



HAL
open science

Contribution de l'intégration du gène blaOXA-48 dans la dissémination des clones ST38 d'Escherichia coli producteurs de carbapénémase

Pengdbamba Dieudonné Zongo

► **To cite this version:**

Pengdbamba Dieudonné Zongo. Contribution de l'intégration du gène blaOXA-48 dans la dissémination des clones ST38 d'Escherichia coli producteurs de carbapénémase. Sciences du Vivant [q-bio]. Sorbonne Université, 2024. Français. NNT : 2024SORUS084 . tel-04639049

HAL Id: tel-04639049

<https://theses.hal.science/tel-04639049>

Submitted on 8 Jul 2024

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.



Sorbonne Université

École doctorale Complexité du Vivant ED515

Institut Pasteur département de Microbiologie

Équipe : Écologie et Évolution de la Résistance aux Antibiotiques

Contribution de l'intégration du gène *bla*_{OXA-48} dans la dissémination des clones ST38 d'*Escherichia coli* producteurs de carbapénémase

Par Pengdbamba Dieudonné ZONGO

Thèse de doctorat de Microbiologie

Dirigée par Isabelle ROSINSKI-CHUPIN

Présentée et soutenue publiquement le 25 juin 2024

Devant un jury composé de :

Pr. Guennadi Sezonov	Sorbonne Université	Président
Dr. Luce Landraud	Inserm/APHP	Rapportrice
Dr. Christian Lesterlin	Université Lyon 1	Rapporteur
Dr. Catherine Guynet	Université Toulouse 3	Examinatrice
Pr. Eduardo PC Rocha	Institut Pasteur	Examineur
Dr. Isabelle Rosinski-Chupin	Institut Pasteur	Directrice

Remerciements

J'exprime toute ma gratitude à ma Directrice de thèse, Isabelle Rosinski-Chupin qui m'a donné l'opportunité de travailler sur ce projet. J'ai eu la chance de rencontrer une scientifique rigoureuse et compréhensive qui m'a énormément guidé à chaque étape de ma thèse. Je suis sincèrement reconnaissant pour ton implication totale sur le déroulement de ma thèse. Merci pour la confiance et la liberté que tu m'as données pour explorer mes idées. Je te suis reconnaissant pour ta disponibilité lors de la rédaction du manuscrit malgré les multiples projets que tu devais gérer en même temps. Merci de m'avoir supporté parce que je n'ai pas toujours été ouvert durant les moments difficiles, mais tu as toujours été là pour me soutenir. Ton encadrement a été pour moi un vrai exemple de mentorat. J'ai beaucoup appris en écoutant, en te regardant gérer les pressions multiples en même temps, rédaction des demandes de financement, révisions de papiers, expérimentations à la paillasse. J'espère vraiment qu'on aura l'opportunité de collaborer dans le futur. Merci du fond du cœur Isabelle.

Je remercie grandement Philippe Glaser, le Directeur de l'Unité Écologie et Évolution de la résistance aux antibiotiques (EERA) de m'avoir ouvert les portes de son laboratoire depuis 2019 quand j'étais en Master 1. De l'incubation de mes premiers isolements sur boîte de pétri à la découverte d'un potentiel outil d'édition génétique, tu as toujours été là pour m'écouter, discuter des résultats et imaginer toute sorte d'expérimentations à faire. Je te remercie Philippe pour ton soutien, tes conseils et tes encouragements depuis mon arrivée dans ton labo.

Je remercie l'école doctorale Complexité du Vivant de la Sorbonne Université pour le financement de mon contrat doctoral durant les trois premières années de thèse. Merci au ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche Scientifique et de l'Innovation du Burkina Faso qui via le CIOSPB m'a accordé une allocation doctorale. Je remercie également le Labex IBEID de l'Institut Pasteur qui a financé ma quatrième année de thèse.

Un grand merci à Nicolas Cabanel d'abord pour ses astuces qui m'ont facilité le travail au laboratoire, la formation au séquençage Illumina et les analyses bio-informatiques et surtout d'être toujours là quand j'étais débordé pour m'aider à effectuer ces tâches.

Je remercie Florence Depardieu, du laboratoire de Biologie de Synthèse dirigé par Dr. David Bikard, de m'avoir fait connaître le monde des phages durant ma thèse.

Merci à toi Marie Royer, pour tes idées et tes suggestions nombreuses qui m'ont aidé dans l'avancement de ma thèse. Merci pour ton soutien moral et tes encouragements.

Je remercie les membres du comité de suivi de thèse : le Pr. Guennadi Sezonov, les Drs Guy Franck-Richard, Olivier Tenaillon et Zeynep Baharoglu qui ont suivi de près l'avancement de mon projet et qui m'ont toujours prodigué des conseils tant au niveau scientifique que personnel.

Aux membres actuels et anciens membres de l'Unité EERA notamment Adriana Chiarelli, Ninon Christol, Juliette Bellengier, Gan Min Meijer, Guilhem Royer, Virginie Guérin, Amaya Lehingue, Rafael Patiño-Navarrete, Alexandre Almeida, Reine Bouyssie, Marie-Thérèse Vicente, je vous remercie pour votre soutien, votre aide et vos encouragements.

Je remercie les membres de l'autre partie de l'unité EERA du côté de l'Hôpital Bicêtre particulièrement Thierry Naas pour leur aide et soutien.

A mes amis, Appolinaire Kaboré, merci d'être toujours là pour me prodiguer des conseils et me faire sortir de la routine. Hamadoun Touré, je suis vraiment chanceux de t'avoir rencontré, merci pour ces discussions animées de science et surtout de foot. Antoine Nikiéma, Aristide Ouedraogo, Aziz Yougbaré, Mahamadi Savadogo, Mahamadi Nikiéma, Frédéric Ouedraogo et Sanatou Toé, je vous remercie pour vos encouragements. Mariatou Dramé, Marta Garcia Lopez, Emilie Yab, Cyril Anjou, un grand merci à vous pour votre soutien et vos encouragements. Mireille Elodie Tsitokana et Amandine Ilboudo, merci pour les discussions interminables mais surtout réconfortantes. Je remercie tous mes amis de Saponé surtout ceux de l'arbre à palabre pour les encouragements. Une dédicace spéciale à Nadembèga Fadoul, Kirissi Serge Zongo, Marie Bonaventure Ouedraogo, Cheick Abdoul Rachid Ouedraogo, Gildas Sutoog-nooma Compaoré, Wend Panga Laius Ephrem Ilboudo, merci d'être toujours présents malgré la distance. Je te suis grandement reconnaissant Abel Wend-soo Zongo pour ton soutien, tes feedbacks et tes aides multiples. Je remercie mon oncle et ami Sibiri Adrien Zongo pour les conseils, les vacances à Brest et les encouragements depuis mon arrivée en France. Je te remercie Hadaré Sawadogo de m'avoir accueilli et soutenu depuis le 1^{er} jour en France.

Merci à toi petit frère René pour les aides multiples, le soutien moral, les fous rires.

Je suis reconnaissant envers mes sœurs (Valérie, Eulalie, Djamilatou, Irène et Mouniratou) et mes frères (Fidel, Luc et David) pour les encouragements et les prières.

Merci à toute ma famille particulièrement ma mère de m'avoir toujours rappelé de tenir bon et surtout de profiter de chaque moment. Merci à toi papa pour tout ce que tu as fait pour nous.

Finalement, je remercie vivement les membres de mon jury de thèse : les Drs Luce Landraud et Christian Lesterlin pour avoir accepté d'être mes rapporteurs, la Dr. Cathérine Guynet, et les Prs Eduardo PC Rocha et Guennadi Sezonov, mes examinateurs. À tous merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Table de matières

Remerciements	2
Table de matières	5
Abréviations	8
Table des figures	10
Table des tableaux	12
Introduction	13
Chapitre 1 : Résistance aux β -lactamines chez les Enterobacteriaceae.....	18
1. Les β -lactamines : structure et propriétés physico-chimiques	18
2. Mécanismes de résistance aux β -lactamines	20
2.1. La réduction de la perméabilité de la membrane externe (ME).....	21
2.2. La surexpression des pompes d'efflux	22
2.3. La modification des PLPs et la production de PLPs alternatives.....	23
2.4. La production de β -lactamases	24
2.4.1. β -lactamases de classe A	25
2.4.2. β -lactamases de classe B	26
2.4.3. β -lactamases de classe C	27
2.4.4. β -lactamases de classe D	27
2.4.5. Les inhibiteurs de β -lactamases.....	28
2.4.6. Zoom sur les carbapénémases	29
3. Rôle de la pression antibiotique sur l'apparition et la dissémination de la résistance .	30
4. Impact de la résistance aux antibiotiques sur la santé publique	32
5. Deux exemples d'évolution de la résistance aux carbapénèmes chez <i>E. coli</i>	33
5.1. <i>E. coli</i> ST410.....	33
5.2. <i>E. coli</i> ST131.....	35
Chapitre 2 : Rôle des plasmides dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques	38
1. Mobilité des gènes de résistance	38
1.1. Transposons et rôle dans la dissémination et mobilité des ARGs.....	38
1.2. Autres EGM impliqués dans la résistance : ICE, phages, plasmides.....	43
1.2.1. Les ICEs	43
1.2.2. Les bactériophages	44
2. Les plasmides : écologie et diversification	45
2.1. Écologie des plasmides	47
2.2. Diversification des plasmides.....	48
3. Zoom sur les plasmides conjugatifs	49

3.1.	Groupes d'incompatibilité.....	50
3.2.	Réplication, contrôle de la réplication et régulation du nombre de copies	51
3.3.	Conjugaison et régulation de la conjugaison.....	56
4.	Persistance des plasmides dans les populations bactériennes	59
4.1.	Coût de fitness imposé par les plasmides.....	59
4.2.	Le « plasmid paradox »	60
5.	Systèmes de l'hôte limitant la diffusion des plasmides :	63
5.1.	Les systèmes de restriction modification de l'hôte	64
5.2.	Système CRISPR/Cas de l'hôte	65
5.3.	Les protéines argonautes	66
5.4.	Autres systèmes anti-plasmides de l'hôte	68
	Chapitre 3 : Les plasmides pOXA-48 et l'émergence des clones <i>E. coli</i> ST38 producteurs de carbapénémase OXA-48.....	71
1.	Découverte et origine du plasmide pOXA-48.....	71
1.1.	Découverte des pOXA-48	71
1.2.	Origine des pOXA-48	73
2.	Caractéristiques majeures de pOXA-48.....	74
2.1.	Nombre de copies et rôle du systèmes ParAB- <i>nuc</i> et PemIK.....	74
2.2.	Les transposons composites Tn1999 et Tn6237	75
2.3.	Inactivation du gène <i>tir</i> et son rôle dans la conjugaison des pOXA-48.....	77
2.4.	Diversification des pOXA-48.....	78
2.5.	Coût de fitness de pOXA-48 et stabilité.....	79
3.	Émergence des clones <i>E. coli</i> ST38 producteurs de carbapénémase OXA-48	80
3.1.	Description des souches <i>E. coli</i> ST38	80
3.2.	Les souches ST38 productrices de CTX-M	82
3.3.	Émergence des clones <i>E. coli</i> ST38 producteurs de carbapénémase OXA-48	83
	Objectifs.....	86
	Résultats	88
	Chapitre 1 : Caractérisation des isolats <i>Escherichia coli</i> producteurs de carbapénémases en France entre 2012 et 2015	88
	Chapitre 2 : Études des facteurs impliqués dans l'émergence des lignées <i>Escherichia coli</i> ST38 productrices de la carbapénémase OXA-48	93
	Chapitre 3 : Résultats préliminaires sur l'origine du coût de fitness lié à l'acquisition des plasmides pOXA-48.....	97
1.	Introduction	97

2.	Rôle de la mutation EnvZ-I86L dans le fitness et la CMI au méropénème de ST38_1	98
3.	Coût de fitness des mutants pOXA-48_1 dans la souche ST38_1	101
4.	Coût de fitness lié à l'acquisition du plasmide pKp1-3	102
5.	Discussion et perspectives des résultats préliminaires	104
	Discussion générale et perspectives.....	107
	Matériels et méthodes.....	118
	Références bibliographiques.....	122
	Annexes.....	153

Abréviations

Abi	Abortive infection
ADN	Acide désoxyribonucléique
APAZ	Analogue de PAZ
ApsAB	AntiPlasmid System AB
ARG	Antibiotic resistance gene
ARN	Acide ribonucléique
ARNcr	ARN-CRISPR
ARNi	ARN interference
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BLSE	β -lactamase à spectre étendu
BREX	Bacteriophage exclusion
Cas	CRISPR Associated protein
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNR	Centre national de référence
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CTX-M	Cefotaximase-München
D-Ala	D-alanine
Ddm	DNA-defence modules
DR	Direct repeat
eAgos	Eukaryotic argonautes
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
<i>Ec</i> -CP	<i>E. coli</i> producteur de carbapénémase
EGM	Élément génétique mobile
ERC	Enterobacteriaceae Résistants aux Carbapénèmes
Inc	Incompatibility group
IR	Inverted repeat
IS	Insertion sequence
ME	Membrane externe
MEM	Méropénème
MID	Middle
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide

NAG	N-acétylglucosamine
NAM	Acide N-acétylmuramique
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NDM	New-Delhi metallo- β -lactamase
Omp	Outer membrane protein
OMS	Organisation Mondiale de la santé
OXA	Oxacillinase
pAgos	Prokaryotic argonautes
PAZ	PIWI-Ago-Zwille
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIWI	P-element-induced wimpy testis
PLP	Protéine de liaison à la pénicilline
QRDR	Quinolone resistance-determining regions
RdRP	ARN polymérase ARN dépendant
RM	Restriction-modification
SMC	Structural maintenance of chromosome
SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
THG	Transfert horizontal des gènes
Tn	Transposon

Table des figures

Figure 1 : Introduction des antibiotiques au niveau clinique et chronologie de l'émergence de la résistance	14
Figure 2 : Les effets des antibiotiques bactériostatiques et bactéricides.....	15
Figure 3 : Processus de sélection des bactéries multirésistantes	16
Figure 4 : Structure de β -lactamines et synthèse du peptidoglycane.	20
Figure 5 : Mécanismes de résistance aux β -lactamines.....	22
Figure 6 : Modes d'action des sérine- et métallo- β -lactamases.	25
Figure 7 : Chronologie de l'évolution de la résistance aux antibiotiques chez les souches ST410.	35
Figure 8 : Chronologie de l'évolution de la résistance aux antibiotiques chez les souches ST131	37
Figure 9 : Structures des transposons	39
Figure 10 : Capture de blaCTX-M par l'ISEcp1	40
Figure 11 : Mécanisme de transfert d'un ICE	44
Figure 12 : Mécanismes de transferts horizontaux chez les bactéries.....	46
Figure 13 : Mobilité des plasmides de résistance à travers différents habitats	48
Figure 14 : Structure d'un plasmide conjugatif.....	49
Figure 15 : Réplication theta de type A des plasmides	52
Figure 16 : Réplication RCR du plasmide pT181.	53
Figure 17 : Différents mécanismes de systèmes de partition	55
Figure 18 : Différentes étapes du transfert d'un plasmide F de la donneuse à la receveuse....	58
Figure 19 : Les différents facteurs contribuant au coût de fitness du plasmide	60
Figure 20 : Solutions évolutives et écologiques au « plasmid paradox »	63
Figure 21 : Mécanismes d'action des systèmes de défense Restriction/Modification, CRISPR/Cas et pAgo sur les EGMs	65
Figure 22 : Structure de RsAgo de <i>Rhodobacter sphaeroides</i> et TtAgo de <i>Thermus thermophilus</i>	67
Figure 23 : Mode d'action des systèmes de défense DdmABC et DdmDE.....	70
Figure 24 : Structure des plasmides IncL et IncM.	73
Figure 25 : Capture du gène blaOXA-48 à partir du chromosome de <i>Shewanella spp.</i>	74
Figure 26 : Variants des différents Tn1999 retrouvés dans les plasmides pOXA-48	76

Figure 27 : Environnements génétiques de Tn1999 et ses variants dans différents variants de pOXA-48 et l'insertion de Tn6237 dans le chromosome.	77
Figure 28 : Variations de fitness liée à l'acquisition du même plasmide pOXA-48 dans différents fonds génétiques <i>E. coli</i> et <i>Klebsiella spp</i>	80
Figure 29 : Carte de distribution épidémiologique des souches ST38.....	82
Figure 30 : Algorithme de recherches des ERCs producteurs de carbapénémases.....	89
Figure 31 : Représentation schématique d'EnvZ dans l'enveloppe cellulaire.....	99
Figure 32 : Mesure du coût de fitness, de la CMI du mutant EnvZ186L ainsi que la stabilité de pOXA-4_1	100
Figure 33 : Mesure du coût de fitness des mutanst de délétion pOXA-4_1 dans ST38.....	102
Figure 34 : Mesure du coût de fitness et de la stabilité de pKp1-3 dans ST38_1	103

Table des tableaux

Tableau 1 : Inhibiteurs de β -lactamases : structure, combinaisons et cibles.....	29
Tableau 2 : Exemples de transposons composites et non-composites portant des ARGs.....	42
Tableau 3 : Amorces et plasmides utilisés dans cette étude.....	121

Introduction

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé à la résistance aux antibiotiques chez *Escherichia coli* particulièrement à la résistance aux carbapénèmes dans la séquence type 38 (ST38) d'*E. coli*. Les carbapénèmes sont des β -lactamines de dernière génération, utilisés dans le traitement des infections à bactéries Gram négatives multirésistantes aux antibiotiques. Ce phénomène de résistance constitue un problème majeur de santé publique au niveau mondial.

Le terme antibiotique a été initialement défini par Waksman en ces termes : « An antibiotic is a chemical substance, produced by micro-organisms, which has the capacity to inhibit the growth of and even to destroy bacteria and other micro-organisms ». Littéralement, un antibiotique est une substance chimique produite par des micro-organismes, qui a la capacité d'inhiber la croissance et même d'entraîner la destruction des bactéries et d'autres micro-organismes (Waksman 1947). C'est à Alexander Fleming que l'on attribue la découverte du premier antibiotique, la pénicilline, en 1928 (Fleming, 1929). Mais des molécules à activité antibactérienne ont été utilisées bien avant. C'est le cas, par exemple, du salvarsan (arsphénamine) utilisé contre *Treponema pallidum*, l'agent causal de la syphilis, synthétisé chimiquement par le scientifique allemand Paul Ehrlich au début du vingtième siècle (Ehrlich et Hata 1910). L'analyse de squelettes venant d'individus de la civilisation nubienne (Actuel Soudan), une ancienne civilisation africaine entre 350 et 550, a même révélé une exposition à la tétracycline, posant la question d'une ingestion accidentelle ou à visée thérapeutique des micro-organismes producteurs d'antibiotiques tels que les espèces du genre *Streptomyces* (Bassett et al. 1980; Nelson et al. 2010).

Dans le passé, les maladies infectieuses d'origine bactérienne ont provoqué des pandémies et des épidémies mortelles à travers le monde. Au début du moyen âge la première pandémie de peste provoquée par la bactérie à Gram négatif *Yersinia pestis* a causé plus de 100 millions de morts dans l'empire romain. La deuxième pandémie de peste qui a duré en Europe jusqu'au début du XIX^{ème} siècle a causé la mort d'environ 200 millions de personnes (Piret et Boivin 2021). *Vibrio cholerae* a causé jusqu'à ce jour sept pandémies différentes à l'origine d'une forte mortalité dans les zones affectées (Piret et Boivin 2021). La gravité de ces pandémies est directement liée à l'absence de traitement efficace durant ces périodes. Ainsi, l'avènement des antibiotiques va largement contribuer à contrôler et surtout à soigner les infections causées par

ces bactéries pathogènes. La découverte de la pénicilline va définitivement révolutionner la lutte contre les maladies infectieuses en plus de contribuer au développement de la médecine moderne. Entre 1940 et 1960, avec la caractérisation d'une panoplie de nouveaux antibiotiques de différentes classes, efficaces contre les bactéries pathogènes, l'humanité vivait « l'âge d'or » des antibiotiques (Hutchings, Truman, et Wilkinson 2019; Stadler et Dersch 2016). Mais au-delà des années 1970, très peu de nouvelles molécules sont découvertes. À cela s'ajoute l'apparition et la propagation de la résistance aux antibiotiques qui rend difficile les traitements de certaines infections bactériennes (Figure. 1). (Aminov 2010; Hutchings, Truman, et Wilkinson 2019)

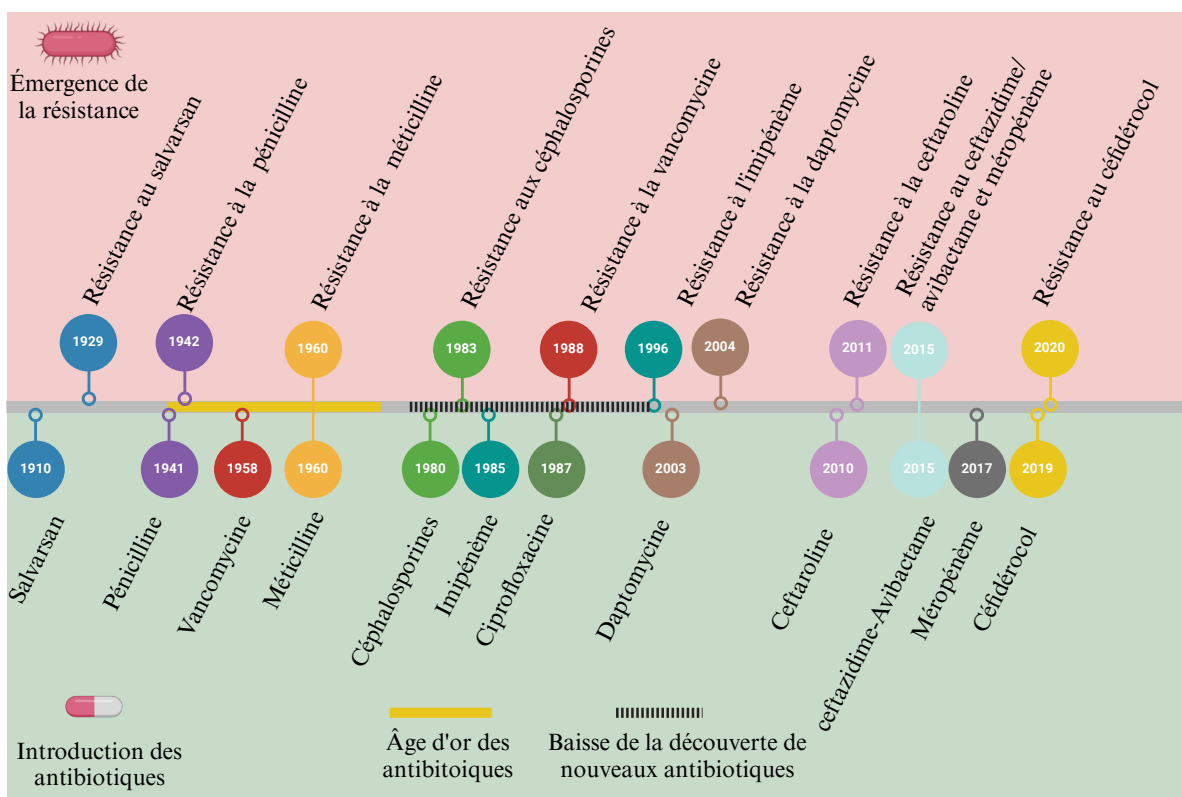


Figure 1 : Introduction des antibiotiques au niveau clinique et chronologie de l'émergence de la résistance. Figure réalisée avec Biorender.

Les antibiotiques sont généralement classés en antibiotiques bactériostatiques ou bactéricides. Les antibiotiques bactéricides tuent la bactérie à la concentration utilisée et les antibiotiques bactériostatiques provoquent l'arrêt de la croissance bactérienne sans pour autant causer la mort (Figure. 2). Les antibiotiques bactériostatiques ciblent généralement les sous-unités du complexe ribosomal nécessaires à la synthèse protéique. Les tétracyclines, les macrolides, la

clindamycine, la combinaison triméthoprime/sulfaméthoxazole, le linézolide et le chloramphénicol sont généralement des classes d'antibiotiques bactériostatiques. Les modes d'actions de ces molécules varient en fonction de leur classe : les tétracyclines inhibent la sous-unité 30S du ribosome, les macrolides, la clindamycine, le linézolide et le chloramphénicol inhibent la sous-unité 50S au niveau de différents sites (M. Patil et Patel 2021). Contrairement aux classes précédentes qui inhibent la synthèse protéique, la combinaison triméthoprime/sulfaméthoxazole inhibe la synthèse de l'acide folique, un cofacteur nécessaire à la synthèse des thymidines, des purines et de l'ADN (Masters et al. 2003). Les antibiotiques bactéricides sont caractérisés par leur capacité à provoquer la mort bactérienne (Figure. 2). Ils appartiennent à la classe des β -lactamines, des aminoglycosides, des fluoroquinolones, des polymyxines et la fosfomycine. Ils ciblent différentes fonctions essentielles de la bactérie : la synthèse du peptidoglycane essentielle au maintien de la structure cellulaire pour les β -lactamines et la fosfomycine, la réplication de l'ADN pour les fluoroquinolones, la synthèse protéique pour les aminoglycosides. Les polymyxines perturbent l'intégrité de la membrane externe (M. Patil et Patel 2021).

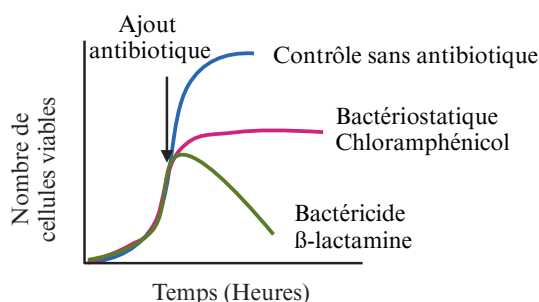


Figure 2 : Les effets des antibiotiques bactériostatiques et bactéricides. Figure créée à partir de Biorender.

La résistance survient lorsqu'une bactérie susceptible à un antibiotique acquiert des mutations ou des gènes de résistance (ARG) provoquant une baisse de l'efficacité de l'antibiotique. Une concentration plus élevée est alors requise pour produire le même effet (Brauner et al. 2016). La susceptibilité à un antibiotique est évaluée en mesurant la concentration minimale inhibitrice (CMI) suivant les recommandations du « Clinical and Laboratory Standards Institute » (CLSI)¹ aux Etats Unis ou de l'EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) en Europe. La concentration active de l'antibiotique dans un organisme étant limitée par différents paramètres, notamment pharmacodynamiques, l'EUCAST a défini des seuils

¹https://clsi.org/media/pjfbvqiql/m100ed34e_sample.pdf

pour les CMI, au-delà desquels le traitement risque d'être inefficace. Ces seuils (breakpoints) permettent de classer les bactéries testées comme susceptibles, intermédiaires (aujourd'hui remplacé par « Zones d'Incertitude Technique ») ou résistantes à l'antibiotique². Au-dessus de ce seuil, une autre alternative thérapeutique doit être mise en place en utilisant une autre molécule antibiotique à laquelle la bactérie est susceptible. Chaque antibiotique exerce une pression de sélection différente pouvant conduire à l'accumulation de mutations et/ou l'acquisition d'ARG rendant la bactérie multirésistante (Figure. 3). Une bactérie est multirésistante lorsqu'elle est non-susceptible à au moins un antibiotique dans au moins trois classes différentes d'agents antimicrobiens (Magiorakos et al. 2012). Ce sont les bactéries multirésistantes qui constituent la plus grande menace clinique.

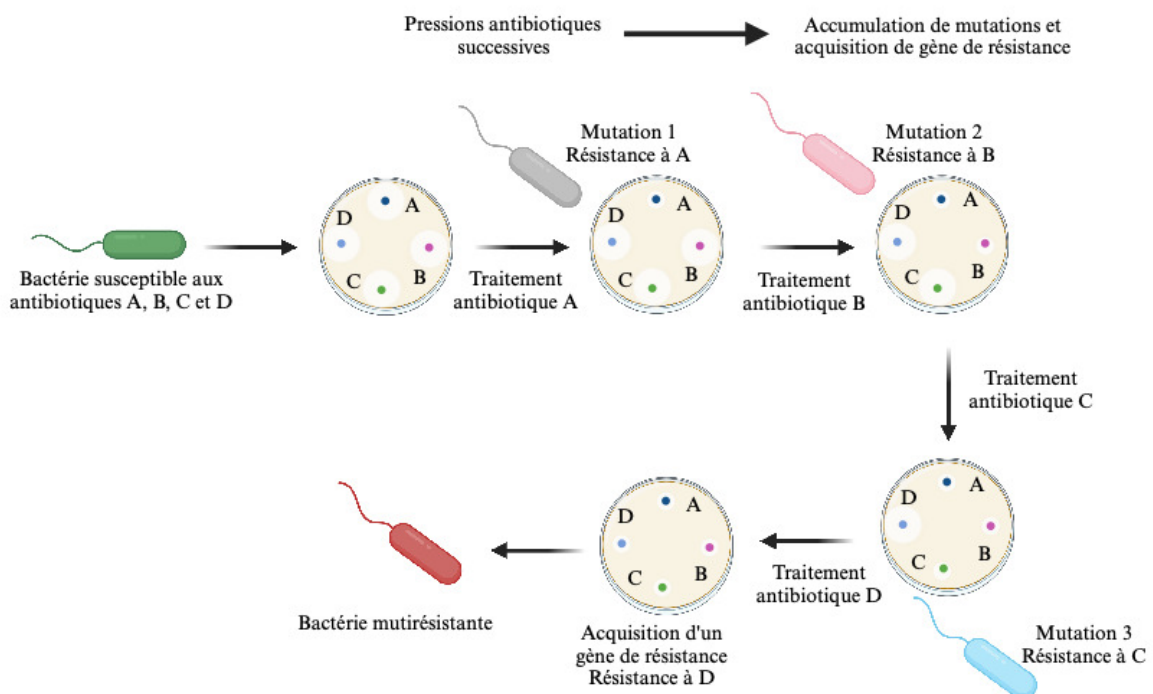


Figure 3 : Processus de sélection des bactéries multirésistantes. Figure créée à partir de Biorender.

Parmi les pathogènes multirésistants aux antibiotiques ceux du groupe ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter spp*) sont particulièrement redoutés (De Oliveira et al. 2020). *K. pneumoniae* est une espèce opportuniste à l'origine de nombreuses infections nosocomiales ainsi que, en dehors du milieu hospitalier, de pneumonies et méningites, (Wyres,

²The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 14.0, 2024. <http://www.eucast.org>.

Lam, et Holt 2020). *K. pneumoniae* appartient à la famille des Enterobacteriaceae, comportant d'autres espèces très connues en médecine humaine et vétérinaire, notamment *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp*, *Salmonella spp* et *Shigella spp* (Adeolu et al. 2016).

Les Enterobacteriaceae pathogènes ou opportunistes posent de sérieux problèmes au niveau clinique à cause de l'émergence de la mutirésistance aux antibiotiques y compris aux β -lactamines de dernière génération que sont les carbapénèmes (Partridge 2015). On considère qu'elles sont responsables d'environ 30% des infection nosocomiales (Satlin et al. 2017). Le groupe des Enterobacteriaceae résistants aux carbapénèmes (ERC) a été classée par l'organisation mondiale de la Santé (OMS) de priorité critique pour le développement de nouveaux antibiotiques ou de nouvelles alternatives thérapeutiques (Tacconelli et al. 2018). Le mécanisme principal de la résistance aux antibiotiques chez les Enterobacteriaceae est l'acquisition des ARGs par transfert horizontal, particulièrement à travers la mobilité des plasmides portant ces gènes (Partridge 2015). *K. pneumoniae* et *E. coli* sont fréquemment retrouvés dans les données épidémiologiques et contiennent généralement des plasmides porteurs de différents ARGs à l'origine de la multirésistance (Satlin et al. 2017).

Chapitre 1 : Résistance aux β -lactamines chez les Enterobacteriaceae

1. Les β -lactamines : structure et propriétés physico-chimiques

Les β -lactamines sont les antibiotiques les plus prescrits au monde à cause de leur faible toxicité, leur efficacité et leur spectre d'action très large. Aux États-Unis, elles représentent 65% des prescriptions des antibiotiques injectables (Karen Bush et Bradford 2016). La pénicilline produite par *Penicillium notatum* fût la première β -lactamine découverte par Alexander Fleming en 1928 (Fleming, 1929). Sa structure a été résolue en 1949 par Dorothy Hodgkin (Hodgkin 1949). Par la suite, les recherches de molécules antibiotiques produites par les micro-organismes ont permis la découverte d'autres molécules de β -lactamines regroupées en quatre familles : d'une part, les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes qui sont des molécules bicycliques et d'autre part, les monobactames qui sont monocycliques (Figure. 4a). Ces molécules se différencient entre elles par leur structure, leur spectre d'activité et leurs cibles (Karen Bush et Bradford 2016). Leur point commun au niveau de la structure est le noyau β -lactame qui est essentiel à leur activité antibiotique (Figure. 4a). La découverte de la structure des β -lactamines a été à l'origine du développement par hémisynthèse de nouvelles molécules dérivées de β -lactamines naturelles, plus efficaces avec un large spectre d'activité (Tooke et al. 2019). Elle a aussi permis la découverte du mode d'action des β -lactamines par Tipper et Strominger en 1965 (Tipper et Strominger 1965).

Les β -lactamines inhibent la synthèse du peptidoglycane. Le peptidoglycane est une structure cellulaire essentielle de l'enveloppe cellulaire des bactéries. Il est localisé dans le périplasme des bactéries à Gram négatif entre la membrane interne et la membrane externe. Le peptidoglycane est constitué de polymères de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) reliés entre eux par des ponts peptidiques. L'assemblage des polymères polysaccharidiques se fait par un processus de transglycosylation. Chez les bactéries Gram négatives un pentapeptide L-Ala-D-Glu-m-DAP-D-Ala-D-Ala lié de façon covalente au NAM par la L-Ala est essentiel à la formation des ponts peptidiques par transpeptidation (Figure. 4b). Le m-DAP (méso-diaminopimélate) du NAM du nouvel hétérodimère NAM-NAG à incorporer dans le polymère forme un pont peptidique par transpeptidation en se liant au quatrième acide aminé D-Ala du pentapeptide du peptidoglycane naissant (Figure. 4b). La

synthèse du peptidoglycane est catalysée par les protéines liant les pénicillines (PLPs) dont l'activité transglycosylase catalyse la transglycosylation entre le NAG et le NAM pour former les polysaccharides et l'activité transpeptidase forme des ponts peptidiques entre les polysaccharides. Certaines PLPs possèdent une activité carboxypeptidase qui clive le dernier D-Ala du pentapeptide du peptidoglycane naissant après la transpeptidation. La rigidité du peptidoglycane renforce la structure de l'enveloppe cellulaire permettant ainsi de maintenir la structure de la bactérie (Lima et al. 2020; Macheboeuf et al. 2006). Les β -lactamines ont une structure similaire au dipeptide D-Ala-D-Ala du pentapeptide (Figure. 4c). De ce fait, elles se lient avec une affinité variable aux PLPs catalysant la transpeptidation (Figure. 4b). Dans une bactérie, on trouve au moins quatre PLPs différentes qui interviennent à différentes étapes de la division cellulaire et une β -lactamine peut cibler une ou plusieurs PLPs causant des dommages divers lors de la croissance bactérienne (Sauvage et al. 2008). Brièvement, la sérine du site actif des transpeptidases effectue une attaque nucléophile sur le noyau β -lactame formant par acylation un complexe dont l'hydrolyse est très lente par rapport au temps de génération de la bactérie. Ceci entraîne un arrêt de la synthèse du peptidoglycane fragilisant ainsi la structure de l'enveloppe cellulaire et ultimement conduisant à la mort de la bactérie (Tipper et Strominger 1965; Tooke et al. 2019). Les β -lactamines peuvent également induire une activité lytique des transglycosylases entraînant une destruction du peptidoglycane (H. Cho, Uehara, et Bernhardt 2014). L'effet bactéricide des β -lactamines dépend de la concentration de l'antibiotique qui doit être supérieure à la CMI et du temps d'action. Le problème majeur liée à l'utilisation de ces molécules est le développement de la résistance particulièrement la dégradation par les β -lactamases (Karen Bush et Bradford 2016).

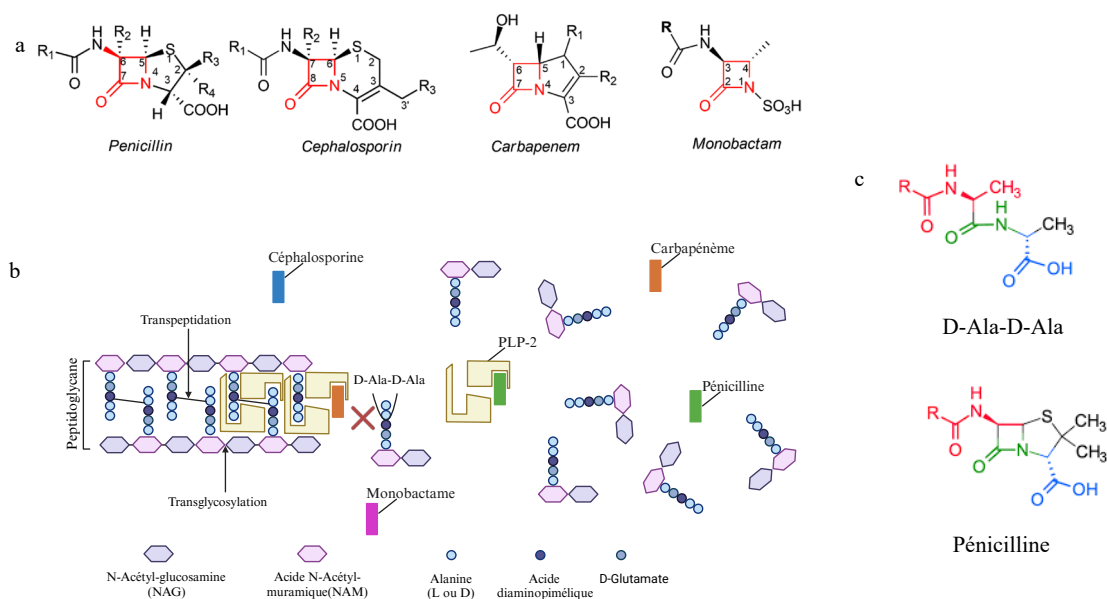


Figure 4 : Structure de β -lactamines et synthèse du peptidoglycane. a. Structures des β -lactamines. Le noyau β -lactame est coloré en rouge. Issue de (De Rosa et al. 2021). **b.** Synthèse du peptidoglycane chez les bactéries à Gram négatif. Les différents composants importants sont indiqués ainsi que la liaison de β -lactamines aux PLPs. Figure générée à partir de Biorender. **c.** Similarité de structure entre le D-Ala-D-Ala et le noyau β -lactame de la pénicilline³.

2. Mécanismes de résistance aux β -lactamines

Pour survivre à l'activité bactéricide des β -lactamines, les bactéries ont développé différents mécanismes de résistance à ces molécules. Quatre mécanismes de résistance ont été particulièrement étudiés : 1) la réduction de la perméabilité de la membrane externe (pour les bactéries à Gram négatif) par la modification de la structure des porines ou la délétion des gènes codant pour ces protéines ; 2) la modification des PLPs et la production de PLPs alternatives ; 3) la surexpression des pompes d'efflux et surtout 4) la dégradation de ces molécules par les β -lactamases. Ce dernier est le principal mécanisme de résistance aux β -lactamines chez les bactéries Gram négatives. Il est à noter qu'il est rare qu'un seul mécanisme puisse induire une forte résistance, c'est la combinaison de ces différents mécanismes qui est à l'origine d'une résistance élevée aux β -lactamines rencontrée chez les Enterobacteriaceae.

³<https://nhsjs.com/2021/beta-lactam-antibiotics-the-past-present-and-future/>

2.1. La réduction de la perméabilité de la membrane externe (ME)

La ME localisée à la surface des bactéries Gram négatives est une bicouche asymétrique constituée d'un feuillet externe majoritairement composé de lipopolysaccharides et d'un feuillet interne majoritairement composé de phospholipides. Les lipopolysaccharides du feuillet externe forment une barrière imperméable aux molécules toxiques hydrophobes faisant ainsi de la ME une barrière naturelle contre le passage des molécules comme les antibiotiques chez les bactéries Gram négatives. Les porines, des protéines transmembranaires de la ME permettent le passage des nutriments et des antibiotiques vers le périplasme (Nikaido 2003). Il existe deux porines majeures chez les Enterobacteriaceae, nommées OmpF et OmpC chez *E. coli*. Ce sont des protéines trimériques constituées de seize feuillets β et formant des canaux cylindriques (Nikaido 2003). Le système à deux composants OmpR-EnvZ est le régulateur principal de l'expression des gènes *ompC* et *ompF* codant pour ces porines (Kenney et Anand 2020; Nikaido 2003). Les inactivations complètes des gènes de porines contribuent à la résistance aux β -lactamines (Figure. 5) (Darby et al. 2023; J. F. Fisher, Meroueh, et Mobashery 2005). Par exemple chez *P. aeruginosa* la perte de la porine OprD est le mécanisme prédominant de la résistance aux carbapénèmes (Cavallo et al. 2004). Certaines mutations réduisent la taille du canal des porines entraînant une réduction de la perméabilité aux β -lactamines. C'est le cas de l'insertion GD dans la boucle L3 de OmpK36 associée à la délétion d'OmpK35 chez *K. pneumoniae* (les homologues de OmpC et OmpF respectivement chez *K. pneumoniae*) qui entraîne une augmentation de la CMI au méropénème de huit fois (Wong et al. 2019). Les mutations entraînant une sous-expression des porines comme la mutation G63S chez OmpR contribuent également à la résistance aux β -lactamines (Figure. 5) (Kong et al. 2018).

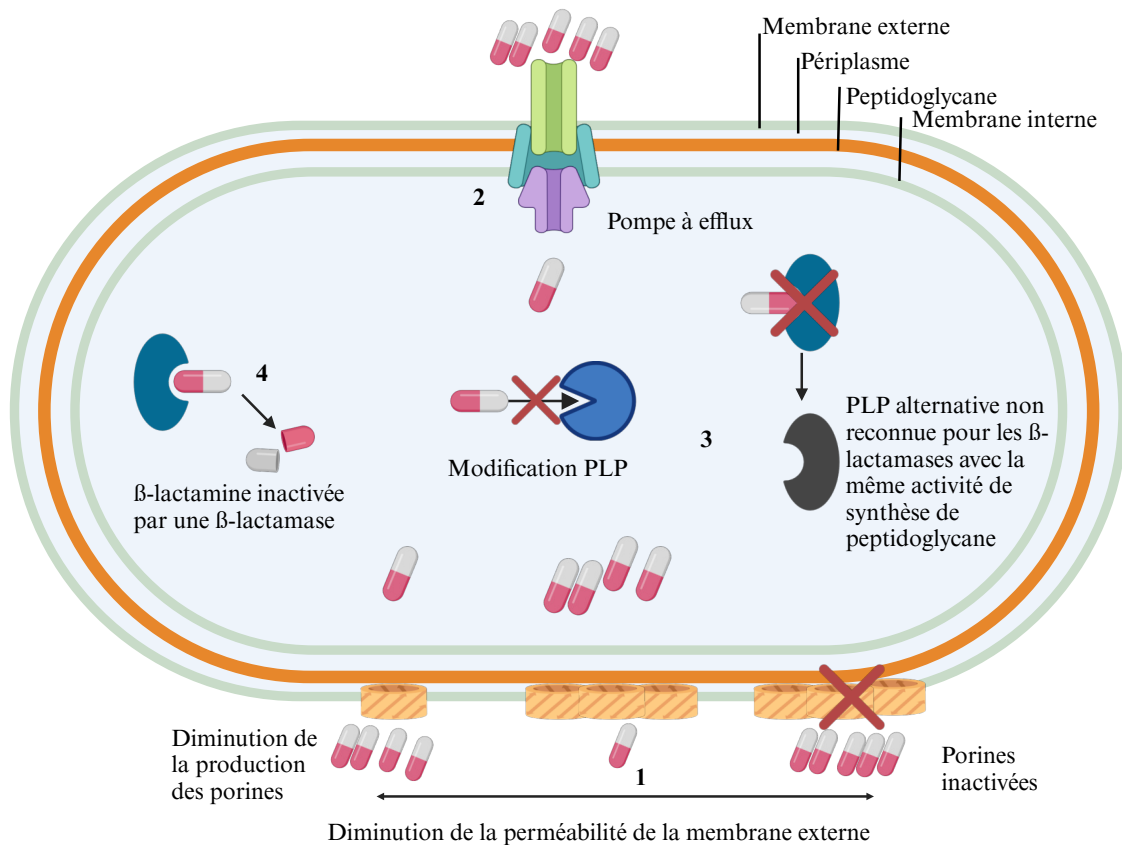


Figure 5 : Mécanismes de résistance aux β -lactamines. 1) Inactivations et sous-expression des gènes de porines. 2) Surexpression de pompes à efflux. 3) Modifications des PLPs et synthèse de PLPs alternatives (Mécanisme de résistance observé dans le périplasm). 4) Hydrolyse par les β -lactamases (Se produit dans le périplasm). Figure créée à partir de Biorender.

2.2.La surexpression des pompes d’efflux

Les pompes d’efflux sont des protéines transmembranaires faisant la liaison entre le cytoplasme bactérien et l’espace extracellulaire. Elles permettent d’exporter les composés toxiques y compris les antibiotiques accumulés dans la bactérie ou pour certains dans le périplasm. Par exemple, la pompe d’efflux AcrAB-TolC prédominante chez les Entérobactéries peut expulser des antibiotiques comme le chloramphénicol, les tétracyclines, les quinolones, les macrolides et les β -lactamines (Figure. 5) (Alav et al. 2021). De façon générale, chez les bactéries Gram négatives, la surexpression des pompes d’efflux est un mécanisme important de la résistance aux antibiotiques. L’association de ce mécanisme avec la diminution de la perméabilité de la membrane externe est à l’origine de l’apparition de bactéries multirésistantes à différents

antibiotiques (Darby et al. 2023; J. F. Fisher, Meroueh, et Mobashery 2005). L'expression des pompes d'efflux est régulée par des répresseurs dont l'inactivation entraîne la surexpression des gènes codant pour ces pompes d'efflux. Cette surexpression permet d'expulser le plus efficacement possible les molécules antibiotiques toxiques pour les bactéries (Salehi et al. 2021). La famille RND (résistance-nodulation-division) de pompes d'efflux confère les phénotypes de résistance les plus importants au niveau clinique lorsqu'elles sont surexprimées (Alav et al. 2021). Par exemple chez *P. aeruginosa*, l'inactivation du répresseur *mexR* entraîne une augmentation de la synthèse de la pompe MexAB-OprM capable d'exporter des antibiotiques de différentes classes y compris les β -lactamines (Masuda et al. 2000; Zahedi Bialvaei et al. 2021). Chez les Enterobacteriaceae, l'inactivation de *marR* entraîne une hyperproduction de l'activateur transcriptionnel MarA (multiple antibiotic resistance) qui entraîne à la fois une surproduction de la pompe AcrAB-TolC et une réduction de la quantité de la porine majeure OmpF (Chubiz et Rao 2011; Nikaido 1998)

2.3. La modification des PLPs et la production de PLPs alternatives

Les β -lactamines en se liant aux PLPs inhibent la synthèse du peptidoglycane indispensable à la formation de la paroi cellulaire. La modification des PLPs réduit l'affinité des β -lactamines à ces enzymes sans affecter de manière significative leur activité enzymatique nécessaire à la synthèse du peptidoglycane (Figure. 5). Par exemple, la mutation de PLP2 chez un isolat *E. coli* producteur de la carbapénémase NDM-1 entraîne une réduction de la susceptibilité aux carbapénèmes (Ranjitkar et al. 2019; Sethuvel et al. 2023). La modification de PLP3 contribue à la résistance aux céphalosporines chez *E. coli* (Freire et al. 2024; Patiño-Navarrete et al. 2020). La synthèse de PLPs alternatives est un mécanisme très répandu chez les bactéries à Gram positif dans la résistance aux β -lactamines, comme la PLP2a alternative MecA chez *S. aureus* (Darby et al. 2023). Cependant, quelques systèmes similaires ont été générés au laboratoire chez les bactéries Gram négatives notamment chez *E. coli*. En effet, la transpeptidation lors de la synthèse du peptidoglycane est classiquement catalysée par les PLPs à activité D-D-transpeptidase ciblées par les β -lactamines. Cependant la surproduction de YcbB à activité L-D-transpeptidase catalyse, à la place des PLPs D-D-transpeptidase, ces réactions de transpeptidation sans être inhibée par les β -lactamines à l'exception des carbapénèmes (Figure. 5) (Caveney et al. 2019; Hugonnet et al. 2016).

2.4. La production de β -lactamases

La dégradation des β -lactamines par les β -lactamases par hydrolyse du noyau β -lactame est le mécanisme principal de la résistance aux β -lactamines chez les bactéries Gram négatives. L'affinité pour les molécules de β -lactamines varie selon les β -lactamases. Il existe deux classifications différentes des β -lactamases. La classification moléculaire de Ambler, basée sur la séquence protéique, organise les β -lactamases en quatre classes moléculaires (A, B, C et D) (Ambler, 1980). La classification fonctionnelle de Bush-Jacoby-Medeiros groupe les β -lactamases selon la similarité d'hydrolyse des substrats et la réponse aux différents inhibiteurs de β -lactamase (K Bush, Jacoby, et Medeiros 1995; Karen Bush et Jacoby 2010). Dans la classification de Ambler, les β -lactamases des classes A, C et D sont des sérine- β -lactamases et la classe B correspond aux métallo- β -lactamases (Ambler, 1980). Les sérine- β -lactamases sont très diverses au niveau de leurs séquences protéiques, cependant elles partagent une propriété commune d'inactivation des β -lactamines par acylation-déacylation du résidu sérine de la β -lactamase (Figure. 6a). Les sérine- β -lactamases, partageant des similarités structurelles avec les PLPs dériveraient de ces protéines (Kelly et al. 1986). Les métallo- β -lactamases (classe B) se caractérisent par une hydrolyse zinc-dépendante du noyau β -lactame (Figure. 6b) (Karen Bush et Bradford 2019). La classe B est subdivisée en 3 sous-groupes (B1-B3) sur la base des acides aminés formant l'architecture du centre métal (Tooke et al. 2019). Selon la dernière mise à jour de la base de données des β -lactamases (<http://bldb.eu/>, 23/06/2024), il existe 8208 β -lactamases différentes enregistrées : 1972 de classe A, 606 de classe B1, 24 de classe B2, 309 de classe B3, 3824 de classe C et 1276 de classe D (Naas et al. 2017).

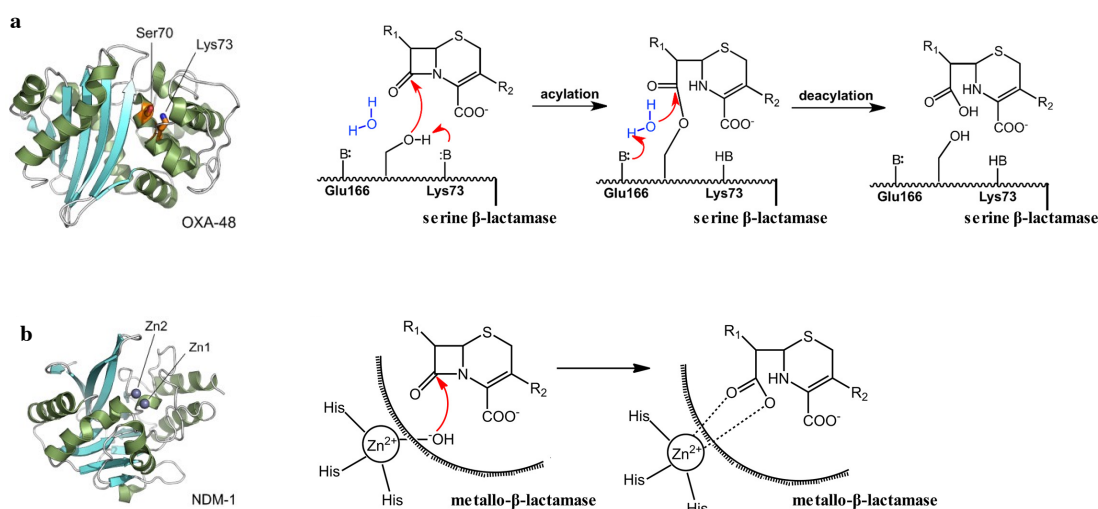


Figure 6 : Modes d'action des sérine- et métallo-β-lactamases. **a.** Hydrolyse de la β-lactamine en deux étapes par les sérine-β-lactamases de la classe A, C et D. Les éléments clés y compris les acides aminés importants sont indiqués. **b.** Hydrolyse d'une β-lactamine par une métallo-β-lactamase de classe B. Un seul ion Zn²⁺ est indiqué ici, cependant d'autres métallo-β-lactamases possèdent deux ions Zn²⁺ au niveau du site actif. Adapté à partir de (Y. He et al. 2020; Tooke et al. 2019).

2.4.1. β-lactamases de classe A

La classe A des sérine-β-lactamases est la plus répandue et comprend des enzymes comme PC1, SHV, TEM, CTX-M et KPC (Tooke et al. 2019). TEM-1 est la première β-lactamase codée par un plasmide découverte chez les bactéries Gram négatives. Elle est active contre les pénicillines et les céphalosporines de première génération (Datta et Kontomichalou 1965). L'introduction des oxyiminocéphalosporines non ciblées par TEM-1 va entraîner une sélection d'une série de mutants de TEM à spectre élargi capables d'hydrolyser ces molécules. Il existe plus de 200 variants de TEM à ce jour (Palzkill 2018). SHV (sulhydryl variant) a une activité similaire à TEM mais est codée sur le chromosome de *K. pneumoniae* puis a été ensuite mobilisée sur des plasmides (Chaves et al. 2001). Plusieurs variants de SHV capables d'hydrolyser les oxyiminocéphalosporines ont été sélectionnés (Tooke et al. 2019). CTX-M abrégé de cefotaximase-München est une enzyme capable d'hydrolyser les oxyiminocéphalosporines. Initialement décrite dans les années 1990 (Bauernfeind, Schweighart, et Grimm 1990),

l'accumulation des mutations par CTX-M va générer des variants qui ont des activités à spectre élargi (Palzkill 2018). Les KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) sont des carbapénémases décrites pour la première fois chez *K. pneumoniae* (Rapp et Urban 2012). Les KPC sont diversifiées suite à des substitutions et hydrolysent à la fois les pénicillines, les céphalosporines et les carbapénèmes (Palzkill 2018). Certains variants de SHV, TEM, CTX-M et KPC sont des β -lactamases à spectre élargi communément appelées BLSEs qui posent de sérieux problèmes au niveau clinique par leur capacité à dégrader différentes β -lactamines. Le succès de ces enzymes est particulièrement lié à leur mobilisation sur les plasmides qui favorisent leur dissémination particulièrement chez les Enterobacteriaceae (Palzkill 2018; Tooke et al. 2019).

2.4.2. β -lactamases de classe B

Les métallo- β -lactamases les plus répandues sont VIM, NDM, IMP et leurs variants. Leur capacité à hydrolyser presque toutes les β -lactamines sauf les monobactames posent de sérieux problèmes au niveau clinique (Karen Bush et Bradford 2019). Elles sont toutes capables de dégrader les carbapénèmes. Certaines de ces enzymes sont codées par des plasmides contenant déjà des gènes de résistance à d'autres antibiotiques, ce qui a facilité leur dissémination globale et surtout le développement d'une multirésistance aux antibiotiques (Karen Bush et Bradford 2019). IMP-1 a été caractérisée en 1988 (M. Watanabe et al. 1991). De nos jours plus de 100 variants d'IMP-1 ont été décrits, constituant la principale cause de résistance aux carbapénèmes dans les pays d'Asie du Sud-Est (Naas et al. 2017; Pongchaikul et Mongkolsuk 2022). VIM-1 a été décrite en 1999 (Lauretti et al. 1999). Plus de 86 variants ont été recensés de nos jours, VIM-1 étant le plus répandu (Naas et al. 2017). Les enzymes type VIM sont généralement présentes sur les intégrons de classe 1 avec d'autres ARGs (Villa et al. 2014). NDM-1 a été initialement découverts en 2007 chez *K. pneumoniae* (Yong et al. 2009) et compte plus de 60 variants à ce jour (Naas et al. 2017). Les métallo- β -lactamases sont produites chez les bactéries pathogènes Gram négatives cliniquement importantes tels que les Enterobacteriaceae, *P. aeruginosa* et les espèces *Acinetobacter* (Zakhour, El Ayoubi, et Kanj 2024). On trouve également dans cette classe des enzymes moins répandues et localisées dans certaines zones du monde telles que les SPM (Sao Paulo metallo- β -lactamase) et GIM (german iminepenmase) trouvées chez *P. aeruginosa* au Brésil et en Allemagne (Karen Bush et Bradford 2019).

2.4.3. β -lactamases de classe C

La classe C des β -lactamases comprend les enzymes AmpC et ses différents variants. Ces enzymes confèrent une résistance à presque toutes les céphalosporines y compris les céphalosporines à spectre élargi comme la ceftazidime, la cefotaxime et la ceftriaxone, ainsi que les céphamycines comme la céfoxitine (Jacoby 2009). Ce sont des β -lactamases chromosomiques très souvent retrouvées dans les bactéries Gram négatives cliniquement importantes comme *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens* et *P. aeruginosa*. L'expression basale des AmpC chromosomiques est faible, cependant l'ajout de β -lactamines entraîne une induction de l'expression de ces enzymes (Jacoby 2009). Elles peuvent également être constitutivement exprimées suite à des mutations dans le gène de l'amidase *ampD* (Schmidtke et Hanson 2006) ou du régulateur *ampR* (Kaneko et al. 2005). Il existe également des variants de AmpC codés sur des plasmides comme CMY-1, MIR, ACT et DHA qui sont globalement disséminés (Karen Bush et Bradford 2019). Selon une étude européenne récente, les bactéries du groupe ESCPM (*E. aerogenes*, *Serratia spp.*, *C. freundii* complex, *Providencia spp.* et *Morganella morganii*) surproduisant les AmpC sont les plus répandues en Europe avec une prévalence de 15,8% devant les BLSEs (6,4%) et les carbapénémases (3,1%) (Boattini et al. 2024).

2.4.4. β -lactamases de classe D

Les β -lactamases de classe D sont aussi appelées oxacillinases à cause de leur capacité à mieux hydrolyser les oxacillines que les pénicillines (Karen Bush et Bradford 2019). Les enzymes de cette classe sont très diverses par leurs cibles et leurs séquences protéiques. On y trouve de nombreuses BLSEs suite à différentes mutations apparues dans le gène *bla_{OXA-10}* (Evans et Amyes 2014). Les gènes codant ces enzymes peuvent être présents sur les chromosomes des bactéries et les plasmides qui facilitent leur dissémination (Evans et Amyes 2014; J. D. D. Pitout et al. 2019). En plus des BLSEs, cette classe comprend aussi des carbapénémases cliniquement importantes que sont OXA-48 et OXA-23 et leurs dérivés qui ont la capacité de dégrader les carbapénèmes (Evans et Amyes 2014; J. D. D. Pitout et al. 2019). OXA-48 et son gène seront discutés en détail dans le chapitre 3 de cette introduction « Les plasmides pOXA-48 et l'émergence des clones *E. coli* ST38 producteurs de carbapénémase OXA-48 »

2.4.5. Les inhibiteurs de β -lactamases

L'action thérapeutique des β -lactamines est menacée par l'émergence et la dissémination des β -lactamases. Ce qui limite le choix des β -lactamines utilisables dans l'antibiothérapie des bactéries exprimant des β -lactamases, notamment des BLSEs. Dans certains cas, le développement d'inhibiteurs de β -lactamases a permis une réutilisation du répertoire bien fourni des β -lactamines (Tableau. 1). Les premiers inhibiteurs utilisés sont des molécules structurellement proches des β -lactamines avec la capacité de se lier aux β -lactamases par acylation sur la sérine provoquant un intermédiaire inactif. L'acide clavulanique est le premier inhibiteur de β -lactamase découvert ciblant les β -lactamases TEM-1 et PC1 (Reading et Cole 1977). La découverte du mécanisme d'action de l'acide clavulanique a permis la synthèse de dérivés sulfone de β -lactamines dont le sulbactame et le tazobactame (K Bush et al. 1993; J. Fisher et al. 1981). L'amoxicilline-acide clavulanique est plus utilisé dans les traitements des infections communautaires et l'ampicilline-sulbactame et la pipéracilline-tazobactame dans les infections nosocomiales les moins sévères (Karen Bush et Bradford 2019). L'avibactame est un nouvel inhibiteur synthétique qui n'est pas un β -lactame et qui cible les β -lactamases classes A et C et quelques β -lactamases de la classe D. Il est utilisé en combinaison avec la ceftazidime pour le traitement des infections causées par les Enterobacteriaceae produisant des β -lactamases et des carbapénèmases comme KPC (Zhanet et al. 2013). Malgré la recherche intensive dans ce domaine, aucun inhibiteur des métallo- β -lactamases n'est encore disponible au niveau clinique (Zakhour, El Ayoubi, et Kanj 2024).

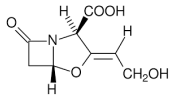
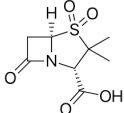
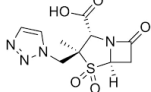
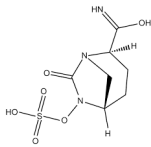
Nom	Structure	Partenaire β -lactamine	Cibles
Acide clavulanique		Amoxicilline	β -lactamase classe A
Sulbactame		Ampicilline	β -lactamase classe A
Tazobactame		Piperacilline Ceftolozane	β -lactamase classe A
Avibactame		Ceftazidime	β -lactamase classe A et C

Tableau 1: Inhibiteurs de β -lactamases : structure, combinaisons et cibles.

2.4.6. Zoom sur les carbapénémases

Les carbapénèmes sont utilisés comme antibiotiques de dernier recours dans le traitement des infections graves à bactéries Gram négatives multirésistantes et productrices de BLSE. L'utilisation thérapeutique de ces antibiotiques a conduit à l'émergence et la dissémination de nouvelles familles ou de variants de β -lactamases : les carbapénémases. Ces dernières sont capables d'hydrolyser les carbapénèmes affaiblissant leur efficacité thérapeutique. On les trouve dans les classes A, B et D de β -lactamases de la classification de Ambler comme décrit dans la section précédente (3.4). Dans la classe A sont retrouvées les KPC présentes dans de nombreuses espèces de bactéries Gram négatives mais aussi les imipénémases (IMI), les Guiana extended-spectrum (GES) et des non-métallo-carbapénémases (NMC) (Noster, Thelen, et Hamprecht 2021). Les GES et les IMI/NMC sont d'origine chromosomiques respectivement de *P. aeruginosa* et *E. cloacae* conférant une résistance intrinsèque. Suite à la capture des ARGs codant pour ces enzymes par des plasmides, elles sont désormais répandues chez les bactéries Gram négatives suite à la dissémination horizontale de ces plasmides (Walther-Rasmussen et Høiby 2007). Les carbapénémase KPC et IMI sont capables de dégrader toutes les β -lactamines (Rapp et Urban 2012), par conséquent leur dissémination pose de sérieux problèmes au niveau clinique. Les carbapénémases de la classe B comprennent NDM, VIM, IMP et leurs différents variants (section 3.4.2). La classe D des carbapénémases est divisée phylogénétiquement en

deux groupes : le groupe I des OXA-23 et leurs variants principalement retrouvé chez *A. baumannii* et le groupe II des OXA-48 et leurs variants. Les carbapénémases du groupe II sont phylogénétiquement éloignées des autres β -lactamases de classe D avec moins de 50% d'identité de séquence protéique (J. D. D. Pitout et al. 2019).

3. Rôle de la pression antibiotique sur l'apparition et la dissémination de la résistance

L'utilisation des antibiotiques en thérapeutique a conduit à l'émergence rapide de bactéries moins sensibles à ces antibiotiques suite à des mutations chromosomiques, notamment des cibles de ces antibiotiques ou par l'acquisition d'ARG par transfert horizontal. Les traitements antibiotiques (β -lactamines et inhibiteurs de β -lactamase) sont aussi à l'origine de la diversification des β -lactamases par l'accumulation de mutations permettant d'élargir le spectre d'activité de l'enzyme ou les rendant insensibles aux inhibiteurs. Ce phénomène a été l'origine de l'émergence des β -lactamases à spectre élargi (BLSE) (Husna et al. 2023; Palzkill 2018). Un phénomène accéléré par le développement par hémisynthèse de nouvelles molécules de β -lactamines moins sensibles aux β -lactamases existantes. Ce phénomène naturel de sélection de nouveaux variants de β -lactamases constitue une menace pour l'introduction de nouvelles molécules de β -lactamines. Par exemple, les souches résistantes à la combinaison avibactame/ceftazidime sont de plus en plus reportés comme la souche *K. pneumoniae* ST307 produisant une KPC-39 un variant de de KPC-3 (A172T) conférant la résistance à cette combinaison (Jousset et al. 2021). La crise sanitaire que nous connaissons aujourd'hui en lien avec la résistance aux antibiotiques est due à l'utilisation massive et souvent mal-adaptée des antibiotiques par l'homme qui a accéléré l'accumulation des mécanismes de résistance au sein de la population bactérienne et l'émergence de bactéries multirésistantes.

Les facteurs anthropiques responsables de l'émergence des bactéries résistantes sont :

-Les prescriptions abusives des antibiotiques au niveau clinique. Certaines mauvaises pratiques telles que la prescription d'antibiotiques aux patients souffrant d'infections virales, les ventes sans prescriptions dans les pays à bas et moyens niveaux de revenu, les interruptions de traitement après la disparition des symptômes de l'infection sont différents facteurs parmi tant d'autres qui contribuent à l'émergence des bactéries résistantes. (Aslam et al. 2018; Michael, Dominey-Howes, et Labbate 2014; Ventola 2015).

-L'utilisation des antibiotiques dans l'élevage et l'agriculture : l'utilisation des antibiotiques comme promoteurs de croissance a été longtemps une pratique courante dans l'élevage partout

dans le monde et pourrait avoir contribué à la sélection de bactéries résistantes chez les animaux transmissibles à l'homme (Ventola 2015). Par ailleurs, certains antibiotiques comme les tétracyclines sont stables et peuvent être libérés dans l'environnement à travers les déjections et les urines des animaux qui sont généralement utilisées dans l'agriculture comme du fertilisant. Ces antibiotiques exercent ensuite une pression de sélection sur les bactéries environnementales favorisant la sélection de bactéries résistantes dans l'environnement qui peuvent aussi potentiellement être transmises à l'homme (Ventola 2015). En 2006, les pays de l'union européenne adoptent une loi sur l'interdiction de l'usage des antibiotiques dans l'élevage comme promoteur de croissance⁴, une loi similaire pour les antibiotique d'importance médicale a été adoptée aux États-Unis en 2017⁵, cependant la bacitracine et le carbadox classés comme antibiotiques médicalement importants par l'OMS sont toujours utilisés comme promoteurs de croissance dans ce pays (Rahman, Fliss, et Biron 2022). L'émergence et la dissémination du gène *mcr1* de résistance à la colistine en Chine a amené les autorités à interdire en 2016 l'utilisation de cet antibiotique comme promoteur de croissance (Walsh et Wu 2016). Cependant, cette pratique est toujours courante dans certains pays comme l'Inde et l'interdiction n'est pas toujours respectée par les éleveurs dans certains pays où une réglementation a été établie. Les antibiotiques sont utilisés aussi pour traiter ou prévenir directement les infections bactériennes des récoltes afin d'augmenter la productivité et les bénéfices, contribuant aussi à la sélection de bactéries résistantes (Michael, Dominey-Howes, et Labbate 2014; Ventola 2015).

-D'autres facteurs anthropiques, non reliés directement à la prise d'antibiotiques, ont aussi probablement contribué à la crise actuelle. Citons par exemple, l'augmentation des voyages internationaux qui a favorisé la dissémination des ERCs dans le monde. Après son apparition aux États-Unis (Yigit et al. 2001) et les nombreuses épidémies causées (Nordmann, Naas, et Poirel 2011) à travers tout le pays, une souche clinique de *K. pneumoniae* productrice de KPC a été détectée pour la première fois en France chez un patient de retour des États-Unis (Naas et al. 2005). Les transmissions de personne à personne dans la communauté ou de patient à patient dans les hôpitaux favorisent aussi la dissémination des ERCs (Khatri et al. 2015; León-Sampedro et al. 2021)

⁴http://ec.europa.eu/health/ph/others/antimicrob_resist/am_02_en.pdf

⁵<https://doi.org/10.1036/1097-8542.BR0125171>

4. Impact de la résistance aux antibiotiques sur la santé publique

Les bactéries multirésistantes constituent une menace importante pour la santé publique et pourraient devenir la première cause de mortalité au monde. On estimait déjà en 2006 à un peu plus de 17 millions le nombre de morts lié aux infections par des bactéries multirésistantes au niveau mondial (Butler et Buss 2006). Environ deux millions de personnes sont infectées chaque année par des bactéries résistantes aux antibiotiques aux États Unis et environ 23000 meurent suite à ces infections (Martens et Demain 2017). En Europe, en 2007, on estimait à environ 25000 morts suite à une infection bactérienne impliquant des bactéries multirésistantes⁶. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la résistance aux antibiotiques entraînerait la mort d'environ 10 millions de personnes par an à partir de 2050 (O'Neill, J., 2014). Une étude récente a estimé qu'en 2019, 4,95 millions de morts étaient associés à la résistance aux antibiotiques dont 1,27 millions attribués à la résistance aux antibiotiques. L'Afrique Sub-saharienne détenait le taux le plus élevé de nombre de morts attribués à la résistance aux antibiotiques avec 27,3 morts pour 100000 habitants et l'Australie le taux le plus faible avec 6,5 morts pour 100000 habitants (Murray et al. 2022).

La résistance aux antibiotiques est aussi à l'origine d'impacts socio-économiques importants dans le monde. Le traitement des infections causées par les bactéries résistantes aux antibiotiques est à l'origine d'énormes surcoûts pour la santé publique. En effet, l'antibiothérapie des bactéries résistantes entraîne un allongement des séjours à l'hôpital compris entre 6,4 et 12,7 jours (Ventola 2015). Le coût de traitement par patient dû à une bactérie résistante varie entre 18588 et 29069 dollars aux États Unis (Ventola 2015). Aux États-Unis, on estime à entre 21 et 34 milliards de dollars par an le coût lié aux traitements des infections causées par les bactéries résistantes au système de santé américain (Golkar, Bagasra, et Pace 2014). Le rapport O'Neill de 2014 estime qu'il pourrait y avoir une chute de 2% à 3,5% du produit intérieur brut pouvant entraîner une perte d'environ 100000 milliards de dollars au monde en 2050 (O'Neill, J., 2014). Au-delà de l'impact économique, l'indisponibilité des patients vis-à-vis de leurs entreprises est à l'origine d'un coût social important, notamment, suite aux pertes salariales que doivent gérer les familles des malades en plus du coût des traitements (Ventola 2015).

⁶https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/0909_TER_The_Bacterial_Challenge_Time_to_React.pdf

5. Deux exemples d'évolution de la résistance aux carbapénèmes chez *E. coli*

Avec une prévalence de plus de 90% des personnes porteuses dans leur microbiote intestinal, *E. coli* est la bactérie anaérobie facultative la plus abondante du microbiote. Sa capacité à survivre dans l'environnement fait d'elle un biomarqueur de la contamination fécale des eaux (Tenaillon et al. 2010). Dans le microbiote intestinal, *E. coli* contribue à la protection de l'hôte vis-à-vis de la colonisation par les bactéries pathogènes en sécrétant des toxines (Hudault 2001). Cependant, certaines souches d'*E. coli* sont des pathogènes importants pour l'homme qui provoquent des infections intestinales et extra-intestinales à l'origine de la mort de plus de 2 millions de personnes par an (Allocati et al. 2013; Tenaillon et al. 2010). *E. coli* est aussi la cause principale des infections urinaires. Ces infections urinaires surviennent lorsqu'il y a une forte colonisation de l'intestin conduisant à une migration des bactéries dans le tractus urinaire. La colonisation et l'infection du tractus urinaire peut s'aggraver en bactériémie lorsque la bactérie passe dans le sang. Chaque année, le taux d'incidence des bactériémies liées à *E. coli* est de 48 pour 100000 personnes pour les adultes dans les pays à haut revenu (Bonten et al. 2021). Elle est également la cause majeure d'infections chez les animaux, notamment de la mortalité élevée dans les élevages de volaille (Swelum et al. 2021). La dissémination des gènes de résistance est à l'origine de l'émergence de certains clones *E. coli* à haut risque multirésistants.

5.1.*E. coli* ST410

Les souches *E. coli* ST410 appartenant au phylogroupe A sont des pathogènes extra-intestinaux responsables de méningites chez les nouveaux nés, d'infections urinaires et de bactériémies chez l'homme. ST410 est également retrouvé chez les animaux sauvages et domestiques et dans différents types d'environnements faisant de ce ST, un vrai pathogène One-Health (Une seule santé). (J. D. D. Pitout et al. 2024). Il a été divisé, par analyse phylogénétique, en deux clades par Roer et al. sur la base de l'antigène *fimH* : le clade A/H53 susceptible aux antibiotiques et le clade B/H24 contenant des bactéries résistantes. Le clade B/H24 est divisé en quatre sous-clades dont B1/H24 susceptibles aux antibiotiques, B2/H24R résistants aux fluoroquinolones, B3/H24Rx résistants aux fluoroquinolones et associés parfois à des β -lactamases comme CMY-2 et CTX-M-15 et B4/H24RxC résistants aux fluoroquinolones associés parfois à la présence des β -lactamases CMY-42, CTX-M-15 et aux carbapénémases OXA-181 et plus rarement NDM-5 (Roer et al. 2018). Leur classification a été actualisée par Chen et al. en 2022 également

en deux clades ST410-A et ST410-B et ce dernier en ST410-B1 (B1/H24), ST410-B2 (B2/H24R et B3/H24Rx) et ST410-B3 (B4/H24RxC) (Chen et al. 2022). La classification des souches ST410 en différents clades retracent l'évolution de la résistance aux antibiotiques dans ce ST, des bactéries sensibles des clades ST410-A et ST410-B1 aux clades multirésistants aux fluoroquinolones et aux β -lactamines ST410-B2 et ST410-B3 (Figure. 7). En effet, le clade ST410-B2 a émergé dans les années 1980 à la suite de recombinaisons dans les gènes *parC*, *parE* et *gyrA* conférant la résistance aux fluoroquinolones. Il a ensuite acquis des plasmides IncF portant *bla*_{CTX-M-15} ou *bla*_{CMY-2} dans les années 1990 conférant la résistance aux céphalosporines de troisième génération. L'acquisition des plasmides IncX3 portant *bla*_{OXA-181} en début 2000 conférant la résistance aux carbapénèmes (Roer et al. 2018), l'intégration chromosomique de *bla*_{CMY-2}, l'insertion YRIN dans le gène *ftsI* codant pour la PLP3, une mutation dans la boîte OmpR du gène *ompF* et l'acquisition du gène *ompC*-ST38 conférant une diminution de susceptibilité à l'ertapénème (Patiño-Navarrete et al. 2020) a conduit à l'émergence du clade ST410-B3 (J. D. D. Pitout et al. 2024). Deux plasmides différents IncF, F36:31:A4:B1 et F1:A1:B49 contiennent *bla*_{CTX-M-15} chez ST410-B2 et ST410-B3 respectivement. Le plasmide F36:31:A4:B1 a donc été remplacé par F1:A1:B49 lors de l'émergence ST410-B3 à partir de ST410-B2 faisant de ce dernier plasmide le plus fréquemment rencontré dans les souches ST410 portant *bla*_{CTX-M-15}. C'est dans ce plasmide F1:A1:B49 que s'est inséré le gène *bla*_{NDM-5} conférant la résistance aux carbapénèmes (Chen et al. 2022). Dans les études épidémiologiques, la carbapénémase OXA-181 est prédominante chez ST410, cependant on retrouve de plus en plus de souches ST410 productrices de NDM-5 suggérant la dissémination et l'adaptation des plasmides porteurs de *bla*_{NDM-5} dans ce ST (Chen et al. 2022; J. D. D. Pitout et al. 2024; Roer et al. 2018). Récemment, un nouveau clone ST410 nommé B5/H24RxC portant uniquement *bla*_{NDM-5} du plasmide F1:A1:B49 a émergé de B4/24RxC (ST410-B3) et contient un îlot de pathogénicité et un nouveau cluster d'antigènes O. Ce nouveau clone a un gain de fitness comparé à B4/24RxC et apparaît comme hypervirulent dans un modèle d'infection de larves de vers de cire. Ce clone a provoqué plusieurs épidémies en Chine (Ba et al. 2024). Les souches ST410 sont réparties dans le monde en fonction des clades, à l'exemple du clade ST410-B2 rencontré fréquemment en Amérique latine et le clade ST410-B3 en Amérique du Nord (J. D. D. Pitout et al. 2024). Cependant, l'évolution rapide de ce ST par acquisition de nouveaux gènes par THG dont certains confèrent la résistance aux carbapénèmes et les épidémies provoquées par ces bactéries pathogènes dans les hôpitaux est un signal d'alarme du risque de l'émergence des clones à haut-risque multirésistants ST410 au niveau international.

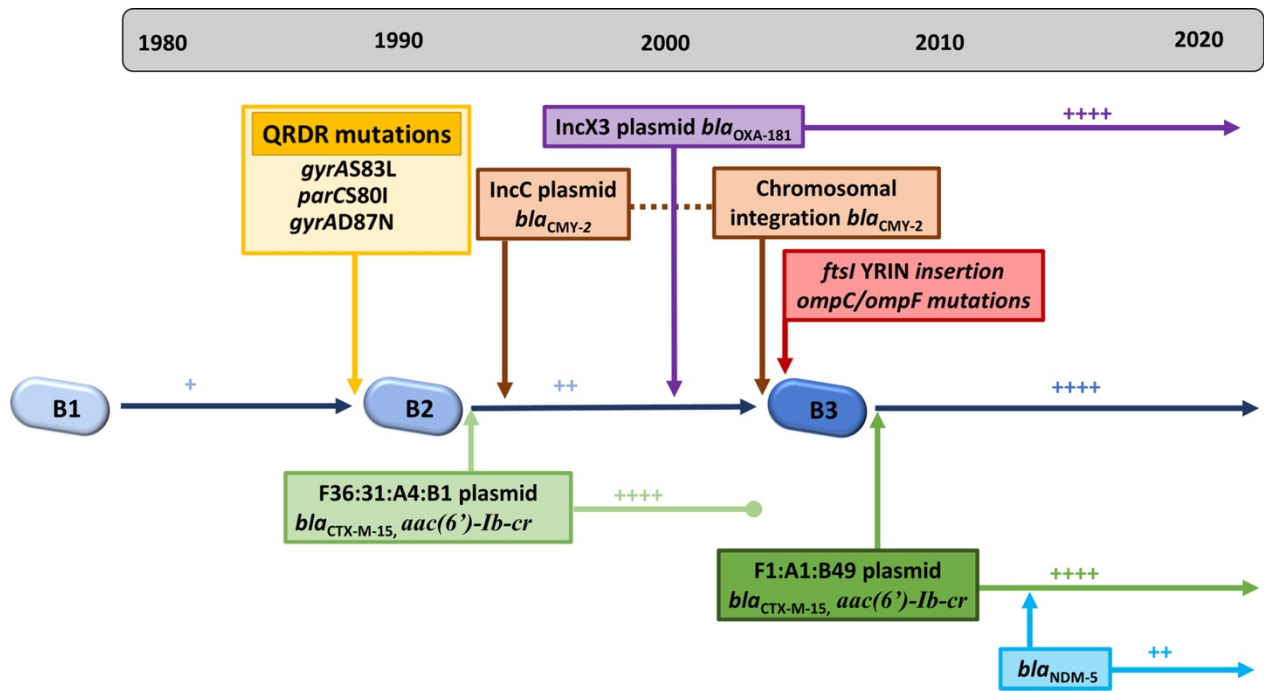


Figure 7 : Chronologie de l'évolution de la résistance aux antibiotiques chez les souches ST410 d'après (J. D. D. Pitout et al. 2024).

5.2.E. coli ST131

Les souches ST131 appartenant au phylogroupe B2 sont des pathogènes extra-intestinaux responsables de millions d'infections par an et sont les plus répandues des souches d'*E. coli* productrice de BLSE responsable d'infections chez l'homme (J. D. D. Pitout et DeVinney 2017). Sur le plan phylogénétique, ST131 peut être divisé en trois clades, A, B et C qui se différencient par des antigènes O et *fimH* et des variants des gènes *gyrA* et *parC*. Le clade A est le plus divergent portant *fimH41* à partir duquel ont émergé les clades B portant *fimH22/27* et le clade C le plus répandu de type *fimH30* (Petty et al. 2014). Ce dernier est divisé en trois sous-clades C1, C1_M27 et C2. Sur la base des génomes séquencés, C1 et C2 représentent 80% des isolats ST131 de façon globale (J. D. Pitout, Peirano, et DeVinney 2023). Les clades C1 et C2 de ST131 sont des clones à haut risque et le clade C2 est connu pour son rôle dans la dissémination globale de *bla*_{CTX-M15}. Le clade C2 constitue 30 à 80% des *E. coli* pathogènes extra-intestinaux producteurs de BLSE (J. D. Pitout, Peirano, et DeVinney 2023). Le succès du clone multirésistant ST131 mondialement disséminé est lié à une succession d'évènements évolutifs débutant par l'acquisition par le clade B de prophages puis d'îlots génomiques contenant de nombreux gènes codant pour des facteurs de virulence offrant un vaste répertoire d'hôtes. S'en est suivi, l'acquisition de *fimH30* par recombinaison et des mutations dans les

gènes *parC* et *gyrA* conférant une résistance élevée aux fluoroquinolones (Ben Zakour et al. 2016; J. D. D. Pitout et DeVinney 2017). En effet, 40% à 90% des souches résistantes aux fluoroquinolones chez les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux sont du ST131. L'ARG *aac(6')-Ib-cr* d'origine plasmidique conférant la résistance aux fluoroquinolones est retrouvé dans 60% à 80% des souches du clade C2 (J. D. Pitout, Peirano, et DeVinney 2023). En plus des facteurs de résistance aux fluoroquinolones, l'acquisition de plasmides IncF portant *bla_{CTX-M15}* principalement dans le clade C2 a contribué au succès de ST131 (Figure. 8) (J. D. D. Pitout et DeVinney 2017). Même si le ST131 est connu pour être généralement associé aux BLSEs, dans certaines études, plus de 10% des souches productrices de carbapénémases appartiennent au ST131 majoritairement aux clades C1 et C2. On trouve dans ce ST principalement des carbapénémases KPC, associées au clade C1, et NDM, associées au clade C2, et rarement des carbapénémase de types OXA-48. Une association entre carbapénémase et clade suggère une adaptation plus ou moins spécifique des plasmides exprimant ces carbapénémases aux différents clades ST131 (J. D. Pitout, Peirano, et DeVinney 2023).

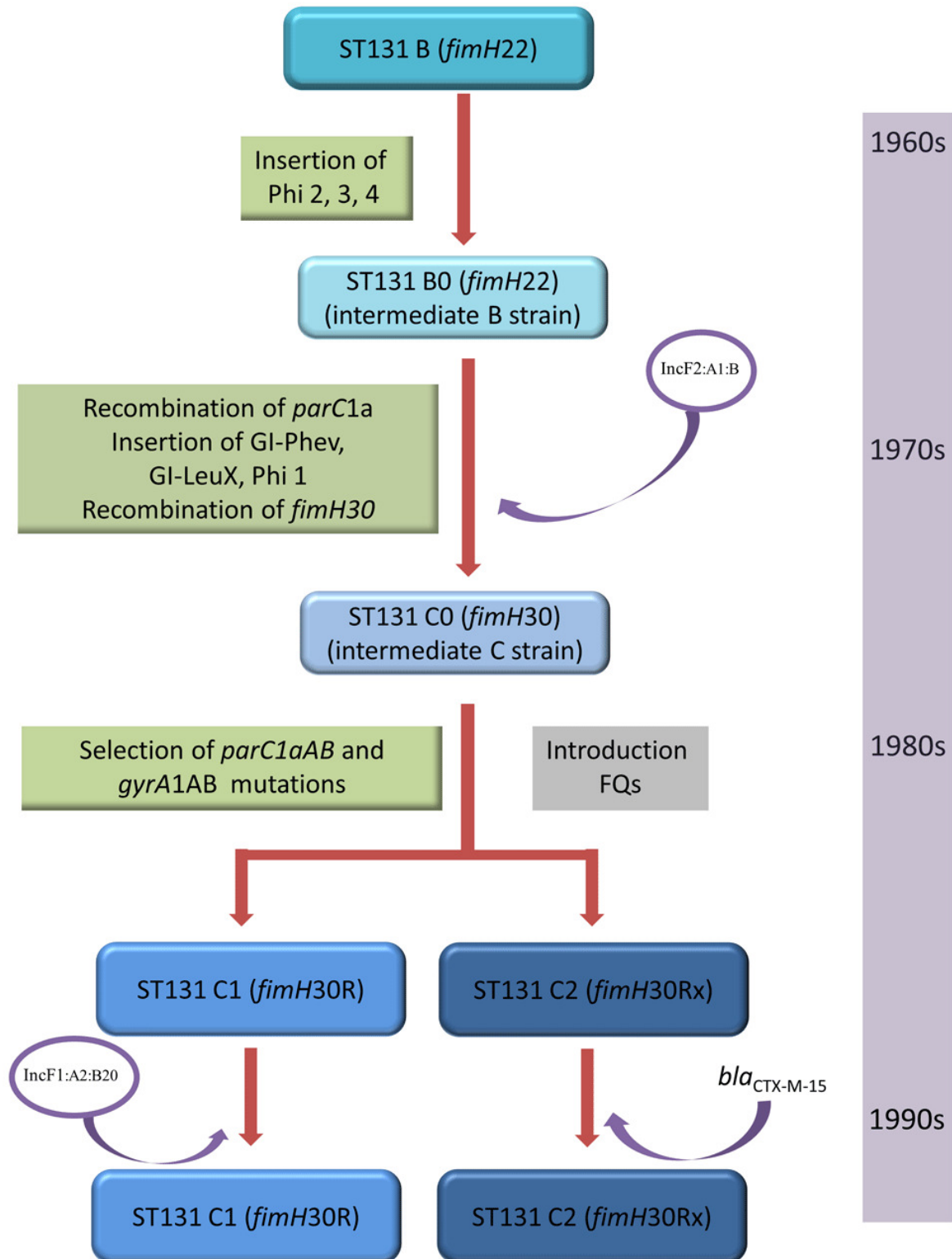


Figure 8 : Chronologie de l'évolution de la résistance aux antibiotiques chez les souches ST131 d'après (J. D. D. Pitout et DeVinney 2017).

Chapitre 2 : Rôle des plasmides dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques

Les bactéries sont des procaryotes capables d'échanger de fragments d'ADN via le transfert horizontal des gènes (THG) ou de subir des réarrangements intra-génomiques conduisant à l'acquisition de nouvelles fonctions (Arnold, Huang, et Hanage 2022). Cette plasticité du génome bactérien influence grandement l'évolution bactérienne. Elle est essentielle à l'adaptation des bactéries aux changements de leur environnement. Le THG est un facteur important dans la dissémination des ARGs chez les bactéries. C'est un processus qui permet la mobilité intracellulaire et intercellulaire des fragments d'ADN bactérien. La mobilité intracellulaire médiée par les éléments génétiques mobiles (EGMs) tels que les séquences d'insertions (ISs), les transposons, les éléments conjugatifs et intégratifs (ICEs) et les phages permettent de déplacer un fragment d'ADN d'un site à un autre dans la même cellule. La mobilité intercellulaire médiée par les plasmides mais aussi les ICEs et les phages permettent de transférer des fragments d'ADN d'une bactérie à une autre. Les principaux mécanismes de THG sont la conjugaison propre aux plasmides et aux ICEs, la transformation via la capture d'ADN libre dans l'environnement et la transduction médiée par les bactériophages (Laura S. Frost et al. 2005).

1. Mobilité des gènes de résistance

1.1. Transposons et rôle dans la dissémination et mobilité des ARGs

D'après (Roberts et al. 2008), les transposons sont des segments définis d'ADN pourvus d'une capacité à s'intégrer de façon répétitive dans un ou plusieurs sites d'un ou de plusieurs génomes. Ces EGMs ont été décrits pour la première fois par Barbara McClintock dans les années 1940 au cours de ses recherches sur la cytogénétique du maïs (McClintock 1950). Les transposons sont des EGMs qui participent à l'évolution des organismes vivants. Ils sont présents dans les trois domaines du vivant, chez les eucaryotes, les bactéries et les archées. Ce chapitre ne traite que des transposons chez les bactéries. Selon le mécanisme de transposition, les transposons sont regroupés en deux classes : la classe I des rétrotransposons (RTns) nécessitant un intermédiaire ARN pour la transposition et la classe II des éléments transposables (Tns à ADN). Ils diffèrent par leur organisation génétique, les gènes codant les transposases et les gènes

accessoires (Babakhani et Oloomi 2018). Les Tns bactériens sont divisés en quatre catégories : les séquences d'insertion (IS), les transposons composites, les transposons non-composites et les phages MU transposables (Babakhani et Oloomi 2018; Dziewit et al. 2012).

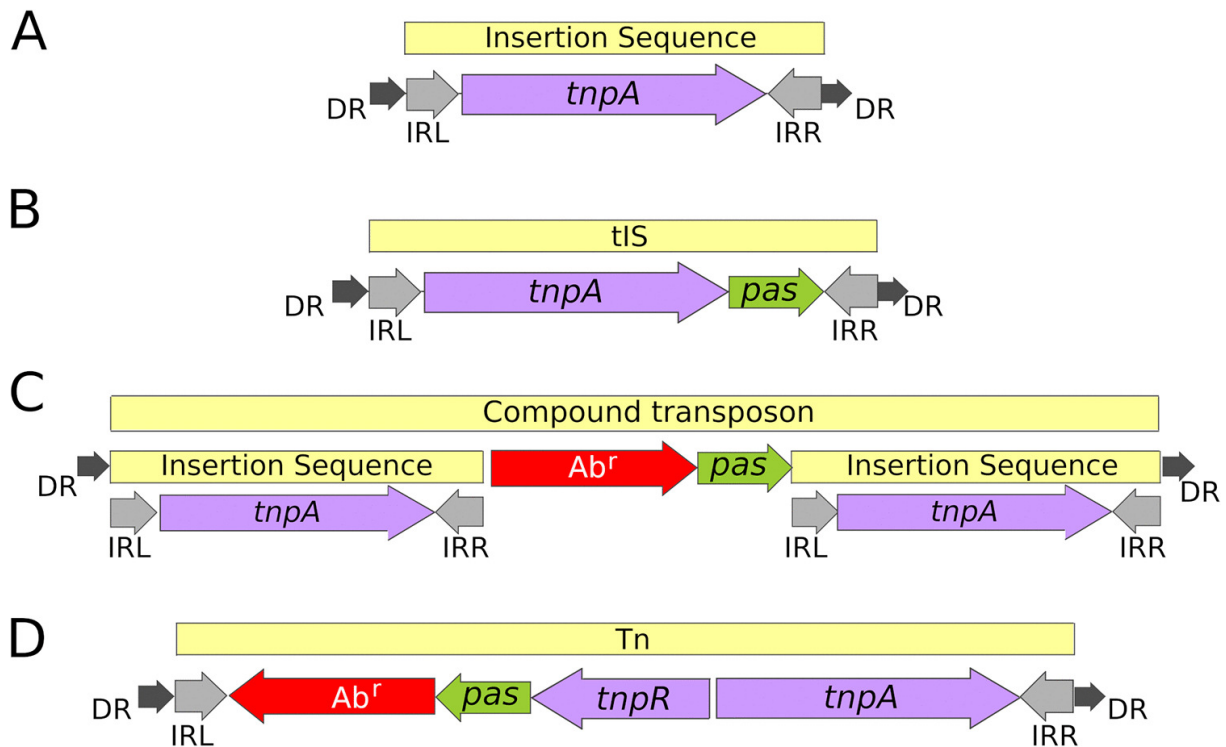


Figure 9 : Structures des transposons. issue de (K. Ross et al. 2021)

-Les ISs sont les EGMs les plus petits et les plus simples de taille inférieure à 2500 pb pouvant sauter de façon autonome d'un site à l'autre (Figure. 9A) (Mahillon et Chandler 1998). Elles sont constituées d'un gène codant pour la transposase (*tnpA*) flanqué de répétitions inversées (IR) aux deux extrémités. Généralement, l'insertion de l'IS crée des répétitions directes (DR pour Direct Repeats) de séquence au niveau du site d'insertion. Les IRs contiennent deux domaines : le domaine I qui inclut les deux ou trois dernières paires de bases à l'extrémité de l'IR proche du DR. Ce domaine est impliqué dans le clivage par la transposase. Le domaine II localisé à l'intérieur de l'IR est impliqué dans la reconnaissance spécifique de la transposase et sa liaison à l'ADN. Généralement, dans la transposase, le domaine de liaison à l'ADN est localisée du côté N-terminal et le domaine catalytique en C-terminal (Mahillon et Chandler 1998). La transposition peut être conservative par un mécanisme de couper-coller qui consiste en l'excision de l'IS de son site d'origine et en son insertion dans un nouveau site, c'est le cas pour l'*IS10* (Hallet et Sherratt 2006). La transposition est rélicative lorsqu'elle est effectuée par un mécanisme de copier-coller. Elle implique la formation d'un co-intégrat entre le site

donneur et le site receveur suivi d'une résolution, c'est le cas de l'IS1 (Mahillon et Chandler 1998). Un autre mécanisme de transposition répllicative implique la formation d'un intermédiaire double brin circulaire, c'est le cas de l'IS911 (Chandler et al. 2015). Il existe différentes familles d'IS telles que IS1, IS4 et IS6 classées selon les similarités génétiques, le type de transposase (Sites catalytiques DDE, DEDD ou HUH) et les IRs (Partridge et al. 2018) (isfinder)⁷. Les tIS (transporter IS) retrouvées dans les familles des IS1595 et IS66 ressemblent aux IS mais contiennent des gènes passagers qui ne sont pas impliqués dans la transposition. Les tIS ont une structure simple comparé aux transposons composites et sont légèrement plus grand que les ISs (Figure. 9B) (Siguier, Gourbeyre, et Chandler 2014). Les mouvements des ISs dans le chromosome causent des mutations pouvant contribuer à la résistance aux antibiotiques (Harmer, Moran, et Hall 2014). Par exemple, l'insertion de l'ISPa133 dans le gène *oprD* entraîne une résistance à l'imipénème chez *P. aeruginosa* (Ruiz-Martinez et López-Jiménez 2011). Les ISs peuvent entraîner une surexpression des ARGs en s'insérant en amont de ces derniers en créant un promoteur fort. L'insertion d'ISBfl en amont de *cepA* entraîne une surproduction de la céphalosporinase à l'origine de la résistance aux céphalosporines chez *B. fragilis* CS30 (Rogers et al. 1994). Les ISs participent aussi à la mobilité des ARGs, notamment à leur capture permettant leur transfert dans un nouveau support. C'est le cas par exemple de *bla*_{CTM} capturée par une ISEcp1 à partir des espèces *Kluyvera* spp. (Figure. 10) (Lartigue et al. 2006).

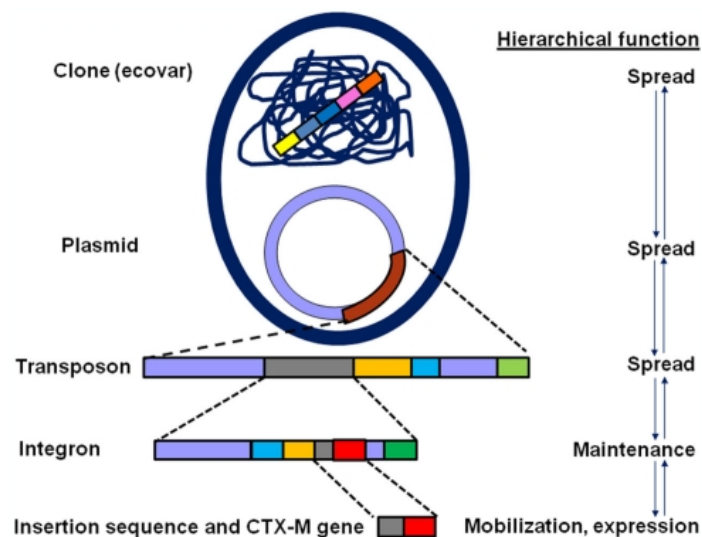


Figure 10 : Capture de *bla*_{CTX-M} par l'ISEcp1. issue de (Cantón, González-Alba, et Galán 2012)

⁷https://isfinder.biotoul.fr/Documents/family_characteristics.php

-Les transposons composites : ces transposons sont caractérisés par la présence de deux ISs à leurs extrémités qui permettent la transposition de la structure entière. Des gènes passagers sont localisés entre les deux ISs dont les ARGs. La transposition est médiée par les deux ISs qui contiennent les gènes codant pour la transposase (Figure. 9C) (Babakhani et Oloomi 2018). L'insertion du transposon entraîne une duplication du site d'insertion formant les DR utilisés pour l'identification des transposons (Hickman et Dyda 2016). Ces transposons sont très diversifiés, les plus importants dans la résistance aux antibiotiques sont *Tn5*, *Tn9*, *Tn10* et *Tn903* (Babakhani et Oloomi 2018; Partridge et al. 2018). Le tableau 2 contient des exemples de transposons composites impliqués dans la dissémination des ARGs.

-Les transposons non-composites : ces transposons ne contiennent pas d'IS mais disposent de sites IRs à leurs extrémités comme les ISs. Ils contiennent un site *res* (site de recombinaison) où la résolution est effectuée (Figure. 9D) (Maekawa, Yanagihara, et Ohtsubo 1996). La transposition des transposons non-composites est une transposition répllicative par un mécanisme de copier-coller. Le gène *tnpA* code pour une transposase qui reconnaît les sites IRs et catalyse la première étape de la transposition consistant à la formation d'un co-intégrat entre le réplicon donneur et le réplicon cible. Le gène *tnpR* code pour une résolvasse qui permet la résolution du co-intégrat en deux molécules, chacune portant une copie du transposon. La résolvasse contrôle la fréquence de transposition en inhibant l'activité de la transposase. L'insertion du transposon non-composite crée des DRs de chaque côté du site d'insertion. Les transposons non-composites contiennent aussi des gènes passagers dont des ARGs (Tableau. 2) (Maekawa, Yanagihara, et Ohtsubo 1996). Ces transposons sont très diversifiés avec des sous-familles telles que *Tn3*, *Tn21*, *Tn501*, *Tn5393*, *Tn7*, *Tn5403*, and *Tn1721* (Babakhani et Oloomi 2018).

- Les Tns peuvent contenir des intégrons qui sont des plateformes de capture d'ARGs permettant d'accumuler plusieurs ARGs à la fois conduisant à l'émergence de phénotypes multirésistants (Partridge et al. 2018). Les intégrons contiennent le gène *intI* codant pour une intégrase. Les intégrations de nouvelles cassettes d'ARG se font au niveau du site *attI* reconnu par l'intégrase (Escudero* et al. 2015). Les cassettes sont des ARG sans promoteur (Escudero* et al. 2015). Par exemple, les transposons *Tn7* et leurs variants contiennent des intégrons de classe 2 (Ramírez, Piñeiro, et Centrón 2010).

- Les bactériophages MU transposables : ils contiennent un gène *tnpA* codant pour la transposase et des sites *attL* et *attR* auxquels se lie la transposase lors de la transposition. Ils peuvent médier la dissémination des ARGs lors de la formation de nouvelles particules durant la phase lytique en les encapsidant accidentellement. Lors de la prochaine infection, les ARGs sont transférés dans le chromosome de leur nouvel hôte (Harshey 2012).

L'activité des transposons n'est pas constitutive, elle est régulée par différents mécanismes notamment par des ARN antisens, des protéines bactériennes telles que Hfq et H-NS (Ellis et Haniford 2016; Nagy et Chandler 2004). Par exemple, la protéine de liaison au nucléoïde H-NS un régulateur positif de *Tn10/IS10*. Elle se lie au complexe *Tn10/IS10*-transposase puis le maintient dans un état déplié favorable à la transposition intermoléculaire (Wardle et al. 2005). H-NS est régulée négativement au niveau post-transcriptionnel par DrsA, un ARN Hfq-dépendant. La délétion de *hfq* entraîne une augmentation de 80 fois de la transposition de l'*IS10* (J. A. Ross, Wardle, et Haniford 2010).

Catégories de transposons	Caractéristiques	ARGs	Références
Tn1	<i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , IS26	<i>bla</i> _{TEM-2}	(Babakhani et Oloomi 2018)
Tn5	<i>tnpA</i> , IS50	<i>kan^R</i> , <i>ble^R</i> , <i>str^R</i>	(Babakhani et Oloomi 2018)
Tn9	<i>tnpA</i> , IS1	<i>cat</i>	(Sukchawalit et al. 1999)
Tn10	<i>tnpA</i> , IS10	<i>tetARCB</i>	(Partridge 2011)
Tn903	<i>tnpA</i> , IS903	<i>aph-3'</i>	(Grindley et Joyce 1981)
Tn6237	<i>tnpA</i> , IS1	<i>bla</i> _{OXA-48}	(Turton et al. 2016)
Tn3	<i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , site <i>res</i>	<i>bla</i> _{TEM-1}	(Babakhani et Oloomi 2018)
Tn7	<i>tnABCDE</i> , site spécifique <i>attTn7</i>	<i>aadA</i> , <i>dhfR</i>	(McKown et al. 1987)
Tn21	<i>tnpA</i> , <i>tnpR</i>	<i>Sul1</i> , <i>aadA1</i> , <i>mer</i>	(Liebert, Hall, et Summers 1999)
Tn5393	<i>tnpA</i> , <i>tnpR</i> , site <i>res</i>	<i>strB</i> , <i>strA</i>	(Chiou et Jones 1993)

Tableau 2 : Exemples de transposons composites et non-composites portant des ARGs.

1.2. Autres EGM impliqués dans la résistance : ICE, phages, plasmides

En plus des transposons, d'autres EGM tels que les ICEs, les bacteriophages et les plasmides sont impliqués dans la résistance aux antibiotiques chez les bactéries. La partie sur les plasmides sera plus particulièrement traitée dans les sections 2 et 3 de ce chapitre.

1.2.1. Les ICEs

Les ICEs sont des EGMs qui peuvent exister sous deux états : un état intégré dans lequel l'ICE est inséré dans le chromosome bactérien et un état conjugatif dans lequel l'ICE est excisé du chromosome et peut être transféré de façon autonome d'une cellule à l'autre par conjugaison (Figure. 11). Les intégrations médiées par l'intégrase se font par recombinaison site spécifique entre les répétitions directes (DR) du site d'attachement *attB* sur le chromosome et celles de l'ICE circulaire *attI* (ou *attP*) (Delavat et al. 2017). Les IMEs (integrative and mobilizable elements) et les CIMEs (*cis*-mobilizable elements) sont des variants des ICEs qui ont perdu l'appareil de conjugaison ou l'appareil de conjugaison et la recombinase site spécifique respectivement. La mobilisation des IMEs se fait par subversion de l'appareil de conjugaison des plasmides présents dans l'hôte (Guédon et al. 2017). Les CIMEs sont mobilisés en *cis* par les ICEs sous-forme CIME-ICE (Puymège et al. 2013). Les îlots génomiques sont aussi souvent catégorisés comme des ICEs parce qu'ils sont flanqués de sites DRs et contiennent un site *attP*. C'est le cas pour SXT/R391 contenant des ARGs, souvent associé à *Vibrio spp* et qui est aussi retrouvé chez *E. coli* (Partridge et al. 2018). Chez les bactéries Gram négatifs, les ICEs contribuent à la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Certains ICEs contiennent des intégrons parfois localisés dans des transposons (Kung, Ozer, et Hauser 2010). En Corée du Sud, on a observé une dissémination clonale du pathogène *P. aeruginosa* portant un ICE PAG-2-like contenant une cassette *bla*_{GES-5} codant pour une carbapénémase dans un intégron de classe 1 localisé dans un transposon (Hong et al. 2016; Martinez et al. 2012).

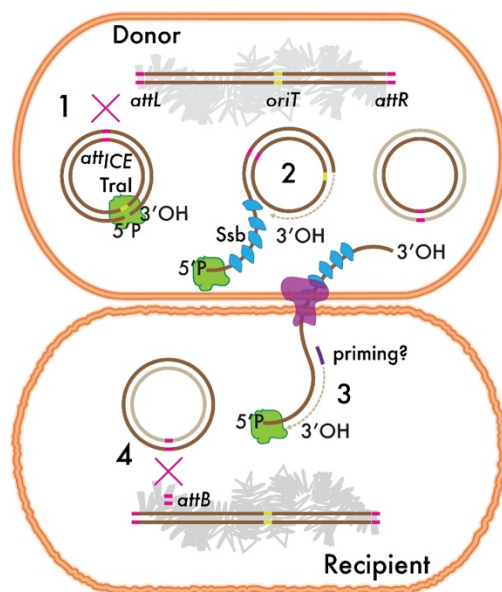


Figure 11 : Mécanisme de transfert d'un ICE. Adapté de (Delavat et al. 2017)

1.2.2. Les bactériophages

Les phages sont des virus qui infectent les bactéries et se répliquent à l'intérieur de ces dernières. Ce sont les entités biologiques les plus abondantes sur la terre (Comeau et al. 2008). Des fragments d'ADN peuvent être échangés entre les bactéries et les phages lors de la synthèse des particules phagiques où des fragments d'ADN bactériens y compris des ARGs peuvent être encapsidés et transférés au prochain hôte. La transduction médiée par les phages peut permettre la dissémination des ARGs présents dans les phages (Balcázar 2018).

La capacité des bactériophages à mobiliser les ARGs, notamment lorsqu'ils sont portés sur des petits plasmides multicopies, a été démontrée au laboratoire avec la mobilisation du gène *armA*, conférant la résistance aux aminoglycosides (Rodríguez-Rubio et al. 2020). Plusieurs études ont rapporté la détection d'ARGs dans des fractions de phages d'origine environnementale ou à partir du microbiote intestinal. Par exemple, les ARGs *bla_{CTX-M}*, *sul1*, *sul2*, *aac*-(6')-*lb-cr*, *ermF* and *aph*(3')-IIIa ont été détectés dans des préparations d'ADN de phages à partir d'échantillons d'une rivière (Yang et al. 2018). Une étude de l'ADN encapsidé dans des particules phagiques issu de 150 échantillons de fèces humains montre que plus de 72% des échantillons étaient positifs pour au moins un des ARGs suivants : *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-9}*, *bla_{OXA-48}*, *qnrA*, *qnrS*, *mecA*, *sul1* and *armA*, avec une prévalence et une abondance élevées de *bla_{TEM}* et *bla_{CTX-M-9}* (Brown-Jaque et al. 2018).

2. Les plasmides : écologie et diversification

Les plasmides sont des fragments d'ADN extrachromosomiques co-existant avec le chromosome bactérien et qui sont dotés de leur propre système de réplication indépendant du chromosome. Le terme plasmide a été formulé en 1952 par Lederberg pour désigner tout fragment d'ADN extrachromosomique pouvant être hérité par la descendance (Lederberg 1952). Lors de la division cellulaire, les cellules filles héritent des copies de plasmides, c'est le transfert vertical. Cependant, le THG des plasmides par conjugaison est un facteur majeur à l'origine de leur dissémination (Laura S. Frost et al. 2005). Les plasmides sont très diversifiés par leur taille (de 1 kb à 400 kb) (Gogarten, Gogarten, et Olendzenski 2009), leur nombre de copies (haut ou bas nombre de copies), leur contenu en GC, leur mode de réplication et de transmission, leur topologie soit circulaire soit linéaire, leurs gènes accessoires (ARGs, gènes de virulence, gènes de résistance aux métaux lourds, etc), leur spectre d'hôtes soit restreint soit élargi (Partridge 2015; Rodríguez-Beltrán et al. 2021). Selon le mode de transmission, on distingue deux grandes classes de plasmides : les plasmides conjugatifs qui possèdent leurs propres systèmes de transfert par conjugaison et les plasmides non conjugatifs regroupant les plasmides mobilisables dont une partie du système de conjugaison est absente et les plasmides non mobilisables (Rodríguez-Beltrán et al. 2021; Rozwandowicz et al. 2018). Les plasmides mobilisables dépendent d'une partie du système de conjugaison des plasmides conjugatifs pour pouvoir se transférer. Les plasmides non-mobilisables peuvent être transférés d'une bactérie à l'autre via d'autres mécanismes canoniques de THG comme la transformation et la transduction ou d'autres mécanismes comme la conduction, la vésiduction, les nanotubes ou les agents de transfert de gènes (GTAs) (Figure. 12) (Clark et Warren 1979; Liu, Thomsen, et Olsen 2022; Soler et Forterre 2020). La conduction consiste en une mobilisation d'un plasmide non-mobilisable grâce à son intégration dans un plasmide conjugatif transféré ensuite par conjugaison. À la fin de la conjugaison, le plasmide non-mobilisable se dissocie du plasmide conjugatif (Clark et Warren 1979). Une étude récente a identifié que 90% des plasmides non mobilisables disposaient de l'origine de transfert typique des plasmides conjugatifs (pOriT) capable de subvertir les relaxases des plasmides conjugatifs ou mobilisables pour se faire transférer par conjugaison suggérant que la conjugaison reste néanmoins le mécanisme principal de transfert des plasmides (Ares-Arroyo, Coluzzi, et Rocha 2023).

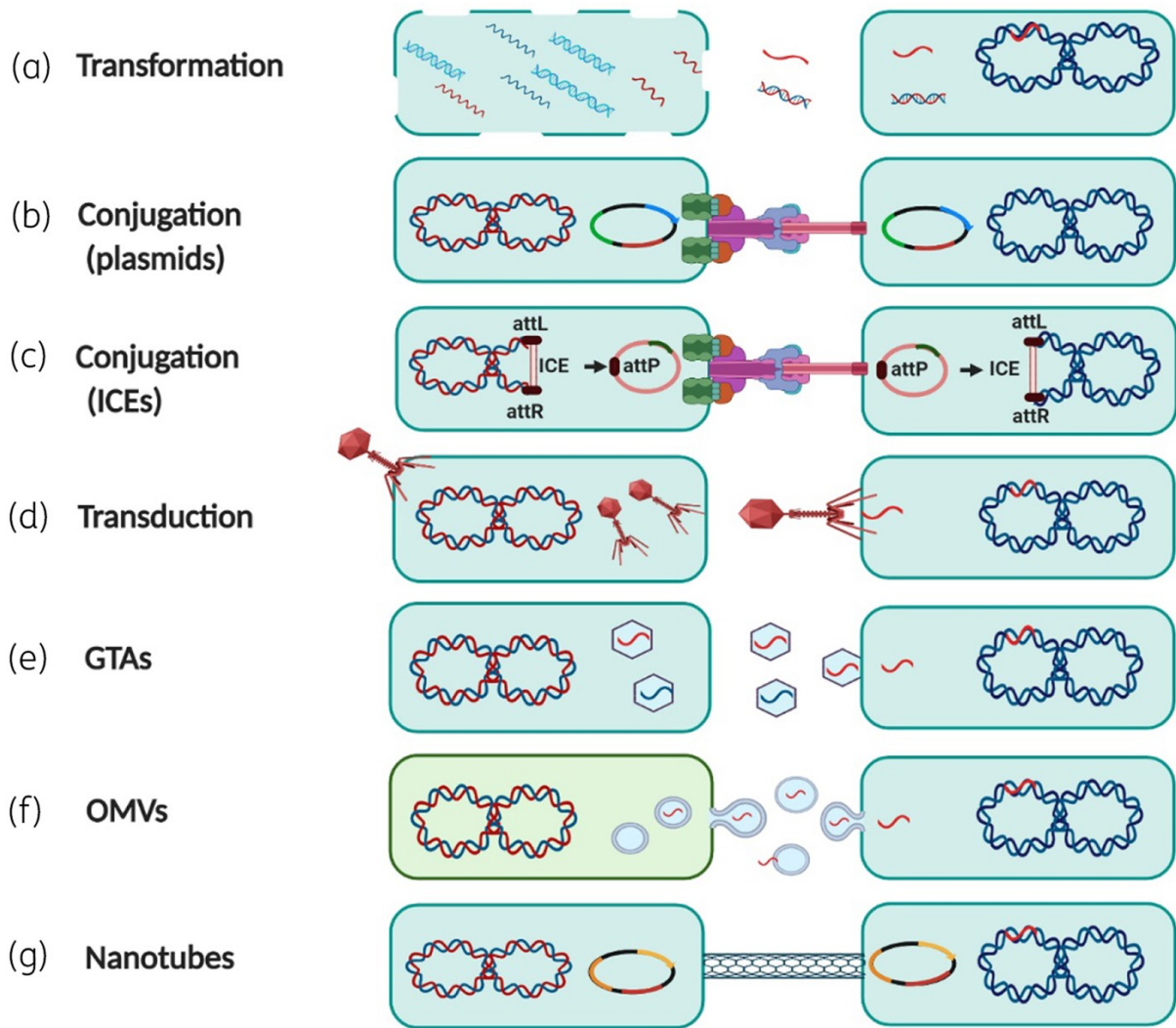


Figure 12 : Mécanismes de transferts horizontaux chez les bactéries. Issue de (Liu, Thomsen, et Olsen 2022)

- a. La transformation qui consiste à la capture par des bactéries compétentes des fragments d'ADN simple ou double brin libérés à la suite de la lyse d'une bactérie.
- b. La conjugaison qui consiste au transfert de plasmides d'une cellule à l'autre, nécessitant un contact physique entre les cellules via le pilus conjugatif médié par le système de sécrétion de type 4, T4SS (Type 4 secretion system).
- c. Conjugaison des ICEs qui consiste à l'excision de l'ICE du chromosome de la donneuse au niveau des sites *attL* et *attR*, suivi d'une circularisation sous-forme de plasmide, reconstituant un site *attP* sur la forme circulaire. L'ICE est transféré de la même manière que les plasmides.
- d. La transduction qui consiste au transfert d'ADN d'une bactérie à une autre médiée par les phages.

- e. Les GTAs (Gene Transfer Agents) sont des séquences dérivées de bactériophages insérées dans le chromosome bactérien. À la différence des prophages, l'activation des GTAs n'induit pas une mobilisation de leurs gènes. Ces gènes codent pour la capside des bactériophages capable d'encapsider des fragments d'ADN de moins de 15 kb et permettant un transfert de type transduction (García-Aljaro, Ballesté, et Muniesa 2017).
- f. Les OMVs sont des vésicules produites à partir de la membrane externe, capables d'encapsuler de l'ADN et de le transférer après fusion à une autre bactérie. Ce mécanisme de transfert est la vésiduction.
- g. Les nanotubes consistent à la formation d'un pore reliant deux bactéries et permettant le transfert de plasmides non-conjugatifs.

2.1.Écologie des plasmides

Les plasmides sont retrouvés dans toutes les branches des domaines des eubactéries et des archées (Norman, Hansen, et Sørensen 2009). Leur abondance dans la nature est étroitement liée aux fonctions adaptatives codées par leurs gènes accessoires permettant d'élargir l'environnement de survie de l'hôte. De ce fait, les associations plasmide-hôte sont généralement dépendantes de l'environnement de l'hôte et des fonctions adaptatives apportées par le plasmide. Par exemple, le cluster de gènes opérant la photosynthèse anoxygénique des Rhodobacteraceae est porté par un plasmide (Brinkmann et al. 2018). *Buchnera aphidicola* porte des plasmides métaboliques responsables de la synthèse d'acides aminés et de vitamines indispensables à la relation symbiotique avec son hôte puceron (Manzano-Marín et al. 2020). Dans les hôpitaux, on trouve différents plasmides à large spectre d'hôtes porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques ou de gènes de virulence à l'origine des infections sévères. La capacité à conjuguer de la majorité de ces plasmides, la pression antibiotique élevée dans les environnements hospitaliers et les transmissions entre patients les rendent parfois endémiques (León-Sampedro et al. 2021). La dissémination des ARGs est favorisée par la circulation des plasmides de résistance. La circulation de ces plasmides est médiée par leur transfert entre bactéries au sein du microbiome et par le passage des bactéries porteuses de ces plasmides entre différents habitats, entraînant ainsi la dissémination de ces plasmides dans la communauté (Figure. 13) (Castañeda-Barba, Top, et Stalder 2024).

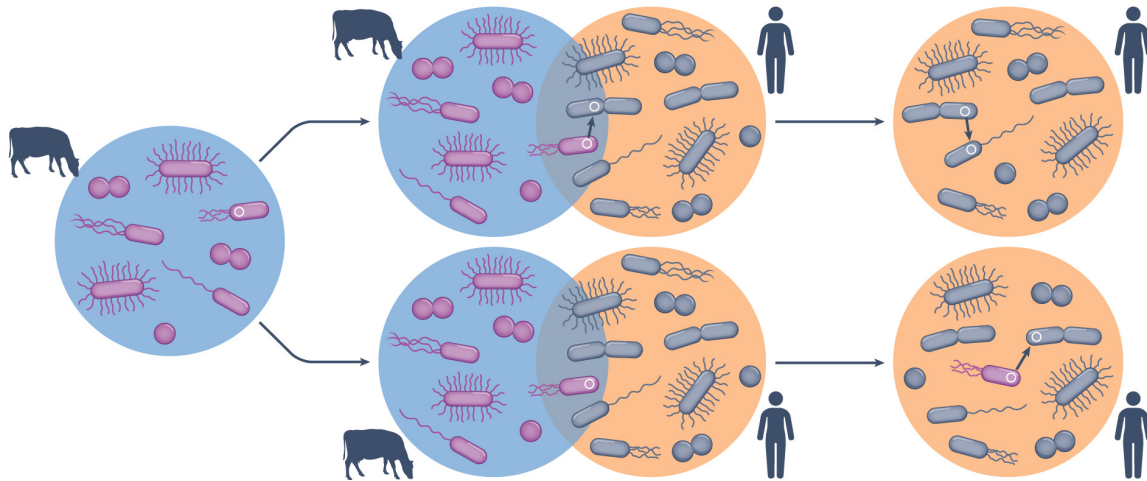


Figure 13 : Mobilité des plasmides de résistance à travers différents habitats. Adapté de (Castañeda-Barba, Top, et Stalder 2024)

2.2. Diversification des plasmides

Les mutations et les transpositions sont deux mécanismes qui contribuent à la diversification des plasmides. Les ISs présentes dans différents plasmides peuvent permettre leur réarrangement et la fusion des plasmides. Elles permettent aussi la capture des ARGs sur les plasmides en provenance du chromosome ou d'autres plasmides. Une étude basée sur 2420 plasmides cliniquement importants dont 70,2% portaient des ARGs (8229 ARGs) a montré que 87% des ARGs sont potentiellement transférés entre différents plasmides grâce aux ISs, 63,1% des transferts étant médiés par les IS26s (Xiaolong Wang et al. 2024). Ces transferts favorisent l'accumulation des ARGs sur le même plasmide conduisant à l'émergence de plasmides multirésistants. Plus de 40% des plasmides déposés dans la base de données de l'US National Center for Biotechnology Information (NCBI) sont des plasmides hybrides résultant de la fusion de deux plasmides médiée par les ISs (Pesesky, Tilley, et Beck 2019). Par exemple, la fusion par recombinaison homologue médiée par IS26 du plasmide IncN1-F33 :A- :B- porteur de *bla*_{CTX-M-55} avec le plasmide non-conjugatif porteur de *mcr-1* est à l'origine de l'apparition d'un nouveau plasmide hybride multirésistant (D. He et al. 2019). La recombinaison homologue médiée par IS26 du plasmide IncFII de *bla*_{KPC-2} et du plasmide IncR porteur de *bla*_{NDM-1} a permis la formation d'un plasmide hybride IncF/IncR multirésistant provoquant une augmentation de 4000 fois de la CMI au méropénème chez *K. pneumoniae* ST11 (Huo et al. 2024). La fusion des plasmides peut aussi permettre la formation de plasmides hybrides porteurs

d'ARGs et de gènes codant pour des facteurs de virulence. C'est le cas du plasmide pS130-4 porteur de gènes codant pour l'aérobactine (*rmpA/rmpA2* et *iucABCD*) et des ARGs tels que *acc6-lb* (résistance aux quinolones), *bla_{SHV-2}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{TEM-1}* et *bla_{KPC-2}* (β-lactamases) et *cml-e1* (résistance au chloramphénicol) (Sun et al. 2024). Les plasmides multicopies sont plus susceptibles aux mutations par rapport au chromosome, favorisant parfois la sélection de mutants apportant de nouvelles fonctions adaptatives à l'hôte en fonction des conditions environnementales. San Millan et al. ont réalisé une évolution *in vitro* en présence de concentrations croissantes de ceftazidime d'une souche *E. coli* MG1655 portant une copie chromosomique du gène *bla_{TEM-1}* ou un plasmide multicopie portant le même gène. Alors qu'aucune mutation de *bla_{TEM-1}* n'a été sélectionnée quand l'ARG était chromosomique, des mutations dans *bla_{TEM-1}* conférant une forte résistance au ceftazidime, ainsi que des mutations entraînant une augmentation du nombre de copies ont été sélectionnées dans le cas du plasmide multicopie, résultant au final en une augmentation de 128 fois de la CMI (San Millan et al. 2016).

3. Zoom sur les plasmides conjugatifs

Les plasmides conjugatifs sont généralement des plasmides de grande taille d'une dizaine à plusieurs centaines de Kb, présents en faible nombre de copies par cellule (Rozwandowicz et al. 2018). Ils sont constitués d'une machinerie de réplication qui assure leur transmission verticale lors de la division cellulaire, d'un module de transfert assurant leur propagation par conjugaison, d'un module constitué de systèmes de partition et de systèmes d'addiction qui assure leur maintien dans l'hôte et de gènes accessoires qui codent pour des fonctions diverses dont certaines sont bénéfiques pour l'hôte (Figure. 14).

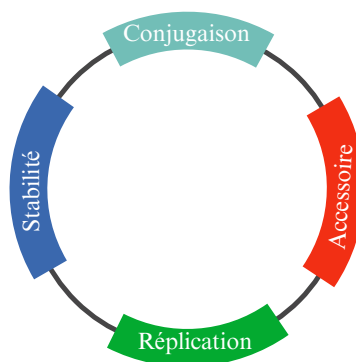


Figure 14 : Structure d'un plasmide conjugatif. Figure réalisée avec Biorender.

3.1. Groupes d'incompatibilité

Les plasmides disposant du même système de réplication ne peuvent pas co-exister dans le même hôte, c'est le phénomène d'incompatibilité découvert par Tsutomu Watanabe (T. Watanabe et al. 1964). Datta et Hedges proposent la première classification des plasmides, la plus utilisée jusqu'à présent, en cinq groupes d'incompatibilité (groupe Inc) : IncW, IncI, IncF, IncN et IncP basée sur ce phénomène d'incompatibilité (Datta et Hedges 1971). Depuis d'autres groupes Inc ont été décrits pour les plasmides conjugatifs porteurs d'ARG chez les Enterobacteriaceae. Les principaux groupes sont IncF, IncI, IncK/B/O/Z, IncA/C, IncH, IncP, IncN, IncW, IncT, IncU et IncL/M. Ils regroupent généralement des plasmides à large spectre d'hôtes permettant une dissémination des ARGs chez différentes espèces bactériennes (Rozwandowicz et al. 2018). En plus de la machinerie de réplication, d'autres facteurs comme les systèmes de partition, les systèmes d'exclusion de surface, les systèmes d'exclusion d'entrée et les relaxases peuvent affecter la compatibilité des plasmides (Novick 1987). En pratique, la détermination des groupes d'incompatibilité est basée essentiellement sur la classification des réplicons, l'analyse de leur séquence ayant été facilitée par l'arrivée des techniques de PCR, puis de séquençage des génomes entiers. Néanmoins, une séparation de certains groupes d'incompatibilité en différents sous-groupes peut se baser sur d'autres séquences (Carattoli et al. 2005, 2014). Par exemple, le groupe IncL et IncM porteurs d'ARGs cliniquement importants était fusionné en un seul groupe IncL/M avant d'être séparé en IncL, IncM1 et IncM2 sur la base des différences de séquences dans le petit ARN antisens *inc* contrôlant l'expression de *repA* et des gènes *traX*, *traY* et *excA*, ces deux derniers gènes étant impliqués dans le système d'exclusion (Carattoli et al. 2015). La compatibilité entre plasmides de groupes Inc différents permet à certaines bactéries pathogènes d'accumuler différents plasmides de différents groupes d'incompatibilité porteurs d'ARGs et de gènes de virulence conduisant à l'émergence de souches hypervirulentes et multirésistantes. C'est le cas de l'émergence de la souche hypervirulente et multirésistante d'*E. coli* contenant le plasmide p2-Hu106 de 250 kb du groupe IncHI1/IncHI2A portant *bla_{NDM-9}* et *mcr-1* et le plasmide p1-Hu106 du groupe IncFIB/IncFIC(IncFII) portant des clusters de gènes codant pour des facteurs de virulence tels que l'aérobactine (*iutA-iucABCD*) et la salmocheline (*iroBCDEN*) (Wu et al. 2024).

3.2. Réplication, contrôle de la réplication et régulation du nombre de copies

La réplication des plasmides lors de la division cellulaire est essentielle pour le maintien dans les cellules filles. Il existe trois mécanismes généraux de réplication des plasmides circulaires : la réplication de type theta, la réplication par déplacement du brin complémentaire de la séquence matrice et la réplication en cercle-roulant (RCR : rolling-circle replication). Les mécanismes de type theta sont sous-divisés en quatre types selon l'initiation de la réplication : la réplication theta de type A est initiée sur un site *oriV* similaire à *oriC* du chromosome de façon DnaA dépendante ; l'initiation des réplications theta de types B, C et D est dépendante de l'hélicase PriA (J. W. Kim et al. 2020). La région du plasmide contenant les gènes et séquences nécessaires à la réplication et à son contrôle est le réplicon. La réplication des plasmides dépend également des protéines de l'hôte telles que la primase (DnaG), l'hélicase (DnaB) et les ADN polymérases (III et I) (Del Solar et al. 1998; J. W. Kim et al. 2020). Brièvement, lors de la réplication theta de type A (Figure. 15), les protéines DnaA de l'hôte se lient aux sites DnaA d'*oriV* sous-forme de monomère. Les itérons, des séquences d'ADN retrouvés dans *oriV* sont saturés par des monomères de la protéine Rep. Ceci entraîne des forces de torsion au niveau de l'ADN permettant une ouverture du double brin d'ADN au niveau d'une région DUE riche en AT et le recrutement de l'hélicase DnaB par Rep avec l'aide de DnaA. Après l'ouverture de l'ADN double brin, les protéines SSBP (Single strand binding protein) viennent se lier aux ADN simples brins. Sur le brin direct est recrutée la primase DnaG de l'hôte qui ajoute un primer pour initier la polymérisation par l'holoenzyme polymérase III de l'hôte. Sur le brin retardé a lieu l'assemblage du complexe primosome avec l'hélicase DnaB pour former une fourche de réplication permettant la réplication couplée des deux brins (J. W. Kim et al. 2020). La différence entre la réplication theta et la réplication par déplacement du brin est l'absence de site d'assemblage du primosome dans ce dernier mécanisme entraînant un déplacement du brin lors de la réplication. Pour la réplication par déplacement du brin, la synthèse du brin retardé est faite à la fin de la synthèse du brin direct. Ce mécanisme est caractéristique des plasmides IncQ (Del Solar et al. 1998).

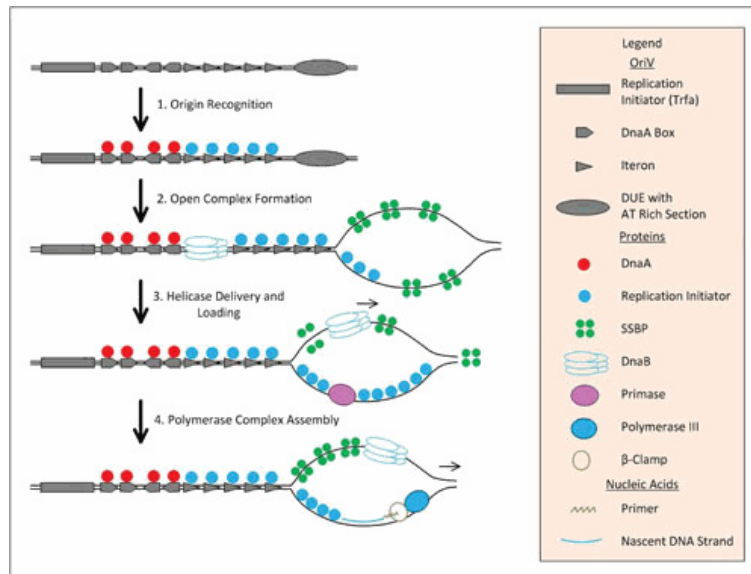


Figure 15 : Réplication theta de type A des plasmides. Les différents facteurs impliqués sont indiqués. Issue de (J. W. Kim et al. 2020).

La réplication RCR s'effectue de manière asymétrique, caractérisée par la séparation de la synthèse du brin direct et du brin retardé qui sont initiées à des origines de réplication différentes. La synthèse du brin direct se fait suite à la liaison de la protéine Rep (RepC pour le plasmide pT181) au site *dso* (double-strand origin). Ce site *dso* est constitué de deux séquences, le site *bind* et le site *nick*. La protéine Rep contient deux tyrosines catalytiques importantes (Y1 et Y2). Rep se lie d'abord au site *bind* puis clive le site *nick* via l'activité catalytique de Y1 libérant une extrémité 3'-OH. Cette extrémité sert de primer pour la synthèse du brin direct. Rep reste attachée à l'extrémité 5' du brin clivé jusqu'à la fin de la synthèse du brin direct. Le complexe Rep-ADN simple brin clivé est libéré à la fin de la synthèse du brin direct et la tyrosine Y2 catalyse une réaction de transestérification avec l'extrémité 3'-OH libre conduisant à la formation d'un ADN simple brin circulaire avec un site *sso* (Single-strand origin) au niveau du site de transestérification. Cet ADN simple brin circulaire sert ensuite de matrice pour la synthèse du brin retardé catalysée cette fois-ci uniquement par des protéines de l'hôte sans implication de Rep qui est inactivée. Un complexe primase de l'hôte est recruté au site *sso* et synthétise un primer utilisé pour la synthèse du brin retardé (Figure. 16) (Wawrzyniak, Plucienniczak, et Bartosik 2017). La réplication RCR est employé par les plasmides et les ICEs pour la conjugaison (Llosa et al. 2002).

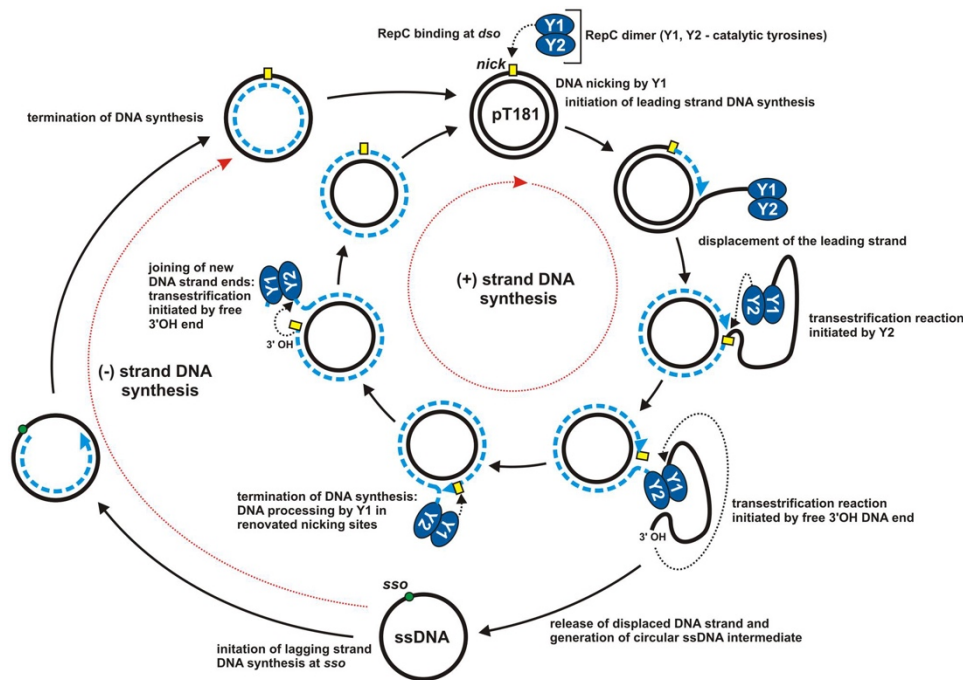


Figure 16 : Réplication RCR du plasmide pT181. Rectangle jaune le site *dso*, en bleu pointillé, l'ADN naissant et cercle vert le site *sso* Adapté de (Wawrzyniak, Płucienniczak, et Bartosik 2017).

La réplication des plasmides est un processus extrêmement régulé qui conditionne le nombre de copies de plasmides par cellule bactérienne. Une augmentation non-contrôlée du nombre de copies de plasmides entraîne une augmentation du niveau d'expression des gènes plasmidiques (San Millan et MacLean 2017). L'initiation de la réplication est donc soumise à une forte régulation qui peut faire intervenir différents mécanismes : ARN antisens, autoinhibition de la transcription de la protéine Rep par liaison à son propre promoteur, interactions entre protéines Rep liées à différents plasmides ou « Handcuffing » provoquant un blocage de la réplication (Del Solar et al. 1998; J. W. Kim et al. 2020). Par exemple, chez les plasmides IncP, l'augmentation de la synthèse de Rep associée à une augmentation du nombre de copies favorise la formation de dimères qui inhibent l'initiation de la réplication de ces plasmides (Konieczny et al. 2015). Un nombre de copies élevé de plasmides IncP peut aussi déclencher le mécanisme de « Handcuffing » (Konieczny et al. 2015). Chez les plasmides IncL/M, le gène *repB* code pour un petit peptide leader dont le codon stop est superposé avec le codon start du gène *repA* codant pour l'initiateur de la réplication Rep. La traduction de RepB et la terminaison correcte de celle-ci facilite la formation d'un pseudonœud entre deux petites séquences complémentaires (8 nt) au niveau de la séquence ADN du leader nécessaire à la synthèse de Rep. Un promoteur

en sens inverse dirige la synthèse d'un petit ARN antisens, ARNinc qui bloque la traduction de RepB par appariement à la séquence Shine Dalgarno. Ce qui inhibe l'expression de *repA* et par conséquent la réplication (Athanasopoulos, Praszquier, et Pittard 1995, 1999). Certains plasmides disposent de systèmes particuliers pour la régulation de la réplication. Par exemple, le plasmide conjugatif pMBL6842 de *Pseudoalteromonas rubra* contient un système toxine-antitoxine PrpT (toxine) / PrpA (antitoxine) impliqué dans la régulation du nombre de copies de ce plasmide. Dans ce mécanisme, l'antitoxine PrpA se fixe aux itérons de l'origine de réplication inhibant la fixation des protéines Rep. L'inactivation de PrpA entraîne une dérépression de la réplication (Ni et al. 2021).

À la fin de la réplication, le maintien des plasmides dans les cellules est assuré par la fidélité de la ségrégation des plasmides. Pour les plasmides à haut nombre de copies comme ColE1, Summers a proposé le modèle d'une ségrégation basée sur le hasard par diffusion des plasmides dans le cytoplasme. Dans ce modèle, le nombre de copies élevé augmente la probabilité que chaque cellule fille puisse hériter d'un moins une copie du plasmide (D Summers 1991). Selon Summers, ce modèle est facilité par les systèmes de résolution des multimères qui utilisent un site de recombinaison spécifique de l'ADN pour dissocier les multimères de plasmides en monomères (David Summers 1998). Un autre modèle proposé est le modèle de l'exclusion du nucléoïde selon lequel les plasmides multicopies sont séparés sous-forme de clusters (Pogliano et al. 2001; Yao, Helinski, et Toukdarian 2007). Cependant, ces deux modèles sont remis en cause en faveur d'une ségrégation active impliquant l'origine de réplication des plasmides et des protéines chromosomiques (Million-Weaver et Camps 2014). Contrairement aux plasmides à haut nombre de copies, les larges plasmides conjugatifs à faible nombre de copies doivent disposer de systèmes de partition qui lors de la division cellulaire, assurent une répartition des molécules de plasmides entre les cellules filles. Ces systèmes sont composés généralement de trois facteurs, un site de type centromère en position *cis*, une protéine de liaison à l'ADN et une protéine motrice qui utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse des NTP pour déplacer le plasmide vers les cellules filles. Les systèmes de partition sont regroupés en trois classes selon les propriétés des NTPases : le système de type I (ParABS) utilise des ATPases de type Walker au niveau du site de liaison de l'ATP, le système de type II (ParRMC) utilise une protéine de type actine et le système de type III (TubZRC) utilise des GTPases qui ressemblent aux tubulines (Baxter et Funnell 2014; Guynet et De La Cruz 2011). Les mécanismes de ségrégation diffèrent selon le type de système de partition (Figure. 17). Le mécanisme de « pushing » est utilisé par le système ParRMC : les protéines ParM se lient au site *parC* de chaque copie du plasmide et

recrutent les protéines motrices ParR dotées d'une activité ATPase qui se polymérisent de façon ATP dépendante. La polymérisation est initiée au centre de la cellule et se poursuit jusqu'aux deux pôles de la cellule mère en division, poussant le plasmide vers les pôles. Le mécanisme de type « pulling » utilisé par le système TubZRC consiste à une liaison des protéines TubR au site *tubC* de chaque copie du plasmide suivie du recrutement de la protéine motrice TubZ dotée d'une activité GTPase. TubZ forme des filaments dynamiques et orientés, se polymérisant à une extrémité et se désassemblant de l'autre, tirant le complexe tubR/*tubC* vers le pôle. ParABS utilise le mécanisme de « Brownian ratchet » qui consiste à la liaison des protéines ParB au site *parS* de chaque copie du plasmide suivi du recrutement de la protéine motrice ParA dotée d'une activité ATPase. ParA se lierait de manière non spécifique et ATP-dépendante à l'ADN du nucléoïde. Le complexe ParB/*parS* se lierait au nucléoïde par l'intermédiaire de ParA, stimulant sa dissociation du nucléoïde. La répartition asymétrique des molécules de ParA liées au nucléoïde dirigerait le mouvement du complexe (Guynet et De La Cruz 2011; Siguier et al. 2023). Un système de partition de type IV a été proposé et concerne les systèmes des plasmides pSK1 (Par) et R388 (StbA) qui ne disposent que d'une seule protéine impliquée dans la partition sans protéine motrice. Chez R388 la protéine StbA se lie au site *stbS* (centromère) du plasmide et forme un complexe StbA/*stbS* qui se lie au chromosome bactérien via des protéines partenaires de l'hôte. La partition du chromosome bactérien entraîne parallèlement les plasmides dans les cellules filles. Ce mécanisme de partition est appelé le modèle « pilot fish » (Quèbre et al. 2022; Siguier et al. 2023).

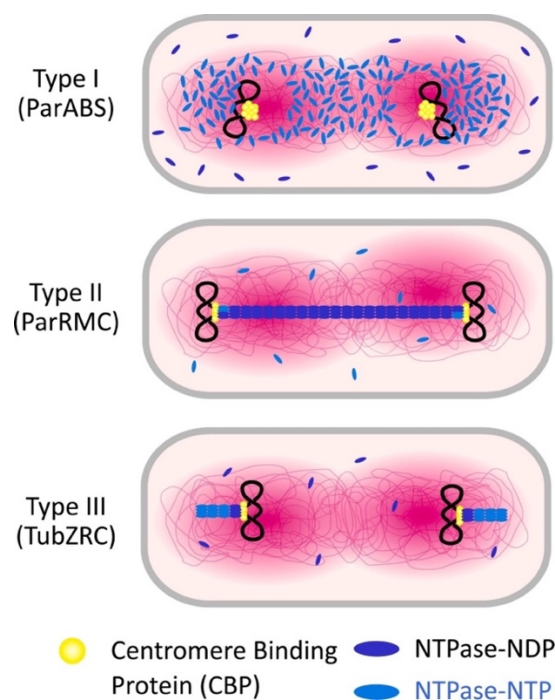


Figure 17 : Différents mécanismes de systèmes de partition. Issue de (Siguier et al. 2023).

3.3. Conjugaison et régulation de la conjugaison

La conjugaison est un mécanisme de THG spécifique aux plasmides et aux ICEs (Figure. 18). Chez les plasmides conjugatifs, les éléments essentiels à la conjugaison sont l'origine de transfert (*oriT*), un module Dtr (DNA transfer and replication) et un module Mpf (Mating pair formation) (Fraikin, Couturier, et Lesterlin 2024; Laura S. Frost et al. 2005; Wawrzyniak, Płucienniczak, et Bartosik 2017). Le module Dtr contient les gènes de transfert et de réplication. Le module Mpf contient les gènes codant pour les protéines du système de sécrétion de type 4 (T4SS) et des gènes de biogénèse des pili. L'origine de transfert *oriT* est similaire au site *dso* des plasmides à réplication RCR et contient un site *bind* et un site *nick*. Brièvement, la conjugaison commence par un contact physique entre la cellule donneuse et la receveuse via le pilus conjugatif, puis le clivage de l'ADN au niveau de *oriT* par la relaxase et finalement le transfert du complexe relaxase/ADN à travers le pilus. Plus précisément, la conjugaison est initiée par la synthèse du T4SS, une structure trans-enveloppe constituée de pilines TraA qui établit le contact entre la cellule donneuse et la cellule receveuse, c'est le pilus conjugatif (Fraikin, Couturier, et Lesterlin 2024). La rétraction du pilus conjugatif permet de stabiliser le contact entre la donneuse et la receveuse. Elle est faite par le biais de l'interaction entre les protéines TraN de la donneuse et certaines protéines membranaires de la receveuse (comme OmpA dans le cas des plasmides IncF) entraînant un contact membrane-membrane entre la donneuse et la receveuse (Fraikin, Couturier, et Lesterlin 2024). En visualisant par microscopie à fluorescence en temps réel la conjugaison du plasmide F et de pED208 similaire au plasmide F, Glodlust et al. ont montré que la conjugaison pouvait aussi se faire sans la rétraction du pilus entre deux cellules physiquement distantes à travers le pilus conjugatif en extension (Goldlust et al. 2023). L'établissement du contact entre la donneuse et la receveuse via le pilus induit la formation du relaxosome par l'expression des gènes du module Dtr. Le relaxosome est un complexe protéique incluant la relaxase qui clive l'ADN plasmidique circulaire au site *oriT*. Pour cela, le plasmide est recruté par TraD la protéine de couplage du T4SS (T4CP) pour former un complexe de pré-initiation. Comme dans la réplication RCR, la relaxase TraI se lie au site *bind* d'*oriT* et clive le plasmide au niveau du site *nick*. Après le clivage elle reste attachée à l'extrémité 5'-phosphate du brin à transférer formant un complexe ADN simple brin-TraI. C'est ce complexe qui est transféré à travers le pilus. Dans la receveuse, la relaxase permet d'initier la synthèse du deuxième brin de l'ADN (Couturier et al. 2023; Fraikin, Couturier, et Lesterlin 2024; Wawrzyniak, Płucienniczak, et Bartosik 2017). La synthèse de l'ADN double brin nécessite une activité primase qui est apportée par certaines relaxases (Henderson et Meyer

1999) ou transférée de la donneuse vers la receveuse via le T4SS (Wilkins et Thomas 2000). Le primosome de l'hôte peut être également recruté dans certains cas (Masai et Arai 1997) et certains plasmides codent pour leur primase (Yakobson et al. 1990). La protéine UvrD de la receveuse, une hélicase impliquée dans la réparation de l'ADN aide à la conversion de l'ADN simple brin en ADN double brin (Shen et al. 2023). L'acquisition de l'ADN simple brin par la receveuse peut déclencher un certain nombre de systèmes de défense de l'hôte tels que le système SOS sensible à l'accumulation d'ADN simple brin, les systèmes de restriction modification et les systèmes CRISPR qui peuvent dégrader l'ADN (Baharoglu, Bikard, et Mazel 2010; Westra et al. 2013). Pour neutraliser ces systèmes, le plasmide dispose de gènes spécifiques dans la région transférée en premier plan (« leading region »), le premier segment à rentrer dans la receveuse. Ces gènes sont transcrits directement une fois dans la receveuse à partir de l'ADN simple brin (Fraikin, Couturier, et Lesterlin 2024; L S Frost, Ippen-Ihler, et Skurray 1994). Les protéines codées par la « leading region » peuvent être aussi transloquées via le T4SS de la donneuse vers la receveuse (Al Mamun et al. 2022). Ces gènes incluent le gène *ssb* codant pour les protéines SSBP (Single-strand binding proteins) qui protègent l'ADN simple brin, le gène *psiB* qui inhibe RecA et empêche l'activation du système SOS (Al Mamun, Kishida, et Christie 2021; Jones, Barth, et Wilkins 1992). Les plasmides peuvent aussi coder pour des systèmes dirigés contre la défense de l'hôte bloquant par exemple les systèmes de restriction modification de l'hôte (Fomenkov et al. 2020) et des systèmes anti-CRISPR (Mahendra et al. 2020). Une fois la conjugaison terminée avec la synthèse de l'ADN double brin dans la receveuse, le plasmide emploie différents mécanismes pour persister dans l'hôte pour contrebalancer le coût de fitness lié à son acquisition. La section 4 de ce chapitre discute en partie ces mécanismes.

La mobilité des plasmides est soumise à différentes régulations. La régulation par les groupes d'incompatibilité mentionnés précédemment empêche l'acquisition par la même receveuse de deux plasmides différents du même groupe (Laura S Frost et Koraimann 2010). Les systèmes de défense de l'hôte (CRISPR, restriction/modification, protéines argonautes) discutés dans la section 5 régulent également la mobilité des plasmides. La conjugaison est régulée en fonction des conditions de l'environnement. Les gènes *tra* des plasmides conjugatifs sont en général réprimés dans les cellules hôtes. Leur transcription dépend de différentes conditions : les conditions liées à l'environnement (par exemple les nutriments, l'oxygène et la température), le sensing de certaines molécules indiquant la présence de receveuses, la densité de la population de bactéries (Laura S Frost et Koraimann 2010). Par exemple, la cellule receveuse *Enterococcus faecalis* produit deux phéromones inductibles cAD1 et cCF10. Ces phéromones

sont perçues par la donneuse et sont activement transportées dans le cytoplasme de la donneuse où elles inhibent les peptides iAD1 et iCF10 entraînant une activation du répresseur TraA/PrgX. Ceci entraîne l'activation de la transcription des gènes Dtr et du T4SS (Dunny et Johnson 2011). Même en conditions optimales, seulement une fraction de la population acquiert la compétence nécessaire pour la conjugaison, suggérant une spécialisation et une coopération entre les cellules (Koraimann et Wagner 2014). La régulation de la conjugaison peut aussi faire intervenir un mécanisme d'exclusion d'entrée. Certains plasmides codent pour des protéines d'exclusion d'entrée (Eex) et des protéines d'exclusion de surface (Sfx). Lors de la conjugaison, la protéine Eex de la donneuse reconnaît la protéine Sfx de la receveuse, et lorsque la protéine Sfx de la receveuse est similaire à celle produite par le plasmide de la donneuse, Eex bloque la conjugaison entre deux cellules donneuses (L S Frost, Ippen-Ihler, et Skurray 1994; Marrero et Waldor 2007). La régulation par l'inhibition de la fertilité des plasmides F a été très étudiée. En effet, les plasmides F contiennent un gène codant pour une protéine chaperone appelée FinO qui protège l'ARN antisense FinP de l'activité de l'ARNase E. Cet ARN antisense FinP est responsable de l'inhibition de la traduction de TraJ, l'activateur transcriptionnel de l'opéron *tra* (Virolle et al. 2020).

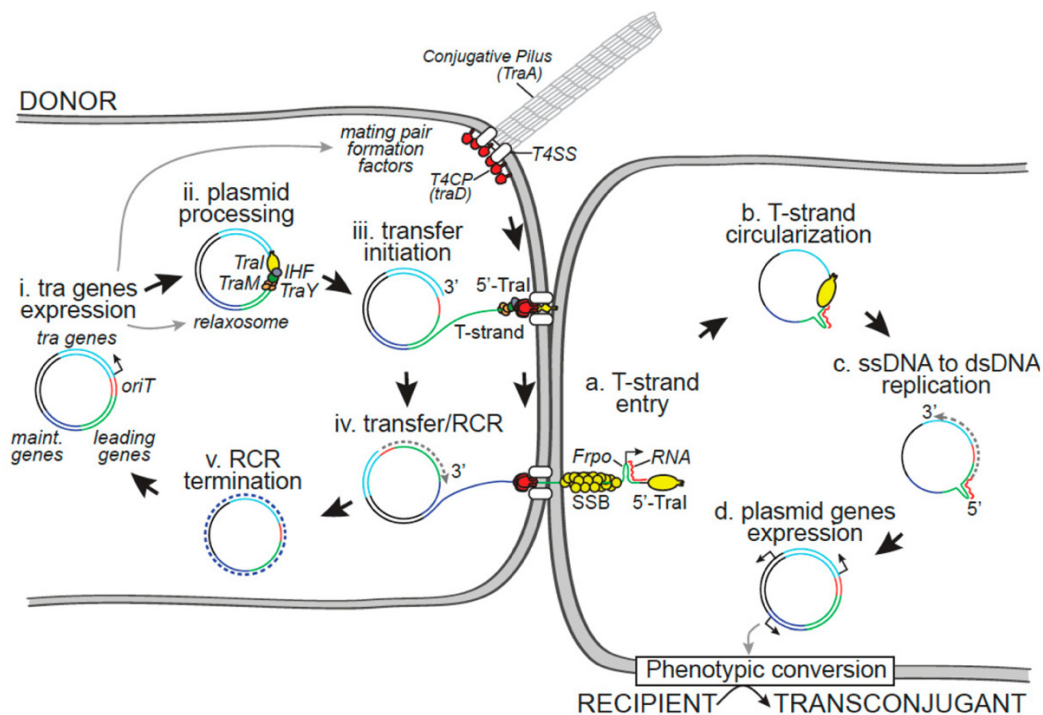


Figure 18 : Différentes étapes du transfert d'un plasmide F de la donneuse à la receveuse.
Issue de (Virolle et al. 2020).

4. Persistance des plasmides dans les populations bactériennes

Bien que les plasmides confèrent souvent un avantage à l'hôte dans certaines conditions environnementales telles que la présence d'antibiotiques, leur persistance et leur diffusion peuvent être limitées par différents facteurs tels que le coût de fitness imposé à leur hôte, un ciblage par les systèmes de défense de l'hôte, l'interaction avec d'autres EGM, notamment avec d'autres plasmides déjà présents ou un fonctionnement non optimal des systèmes de partition.

4.1. Coût de fitness imposé par les plasmides

Différents mécanismes pourraient être à l'origine d'un coût de fitness imposé par les plasmides (Figure. 19) (San Millan et MacLean 2017) :

-Le coût de la conjugaison. À la fin des années 1990, Turner et *al.* avaient montré qu'un taux de conjugaison élevé était associé à un coût de fitness plus important pour l'hôte et que la sélection de plasmides à faible taux de conjugaison améliorait le fitness de la souche ancestrale (Turner, Cooper, et Lenski 1998). De même, Porse et *al.* ont montré dans une étude d'évolution expérimentale, que le coût de fitness imposé par le plasmide de multirésistance conjuguatif IncN pKP33 de 73 kb était dû à la conjugaison. Dans cette étude, l'évolution expérimentale a conduit à la sélection de souches délétées d'une région de 25 kb comprenant les gènes codant pour le pilus de transfert (T4SS) abolissant le coût imposé par la plasmide (Porse et al. 2016). Ce coût de fitness imposé par la conjugaison pourrait être lié à une forte demande en ATP (San Millan et MacLean 2017).

-Les coûts énergétiques liés à la réplication du plasmide, la transcription et la traduction des gènes plasmidiques via la séquestration des protéines de la machinerie de réplication de l'hôte telles que les ribosomes, les polymérase et les hélicases conduisant à une altération de la division cellulaire (San Millan et MacLean 2017). Par exemple il a été montré que le coût de fitness induit par le plasmide RP4 chez *Pseudomonas sp.* pouvait être réduit par l'augmentation de l'expression de l'hélicase UvrD (Loftie-Eaton et al. 2017).

-Le coût liée aux interactions entre les EGMs : l'acquisition du plasmide pNUK73 provoque un coût de fitness important chez *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (San Millan et al., 2014). Le coût de fitness provoqué par pNUK73 est dû à des interactions entre le plasmide et des gènes

chromosomiques récemment acquis de la souche PAO1. Le coût se manifeste par une altération de l'expression d'environ 13% gènes chromosomiques, dont une surexpression des gènes impliqués dans la traduction des protéines, la synthèse des ribosomes et la biogénèse. Dix des 15 gènes du système SOS régulé par LexA y compris *recA* et *lexA* sont aussi surexprimés. Le gène *rep* du plasmide pNUK73 est également surexprimé. Les mutations chromosomiques dans trois gènes différents dont l'un code pour une hélicase et les deux autres contigus codent pour des kinases ont conduit à une réduction du coût de fitness, une baisse de l'expression de *rep* et un retour à une expression normale des gènes chromosomiques. Les trois gènes codant l'hélicase et les kinases sont localisés sur des îlots génomiques récemment acquis dans la souche PAO1 (San Millan et al. 2015).

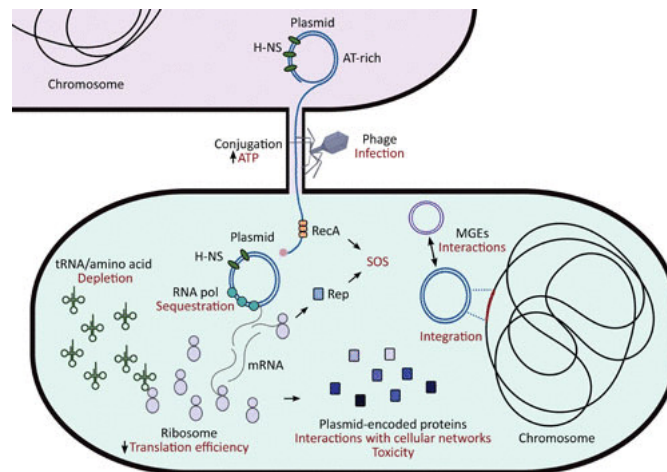


Figure 19 : Les différents facteurs contribuant au coût de fitness du plasmide. Issue de (San Millan et MacLean 2017).

4.2. Le « plasmid paradox »

Pour persister dans une population bactérienne, les plasmides doivent être transmis de génération en génération de la cellule mère aux cellules filles et leur maintien dépend de la fidélité de la ségrégation. Une ségrégation imparfaite conduit à l'apparition d'une sous-population sans plasmide. C'est la raison pour laquelle de nombreux plasmides à faible nombre de copies codent pour des systèmes d'addiction qui favorisent l'élimination des bactéries filles qui n'ont pas reçu de plasmide. En absence de pression de sélection, cette sous-population sans plasmide pourra éventuellement se répliquer plus vite que les bactéries porteuses du plasmide, notamment si le coût lié au portage du plasmide est important. Les bactéries porteuses du

plasmide seront alors éliminées de la population. Sur cette base, Bergström et *al.*, dans les années 2000, ont proposé un modèle mathématique qui prédit que 1) en absence d'une pression de sélection pour le maintien des traits bénéfiques à l'hôte, les plasmides seront éliminés de la population ; 2) en présence de la pression de sélection les gènes plasmidiques codant pour des traits bénéfiques à l'hôte finiront par s'intégrer dans le chromosome associé, conduisant là aussi finalement à une perte du plasmide. Ce modèle suggère donc que les plasmides ne peuvent pas persister en tant qu'éléments génétiques parasites.

Néanmoins depuis les années 2000 de nombreuses exceptions à cette prédiction ont été observées. Le phénomène de persistance à long terme de certains plasmides dans les populations bactériennes en absence de pression de sélection est qualifié de paradoxe des plasmides (« plasmid paradox ») (Brockhurst et Harrison 2022). Différentes explications à ce paradoxe ont été proposées, basées sur des expériences d'évolution expérimentale et des modélisations mathématiques (Figure. 20) :

-Une adaptation rapide du plasmide à son hôte favorisée par la sélection de mutations compensatoires permettant notamment de réduire le coût du plasmide. Ces mutations peuvent avoir lieu dans le chromosome ou dans le plasmide. La diminution du coût du plasmide entraîne sa stabilisation dans l'hôte (Section précédente).

-Le « piggybacking » sur l'adaptation des niches contribue à la persistance dans plasmides. Ce mécanisme consiste à la sélection de mutations chromosomiques permettant l'adaptation des bactéries dans une niche. Parallèlement, ces mutations réduisent le coût de fitness imposé par les plasmides acquis dans cette niche. Kloos et *al.* ont réalisé des expériences d'évolution impliquant un pathogène extraintestinal *E. coli* ST537 et deux plasmides de multirésistance dont l'un est un plasmide non-conjugatif et l'autre un plasmide conjugatif. Dans cette étude, ils ont caractérisé des mutations bénéfiques survenues sur les régulateurs globaux du métabolisme bactérien, *CCR* (carbon catabolite repression) et *ArcAB* (aerobic respiration control). Ces mutations survenues à la fois dans les souches parentales sans plasmide évoluées et dans les souches porteuses évoluées permettent une adaptation de l'hôte dans la niche tout en réduisant le coût de fitness lié au portage du plasmide. (Kloos et al. 2021).

-Les plasmides peuvent persister dans les populations bactériennes grâce à un taux élevé de transfert horizontal. C'est ce qu'ont montré Lopatkin et *al.* en utilisant des expériences

d'évolution impliquant neuf plasmides de résistance de six groupes d'incompatibilité différents dans des populations bactériennes d'*E. coli* en absence de pression antibiotique. Dans cette étude, ils ont montré que lorsque le taux de conjugaison est supérieur au taux de perte liée aux erreurs de ségrégation, les plasmides recolonisent rapidement les souches ayant perdu le plasmide permettant leur persistance dans la population à long terme (Lopatkin et al. 2017).

-La variabilité du coût de fitness en fonction des différents hôtes colonisés favorise la persistance des plasmides. Cette hypothèse soutient que les fonds génétiques dans lesquels la présence du plasmide impose un faible coût de fitness ou entraîne un gain de fitness pour l'hôte permettent le maintien des plasmides dans la population bactérienne. Elle s'appuie notamment sur les études de Alonso-del Valle et al. sur le plasmide de résistance pOXA-48 dans des souches cliniques *E. coli* et *Klebsiella ssp.* Dans ces deux espèces, ils ont montré que le même plasmide pOXA-48 peut, en fonction de la souche utilisée, induire des coûts négatifs plus ou moins importants ou avoir des effets positifs sur le fitness de certaines souches. En combinant la variabilité du fitness avec un modèle mathématique, ils ont montré que l'introduction d'un coût de fitness variable dans leur modèle permettait une stabilisation des plasmides à l'échelle de la population globale. Cette stabilité due à la variabilité du fitness est renforcée lorsque la communauté bactérienne est diversifiée (Alonso-del Valle et al. 2021).

-Les interactions entre différents plasmides dans le même hôte peuvent résulter en une épistasie positive. Ceci consiste en une réduction du coût de fitness imposé par chaque plasmide lorsqu'ils sont coinfectés dans le même hôte. Cette hypothèse a été vérifiée par San Millan et al., qui ont observé dans une de leurs études que cinq des six plasmides utilisés induisaient un coût de fitness moins important en présence d'un autre plasmide que lorsqu'ils étaient seuls dans leur hôte (San Millan, Heilbron, et MacLean 2014).

-La transmission "source-sink spillover". Ce mécanisme est observé à l'échelle des communautés bactériennes et implique des espèces "sink" qui sont incapables de maintenir le plasmide à long terme et des espèces "sources" qui sont des réservoirs de plasmides. Cette hypothèse soutient que dans les communautés bactériennes composées de plusieurs espèces possédant une capacité variable à acquérir, maintenir et transférer des plasmides, ces derniers peuvent persister dans les espèces "sink", grâce au flux de transfert des plasmides des espèces "sources" vers les espèces "sink". Cette hypothèse a été vérifiée par Hall et al. dans une étude impliquant deux espèces de *Pseudomonas* trouvées dans le sol et le plasmide de résistance au

mercure pQBR57. Dans cette étude, le plasmide pQBR57 qui est rapidement perdu dans le fond génétique de *Pseudomonas putida*, est relativement stabilisé dans ce dernier lorsque *Pseudomonas putida* est co-cultivé avec *Pseudomonas fluorescens* dans lequel le plasmide est stable. La persistance de pQBR57 est due à la conjugaison inter-espèce de la souche "source" (*Pseudomonas fluorescens*) vers la souche "sink" (*Pseudomonas putida*) (Hall et al. 2016).

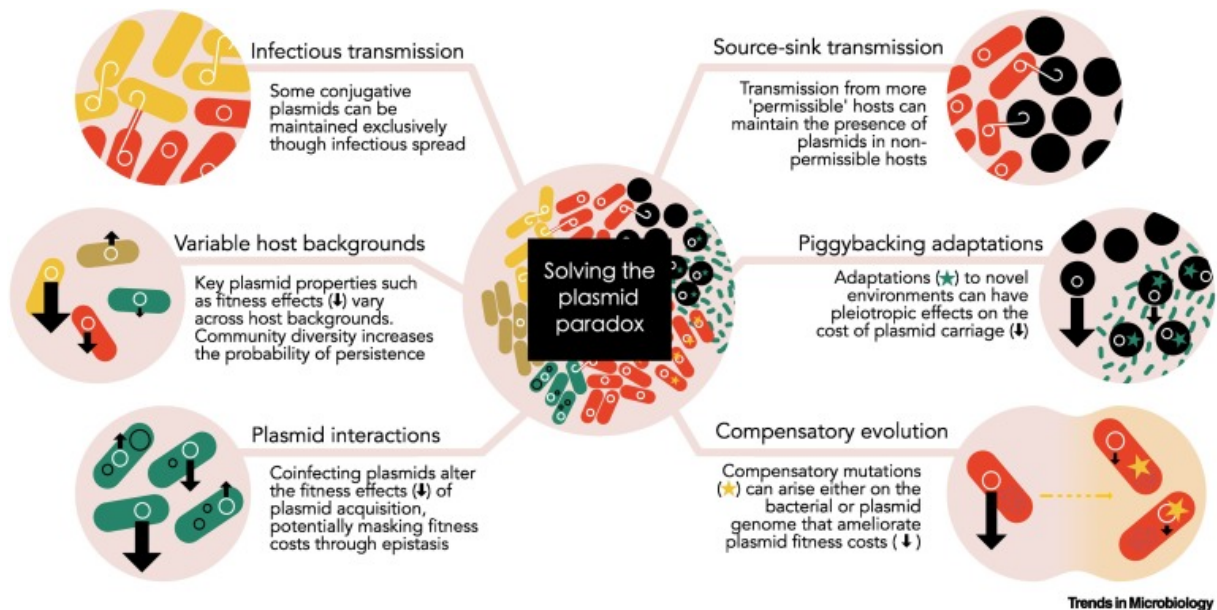


Figure 20 : Solutions évolutives et écologiques au « plasmid paradox ». Issue de (Brockhurst et Harrison 2022).

5. Systèmes de l'hôte limitant la diffusion des plasmides :

Les bactéries ont développé une panoplie de systèmes de défense pour lutter contre l'invasion des EGMs notamment des phages (Millman et al. 2022; Ryazansky, Kulbachinskiy, et Aravin 2018). Ces systèmes de défense sont majoritairement retrouvés sur des îlots génomiques suggérant qu'ils ont été acquis par THG (Millman et al. 2022). Puigbò et al. ont montré qu'en moyenne les gènes codant pour les systèmes de défense ont un flux d'environ 1,4 fois supérieur aux autres gènes du génome et constituent ainsi les gènes qui sont les plus rapidement acquis ou perdus (Puigbò et al. 2017). À ce jour, 152 systèmes de défense différents ont été recensés dans les bases de données de DefenseFinder, un programme de recherche bioinformatique de systèmes de défense (F. Tesson et al. 2024; Florian Tesson et al. 2022). Ces systèmes

interviennent à différentes étapes pour empêcher l'infection par les phages ou en limiter la persistance dans la cellule. Bien que les plasmides puissent apporter un avantage sélectif à l'hôte (cas des ARGs en présence d'antibiotique), ils peuvent être aussi considérés comme des éléments parasites ne partageant pas forcément les mêmes intérêts évolutifs que le chromosome bactérien. Certains facteurs sélectionnés naturellement peuvent conduire à une augmentation de la transmission des plasmides au détriment de l'hôte ou des autres EGMs, ce qui crée des conflits génétiques pouvant être défavorables à l'hôte (Werren 2011). Parmi les systèmes de défense décrits certains seulement ont été montrés avoir un effet sur la diffusion ou la persistance des plasmides.

5.1. Les systèmes de restriction modification de l'hôte

Les systèmes de restriction modification (RM) sont très répandus chez les bactéries et constituent une barrière pour la propagation des plasmides (Shaw, Rocha, et MacLean 2023). Ils constituent en quelque sorte le système immunitaire inné des bactéries. Par exemple, l'expression du RM de type I EcoKI chez *E. coli* MG1655 entraîne une réduction de 85% de la fréquence de conjugaison du plasmide pOLA52 (Roer, Aarestrup, et Hasman 2015). Les systèmes de restriction modification sont constitués typiquement de deux activités antagonistes : 1) une activité endonucléase faisant intervenir une reconnaissance et un clivage de l'ADN au niveau de motifs spécifiques et 2) une activité de modification qui protège les sites cibles dans la cellule hôte. Un ADN étranger entrant dans la cellule est dénué de ces modifications et est donc susceptible à la dégradation par l'endonucléase (Figure. 21). Les systèmes de restriction modification sont regroupés en quatre classes selon la composition des sous-unités et leurs caractéristiques biochimiques (Structure des protéines, reconnaissance des sites de restriction, co-facteurs, spécificité des substrats). Les RM de classes I à III sont composées d'une méthyltransférase qui méthyle l'ADN endogène et d'une endonucléase (REase) qui dégrade l'ADN étranger non méthylé ; les RM de classe IV fonctionnent différemment, ils sont constituées uniquement d'une endonucléase qui cette fois-ci ne dégrade que l'ADN étranger méthylé (Loenen et Raleigh 2014). Outre la méthylation, d'autres modifications ont été décrites. Par exemple l'insertion dans le chromosome de la 7-déazapurine par des enzymes paralogues aux ARNt transglycosylases (*tgtA5*) inhibe la transformation de l'hôte par les plasmides non modifiés (Thiaville et al. 2016). Le système SspABCD–SspE PT utilise un autre type de réaction de modification, par laquelle l'oxygène non-pontant du groupe phosphate lié aux désoxyriboses dans l'ADN est remplacé par un soufre, formant un

groupement phosphorothioate. La reconnaissance de ces marqueurs épigénétiques protège le génome de l'hôte de la dégradation par la nucléase SspE (Xiong et al. 2020). Certains plasmides codent eux-mêmes pour un RM qui les protège de la dégradation par les systèmes de l'hôte en méthylant l'ADN plasmidique favorisant ainsi leur maintenance dans l'hôte (Wein et Dagan 2020).

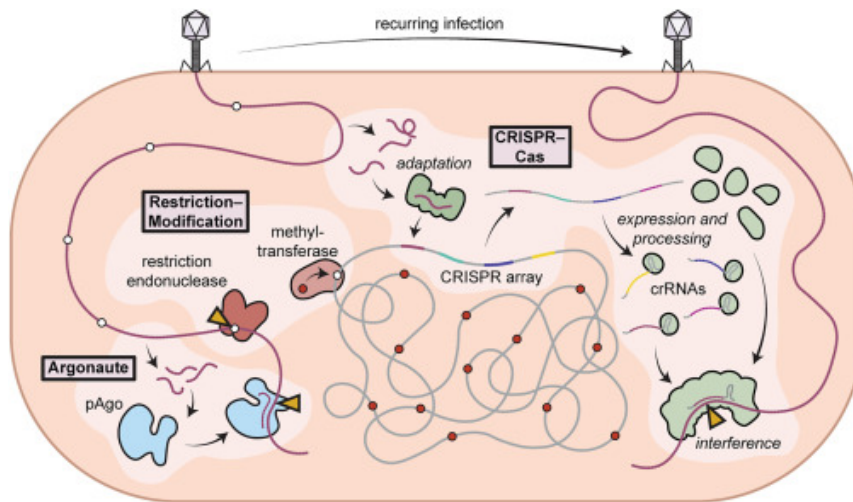


Figure 21 : Mécanismes d'action des systèmes de défense Restriction/Modification, CRISPR/Cas et pAgo sur les EGMs. Issue de (Mayo-Muñoz et al. 2023).

5.2. Système CRISPR/Cas de l'hôte

Les systèmes CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats / CRISPR associated protein) sont décrits comme le système immunitaire adaptatif des bactéries. Ils sont très divers et se différencient par l'architecture des modules effecteurs, leurs structures et leurs fonctions (Koonin, Makarova, et Zhang 2017). Un locus CRISPR-Cas contient des motifs CRISPR et des gènes *cas*. Les motifs CRISPR sont constitués de répétitions palindromiques entre lesquelles s'insèrent des motifs appelés spacers. Ces spacers sont complémentaires à des séquences présentes dans les EGMs, appelées protospacers. Les gènes *cas* constituent deux modules fonctionnels : un module codant pour le système d'adaptation responsable de l'acquisition des séquences spacers à partir de l'ADN étranger et un module codant pour le système d'interférence impliqué dans la génération des ARN-CRISPR (ARNcr), le ciblage des protospacers et la dégradation de l'ADN étranger. Le fonctionnement de CRISPR-Cas est divisé en trois étapes : 1) l'adaptation (acquisition de spacers), 2) la synthèse des ARNcr et 3) l'interférence. Brièvement, des petits fragments d'ADN étranger provenant des EGMs (spacers) sont générés et insérés entre les répétitions palindromiques formant les

motifs CRISPR, les motifs CRISPR sont ensuite transcrits en ARNcr précurseur (pre-ARNcr). Les pre-ARNcr sont maturés en ARNcr, constitués d'un spacer flanqué par des séquences issues des répétitions palindromiques. Enfin, l'ARNcr associé aux protéines Cas forme le complexe d'interférence qui cible l'ADN étranger en se liant par complémentarité aux protospacers provoquant leur dégradation pour les protéines Cas (Figure. 21) (Mayo-Muñoz et al. 2023). Les systèmes CRISPR peuvent être impliqués dans la défense contre les plasmides. Par exemple, Garneau et al. ont montré que le système CRISPR1/Cas de *S. thermophilus* est capable de générer et capturer des spacers d'un plasmide conjugatif contenant le gène *cat* conférant la résistance au chloramphénicol. L'acquisition du spacer après un premier contact avec le plasmide empêche l'acquisition ultérieure de ce plasmide (Garneau et al. 2010). Une étude analysant la fréquence du système CRISPR de type I-E dans une collection de 459 souches *K. pneumoniae* du groupe clonal (CG258) (clone mondialement disséminé associé aux plasmides IncF-*bla*_{KPC}) a révélé que seulement 12 des 247 souches portant IncF-*bla*_{KPC} possèdent ce système. Les analyses phénotypiques ont montré que ce système réduit la fréquence de conjugaison du plasmide IncF de deux fois et entraîne la perte du plasmide dans 50% de la population après 10 jours de passages sans antibiotique. La rareté de ce système CRISPR de dans les souches du groupe clonal 258 pourrait expliquer la diffusion des IncF-*bla*_{KPC} dans ce complexe clonal (Zhou et al. 2020).

5.3. Les protéines argonautes

Les protéines argonautes ont d'abord été découvertes chez les eucaryotes (eAgos) où elles interviennent dans le système d'interférence par l'ARN (ARNi) (Waterhouse, Wang, et Lough 2001). Les ARNi sont regroupés en trois classes : les ARNmi qui sont des micro-ARN endogènes codés dans le génome eucaryote pour réguler l'expression des gènes en dégradant les ARNm ou en bloquant leur traduction ; les ARNsi issus de la dégradation des virus à ARN et conduisant à une dégradation de ces derniers ; les ARNpi (PIWI-interacting RNA) essentiellement exprimés dans les cellules germinales. Trois protéines sont généralement impliquées dans l'ARNi : une protéine Argonaute (Ago-Piwi), une protéine de type Dicer contenant un domaine ARNase III et un domaine hélicase et une ARN polymérase ARN dépendant (RdRP) (Shabalina et Koonin 2008). Les protéines Argonautes utilisent les ARNi comme guides pour reconnaître et dégrader les ARN ciblés ou diminuer leur expression. Les protéines Argonautes sont également présentes chez les procaryotes (pAgos) (bactéries et archées) où elles jouent un rôle dans l'immunité innée (Figure. 21). Les pAgos sont très

diversifiées du point de vue de leur structure et de leur activité puisqu'elles sont capables d'utiliser des séquences guides soit de type ADN, soit de type ARN. De même elles sont capables de cibler soit des ADNs, soit des ARNs. Du point de vue de leur structure elles sont divisées en trois groupes selon l'architecture des différents domaines : les Argonautes longues de type A (Long-A pAgo), les Argonautes longues de type B (Long-B pAgo) et Argonautes courtes (short pAgos)(Ryazansky, Kulbachinskiy, et Aravin 2018). Les pAgos Long-A et Long-B sont similaires aux eAgos avec une structure bilobée composée du domaine "middle" (MID) et du domaine N-terminal d'un côté, du domaine "P-element-induced wimpy testis" (PIWI) et du domaine PIWI-Ago-Zwille (PAZ) de l'autre. Dans les pAgos Long-A et les Argonautes eucaryotes, le domaine PIWI est responsable de l'activité endonucléase de la protéine et contient les acides aminés DEDX impliqués dans la catalyse. Les domaine MID et PAZ sont responsables de la fixation des extrémités 5' et 3', respectivement, des séquences guides. Les pAgos Long-B présentent la même structure mais le domaine PIWI est dénué d'activité nucléase. Les pAgos courtes contiennent les domaines MID et PIWI, mais les domaines PAZ et N-terminal sont absents. Certaines pAgos courtes ont perdu aussi le domaine MID et d'autres contiennent un domaine APAZ (analogue de PAZ mais sans similarité de séquence) (Ryazansky, Kulbachinskiy, et Aravin 2018). Le domaine MID permet la liaison à l'extrémité 5 prime des séquences guides. Dans les Argonautes Long-B les acides aminés responsables de cette liaison sont très conservés formant un motif consensus YKQxxK. C'est le cas par exemple pour RsAgo de *Rhodobacter sphaeroides* (Y463, K467, Q478 et K506) (Figure .22).

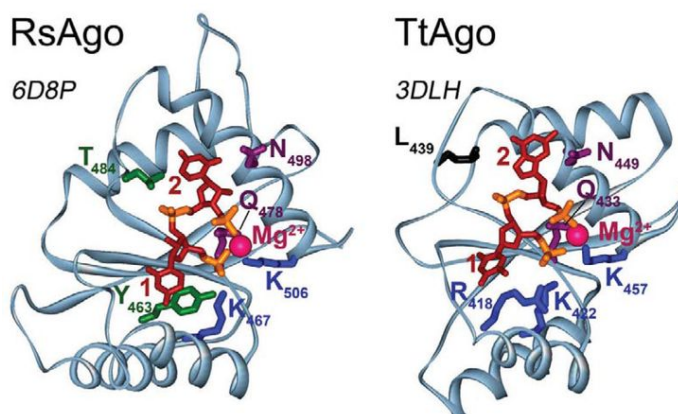


Figure 22 : Structure de RsAgo de *Rhodobacter sphaeroides* et TtAgo de *Thermus thermophilus*. Les acides aminés conservés sont indiqués, RsAgo contient un guide 5 prime ARN et TtAgo un guide 5 prime ADN. Issue de (Ryazansky et al. 2018).

Un exemple d'Argonaute de type Long-A impliqué dans la défense contre les plasmides est l'argonaute de *Thermus thermophilus* (TtAgo). TtAgo est chargée par des guides ADN

phosphorylés à l'extrémité 5 prime d'environ 13-25 pb majoritairement d'origine plasmidique. *TtAgo* et ces guides ADN forment un complexe qui se lie sur les plasmides par complémentarité grâce au guide ADN suivi de sa dégradation par l'activité nucléase de *TtAgo*. Cette argonaute empêche ainsi l'acquisition et la dissémination des plasmides (Swarts, Jore, et al. 2014). L'argonaute *CbAgo* de *C. difficile* élimine également des plasmides de différents groupes d'incompatibilité empêchant leur diffusion. Chez *CbAgo*, les ADN guides sont générés majoritairement à partir de séquences multicopies suggérant que cette argonaute se base sur la nature multicopie des EGMs dont les plasmides pour les cibler et les éliminer (Kuzmenko et al. 2020).

Les gènes codant pour les pAgos long-B et les pAgos courtes qui, à la différence des pAgos long-A ne possèdent pas d'activité nucléase, sont fréquemment trouvés au niveau du génome à proximité de gènes codant pour des nucléases, des protéines à domaine SIR2 impliquées dans le métabolisme du NAD, protéines à domaines membranaires (Ryazansky, Kulbachinskiy, et Aravin 2018; Song et al. 2023; Swarts, Makarova, et al. 2014; Xiaoshen Wang et al. 2023). Il a été récemment montré dans différents systèmes que ces protéines sont utilisées comme protéines effectrices dans des complexes avec les pAgos, l'activité de ces complexes conférant une immunité contre des phages ou des plasmides (Lu et al. 2024; Song et al. 2023; Swarts, Makarova, et al. 2014). Dans ces différents systèmes, l'interaction entre la protéine Argonaute et l'acide nucléique ciblé fait intervenir un appariement avec la séquence guide et conduit à l'activation de la protéine effectrice.

5.4. Autres systèmes anti-plasmides de l'hôte

-Le système Wadjet est un système antiplasmide qui empêche la transformation des plasmides dans l'hôte grâce à la reconnaissance de la topologie de l'ADN plasmidique. Il est constitué de quatre sous-unités différentes JetABCD : JetC est une protéine de type SMC (structural maintenance of chromosome), JetA est une kléisine, un partenaire des protéines SMC, JetB est une protéine KITE (kleisin interacting tandem winged-helix elements of SMC complexes) et JetD contient un domaine nucléase. Le complexe JetABC est similaire au complexe condensine MukEBF bactérien impliqué dans la ségrégation de l'ADN lors de la division cellulaire, se lie au plasmide. Seul l'ADN circulaire est ciblé par ce système (Deep et al. 2022). Selon Pradhan et al., un dimère du complexe JetA₁B₂C₂ utilise une activité d'extrusion de boucle dépendante de l'ATP pour reconnaître les molécules circulaires de plasmide qui sont ensuite clivées par un dimère de JetD (Pradhan et al. 2024). Des systèmes similaires sont retrouvés à la fois chez

les bactéries Gram positives telles que *Bacillus cereus* et *Corynebacterium glutamicum* et les bactéries Gram négatives telles que *P. aeruginosa* (Deep et al. 2022; Weiß et al. 2023).

-Le système antiphage BREX (Bacteriophage exclusion) de type I d'*E. coli* est aussi impliqué dans l'élimination de plasmides de groupe IncF majoritairement porteurs de *bla_{KPC}* et *bla_{NDM}* chez *E. coli*. Il est constitué de six sous-unités différentes BREX-ABCXZL : BREX-A et B sont des protéines de fonction inconnues, BREX-C contient le domaine ATPase, BREX-X le domaine méthylase, BREX-Z le domaine phosphatase alcaline et BREX-L le domaine protéase. Le mécanisme d'action du système BREX dépend de la méthylation du génome bactérien sur des sites spécifiques pour le distinguer de l'ADN étranger comme pour les systèmes RM de type I à III. Cependant, BREX est dépourvu de nucléase donc n'induit pas la dégradation directe de l'ADN. L'infection d'une bactérie possédant un système BREX par des phages dépourvus des méthylation caractéristiques de BREX est inhibée (Gordeeva et al. 2019). Chez les plasmides, l'absence de méthylation du site spécifique de reconnaissance de BREX 5'-CANCATC-3 conduit à une réduction de l'efficacité de conjugaison et une abolition complète de la transformation. Seules 5,4% (23/424) des souches cliniques d'*E. coli* dans l'étude Jiang et al. contiennent BREX (Jiang et al. 2024).

-Les systèmes DdmABC et DdmDE (Ddm pour DNA-défense modules) de *Vibrio*. Récemment ont été découverts par (Jaskólska, Adams, et Blokesch 2022; O'Hara, Alam, et Ng 2022) deux systèmes de défense antiplasmide et antiphage, DdmABC et DdmDE, dans la souche *Vibrio cholerae* El Tor responsable de la septième pandémie du choléra (Figure. 23). Le système DdmDE cible uniquement les petits plasmides (moins de 10 kb) et provoquent leur élimination après 10 générations de croissance. DdmE est une protéine similaire à une argonaute mais est dépourvue des domaines caractéristiques des argonautes comme le domaine PIWI. DdmD contient un domaine hélicase en N-terminal qui contient des acides aminés conservés impliqués dans la liaison des nucléotides et l'hydrolyse de l'ATP et un domaine nucléase en C-terminal. La substitution des acides aminés conservés dans le site de liaison aux nucléotides (K55A) ou l'hydrolyse de l'ATP (E273A) du domaine hélicase abolit complètement l'activité de DdmDE. Par contre la substitution d'acide aminé conservé du domaine nucléase (K1102A) abolit partiellement l'activité du système. Selon le modèle proposé, DdmE est une protéine senseur de type argonaute inactif qui se lie au plasmide et recrute DdmD doté d'une activité nucléase qui dégrade les plasmides. DdmABC ne provoque pas l'élimination complète des plasmides mais la présence d'un plasmide induit un défaut de croissance suggérant un mécanisme

d'infection abortive. DdmA possède un domaine nucléase, DdmB contient un site de liaison à l'ATP et DdmC est une protéine SMC similaire à JetC dans le système Wadjet. DdmABC provoque une dégradation partielle des grands plasmides comme le plasmide de résistance pVCR94 retrouvés dans les souches de *V. cholerae* et interfère avec l'acquisition de ces plasmides lors de la conjugaison. En présence d'une concentration élevée du phage P1, DdmABC provoque un arrêt de croissance suivi d'une lyse de l'hôte suggérant que ce système fonctionne comme un système Abi (Abortive infection).

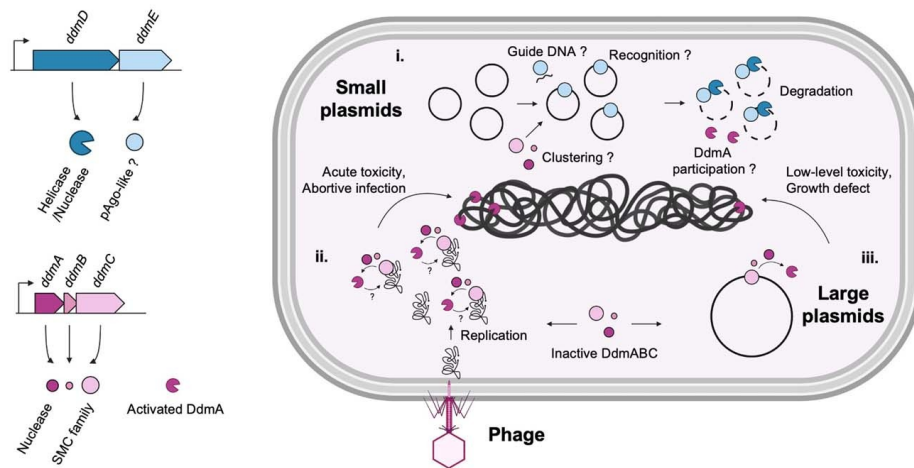


Figure 23 : Mode d'action des systèmes de défense DdmABC et DdmDE. Issue de (Jaskólska, Adams, et Blokesch 2022).

Chapitre 3 : Les plasmides pOXA-48 et l'émergence des clones *E. coli* ST38 producteurs de carbapénémase OXA-48

1. Découverte et origine du plasmide pOXA-48

1.1. Découverte des pOXA-48

Le gène *bla*_{OXA-48} a été initialement découvert dans une souche *K. pneumoniae* isolée en Turquie en 2001. Dans cette souche, ce gène était localisé à proximité d'une *IS1999* au sein d'un plasmide conjugatif d'environ 70 kb nommé pA-1 (Poirel et al. 2004). Rapidement, des plasmides possédant des caractéristiques similaires c'est à dire approximativement la même taille, une capacité à conjuguer élevée et portant uniquement le gène *bla*_{OXA-48} comme ARG, ont été détectés dans d'autres souches d'Enterobacteriaceae isolées dans d'autres pays comme la France et la Tunisie suggérant une dissémination de ce plasmide (Carrère et al. 2010; Cuzon et al. 2011). Le séquençage complet du plasmide révèle un plasmide du groupe d'incompatibilité IncL/M d'approximativement 62 kb nommé pOXA-48a contenant le gène *bla*_{OXA-48} inséré dans un transposon composite *Tn1999*. Ce plasmide partage 97% d'identité de séquence avec le plasmide IncL/M pCTX-M-3 qui a été utilisé comme référence pour son annotation (Poirel, Bonnin, et Nordmann 2012).

Les plasmides des groupes d'incompatibilité L et M forment un groupe de plasmides proches, mais compatibles qui peuvent coexister dans le même hôte. Ils ne peuvent pas être différenciés par la méthode de typage basée sur la PCR des gènes du réplicon (Carattoli et al. 2005). Cependant, une analyse des séquences de différents plasmides IncL/M, pOXA-48 inclus, par Carattoli et al., a permis de séparer le groupe IncL/M en groupes IncL et groupe IncM (Figure. 24). Les deux groupes partagent un core génome de 38 kb comprenant le module de transfert, le module de réplication, le système de partition *parAB* et un certain nombre de gènes codant pour des protéines hypothétiques. Ils diffèrent au niveau de la séquence des trois protéines ExcA, TraY et TraX (35%, 59% et 75% d'identité de séquence protéique respectivement) et de la séquence de l'ARN antisens, *ARN_{inc}* impliqué dans la régulation de la réplication des plasmides IncL/M. Sur la base de l'ARN antisense *ARN_{inc}* le groupe M peut être redivisé en sous-groupes M1 et M2 non compatibles en raison de la quasi-identité (99% d'identité) des protéines ExcA et TraY. Les protéines ExcA de la bactérie receveuse et TraY de la donneuse sont impliquées dans un système d'exclusion d'entrée. Lors de la conjugaison, ExcA de la

receveuse reconnaît TraY de la donneuse et si cette dernière est similaire à TraY de la receveuse la conjugaison est inhibée (Carattoli et al. 2015).

Les plasmides IncL sont principalement retrouvés chez les Enterobacteriaceae telles que *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* et *E. coli*. Ils jouent un rôle essentiel dans la dissémination des gènes de résistance chez ces bactéries Gram négatives. Le groupe IncL comprend les plasmides pOXA-48 portant *bla*_{OXA-48} et d'autres plasmides porteurs d'ARGs comme *bla*_{CTX-M} codant pour une β -lactamase, *rmtE4* codant pour une méthyltransférase de l'ARN 16S conférant une pan-résistance aux aminoglycosides ou *bla*_{VIM-1} codant pour une carbapénémase localisée dans un intégron contenant d'autres ARGs conférant une multirésistance (Cabanel et al. 2021; Cañada-García et al. 2023; Carattoli et al. 2015; Delgado-Blas et al. 2023). Le plasmide pOXA-48 à l'origine de la dissémination de *bla*_{OXA-48} est fréquemment retrouvé en Europe. En France il est le plus prévalent des plasmides porteurs d'ARGs codant pour les carbapénémases. Il est retrouvé dans des entérobactéries isolées chez l'homme, les animaux et dans l'environnement (Haenni et al. 2022; Hendrickx et al. 2021; Patiño-Navarrete et al. 2022; Skalova et al. 2017). Les plasmides pOXA-48 sont prévalents dans certaines souches épidémiques notamment de *K. pneumoniae* et *E. coli* décrites dans différentes régions du monde indiquant leur dissémination rapide (Carrër et al. 2008, 2010; Cuzon et al. 2011; L. Wang et al. 2021).

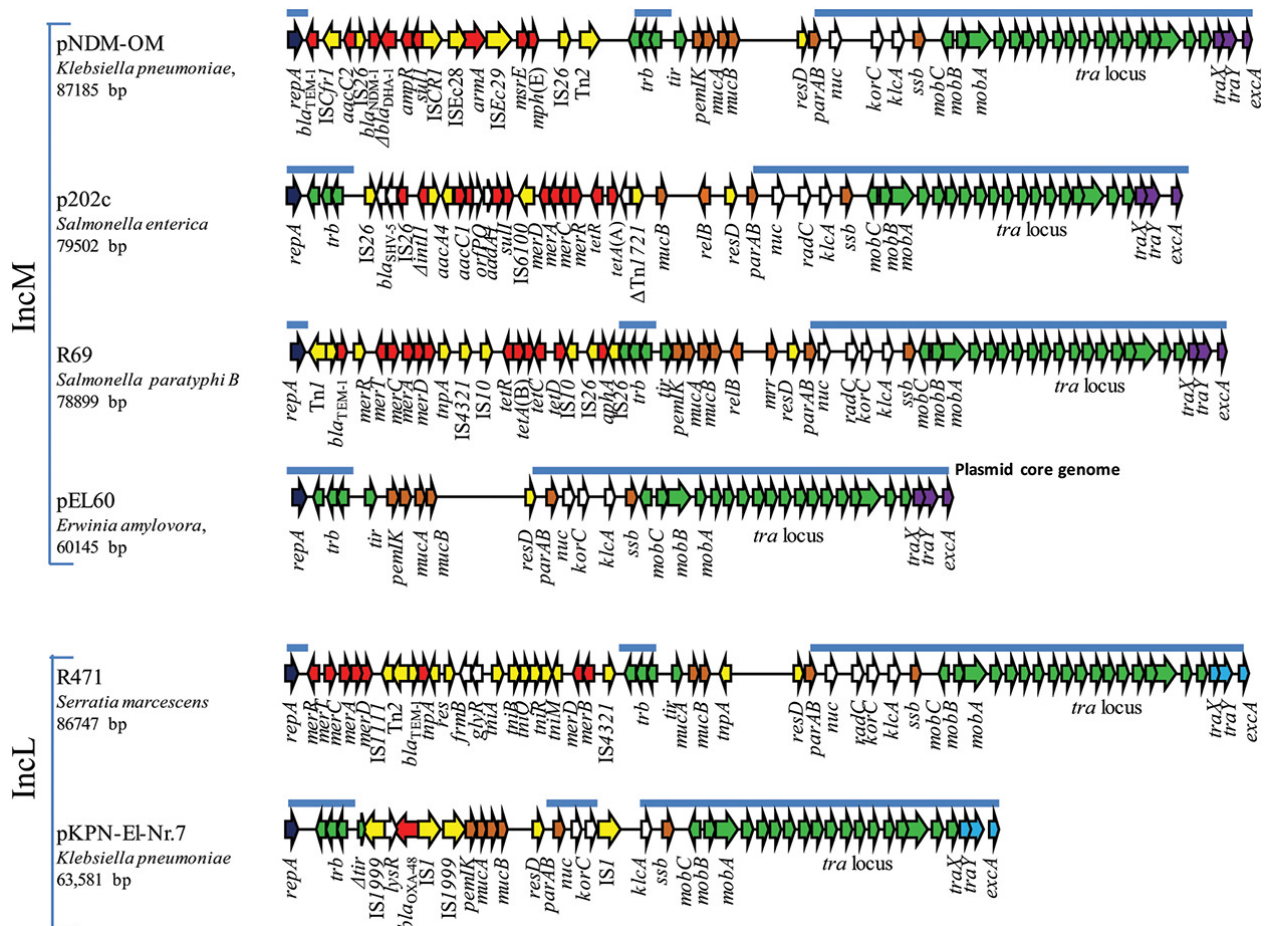


Figure 24 : Structure des plasmides IncL et IncM. pKPN-EI-Nr.7 est un variant de pOXA-48 et pEL60 un plasmide sans ARG, l'ancêtre probable des plasmides IncL et IncM. Le core génome des plasmides est souligné en bleu. Les gènes *traX*, *traY* et *excA* qui différencient le groupe IncL du groupe IncM sont colorés en bleu (IncL) et en violet (IncM). Issue de (Carattoli et al. 2015).

1.2. Origine des pOXA-48

Au sein de pOXA-48, *bla*_{OXA-48} ainsi qu'un gène *lysR* codant pour un régulateur transcriptionnel et une portion du gène *acc* codant pour une acétyl coenzyme A carboxylase se trouvent encadrés par deux séquences IS1999 formant un transposon composite Tn1999.

OXA-48 partage 92% d'identité en acides aminés avec OXA-54, une carbapénémase codée par le core génome de *Shewanella oneidensis*. De même le gène *lysR* de Tn1999 partage 88% d'identité de séquence nucléotidique avec le gène *lysR* situé à proximité de *bla*_{OXA-54} chez *Shewanella oneidensis* (Poirel, Héritier, et Nordmann 2004). Cependant, les IS1999 entourant *bla*_{OXA-48} dans le plasmide pOXA-48 ne sont pas retrouvées à proximité de *bla*_{OXA-54}. De façon similaire, le gène chromosomique *bla*_{OXA-199} de *Shewanella xiamenensis* isolé en Chine code

pour une carbapénémase similaire à OXA-48 et partage 99,4% d'identité de séquence nucléotidique avec *bla*_{OXA-48}. On trouve aussi en aval de *bla*_{OXA-199} deux gènes contigus *lysR-acc* partagent 99% et 100% d'identité de séquence nucléotidique respectivement avec les séquences de Tn1999. Les IS1999 en amont et en aval de *bla*_{OXA-48} du plasmide pOXA-48 ne sont pas retrouvées à proximité de ce gène comme chez *bla*_{OXA-54}. La conservation de la synténie des trois gènes et leur similarité de séquence suggèrent fortement que *bla*_{OXA-48} a été capturé à la suite de l'insertion des IS1999 dans le chromosome des *Shewanella spp*, formant le transposon composite Tn1999 qui a été ensuite capturé par un plasmide IncL conjugatif (Figure. 25) (Zong 2012).

Le plasmide IncL/M pEL60 d'*Erwinia amylovora* d'environ 60 kb et dépourvu d'ARG possède une structure similaire à celle des plasmides pOXA-48 avec deux grandes différences : i) l'absence de l'insertion de Tn1999 dans le gène *tir* de pOXA-48 et ii) la différence des séquences *traX*, *traY* et *excA*. Cette similarité de séquence et la conservation de la synténie des gènes suggère que pEL60 pourrait être le plasmide ancestral des plasmides IncL et IncM ou un plasmide proche de cet ancêtre (Figure. 24) (Bonnin et al. 2013).

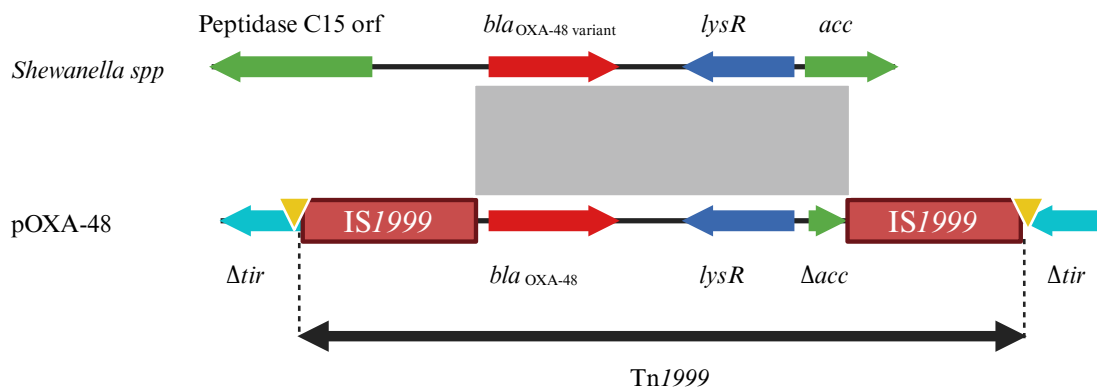


Figure 25 : Capture du gène *bla*_{OXA-48} à partir du chromosome de *Shewanella spp*. En vert les gènes chromosomiques de *Shewanella spp.*, en cyan le gène *tir* du plasmide pOXA-48 dans lequel s'est inséré Tn1999, en jaune les duplications du site d'insertion. Figure créée avec Biorender.

2. Caractéristiques majeures de pOXA-48

2.1. Nombre de copies et rôle du systèmes ParAB-*nuc* et PemIK

Les plasmides pOXA-48 sont des plasmides conjugatifs à faible nombre de copies, variant entre une et quatre copies par cellules (Alonso-del Valle et al. 2023; DelaFuente et al. 2022).

Certaines mutations dans le gène *repA* de pOXA-48 peuvent entraîner une augmentation de ce nombre de copies. L'insertion d'un nucléotide en amont de *repA*, le gène codant pour la protéine RepA responsable de l'initiation de la réplication du plasmide conduit à une augmentation du nombre de copies passant de quatre à plus de huit copies par cellule bactérienne (DeLaFuente et al. 2022). Les plasmides pOXA-48 contiennent un système de partition ParAB impliqué dans la ségrégation des plasmides lors la division cellulaire. L'inactivation de ParAB du plasmide IncM2 pCTX-M-3 identique à celui de pOXA-48 entraîne une perte très rapide des plasmides pCTX-M-3. La mutation dans la séquence *nuc* codant pour une nucléase putative et localisée en aval des gènes *parAB* déstabilise aussi le plasmide, indiquant un rôle potentiel de *nuc* dans la partition du plasmide (Mierzejewska, Kulińska, et Jagura-Burdzy 2007).

Les plasmides pOXA-48 contiennent également un système toxine-antitoxine PemIK similaire à 97% avec celui du plasmide R100 qui est impliqué dans la persistance de ce plasmide (Tsuchimoto, Ohtsubo, et Ohtsubo 1988). PemIK de pOXA-48 et du plasmide IncM2 pCTX-M-3 sont identiques, cependant la délétion de la région codant pour PemIK dans pCTX-M-3 n'affecte pas la stabilité du plasmide (Mierzejewska, Kulińska, et Jagura-Burdzy 2007). Cependant, il a été montré que la toxine PemK de pOXA-48 induit la dormance de *K. pneumoniae* empêchant l'infection de la bactérie en présence de phages lytiques. En inhibant l'infection par des phages lytiques, PemIK joue un rôle dans la survie de l'hôte et permet ainsi le maintien de pOXA-48 dans l'hôte et sa transmission dans la population bactérienne après le retrait des phages (Bleriot et al. 2022)

2.2. Les transposons composites Tn1999 et Tn6237

La position de l'insertion du transposon composite Tn1999 contenant *bla*_{OXA-48} dans le plasmide pOXA-48 est une caractéristique majeure du plasmide. Tn1999 est inséré à la même position dans le gène *tir* du plasmide IncL dans tous les plasmides pOXA-48 (Carrër et al. 2010), suggérant un évènement unique d'intégration et une dissémination et une diversification subséquente du plasmide. Tn1999 peut s'inverser dans le plasmide pOXA-48 probablement par un mécanisme de recombinaison homologue entre les deux IS1999 inversées répétées changeant l'orientation du gène *bla*_{OXA-48} dans le plasmide. Huit variants de Tn1999 ont été décrits à ce jour (Figure. 26) suite à divers évènements génomiques : insertions d'ISs (IS1R, ISKpn19), de transposons (Tn2015, Tn7442), inversions et délétions (Figure. 26) (Beyrouthy et al. 2014a; Carrër et al. 2008; Giani et al. 2012; Kumwenda et al. 2021; A Potron et al. 2013; Sattler et al. 2022). Le variant Tn1999.2 (Figure. 26) est le plus fréquent avec une prévalence

de 78,5% (84/107) dans l'étude épidémiologique réalisée par Potron *et al.* (A Potron *et al.* 2013).

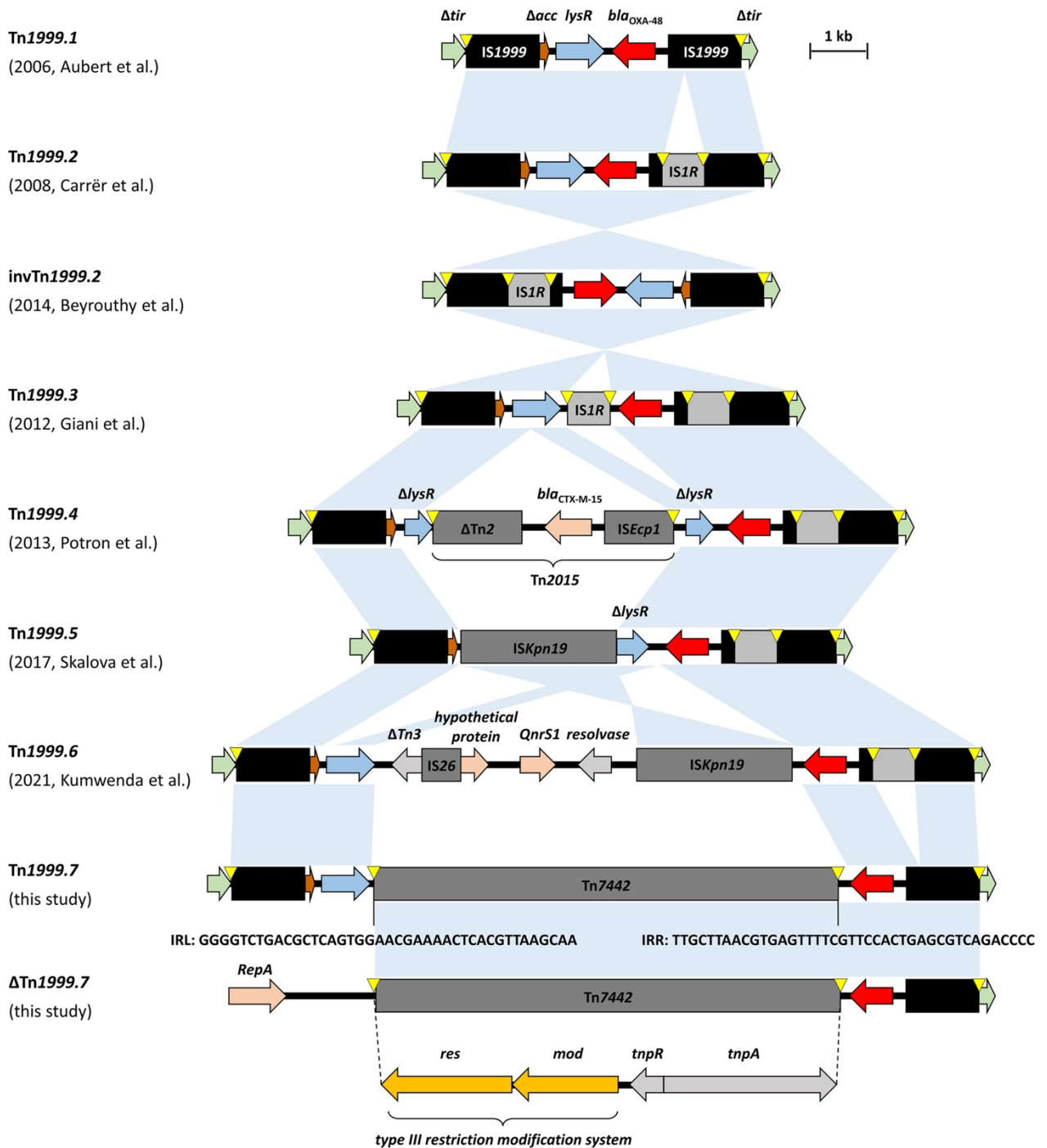


Figure 26 : Variants des différents Tn1999 retrouvés dans les plasmides pOXA-48. En vert le gène *tir*, en noir les *IS1999*, en rouge le gène *bla_{OXA-48}*, en bleu, le gène *lysR*, en orange le gène *acc* tronqué. Les différents évènements génomiques sont indiqués en gris, Issue de (Sattler *et al.* 2022)

Certains plasmides pOXA-48 contiennent une *ISIR* supplémentaire située à environ 18 kb de *Tn1999-2* en aval du gène *korC*. Lorsque le *Tn1999.2* est inversé par rapport à l'*IS1* inséré dans l'*IS1999* en amont de *bla*_{OXA-48}, un transposon composite *Tn6237* d'environ 21,9 kb encadré par les deux *IS1* est constitué (Figure. 27)(Beyrouthy et al. 2014a). On trouve dans d'autres pOXA-48 les deux *IS1* présentes sans l'inversion de *Tn1999.2*. Ce transposon *Tn6237* a été observé dans le chromosome bactérien suggérant une transposition du gène *bla*_{OXA-48} dans le chromosome à partir de plasmides pOXA-48 (Figure. 27) (Beyrouthy et al. 2014a; Patiño-Navarrete et al. 2022; Skalova et al. 2017; Turton et al. 2016). Ces insertions chromosomiques sont observées surtout chez *E. coli* ST38 mais aussi de façon rare chez *E. coli* ST227, ST131, ST127, ST88 et *K. pneumoniae* (Beyrouthy et al. 2014a; Hendrickx et al. 2021; Mataseje et al. 2018).

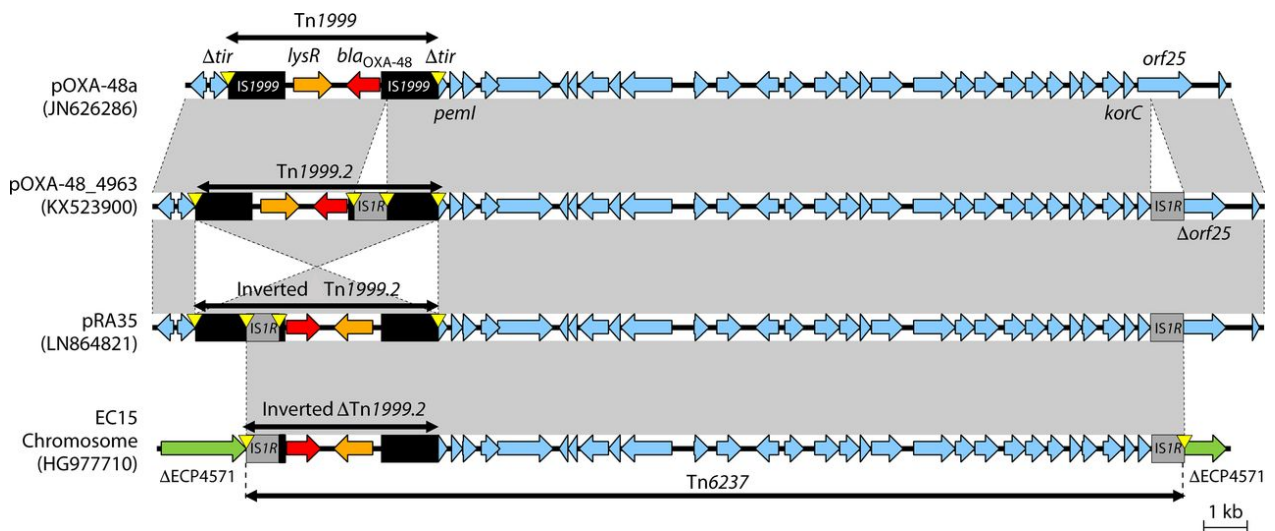


Figure 27 : Environnements génétiques de *Tn1999* et ses variants dans différents variants de pOXA-48 et l'insertion de *Tn6237* dans le chromosome. En vert le gène chromosomique au site d'insertion, en bleu les gènes plasmidiques et en jaune les duplications du site d'insertion. Adapté de (J. D. D. Pitout et al. 2019).

2.3. Inactivation du gène *tir* et son rôle dans la conjugaison des pOXA-48

Dans les plasmides pOXA-48, le gène *tir* est interrompu par *Tn1999* (Poirel, Bonnin, et Nordmann 2012). Initialement le gène *tir* a été décrit dans le plasmide R100 comme ayant une fonction homologe au gène *F3* du plasmide IncP-1 RP4. Ce gène est à l'origine de l'inhibition de la conjugaison de ce dernier plasmide par interférence avec le module de transfert (Tanimoto et al. 1985). La séquence de *tir* dans pCTX-M-3, la référence utilisée pour l'annotation de pOXA-48a, et dans R100 est identique à 100% avec celle dans les plasmides pOXA-48

(Mierzejewska, Kulińska, et Jagura-Burdzy 2007). Le promoteur du gène *tir* de pOXA-48a est un promoteur fort à la suite d'une mutation dans la boîte -35 (TCGGCA) par rapport à celui du plasmide IncL/M pNDM-OM (-35 : TCGGTA) portant un gène *tir* intact. La mesure de l'expression de *tir* par RT-qPCR révèle qu'il est 11 fois plus exprimé chez pOXA-48a comparé à pNDM-OM. Cependant la protéine Tir produite est tronquée dans le cas de pOXA-48. La complémentation de pOXA-48a avec un gène *tir* sauvage entraîne une diminution de la fréquence de conjugaison entre 50 et 100 fois, montrant que l'inactivation de la protéine codée par *tir* lève l'inhibition de la conjugaison de pOXA-48a (Poirel, Bonnin, et Nordmann 2012). En effet, les fréquences de conjugaison des plasmides pOXA-48 sont élevées de façon générale, variant entre 10^{-1} et 10^{-4} transconjugants par donneuses ou receveuses selon les conditions expérimentales (Hamprecht et al. 2019; León-Sampedro et al. 2021; Poirel, Bonnin, et Nordmann 2012; Sattler et al. 2022). Cette caractéristique des pOXA-48 a probablement contribué à leur dissémination rapide dans le monde.

2.4. Diversification des pOXA-48

Depuis leur apparition en clinique, on observe une diversification des plasmides pOXA-48, incluant l'introduction de SNPs et des modifications de la structure et de la taille. Cette diversification a été observée dans un contexte hospitalier entre plasmides isolés d'un même patient, impliquant des mutations ponctuelles, des délétions ou des insertions provoquant des effets phénotypiques divers sur le fitness, la résistance aux carbapénèmes et le nombre de copies de plasmides. (DelaFuente et al. 2022). À cela s'ajoutent la diversification liée à l'insertion de *Tn1999* et les réarrangements des différents variants de *Tn1999* affectant ainsi la structure même du plasmide (Section 2.2.). Différents plasmides IncL pOXA-48 portant l'ARG *bla*_{OXA-48} dans le *Tn1999.2* et issus de souches d'Enterobacteriaceae isolées dans des hôpitaux en Chine ont été décrits récemment (L. Wang et al. 2021). Certains de ces plasmides contiennent parfois jusqu'à cinq ARGs en plus de *bla*_{OXA-48} dont *bla*_{CTX-M-14} codant pour une BLSE, *bla*_{TEM-1}, différents variants d'*aph* codant pour aminoglycoside phosphotransférase conférant la résistance aux aminoglycosides et *erm(B)* à l'origine de la résistance à l'érythromycine insérés à différentes positions dans le plasmide en dehors de *Tn1999.2*. Cela montre une diversification de pOXA-48 qui, à l'origine ne porte que *bla*_{OXA-48}, s'est ensuite transformé en un plasmide conférant une multirésistance. Les insertions et les délétions dans les plasmides pOXA-48 sont à l'origine de la diversité de taille retrouvée chez ces plasmides, allant de 57 kb à plus de 109 kb (J. D. D. Pitout et al. 2019; Sattler et al. 2022; L. Wang et al. 2021). Cette diversification

des plasmides pOXA-48 pourrait entraîner des variations dans le coût de fitness imposé par ces plasmides à l'hôte et dans leur persistance dans les populations.

2.5. Coût de fitness de pOXA-48 et stabilité

L'analyse du coût de fitness lié à l'acquisition des plasmides pOXA-48 dans la souche de laboratoire J53 donne des résultats contradictoires dans la littérature. Dans certains cas, on n'observe pas de coût de fitness provoqué par les pOXA-48 (Hamprecht et al. 2019), dans d'autres cas on observe une baisse de fitness dépassant les 30% (DelaFuente et al. 2022). Cependant, une étude portant sur 25 souches *E. coli* et 25 souches *Klebsiella spp.*, dont 20 *K. pneumoniae* a montré que l'acquisition du même plasmide pOXA-48 par ces 50 souches cliniques donnait des phénotypes divers. En effet, on a observé une variabilité de fitness allant d'une baisse de 30% à un gain d'environ 20% de fitness des transconjugants par rapport aux souches non porteuses à la fois chez les *E. coli* et les *Klebsiella spp.* (Figure. 28) (Alonso-del Valle et al. 2021). Ceci montre que le coût de fitness lié à l'acquisition de pOXA-48 est dépendant du fond génétique de l'hôte.

Par ailleurs, dans l'étude de De la Fuente et al., le variant pOXA-48 muté dans en amont de *repA* et caractérisé par un nombre de copies plus élevé, induit un coût de fitness plus important en absence d'antibiotique dans son hôte, et une résistance accrue à l'ertapénème. Dans cette même étude, un variant pOXA-48 identifié chez un autre patient et présentant une délétion partielle de *bla_{OXA-48}* qui abolit la résistance à l'ertapénème, induit un coût de fitness plus faible que le variant avec le gène *bla_{OXA-48}* complet (DelaFuente et al. 2022). Cela suggère que le coût de fitness dépend du variant plasmidique utilisé et au moins partiellement de l'expression de *bla_{OXA-48}*.

Globalement, les plasmides pOXA-48 ont été décrits comme des plasmides stables en absence de pression de sélection par des études différentes avec une certaine variabilité, allant de 80% de souches porteuses après sept jours de passage à 100% de souches porteuses après deux jours de passage (Alonso-del Valle et al. 2021; Hamprecht et al. 2019; Sattler et al. 2022). Cependant, l'insertion du Tn7442 portant le système de restriction de type III dans le Tn1999.7 d'un variant de pOXA-48 entraîne une augmentation de la stabilité après quatorze jours de passage sans antibiotique comparé au plasmide pOXA-48 portant Tn1999.2 dépourvu de ce système de restriction (Sattler et al. 2022).

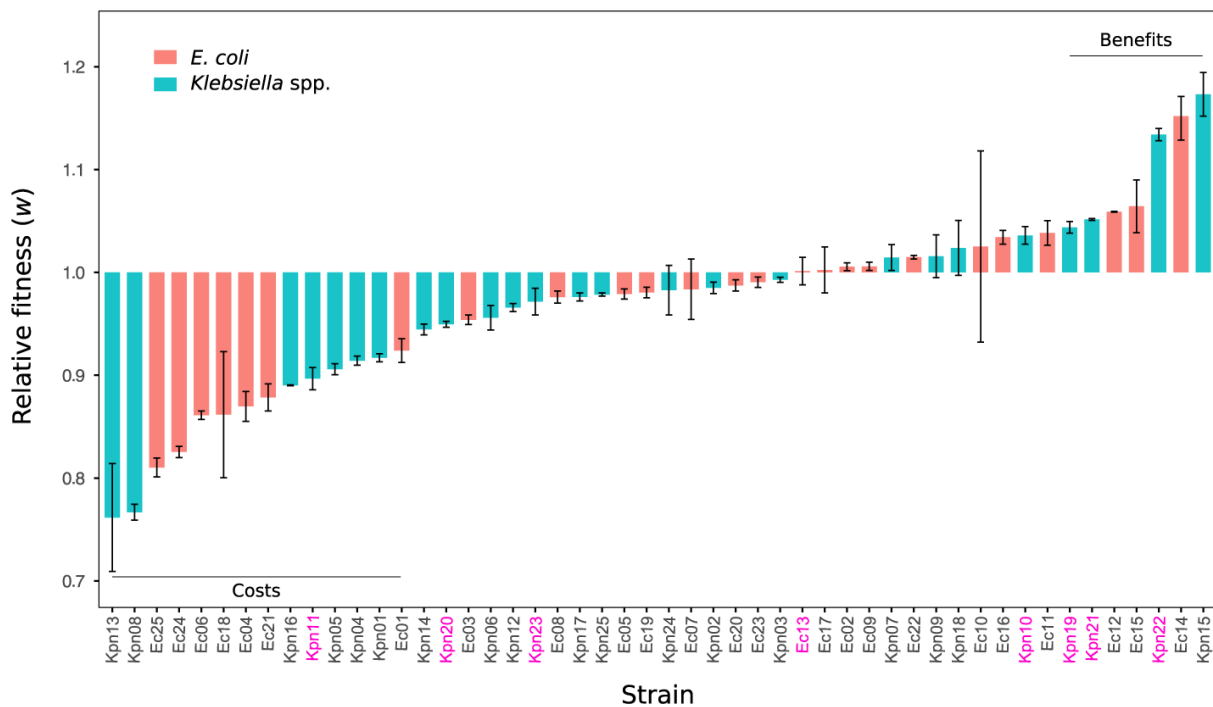


Figure 28 : Variations de fitness liée à l'acquisition du même plasmide pOXA-48 dans différents fonds génétiques *E. coli* et *Klebsiella spp.*. (Alonso-del Valle et al. 2021)

Les plasmides pOXA-48 portant *bla*_{OXA-48} retrouvés chez les Enterobacteriaceae sont principalement associés à *K. pneumoniae* et sporadiquement à certains ST d'*E. coli* en circulation tels que ST10 (León-Sampedro et al. 2021). *E. coli* ST38 porteur de *bla*_{OXA-48} ou son variant *bla*_{OXA-244} est le plus prédominant des STs d'*E. coli* porteur de *bla*_{OXA-48} ou son variant dans les données épidémiologiques (Hendrickx et al. 2021; Patiño-Navarrete et al. 2022; A Potron et al. 2013). Dans la majorité des cas, le gène *bla*_{OXA-48} est intégré dans le chromosome et les souches dans lesquelles on trouve ces intégrations sont phylogénétiquement proches (Hendrickx et al. 2021; Patiño-Navarrete et al. 2022; Turton et al. 2016).

3. Émergence des clones *E. coli* ST38 producteurs de carbapénémase OXA-48

3.1. Description des souches *E. coli* ST38

Les souches *E. coli* ST38 sont des pathogènes extra-intestinaux appartenant au phylogroupe D avec un large spectre d'hôtes et de réservoirs. Elles sont retrouvées chez l'homme, les animaux

sauvages (oiseaux) et domestiques (chiens, volaille), dans l'environnement (Air, sol et eau), dans les produits laitiers et la viande de bétail. Les transmissions entre hôtes et environnements sont fréquentes comme l'atteste le nombre peu élevé de SNPs (< 35 SNPs) entre des isolats de différents hôtes et environnements (Guenther et al. 2017; Roy Chowdhury et al. 2023). Les souches ST38 ont été isolées sur tous les continents et majoritairement dans certaines régions du monde comme l'Australie, l'Amérique du Nord, la Chine, l'Allemagne, l'Angleterre et la France (Figure. 29). Chez l'homme, elles sont fréquemment rencontrées dans les infections urinaires et des bactériémies. En effet, le complexe clonal ST38 représente 4,8% des infections urinaires et 6,2% des bactériémies aux États-Unis (Mendes et al. 2019). L'analyse de souches résistantes au ceftriaxone provenant majoritairement d'échantillons urinaires à New York a révélé que *E. coli* ST38 était le deuxième ST le plus prédominant (15,7%) après ST131 (46%) (Mostafa et al. 2020). En Corée, *E. coli* ST38 est classé quatrième dans les souches responsables d'infections urinaires (9%) après ST131, ST393 et ST1193 (28,7%, 14,7% et 13,1% respectivement) (B. Kim et al. 2020). En Arabie Saoudite, *E. coli* ST38 est le troisième responsable des infections urinaires (7,4%) après ST131 (17,3%) et ST73 (11,4%) (Alghoribi et al. 2015). En France ST38 est le deuxième ST responsable des infections urinaires fébriles chez les enfants avec une prévalence de 10,6% après ST131 (42,7%) (Birgy et al. 2019). L'analyse phylogénétique par Fonseca et al. de 376 souches ST38 provenant de 72 pays de tous les continents a montré que ces souches sont divisées en deux clades sans distinction de la source. Un clade 1 minoritaire et un clade 2 majoritaire dans les bases de données dominé par des souches d'origine humaine dans lequel on trouve des sous-clades contenant des souches provenant uniquement de l'homme (Fonseca et al. 2022). Une autre analyse phylogénétique plus récente de 925 souches provenant de 38 pays de tous les continents a montré également que les souches ST38 sont regroupées en deux clades comme dans l'analyse précédente, un clade A majoritaire constitué principalement de 91% (538 sur 593) de souches d'origine humaine tandis que le clade B minoritaire est constitué principalement de 56,6% (188 sur 332) de souches qui ne sont pas d'origine humaine. Des 925 souches, les sérogroupes complets (antigènes O et H) de 483 ont été générés. Trois sérogroupes prédominants sont retrouvés, provenant majoritairement du clade A issus de différentes sources : O86 :H18, O1 :H15 et O50/O2 :H30 constitués respectivement de 203, 71 et 56 souches (Roy Chowdhury et al. 2023). Toutes les souches analysées contiennent au moins deux facteurs de virulence caractéristiques des pathogènes extra-intestinaux. Le nombre de ces gènes varie entre 2 à 35 selon la souche et certains de ces gènes sont généralement retrouvés dans des plasmides IncF. L'îlot de pathogénicité de *Yersinia spp.* codant pour un sidérophore, la yersiniabactine jouant un rôle

important dans la capture du fer est retrouvé dans plus de 800 souches. Des facteurs de virulence codant pour des transporteurs de fer comme *shuA*, *shuT* et *shuX* ou le régulateur des gènes de virulence *aggR* caractéristiques des souches *E. coli* entéroaggrégatives ont été détectés dans certains isolats ST38. Parmi les 99 souches portant *aggR*, 93 appartiennent au clade A et sont associées à des infections humaines. 918 des 925 souches ST38 étudiées contiennent *shuA* and *shuT* (Roy Chowdhury et al. 2023). Les souches ST38 portent généralement plusieurs ARGs conférant la résistance aux antibiotiques cliniquement importants tels que les aminoglycosides, les β -lactamines et les fluoroquinolones (Fonseca et al. 2022; Turton et al. 2016). Le clade A de l'étude Roy Chowdhury et al. est divisé en trois sous-clades A1 à A3 de plus de 50 souches chacun, caractérisés par la présence des variants du gène *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15} et *bla*_{CTX-M-27} étant les plus fréquents. Les souches de ces sous-clades proviennent de différentes sources notamment des infections chez l'homme (Roy Chowdhury et al. 2023).

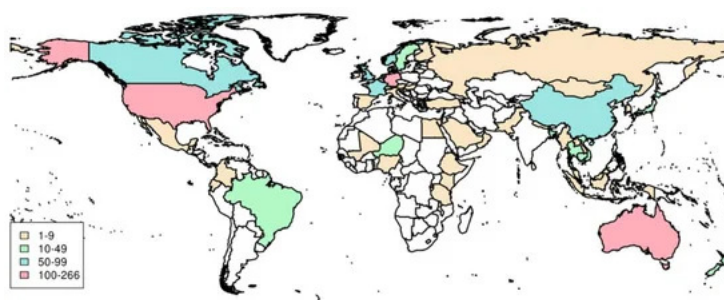


Figure 29 : Carte de distribution épidémiologique des souches ST38. Issue de (Fonseca et al. 2022)

3.2. Les souches ST38 productrices de CTX-M

Les souches *E. coli* ST131 sont numéro 1 dans les données épidémiologiques des souches responsables d'infections extra-intestinales chez l'homme. Elles sont connues pour leur rôle dans la dissémination mondiale du gène *bla*_{CTX-M-15} généralement porté par des plasmides IncF. Les différents variants de *bla*_{CTX-M} codent pour des BLSEs conférant une résistance à différentes β -lactamines (Alghoribi et al. 2015; S.-T. Cho et al. 2023; Coque et al. 2008; Nicolas-Chanoine, Bertrand, et Madec 2014; J. D. D. Pitout et DeVinney 2017). Différents variants de *bla*_{CTX-M} localisés sur des plasmides types IncF et IncI sont de plus en plus détectés dans les souches *E. coli* ST38 dans différentes études épidémiologiques à travers le monde (Cameron et al. 2021; Roy Chowdhury et al. 2023). Pour donner quelques exemples, l'étude épidémiologique de souches productrices de CTX-M isolées dans l'urine en Corée a révélé une prévalence de 27,5%

(22/80) de souches ST38 productrices de CTX-M, majoritairement de CTX-M14. Pour comparaison, les souches ST131 ont une prévalence de 42,5% (34/80) dans cette étude. Ces souches ST38 productrices de la BLSE CTX-M sont à l'origine d'infections urinaires dans les hôpitaux et dans la communauté en Corée (S. Kim et al. 2016). En Arabie Saoudite, le gène *bla*_{CTX-M-15} est fréquemment retrouvé dans les souches *E. coli* ST38 issues d'infections urinaires (5/6 des ST38) comparé aux autres BLSEs (Alghoribi et al. 2015). Ces exemples montrent que les gènes *bla*_{CTX-M} sont fréquemment détectés dans les souches ST38 avec des différences de variant prédominant selon la région et les études. En plus des formes plasmidiques de *bla*_{CTX-M}, on retrouve parfois des gènes *bla*_{CTX-M} à proximité de l'*ISEcp1* insérés à différentes positions dans le chromosome des souches ST38, suggérant une transposition de ces gènes des plasmides vers le chromosome (Falgenhauer et al. 2020; Guenther et al. 2017; Hendrickx et al. 2021; Shawa et al. 2021). La prévalence élevée de CTX-M dans les souches ST38 suggère qu'elles pourraient contribuer comme ST131 à la dissémination des gènes *bla*_{CTX-M} quand ils sont dans un plasmide ou contribuer à l'émergence de clones multirésistants ST38 de très haut risque quand *bla*_{CTX-M} est inséré dans le chromosome avec d'autres ARGs.

3.3.Émergence des clones *E. coli* ST38 producteurs de carbapénémase OXA-48

En plus des gènes producteurs de BLSEs comme *bla*_{CTX-M}, différents ARGs codant pour des carbapénémases sont retrouvés chez les ST38, notamment *bla*_{OXA-48} et son variant *bla*_{OXA-244}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} et *bla*_{IMP}. Le gène *bla*_{OXA-48} et son variant *bla*_{OXA-244} sont les gènes de carbapénémase les plus fréquemment rencontrés (Fonseca et al. 2022). En 2013, Potron et al. rapportaient une dissémination intercontinentale de souches productrices d'OXA-48, notamment de souches appartenant au ST38. Parmi ces souches ST38, approximativement 86% (6/7) avaient le gène *bla*_{OXA-48} intégré dans le chromosome (A Potron et al. 2013). En Europe, les souches ST38 productrices d'OXA-48 sont très répandues (J. D. D. Pitout et al. 2019). Une étude réalisée au Royaume Uni en 2016 a révélé une dissémination clonale des souches ST38 produisant une OXA-48 chromosomique dans différents hôpitaux (Turton et al. 2016). Aux Pays-Bas, l'étude des souches productrices d'OXA-48 a révélé une prédominance de souches ST38 produisant une OXA-48 dans lesquelles le gène *ba*_{OXA-48} est inséré dans le chromosome (Hendrickx et al. 2021). Skalova et al. ont aussi signalé la présence d'une souche ST38 avec une *ba*_{OXA-48} chromosomique en République Tchèque (Skalova et al. 2017). En 2011, Poirel et al. informait l'émergence de souches ST38 productrices d'OXA-48 en France (Poirel et al.

2011). Une étude épidémiologique portant sur 140 souches *E. coli* productrices de carbapénémase en France a révélé que 71% des souches produisaient des carbapénémases de type OXA-48. Les souches ST38 produisant OXA-48 étaient prédominantes avec 81% (17/21) des souches portant un *bla*_{OXA-48} chromosomique (Gauthier et al. 2018). La forme chromosomique de *bla*_{OXA-48} est toujours caractérisée par la présence de Tn6237 ou de variants plus courts (de 2,5 à 21,9 kb) dans lesquels les séquences plasmidiques en aval de *bla*_{OXA-48} ont été plus ou moins délétées (Hendrickx et al. 2021; J. D. D. Pitout et al. 2019; Turton et al. 2016). Différentes souches sont caractérisées par le même site d'intégration de *bla*_{OXA-48} dans le chromosome suggérant une dissémination clonale après l'évènement d'intégration. Par exemple, des souches dans lesquelles Tn6237 est intégré dans le gène *yjiK* sont retrouvées dans différents pays comme l'Angleterre (Turton et al. 2016) et les Pays Bas (Hendrickx et al. 2021). De façon générale, la carbapénémase OXA-48 a une activité hydrolytique faible vis-à-vis des carbapénèmes par rapport à OXA-181 (Oueslati, Nordmann, et Poirel 2015). Cependant, dans certaines lignées ST38, OXA-48 est associée avec des porines majeures OmpC-ST38 qui contiennent des mutations réduisant la perméabilité aux carbapénèmes (Patiño-Navarrete et al. 2020), des gènes *bla*_{CTX-M} codant pour des BLSE ainsi que d'autres ARGs (Falgenhauer et al. 2020; Hendrickx et al. 2021; Turton et al. 2016). Ainsi, la combinaison de ces différents facteurs de résistance fait des souches ST38 des souches multirésistantes aux antibiotiques y compris aux carbapénèmes. Et l'intégration chromosomique de *bla*_{OXA-48} ou son variant *bla*_{OXA-244} permet de transférer verticalement ce gène dans la descendance conservant ainsi le caractère multirésistant et probablement un coût de fitness plus faible que celui imposé par le plasmide pOXA-48.

Le variant d'OXA-48, OXA-244, différant par une seule substitution (Arg-222-Gly) est aussi très répandu en Europe. Au Danemark, la surveillance des souches *E. coli* productrices d'OXA-244 provenant d'urine ou de fèces a révélé que 54,1% (13/24) des souches étaient des ST38 (Hammerum et al. 2020). Une étude conjointe réalisée par deux réseaux de surveillance au niveau de la région frontalière entre Allemagne et Suisse entre 2017 et 2019 sur les *E. coli* productrices de carbapénémases a montré une émergence de souches porteuses de *bla*_{OXA-244}. Ces souches représentaient jusqu'à 27,5 % des souches totales du côté allemand et 7% du côté suisse. Parmi ces souches, les souches du ST38 représentaient 75,6% du total. Le gène *bla*_{OXA-244} inséré dans le chromosome est localisé dans des variants délétés du transposon composite Tn51098 similaire à Tn6237 sauf qu'il contient le gène *bla*_{OXA-244} (Falgenhauer et al. 2020). En Norvège, des souches ST38 OXA-244 phylogénétiquement proches ont été à l'origine de différentes épidémies dans différents hôpitaux (Lindemann et al. 2023). En France, la

prévalence des souches ST38 productrices d'OXA-244 est passée de 12% en 2016 à 49% en 2019. Dans ces souches, le gène *bla*_{OXA-244} est inséré dans le chromosome et localisé dans le transposon composite Tn51098 ou ses variants tronqués avec des tailles variant entre 3 et 21,9 Kb (Cecile Emeraud et al. 2021). La carbapénémase OXA-244 a une plus faible activité hydrolytique qu'OXA-48 vis-à-vis de l'imipénème, ce qui rend difficile sa détection au niveau clinique (Falgenhauer et al. 2020). Ceci suggère que le nombre de souches ST38 OXA-244 dans les études épidémiologiques pourrait être sous-estimé. Récemment, 42 souches ST38 porteuses de *bla*_{NDM-5} inséré dans le chromosome et responsables d'une épidémie ont été isolées lors d'une surveillance épidémiologique en République Tchèque. Les analyses phylogénétiques ont révélé que ces souches sont regroupées dans un seul clade avec des souches provenant d'Australie (n = 4), de Vietnam (n = 2) et de la Norvège (n = 1) portant elles aussi le gène *bla*_{NDM-5}. Une région de 27 kb entourée par deux IS26 contiennent le gène *bla*_{NDM-5} et les ARGs *aadA2*, *mphA*, *sul1*, *dfrA12* et *ermB* conférant la résistance aux aminoglycosides, aux macrolides, aux sulfonamides et au triméthoprim. La région de 27 kb partage une forte similarité avec les plasmide IncF (F90:A2:B33) de 161,700-bp (pNDM_p30_L1, numéro d'accèsion CP085061.1) isolée dans une souche humaine d'*E. coli* au Royaume Uni en 2021 et IncF (F90:A2:B20) de 148,746-bp (pIsolateD_A, numéro d'accèsion CP135489.1) isolée dans une souche humaine d'*E. coli* au Canada en 2023, suggérant une transposition de cette région des plasmides dans le chromosome (Chudejova et al. 2024). À ce jour, les facteurs impliqués dans l'intégration chromosomique des ARGs chez les bactéries restent inconnus.

Objectifs

L'émergence et la dissémination de la résistance aux carbapénèmes chez les Enterobacteriaceae sont liées aux transferts horizontaux des plasmides conjugatifs porteurs de gènes codant pour des carbapénémases. Les isolats *E. coli* ST38 producteurs de carbapénémases sont très répandus en France et en Europe de façon générale, notamment ceux exprimant OXA-48. Chez ces isolats le gène *bla*_{OXA-48} est le plus souvent intégré dans le chromosome contrairement à la situation la plus fréquemment rencontrée chez les Enterobacteriaceae où *bla*_{OXA-48} est porté par un plasmide de la famille des pOXA-48 du groupe d'incompatibilité IncL qui a favorisé sa dissémination par conjugaison. Plusieurs sites d'intégration chromosomique du gène *bla*_{OXA-48} ont été identifiés suggérant qu'il y a eu plusieurs événements d'intégration suivis chacun d'une dissémination clonale. Les facteurs impliqués dans la sélection et l'émergence de ces clones ST38 portant un *bla*_{OXA-48} chromosomique ne sont pas connus.

Bien que l'intégration d'ARGs dans le chromosome bactérien, probablement suite à un événement de transposition à partir d'un plasmide, soit un phénomène fréquemment rapporté dans différents lignages bactériens, à ce jour, aucune étude, à ma connaissance, portant sur les facteurs favorisant la sélection de ces événements de transposition n'a été réalisée. Étant donné la fréquence des événements d'intégration dans le lignage ST38 et le succès de la dissémination des clones ayant intégré *bla*_{OXA-48} dans le chromosome, ce lignage paraissait être un modèle particulièrement pertinent pour comprendre les facteurs favorisant la mobilité des gènes de résistance des plasmides vers le chromosome.

L'objectif principal de ma thèse consistait ainsi à caractériser les facteurs génétiques et environnementaux impliqués dans l'intégration chromosomique du gène *bla*_{OXA-48} chez *E. coli* ST38 et à déterminer les avantages sélectifs liés à l'intégration.

Pour pouvoir aborder ce problème j'ai d'abord cherché à reproduire cette intégration au laboratoire au cours d'expériences d'évolution. Pour ceci j'ai choisi différentes souches ST38 non porteuses de *bla*_{OXA-48} dans lesquelles j'ai introduit le plasmide pOXA-48 par conjugaison. Ces souches ont été choisies sur la base d'une étude des isolats résistants aux carbapénèmes, notamment des isolats ST38, récoltés par le Centre National de Référence dans la période 2012-2016 (Chapitre 1). Au cours de cette étude nous avons réalisé une phylogénie des isolats ST38 français en les remettant dans un contexte phylogénique plus large. Ceci nous a permis de montrer qu'au moins quatre lignages ST38 étaient en cours de dissémination, ces quatre

lignages étant caractérisés par l'intégration chromosomique de *bla_{OXA-48}*. Des isolats non porteurs de gènes de carbapénémase ont été positionnés sur cette phylogénie et nous en avons choisi trois reflétant la diversité phylogénétique des ST38 pour la suite des expériences.

J'ai choisi aussi trois plasmides pOXA-48 différant par leur structure, pour tester l'hypothèse que la présence de *bla_{OXA-48}* dans un élément génétique mobile comme Tn6237 était un facteur important pour observer une intégration chromosomique. J'ai d'abord analysé le coût de fitness induit par les plasmides pOXA-48 dans les différentes souches, ainsi que la stabilité des plasmides en absence d'antibiotique. J'ai ensuite réalisé différentes expériences d'évolution pour tester le rôle de la souche et de la structure du plasmide dans l'obtention de bactéries porteuses d'un gène *bla_{OXA-48}* intégré (chapitre 2). Ceci nous a permis de montrer que l'obtention de ces bactéries était dépendante de la présence de Tn6237, d'un coût de fitness important et de l'élimination du plasmide par un nouveau système anti-plasmide que nous avons caractérisé. Enfin je me suis intéressé à l'origine du coût de fitness induit par le plasmide notamment dans la souche ST38_1. Les résultats encore préliminaires de ce travail seront présentés dans le chapitre 3.

Résultats

Chapitre 1 : Caractérisation des isolats *Escherichia coli* producteurs de carbapénémases en France entre 2012 et 2015

Les souches *E. coli* productrices de carbapénémases (*Ec*-CP) constituent une menace pour la santé publique et sont dorénavant isolées dans différentes régions du monde. Depuis 2012, le centre national de référence (CNR) de la résistance aux antibiotiques en France a pour mission de surveiller l'émergence de souches résistantes afin d'actualiser l'épidémiologie de la résistance aux antibiotiques en France, de discerner les phénomènes épidémiques par rapport aux cas sporadiques afin de prévenir la dissémination des bactéries résistantes. Ainsi sont collectées les bactéries isolées chez les patients infectés par des *Ec*-CP ou des patients porteurs d'*Ec*-CP (Longue hospitalisation, ré-hospitalisation, personnes âgées vivant dans les EHPADs ayant été en contact avec une personne porteuse de bactérie productrice de carbapénémase). L'identification d'une ERC se fait par la recherche d'une carbapénémase dans la souche isolée. Ainsi, une bactérie est suspectée comme productrice de carbapénémase lorsqu'il y a une diminution de la sensibilité à une molécule de carbapénèmes. En France, le CNR conseille l'utilisation de l'ertapénème qui offre une meilleure sensibilité pour la détection de ces bactéries. Certains laboratoires privés et publics disposent d'outils pour détecter les bactéries productrices de carbapénémase, notamment des méthodes colorimétriques, des MALDI-TOF, des outils de PCR, des antibiogrammes parmi tant d'autres. Et lorsqu'une bactérie productrice de carbapénémase est suspectée, elle peut être envoyée au CNR qui est chargée d'évaluer le cas épidémique ou sporadique de la souche aujourd'hui par le séquençage de son génome. Ceci permet de conserver une vision globale et actualisée de l'épidémiologie en France. Un algorithme décrivant les différentes étapes pour l'identification de ces bactéries est mis en place dans les laboratoires du CNR pour une recherche routinière (Figure. 30). Dans le but de caractériser les populations *Ec*-CP circulant en France, en collaborant avec le CNR, nous avons séquencé 691 souches collectées par le CNR entre 2012 et 2015 et 22 souches collectées avant 2012 pour des analyses génomiques approfondies.

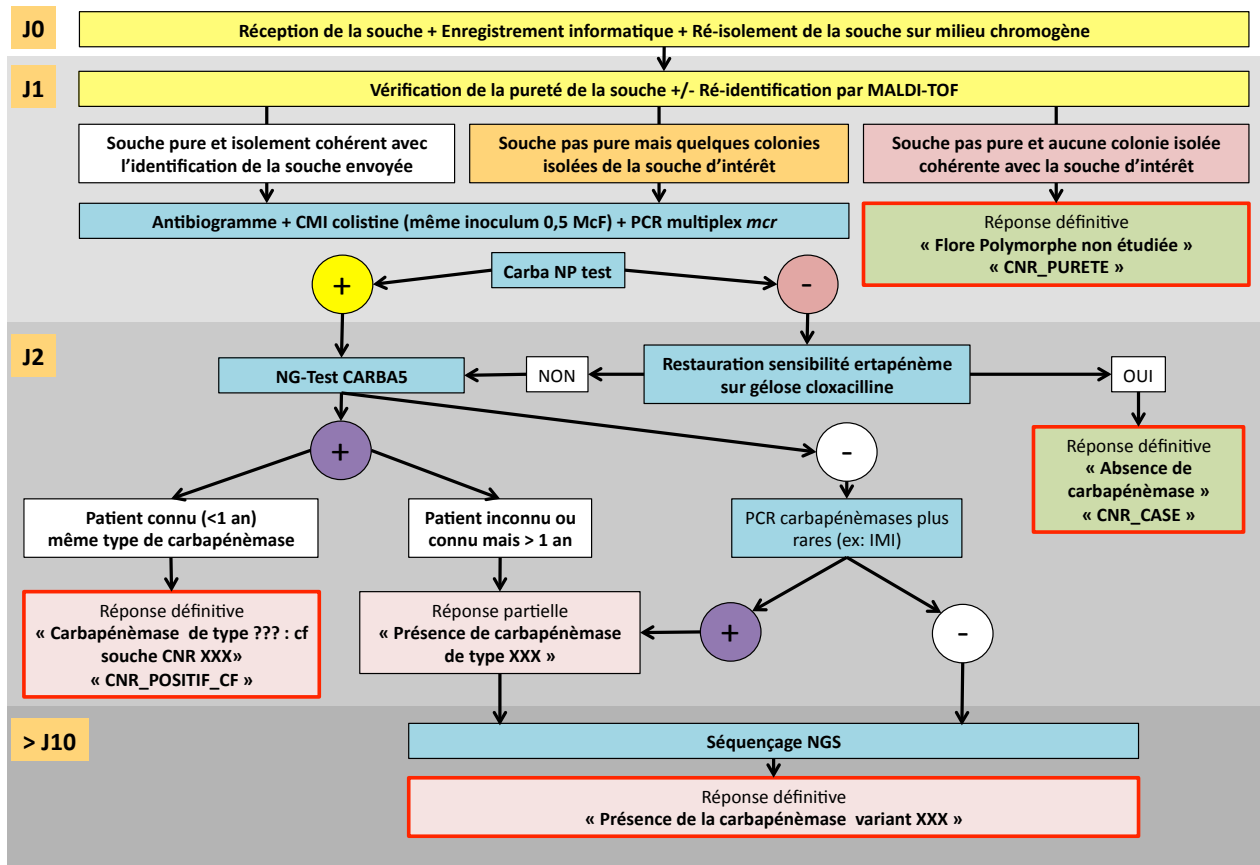


Figure 30 : Algorithme de recherches des ERCs producteurs de carbapénémases. Issue du site officiel du CNR de la résistance aux antibiotiques en France.

Les souches collectées proviennent majoritairement des écouvillons rectaux de patients suspects de porter une *Ec*-CP et représentent 66,5% (474/713) des souches (patients rapatriés des hôpitaux étrangers, patients ayant visité un pays étranger au cours des six derniers mois, patients ayant été contact avec un patient porteur et patients anciens porteurs). Les souches responsables d'infection représentent 24% (172/713). Pour le reste des souches, l'origine n'a pas été rapportée. Entre 2012 et 2015, le nombre d'*Ec*-CP lié aux infections a augmenté mais lentement comparativement aux souches issues de criblage d'écouvillons rectaux ou d'origines inconnues. Les 713 souches séquencées sont réparties dans les huit phylogroupes avec trois clades prédominants qui sont CC10 (phylogroupe A ; incluant ST10, ST167 et ST617), CC23 (phylogroupe C ; incluant ST410, ST88 et ST90) et ST38 (phylogroupe D) avec 161, 97 et 98 isolats respectivement, soit 49,9% des souches *Ec*-CP du CNR. Les souches sont classées en 168 ST différents. Les souches les plus abondantes appartiennent au ST38 (n = 92, 12,9%), au ST10 (n = 67, 9,4%), au ST410 (n = 64, 9%) et au ST167 (n = 34, 4,8%). Dans la phylogénie, les souches isolées des infections et celles issues de criblage sont mixées.

La recherche des ARGs montre une variabilité de leur nombre entre les isolats, avec des isolats multirésistants portant jusqu'à 26 ARGs et des isolats dans lesquels le seul ARG caractérisé est le gène codant pour la carbapénémase. Un ARG codant pour une BLSE de la famille *bla_{CTX-M}* est présent dans 40,7% des souches isolées. On retrouve des mutations dans les régions QRDRs (Quinolone resistance-determining regions) dans 59,6% des souches. 19 souches ont plus de cinq mutations dans QRDRs et 250 autres ont 4 mutations différentes dans cette région, indiquant une évolution à long terme de ces souches en présence de fluoroquinolones. Les souches avec un nombre élevé de mutations dans les régions QRDRs sont généralement les souches avec le plus grand nombre d'ARG à l'exception des souches ST38. La recherche de gènes de carbapénémases révèle que *bla_{OXA-48}* et *bla_{OXA-181}* sont prédominants et sont détectés dans 464 souches (65%) et 101 souches (14,1%) respectivement, suivi par *bla_{NDM}* détecté dans 106 souches (14,9%) et *bla_{VIM}* détectés dans 18 souches. Seulement cinq souches sont porteuses de *bla_{KPC}* et 12 souches portent deux gènes différents de carbapénémases. Particulièrement, le gène *bla_{OXA-48}* est fréquemment associé aux souches moins résistantes (moins de mutations dans QRDRs et moins d'ARG) et 117 souches ne portent que cet ARG y compris des souches issues d'infection. Nous avons observé une association entre les gènes de carbapénémase et les STs. Parmi les 22 STs contenant au moins sept souches, *bla_{OXA-48}* est prédominant dans 14 d'entre eux. À l'exception du ST38, *bla_{OXA-48}* est associé à la présence de plasmides IncL pOXA-48 indiquant la circulation de ces plasmides en France. Le gène *bla_{OXA-181}* est prédominant chez ST410, ST940 et ST1284, ces trois STs représentant 74% des souches porteuses de ce gène dont 50,5% sont constituées de ST410.

Des mutations dans le gène *ftsI* codant pour la PLP3 conférant une résistance aux β -lactamines ont été détectées dans 131 souches (18,4%) appartenant essentiellement aux ST101, ST167, ST410 et ST1284. Des variants de la porine OmpC proches de la porine codée dans les souches ST38 et moins susceptibles aux β -lactamines ont été détectés dans certains STs comme le ST410. Lors d'une étude précédente du laboratoire concernant le ST410 il a été montré que la présence de ces variants résulte d'évènements de recombinaison. Ce travail avait aussi abouti à proposer un modèle d'évolution des lignages *E. coli* résistants aux carbapénèmes faisant intervenir plusieurs étapes incluant des mutations ponctuelles, des recombinaisons, l'acquisition de gènes de résistance et la sélection par des beta-lactamines différentes (Patiño-Navarrete et al. 2020). Parmi les exceptions à ce modèle, les lignages issus du ST131 et les lignages ST38 porteurs de *bla_{OXA-48}* semblaient suivre des trajectoires évolutives différentes (Patiño-Navarrete et al. 2020).

Afin de comprendre les relations phylogénétiques entre les souches *Ec*-CP du CNR et celles isolées au niveau international, un arbre phylogénétique des 14 STs contenant plus de 10 *Ec*-CP isolées par le CNR a été réalisé en incorporant des génomes issus de bases de données publiques. L'analyse de ces arbres parallèlement à l'analyse des mutations dans QRDRs, *ftsI* codant pour la PLP3 et des variants de OmpC a confirmé que 51 (80%) des ST410, 17 (49%) des ST167, 3 (33%) des ST405 et 8 (62%) des ST101 des *Ec*-CP du CNR appartenaient à des clones multirésistants mondialement disséminés enrichis en gène de carbapénémase. Les clades caractérisés par les mutations *ftsI* et des OmpC-ST38 expriment principalement *bla*_{OXA-181} (ST410) ou *bla*_{NDM} dans d'autres lignées.

Les souches ST38 étant prédominantes dans cette étude (n = 92) nous avons construit un arbre phylogénétique incluant les 92 souches ST38 du CNR, 314 *Ec*-CP ST38 provenant de la base de données Enterobase et 150 ST38 non productrices de carbapénémase provenant de la base de données NCBI. En analysant cette phylogénie, nous avons constaté qu'environ 80% des souches ST38 du CNR porteuses d'un gène de carbapénémase sont regroupés en quatre clades différents. Les clades G1 (n = 35), G2 (n = 25) et G4 (n = 4) contiennent uniquement *bla*_{OXA-48}. G3 (n = 7) contient *bla*_{OXA-48} ou son variant *bla*_{OXA-244}. Parmi les 25 isolats du clade G2, seuls quatre ont été isolés hors de France, aux Pays-Bas. Cette analyse montre une dissémination globale de G1, G3 et G4 et une dissémination régionale de G2. Dans les souches des quatre clades, le plasmide IncL porteur de *bla*_{OXA-48} est absent suggérant une intégration chromosomique qui a été confirmée par un séquençage long reads combiné à l'analyse des séquences illumina pour certains des isolats, et pour les différents isolats du CNR par PCR. Le gène *bla*_{OXA-48} est localisé à l'intérieur du transposon composite Tn6237 ou ses variants de tailles différentes suggérant une transposition de Tn6237 des plasmides pOXA-48 sur le chromosome.

En conclusion, nous avons montré qu'il y a une circulation des *Ec*-CP en France majoritairement des souches porteuses de *bla*_{OXA-48} et *bla*_{OXA-181} avec des associations spécifiques entre les STs et ces gènes de carbapénémase. Le ST38 qui est le plus représenté dans cette étude est caractérisé par l'intégration chromosomique de *bla*_{OXA-48} et des porines OmpC-ST38 moins perméables aux β-lactamines. La dissémination globale des clones ST38 G1, G3 et G4 porteurs de *bla*_{OXA-48} chromosomique suggère que les souches appartenant à ces clones ont un avantage évolutif par rapport aux souches porteuses de *bla*_{OXA-48} plasmidique des

autres ST. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal ASM mSystems (Patiño-Navarrete et al. 2022).

Toutes les données supplémentaires de cette étude regroupées dans deux feuilles Excel (Table S1 et S2) sont accessibles dans la version en ligne de l'article dans la section « supplemental material ».

Dans cette étude, j'ai participé à l'analyse des séquences génomiques des souches *E. coli* ST38 qui sont prédominantes (n = 92). Nous avons construit l'arbre phylogénétique des souches ST38 en incluant en plus des souches du CNR, des séquences génomiques issues des bases de données Enterobase et NCBI. Ce qui nous a permis de montrer la dissémination internationale et régionale des clones ayant intégré le gène *bla_{OXA-48}* dans le chromosome (G1 à G4).



Specificities and Commonalities of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated in France from 2012 to 2015

Rafael Patiño-Navarrete,^{a,b} Isabelle Rosinski-Chupin,^{a,b} Nicolas Cabanel,^{a,b} Pengdamba Dieudonné Zongo,^{a,b,c} Mélanie Héry,^{a,d} Saoussen Oueslati,^{a,d} Delphine Girlich,^{a,d}  Laurent Dortet,^{a,d,e,f}  Rémy A. Bonnin,^{a,d,f}  Thierry Naas,^{a,d,e,f}  Philippe Glaser^{a,b}

^aUnité EERA, Institut Pasteur, APHP, Université Paris-Saclay, Paris, France

^bUMR3525, CNRS, Université de Paris, Paris, France

^cSorbonne Université, Paris, France

^dTeam "Resist" INSERM U1184 "Immunology of Viral, Auto-Immune, Hematological and Bacterial diseases (IMVA-HB)", Le Kremlin-Bicêtre, France

^eDepartment of Bacteriology-Hygiene, Bicêtre Hospital, APHP, Le Kremlin-Bicêtre, France

^fAssociated French National Reference Center for Antibiotic Resistance, Le Kremlin-Bicêtre, France

Rafael Patiño-Navarrete and Isabelle Rosinski-Chupin contributed equally. Author order was determined alphabetically.

Thierry Naas and Philippe Glaser contributed equally. Author order was determined by setting the corresponding author as the last author.

ABSTRACT Carbapenemase-producing *Escherichia coli* (CP-Ec) represents a major public health threat with a risk of dissemination in the community as has occurred for lineages producing extended-spectrum β -lactamases. To characterize the extent of CP-Ec spread in France, isolates from screening and infection samples received at the French National Reference Center (F-NRC) laboratory for carbapenemase-producing *Enterobacterales* were investigated. A total of 691 CP-Ec isolates collected between 2012 and 2015 and 22 isolates collected before 2012 were fully sequenced. Analysis of their genome sequences revealed some disseminating multidrug-resistant (MDR) lineages frequently acquiring diverse carbapenemase genes mainly belonging to clonal complex 23 (CC23) (sequence type 410 [ST410]) and CC10 (ST10 and ST167) and sporadic isolates, including rare ST131 isolates ($n = 17$). However, the most represented sequence type (ST) was ST38 ($n = 92$) with four disseminated lineages carrying *bla*_{OXA-48-like} genes inserted in the chromosome. Globally, the most frequent carbapenemase gene ($n = 457$) was *bla*_{OXA-48}. It was also less frequently associated with MDR isolates being the only resistance gene in 119 isolates. Thus, outside the ST38 clades, its acquisition was frequently sporadic with no sign of dissemination, reflecting the circulation of the IncL plasmid pOXA-48 in France and its high frequency of conjugation. In contrast, *bla*_{OXA-181} and *bla*_{NDM} genes were often associated with the evolution of MDR *E. coli* lineages characterized by mutations in *ftsI* and *ompC*.

IMPORTANCE Carbapenemase-producing *Escherichia coli* (CP-Ec) might be difficult to detect, as MICs can be very low. However, their absolute number and their proportion among carbapenem-resistant *Enterobacterales* have been increasing, as reported by WHO and national surveillance programs. This suggests a still largely uncharacterized community spread of these isolates. Here, we have characterized the diversity and evolution of CP-Ec isolated in France before 2016. We show that carbapenemase genes are associated with a wide variety of *E. coli* genomic backgrounds and a small number of dominant phylogenetic lineages. In a significant proportion of CP-Ec, the most frequent carbapenemase gene *bla*_{OXA-48} was detected in isolates lacking any other resistance gene, reflecting the dissemination of pOXA-48 plasmids, likely in the absence of any antibiotic pressure. In contrast, carbapenemase gene transfer may also occur in multidrug-resistant *E. coli*, ultimately giving rise to at-risk lineages encoding carbapenemases with a high potential of dissemination.

Editor Zackery Bulman, University of Illinois at Chicago

Copyright © 2022 Patiño-Navarrete et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Philippe Glaser, pglaser@pasteur.fr.

The authors declare no conflict of interest.

Received 22 September 2021

Accepted 7 December 2021

Published 11 January 2022

KEYWORDS drug resistance evolution, emergence, genomics, multidrug resistance, surveillance studies

Escherichia coli is one of the first causes of diverse bacterial infections in the community and in the hospital. In particular, it is the most frequent cause of urinary tract infection (UTI), and 50 to 60% of women will suffer at least one UTI during her life (1). Therefore, multidrug resistance (MDR) in *E. coli* is a major public health issue making *E. coli* infections more difficult to treat. In addition, as carbapenemase-producing *Enterobacteriales* (CPE) are increasingly detected (2, 3) and *E. coli* is a ubiquitous member of the human gut microbiome, carbapenemase-producing *E. coli* (CP-*Ec*) is also becoming a major actor for the global dissemination of carbapenemase genes (4).

The emergence and spread of carbapenem-resistant Gram-negative bacteria are mainly linked to the widespread dissemination through horizontal gene transfer (HGT) of mobile genetic elements (MGEs) encoding carbapenemases. These carbapenemases belong to Ambler class A (mainly KPC type), class B (metallo- β -lactamases IMP, VIM, and NDM types) or class D (OXA-48-like enzymes) of β -lactamases (5). The global epidemiology of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *E. coli* has been characterized through multiple studies, revealing in Western countries the major contribution of the sequence type 131 (ST131) lineage in the high prevalence of *bla*_{CTX-M} family ESBL genes (6). Much less is known with respect to CP-*Ec*.

Since 2012, the French National Reference Center (F-NRC) laboratory for carbapenemase-producing *Enterobacteriales* has experienced a steady increase in the number of CP-*Ec* isolates received each year (2). A multilocus sequence typing (MLST) analysis of isolates received in 2012 and 2013 revealed a broad diversity of sequence types (STs), as the 140 analyzed isolates belonged to 50 different STs. However, a few STs were overrepresented (7), such as the ST38 (24 isolates) and ST410 (10 isolates). In that study, only one isolate belonged to ST131, contrasting with the situation in the United Kingdom where ST131 isolates represented 10% of the CP-*Ec* isolates received between 2014 and 2016 by Public Health England (8). On the other hand, a genome-based survey of CPE in the Netherlands between 2014 and 2018 revealed that the 264 analyzed *E. coli* isolates belonged to 87 different STs, with three dominant lineages, ST38 ($n = 46$), ST167 ($n = 22$), and ST405 ($n = 16$) representing 32% of the isolates (9). F-NRC isolates also showed a predominance of isolates producing OXA-48-like carbapenemases, followed by NDM-producing isolates and suggested clonally related isolates among ST38 OXA-48-producing isolates and ST410 OXA-181-producing isolates, respectively (7).

Whole-genome sequencing (WGS) significantly increases our ability to infer phylogenetic relationships between isolates. By sequencing 50 ST410 CP-*Ec* isolates received by the F-NRC between 2011 and 2015 (10), we showed that 36 (72%) belonged to a newly described ST410 lineage producing OXA-181 (11). We showed that this clade is characterized by mutations in the two porin genes *ompC* and *ompF* leading to a decreased outer membrane permeability to certain β -lactams and by a four-codon duplication (YRIN) in the *ftsI* gene encoding the penicillin binding protein 3 (PBP3) leading to a decreased susceptibility to β -lactams targeting this PBP (10). After a thorough analysis of CP-*Ec* genome sequences from public databases for mutations in these three genes, we proposed that CP-*Ec* followed three different evolutionary trajectories. In some lineages which are enriched in CP-*Ec* isolates and have disseminated globally, acquisition of carbapenem resistance genes might have been facilitated by the mutations in porin genes and in *ftsI*. In ST38, the genetic background and in particular a specific *ompC* allele with reduced permeability to some β -lactams may have similarly facilitated the acquisition of carbapenemase genes. In contrast, other CP-*Ec* isolates, including isolates from ST131, might have occurred sporadically following the acquisition of plasmids encoding carbapenemase and with no clue of dissemination (10).

Here, we thoroughly characterized the diversity of CP-*Ec* circulating in France by sequencing the genomes of almost all isolates received by the F-NRC from its creation

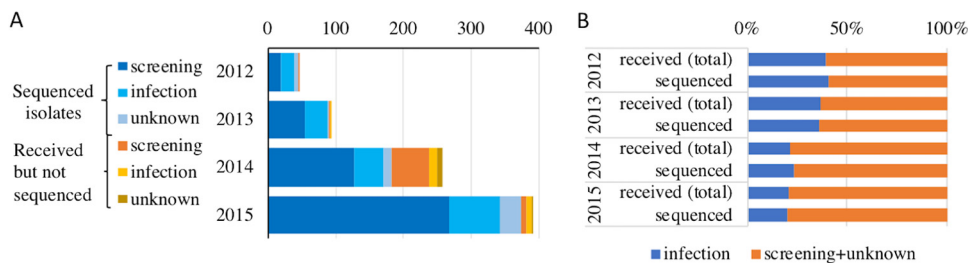


FIG 1 Origin of the isolates received by the F-NRC during the 2012–2015 period. (A) Absolute number of isolates per year from infection, screening, or unknown origins, differentiating between isolates that have or have not been sequenced. (B) Proportions of isolates from infection or from screening or unknown origins showing that isolates from infection origin represent the same proportions among total isolates that have been received by the F-NRC and isolates that have been sequenced.

in 2012 until 2015 (see Table S1 in the supplemental material). By combining whole-genome phylogeny with the addition of *E. coli* genome sequences publicly available (Table S2) and tracking mutations in candidate genes, we show that three different situations are encountered. The high transmission potency of the IncI pOXA-48 plasmids has led to a high frequency of OXA-48-producing isolates, often characterized by susceptibility to most non- β -lactam antibiotics. On the other hand, an increasing number of CP-*Ec* lineages, mainly producing OXA-181 and NDM carbapenemases, are observed in France as in other European countries. These lineages are multidrug-resistant (MDR) or extensively drug-resistant (XRD) lineages, they show several mutations in quinolone resistance-determining regions (QRDRs) and are often mutated in *ftsI* and porin genes. Finally, the rapid dissemination of four OXA-48/OXA-244 ST38 lineages might have been favored by the chromosomal integration of the carbapenemase gene.

RESULTS

CP-*Ec* isolates collected until 2015 by the French National Reference Center.

Isolates analyzed in this work were sent to the F-NRC laboratory on a voluntary basis from private and public clinical laboratories from different parts of France mainly between the years 2012 and 2015. During this period, we encountered a regular increase in the number of isolates received each year (Fig. 1A) corresponding to an increasing number of isolated strains and an increasing frequency of isolates sent to the F-NRC. A total of 713 CP-*Ec* isolates, including 22 isolates collected from 2001 to 2011 were submitted to WGS. The 691 sequenced isolates of the 2012–2015 period represented 87.5% of the 790 CP-*Ec* isolates received by the F-NRC during this period.

The majority of the sequenced isolates (66.5%, 474/713) were from rectal swab screening of patients suspected of carrying CPE (patients repatriated from a hospital abroad, patients who have visited a foreign country within the last 6 months, contact patients of a former carrier, or a previously known carrier), 24% (172/713) were considered to be responsible for infection (isolated from clinical samples), and the source was unknown for 67 isolates (Fig. 1A; see Table S1 in the supplemental material). During the 4-year period, the number of infection-related isolates was found to increase more slowly than the number of screening or of unknown source isolates. A nearly twofold decrease in the proportion of clinical versus total isolates was observed between 2013 and 2014 (Fig. 1B). Of the 172 isolates associated with disease, 122 were isolated from urine (71%), 15 from blood samples, 8 from deep site samples, 8 from wound samples, 9 from the respiratory tract, 3 from vaginal samples, 3 from pus, 3 from bile, and 1 from the skin of a newborn. All these isolates were previously identified as carbapenemase producers by PCR.

Diversity of CP-*Ec* isolates as assessed by whole-genome sequencing. The genome sequences of the 713 CP-*Ec* isolates were first analyzed following *de novo* assembly. For each isolate, we determined its MLST type (Achtman scheme), phylogroup (ClermonTyping), and antibiotic resistance gene (ARG) content. We also searched for mutations in the QRDRs of *gyrA*, *parC*, and *parE* and for mutations in *ftsI*, *ompC*, and

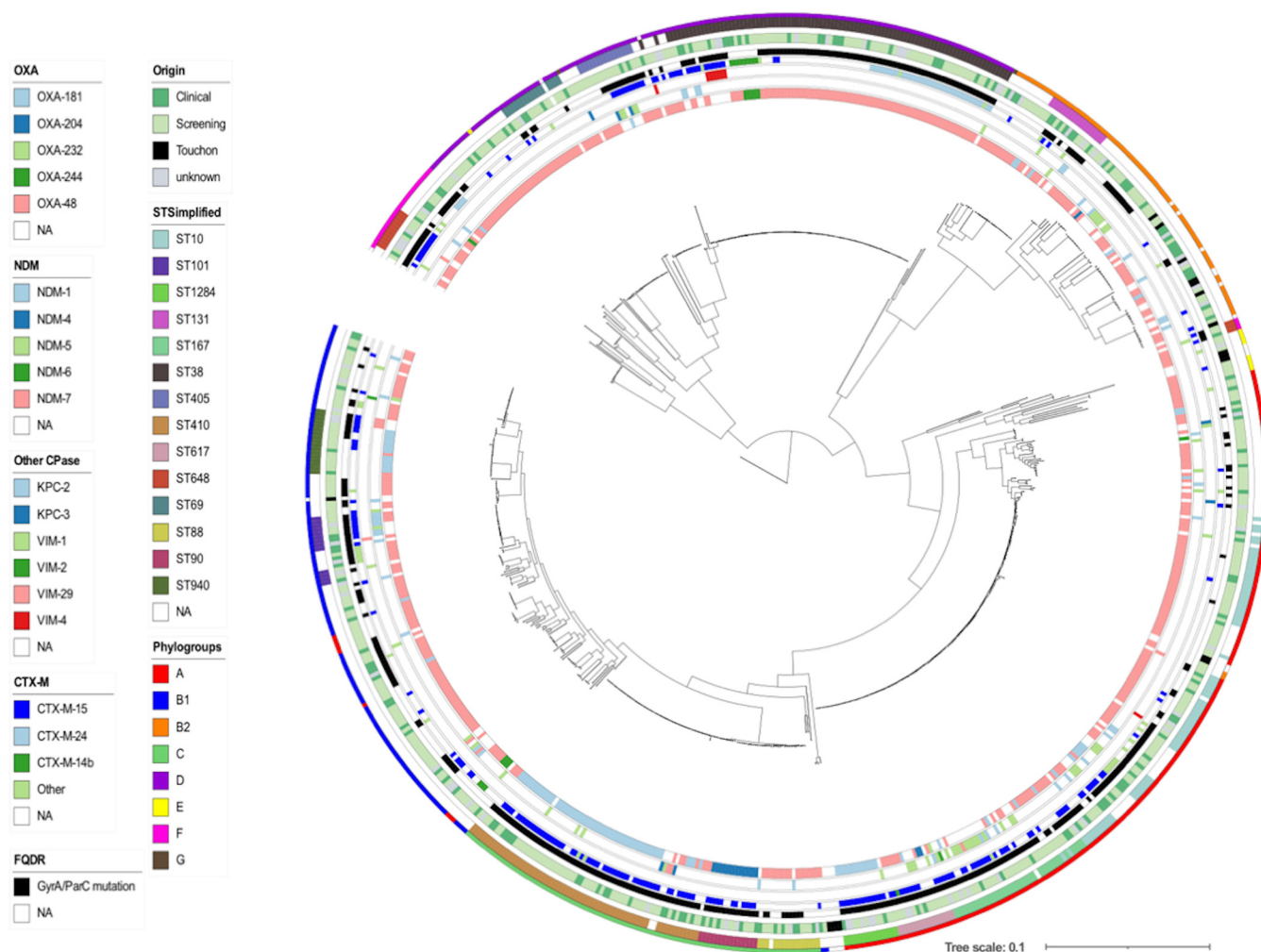


FIG 2 Core genome phylogeny of CP-*Ec* isolates received by the F-NRC. ML phylogeny of the 713 CP-*Ec* isolates was built with RAxML (45) from 372,238 core SNPs after sequence alignment on MG1655-K12 (NC_000913.3) selected as the best reference. The genome sequence of *Escherichia fergusonii* strain ATCC 35469 (NC_011740.1) was used as an outgroup for the phylogenetic analysis. Genomes from Touchon et al. (40) were also incorporated into the analysis. Genomic features are indicated as in the figure key (left) from the inside to the outside circles: carbapenemases of the OXA, NDM, and other types, CTX-M ESBL, mutations in *gyrA* and *parC* QRDR region (FQ resistance), origin, main ST, phylogroups. Reference genomes from Touchon et al. (40) are indicated as Touchon. NA, not available.

ompF we previously identified as associated with CP-*Ec* disseminated lineages (10) (Table S1). F-NRC CP-*Ec* bacteria were assigned to 168 different STs, including six new allelic combinations. ST38 was the most prevalent ST ($n = 92$, 12.9%), followed by ST10 ($n = 67$, 9.4%), ST410 ($n = 64$, 9%), and ST167 ($n = 34$, 4.8%). Ten additional STs were represented by at least 10 isolates (see Fig. S1A and Table S1 in the supplemental material), and 154 STs were represented by less than 10 isolates, including 102 STs with a single isolate.

We next performed a core genome phylogeny following read mapping using strain *E. coli* MG1655 (NCBI reference sequence NC_000913.3) as the reference genome sequence. The phylogenetic tree, estimated from 372,238 core single nucleotide polymorphisms (SNPs) was consistent with the results of phylogroup determination by using *in silico* ClermonTyping (12) except for a few isolates (Fig. 2). In agreement with the MLST-based analysis, this tree showed a broad diversity of CP-*Ec* isolates belonging to the eight phylogroups and three dominant clades corresponding to CC10 (phylogroup A; including ST10, ST167, and ST617), CC23 (phylogroup C; including ST410, ST88, and ST90) and ST38 (phylogroup D) with 161, 97, and 98 isolates, respectively, accounting for 49.9% of the F-NRC CP-*Ec* isolates analyzed (Fig. 2). Phylogroup B2

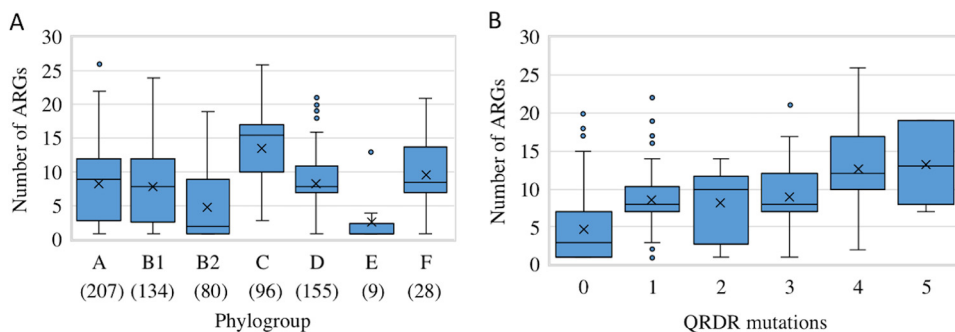


FIG 3 Resistance gene content of the F-NRC CP-*Ec* isolates. (A) Box plot representation of the ARG content according to the phylogroup. The number of isolates belonging to each phylogroup is indicated within parentheses. The limits of the box indicate the lower and upper quartile. Outliers are indicated by points above the maximum value. (B) Relationships between the number of ARGs and the number of mutations in QRDRs. In the box plot representations, the median is indicated by an horizontal bar, and the mean is indicated by a × symbol.

isolates represented 11% of the total isolates ($n = 80$), and only 17 CP-ST131 isolates were identified. Fluctuations in the proportions of the main STs could be observed during the 4 years of the analysis, but no clear tendency could be identified (Fig. S1A).

Infection-related and screening isolates were intermixed throughout the phylogeny (Fig. 2). However, an enrichment in infection-related isolates was observed in phylogroup C (Pearson's chi-squared test, $P < 0.02$, degrees of freedom [df] = 1) and phylogroup B2 (Pearson's chi-squared test, $P < 0.0005$, df = 1) (Fig. S1B). In phylogroup B2, 5 out of 9 ST127 isolates, 5 out of 17 ST131 isolates, and 7 out of 8 ST636 isolates were responsible for UTIs (Table S1).

Diversity of antibiotic resistance genes carried by CP-*Ec* isolates. The number of acquired ARGs was found to vary from 1 to 26 among the 713 CP-*Ec* isolates. The median was higher in phylogroup C isolates (median, 16) and lower in isolates from phylogroup B2 (median, 2) compared to other phylogroups (medians for phylogroup A, B1, and D were 9, 8, and 8, respectively) (Fig. 3A). An ESBL of the CTX-M family was present in 40.7% ($n = 290$) of the isolates, with a predominance of *bla*_{CTX-M-15} gene ($n = 205$) (Table S1). Mutations in *gyrA*, *parC* and/or *parE* potentially leading to fluoroquinolone (FQ) resistance occurred in 425 CP-*Ec* isolates (59.6%), with mutations in *gyrA*, *parC*, and *parE* identified in 412, 309, and 261 isolates, respectively (Table S1). Up to five mutations in QRDRs were identified in 19 isolates, and 250 isolates had four mutations in QRDRs, suggesting they have been subjected to long-term evolution under antibiotic pressure, including FQ (Table S1). Globally, a higher number of mutations in QRDRs was associated with a higher number of resistance genes (Fig. 3B), furthering the link between the number of QRDR mutations and a likely evolution under antibiotic selective pressure for CP-*Ec* isolates.

Four isolates from 2015, two ST648 isolates collected in the same hospital at 1-week interval, one ST216 isolate and one ST744 isolate, carried a *mcr-9* gene conferring resistance to colistin (Table S1). Although not associated with infection, the four isolates were MDR, carrying 13 to 20 acquired ARGs in addition to *mcr-9* and carbapenemase genes (*bla*_{VIM-1} for three of the isolates, *bla*_{NDM-1} and *bla*_{OXA-48} for one isolate). Determination of the MIC for colistin for these four isolates were at the resistance breakpoint (MIC = 2 mg/L).

Diversity of carbapenemase genes. Carbapenemase genes identified by WGS (Table S1) were in agreement with molecular data collected by the F-NRC laboratory. The *bla*_{OXA-48} and *bla*_{OXA-181} genes were the most frequent carbapenemase genes detected in 464 (65%) and 101 (14.1%) *E. coli* isolates, respectively. Twenty-nine other isolates carried minor *bla*_{OXA-48-like} genes (Table S1). *bla*_{NDM} family genes were detected in 14.9% (106/713) of the CP-*Ec* isolates (*bla*_{NDM-5} in 49 isolates and *bla*_{NDM-1} in 41 isolates). Three additional *bla*_{NDM} alleles were identified: *bla*_{NDM-7} ($n = 10$) including a variant coding for a NDM7-like carbapenemase with a S24G mutation, *bla*_{NDM-4} ($n = 5$), and *bla*_{NDM-6} ($n = 1$). Four different

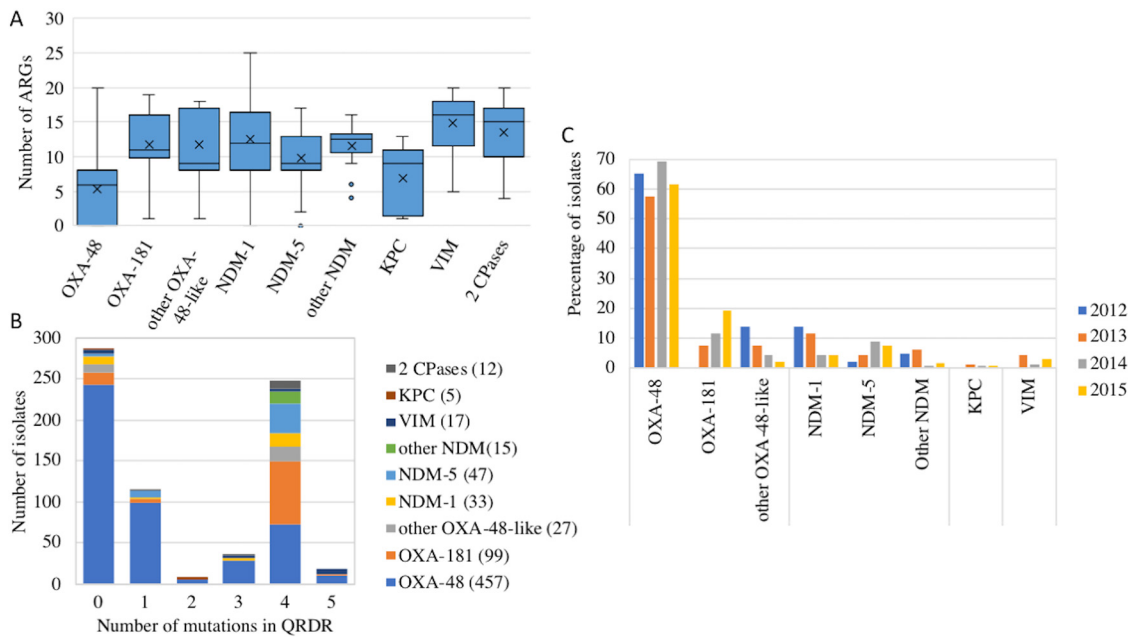


FIG 4 Carbapenemase gene content of the F-NRC CP-*Ec* isolates. (A) Relationship between the carbapenemase allele and the ARG content. In the box plot representation, the median is indicated by an horizontal bar and the mean by a × symbol. The limits of the box indicate the lower and upper quartile. Outliers are indicated by points above the maximum value. (B) Number of isolates carrying a specific carbapenemase allele according to the number of QRDR mutations in their genomes. (C) Per-year evolution of the percentage of isolates carrying the different carbapenemase alleles in the 2012–2015 period. The year of isolation is indicated as in the figure key (right). Given their small number ($n = 22$), strains isolated before 2012 are not indicated.

*bla*_{VIM} alleles were detected in 18 isolates: *bla*_{VIM-1} ($n = 8$), *bla*_{VIM-4} ($n = 8$), *bla*_{VIM-2} ($n = 1$), and *bla*_{VIM-29} ($n = 1$). Only five *E. coli* isolates expressed *bla*_{KPC-2} ($n = 2$) or *bla*_{KPC-3} ($n = 3$) alleles. In 12 isolates, two different carbapenemase genes were found; *bla*_{OXA-48}/*bla*_{NDM-1} was the most frequent cooccurrence ($n = 5$) (Table S1).

The analysis of the number of additional ARGs and of mutations in QRDR regions showed that, compared with other carbapenemase genes, the presence of *bla*_{OXA-48} was frequently associated with less resistant isolates (Fig. 4A and B). In particular, it was the only ARG in 117 isolates of the 457 (24.5%) encoding this carbapenemase, including 23 infection-related isolates. Of those isolates, only five showed mutations in QRDRs. Conversely, only two *bla*_{NDM-1} gene-carrying isolates of 42 isolates and one *bla*_{NDM-5} gene-carrying isolates of 49 isolates carried no other ARG.

A temporal analysis of the proportion of isolates displaying *bla*_{OXA-48} did not reveal significant variations (Pearson’s chi-squared test, $P = 0.05$, $df = 3$) during the 2012–2015 period (Fig. 4C). In contrast, the frequency of *bla*_{OXA-181} relative to other alleles was found to significantly increase from 0% in 2012 to 18.9% in 2015 (Pearson’s chi-squared test, $P < 0.0002$, $df = 3$) (Fig. 4C).

We observed some association between the carbapenemase gene and the ST. Of the 22 STs with at least seven F-NRC CP-*Ec* isolates, 14 predominantly displayed *bla*_{OXA-48} (Fig. 5A); *bla*_{OXA-48} was also predominant in STs represented by six or less isolates. In three lineages, ST410, ST940, and ST1284, *bla*_{OXA-181} was the predominant allele. These three STs grouped 74% of the *bla*_{OXA-181} gene carrying *E. coli* isolates from the F-NRC, and ST410 accounted for 50.5% of them. Finally, *bla*_{OXA-204} was the most prevalent allele in ST90, and *bla*_{NDM-5} was the predominant allele in ST636.

Characteristics of the STs preferentially associated with F-NRC CP-*Ec* isolates.

Eight of the 14 STs with more than 10 CP-*Ec* isolates (ST410, ST167, ST940, ST405, ST617, ST90, ST1284, and ST101) were characterized by a larger number of ARGs (median ≥ 10) and a larger number of mutations in QRDRs compared to ST38, ST10, ST131, ST69, ST88, and ST represented by less than seven isolates (Fig. 5B and C). ST648 isolates have an intermediate position, being highly mutated in QRDRs but less

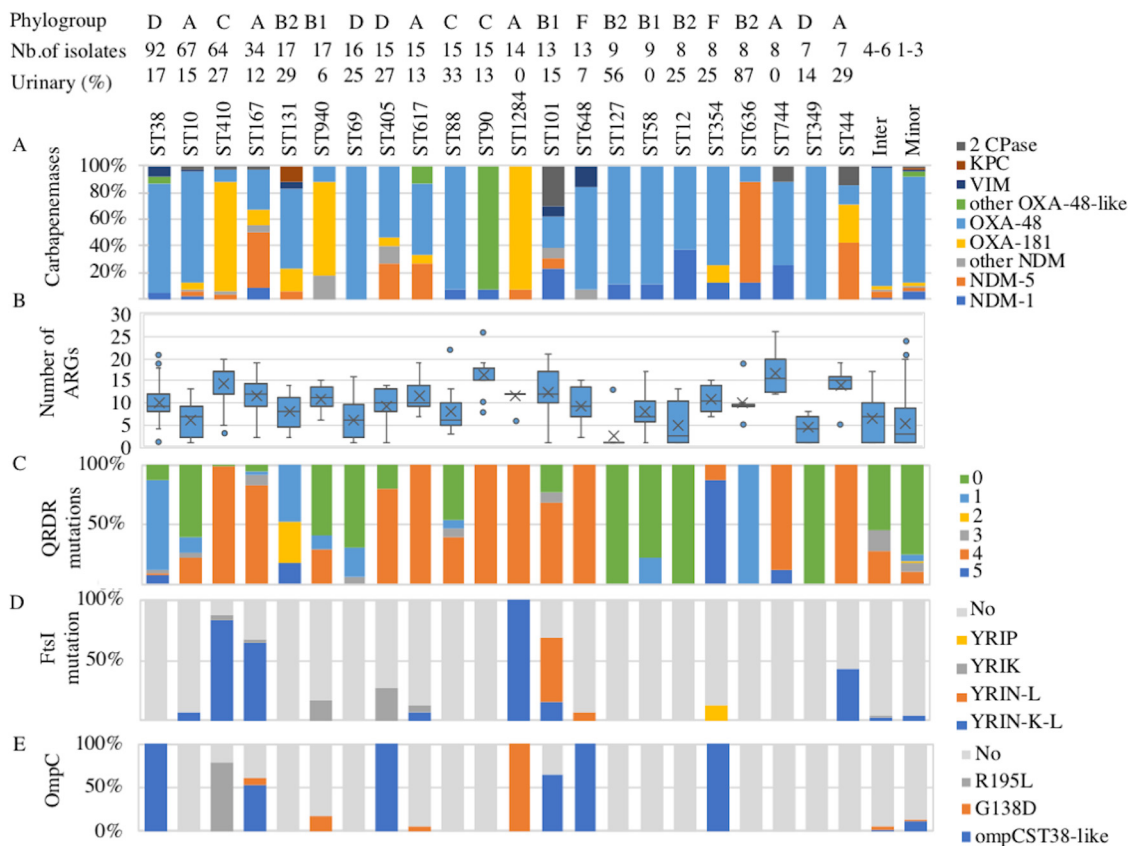


FIG 5 Features of the main STs associated with CP-Ec isolates in France. At the top of the figure, for each ST, the phylogroup, the total number of isolates, and the number of isolates associated with urinary tract infections are indicated. Intermediate (Inter) and minor ST indicate ST represented by four to six isolates and one to three isolates, respectively. (A) Proportion of the isolates according to the carbapenemase allele in each ST. (B) Box plot representation of the ARGs content according to the ST. (C) Proportion of isolates according to the number of mutations in QRDR. (D) Proportion of isolates with a specific PBP3 characterized by a YRIP, YRIK, or YRIN insertion between positions 333 and 334, the YRIN insertion is generally associated with a A413V mutation (YRIN-L) and less frequently also with a E349K mutation (YRIN-K-L) (10). (E) Proportion of isolates carrying specific mutations in *ompC*: R195L, G138D or acquisition of an ST38-like *ompC* allele by recombination (10).

rich in ARGs. Analysis of CP-Ec isolates from the F-NRC for polymorphisms in *ftsI* revealed that 131 (18.4%) had a 4-amino-acid (aa) insertion between positions 333 and 334 of PBP3, the insertion being particularly prevalent in ST101, ST167, ST410, and ST1284 (Table S1 and Fig. 5D). Similarly, *ompC* alleles we previously characterized as modifying susceptibility to antibiotics were more prevalent in some STs: an ST38-like *ompC* allele resulting from a recombination event or a G138D mutation was present in 33 and 26 isolates belonging to six different STs, whereas the R195L mutation was observed in 50 isolates all from ST410 (Table S1 and Fig. 5E). In addition, 144 isolates belonging to phylogroups D and F possessed the ST38-like allele inherited vertically. On the other hand, the *ompF* gene was pseudogenized in 47 isolates (Table S1).

To analyze the phylogenetic relationships between F-NRC Cp-Ec and other Cp-Ec isolates collected worldwide, we built ST-based maximum likelihood trees for the 14 STs with more than 10 isolates and included to this analysis genome sequences publicly available (Table S2). Together with the analysis of QRDR mutations and mutations in *ftsI* and *ompC*, this showed that 51 (80%) of the ST410 (Fig. S2A), 17 (49%) of the ST167 (Fig. S2B), 3 (33%) of the ST405 (Fig. S2C), and 8 (62%) of the ST101 (Fig. S2D) F-NRC CP-Ec isolates belonged to internationally disseminating MDR subclades enriched in CP we previously identified (10). Subclades characterized by mutations in *ftsI* and *ompC* mainly expressed *bla*_{OXA-181} (ST410) or *bla*_{NDM} (other lineages). Other isolates belonging to these STs were dispersed on their respective phylogenies and with no sign of clonal dissemination for most of them.

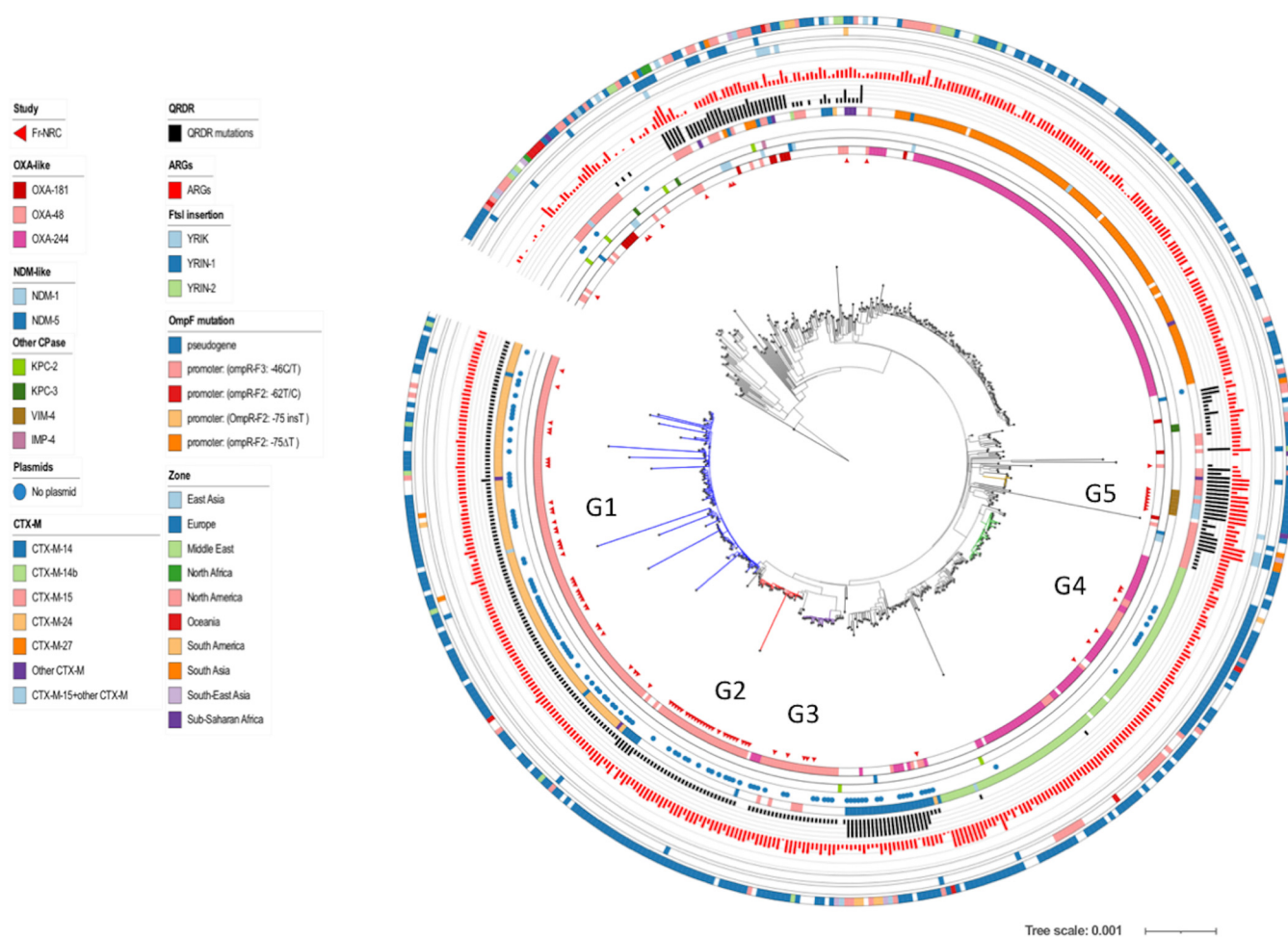


FIG 6 Core genome phylogeny of ST38 isolates. ML Phylogeny was based on genome sequences of 92 CP-*Ec* from the F-NRC and 464 genome sequences retrieved from EnteroBase and from the NCBI database, including 331 carrying a carbapenemase gene. A core genome (2,900,000-nt) alignment of the *de novo* assemblies on the sequence of GCA_005886035.1 used as a reference was performed by using Parsnp (47); ML phylogeny was built with RAxML (45) from 6,170 core SNPs after removing recombined regions with Gubbins (48). The genome sequence of CNRC6O47 (ST963) was used as an outgroup for the phylogenetic analysis. F-NRC isolates are indicated by red triangles (inner circle). Other genomic features are indicated as indicated in the figure key (left) from the inside to the outside circles: carbapenemases of the OXA, NDM, and other types; absence of any plasmid of any Inc type as identified by using PlasmidFinder (14); ESBL of the CTX-M types; number of mutations in *gyrA* and *parC* QRDRs (FQ resistance); number of ARGs; mutations in *ftsI*, *ompC*, and *ompF*; and geographical origin. The four OXA-48-like clades (G1, G2, G3, and G4) clustering most French isolates are colored in blue, red, violet, and green. A fifth clade (G5) corresponding to a possible outbreak of VIM-4 isolates in east of Paris is colored in brown.

ST38 corresponded to the most represented ST ($n = 92$) among the studied CP-*Ec*. The phylogenetic reconstruction together with 314 additional nonredundant CP-*Ec* genome sequences retrieved from EnteroBase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>) and 150 non-CP isolates from NCBI provided evidence that 80.4% ($n = 67$) of the French isolates clustered into four clades (Fig. 6). Three of the clades, G1 ($n = 35$), G2 ($n = 25$), and G4 ($n = 4$) only contained isolates encoding *bla*_{OXA-48r} while G3 ($n = 7$) included isolates expressing *bla*_{OXA-48} or its single nucleotide derivative *bla*_{OXA-244}. All but one isolate in G1 expressed *bla*_{CTX-M-24r} while isolates of G3 expressed *bla*_{CTX-M-14b}. The phylogenetic analysis provided evidence of worldwide dissemination of G1, G3, and G4 clades and multiple introduction in France. Strikingly, among the 28 isolates of the G2 clade, 24 were collected in France and four in the Netherlands, suggesting at this time a more regional dissemination. In none of the isolates of the four clades could an IncI plasmid, that generally carries *bla*_{OXA-48} (13), be identified by PlasmidFinder (14). It suggests a chromosomal integration as previously shown among ST38 isolates collected in the United Kingdom (15). Analysis of representative isolates of the G1 and G3 cluster (G1, GCA_005886035.1; G3, GCA_004759025.1), whose genome sequences were completely

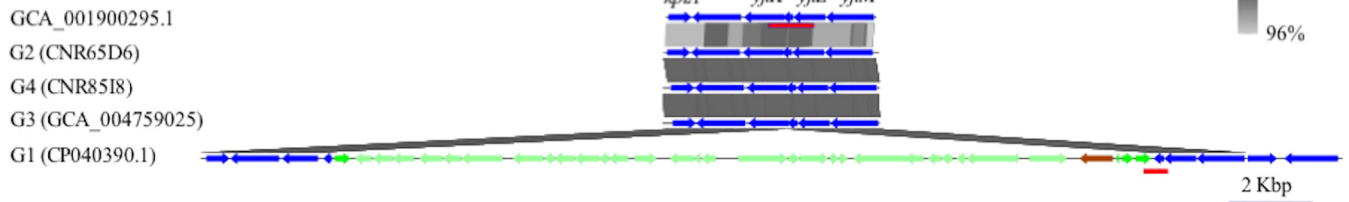
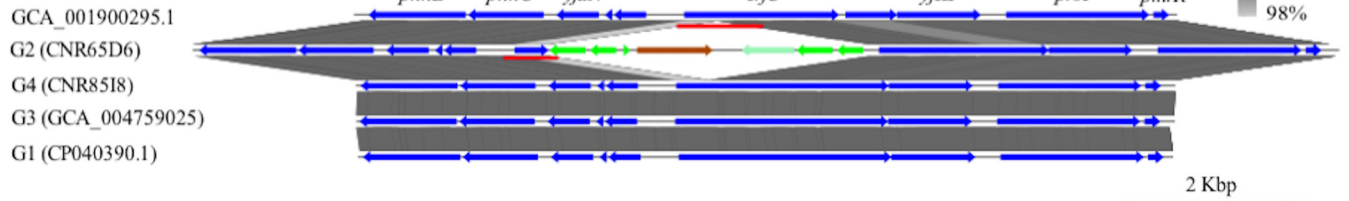
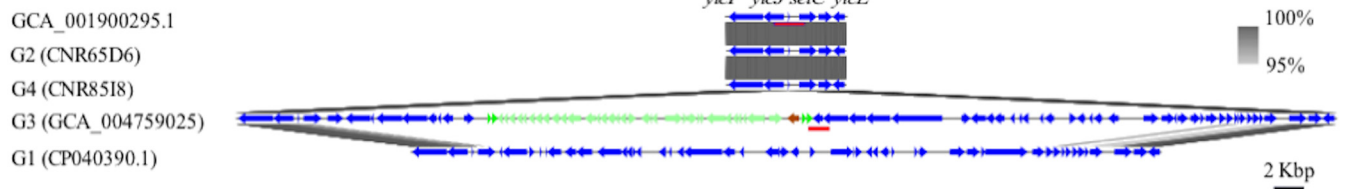
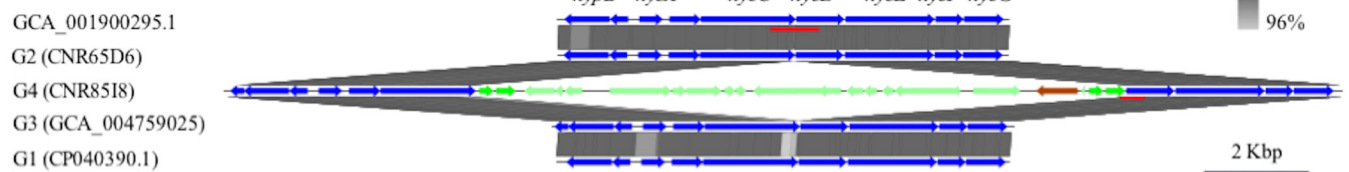
G1 type insertion**G2 type insertion****G3 type insertion****G4 type insertion**

FIG 7 bla_{OXA-48} integration sites of ST38 CP-*Ec* clades 1, 2, 3, and 4. The genome sequences of GCA_005886035.1 (CP040390.1), CNR65D6, GCA_004759025.1 (CP038505.1), and CNR8518 were chosen as representative genomes of clusters 1, 2, 3, and 4, respectively, and aligned, by using BlastN, against the sequence of GCA_001900295.1 (CP010116.1), an ST38 isolate that does not carry a carbapenemase gene and whose genome sequence was complete. Gene annotations were derived from strain MG1655 (NC_000913.3). The regions surrounding the bla_{OXA-48} insertion sites in each clade were more precisely aligned against the corresponding sequences of CP010116.1 and of representative genomes of the other clades by using Easyfig (52). bla_{OXA-48} is represented by a brown arrow, cointegrated genes of pOXA-48 origin are indicated by light green arrows, and the *IS1* transposase is indicated by a green arrow. Sequences used to perform the BLAST analysis on Illumina contigs are underlined in red. It is interesting to note that, in the G3 clade, bla_{OXA-48} integration occurs in a genomic island inserted at tRNA^{Sec}. Another genomic island is present in G1-type strains but does not carry bla_{OXA-48} .

assembled, confirmed that bla_{OXA-48} and $bla_{OXA-244r}$ in these two isolates, respectively, were chromosomally integrated. To assess the genetic support of bla_{OXA-48} in the two other clades, we have determined the complete genome sequence of two isolates belonging to G2 (CNR65D6) and G4 (G4:CNR8518) by combining long-read Pacbio and Illumina sequencing and found that both possess a chromosomally inserted bla_{OXA-48} gene. pOXA-48 plasmid sequences of various lengths were cointegrated with bla_{OXA-48} , the whole sequence being surrounded by *IS1* insertion sequences with different insertion sites for the four clades (Fig. 7). BlastN analyses on the assembled Illumina sequences of other isolates of each clade showed that isolates of the same clade share the same insertion sites (see Materials and Methods). A fifth clade, composed of seven closely related French isolates corresponded to a possible outbreak east of Paris, France, between December 2014 and December 2015. These isolates are predicted to

be highly resistant, as they are carrying in addition to *bla*_{VIM-4}, *bla*_{CTX-M-15}, as well as 15 to 18 additional ARGs and five mutations in QRDRs.

ST10 *E. coli* isolates are commensals of a variety of mammals and bird species (16), and studies in different contexts have shown that this ST is also associated with ARG carriage (17, 18). The 67 F-NRC ST10 CP-*Ec* isolates were distributed throughout the ST10 phylogeny. Nonetheless, 31 isolates belonged to a clade enriched with carbapenemase producers (Fig. S3A, in green) that mainly expressed *bla*_{OXA-48}, with the exception of three isolates expressing *bla*_{OXA-181}, three expressing *bla*_{NDM-5}, and one expressing *bla*_{VIM-4}. Two of the *bla*_{OXA-181}-expressing isolates and the three *bla*_{NDM-5}-expressing isolates were closely related, shared a CTX-M-27 ESBL, four mutations in QRDRs, and a *ftsI* allele with a 4-aa YRIN insertion (Fig. S3A, in red).

ST131 isolates are major contributors for extraintestinal infections and the main factor responsible for the dissemination of CTX-M-15 ESBL (19, 20). ST131 evolution has been thoroughly analyzed, and four main lineages A, B, C1, and C2 have been described (21). We identified only 17 ST131 CP-*Ec* isolates received by the F-NRC (Fig. 2), 10 belonged to lineage A, while the others were scattered in the three other lineages (Fig. S3B). The main carbapenemase associated with these isolates was OXA-48 ($n = 10$). We also did not observe any association with the carriage of *bla*_{CTX-M} genes, as only four ST131 CP-*Ec* isolates carried a *bla*_{CTX-M-15} gene. These results are in accordance with the United Kingdom survey (8) and our previous observations from sequences retrieved from public databases (10).

ST940 (phylogroup B1) and ST1284 (phylogroup A) represented 2.4% ($n = 17$) and 1.9% ($n = 14$) of the sequenced isolates, while they were poorly represented in sequence databases. For instance, in May 2021, only 83 and 103 genome sequences could be retrieved from EnteroBase for these STs, respectively, but with 43% ($n = 36$) and 22% ($n = 22$) carrying a carbapenemase gene, respectively. This suggested that ST940 and ST1284 were associated with the dissemination of carbapenemase genes. Phylogenetic trees were drawn by adding the nonredundant sequences from EnteroBase to those of the F-NRC and NCBI. For ST940 (Fig. S4A), this revealed a well-differentiated subclade of 18 isolates from Asia, Australia, and Europe carrying *bla*_{NDM-5} and sharing mutations in *ftsI* and *ompC*. Isolates from the F-NRC were distributed on the tree, showing that the overrepresentation of ST940 in France did not result from local outbreaks. Three F-NRC isolates belonged to a second smaller subclade of *bla*_{NDM}-expressing isolates, also mutated in *ftsI* and *ompC*. In contrast, in ST1284, 13 isolates carrying *bla*_{OXA-181} were found to be closely related (Fig. S4B). Metadata analysis showed that 12 of them were recovered from the same health facility in the Paris suburb during a 1-month period in 2015, demonstrating a local outbreak origin. A fourteenth unrelated isolate expressed *bla*_{NDM-5}. The F-NRC isolates belonged to a clade characterized by four mutations in QRDR determinants, a YRIN duplication in PBP3, a G137D mutation in *OmpC* and containing additional OXA-181- or NDM-producing isolates.

Of the 15 ST90 CP-*Ec* isolates, 9 encoding the *bla*_{OXA-204} allele were isolated in hospitals east of Paris between August 2012 to April 2013 and suspected to be associated with the use of a contaminated endoscope (22). Isolates closely related to this outbreak reappeared in 2014 (three times) and in 2015 (twice), also in hospitals located east of Paris. They belonged to a MDR clade characterized by four mutations in QRDRs (Fig. S5A). Finally, in the four last STs with more than 10 CP-*Ec* isolates (ST69, ST88, ST617, and ST648), French CP-*Ec* isolates were distributed throughout their respective phylogenetic trees (Fig. S5B and S5C and Fig. S6A and S6B) with no sign of clonal dissemination, except for a small cluster of five ST69 isolates from two geographical regions and expressing *bla*_{OXA-48}.

In addition to potential outbreaks detected in ST38 (*bla*_{VIM-4}), ST90 (*bla*_{OXA-204}), and ST1284 (*bla*_{OXA-181}), we also found evidence for another potential outbreak among isolates belonging to ST359. The five isolates carried *bla*_{OXA-48} and *bla*_{CTX-M-32} and had three

mutations in QRDRs. They were isolated during January 2014, four of them in the southeastern part of France and one in the Parisian suburbs.

DISCUSSION

The prevalence of CP-*Ec* is increasing worldwide. However, whether this reveals conjugation event in *E. coli* isolates by circulating CP-encoding plasmids or the emergence and dissemination of at-risk clones is still largely unknown. Here, we have analyzed, by using WGS, 691 (87.8%) of the CP-*Ec* isolates received by the F-NRC during the 2012–2015 period and 22 isolates from the Bicêtre hospital strain collection (2001 to 2011) to characterize both the diversity of carbapenemase genes and of CP-*Ec* isolates in France. Altogether, 713 CP-*Ec* isolates were sequenced, representing to our knowledge the most extended collection of CP-*Ec* isolates sequenced published to date.

The number of CP-*Ec* isolates sent to the F-NRC was found to strongly increase during the 4-year period of analysis, which might be a consequence of an increased circulation of CP-*Ec* in France but also of an increased screening of potential CPE carriers at their admission to the hospital. Indeed, while the number of infection-related CP-*Ec* isolates was regularly increasing, their proportion compared to the total number of received and sequenced isolates decreased by twofold, with a clear change observed between 2013 and 2014 (Fig. 1). This is likely a consequence of the implementation of the recommendations on MDR screening of the French Public Health Advisory Board 2013 (23). However, as CP-*Ec* isolates were sent on a voluntary basis by clinical laboratories, we cannot exclude some sampling bias.

The most predominant carbapenemase allele was *bla*_{OXA-48} (65%), followed by *bla*_{OXA-181} (14.1%) which detection constantly increased from no cases in 2012 to 73 in 2015. Next was *bla*_{NDM-5} that was found to progressively substitute to the *bla*_{NDM-1} gene in the frequency of detection (Fig. 4). The predominance of *bla*_{OXA-48-like} genes and particularly of *bla*_{OXA-48v} among CP-*Ec* was also noted in other studies (9, 24, 25) although in lower proportions. The small number of *bla*_{KPC} genes detected in these studies is in contrast with the situation reported in *Klebsiella pneumoniae* for many European countries (26). However, *bla*_{OXA-48} was found to be the most prevalent allele in *K. pneumoniae* in France (2) and in the Netherlands (9). This difference might result from a lower capacity for *bla*_{KPC}-carrying plasmids to conjugate to *E. coli* compared to pOXA-48 or to a higher fitness cost. It might also be linked to sampling differences, as different thresholds of carbapenem susceptibility might have been used to collect CRE isolates among studies. Indeed, OXA-48-like carbapenemases are generally associated with lower levels of carbapenem resistance than KPC. This analysis was performed on isolates collected between 2012 and 2015 and revealed early trends in the evolution of CP-*Ec* isolated in France. It will be essential in the characterization of the genomic evolution of CP-*Ec* in more recent years, which remains to be performed.

The number of ARGs identified in the CP-*Ec* isolates from the F-NRC varied from 1 (the carbapenemase gene only) to 26, showing that carbapenemase genes were acquired not only in MDR isolates but also in an *E. coli* population that can be considered “naive” relative to evolution under antibiotic selective pressure and resident of the intestinal microbiota. This was particularly true for isolates producing *bla*_{OXA-48} that were generally associated with a lower number of resistance genes than isolates producing other carbapenemases, irrespective of their clinical status (Fig. 4A). In particular, 118 out of the 121 (97.5%) isolates with no other ARG than the carbapenemase gene carried *bla*_{OXA-48}. Therefore, the predominance of *bla*_{OXA-48} among the carbapenemase genes identified in the F-NRC collection might mainly rely on the higher conjugative transfer rate of pOXA-48-related plasmids compared to the rates of plasmids carrying genes encoding other carbapenemases (27). pOXA-48 has indeed been shown to rapidly conjugate among *Enterobacteriales* in hospitalized patients (28). This could also explain the high frequency of *bla*_{OXA-48}-carrying isolates belonging to ST10, ST69, ST88, ST127, ST12, and ST58 (Fig. 5) that carried a small number of resistance genes and

QRDR mutations and among which four were previously identified among the most frequent *E. coli* STs characterized from fecal samples (29).

On the other hand, MDR CP-*Ec* isolates may result from the transfer of carbapenem resistance genes into isolates already selected through multiple exposures to antibiotic treatments that have already acquired multiresistance plasmids or chromosomal mutations increasing their intrinsic drug resistance, such as mutations in QRDRs, in *ftsI* and/or porin genes. Alternatively, the circulation of carbapenem-resistant lineages, such as the OXA-181-producing ST410 *E. coli* lineage, showing a stable association between the lineage and the resistance gene, may also occur and significantly contribute to the number of CP-*Ec* isolates collected. Discriminating between both alternatives would require a more extended comparison of plasmids carried in these lineages after long-read sequencing similarly to what been done in *K. pneumoniae* (30). Strikingly, the analysis of *ftsI* alleles coding for a PBP3 with the 4-amino-acid duplication revealed a contrasted situation among CP-*Ec* isolates collected in France, with the duplication in *ftsI* found in 72.3%, 77.8%, and 67% of the isolates carrying *bla*_{NDM-5} (34/47), *bla*_{NDM-7} (7/9), and *bla*_{OXA-181} (68/101) genes but in only 0.7% (4/458) of the isolates carrying *bla*_{OXA-48}. We previously proposed that the fixation of mutations reducing the intrinsic susceptibility to carbapenems might have favored the efficient conjugative transfer of plasmids carrying the carbapenemase genes from other CPE species in the gut (10). Transconjugants would be selected in the context of low biliary excretion of carbapenems or other β -lactams after parenteral administration. Increasing the proportion of the donor and recipient bacteria would therefore be less necessary for plasmids with high conjugative rates, such as pOXA-48 (27). Alternatively, these mutations might also have favored plasmid maintenance by increasing the resistance level and selection of the isolates during β -lactam or carbapenem treatment. Of particular concern in France are the OXA-181-producing ST410 and the NDM (NDM-1, -5, and -7) ST167 lineages that significantly contribute to the circulation of carbapenem resistance. However, our study also reveals smaller lineages, that although less frequently encountered in international studies, are nevertheless circulating. In contrast, we did not obtain evidence for clonal dissemination of CP-*Ec* ST131 lineages derived from the B2 clade responsible for *bla*_{CTX-M-15} gene dissemination (19, 20).

Despite their high frequency among the F-NRC collection, the ST38 isolates do not fall into one of the two previous categories. Indeed, while these isolates mainly express *bla*_{OXA-48} or its single point mutant derivative *bla*_{OXA-244} (31), our phylogenetic analysis revealed that a majority of them belong to four different lineages, including one mostly associated with rapid dissemination in France. In contrast with OXA-181- and NDM-producing lineages previously described, these lineages are associated with a moderate number of ARGs and QRDR mutations. None of the ST38 isolates is mutated in *ftsI*; however, we previously demonstrated that all are characterized by an *ompC* allele that encodes a porin with a reduced permeability to certain β -lactams and has disseminated into unrelated lineages by homologous recombination (10). A common feature of the four lineages is the integration of part of the pOXA-48 plasmid carrying *bla*_{OXA-48}. This could have reduced a fitness cost of this plasmid and facilitated the clonal expansion of these lineages. However, ST38 isolates were identified as a infrequent colonizer of the gastrointestinal (GI) tract (29, 32). Therefore, additional features of these CP-*Ec* ST38 lineages might have contributed to their dissemination.

In conclusion, by analyzing genome sequences of CP-*Ec* isolates collected by the F-NRC, we showed that MDR lineages, enriched in carbapenemase-producing isolates are circulating in France, and that some of them, such as ST1284 isolates, are associated with outbreaks. The results of our study also suggest that the evolutionary trajectory may depend on the carbapenemase gene, *bla*_{OXA-181} or *bla*_{NDM} genes being more frequently associated with the evolution of MDR *E. coli* lineages characterized by mutations in *ftsI* and *ompC*. Surveillance of these mutations may be an important parameter in controlling the circulation of MDR lineages. On the other hand, carbapenemase genes are also frequently acquired through plasmid dissemination from other bacterial species. Depending on the resistance background of the receiver *E. coli*, this may lead

to XDR or to isolates sensitive to a broad range of antibiotics. Finally, we also observed a strong and rapid dissemination of ST38 isolates that might have been favored by a reduced susceptibility to carbapenems linked to the ST38 *ompC* allele and by the chromosomal integration of the carbapenemase gene. These results strengthen our model of different evolutionary trajectories associated with the gain of carbapenemase genes (10). They also show that systematic genome sequencing of CP-*Ec* and on a larger scale, CPE isolates, irrespective of their clinical or resistance status, is able to provide useful information not only on the circulation of MDR lineages but also on the propagation of resistance genes through horizontal gene transfer.

MATERIALS AND METHODS

Isolate collection and sequencing. CP-*Ec* isolates analyzed in this study were collected by the F-NRC, mainly between the years 2012 and 2015. Twenty-two additional isolates we received before the creation of the F-NRC in 2012 were included in the analysis. Information on these isolates such as the year of isolation, region and department in France, and summary of their genomic features are reported in Table S1 in the supplemental material.

Whole-genome sequencing and analyses. DNA was extracted by using the Qiagen Blood and Tissue DNA easy kit. Sequencing libraries were constructed by using the Nextera XT kit (Illumina) following the manufacturer's instructions and sequenced with the Illumina HiSeq2500 or NextSeq500. FastQ files were trimmed for adaptors and low-quality bases (setting the minimum base quality threshold to 25) with the Cutadapt fork Atropos (33). *De novo* assemblies were generated from the trimmed reads with SPAdes v3.12.0 (34), using k-mer sizes of 51, 71, 81, and 91, the coverage cutoff option was set to "auto" and the "careful" option was activated. QUAST v2.2 (35) was used to assess the assembly quality, and contigs shorter than 500 bp were filtered out for phylogenetic analyses. The ST38 isolates CNR65D6 and CNR85I8 were sequenced to completion by using the long-read PacBio technology. PacBio reads were assembled with the RS_HGAP_Assembly.3 protocol from the SMRT analysis toolkit v2.3 (36) and with Canu (37), polished with Quiver (36), and manually corrected by mapping Illumina reads using Breseq (38). Assembled genomes were annotated with Prokka v1.9 (39). To analyze the F-NRC CP-*Ec* isolates belonging to the main ST recovered during the analysis in a more global context, their genome sequences were combined to the assembled genome sequences from the same ST retrieved from the NCBI database (July 2019) and in some STs from Enterobase (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>, April 2021). Retrieved genomes were annotated in the same way as the genome sequences of the F-NRC isolates (Table S2).

To generate a core genome phylogeny tree of all isolates, the best reference genome was first selected among a set of 18 genomes analyzed by Touchon et al. (40) using the software refRank (41) and three subsets of 100 randomly selected sequences from our study as input. This led to the selection of the genome sequence of strain MG1655-K12 (NC_000913.3) as the reference for read mapping and SNP identification. Sequence reads for the 17 reference genomes (40) as well as for the genome sequence of *Escherichia fergusonii* strain ATCC 35469 (NC_011740.1), used as an outgroup, were simulated with ART (42). Trimmed sequencing reads were mapped against the MG1655-K12 genome with BWA-MEM algorithm of the BWA v0.7.4 package (43). For SNP calling, the Genome Analysis Toolkit (GATK) v3.6.0 (44) was used with the following criteria, a minimum depth coverage (DP) of 10, a quality by depth (QD) bigger than 2, a fisher strain bias (FS) below 60, a root mean square of the mapping quality (MQ) above 40, and the mapping quality rank sum test (MQRankSum) and the read position rank sum test (ReadPosRankSum) greater than -12.5 and -8 , respectively. A maximum likelihood tree was estimated with RAxML v8.28 (45) using core genome SNPs after removing positions in the accessory genome identified with the filter_BSR_variome.py script from the LS-BSR pipeline (46).

For STs with more than 10 CP-*Ec* isolates from the F-NRC, a core genome alignment was generated with Parsnp (47), by using a finished genome sequence as reference. A closely related isolate outside the ST lineage was selected from the global phylogenetic tree, including all F-NRC isolates and used as an outgroup to root the ST phylogenetic trees. Maximum likelihood (ML) trees were generated with RAxML v8.28 (45) after removing regions of recombination with Gubbins (48). All graphic representations were performed by using ITOL (49).

MLST type, phylogroup, resistance gene, and plasmid replicon identification. Sequence type was assigned to each assembly through a python script that relies on BLAST (10). Antibiotic resistance genes (ARGs) and mutations in *gyrA*, *parC*, and *parE* quinolone resistance determining regions (QRDRs) were identified with Resfinder 4.0 and PointFinder (50) run locally, respectively. The scripts and database (retrieved 4 January 2021) were downloaded from the repositories of the Centre for Genomic Epidemiology (<https://bitbucket.org/genomicEpidemiology/>). The identified ARGs were manually reviewed to eliminate potential redundant ARGs predicted at the same genomic position. *mdf(A)* that is present in *E. coli* core genome was not taken into account. Phylogroups were assigned by using EzClermont (51) run locally. Plasmid replicons were identified with plasmidfinder run on each assembly (14). *ftsI*, *ompC*, and *ompF* coding sequences (CDS) and *ompF* promoter sequences were identified by using BlastN. Translated or nucleotide sequences were clustered by cd-hit (cd-hit-v4.8.1) with an amino acid (FtsI, OmpC, OmpF) or nucleotide sequence (*ompF* promoter) identity threshold of 1. Sequences of each cluster were aligned to detect mutations in regions of interest: 4-amino-acid insertions between P333 and Y334 and E349K and I532L mutations (FtsI), mutation modifying charge in L3 constriction loop, R195L mutation, nonsense or frameshift mutations

or OmpC sequence clustering with ST-38 OmpC sequences (OmpC), nonsense mutations (OmpF) or mutations affecting one of the OmpR boxes: mutation –46T/C in OmpR-F3 box and mutation –75ΔT in OmpR-F2 box (*ompF* promoter).

Determination of *bla*_{OXA-48} insertion site in ST38 clades 1, 2, 3, and 4. The genome sequences of GCA_005886035.1 (CP040390.1), CNR65D6, GCA_004759025.1 (CP038505.1), and CNR85I8 were chosen as representative genomes of clusters 1, 3, 2, and 4, respectively, and aligned, by using BlastN, against the sequence of GCA_001900295.1 (CP010116.1), an ST38 isolate that does not express a carbapenemase and whose genome sequence was complete. The regions surrounding the *bla*_{OXA-48} insertion sites in each clade were more precisely aligned against the corresponding sequences of other representative genomes by using Easyfig (Easyfig_mac_2.1) (52) (see Fig. S3 in the supplemental material). To perform a BLAST analysis of insertion sites by using contigs generated from Illumina sequences, smaller sequences were chosen as queries as following: nucleotides (nt) 1240133 to 1240934, nt 964173 to 965072, nt 419599 to 421606, nt 4206783 to 4207690 from GCA_001900295.1 to screen for native sequences corresponding to the four *bla*_{OXA-48} insertion sites in G1, G2, G3, and G4 clades and sequences nt 4460332 to 4460759 from CP040390.1, nt 4763987 to 4764506 from CNR65D6, nt 100784 to 102087 from CP038505.1, and nt 1206426 to 1206985 from CNR85I8 to screen for the integration site plus IS1 insertion as occurring in G1, G2, G3, and G4 clades, respectively.

Statistical analysis. Pearson's chi-squared tests were performed by using standard libraries contained within the R statistics package (<http://www.R-project.org>).

Availability of data. All sequence data have been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank (BioProject PRJEB46636) and BioSample identifiers for the Illumina sequence data are listed in Table S1. Complete genome sequences of CNR65D6 and CNR85I8 and the long-read sequencing data have been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank with the accession numbers OU701452.1 (PacBio reads, ERR6414227) and OU701449.1 (PacBio reads, ERR6414228), respectively.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

FIG S1, PDF file, 0.02 MB.

FIG S2, PDF file, 0.9 MB.

FIG S3, PDF file, 1.3 MB.

FIG S4, PDF file, 0.3 MB.

FIG S5, PDF file, 0.4 MB.

FIG S6, PDF file, 0.4 MB.

TABLE S1, XLSX file, 0.1 MB.

TABLE S2, XLSX file, 0.3 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the French National Research Agency (ANR-10-LABX-62-IBEID, ANR-10-LABX-33, INCEPTION project [PIA/ANR-16-CONV-0005]) and from the European Union's Horizon 2020 research and Innovation Program under grant agreement 773830 (Project ARDIG, One Health EJP).

Pengdbamba Dieudonné Zongo is a scholar of Ed525 CDV, Sorbonne Université, Paris.

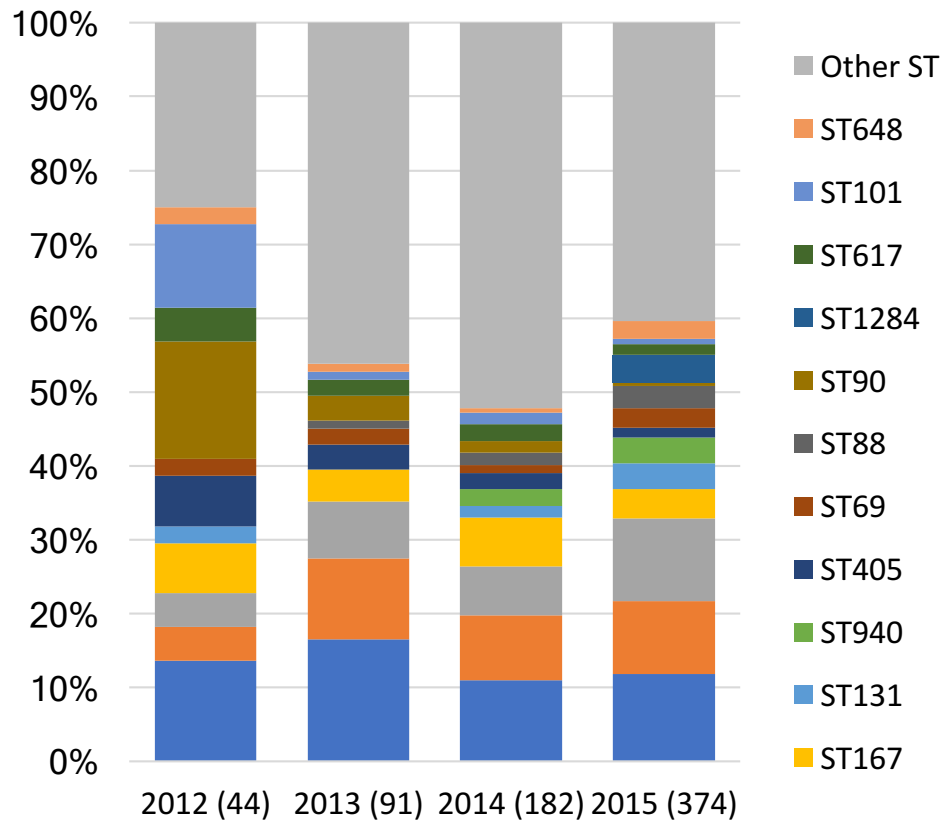
REFERENCES

- Medina M, Castillo-Pino E. 2019. An introduction to the epidemiology and burden of urinary tract infections. *Ther Adv Urol* 11:1756287219832172. <https://doi.org/10.1177/1756287219832172>.
- Dortet L, Cuzon G, Ponties V, Nordmann P. 2017. Trends in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill* 22(6):pii=30461. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.6.30461>.
- French National Reference Center for antibiotic resistance, Le Kremlin-Bicêtre, France, activity report 2019–2020. <https://www.cnr-resistance-antibiotiques.fr/bilans-dactivite.html>.
- Saleem AF, Allana A, Hale L, Diaz A, Salinas R, Salinas C, Qureshi SM, Hotwani A, Rahman N, Khan A, Zaidi AK, Seed PC, Arshad M. 2020. The gut of healthy infants in the community as a reservoir of ESBL and carbapenemase-producing bacteria. *Antibiotics* 9:286. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060286>.
- Bush K, Jacoby GA. 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 54:969–976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>.
- Stoesser N, Sheppard AE, Pankhurst L, De Maio N, Moore CE, Sebra R, Turner P, Anson LW, Kasarskis A, Batty EM, Kos V, Wilson DJ, Phetsouvanh R, Wyllie D, Sokurenko E, Manges AR, Johnson TJ, Price LB, Peto TE, Johnson JR, Didelot X, Walker AS, Crook DW, Modernizing Medical Microbiology Informatics Group (MMMIG). 2016. Evolutionary history of the global emergence of the *Escherichia coli* epidemic clone ST131. *mBio* 7:e02162-15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02162-15>.
- Gauthier L, Dortet L, Cotillon G, Creton E, Cuzon G, Ponties V, Bonnin RA, Naas T. 2018. Diversity of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolates, France 2012–2013. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e00266-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00266-18>.
- Ellaby N, Doumith M, Hopkins KL, Woodford N, Ellington MJ. 2019. Emergence of diversity in carbapenemase-producing *Escherichia coli* ST131, England, January 2014 to June 2016. *Euro Surveill* 24(37):pii=1800627. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.37.1800627>.
- van der Zwaluw K, Witteveen S, Wienders L, van Santen M, Landman F, de Haan A, Schouls LM, Bosch T, Dutch CPE surveillance Study Group. 2020. Molecular characteristics of carbapenemase-producing *Enterobacterales* in the Netherlands; results of the 2014–2018 national laboratory surveillance. *Clin Microbiol Infect* 26:1412.e7–1412.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.01.027>.

10. Patino-Navarrete R, Rosinski-Chupin I, Cabanel N, Gauthier L, Takissian J, Madec JY, Hamze M, Bonnin RA, Naas T, Glaser P. 2020. Stepwise evolution and convergent recombination underlie the global dissemination of carbapenemase-producing *Escherichia coli*. *Genome Med* 12:10. <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0699-6>.
11. Roer L, Overballe-Petersen S, Hansen F, Schønning K, Wang M, Røder BL, Hansen DS, Justesen US, Andersen LP, Fulgsang-Damgaard D, Hopkins KL, Woodford N, Falgenhauer L, Chakraborty T, Samuelsen Ø, Sjöström K, Johannesen TB, Ng K, Nielsen J, Ethelberg S, Stegger M, Hammerum AM, Hasman H. 2018. *Escherichia coli* sequence type 410 is causing new international high-risk clones. *mSphere* 3:e00337-18. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00337-18>.
12. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. 2018. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia coli* genus strain phylogeny. *Microb Genom* 4:e000192. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192>.
13. Hendrickx APA, Landman F, de Haan A, Witteveen S, van Santen-Verheue MG, Schouls LM, Dutch Cpe Surveillance Study Group. 2021. bla(OXA-48)-like genome architecture among carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands. *Microb Genom* 7:e000512. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000512>.
14. Carattoli A, Zankari E, Garcia-Fernandez A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, Møller Aarestrup F, Hasman H. 2014. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 58:3895–3903. <https://doi.org/10.1128/AAC.02412-14>.
15. Turton JF, Doumith M, Hopkins KL, Perry C, Meunier D, Woodford N. 2016. Clonal expansion of *Escherichia coli* ST38 carrying a chromosomally integrated OXA-48 carbapenemase gene. *J Med Microbiol* 65:538–546. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000248>.
16. Leverstein-van Hall MA, Dierikx CM, Cohen Stuart J, Voets GM, van den Munchhof MP, van Essen-Zandbergen A, Platteel T, Fluit AC, van de Sande-Bruinsma N, Scharinga J, Bonten MJ, Mevius DJ, National ESBL surveillance group. 2011. Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains. *Clin Microbiol Infect* 17: 873–880. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x>.
17. Oteo J, Diestra K, Juan C, Bautista V, Novais A, Pérez-Vázquez M, Moyá B, Miró E, Coque TM, Oliver A, Cantón R, Navarro F, Campos J, Spanish Network in Infectious Pathology Project (REIPI). 2009. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Spain belong to a large variety of multilocus sequence typing types, including ST10 complex/A, ST23 complex/A and ST131/B2. *Int J Antimicrob Agents* 34:173–176. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.03.006>.
18. Manges AR, Mende K, Murray CK, Johnston BD, Sokurenko EV, Tchesnokova V, Johnson JR. 2017. Clonal distribution and associated characteristics of *Escherichia coli* clinical and surveillance isolates from a military medical center. *Diagn Microbiol Infect Dis* 87:382–385. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.01.007>.
19. Price LB, Johnson JR, Aziz M, Clabots C, Johnston B, Tchesnokova V, Nordstrom L, Billig M, Chattopadhyay S, Stegger M, Andersen PS, Pearson T, Riddell K, Rogers P, Scholes D, Kahl B, Keim P, Sokurenko EV. 2013. The epidemic of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. *mBio* 4:e00377-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00377-13>.
20. Nicolas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. 2014. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev* 27:543–574. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>.
21. Decano AG, Downing T. 2019. An *Escherichia coli* ST131 pangenome atlas reveals population structure and evolution across 4,071 isolates. *Sci Rep* 9:17394. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54004-5>.
22. Potron A, Bernabeu S, Cuzon G, Pontié V, Blanchard H, Seringe E, Naas T, Nordmann P, Dortet L. 2017. Analysis of OXA-204 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae reveals possible endoscopy-associated transmission, France, 2012 to 2014. *Euro Surveill* 22(49):pii=17-00048. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.49.17-00048>.
23. Lepelletier D, Berthelot P, Lucet JC, Fournier S, Jarlier V, Grandbastien B, National Working Group. 2015. French recommendations for the prevention of 'emerging extensively drug-resistant bacteria' (eXDR) cross-transmission. *J Hosp Infect* 90:186–195. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2015.04.002>.
24. Ortega A, Sáez D, Bautista V, Fernández-Romero S, Lara N, Aracil B, Pérez-Vázquez M, Campos J, Oteo J, Spanish Collaborating Group for the Antibiotic Resistance Surveillance Programme. 2016. Carbapenemase-producing *Escherichia coli* is becoming more prevalent in Spain mainly because of the polyclonal dissemination of OXA-48. *J Antimicrob Chemother* 71: 2131–2138. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw148>.
25. Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasević AT, Cantón R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Monnet DL, European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group. 2017. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* 17:153–163. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30257-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30257-2).
26. David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, Abudahab K, Goater R, Giani T, Errico G, Aspbury M, Sjunnebo S, EuSCAPE Working Group, ESGEM Study Group, Feil EJ, Rossolini GM, Aanensen DM, Grundmann H. 2019. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol* 4: 1919–1929. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0492-8>.
27. Potron A, Poirel L, Nordmann P. 2014. Derepressed transfer properties leading to the efficient spread of the plasmid encoding carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother* 58:467–471. <https://doi.org/10.1128/AAC.01344-13>.
28. León-Sampedro R, DelaFuente J, Díaz-Agero C, Crellen T, Musicha P, Rodríguez-Beltrán J, de la Vega C, Hernández-García M, R-GNOSIS WP5 Study Group, López-Fresneña N, Ruiz-Garrajosa P, Cantón R, Cooper BS, San Millán Á. 2021. Pervasive transmission of a carbapenem resistance plasmid in the gut microbiota of hospitalized patients. *Nat Microbiol* 6: 606–616. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00879-y>.
29. Matsui Y, Hu Y, Rubin J, de Assis RS, Suh J, Riley LW. 2020. Multilocus sequence typing of *Escherichia coli* isolates from urinary tract infection patients and from fecal samples of healthy subjects in a college community. *Microbiologyopen* 9:1225–1233. <https://doi.org/10.1002/mbo3.1032>.
30. David S, Cohen V, Reuter S, Sheppard AE, Giani T, Parkhill J, European Survey of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group, ESCMID Study Group for Epidemiological Markers (ESGEM), Rossolini GM, Feil EJ, Grundmann H, Aanensen DM. 2020. Integrated chromosomal and plasmid sequence analyses reveal diverse modes of carbapenemase gene spread among *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117:25043–25054. <https://doi.org/10.1073/pnas.2003407117>.
31. Emerald C, Girlich D, Bonnin RA, Jousset AB, Naas T, Dortet L. 2021. Emergence and polyclonal dissemination of OXA-244-producing *Escherichia coli*, France. *Emerg Infect Dis* 27:1206–1210. <https://doi.org/10.3201/eid2704.204459>.
32. Massot M, Daubié AS, Clermont O, Jauréguy F, Couffignal C, Dahbi G, Mora A, Blanco J, Branger C, Mentré F, Eddi A, Picard B, Denamur E, Colville Group. 2016. Phylogenetic, virulence and antibiotic resistance characteristics of commensal strain populations of *Escherichia coli* from community subjects in the Paris area in 2010 and evolution over 30 years. *Microbiology (Reading)* 162:642–650. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000242>.
33. Didion JP, Martin M, Collins FS. 2017. Atropis: specific, sensitive, and speedy trimming of sequencing reads. *PeerJ* 5:e3720. <https://doi.org/10.7717/peerj.3720>.
34. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N, Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* 19:455–477. <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
35. Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. 2013. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* 29:1072–1075. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>.
36. Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J. 2013. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods* 10:563–569. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2474>.
37. Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. 2017. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res* 27:722–736. <https://doi.org/10.1101/gr.215087.116>.
38. Deatherage DE, Barrick JE. 2014. Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol Biol* 1151:165–188. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0554-6_12.
39. Seemann T. 2014. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30:2068–2069. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu153>.

40. Touchon M, Hoede C, Tenaillon O, Barbe V, Baeriswyl S, Bidet P, Bingen E, Bonacorsi S, Bouchier C, Bouvet O, Calteau A, Chiapello H, Clermont O, Cruveiller S, Danchin A, Diard M, Dossat C, Karoui ME, Frapy E, Garry L, Ghigo JM, Gilles AM, Johnson J, Le Bouguenec C, Lescat M, Mangenot S, Martinez-Jehanne V, Matic I, Nassif X, Oztas S, Petit MA, Pichon C, Rouy Z, Ruf CS, Schneider D, Tourret J, Vacherie B, Vallenet D, Medigue C, Rocha EP, Denamur E. 2009. Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. *PLoS Genet* 5:e1000344. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000344>.
41. Becker L, Fuchs S, Pfeifer Y, Semmler T, Eckmanns T, Korr G, Sissolak D, Friedrichs M, Zill E, Tung ML, Dohle C, Kaase M, Gatermann S, Rüssmann H, Steglich M, Haller S, Werner G. 2018. Whole genome sequence analysis of CTX-M-15 producing *Klebsiella* isolates allowed dissecting a polyclonal outbreak scenario. *Front Microbiol* 9:322. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00322>.
42. Huang W, Li L, Myers JR, Marth GT. 2012. ART: a next-generation sequencing read simulator. *Bioinformatics* 28:593–594. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr708>.
43. Li H, Durbin R. 2009. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 25:1754–1760. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>.
44. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, DePristo MA. 2010. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20:1297–1303. <https://doi.org/10.1101/gr.107524.110>.
45. Stamatakis A. 2014. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 30:1312–1313. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033>.
46. Sahl JW, Caporaso JG, Rasko DA, Keim P. 2014. The large-scale blast score ratio (LS-BSR) pipeline: a method to rapidly compare genetic content between bacterial genomes. *PeerJ* 2:e332. <https://doi.org/10.7717/peerj.332>.
47. Treangen TJ, Ondov BD, Koren S, Phillippy AM. 2014. The Harvest suite for rapid core-genome alignment and visualization of thousands of intraspecific microbial genomes. *Genome Biol* 15:524. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0524-x>.
48. Croucher NJ, Page AJ, Connor TR, Delaney AJ, Keane JA, Bentley SD, Parkhill J, Harris SR. 2015. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res* 43:e15. <https://doi.org/10.1093/nar/gku1196>.
49. Letunic I, Bork P. 2019. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res* 47:W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
50. Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, Cattoir V, Philippon A, Allesoe RL, Rebelo AR, Florensa AF, Fagelhauer L, Chakraborty T, Neumann B, Werner G, Bender JK, Stingl K, Nguyen M, Coppens J, Xavier BB, Malhotra-Kumar S, Westh H, Pinholt M, Anjum MF, Duggett NA, Kempf I, Nykäsenoja S, Olkkola S, Wiczorek K, Amaro A, Clemente L, Mossong J, Losch S, Ragimbeau C, Lund O, Aarestrup FM. 2020. ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *J Antimicrob Chemother* 75:3491–3500. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa345>.
51. Waters NR, Abram F, Brennan F, Holmes A, Pritchard L. 2020. Easy phylotyping of *Escherichia coli* via the EzClermont web app and command-line tool. *Access Microbiol* 2:acmi000143. <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000143>.
52. Sullivan MJ, Petty NK, Beatson SA. 2011. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* 27:1009–1010. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr039>.

A



B

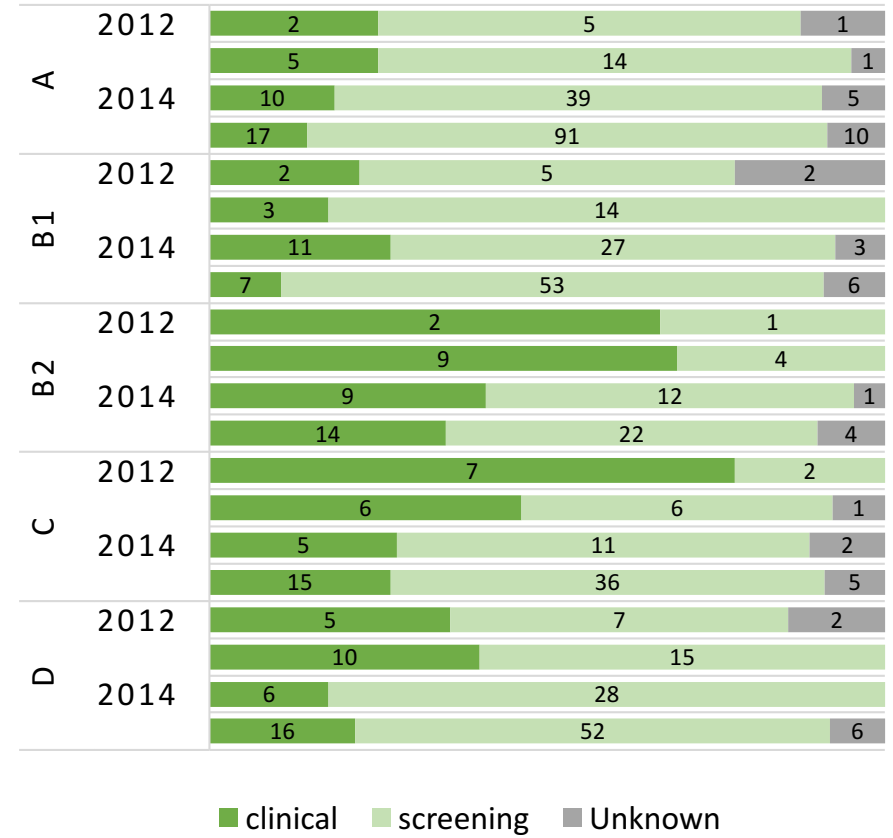


Figure S1. Per-year analysis of the origin of the isolates received by the F-NRC.

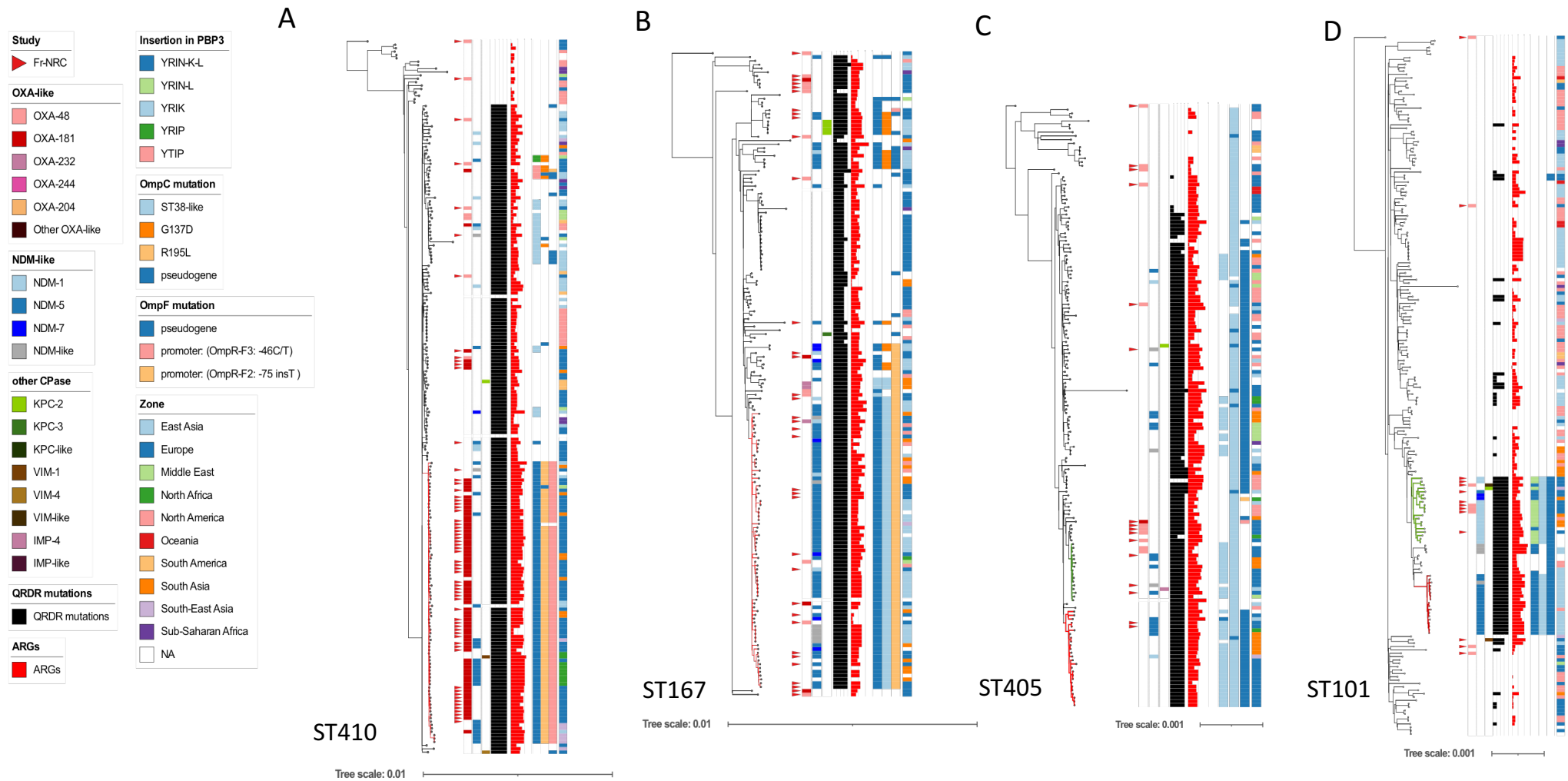
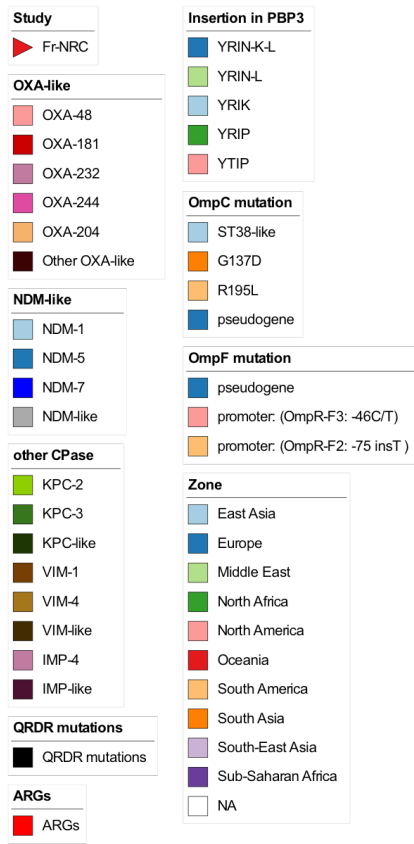
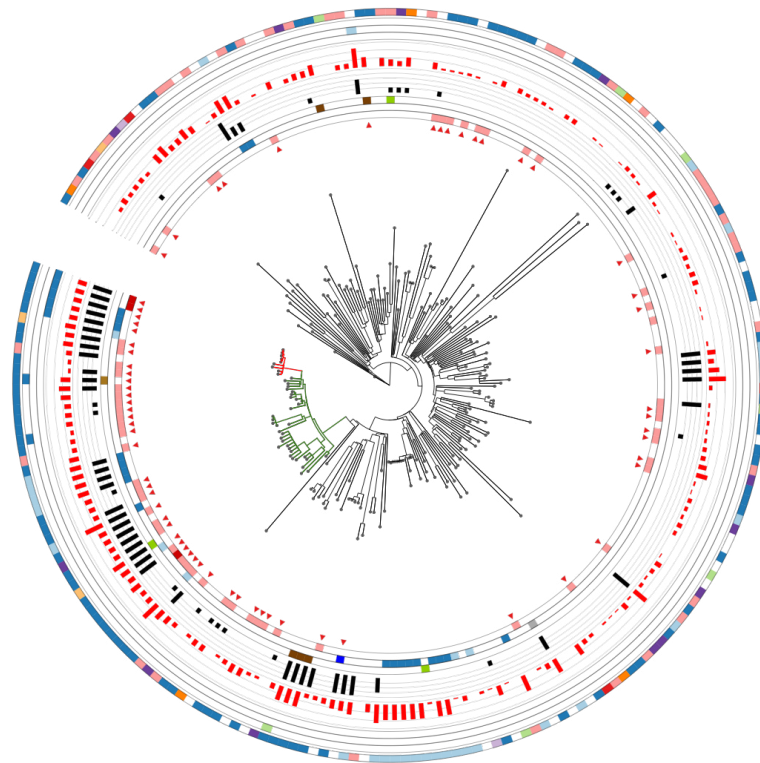


Figure S2. Core genome phylogenies of the main ST characterized by clades disseminating internationally.



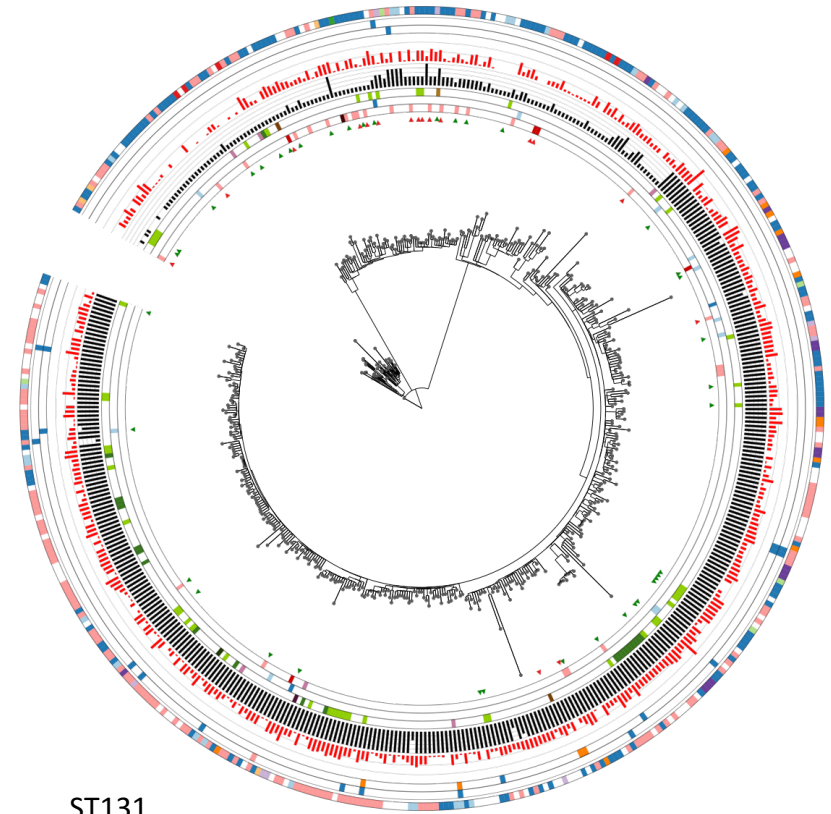
A



ST10

Tree scale: 0.001

B



ST131

Tree scale: 0.001

Figure S3. Core genome phylogenies of ST10 and ST131 isolates.

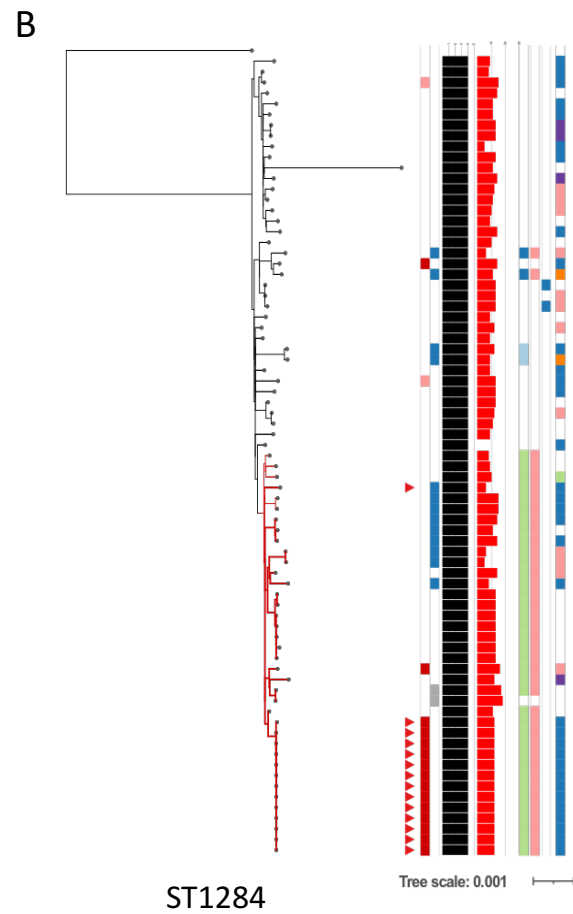
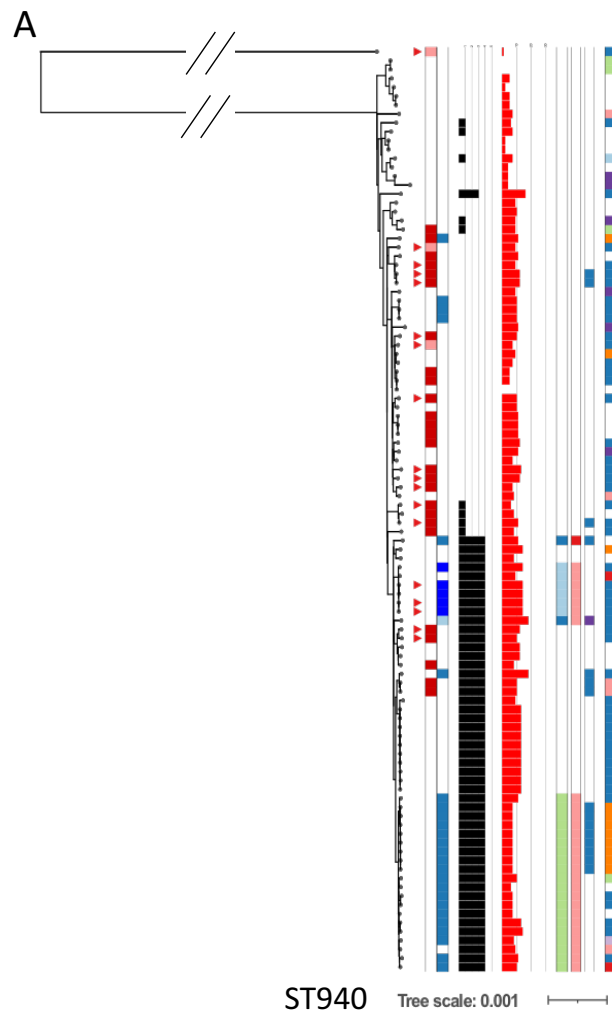
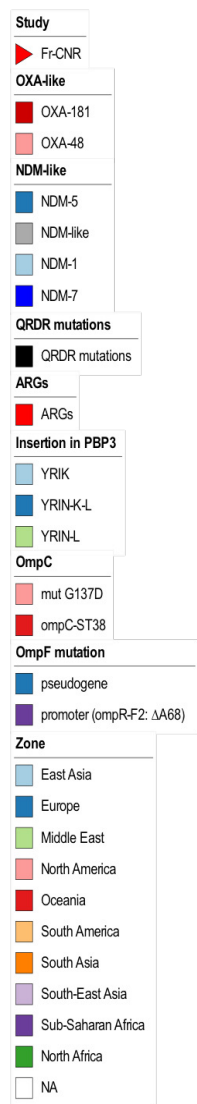


Figure S4. Core genome phylogeny of ST940 and ST1284 isolates. A:

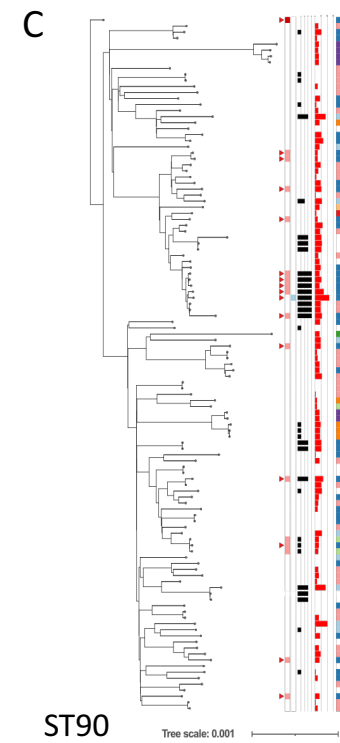
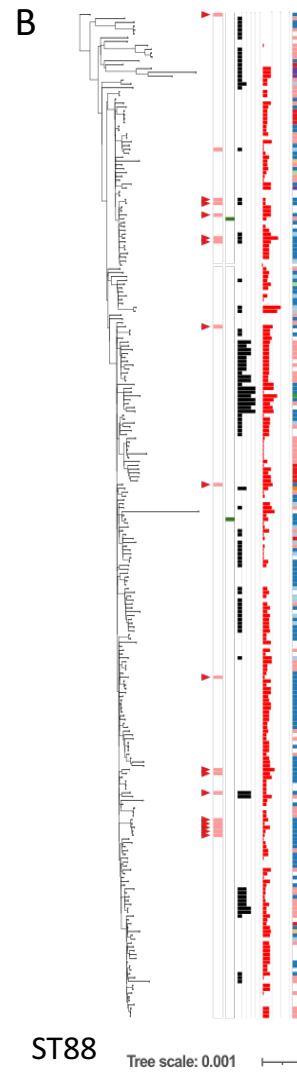
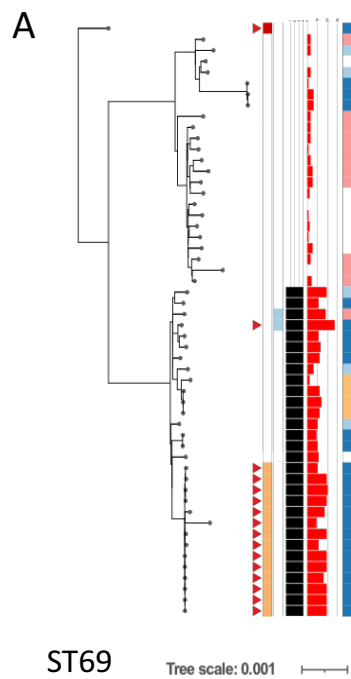
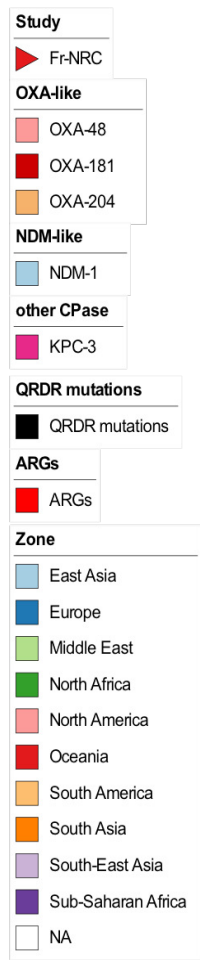


Figure S5. Core genome phylogenies of ST69, ST88 and ST90. isolates.

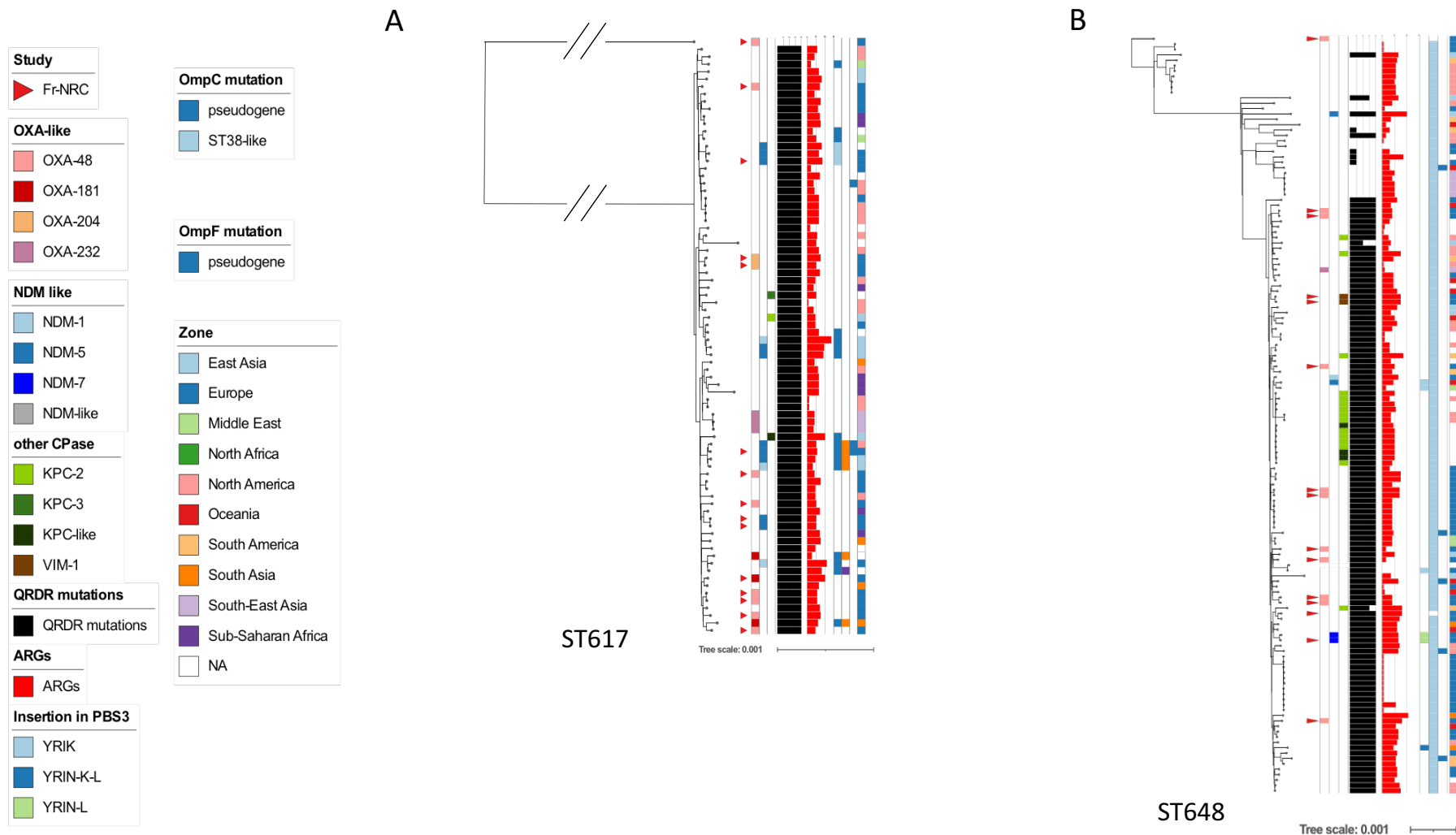


Figure S6. Core genome phylogeny of ST617 and ST648 isolates.

Chapitre 2 : Études des facteurs impliqués dans l'émergence des lignées *Escherichia coli* ST38 productrices de la carbapénémase OXA-48

Les souches *E. coli* ST38 sont des pathogènes extra-intestinaux majoritairement retrouvés dans les infections urinaires. Différents lignages caractérisés par la présence de gènes codant pour une β -lactamase à spectre étendu de type CTX-M ou pour une carbapénémase, notamment OXA-48 ou OXA-244 ont émergé et ont une dissémination mondiale. En étudiant la phylogénie de ce ST, nous avons montré la dissémination d'au moins quatre clones caractérisés par des intégrations de *bla*_{OXA-48} à des positions différentes du chromosome, trois (G1, G2 et G3) de ces clones étant proches phylogénétiquement. De plus l'analyse des réplicons présents dans les isolats appartenant à ces clones a suggéré qu'un certain nombre d'entre eux, bien que multirésistants ne possédaient aucun plasmide, indiquant que les ARGs étaient insérés dans le chromosome. Ceci a été confirmé par le séquençage génomique PacBio de certains de ces isolats.

Les facteurs impliqués dans l'intégration chromosomique des ARGs demeurent inconnus. Pour étudier ces facteurs, notamment ceux impliqués dans l'intégration de *bla*_{OXA-48}, les *E. coli* appartenant au ST38 semblaient constituer un modèle particulièrement propice. Nous avons obtenu de l'UMR AgroEcologie, INRAE à Dijon, et séquencé 16 souches ne portant pas *bla*_{OXA-48}. Parmi celles-ci nous en avons choisi trois pour leur position dans l'arbre phylogénétique des ST38. En particulier, l'une des souches, renommée ST38_1 semblait particulièrement intéressante, parce que positionnée dans un groupe de souches proches du lignage G1. Des trois souches, ST38_1 et ST38_2 étaient caractérisées par l'intégration chromosomique de tous les gènes de résistance et ST38_3 contenait à la fois des ARGs chromosomiques et un plasmide IncF portant également des ARGs.

Nous avons fait l'hypothèse que la présence de *bla*_{OXA-48} au sein d'un transposon, Tn6237 pouvait être un facteur favorisant son intégration dans le chromosome. J'ai sélectionné différentes souches de *K. pneumoniae* présentes dans notre collection, séquencées et porteuses du gène *bla*_{OXA-48} et analysé par PCR la structure des plasmides pOXA-48 présents dans ces souches. Cela m'a permis d'identifier trois souches porteuses de plasmides pOXA-48 différent

par leur structure que nous avons nommés pOXA-48_1, pOXA-48_2 et pOXA-48_3. pOXA-48_1 contient le transposon composite Tn6237 portant le gène *bla*_{OXA-48}. Ce transposon est absent dans pOXA-48_2 à la suite d'une délétion d'une des *IS1* de Tn6237. Il est absent aussi dans pOXA-48_3 où une inversion de Tn1999.2 est nécessaire pour le constituer. J'ai transféré par conjugaison ces trois plasmides dans les trois souches ST38_1, ST38_2 et ST38_3. Nous avons observé que l'acquisition de ces plasmides provoquait un coût de fitness pour l'hôte ST38_1 en milieu riche et pour les deux hôtes ST38_2 et ST38_3 en milieu minimum. Nous avons constaté qu'aucun des trois plasmides n'était stable après 10 jours de passage sans pression de sélection antibiotique peu importe la souche hôte. J'ai ensuite réalisé des expériences d'évolution de différentes combinaisons ST38/pOXA-48 pendant 28 jours (220 générations) en présence de méropénème. En analysant le fitness de la population durant ces expériences, nous avons observé une amélioration de fitness de la combinaison ST38_1/pOXA-48_1 en milieu riche et similairement de ST38_2/pOXA-48_1 en milieu minimum. Nous avons également constaté une amélioration tardive du fitness de la combinaison ST38_1/pOXA-48_3. Cependant il n'y a pas eu d'amélioration de fitness en présence de pOXA-48_2.

A partir des populations évoluées, nous avons isolé des colonies en présence de méropénème. Par PCR, en ciblant les gènes *bla*_{OXA-48} et *repA* (origine de répllication du plasmide) nous avons montré que dans le cas de la combinaison ST38_1/pOXA-48_1 il était possible d'identifier, à la fin de l'expérience d'évolution deux populations de colonies porteuses du gène *bla*_{OXA-48}, l'une qui avait perdu le plasmide, l'autre qui l'avait conservé. Le séquençage génomique des deux types de colonies nous a permis de constater deux trajectoires évolutives convergentes. Premièrement une intégration du Tn6237 dans un nouveau réplicon (chromosome ou plasmide endogène IncF) pour les colonies *bla*_{OXA-48}⁺ qui avaient perdu le plasmide. Et deuxièmement des mutations récurrentes dans un opéron codant pour des protéines de fonction inconnue pour les colonies qui avaient conservé le plasmide.

Quelques rares intégrations ont été observées aussi pour les transconjugants ST38_1/pOXA-48_3 évolués en milieu riche et ST38_2/pOXA-48_1 en milieu minimum. Les souches avec l'intégration sont dominantes au jour 28 chez ST38_1/pOXA-48_1. Nous avons montré que l'intégration de *bla*_{OXA-48} entraîne une réduction du coût de fitness lié à la présence du plasmide ce qui explique leur sélection rapide. Dans le cas des transconjugants ST38_2/pOXA-48_1, le gain de fitness étant moins important, les lignages avec l'intégration sont sélectionnés de façon moins efficace.

Des mutations récurrentes dans l'opéron de fonction inconnue ont été observées aussi pour les transconjugants ST38_2/pOXA-48_1 en milieu riche et en milieu minimum et pour les transconjugants ST38_1/ pOXA-48_2 et ST38_1/ pOXA-48_3. Dans les transconjugants présentant une mutation dans l'opéron, nous avons observé une stabilisation des plasmides et un gain partial ou complet de fitness. Dans la souche ST38_2 la mutation de l'opéron entraîne une abolition complète du coût de fitness lié au plasmide. Nous avons montré que l'opéron code pour un système de défense antiplasmide que nous avons nommé ApsAB (AntiPlasmid System AB). Ce système cible à la fois des plasmides à haut et bas nombre de copies utilisés au laboratoire : pACYt (p15A ori, 10 copies), pBbE8c (ColE1 ori, 20-30 copies) et pUC19 (pMB1 ori, >100 copies). Les prédictions structurales des protéines ApsA/B montrent que ApsA est une protéine possédant un domaine hélicase et un domaine nucléase et ApsB une protéine similaire à une protéine argonaute possédant un domaine MID mais dépourvue des domaines PIWI et PAZ caractéristiques des argonautes. La mutation des acides aminés prédits comme impliqués dans l'activité hélicase et nucléase d'ApsA abolit complètement ou partiellement l'activité d'ApsAB. Et l'inactivation d'un acide aminé d'ApsB impliqué dans la liaison de la séquence guide chez les protéines Argonautes abolit complètement l'activité d'ApsAB. En plus, ApsAB interfère avec l'acquisition de l'ADN étranger par conjugaison avec une diminution d'environ 2-log de la fréquence de conjugaison des plasmides pOXA-48.

Par une expérience d'évolution après délétion de l'opéron *apsAB* dans le fond génétique ST38_1, nous avons montré que la déstabilisation du plasmide pOXA-48_1 par ApsAB est essentielle à la sélection et l'émergence des clones porteurs de la forme intégrée de *bla*_{OXA-48}, aucune intégration n'ayant été observée chez les souches délétées évoluées.

Chez *E. coli*, il existe au moins deux autres systèmes apparentés à ApsAB partageant 92/92 % et 28/25 % d'identité protéique avec ApsAB. Nous avons cloné deux opérons représentatifs de ces systèmes et montré que les protéines codées étaient elles aussi capables de dégrader les plasmides. Ce système est retrouvé dans de nombreuses familles bactériennes allant des Enterobacteriaceae aux cyanobactéries et pourrait avoir un impact écologique important sur la circulation des plasmides.

En conclusion, ces données nous ont permis de montrer que l'intégration chromosomique de *bla*_{OXA-48} chez ST38 est un processus multifactoriel impliquant à la fois : un coût de fitness élevé lié au portage du plasmide, l'intégration du gène *bla*_{OXA-48} dans une structure mobile comme le transposon Tn6237 et le système de défense antiplasmide ApsAB de l'hôte qui

déstabilise le plasmide pOXA-48. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans le journal Nature Communications (Zongo et al. 2024).


Toutes les données supplémentaires de cette étude regroupées dans 10 feuilles Excel (Supplementary Data 1 à 10) sont accessibles dans la version en ligne de l'article dans la section « supplementary information ».




An antiplasmid system drives antibiotic resistance gene integration in carbapenemase-producing *Escherichia coli* lineages

Received: 8 February 2024

Accepted: 24 April 2024

Published online: 15 May 2024

 Check for updates

Pengdbamba Dieudonné Zongo^{1,2,3}, Nicolas Cabanel^{1,3,9}, Guilhem Royer ^{1,3,9}, Florence Depardieu ^{3,4}, Alain Hartmann ⁵, Thierry Naas ^{6,7,8}, Philippe Glaser ^{1,3,10} & Isabelle Rosinski-Chupin ^{1,3,10} 


Plasmids carrying antibiotic resistance genes (ARG) are the main mechanism of resistance dissemination in Enterobacterales. However, the fitness-resistance trade-off may result in their elimination. Chromosomal integration of ARGs preserves resistance advantage while relieving the selective pressure for keeping costly plasmids. In some bacterial lineages, such as carbapenemase producing sequence type ST38 *Escherichia coli*, most ARGs are chromosomally integrated. Here we reproduce by experimental evolution the mobilisation of the carbapenemase *bla*_{OXA-48} gene from the pOXA-48 plasmid into the chromosome. We demonstrate that this integration depends on a plasmid-induced fitness cost, a mobile genetic structure embedding the ARG and a novel antiplasmid system ApsAB actively involved in pOXA-48 destabilization. We show that ApsAB targets high and low-copy number plasmids. ApsAB combines a nuclease/helicase protein and a novel type of Argonaute-like protein. It belongs to a family of defense systems broadly distributed among bacteria, which might have a strong ecological impact on plasmid diffusion.

Antibiotic resistance is of major public health concern, having been responsible for more than 1.2 million deaths in 2019¹. Mobile genetic elements, particularly plasmids carrying antibiotic resistance genes (ARG), are key contributors to antibiotic resistance spread within and between species². While often carrying features beneficial under specific adverse environments, plasmids frequently confer a fitness cost to their bacterial host^{3,4}. This is expected to lead to their loss over time and, under positive selection, to the integration of beneficial traits into the host chromosome as predicted by Bergstrom et al.' mathematical

model of plasmid persistence⁵. However, some plasmids may persist over a long period even in the absence of selective pressure, a phenomenon known as the plasmid paradox^{6,7}. Solutions to this paradox include compensatory mutations improving the fitness of plasmid-carrying bacteria⁸⁻¹⁰ and high conjugation rates¹¹. On the other hand, bacteria have developed defense mechanisms to counteract invasion by parasitic DNAs, some of them able to limit plasmid diffusion¹²⁻¹⁴.

Carbapenemases are enzymes responsible for the hydrolysis of carbapenems, broad-spectrum antibiotics of major clinical importance.

¹Ecology and Evolution of Antibiotic Resistance Unit, Institut Pasteur, Paris, France. ²Sorbonne Université, Paris, France. ³Université Paris Cité, Paris, France. ⁴Synthetic Biology Unit, Institut Pasteur, Paris, France. ⁵UMR AgroEcologie 1347, INRAE, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France. ⁶Team ReSIST, INSERM UMR 1184, Paris-Saclay University, Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁷Department of Bacteriology-Hygiene, Bicêtre Hospital, APHP, Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁸Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance, Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁹These authors contributed equally: Nicolas Cabanel, Guilhem Royer. ¹⁰These authors jointly supervised this work: Philippe Glaser, Isabelle Rosinski-Chupin.

 e-mail: isabelle.rosinski-chupin@pasteur.fr

In Western Europe, the class D enzyme OXA-48 is the most frequent carbapenemase in Enterobacteriales^{15–17}. This is generally attributed to the high conjugation rate of the IncI group pOXA-48 plasmids¹⁸. These 56–76 kb-long plasmids induce variable fitness costs to their hosts¹⁹. In addition, OXA-48 is also encoded on the chromosome^{15,20,21}, mainly in *E. coli* isolates of sequence type ST38, a major cause of extra-intestinal infections²². These ST38 isolates belong to disseminated clones with the *bla*_{OXA-48} gene embedded in a complete or partial composite transposon, Tn6237, that likely derives from a pOXA-48 plasmid.

The factors driving ARG integration into the chromosome are largely unknown. Here, to identify such factors and to decipher the biological mechanisms leading to the selection of ARG integration, we experimentally characterize the move of the carbapenemase *bla*_{OXA-48} gene from a pOXA-48 plasmid into the chromosome. We followed the integration of *bla*_{OXA-48} through experimental evolution and show that the emergence of ST38 lineages with integrated *bla*_{OXA-48} depends on the fitness cost imposed by pOXA-48 and on its elimination by a novel antiplasmid system.

Results

pOXA-48 plasmids induce a fitness cost and are unstable in ST38 *E. coli*

To set up an experimental model to study *bla*_{OXA-48} integration we used *E. coli* ST38 because of its evolutionary history characterized by pervasive ARG integrations^{23–26} in addition to its clinical relevance. We chose three ST38 isolates from water or sewage that did not carry *bla*_{OXA-48} (Supplementary Data 1) and transferred into these isolates three variants of the IncI pOXA-48 plasmid (pOXA-48_1, pOXA-48_2 and pOXA-48_3) by conjugation. The three isolates differed by their position in ST38 phylogenetic tree (Supplementary Information Supplementary Fig. 1). In particular, ST38-1 belonged to a branch of the tree also encompassing three sub-clades characterized by different *bla*_{OXA-48} chromosomal integrations¹⁵ (Supplementary Information Supplementary Fig. 1). It is closely related to one of these sub-clades, colored in blue on the tree, sharing the same H-and O-antigens (O2-H30). Plasmids were scarce in the three selected isolates. ST38_1 and ST38_3 contained only an IncFII and an IncFIC(FII) plasmid, respectively, whereas ST38_2 had no plasmid. Their complete genome sequence showed that, in ST38_1 and ST38_2, all ARGs were chromosomally inserted. In contrast, in ST38_3 most ARGs were carried by the IncFIC(FII) plasmid (Supplementary Data 1). We used as donor strains of the three pOXA-48 plasmids three clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *K. pneumoniae* is the most common pOXA-48 plasmid-bearing species found in hospitals²⁷. The three plasmids mainly differed by the presence and position of *IS1* generating or not a composite transposon, Tn6237 (Fig. 1a). This 21.5 kb transposon consists of two *IS1* bracketing *bla*_{OXA-48} and other plasmid genes. While this structure was present in pOXA-48_1, it was inactivated in pOXA-48_2 by a 6.8 kb-long deletion, including the *bla*_{OXA-48}-distant *IS1*. In pOXA-48_3, the 4.5 kb region including *bla*_{OXA-48} and the *bla*_{OXA-48}-proximal *IS1* was inverted, leaving *bla*_{OXA-48} outside the composite transposon (Fig. 1a). We first showed that the plasmid structure did not influence the meropenem minimum inhibitory concentration (MIC) of the transconjugant unlike the genetic background of the recipient strain with a higher MIC for ST38-1 transconjugants, 0.5 µg ml⁻¹, compared to 0.25 µg ml⁻¹ and 0.38 µg ml⁻¹ for ST38_2 and ST38_3 transconjugants respectively (Supplementary Information Supplementary Table 1).

To assess the fitness cost induced by pOXA-48 plasmids we compared the maximum growth rate of the transconjugants and isogenic plasmid-free strains. We estimated the relative fitness as the ratio of doubling time of transconjugants over plasmid-free strain. At least 15% doubling time increase was induced in lysogeny broth (LB) medium by pOXA-48 plasmids in ST38_1 (Fig. 1b). In contrast, in this medium, the three plasmids induced a lower (<5%) fitness cost in ST38_2 and ST38_3 (Fig. 1b). Fitness cost was dependent on the growth

medium as in M9 glucose minimal medium it rose up to 12% for ST38_2 transconjugants, while decreasing to 7–11% in ST38_1 transconjugants.

As pOXA-48 plasmids often conferred a fitness cost to their host, we quantified their stability in the three ST38 strains, following ten-day serial passages of the transconjugants (ca. 80 generations) in LB in the absence of antibiotic. The three pOXA-48 plasmids were gradually lost and at day 10, more than 95% of the population in ST38_1 and 40–80% in ST38_2 and ST38_3 had lost pOXA-48, irrespective of the plasmid variant (Fig. 1c).

Twenty-eight days of in vitro evolution led to frequent *bla*_{OXA-48} chromosomal integration in ST38_1

To determine whether the fitness of pOXA-48 transconjugants could be improved by plasmid-host coevolution, we first performed 28-day experimental evolutions of ST38_1/pOXA-48_1 transconjugants (Table 1). We hypothesized that this strain/plasmid combination might lead to chromosomal integration of *bla*_{OXA-48} and pOXA-48_1 loss. Indeed, ST38_1 was phylogenetically close to sub-clades with chromosomal *bla*_{OXA-48} (Supplementary Information Supplementary Fig. 1), the Tn6237 structure in pOXA-48_1 had the characteristics of a mobile composite transposon and pOXA-48_1 induced a high fitness cost in ST38_1. Given the instability of pOXA-48_1, the growth medium was supplemented with subinhibitory concentration (0.1 µg ml⁻¹) of meropenem every passage or every third passage (Table 1 and Supplementary Information Supplementary Table 2). The ST38_1 plasmid-free strain was evolved as control. Five independent lineages were derived for each condition. Experimental evolution led to a rapid growth rate improvement for all transconjugant lineages under both meropenem conditions (Fig. 2a). To characterize the populations, we first performed pool-sequencing after 7, 14, 21 and 28 days of evolution. We observed a progressive decrease in read coverage of the pOXA-48_1 DNA-region outside Tn6237 (Fig. 2b, Supplementary Information Supplementary Fig. 2), suggesting the enrichment of bacteria having lost pOXA-48_1 but keeping *bla*_{OXA-48}.

To further characterize putative transposition events of Tn6237, we PCR-screened meropenem-resistant colonies isolated at 28-day evolution for *bla*_{OXA-48} and plasmid origin of replication (*repA*). We identified *bla*_{OXA-48}⁺ *repA*⁺ colonies in all ST38_1/pOXA-48_1 lineages (Supplementary Data 2). Two to three of these colonies per lineage were whole-genome-sequenced (WGS). Variant analysis revealed *IS1* new junctions in the chromosome or in the ST38_1 IncFII plasmid. We verified by PCR and Sanger sequencing that these new junctions corresponded to Tn6237 transposition. In total, ten integrations at different positions in the chromosome and three in the IncFII plasmid were identified (Supplementary Data 3 and Fig. 2c). Analysis of pool sequencing reads revealed 44 additional new junctions, considering a threshold of 5% of the reads (Supplementary Data 4). Twenty were chosen for PCR analysis among which 16 were confirmed as Tn6237 integration. Integrations were detected already at seven days of evolution and multiple integrations at multiple positions on the chromosome and the IncFII plasmid were selected in each lineage after 28 days (Supplementary Data 4 and Fig. 2c).

To determine whether *bla*_{OXA-48} integration was associated with a fitness improvement, we selected three colonies, one in the chromosome and two in the IncFII plasmid. The growth rate of the three clones was increased with a 10–15% reduction in doubling time compared to the original transconjugant (Fig. 2d) and the meropenem MIC decreased by 50% (0.25 vs 0.5 µg ml⁻¹) (Supplementary Information Supplementary Table 1). Therefore, in ST38_1, *bla*_{OXA-48} integration appears as a major mechanism to relieve the fitness cost associated with pOXA-48_1 carriage.

*bla*_{OXA-48} integration depends on pOXA-48 structure and on recipient strain

To determine whether *bla*_{OXA-48} integration during experimental evolution was dependent on the presence of Tn6237, we then evolved

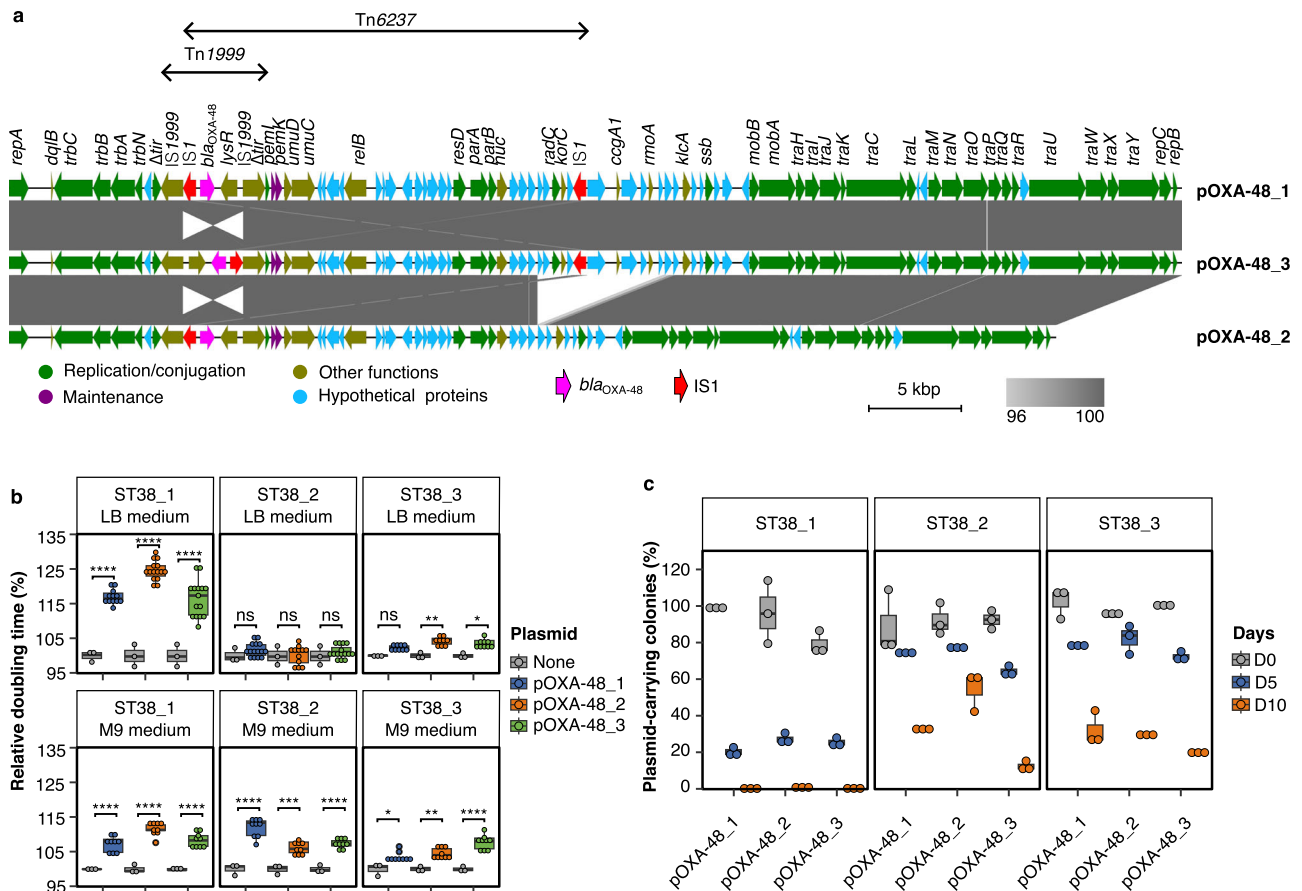


Fig. 1 | pOXA-48 plasmids induce variable fitness costs and are unstable in three ST38 strains. Three different variants of pOXA-48 were introduced from three *K. pneumoniae* isolates into three ST38 *E. coli* strains. **a** Alignment of the three pOXA-48 plasmids used in the study and displayed with Easyfig⁵⁹. ISIs are indicated in red and the *bla*_{OXA-48} gene is in pink. The two composite transposons are indicated by double headed arrows. Tn6237 carrying *bla*_{OXA-48} is only present in the pOXA-48_1 variant. Percentages of nucleotide identities are indicated by a gray gradient as indicated in the Figure key. **b** Comparison of the relative doubling time of plasmid-free strains and transconjugants calculated at exponential phase in the absence of meropenem in LB or M9 glucose minimum media. For each strain/plasmid combination, three to five transconjugants were tested. For each transconjugant, three independent experiments were performed. The relative doubling time is the ratio to the doubling time of the plasmid-free strain. **c** Plasmid loss during serial passages in the absence of meropenem. The ratio of plasmid-carrying colonies over the whole population at days 0, 5 and 10 was quantified by using the number of colonies growing on meropenem containing plates as a proxy for the number of

plasmid-carrying colonies. The results are from three biologically independent experiments. For boxplots in **(b)** and **(c)**, the median is indicated by the line, the box bounds the 25th and 75th quartiles and whiskers bound the minimum and maximum values excluding outliers. Outliers are values > 1.5 × interquartile range. For **(b)**, normal distribution of data was assessed with Shapiro-Wilk normality test. Statistical analysis was performed with pairwise two sample two-sided t-test and *p*-values were FDR-adjusted. Upper panel: Plasmid-free strains: *n* = 3; ST38_1 transconjugants: for pOXA-48_1: *n* = 12; for pOXA-48_2 and pOXA-48_3 *n* = 15; *****p* < 0.0001, *p* = 1.58e-22, 3.71e-39, 2.35e-22 (from left to right); ST38_2 transconjugants *n* = 15 for each plasmid; ns: no significant difference; ST38_3 transconjugants: *n* = 9 for each plasmid; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, *p* = 9.97e-3, 2.9e-2 (from left to right). Lower panel: Plasmid-free strains: *n* = 3; for each strain/plasmid combination: *n* = 9; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001, *p* = 1.02e-5, 1.05e-11, 4.72e-7, 1.85e-12, 2.34e-4, 9.27e-6, 2.9e-2, 8.67e-3, 4.12e-6 (from left to right). Source data are provided as a Source Data File.

ST38_1 transconjugants carrying plasmids pOXA-48_1, pOXA-48_2 or pOXA-48_3 in LB with meropenem added every third passage (Table 1). In contrast to pOXA-48_1, no fitness improvement throughout time was observed for pOXA-48_2, while the fitness of the population was slightly improved for pOXA-48_3 transconjugants at 28-day evolution (Fig. 3a). Bulk DNA sequencing of the whole populations at day 21 and at day 28 revealed after 28-day evolution only a relative decrease in read-coverage of the pOXA-48_3 region equivalent to the one lost in pOXA-48_1 (Supplementary Information Supplementary Fig. 3a, b) and a few new IS1 junctions. Two Tn6237 integrations in the chromosome were confirmed by PCR, suggesting the reconstitution of Tn6237 in pOXA-48_3 (Supplementary Data 4). This showed that *bla*_{OXA-48} integration was dependent on its inclusion in Tn6237.

To determine whether the result of the experimental evolution was dependent on the ST38_1/pOXA-48_1 combination, we performed similar experimental evolution of ST38_2/pOXA-48_1 and ST38_3/pOXA-48_1 transconjugants (Table 1). For both experiments, we added

meropenem every third passage in LB. For ST38_2/pOXA-48_1 we also checked that a daily addition had no influence on the final result. In all cases, no evolution of the fitness was observed (Fig. 3b) while PCR-screening of meropenem-resistant colonies at 28-day did not identify any *bla*_{OXA-48}⁺ *repA*⁻ colonies (Supplementary Data 2). This suggested that in the absence of a sufficient fitness cost, *bla*_{OXA-48} integrations were not enriched enough to be detected. To test this hypothesis, we performed a similar experiment in minimal medium in which pOXA-48_1 induced a higher fitness cost to the ST38_2 transconjugants (Fig. 1b). A rapid improvement of growth rate was observed (Fig. 3c). We detected a few *bla*_{OXA-48}⁺ *repA*⁻ colonies, associated with a Tn6237 chromosomal integration, in only two of the five evolved lineages by PCR screening (Supplementary Data 2 and Supplementary Data 3). These colonies showed a full fitness recovery (Supplementary Information Supplementary Fig. 3c). Pool sequencing did not reveal any integration site at a frequency superior to 5%, nor a significant plasmid loss (Supplementary Information Supplementary Fig. 3d). Therefore,

Table 1 | Experimental scheme of the different evolution experiments

ST38 <i>E. coli</i> recipient strain	^{ab} Plasmid	Medium	MEM addition
Experimental evolution 1 (Fig. 2): Evolution with high fitness cost induced by pOXA-48 and blaOXA-48 in Tn6237			
ST38_1	-	LB medium	No MEM
ST38_1	pOXA-48_1	LB medium	MEM / day
ST38_1	pOXA-48_1	LB medium	MEM / 3 days
Experimental evolution 2 (Fig. 3): Role of plasmid structure			
ST38_1	-	LB medium	No MEM
ST38_1	pOXA-48_1	LB medium	MEM / 3 days
ST38_1	pOXA-48_2	LB medium	MEM / 3 days
ST38_1	pOXA-48_3	LB medium	MEM / 3 days
Experimental evolution 3 (Fig. 3): Evolution with low pOXA-48 induced fitness cost			
ST38_2	-	LB medium	No MEM
ST38_2	pOXA-48_1	LB medium	MEM / day
ST38_2	pOXA-48_1	LB medium	MEM / 3 days
ST38_3	-	LB medium	No MEM
ST38_3	pOXA-48_1	LB medium	MEM / 3 days
Experimental evolution 4 (Fig. 3): Evolution with intermediate pOXA-48 induced fitness cost			
ST38_2	-	M9 medium	No MEM
ST38_2	pOXA-48_1	M9 medium	MEM / 3 days
Experimental evolution 5 (Fig. 6): Evolution in the absence of pOXA-48 destabilization by ApsAB			
ST38_1	-	LB medium	No MEM
ST38_1ΔapsAB	pOXA-48_1	LB medium	MEM / 3 days

^aMaps of the three pOXA-48 plasmids are shown in Fig. 1a.

^bpOXA-48 plasmid were introduced by conjugation. A dash indicated the recipient strain with no pOXA-48 plasmid.

chromosomal integration and plasmid loss were not the main contributors to the fitness recovery observed in ST38_2 transconjugants, in contrast to ST38_1 transconjugants.

pOXA-48 plasmids are stabilized by inactivation or mutation of a novel antiplasmid system

In all evolved lineages, including those where Tn6237 transposition was selected, bacteria still retaining the plasmid could be found after 28-day evolution. To identify other possible paths for plasmid-host coadaptation, we performed WGS of three to five *bla*_{OXA-48}⁺ *repA*⁺ colonies of each evolved lineage. We identified sporadic mutations occurring in the three ST38 evolved transconjugants and control plasmid-free strains, including only nine in different loci of pOXA-48 (eight in pOXA-48_1 and one in pOXA-48_2) (Supplementary Data 5). Mutations potentially decreasing susceptibility to carbapenems (in *ompC* or *envZ* for instance) were encountered. Large chromosomal deletions ranging from 15 to 40 kb and encompassing *mutS* and *rpoS* were also observed in evolved ST38_1 lineages. They were independent on pOXA-48 presence and meropenem addition, as they also occurred in control experiments. *mutS* loss led to a large number of mutations ($n = 13$ to 38) likely resulting from an hypermutator phenotype. On the other hand, in 62% (86/138) of evolved transconjugants, we observed convergent evolution with mutations in two adjacent genes, F3141 or F3140, located in a ST38_1 genomic island (Fig. 4a) or its ortholog in ST38_2 (Supplementary Data 6). The most frequent mutations were IS1 insertions ($n = 67$ with 37 different insertion sites). We also detected insertions of other IS ($n = 3$), non-synonymous ($n = 3$, two different), non-sense ($n = 2$), or frameshift ($n = 7$, four different) mutations and

complete or partial deletions ($n = 4$) of these genes (Supplementary Data 6). All (15/15) sequenced *bla*_{OXA-48}⁺ *repA*⁺ colonies from the M9-evolved ST38_2/pOXA-48_1 transconjugants carried mutations in orthologs of F3141 or F3140 and all ($n = 30$) from the five LB-evolved lineages shared the same IS1 insertion in F3140 suggesting that it was present but not detectable in sequencing reads of the initial culture (Supplementary Data 6). No mutation in F3141-F3140 orthologs was detected in ST38_3/pOXA-48_1 transconjugants evolved in LB.

In ST38_1, six out of the ten tested mutations led to a fitness improvement compared to the original transconjugant, which was variable and always lower than following *bla*_{OXA-48} integration and pOXA-48_1 loss (Fig. 4b). In ST38_2 the six tested mutations in F3141-F3140 orthologs led, in M9, to a full fitness recovery (Fig. 4b). Three ST38_1 and three ST38_2 evolved transconjugants mutated in F3140 or in F3141 were tested for pOXA-48_1 plasmid stability by 10-day serial passages in the absence of meropenem (Fig. 4c). In all tested transconjugants an increase in plasmid persistence was observed compared to the original transconjugant (Fig. 4c). pOXA-48_1 was kept in more than 90% of ST38-2 mutated transconjugants. In ST38-1 the stability was more variable with 50 to 100% bacteria keeping pOXA-48_1.

Conjugation of the pOXA-48 plasmids to genetically modified derivatives of ST38_1 and ST38_3 deleted for F3141-F3140 confirmed the stabilization of the plasmid in the absence of F3141-F3140 (Fig. 4d). Of note, ST38_2 was not amenable to genetic manipulation under the conditions we used. Furthermore, complementation in ST38_1ΔF3141-F3140 strain with a pHV7-derivative plasmid expressing F3141-F3140 under the control of the arabinose inducible promoter led to more than 80% loss of any of the three pOXA-48 plasmids at 48 h following induction (Fig. 4e). Induced expression of the operon with a non-sense mutation in either F3141 or in F3140 did not destabilize pOXA-48_1 confirming that the two proteins were needed for plasmid loss (Fig. 4f).

To determine whether F3141-F3140 might be involved in a more global antiplasmid activity, we compared the stability of five plasmids with different replication origins and copy numbers. In addition to the IncL pOXA-48 plasmids, F3141-F3140 deletion increased the stability of p15A, ColE1 and pMB1-type plasmids, but had no effect on pSC101 and IncFII/IncFIB plasmid stability (Fig. 5a). This confirmed that F3141-F3140 corresponds to a novel antiplasmid defense system that we renamed *apsAB* for antiplasmid system AB.

We found that ApsAB also reduces the conjugation frequency of the three pOXA-48 plasmids while comparing the transfer frequency with ST38_1 wild type or ST38_1ΔapsAB as recipient strains (Fig. 5b). This suggests that ApsAB interferes with foreign DNA acquisition. However, ApsAB did not affect the transformation frequency of p15A and ColE1 plasmids (Fig. 5c). As some antiplasmid systems are also involved in antiphage defense, we tested the activity of ApsAB chromosomally expressed in MG1655 against eight different phages from *E. coli* (lambda, T4, P1, 186clts, CLB_P2, LF82_P8, T5 and T7)²⁸ and did not observe any antiphage activity (Supplementary Information Supplementary Fig. 4).

Finally, to determine whether ApsAB actively eliminates plasmids, we quantified the persistence of a ColE1 plasmid over time following the induction of *apsAB* expression from a chromosomally integrated copy. Plasmid elimination was observed from between 2h30 and 3 h of arabinose induction and was almost complete (> 95%) by a six-hour induction, whether or not chloramphenicol was added at 2h30 to stop cell division. These results indicate that ApsAB actively eliminates the plasmid, likely by promoting its degradation (Fig. 5d).

ApsAB defense system is necessary for the selection of *bla*_{OXA-48} integration

We hypothesized that the elimination of pOXA-48 plasmids by ApsAB could contribute to the emergence of lineages with *bla*_{OXA-48} inserted in the chromosome. To test this hypothesis, we deleted the *apsAB* operon in the original ST38_1/pOXA-48_1 transconjugant, which has

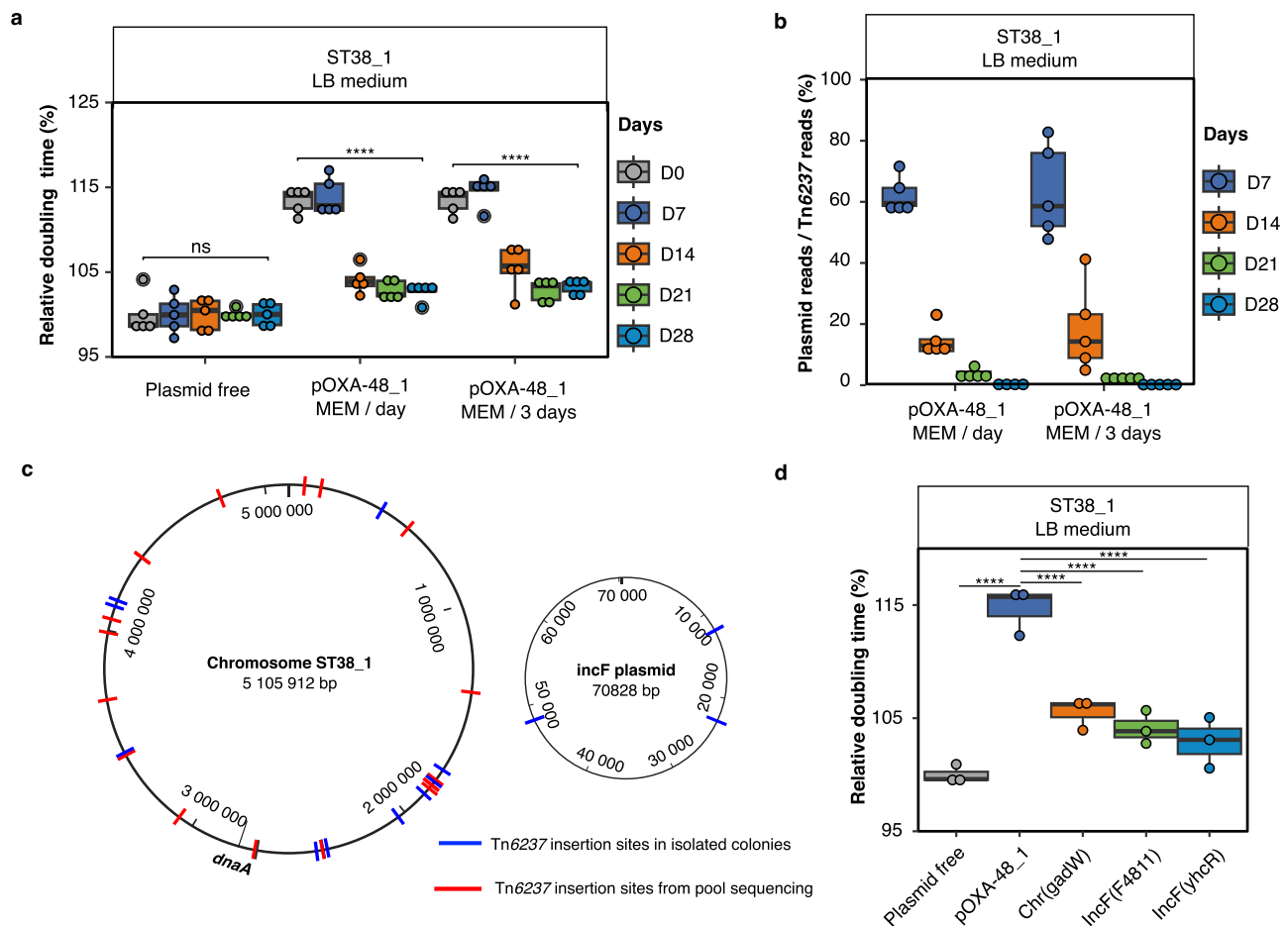


Fig. 2 | Experimental evolution of pOXA-48_1 transconjugants selects Tn6237 transposition and pOXA-48 loss in ST38_1. Experimental evolution was performed by 28-day passages of ST38_1/pOXA-48_1 transconjugants or of the ST38_1 parental strain in LB. For transconjugants, meropenem was added every day (MEM/day) or every three days (MEM/3 days) in cultures at subinhibitory concentration. For each condition five lineages were evolved in parallel. **a** Evolution of the relative doubling time of ST38_1/pOXA-48_1 transconjugant population and of the parental strain as control. **b** Quantification of plasmid loss by WGS of whole populations for the evolved lineages in the two experimental conditions. Plasmid loss was estimated by calculating the ratio of the number of reads on three pOXA-48 regions of same size, two outside Tn6237 and one inside (see also Supplementary Fig. 2). **c** Tn6237-insertion-sites identified in the evolved lineages. **d** Comparison of the relative doubling time of the original transconjugant and three *bla*_{OXA-48} integrants (Tn6237 integrated in the chromosome at *gadW* and at two positions in the IncFI endogenous plasmid. The integrant at *gadW* had an additional mutation in *malT*

frequently present in transconjugant and control evolved colonies. Chr: chromosome). In (a), (b) and (d), boxplots show median, box bounds 25th and 75th quartiles, whisker bounds minimum and maximum excluding outliers and outliers are values > 1.5 × interquartile range. For (a) and (b), the results are from five independent evolved lineages, for (d) they are from three biologically independent experiments. Doubling times were determined during exponential growth phase in the absence of meropenem. The relative doubling time was calculated as the ratio of the doubling time to one of the evolved plasmid-free lineages collected on the same day in (a) or to the plasmid-free strain in (d). Normal distribution of data was assessed with Shapiro-Wilk normality test. Statistical analysis was performed with pairwise two sample two-sided t-test and *p*-values (Source Data) were FDR-adjusted. ns: no significant difference; *****p* < 0.0001. a: *p* = 9.28e-22 and 3.5e-20; d: *p* = 1.4e-08, 3.5e-06, 6.4e-07 and 2e-07 (from left to right). Source data are provided as a Source Data File.

the capacity to rapidly evolve towards Tn6237 integration. No significant difference in fitness was detected between the deleted strain and the original transconjugant (Fig. 6a). As expected, *apsAB* deletion led to pOXA-48_1 stabilization (Fig. 6b). We then performed experimental evolution in LB medium of five lineages of ST38_1Δ*apsAB*/pOXA-48_1 (Table 1). Contrary to the original ST38_1/pOXA-48_1 (Fig. 2a), no fitness recovery was detected after 28 days of evolution of ST38_1Δ*apsAB*/pOXA-48_1 (Fig. 6c). No *bla*_{OXA-48}⁺ *repA*⁺ colonies out of 120 tested colonies at day 28 was detected by PCR screening. Similarly, pool sequencing of the whole population at days 7, 14, 21, and 28 showed no loss of pOXA-48_1 plasmid by analyzing plasmid read-coverage and no Tn6237 transposition based on the PCR testing of the few new ISI junctions (*n* = 4) (Fig. 6d). Our results, therefore, show that plasmid destabilization through the activity of ApsAB is a key factor in the emergence of lineages with chromosomally integrated *bla*_{OXA-48}.

ApsAB is the first characterized member of a broad family of Argonaute-like systems

Sequence similarity search against the NCBI nr public database by BLASTP revealed positive matches of ApsA and ApsB only with proteins of unknown function. Nevertheless, using similarity search based on structure predictions, we predicted in ApsA a central helicase domain with conserved residues characteristic of superfamily 2 helicase²⁹ and a C-terminal domain containing a PD-(D/E)XK-superfamily nuclease motif³⁰ (Fig. 7a). Directed mutagenesis showed that substitutions predicted to impair ATP hydrolysis (E533A) and helicase activity (K221A) completely abolished pOXA-48 plasmids destabilization while a mutation in the predicted nuclease active site (K1435A) had a partial effect (Fig. 7b and Supplementary Information Supplementary Fig. 5). On the other hand, structural modeling of ApsB revealed a loose structural similarity with prokaryotic Argonaute proteins (pAgos) acting as nucleic acid-guided endonucleases. However, ApsB lacked

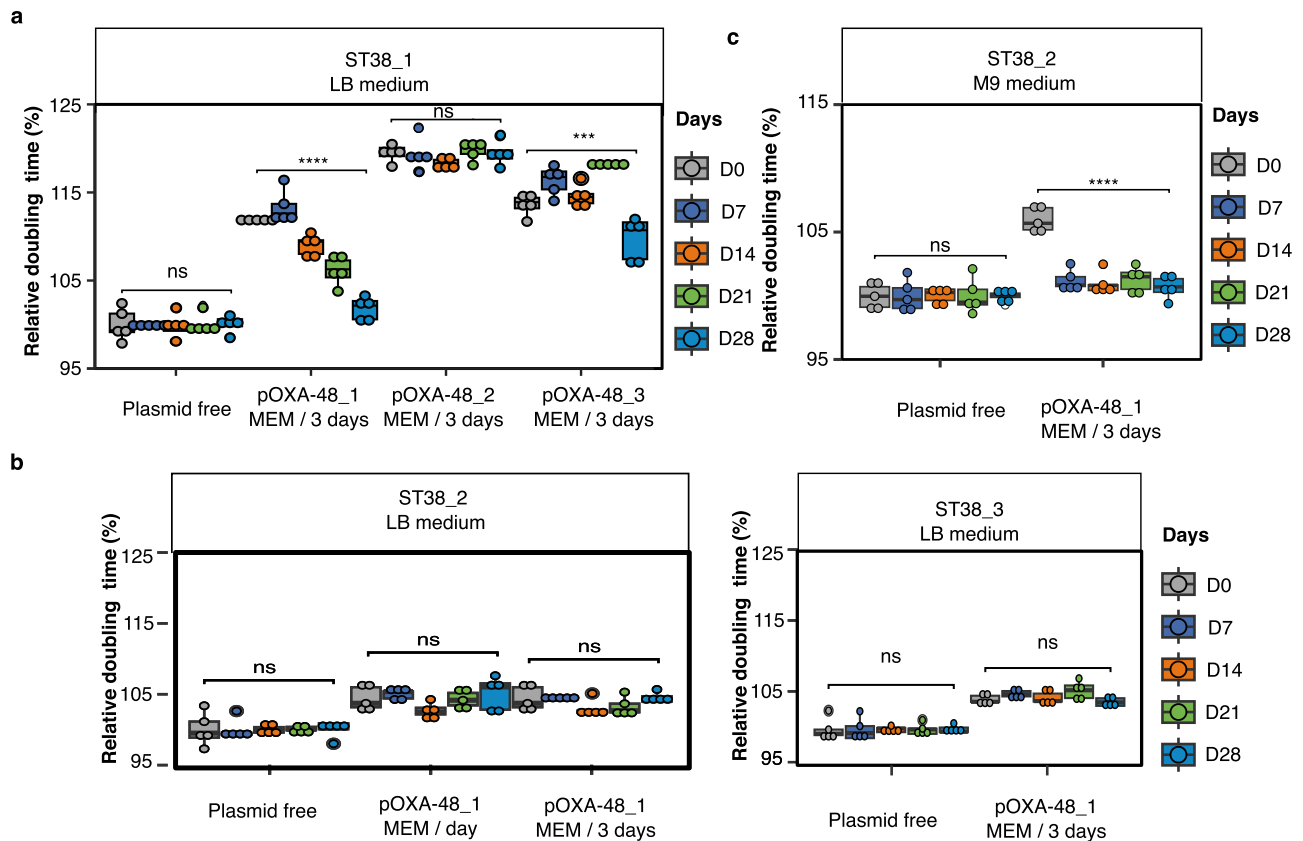


Fig. 3 | Experimental evolution of pOXA-48 transconjugants depends on plasmid structure and plasmid-induced fitness cost. Experimental evolution was performed by 28-day passages of transconjugants from the three ST38 *E. coli* strains in LB or in M9 minimal medium. For evolution of the transconjugants, meropenem was added every day (MEM/day) or every three days (MEM/3 days) in cultures at subinhibitory concentration. For each condition five lineages were evolved in parallel. **a** Evolution of the relative doubling time of ST38_1 pOXA-48_1, pOXA-48_2 or pOXA-48_3 transconjugant populations in the presence of meropenem at subinhibitory concentration and of the parental strain. **b** Evolution of the relative doubling time from ST38_2 and ST38_3 pOXA-48_1 transconjugants in the presence of meropenem at subinhibitory concentration. **c** Evolution of the relative doubling time of ST38_2 pOXA-48_1 transconjugants in M9 medium in the

presence of meropenem at subinhibitory concentration. For **(a)**, **(b)** and **(c)**, doubling times were determined during exponential growth phase in the absence of meropenem. The relative doubling time was calculated as the ratio of the doubling time to one of the evolved plasmid-free lineages collected on the same day. Box-plots show median, box bounds 25th and 75th quartiles, whisker bounds minimum and maximum excluding outliers and outliers are values $> 1.5 \times$ interquartile range. For **a**, **b** and **c**, the results are from five independent evolved lineages. Normal distribution of data was assessed with Shapiro-Wilk normality test. Statistical analysis was performed with pairwise two sample two-sided t-test and *p*-values (Source Data) were FDR-adjusted. ns: no significant difference; ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001. **a**: *p* = 3.51e-19, *p* = 1.7e-04 (from left to right); **c**: *p* = 8.17e-10. Source data are provided as a Source Data File.

typical PIWI and PAZ domains characteristic of Argonautes and was not identified among pAgos³¹ (Fig. 7c). Sequence alignment of ApsB homologs retrieved from the NCBI database identified a conserved Y[X]₃K[X]_nQ[X]_nK motif (Fig. 7d, Supplementary Information Supplementary Fig. 6 and Supplementary Data 7), reminiscent of the conserved residues Y[X]₃K[X]_nQ[X]_nK characteristic of the MID domain of long-B pAgos that interacts with the 5'-end of guide nucleic acids³². The K413A substitution in this motif completely abolished pOXA-48 plasmid destabilization, supporting the requirement of this motif for ApsAB antiplasmid activity (Fig. 7b).

The association of an Argonaute-like protein and a protein with helicase and nuclease domains was reminiscent of the DdmDE plasmid defense system recently characterized in *Vibrio cholerae*¹³. No sequence similarity could be found between ApsB and DdmE. Their predicted 3D structures were different (Root-Mean-Square Deviation of atomic positions (RMSD) = 30.6) and DdmE did not contain the MID-like motif. However, searching for ApsA homologs by PSI-BLAST in databases unveiled a wide family of proteins ranging from ApsA-like to DdmD-like proteins. (Fig. 8a, Supplementary Data 8).

We identified ApsAB-like systems mainly among Enterobacterales but also in other gamma-proteobacteria and some beta-proteobacteria

and cyanobacteria (Fig. 8a and Supplementary Data 7, 8). In *E. coli*, complete or partially deleted *apsAB* homologs were located in at least three different families of genomic islands, some of them encoding other defense systems like Shango systems (Fig. 8b). We evaluated the antiplasmid activity of two representatives of *E. coli* ApsAB-like systems, showing 92/92 % or 28/25 % protein sequence identity with ST38_1 ApsA/ApsB respectively. Both systems were found to destabilize a ColE1 multicopy plasmid (Fig. 8c), indicating that the antiplasmid activity is not restricted to ApsAB from ST38 strains.

Discussion

Mathematical modeling predicts that selective pressures, such as those exerted on bacteria during antibiotic treatment, will promote the integration of beneficial plasmid genes into the chromosome⁵. In this study, by investigating chromosomal integrations of *bla*_{OXA-48}, we demonstrate that, in addition to the selective advantage and a genetic structure promoting the mobility of the ARG, integration also depends upon a bacterial host antiplasmid system (ApsAB), here discovered. ApsAB influences plasmid-induced fitness cost and plasmid persistence. It belongs to a large family widespread across bacterial species ranging from cyanobacteria to Enterobacterales (Fig. 8a, Supplementary Data 7, 8).

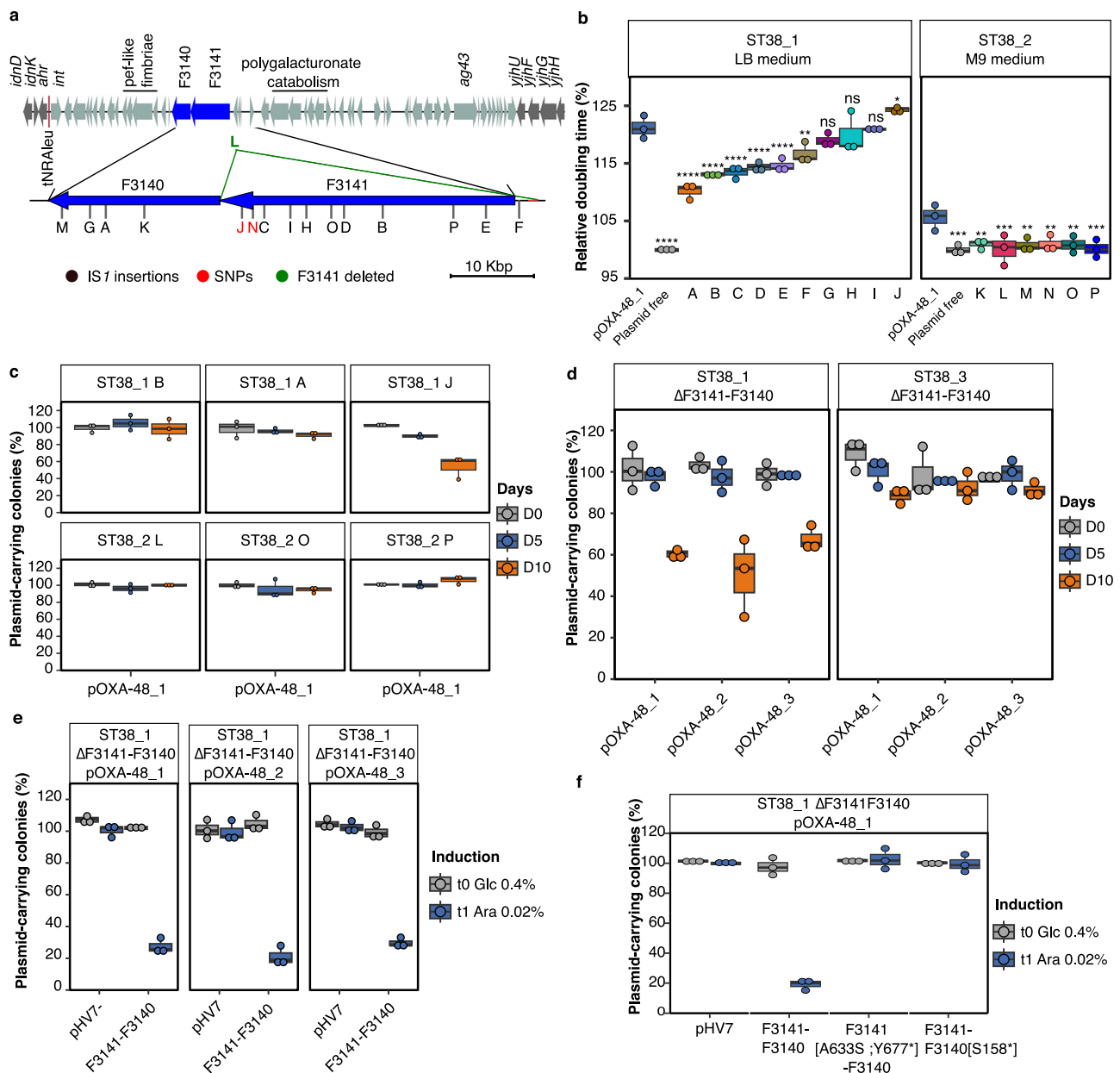


Fig. 4 | Mutations in the F3141-F3140 operon led to pOXA-48 stabilization.

a Organization of the genomic island containing the F3141-F3140 operon. The organization of the genomic island and its insertion at tRNA-leu is identical for the three ST38 strains. Positions of the mutations of the analyzed mutants named by letters are indicated by vertical dash. In black, IS1 insertion, in green, a deletion of F3141 and in red, SNPs (strain J, L1444* and strain N, V1425W). **b** Doubling time comparison of ten F3141-F3140 mutant strains as indicated in (a) and of the original transconjugant. Doubling times were determined during exponential growth phase in the absence of meropenem in LB medium for ST38_1 strain and in M9 medium for ST38_2. The relative doubling time is calculated as the ratio to the doubling time of the plasmid-free strain. **c, d, e** and **f**. pOXA-48 stability in F3141-F3140 mutants after 10-day passages in LB medium in the absence of meropenem. **c** pOXA-48_1 stability in three ST38_1 and three ST38_2 mutants. Letters define the mutant strain as in (a) and (b). **d** Quantification of the carriage of the three pOXA-48 plasmids in ST38_1 and ST38_3 transconjugants deleted for the F3141-F3140 operon. and **f**. Quantification of pOXA-48 plasmids carriage following complementation of F3141-F3140

operon deletion. A plasmid copy of the complete F3141-F3140 operon (**e**) or of the operon inactivated for F3141 or F3140 (**f**) was expressed under the control of the p_{BAD} inducible promoter in ST38_1ΔF3141-F3140 transconjugant. t0 refers to the value obtained following one 24-h passage in LB glucose (0.4%) and t1 to the value determined after two additional passages in LB arabinose (0.02%). pHV7-empty is used as negative control. For **a, b, c** and **d**, boxplots show median, box bounds 25th and 75th quartiles, whiskers bound minimum and maximum values excluding outliers and outliers are values > 1.5 × interquartile range. For **a, b, c** and **d**, the results are from three biologically independent experiments. For **b**, normal distribution of data was assessed with Shapiro-Wilk normality test. Statistical analysis was performed with pairwise two sample two-sided t-test and *p*-values (Source Data) were FDR-adjusted. ns no significant difference; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001. b: LB medium: *p* = 3.12–18, 2.03e-09, 1.5e-6, 3.2e-6, 2.10e-5, 3.73e-5, 1.86e-3, 3.19e-2 (from left to right); M9 medium: *p* = 2.95e-4, 1.43e-03, 3.24e-4, 1.19e-3, 1.58e-3, 1.35e-3, 3.59e-4 (from left to right). Source data are provided as a Source Data File.

To investigate the factors involved in *bla*_{OXA-48} gene integration into another replicon, we performed experimental evolutions of pOXA-48s transconjugants of three *E. coli* ST38 strains. Sub-inhibitory concentration of carbapenem was added every passage or

every three passages, leading to alternate selection for growth and for resistance (Table 1). Rapidly, for one of the five strain/plasmid pairs tested (ST38_1/pOXA48_1), *bla*_{OXA-48} integrated lineages emerged and became dominant at day 28 (Fig. 2b). Tn6237

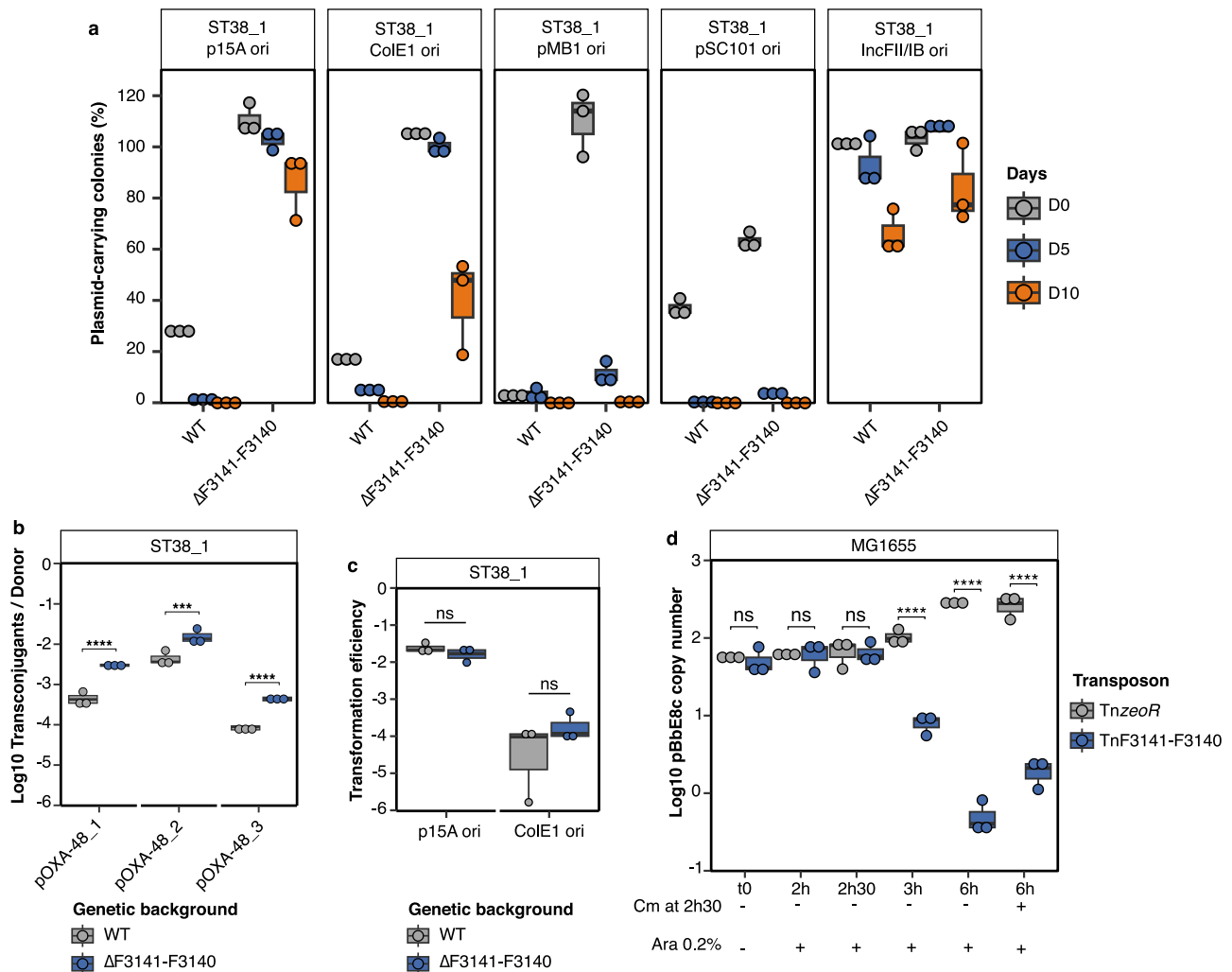


Fig. 5 | F3141-F3140 (ApsAB) acts as an antiplasmid system active against low and high copy number plasmids. **a** Activity of F3141-F3140 against non-IncL plasmids with different replicons and copy numbers: pACYt: p15A ori, ca. 10 copies; pBbE8c: ColE1 ori, ca. 20–30 copies; pUC19: pMB1 ori, >100 copies; pBbS8c: pSC101 ori, ca. 5 copies. CNRI46C9-pKCP: incFII/IncFIB, ca. 1–2 copies **b** Comparison of pOXA-48 conjugation frequency between ST38_1 WT (wild type) and ST38_1ΔF3141-F3140. **c** Comparison of transformation efficiency into ST38_1 WT and ST38_1ΔF3141-F3140 by using electroporation of pACYt and pBbE8c **d** Quantification of the ColE1 derivative pBbE8c following induction of the F3141-F3140 operon cloned under the pBAD promoter and inserted into MG1655 *E. coli* chromosome (TnF3141-F3140). Tn_{zeoR} used as control, corresponds to the empty transposon and only carries the zeocin resistance gene. The plasmid copy number was determined on DNA

preparations by qPCR by using the Δ Ct method with primers in pBbE8c replication origin and *rpsL* (chromosomal gene) as reference gene (Supplementary Data 9). For **a**, **b**, **c** and **d**, boxplots show median, box bounds 25th and 75th quartiles, whisker bounds minimum and maximum excluding outliers and outliers are values $>1.5 \times$ interquartile range. For **a**, **b**, **c**, and **d**, the results are from three biologically independent experiments. For **b**, **c** and **d**, normal distribution of data was assessed with Shapiro-Wilk normality test. Statistical analysis was performed with Log₁₀-transformed data by using a pairwise two-sample two-sided t-test and *p*-values (Source Data) were FDR-adjusted. ns no significant difference; ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001. b: *p* = 0.0000198, 0.000648, 0.0000556 (from left to right). d: *p* = 4.15e-9, 4.96e-17, 8.47e-15 (from left to right). Source data are provided as a Source Data File.

transposition from pOXA-48_1 appears as particularly efficient to move *bla*_{OXA-48} into the chromosome or the resident F-plasmid, as in each evolved lineage multiple integration events were selected. *bla*_{OXA-48} chromosomal integration was also observed with pOXA-48_3, but at late time points. These integration events were also due to Tn6237 transposition. We hypothesize that the Tn6237 structure has been reconstituted following homologous recombination between the two IS1999 copies surrounding *bla*_{OXA-48} and the *bla*_{OXA-48} proximal IS1 (Fig. 1a). Altogether the experimental evolution successfully reproduced *bla*_{OXA-48} integrations observed in worldwide disseminated ST38 clinical lineages^{20,21}. Our results show that low doses of carbapenem, such as those encountered in the gut during parenteral administration of carbapenems³³, might have contributed to the emergence of *bla*_{OXA-48} chromosomally integrated lineages.

In addition to *bla*_{OXA-48} integration by transposition, we observed during experimental evolution convergent mutations (mainly inactivation) of the *apsAB* operon. ApsAB increases the fitness cost of pOXA-48 plasmids in ST38 transconjugants and destabilizes these plasmids (Fig. 4b, c). In experiments with ST38_1, the fitness gain linked to *bla*_{OXA-48} integration and plasmid loss was high and lineages with *bla*_{OXA-48} integration emerged rapidly. This was not the case with ST38_2 where both events led to equivalent fitness gain. This probably explains why *apsAB* inactivation events were generally selected at the expense of *bla*_{OXA-48} chromosomal integration in this strain. More specifically, we showed that pOXA-48 plasmids destabilization was needed for the selection of *bla*_{OXA-48} integration (Fig. 6d). *apsAB* location, embedded in a genomic island, and its distribution among ST38 isolates (Supplementary Information Supplementary Fig. 1) suggested that it has been horizontally acquired. This represents a typical

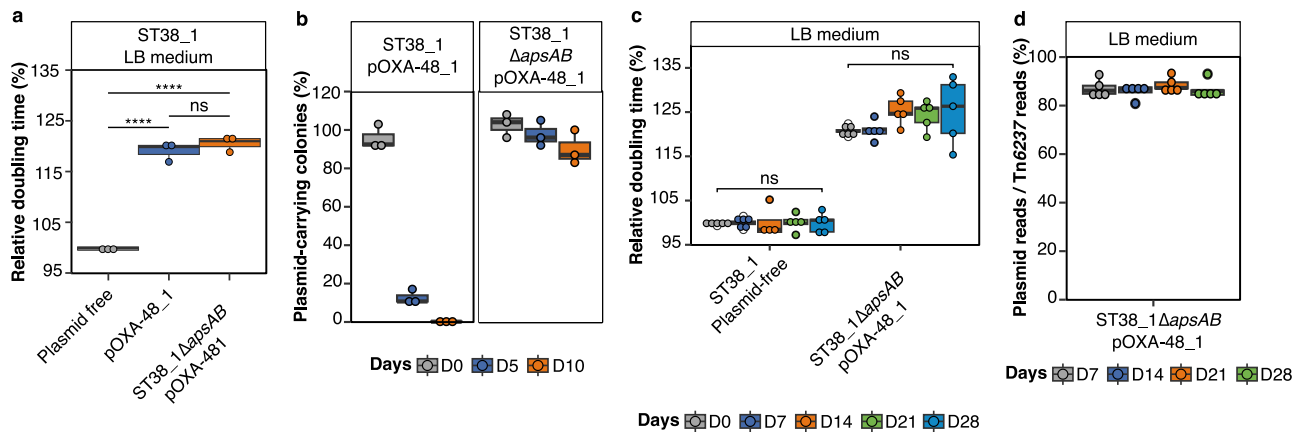


Fig. 6 | *bla*_{OXA-48} integration and pOXA-48_1 loss require the *apsAB* operon. **a** Comparison of the relative doubling time between the original transconjugant and ST38_1Δ*apsAB* transconjugant **b** Quantification of plasmid carrying strains after *apsAB* deletion in the original transconjugant. **c** Evolution of the relative doubling time of ST38_1Δ*apsAB* transconjugant whole population and of the parental strain. **d** Quantification of plasmid loss by whole genome sequencing of whole populations (also see Supplementary Fig. 2). Plasmid loss was estimated by calculating the ratio of the number of reads on two pOXA-48 regions of same size, one outside Tn6237 and one inside. Doubling times in (a) and (c) were determined during the exponential growth phase in the absence of meropenem. The relative doubling time is calculated as the ratio to the doubling time of one of the evolved plasmid-

free lineages from the same day for (c) or to the plasmid-free strain in (a). For **a**, **b**, **c** and **d**, boxplots show median, box bounds 25th and 75th quartiles, whisker bounds minimum and maximum excluding outliers and outliers are values > 1.5 × interquartile range. The results are from three biologically independent experiments (a and b) and five independent evolved lineages (c and d). Normal distribution of data was assessed with Shapiro-Wilk normality test. Statistical analysis was performed with Log10-transformed data by using a pairwise two-sample two-sided t-test and *p*-values (Source data) were FDR-adjusted. ns no significant difference. *****p* < 0.0001. a: *p* = 0.00000584, 0.00000584 (from left to right). Source data are provided as a Source Data File.

case of MGE negative interactions between a genomic island and plasmids^{34,35}. *apsAB* was present in the three strains of the study and was associated to a low stability of the three pOXA-48 plasmids. However, while *apsAB* was frequently inactivated in colonies that retained pOXA-48 in ST38_1 and ST38_2, we did not detect inactivation events in ST38_3, suggesting that conservation of *apsAB* might be positively selected for an unknown reason in this genetic background. Nevertheless, *apsAB* deletion in this strain led to a stabilization of pOXA-48 plasmids (Fig. 4d). In addition to ApsAB, nine to eleven other defense systems were predicted in the three strains (Supplementary Data 1). None was specific to ST38_1 and we did not detect any mutation in these systems during experimental evolutions. Therefore, they probably did not influence the evolution results. *apsAB* is present in the four ST38 clinical lineages in which *bla*_{OXA-48} is integrated in the chromosome (Supplementary Information Supplementary Fig. 1)¹⁵ and has likely driven the integration event leading to their dissemination. However, as ARGs integrated in the genome are frequently being reported in resistant *E. coli* and *apsAB* homologs only found in a subset of strains, other plasmid destabilizing systems are probably to be involved. Alternatively, in the absence of an active antiplasmid system, the mobilization to the chromosome might be much less frequently selected.

In recent years, a plethora of bacterial defense systems have been discovered. But, only a few of them, such as CRISPR, restriction-modification, pAgos, DdmDE and Wadjet were described to have antiplasmid activity^{13,36,37}. By combining different in silico search strategies, we uncovered a broad family of ApsA homologs that combine helicase and nuclease domains. Strikingly, this family was subdivided into two classes associated with two families of argonaute-like proteins, whose prototypes were ApsB and the recently described DdmE¹³. We therefore connected DdmDE- to ApsAB-like systems. However, unique to ApsB-like proteins is the conservation of a MID-like domain of long pAgos, which we showed to be essential for its activity. This suggests that ApsB is involved in a guide-dependent recognition of the target, ApsA bringing the nuclease activity, similarly to what has recently been described for a group of catalytically inactive long true pAgos³⁸. While these Argonaute systems confer immunity also via

abortive infection³⁸, we do not have evidence that ApsAB kills plasmid invaded cells. Despite the absence of similarity between DdmE and ApsB, both DdmDE and ApsAB share an antiplasmid activity, like a second *E. coli* system, only 28/25% similar to ST38 ApsAB (Fig. 8c). This suggests that the compendium of systems we brought out represents a new diverse family of defense systems acting on plasmids. Their precise functional mechanisms, in particular the nature and specificity of the guides, remain to be characterized. These systems might also provide new tools for genomic engineering and plasmid curing, including those carrying ARGs.

To our knowledge, we provide the first evidence of an antiplasmid defense system influencing the evolutionary fate of an antibiotic resistance gene. Conversely, during our analysis of *apsAB* homologs, we retrieved many partially deleted systems, which might reflect the counter-selection of these systems in a context of antibiotic pressure that favors the stabilization and dissemination of ARG carrying plasmids.

Methods

Bacterial strains, growth conditions, and plasmids

Characteristics of the strains used in this work are summarized in Supplementary Data 1. All strains were submitted to Illumina sequencing and for some of them to long-read sequencing. Donor strains in conjugation experiments were three clinical *K. pneumoniae* isolates carrying either pOXA-48_1, pOXA-48_2 or pOXA-48_3. The organization of ISI sequences in the three plasmids was confirmed by PCR. Recipient strains were three *E. coli* ST38 environmental isolates characterized by different O-types/H-types. Their position in the ST38 phylogeny is given in (Supplementary Information Supplementary Fig. 1a). ST38_1 carried an endogenous IncFII, 70.8 kb-long plasmid deprived of any ARG while ST38_3 contained a 161 kb-long IncFIC(FII) plasmid. ST38_2 has no plasmid (Supplementary Data 1). *E. coli* strains CNR36C9 (ST219) and CNR81D10 (ST10) encoding closely related (91%/92% amino acid (a.a.) identity) or distantly related (28%/25% a.a. identity) *apsAB*-like systems respectively were used for PCR-cloning of *apsAB* homologs. *E. coli* K-12 strain MG1655 was used for *apsAB* expression experiments from a mini-Tn7 inserted downstream *glsM*. *E.*

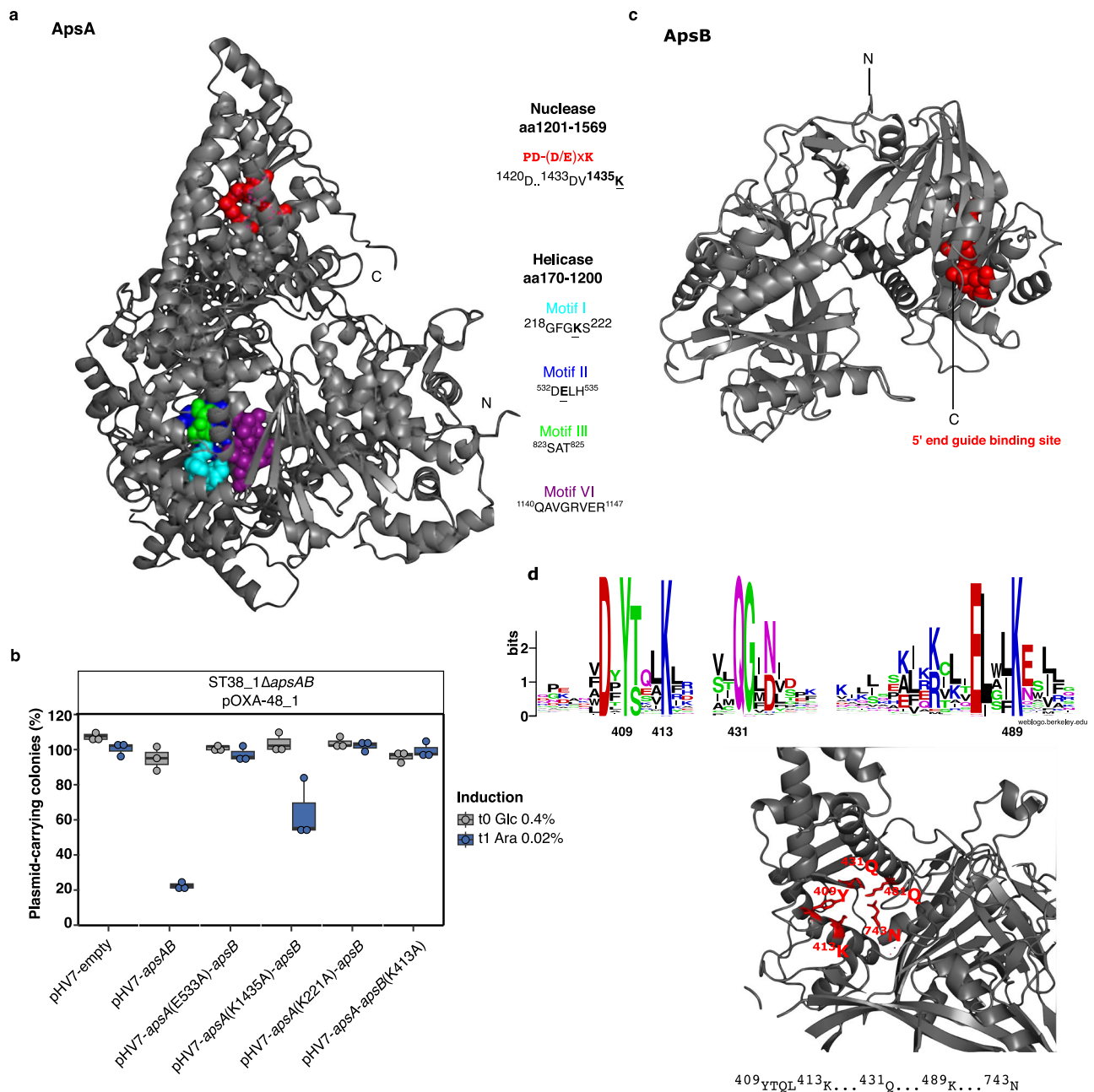


Fig. 7 | ApsAB associates a protein with helicase and nuclease domains and a novel Argonaute-like protein. a Predicted structure of ApsA as determined with AlphaFold2. The conserved PD-(D/E)XK nuclease domain with active site residues (¹⁴²⁰D...¹⁴³³DV¹⁴³⁵K) in red and the four motifs of the helicase domain in cyan ²¹⁸GFGKS²²², blue ⁵³²DELH⁵³⁵, gray ⁸²³SAT⁸²⁵ and purple ¹¹⁴⁰QAVGRVER¹¹⁴⁷ are indicated. **b** Effect of mutations replacing key residues of the putative helicase (K221A, E533A) or nuclease (K1435A) domains of ApsA and of the putative 5' end guide binding motif (K413A) of ApsB on pOXA-48_1 maintenance. Effect on pOXA-48_2 and _3 are shown in Supplementary Fig. 5. *apsAB* and variants were expressed under the control of the P_{BAD} inducible promoter in ST38_1 Δ F3141-F3140 transconjugants. t0 refers to the value obtained following one 24-h passage in LB glucose 0.4%, and t1 to the value determined after two additional passages in LB arabinose 0.02%. phV7-empty (pHV7) is a negative control. Results are from three biologically independent

experiments. Boxplots show median, box bounds 25th and 75th quartiles, whisker bounds minimum and maximum excluding outliers, and outliers are values > 1.5 \times interquartile range. Source data are provided as a Source Data File. **c** Predicted structure of ApsB as determined with AlphaFold2. The conserved motif acting as 5'-end guide binding motif in the MID domain of pAgos, ⁴⁰⁹Y,⁴¹³K,⁴³¹Q,⁴⁸⁹K, is indicated as red balls; the RNase H fold of the PIWI domain and the PAZ domain of pAgos are not conserved in ApsB. **d** Sequence logo generated by WebLogo from the alignment of ApsB homologs (shown in Supplementary Fig. 6) in the region corresponding to the MID domain, highlighting the conserved residues. A zoom on the ApsB MID domain structure at the ⁴⁰⁹Y,⁴¹³K,⁴³¹Q,⁴⁸⁹K residues is provided in the lower panel. The C-terminal ⁷⁴³N residue possibly interacting with the putative guide nucleic acid in the binding pocket is also indicated.

coli strains DH5a and XL1 blue were used for cloning and MFD *pir*³⁹ for propagation of plasmids with RK6 origin of replication and for bacterial mating.

Bacterial growths were performed at 37 °C. Liquid cultures were performed in LB Miller or in M9 medium supplemented with glucose

0.4%, MgSO₄ 1 mM and CaCl₂ 0.1 mM with shaking. Where appropriate, antibiotics were added: meropenem (0.1 μ g ml⁻¹), apramycin (40 μ g ml⁻¹), zeocin (30 μ g ml⁻¹) and chloramphenicol (10 μ g ml⁻¹). Growth and mating experiments with MFD pir derivatives were performed in LB or LB agar complemented with 0.3 mM diaminopimelic

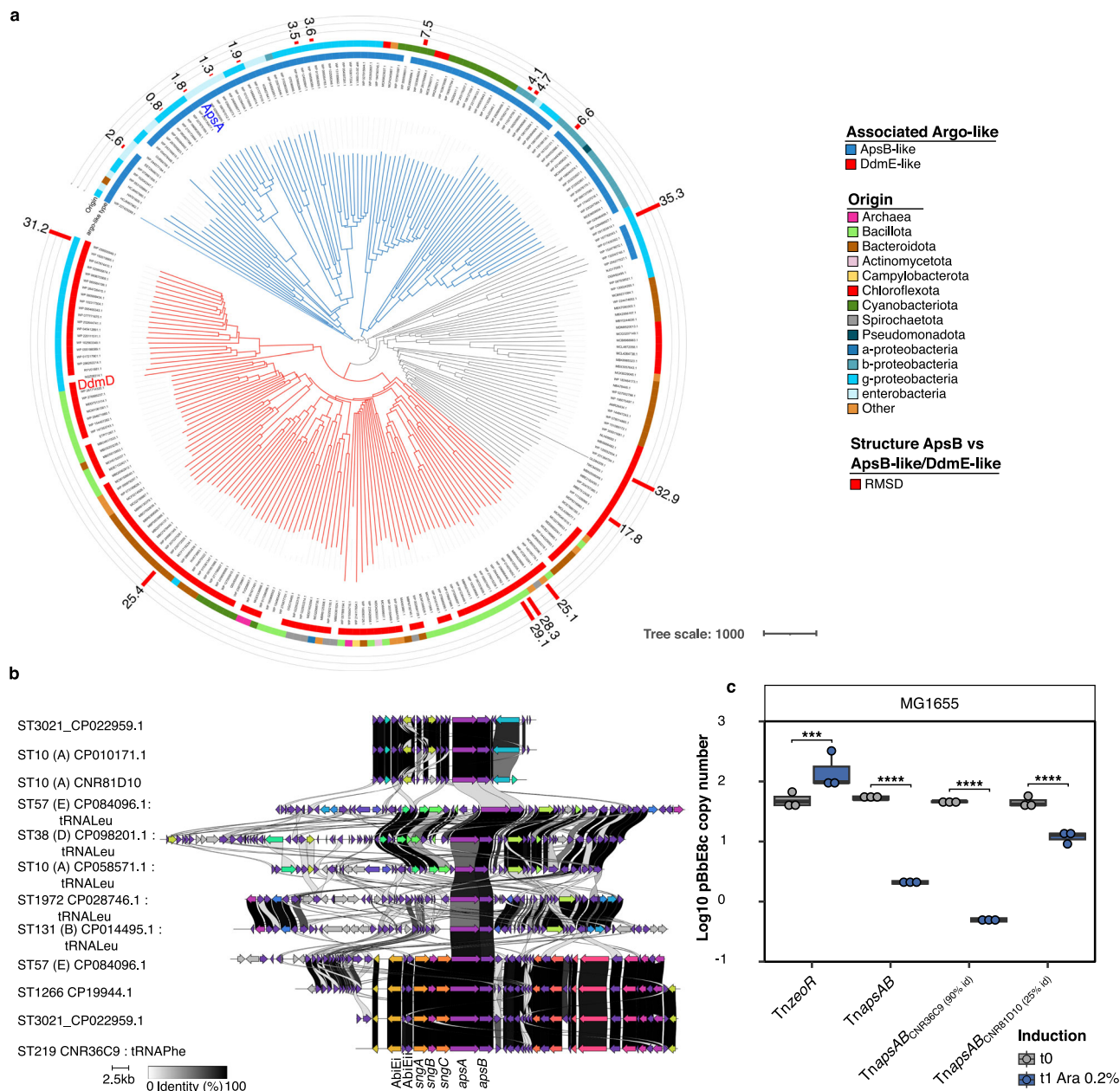


Fig. 8 | ApsAB belongs to a broad family of putative antiplasmid systems.

a Distance tree of ApsA related sequences retrieved from the NCBI database. Protein sequences were retrieved by using PSI-BLAST and the distance tree was obtained by the Neighbour-joining method. The distance tree separates proteins more related to ApsA (in blue) or to DdmD (in red), or intermediate (in gray). Circles are annotated as the figure key. From inside to outside: the type of associated Argonaute-like protein (ApsB or DdmE), the taxonomic origin of the sequence, and for 19 ApsB-like or DdmE-like proteins with a predicted 3-D structure in Uniprot or NCBI databases, a measure of their structural similarity with ApsB by using the root-mean-square deviation of atomic positions (RMSD) (See also Supplementary Data 8). **b** Alignment of different families of genomic islands containing a complete or a truncated *apsAB*-like operon. Other defense systems, such as the SngABC Shango system and the AbiE/AbiEII systems, encoded in some of these genomic islands are indicated. The sequence type (ST) and the strain ID are indicated, and the *E. coli* phylogroup is given between brackets. When it could be identified, the tRNA in which the genomic island is inserted is also indicated. *apsAB* variants from CNR36C9 and CNR81D10 tested in (c) have been included. **c** Quantification of the

ColE1 derivative pBbE8c following induction of two homologs of the *apsAB* operon encoding proteins with 92/92% and 28/25% aa sequence identity with ApsA/B, respectively. Operon was cloned in Tn7 following PCR amplification from the ST219 CNR36C9 and ST10 CNR81D10 isolates under the p_{BAD} promoter and inserted in MG1655 *E. coli* chromosome. TnZeoR used as control, corresponds to the empty transposon and only carries the zeocin resistance gene. The plasmid copy number was determined by qPCR by using the ΔCt method with primers in pBbE8c replication origin and *rpsL* (chromosomal gene) as the reference gene. The results are from three biologically independent experiments. Boxplots show median, box bounds 25th and 75th quartiles, whisker bounds minimum and maximum excluding outliers and outliers are values > 1.5 × interquartile range. The normal distribution of data was assessed with Shapiro-Wilk normality test. Statistical analysis was performed with Log10-transformed data by using a pairwise two-sample two-sided t-test and *p*-values (Source Data) were FDR-adjusted. ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001. *p* = 4.69e-04, 1.32e-09, 1.77e-11, 8.71e-05 (from left to right). Source data are provided as a Source Data File.

acid (DAP, ThermoScientific). Induction from p_{BAD} promoter was performed in LB Miller supplemented with L-arabinose to a final concentration of 0.02 or 0.2% as indicated. E-test were performed on Mueller Hinton agar (MHA) medium. A list of plasmids used in the study and their main characteristics is provided in (Supplementary Data 9). All inserted fragments were verified by Sanger sequencing (Eurofins Genomics), and expression plasmids carrying *apsAB* were WGS (PlasmidSaurus or Eurofins Genomics).

Conjugation assay

Overnight precultures in LB of donors and recipient strains were diluted 1:100 into fresh LB and grown to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.6. After mixing at 1:1 ratio, 200 μ l were spread on a filter (MILLIPORE type HAEP 0.45 μ M) placed on LB agar and incubated at 37 °C overnight or for one hour. Bacteria were harvested in physiological water followed by serial dilutions and plated on LB agar containing two antibiotics: meropenem (MEM) 0.1 μ g ml⁻¹ and tetracycline (TET) 10 μ g ml⁻¹ to select transconjugants. Transconjugants were WGS and those devoid of mutations were selected for further analysis. Conjugation frequency was calculated as the ratio of transconjugants over donor after a 1h-mating followed by selection of transconjugants, donors, and recipients (MEM 0.1 μ g ml⁻¹ and TET 10 μ g ml⁻¹; MEM 0.1 μ g ml⁻¹, TET 10 μ g ml⁻¹ respectively).

Growth curves and relative fitness assessments

Overnight precultures in LB or M9 of the three ST38 *E. coli* plasmid-free isolates and their isogenic transconjugants were inoculated without and with antibiotic (MEM 0.1 μ g ml⁻¹) respectively. 96-well plates were inoculated with 100 μ l of precultures diluted to 5×10^5 colony forming unit (CFU) per milliliter in LB or M9 medium and incubated at 37 °C with shaking for 6 (LB) or 16 h (M9) in an automatic plate reader (Tecan infinite M Nano under i-control 2.0.10). Three independent experiments were carried out for each strain. For each independent biological replicate, the doubling time was obtained by calculating the mean from three to five technical replicates. The doubling time was calculated using the formula: $G = \ln(2)/\mu_{max}$. μ_{max} is the maximum growth rate, corresponding to the slope of the curve at exponential phase. The relative doubling time was calculated using the formula: $W = G_{transconjugant}/G_{plasmid-free}$.

Experimental evolution

Overnight precultures in LB or in M9 of transconjugants and plasmid-free strains were diluted 1:200 into 10 ml fresh LB medium or into complemented M9 medium with and without MEM 0.1 μ g ml⁻¹ respectively and incubated at 37 °C with shaking (220 r.p.m, INFORS HT Minitron). For each experiment, five independent biological replicate cultures were evolved. Serial transfers were achieved for 28 days using 1:200 dilutions every day into 10 ml of fresh medium (ca. 8 generations per day). For the evolution of transconjugant lineages, MEM was added every day or every three days at 0.1 μ g ml⁻¹ as indicated. Each seven days, whole populations were collected and frozen at -80 °C, and bacterial pellets for DNA sequencing were obtained by centrifuging 1 ml of culture. Relative fitness of whole population through experimental evolution was monitored by growth curves. PCR using primers (Sigma-Aldrich) targeting *bla*_{OXA-48} and *repA* (Supplementary Data 9) were performed on isolated colonies selected on MEM 0.1 μ g ml⁻¹ to identify potential integration of *bla*_{OXA-48} (Tn6237) and pOXA-48 loss at day 7, day 14, day 21 and day 28.

Plasmid stability assay

Overnight precultures of pOXA-48 transconjugants in LB with MEM 0.1 μ g ml⁻¹ were set as day 0. Plasmid stability was assessed by serial passages using 1:200 dilutions into 10 ml fresh LB without MEM for ten days. Bacteria were collected and frozen at -80 °C at days 0, 5 and 10 and CFU were determined by plating 100 μ l diluted cultures on LB agar

with and without MEM 0.05 μ g ml⁻¹. Colonies growing on MEM were used as a proxy for plasmid-carrying bacteria as Tn6237 integration was estimated as a rare event under these conditions. Automatic bacterial colony counting was done with scan4000 (INTERSCIENCE) and plasmid stability was calculated as the ratio of plasmid-carrying bacteria over total population. Due to dilution and plating biases this might occasionally result in ratios slightly superior to 100%. The stability of other plasmids was similarly tested after introduction by electroporation (pBbS8c, pBbE8c, pACYt, pUC19) or conjugation (pKPC, using CNR146C9 as donor) with adequate antibiotic selection (Supplementary Data 9).

Plasmid constructions for expression of wild-type and mutated copies of *apsAB*

F3141-F3140 operon, F3140 (*apsB*) and F3141 (*apsA*) were cloned under the control of a p_{BAD} inducible promoter in a pHV7 vector coding for apramycin resistance. All growing steps of pHV7-F3141-F3140 transformants were performed in the presence of glucose 0.2 % to repress *apsAB* induction. Two mutated versions of this operon where a stop codon was introduced in F3141 or F3140 sequence were generated during this cloning and the corresponding plasmids were used for activity testing. For site-directed mutagenesis, selected codons were modified in the pHV7-F3141-F3140 plasmid by using the Q5 Site-Directed Mutagenesis kit (New England Biolabs) according to manufacturer's recommendations. pHV7 plasmid mutants were WGS (Eurofins). For chromosomal expression of *apsAB* (F3141-F3140) in MG1655, *apsAB* or *apsAB* homologs were cloned under the control of a p_{BAD} promoter in a miniTn7 transposon (miniTn*apsAB*) using primers described in Supplementary Data 9. miniTn*apsAB* was integrated downstream *glmS*, a neutral chromosomal position of *E. coli* K12 MG1655 strain following triparental mating as previously described⁴⁰. Antiplasmid activity of these constructs was analyzed by electroporating the Cole1 plasmid pBbE8c. An MG1655 strain harboring an empty miniTn7 (miniTn*zeoR*) integrated at *glmS* was used as control. When stated, chloramphenicol was added at 10 μ g ml⁻¹ to arrest bacterial growth 2.5 h after addition of arabinose 0.2%.

F3140-3141 (*apsAB*) chromosomal deletion and complementation

Complete deletion of the F3140-3141 (*apsAB*) operon was obtained by λ Red recombination⁴¹ by using an in-lab p15red vector carrying the lambda recombinase under the control of an inducible pBAD promoter (Supplementary Data 9). Primers (Sigma-Aldrich) used for PCR amplification of the *zeoR* cassette between F3141-F3140 homology sequences are shown in Supplementary Data 9. *zeoR* marker was eliminated by using an in-lab p15Flip plasmid encoding the Flippase. SacB counterselection was used to eliminate recombinering plasmids. F3141-F3140 (*apsAB*) operon deletion were confirmed by PCR. The absence of mutation in the ST38_1*ΔapsAB* clone used for experimental evolution was determined by WGS. For complementation, recipient cells were electroporated with the plasmids pHV7-empty, pHV7-F3141, pHV7-F3140, pHV7-F3141-F3140 and pHV7-F3141-F3140-mutants (Supplementary Data 9). pHV7-derivatives carrying strains were incubated 24 h in LB, apramycin 50 μ g ml⁻¹, 0.4% glucose to repress p_{BAD} activity (t_0); two serial passages using 1:200 dilutions were then performed in LB, apramycin 50 μ g ml⁻¹ and 0.02% arabinose to induce F3141-F3140 transcription. Cultures were diluted and plated on LB agar with or without MEM 0.05 μ g ml⁻¹ and pOXA-48 plasmids stability assessed as the ratio of resistant colonies over whole population.

Carbapenem susceptibility testing

MEM Minimal Inhibitory concentration (MIC) was determined by Etest (Biomerieux). The plates were inoculated by flooding 2 ml of bacterial culture (10⁶ bacteria ml⁻¹), spread by a gentle rocking motion, and

excessive liquid was removed leaving 0.5 ml of culture (+/– 10%). The flooding method was selected over swab streaking as it provides a more accurate reading of the Etest result.

Bacteriophages plaque assays

Phage plaque assays have been performed as previously described and by using the same phage collection²⁸ (bacteriophages lambda, T4, P1, 186cIts, CLB_P2, LF82_P8, AL505_P2, and T5, Supplementary Table 1). Phages were obtained as active cultures. The preys, *E. coli* K12 MG1655 strain and its isogenic derivatives chromosomally encoding the miniTn_{apsAB} or the miniTn_{zeoR} as control were grown overnight. Overnight cultures were diluted to 1:20 in the presence of arabinose 0.2% in LB medium and incubated at 37 °C for 3 h to induce *apsAB* expression. Bacterial lawns were prepared by mixing 200 µL of the induced culture with 100 µL of CaCl₂ 1 M and 20 ml of LB + 0.5% agar and poured onto 12 × 12 cm square plates of LB containing 0.2% arabinose. High-titer (> 10⁸ pfu ml⁻¹) stocks of phages lambda, T4, P1, 186cIts, CLB_P2, LF82_P8, AL505_P2, and T5 serially diluted were spotted on each plate and incubated at 37 °C overnight except for phage T7 incubated overnight at room temperature.

Whole genome sequencing and mutation identification

ST38_1, ST38_2 and ST38_3 strains were fully sequenced and used as reference sequences by combining Illumina sequencing and PacBio sequencing (ST38_1, ST38_2) or Oxford Nanopore technology (ST38_3). DNA was extracted at the exponential phase with Qiagen Puregene Yeast/Bact kit B. PacBio sequencing libraries were prepared with NANOBIND CBB KIT RT PacBio. ST38_3 Nanopore sequencing library was prepared by using Native Barcoding Kit 24 V14 (ref SQK-NBD114.24), and sequencing was performed with flowcell R10.4.1 (ref FLO-MINI14) on MinION Mk1C device with Guppy 5.0.14 as a base-caller. Long-read PacBio sequences were assembled with hybrid-SPAdes v 3.15.5 for hybrid assembly of short and long reads⁴². Hybrid assembly of short and long-read Nanopore sequences were performed by using Canu 2.2⁴³ and Circlator 1.5.5⁴⁴.

For Illumina sequencing, DNA was extracted from stationary phase cultures by using the Qiagen Blood and Tissue DNeasy kit, libraries were prepared with the NEBNext Ultra II FS DNA Library Prep Kit and sequencing was performed with NovaSeq6000 or NextSeq500 sequencing platforms. Short-read Illumina sequences were assembled with SPAdes 3.15.5⁴⁵ or aligned to the reference sequences by using Breseq 0.35.7⁴⁶ to identify SNPs, deletions, insertions and recombination events. IGV 2.11.9⁴⁷ was used to visually confirm mutation events. Illumina-reads of the whole population of the evolved lineages collected at day 7, day 14, day 21, and day 28 were analyzed for new junction evidence and coverage distribution by using Breseq 0.35.7⁴⁶ with the -p option for pool sequencing, a polymorphism frequency cutoff 2.5% option with at least 10 polymorphic reads. Plasmid coverage inside and outside the Tn6237 sequence was determined as the number of reads on three 15 kb-long regions, one in Tn6237, two outside, containing no IS, by using BAM files and the GRanges function of the GenomicAlignments package 1.22.1 in RStudio (R 3.6.3). The ratio was calculated as the ratio of the average of the number of reads mapping on the two regions outside Tn6237 to the number of reads mapping on Tn6237. IS1 new junctions detected by Breseq were tested as potential Tn6237 integration sites by PCR using a primer located near the new IS1 insertion site and a primer in *bla*_{OXA-48} (Supplementary Data 9). PCR products were Sanger-sequenced to confirm the insertion site.

Phylogenetic analysis of *E. coli* ST38 and sequence annotation

To contextualize the three ST38 strains used in this work we performed a phylogenetic analysis using 1907 sequences retrieved from public databases (April 2020): 1248 assembled genome sequences from Enterobase [<https://enterobase.warwick.ac.uk/>], 149 assembled

genomes from the NCBI and 510 sequences retrieved as reads and assembled with SPAdes 3.12.0⁴⁵ (Supplementary Data 10). QUAST 2.2⁴⁸ was used to assess the assembly quality and contigs shorter than 500 bp were filtered out for the phylogenetic analysis. A core genome alignment was generated with Parsnp 1.5.4⁴⁹, by using a finished genome sequence as reference. Maximum-Likelihood (ML) trees were generated with RAxML 8.2.12⁵⁰ using GTRGAMMA after removing regions of recombination with Gubbins⁵¹. The ST38 single locus variant ST963 strain CNRC6047 was used as outgroup to root the phylogenetic tree. Trees were visualized and annotated using ITOL⁵² [<https://itol.embl.de/>].

Genomes annotation was performed by using Prokka 1.14.5⁵³. Resistome and plasmidome were characterized by using ABRicate 1.0.1 on the ResFinder db⁵⁴ (minimum coverage 60%, minimum identity 95%) and PlasmidFinder 2.1.1 (minimum coverage 60%, minimum identity 95%)⁵⁵. Identification of defense systems was performed by using DefenseFinder [<https://defensefinder.mdmlab.fr/>].

In silico characterization of ApsAB antiplasmid systems

Search for *apsAB* homologs were performed by using PSI-BLAST with three iterations on the recently introduced NCBI clustered nr database [<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>]. This database is composed of representative sequences of clusters, that groups NCBI nr sequences sharing 90% identity and 90% length to other members of the cluster. Only sequences longer than 1100 a.a. residues (ApsA) and 500 a.a. residues (ApsB) were kept for PSI-BLAST iterations. CDS located downstream of *apsA* homologs were retrieved by using GCsnap 1.0.17⁵⁶. Protein sequences were aligned by using MuscleW 3.8.31 (default options) under Jalview 2.11.3⁵⁷ and a distance tree was created by Neighbor-Joining method using a BLOSUM62 matrix. Remote homology detection was also performed with the HHpred server [<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>] using PDB_mmCIF70_18_jun, SCOPe70_2_08, CATH_S40_v4.3 and UniProt-SwissProt-viral70_3_nov_2021 as target databases accessed in September 2023. Structural modelling was performed with Alphafold2⁵⁸ implemented in Neurosnap [<https://neurosnap.ai/>] and the resulting models were used as templates for similarity searches with Foldseek [<https://search.foldseek.com/search>]. Structure annotation was performed with Pymol 2.5.5 (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.5 Schrödinger, LLC.). Alpha-fold or icn3d pdb models of 20 ApsB-like or DdmE-like proteins (Supplementary Data 8) were recovered from Uniprot [<https://www.uniprot.org/>] or ncbi [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/>] and aligned to ApsB structure model under Pymol 2.5.5 and the Root-mean-square deviation of atomic positions (RMSD) was used as a proxy to estimate protein structure similarity. The genomic environment of *apsAB* homologs from 12 *E. coli* strains belonging to different STs was compared by using the web version of Clinker [<https://cagecat.bioinformatics.nl/tools/clinker>].

Statistical tests

All graphs were generated with R (version 3.6.3) by using the R packages (tidyverse, forcats, ggplot2, ggpubr, rstatix, broom). Normality of data were assessed by using the Shapiro test. All the statistical analyzes were performed with a pairwise two sample t.test and p-value were corrected following Benjamini-Hochberg correction (FDR).

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

Data availability

The data that support the findings of this study are provided within the manuscript and the associated supplementary materials. Full details and links to the publicly available databases [<https://enterobase>.

warwick.ac.uk/], [<https://defensefinder.mdmlab.fr/>], [<https://www.uniprot.org/>], [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/icn3d/>], [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>] used in bioinformatic analyzes are provided in the methods and their associated references. Complete genome sequences of ST38_1, ST38_2, and ST38_3 and of the three pOXA-48 plasmids have been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank (BioProject PRJEB71895). The corresponding Genome_ID are provided in Supplementary Data 1 (for ST38 strains) and 9 (for pOXA-48s). Illumina reads for the three *K. pneumoniae* used as donors of pOXA-48 have also been deposited at DDBJ/EMBL/GenBank (BioProject PRJEB71895), and their accession numbers are given in Supplementary Data 1. Sequence data from individual colonies and pools are available from the corresponding author upon request. Source data are provided in this paper.

References

- Murray, C. J. L. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *Lancet* **399**, 629–655 (2022).
- Rozwandowicz, M. et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* **73**, 1121–1137 (2018).
- Johnson, T. J. et al. In Vivo Transmission of an IncA/C Plasmid in *Escherichia coli* Depends on Tetracycline Concentration, and Acquisition of the Plasmid Results in a Variable Cost of Fitness. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 3561–3570 (2015).
- Starikova, I. et al. Fitness costs of various mobile genetic elements in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2755–2765 (2013).
- Bergstrom, C. T., Lipsitch, M. & Levin, B. R. Natural selection, infectious transfer and the existence conditions for bacterial plasmids. *Genetics* **155**, 1505–1519 (2000).
- Brockhurst, M. A. & Harrison, E. Ecological and evolutionary solutions to the plasmid paradox. *Trends Microbiol.* **30**, 534–543 (2022).
- San Millan, A., Heilbron, K. & MacLean, R. C. Positive epistasis between co-infecting plasmids promotes plasmid survival in bacterial populations. *ISME J.* **8**, 601–612 (2014).
- Dahlberg, C. & Chao, L. Amelioration of the cost of conjugative plasmid carriage in *Escherichia coli* K12. *Genetics* **165**, 1641–1649 (2003).
- Harrison, E., Guymier, D., Spiers, A. J., Paterson, S. & Brockhurst, M. A. Parallel Compensatory Evolution Stabilizes Plasmids across the Parasitism-Mutualism Continuum. *Curr. Biol.* **25**, 2034–2039 (2015).
- Loftie-Eaton, W. et al. Compensatory mutations improve general permissiveness to antibiotic resistance plasmids. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, 1354–1363 (2017).
- Lopatkin, A. J. et al. Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nat. Commun.* **8**, 1689 (2017).
- Boyle, T. A. & Hatoum-Aslan, A. Recurring and emerging themes in prokaryotic innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* **73**, 102324 (2023).
- Jaskólska, M., Adams, D. W. & Blokesch, M. Two defence systems eliminate plasmids from seventh pandemic *Vibrio cholerae*. *Nature* **604**, 323–329 (2022).
- Mayo-Muñoz, D., Pinilla-Redondo, R., Birkholz, N. & Fineran, P. C. A host of armor: Prokaryotic immune strategies against mobile genetic elements. *Cell Rep.* **42**, 112672 (2023).
- Patiño-Navarrete, R. et al. Specificities and Commonalities of Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* Isolated in France from 2012 to 2015. *mSystems* **7**, e01169-21 (2022).
- Pitout, J. D. D., Peirano, G., Kock, M. M., Strydom, K.-A. & Matsumura, Y. The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin. Microbiol. Rev.* **33**, e00102–e00119 (2019).
- Wielders, C. C. H. et al. Epidemiology of carbapenem-resistant and carbapenemase-producing Enterobacteriales in the Netherlands 2017–2019. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **11**, 57 (2022).
- Poirel, L., Bonnin, R. A. & Nordmann, P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 559–562 (2012).
- Alonso-del Valle, A. et al. Variability of plasmid fitness effects contributes to plasmid persistence in bacterial communities. *Nat. Commun.* **12**, 2653 (2021).
- Hendrickx, A. P. A. et al. bla OXA-48-like genome architecture among carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the Netherlands. *Microb. Genomics* **7**, 000512 (2021).
- Turton, J. F. et al. Clonal expansion of *Escherichia coli* ST38 carrying a chromosomally integrated OXA-48 carbapenemase gene. *J. Med. Microbiol.* **65**, 538–546 (2016).
- Fonseca, E. L., Morgado, S. M., Caldart, R. V. & Vicente, A. C. Global Genomic Epidemiology of *Escherichia coli* (ExPEC) ST38 Lineage Revealed a Virulome Associated with Human Infections. *Microorganisms* **10**, 2482 (2022).
- Emeraud, C. et al. Emergence and Polyclonal Dissemination of OXA-244–Producing *Escherichia coli*, France. *Emerg. Infect. Dis.* **27**, 1206–1210 (2021).
- Falgenhauer, L. et al. Cross-border emergence of clonal lineages of ST38 *Escherichia coli* producing the OXA-48-like carbapenemase OXA-244 in Germany and Switzerland. *Int. J. Antimicrob. Agents* **56**, 106157 (2020).
- Guenther, S. et al. Chromosomally encoded ESBL genes in *Escherichia coli* of ST38 from Mongolian wild birds. *J. Antimicrob. Chemother.* **72**, 1310–1313 (2017).
- Shawa, M. et al. Novel chromosomal insertions of ISEcp1-blaCTX-M-15 and diverse antimicrobial resistance genes in Zambian clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* **10**, 79 (2021).
- León-Sampedro, R. et al. Pervasive transmission of a carbapenem resistance plasmid in the gut microbiota of hospitalized patients. *Nat. Microbiol.* **6**, 606–616 (2021).
- Rousset, F. et al. Phages and their satellites encode hotspots of antiviral systems. *Cell Host Microbe* **30**, 740–753.e5 (2022).
- White, M. F. Structure, function and evolution of the XPD family of iron-sulfur-containing 5'→3' DNA helicases. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 547–551 (2009).
- Knizewski, L., Kinch, L. N., Grishin, N. V., Rychlewski, L. & Ginalski, K. Realm of PD-(D/E)XK nuclease superfamily revisited: detection of novel families with modified transitive meta profile searches. *BMC Struct. Biol.* **7**, 40 (2007).
- Lisitskaya, L., Aravin, A. A. & Kulbachinskiy, A. DNA interference and beyond: structure and functions of prokaryotic Argonaute proteins. *Nat. Commun.* **9**, 5165 (2018).
- Miyoshi, T., Ito, K., Murakami, R. & Uchiumi, T. Structural basis for the recognition of guide RNA and target DNA heteroduplex by Argonaute. *Nat. Commun.* **7**, 11846 (2016).
- Kuang, H., Yang, Y., Luo, H. & Lv, X. The impact of three carbapenems at a single-day dose on intestinal colonization resistance against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *mSphere* **8**, e00479–23 (2023).
- Dionisio, F., Zilhão, R. & Gama, J. A. Interactions between plasmids and other mobile genetic elements affect their transmission and persistence. *Plasmid* **102**, 29–36 (2019).
- San Millan, A., Toll-Riera, M., Qi, Q. & MacLean, R. C. Interactions between horizontally acquired genes create a fitness cost in *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat. Commun.* **6**, 6845 (2015).
- Georjon, H. & Bernheim, A. The highly diverse antiphage defence systems of bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **21**, 686–700 (2023).

37. Millman, A. et al. An expanded arsenal of immune systems that protect bacteria from phages. *Cell Host Microbe* **30**, 1556–1569.e5 (2022).
38. Song, X. et al. Catalytically inactive long prokaryotic Argonaute systems employ distinct effectors to confer immunity via abortive infection. *Nat. Commun.* **14**, 6970 (2023).
39. Jackson, S. A., Fellows, B. J. & Fineran, P. C. Complete Genome Sequences of the *Escherichia coli* Donor Strains ST18 and MFDpir. *Microbiol. Resour. Announc.* **9**, e01014–e01020 (2020).
40. Choi, K.-H. et al. A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nat. Methods* **2**, 443–448 (2005).
41. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl Acad. Sci.* **97**, 6640–6645 (2000).
42. Antipov, D., Korobeynikov, A., McLean, J. S. & Pevzner, P. A. HYBRID SPA_{DES}: an algorithm for hybrid assembly of short and long reads. *Bioinformatics* **32**, 1009–1015 (2016).
43. Koren, S. et al. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive *k*-mer weighting and repeat separation. *Genome Res.* **27**, 722–736 (2017).
44. Hunt, M. et al. Circlator: automated circularization of genome assemblies using long sequencing reads. *Genome Biol.* **16**, 294 (2015).
45. Pribelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A. & Korobeynikov, A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr. Protoc. Bioinforma.* **70**, e102 (2020).
46. Deatherage, D. E. & Barrick, J. E. Identification of Mutations in Laboratory-Evolved Microbes from Next-Generation Sequencing Data Using breseq. in *Engineering and Analyzing Multicellular Systems* (eds. Sun, L. & Shou, W.) vol. 1151 165–188 (Springer New York, New York, NY, 2014).
47. Robinson, J. T. et al. Integrative genomics viewer. *Nat. Biotechnol.* **29**, 24–26 (2011).
48. Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. & Tesler, G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics* **29**, 1072–1075 (2013).
49. McKenna, A. et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* **20**, 1297–1303 (2010).
50. Stamatakis, A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* **30**, 1312–1313 (2014).
51. Croucher, N. J. et al. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* **43**, e15–e15 (2015).
52. Letunic, I. & Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **47**, W256–W259 (2019).
53. Seemann, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* **30**, 2068–2069 (2014).
54. Zankari, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2640–2644 (2012).
55. Carattoli, A. et al. In silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 3895–3903 (2014).
56. Pereira, J. GCsnap: interactive snapshots for the comparison of protein-coding genomic contexts. *J. Mol. Biol.* **433**, 166943 (2021).
57. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M. & Barton, G. J. Jalview Version 2—a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* **25**, 1189–1191 (2009).
58. Jumper, J. et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**, 583–589 (2021).
59. Sullivan, M. J., Petty, N. K. & Beatson, S. A. Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics* **27**, 1009–1010 (2011).

Acknowledgements

We thank Alexandre Almeida for his critical reading of the manuscript, David Vallenet for his help in the structure analysis of ApsAB, and Jean-Marc Ghigo for providing *E. coli* strain MFDpir. Sequencing was performed at the Biomix Platform, C2RT, Institut Pasteur, Paris, France, supported by France Génomique (ANR-10-INBS-09) and IBISA. This work was supported by “Investissement d’Avenir” program, LABEX IBEID (Grant ANR-10-LABX-62-IBEID) and SEQ2DIAG (ANR-20-PAMR-0010). PDZ received a fellowship from CIOSPB (Center national de l’Information, de l’Orientation Scolaire et Professionnelle, et des Bourses) of the Ministry of Higher Education, Scientific Research and Innovation of Burkina Faso and from the LABEX IBEID.

Author contributions

I.R.C., P.G. and P.D.Z. designed the study. P.D.Z., I.R.C., NC, F.D. and G.R. performed the experiments. P.D.Z., P.G. and I.R.C. analyzed the data. F.D., T.N. and A.H. provided materials. I.R.C., P.G. and P.D.Z. wrote the manuscript with input from G.R. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

All authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48219-y>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Isabelle Rosinski-Chupin.

Peer review information *Nature Communications* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. A peer review file is available.

Reprints and permissions information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

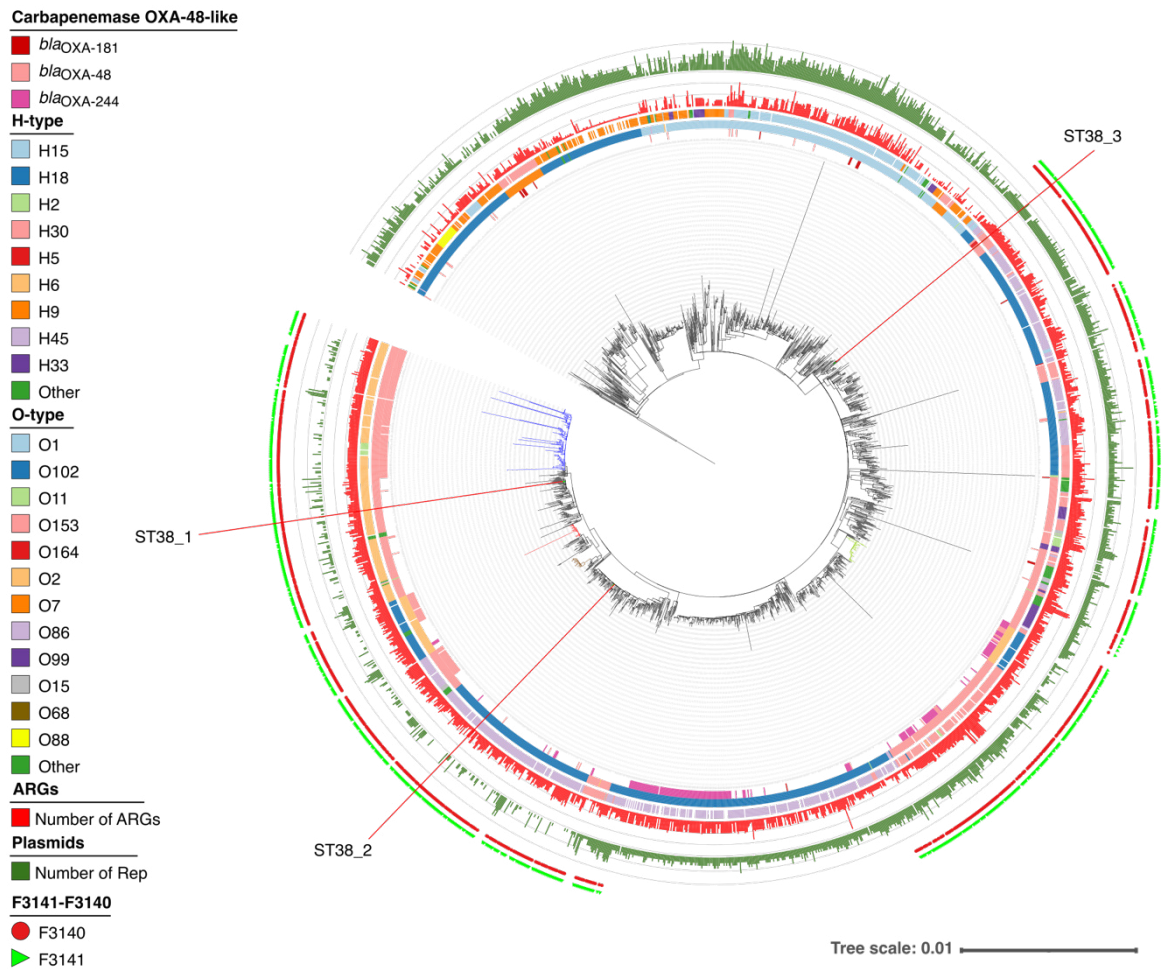
Supplementary information for

An antiplasmid system drives antibiotic resistance gene integration in carbapenemase-producing *Escherichia coli* lineages

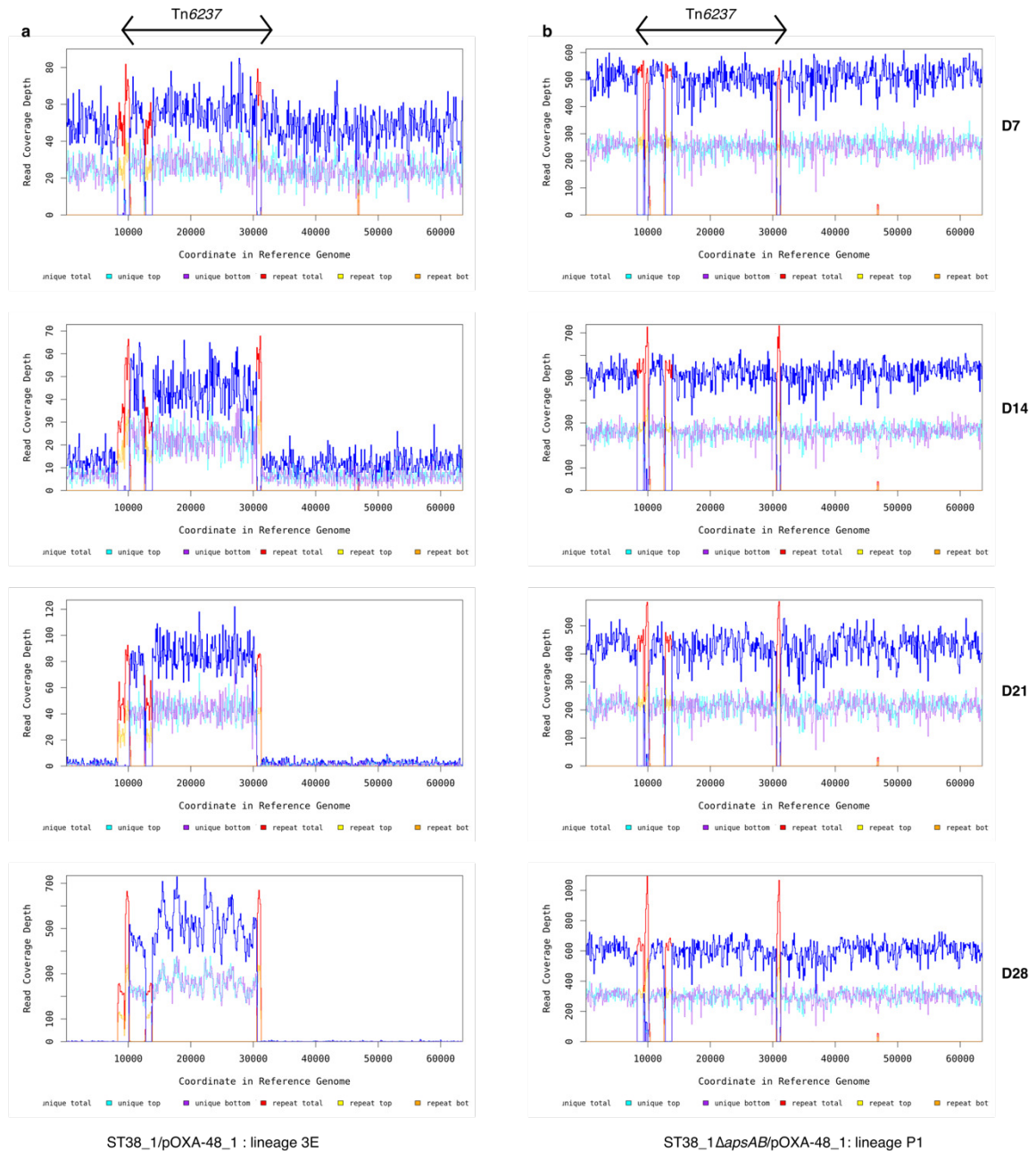
^{1,2,3}Pengdbamba Dieudonné Zongo, ^{1,3,#}Nicolas Cabanel, ^{1,3,#}Guilhem Royer, ^{3,4}Florence Depardieu, ⁵Alain Hartmann, ^{6,7,8}Thierry Naas, ^{1,3,&}Philippe Glaser,^{1,3,&}Isabelle Rosinski-Chupin*

¹Ecology and Evolution of Antibiotic Resistance Unit, Institut Pasteur, Paris, France; ²Sorbonne Université, Paris, France ; ³Université Paris Cité ⁴; Synthetic Biology Unit, Institut Pasteur, Paris, France ; ⁵UMR AgroEcologie 1347, INRAe, Université Bourgogne Franche-Comté, Dijon, France ; ⁶Team Resist, INSERM UMR 1184, Université Paris-Saclay; ⁷Department of Bacteriology-Hygiene, Bicêtre Hospital, APHP; ⁸Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance, Le Kremlin-Bicêtre, France.

and &: Contributed equally to this work



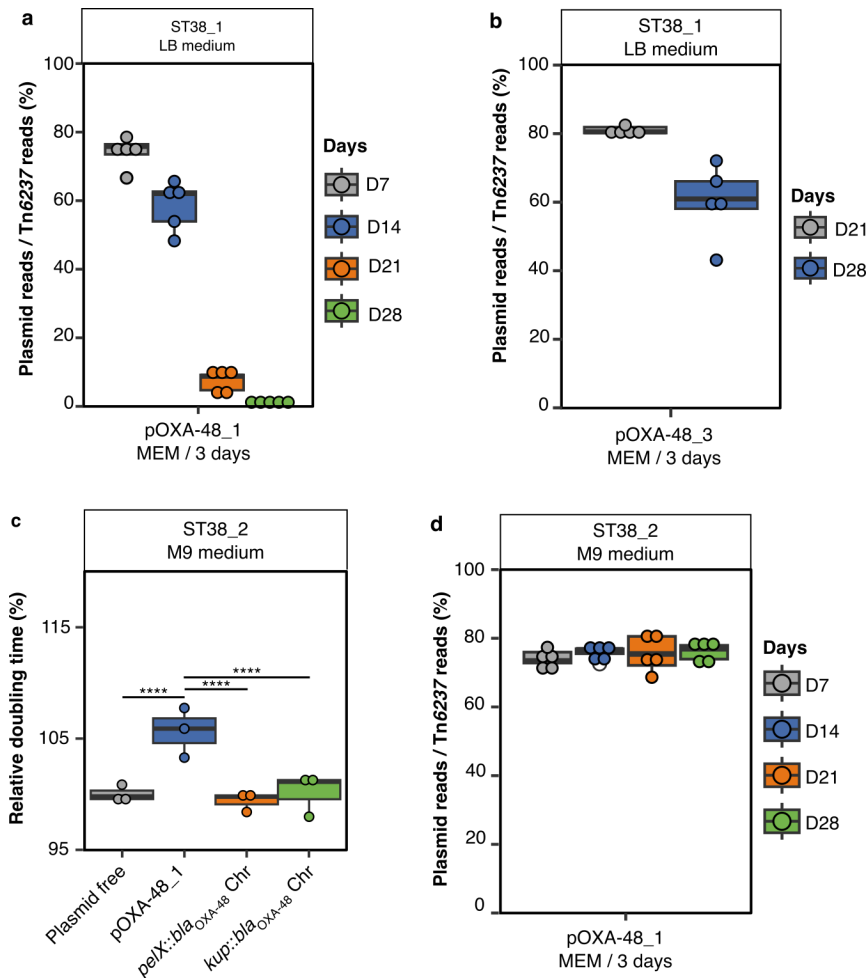
Supplementary Figure 1: Phylogeny of ST38 *E. coli*. Core genome phylogeny of a collection of 1907 *E. coli* ST38 strains from the NCBI database and Enterobase and the three strains of the study. The list of the strains and their characteristics are provided in Supplementary Data 10. The ST38 single locus variant ST963 strain CNRC6047 was used as outgroup to root the maximum-Likelihood tree generated by RAxML⁵⁰ after removing regions of recombination by Gubbins⁵¹. Genomic features are indicated as in the figure key from the inside to the outside circles: carbapenemases OXA-48-like, H-type and O-type antigen, Numbers of ARGs as determined by using ResFinder⁶⁰, Number of plasmid replicon sequences (Rep) as determined by using PlasmidFinder⁵⁵ and presence of F3141-F3140 antiplasmid defence system. Worldwide disseminated chromosomally integrated lineages are coloured in blue, red, brown and light green. The recipient strains ST38_1, ST38_2 and ST38_3 are indicated with red solid lines.



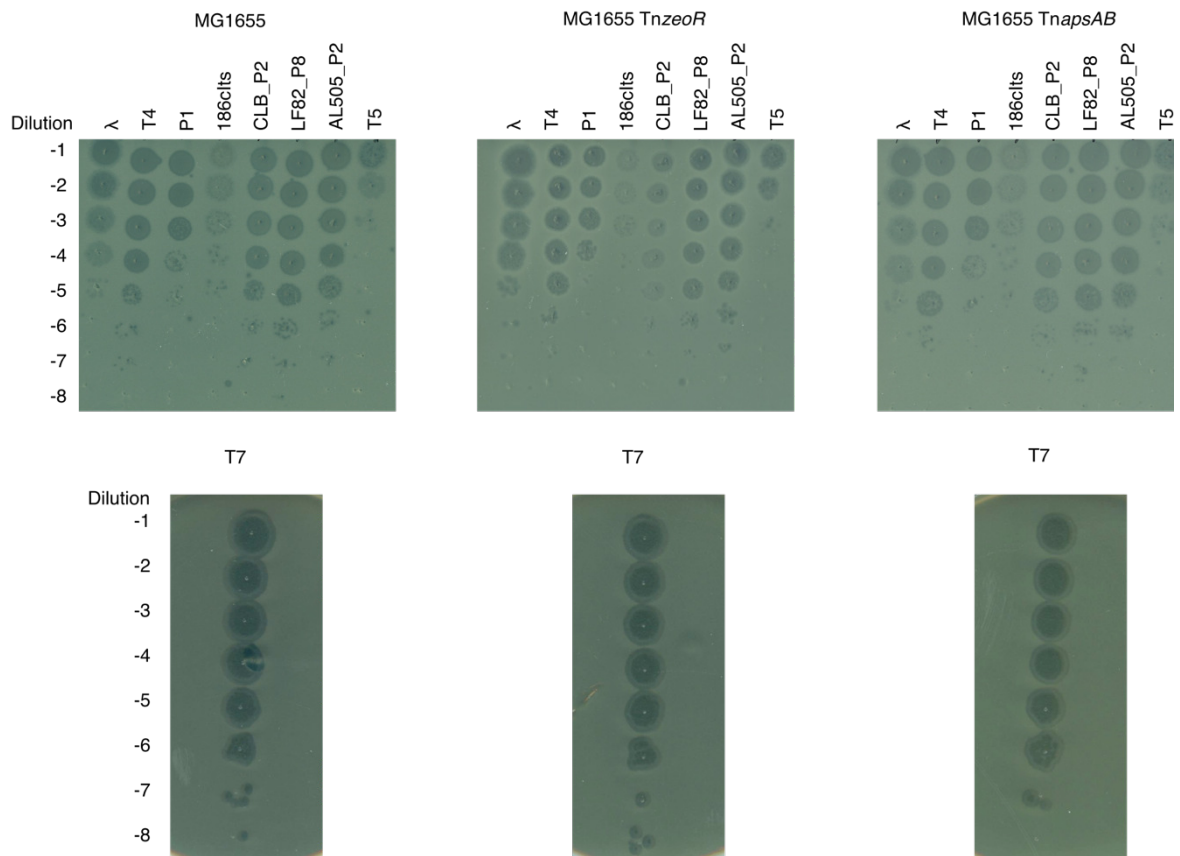
ST38_1/pOXA-48_1 : lineage 3E

ST38_1ΔapsAB/pOXA-48_1: lineage P1

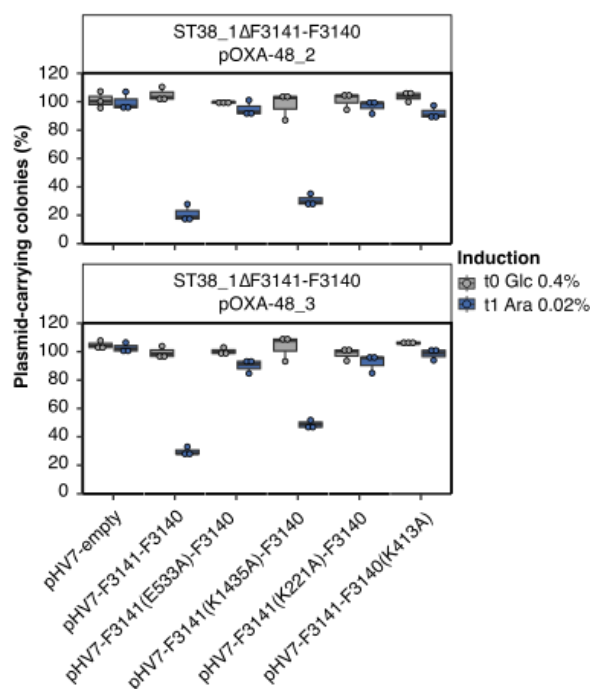
Supplementary Figure 2: pOXA-48_1 plasmid is gradually lost during experimental evolution of ST38_1 transconjugants. Evolution of pOXA-48_1 plasmid coverage during experimental evolution from day 7 to day 28, as obtained by Breseq⁴⁶ mapping of pool sequencing of an evolved population on pOXA-48_1 reference sequence. X-axis shows read-coverage depth and Y-axis pOXA48_1 coordinates. Tn6237 is shown by double headed arrows. **a.** pOXA-48_1 coverage in ST38_1 (Lineage 3E). **b.** pOXA-48_1 coverage in ST38_1 Z103ΔapsAB (Lineage P1).



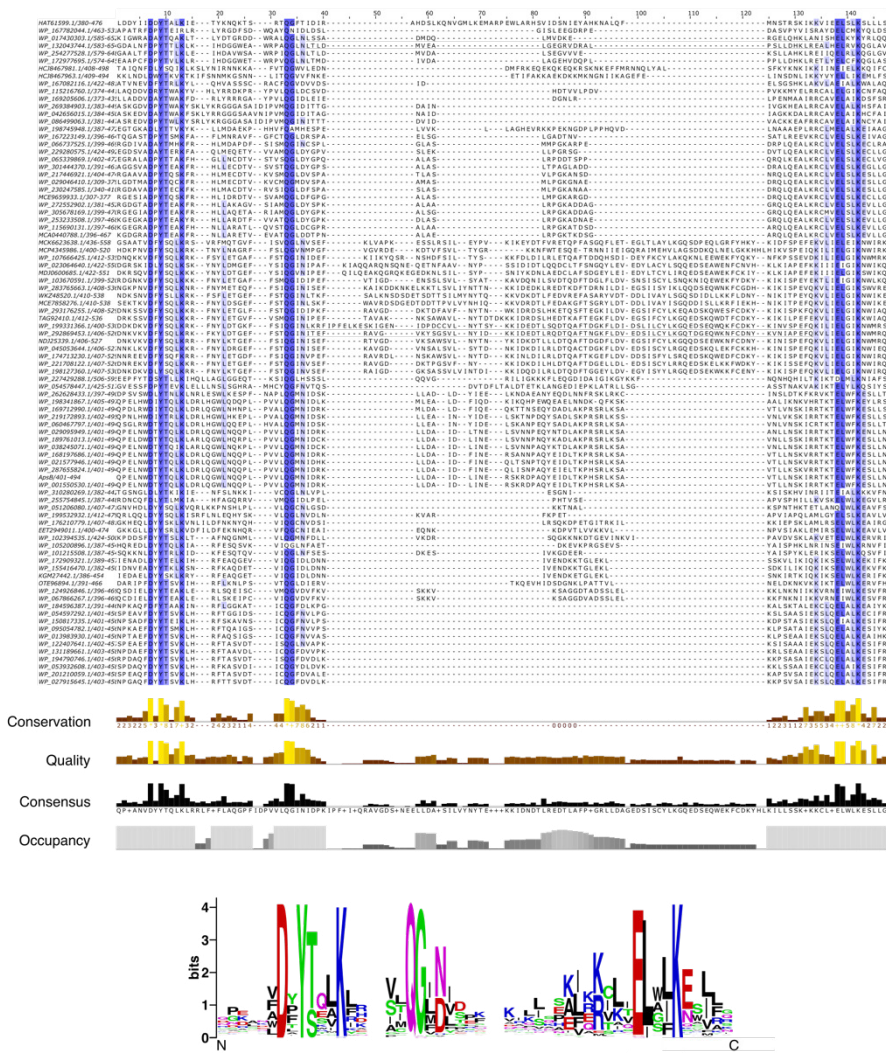
Supplementary Figure 3: Tn6237 insertion is associated with pOXA-48 plasmid loss. a. b. and d. Quantification of plasmid loss by population WGS. Plasmid loss was estimated by calculating the ratio of the number of reads on three pOXA-48_1 regions of same size, two outside and one inside Tn6237 respectively. **a.** pOXA-48_1 in ST38_1 evolved in LB medium is gradually lost from day 7 (D7) to day 28 (D28). **b.** pOXA-48_3 in ST38_1 transconjugants evolved in LB medium is partially lost at D28. **c.** Comparison of the relative doubling time of *bla*_{OXA-48} integrants and the original transconjugant calculated at exponential growth phase in the absence of meropenem. The relative doubling time is calculated as the ratio of the doubling time to the doubling time of one plasmid-free strain. Chr for chromosome. **d.** pOXA-48_1 in ST38_2 evolved in M9 medium remains unchanged between D7 and D28. Figures a, b and d show the results from five independent lineages, Figure c from three biologically independent experiments. Boxplots show median, box bounds 25th and 75th quartiles, whisker bounds minimum and maximum excluding outliers and outliers are value $> 1.5 \times$ interquartile range. For c, normal distribution of data was assessed with Shapiro-Wilk normality test. Statistical analysis was performed by using a pairwise two sample two-sided t-test and *p*-values (Source data) were FDR-adjusted. *****p*<0.0001. In c: *n*=3, *p*=0.000516, 0.000271, 0.000699 (from left to right). Source data are provided as a Source Data File.



Supplementary Figure 4. ApsAB does not target eight tested phages. Serial dilutions of high titre lysates of phages lambda, T4, P1, 186cIts, CLB_P2, LF82_P8, AL505_P2, T5 and T7 spotted on MG1655 strain and its isogenic derivatives chromosomally carrying the miniTnapsAB (*apsAB* under the control of the arabinose inducible promoter p_{BAD}) or the miniTnzeoR as a negative control. Experiments were performed in three independent biological replicates and showed reproducible results. A representative experiment is shown. Dilution factor is indicated in Log₁₀. Source data are provided at the end of this .pdf file.



Supplementary Figure 5: Effect of mutations replacing key residues of the putative helicase (K221A, E533A) or nuclease (K1435A) domains of ApsA and of the predicted 5' nucleic acid binding domains (K413A) of ApsB on pOXA-48_2 and pOXA-48_3 maintenance. *apsAB* and variants were expressed under the control of the p_{BAD} inducible promoter in ST38_1 Δ F3141-F3140 transconjugants. t0 refers to the value obtained following one 24h-passage in LB glucose (0.4%) and t1 to the value determined after two additional passages in LB arabinose (0.02%). pHV7-empt is a negative control. Figures show the results from three biologically independent experiments. Boxplots show median, box bounds 25th and 75th quartiles, whisker bounds minimum and maximum excluding outliers and outliers are value $> 1.5 \times$ interquartile range. Source data are provided as a Source Data File.



Supplementary Figure 6: Conserved residues in ApsB MID-like domain. Multiple alignment of ApsB-like proteins showed different conserved residues indicated in blue. The parameters Conservation, Quality, Consensus and Occupancy of amino acids are indicated below the alignment. The sequence logo generated by WebLogo [<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>] highlights the conserved residues. The list of ApsB-like proteins is provided in Supplementary Data 7.

Supplementary Table 1 : Meropenem MIC of plasmid-free strains, transconjugants and Tn6237 integrants

MICs of strains before experimental evolution

Strains	&Plasmid	MIC meropenem $\mu\text{g}/\text{mL}^{\#}$
ST38_1	-	0.023
ST38_1 transconjugant Z103	pOXA-48_1	0.5
ST38_1 transconjugant Z112	pOXA-48_2	0.5
ST38_1 transconjugant Z122	pOXA-48_3	0.5
ST38_2	-	0.032
ST38_2 transconjugant Z3	pOXA-48_1	0.25
ST38_2 transconjugant Z41	pOXA-48_2	0.25
ST38_2 transconjugant Z62	pOXA-48_3	0.25
ST38_3	-	0.047
ST38_3 transconjugant Z142	pOXA-48_1	0.38
ST38_3 transconjugant Z147	pOXA-48_2	0.38
ST38_3 transconjugant Z152	pOXA-48_3	0.38

&: a dash indicates the recipient strain not carrying a pOXA-48 plasmid

MICs of strains with Tn6237 chromosomal integration (after experimental evolution)

Strains	Experimental evolution	MIC meropenem $\mu\text{g}/\text{mL}^{\#}$	Complementary informations
3E-p12	ST38_1/pOXA-48_1	0.25	Tn6237 integration in IncF plasmid in <i>FIEDEJGE_04811</i>
5A-p14	ST38_1/pOXA-48_1	0.25	Tn6237 integration between <i>FIEDEJGE_02264</i> and <i>gadW</i> . One mutation in <i>malt</i>
5B-p16	ST38_1/pOXA-48_1	0.25	Tn6237 integration in IncF plasmid in <i>yhcR</i>
N2_p45	ST38_2/pOXA-48_1	0.5*	Tn6237 integration in <i>kup</i> + IS1 insertion in <i>ompF</i> promotor (position -56)
N5_p48	ST38_2/pOXA-48_1	0.5*	Tn6237 integration in <i>pelX</i> + Mutation R78W in <i>envZ</i>

#: Determined by E-test. Three biologically independent experiments were performed for each strain with reproducible results.

*: MIC of ST38_2 integrated strains is twice the one of the original transconjugant due to mutations in *ompF* and *envZ* genes involved in bacterial outer membrane permeability.

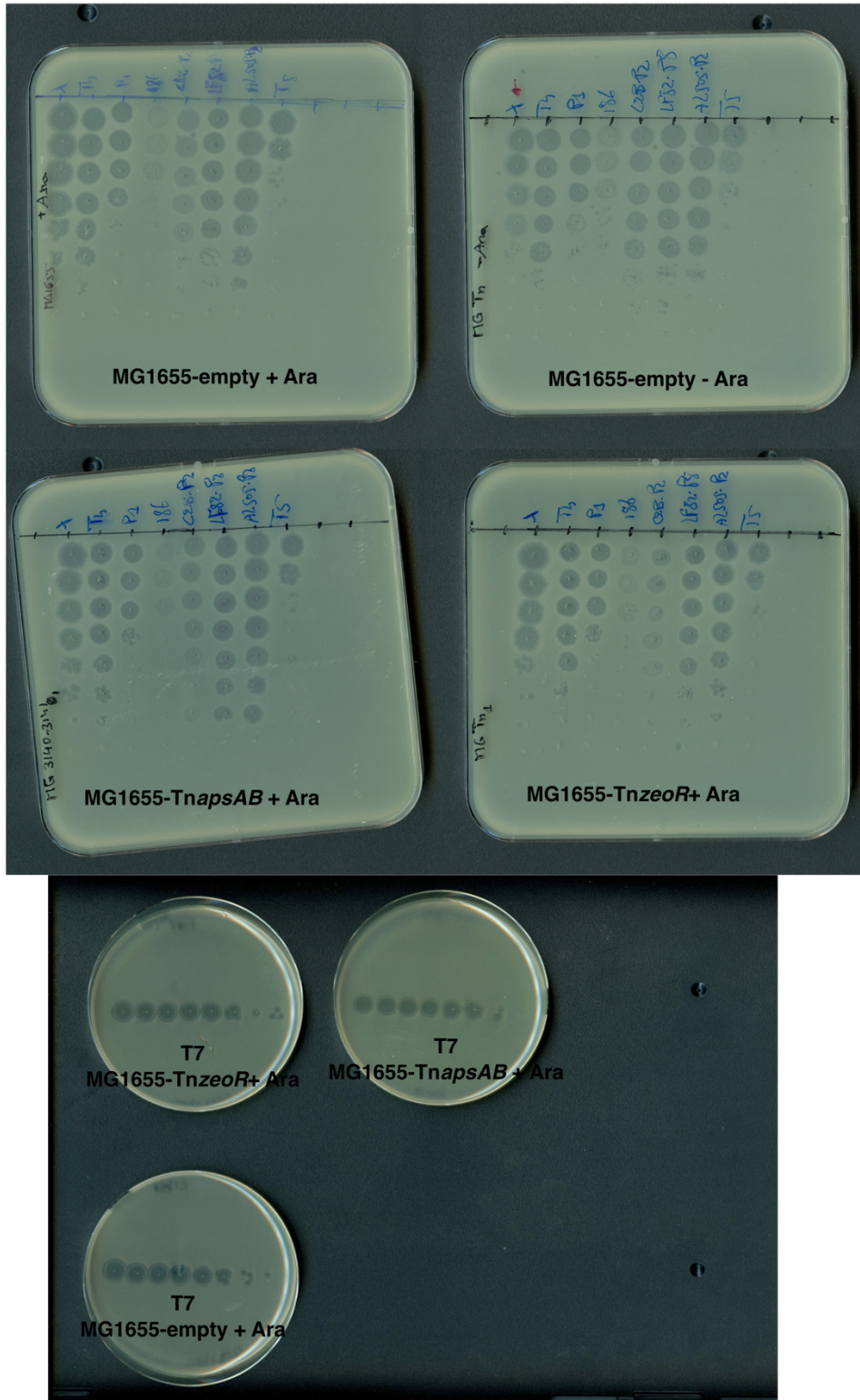
Supplementary Table 2 : Summary of the different evolution experiments.

Evolution experiment	Recipient strain	Plasmid &	Strain #	Medium	Condition *	Lineages
Experimental evolution 1 (Fig. 2)						
ST38_1/LB/No MEM	ST38_1	-	ST38_1	LB medium	No MEM	1A,1B,1C,1D,1E
ST38_1/POXA-48 1/LB/MEM/day		pOXA-48_1	Z103	LB medium	MEM / day	3A,3B,3C,3D,3E
ST38_1/POXA-48 1/LB/MEM/3 days		pOXA-48_1	Z103	LB medium	MEM / 3 days	5A,5B,5C,5D,5E
Experimental evolution 2 (Fig. 3)						
ST38_1/LB/No MEM	ST38_1	-	ST38_1	LB medium	No MEM	A1,A2,A3,A4,A5
ST38_1/POXA-48 1/LB/MEM/3 days		pOXA-48_1	Z103	LB medium	MEM / 3 days	B1,B2,B3,B4,B5
ST38_1/POXA-48 2/LB/MEM/3 days		pOXA-48_2	Z112	LB medium	MEM / 3 days	C1,C2,C3,C4,C5
ST38_1/POXA-48 3/LB/MEM/3 days		pOXA-48_3	Z122	LB medium	MEM / 3 days	D1,D2,D3,D4,D5
Experimental evolution 3 (Fig. 3)						
ST38_2/LB/No MEM	ST38_2	-	ST38_2	LB medium	No MEM	2A,2B,2C,2D,2E
ST38_2/POXA-48 1/LB/MEM/day		pOXA-48_1	Z5	LB medium	MEM / day	4A,4B,4C,4D,4E
ST38_2/POXA-48 1/LB/MEM/3 days		pOXA-48_1	Z5	LB medium	MEM / 3 days	6A,6B,6C,6D,6E
ST38_3/LB/No MEM	ST38_3	-	ST38_3	LB medium	No MEM	E1,E2,E3,E4,E5
ST38_3/POXA-48 1/LB/MEM/3 days		pOXA-48_1	Z142	LB medium	MEM / 3 days	F1,F2,F3,F4,F5
Experimental evolution 4 (Fig. 3)						
ST38_2/M9/No MEM	ST38_2	-	ST38_2	M9 medium	No MEM	M1,M2,M3,M4,M5
ST38_2/POXA-48 1/M9/MEM/3 days		pOXA-48_1	Z3	M9 medium	MEM / 3 days	N1,N2,N3,N4,N5
Experimental evolution 5 (Fig. 6)						
ST38_1/LB/No MEM	ST38_1	-	ST38_1	LB medium	No MEM	O1,O2,O3,O4,O5
ST38_1 Δ apsAB/POXA-48 1/LB/MEM/3 days		pOXA-48_1	Z103 Δ apsAB	LB medium	MEM / 3 days	P1,P2,P3,P4,P5

&: a dash indicates the parental strain not carrying a pOXA-48 plasmid

#: Refers to the ancestor of evolved lineages. See Supplementary Data 1.

*: MEM: meropenem at 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.



Source data for Supplementary Figure 4

Chapitre 3 : Résultats préliminaires sur l'origine du coût de fitness lié à l'acquisition des plasmides pOXA-48

1. Introduction

L'existence d'un coût de fitness lié à l'acquisition de plasmides a été observée dans de nombreuses études (Carroll et Wong 2018; Starikova et al. 2013). L'origine de ce coût de fitness n'est pas totalement élucidée et diverses explications ont été proposées : déplétion des ressources énergétiques ou des métabolites liée à la réplication du plasmide ou à la transcription des gènes plasmidiques, interférences avec l'expression de gènes chromosomiques (Carroll et Wong 2018; San Millan et MacLean 2017). Il a été montré que des mutations compensatoires sur le plasmide ou le chromosome permettent fréquemment d'abolir le coût du plasmide (Hall et al. 2020, 2021). Comme mentionné précédemment, l'acquisition des plasmides pOXA-48 provoque un coût de fitness pour l'hôte (DelaFuente et al. 2022). L'impact sur le fitness de l'hôte provoqué par les plasmides pOXA-48 est dépendant du fond génétique (Alonso-del Valle et al. 2021).

Dans l'étude réalisée dans le chapitre 2, trois plasmides différents pOXA-48 ont été transférés par conjugaison dans trois souches ST38 différentes pour évaluer le coût de fitness lié à l'acquisition de ces plasmides. Nous avons observé que la présence de chacun des trois plasmides provoquait un coût de fitness dans les différents hôtes, avec un coût de fitness plus important dans la souche ST38_1 par rapport à ST38_2 et ST38_3 dans lesquelles le coût de fitness n'était induit qu'en milieu minimum.

L'intensité du coût de fitness induit par pOXA-48 dans les transconjugants ST38-1 s'est révélé comme un paramètre majeur dans l'émergence de lignées porteuses de *bla*_{OXA-48} dans le chromosome. Dans le fond génétique ST38_1, l'acquisition de pOXA-48_1 entraîne une augmentation du temps de doublement d'environ 15% comparé à la souche sans plasmide. Ce coût de fitness est considérablement réduit mais pas complètement aboli après intégration du transposon Tn6237 dans le chromosome. Il est réduit aussi, mais dans des proportions moindres, par l'inactivation du système antiplasmide ApsAB. Ceci suggère que le coût de fitness dépend à la fois de fonctions portées par le chromosome et par le plasmide et m'a conduit :

- À chercher à identifier des mutations compensatoires. Par exemple, le système ApsAB s'est révélé comme un des éléments impliqués dans le coût de fitness observé dans ST38_1, ST38_2 et ST38_3. De manière plus accidentelle l'analyse des coûts de fitness induits par pOXA-48 dans les transconjugants ST38_1 de départ m'a permis aussi d'identifier un transconjugant, muté dans *envZ*, dans lequel le coût de fitness était quatre fois moins élevé par rapport aux autres transconjugants.
- À analyser les conséquences sur le fitness de diverses délétions dans le plasmide pOXA-48.
- À étudier le coût de fitness induit par des plasmides proches différant par leur structure.

2. Rôle de la mutation EnvZ-I86L dans le fitness et la CMI au méropénème de ST38_1

Parmi les cinq transconjugants isogéniques ST38_1/pOXA-48_1 testés, un transconjugant avait un coût de fitness quatre fois moins élevé comparé aux quatre autres transconjugants. Le séquençage de ce transconjugant a permis d'identifier une seule mutation dans le gène codant pour EnvZ induisant un changement d'acide aminé I vers L en position 186. La protéine EnvZ est une protéine transmembranaire constituant avec le répondeur-régulateur OmpR, le système à deux composants EnvZ-OmpR impliqué dans la régulation l'expression des porines majeures OmpC et OmpF (Figure. 31). EnvZ est la protéine senseur du système qui perçoit les changements d'osmolarité et de pH dans l'environnement activant une cascade de signalisation conduisant à l'activation par phosphorylation en N-terminal du régulateur OmpR doté d'un domaine de liaison à l'ADN en C-terminal. Les sites de liaison d'OmpR sont localisés au niveau des promoteurs des gènes *ompC* et *ompF* (Kenney et Anand 2020). Les mutations dans *envZ* perturbent l'expression des gènes *ompC* et *ompF* (Trampari et al. 2022) ainsi que le fitness de l'hôte (Card, Jordan, et Lenski 2021).

La mutation I86L s'est produite dans une boucle d'EnvZ exposée dans le périplasma. Le rôle de cette boucle périplasmique est assez mal compris. Il a été montré qu'elle interagit avec MzrA, une protéine membranaire modulant l'activité de EnvZ. L'augmentation d'expression de MzrA notamment lors d'un stress d'enveloppe conduit à une augmentation de la phosphorylation de OmpR aboutissant directement ou indirectement à une diminution de l'expression des porines et à la réduction du stress d'enveloppe (Gerken et Misra 2010).

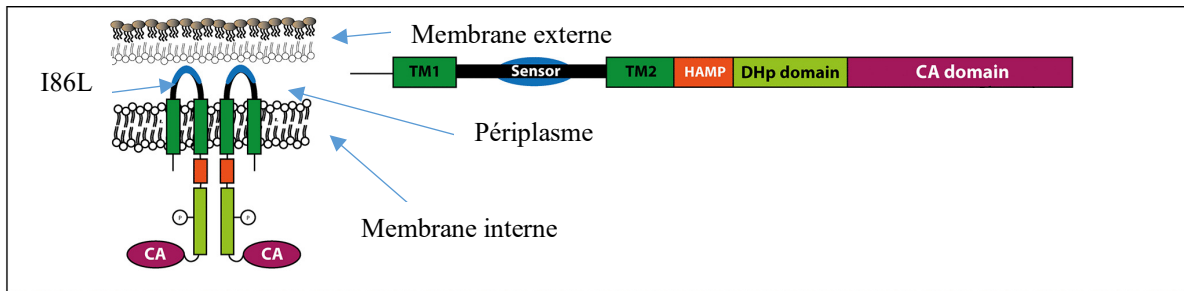


Figure 31 : Représentation schématique d'EnvZ dans l'enveloppe cellulaire. En vert foncé les domaines transmembranaires (TM1-2), dans le périplasma entre les deux TM on a le domaine senseur (boucles), en orange le domaine HAMP permettant la transduction du signal aux domaines cytoplasmiques d'EnvZ, en vert claire le domaine DHp qui contient His-243 catalyse l'autophosphorylation et en violet le domaine C-terminal (CA) qui contient le site catalytique doté du site de liaison à l'ATP. La mutation I86L est indiquée. Adapté de (Trampari et al. 2022).

J'ai montré que cette mutation entraîne une augmentation de la CMI de deux fois, qui passe de 0,25 $\mu\text{g/ml}$ chez le transconjugant isogénique sans la mutation à 0,5 $\mu\text{g/ml}$ (Figure. 32a). De façon inattendue, la mutation EnvZ-I86L entraîne une baisse du coût de fitness lié à l'acquisition de pOXA-48_1 passant de 15% à 4% soit une réduction d'environ quatre fois (Figure. 32b).

Pour comprendre le rôle de cette mutation dans l'augmentation de la CMI et la réduction du coût de fitness, j'ai effectué une RT-qPCR des gènes *ompF* et *ompC*. Ceci m'a permis de quantifier le niveau d'expression de ces gènes chez la souche sauvage sans plasmide, le mutant et le transconjugant isogénique sans la mutation. Cette quantification a révélé une diminution de trois fois du niveau d'expression de *ompF* dans la souche mutée par rapport au transconjugant sans mutation et à la souche sauvage sans plasmide. Cependant, l'expression d'*ompC* n'est pas affectée par cette mutation (Figure. 32c). Aucune variation d'expression des porines n'est observée dans le fond ST38_1 sauvage en fonction de la présence ou de l'absence du plasmide.

En comparant le niveau d'expression d'*ompC* et *ompF* en milieu riche entre la souche sauvage sans plasmide et le transconjugant sans mutation EnvZ-I86L, nous avons constaté que les

valeurs Ct moyennes d'*ompC* sont de 10,99 et 11,29 pour la souche sauvage et le transconjugant respectivement contre 16,49 et 16,19 pour *ompF* pour la souche sauvage et le transconjugant respectivement. Cela indique que *ompC* est exprimé à un niveau beaucoup plus élevé que *ompF* en milieu riche comme attendu (Kenney et Anand 2020). La variation de fitness et de MIC dans ce mutant qui touche essentiellement l'expression de *ompF* est donc inattendue. L'augmentation de la MIC tendrait à suggérer que l'entrée du mérépénème se fait essentiellement par OmpF, notamment dans les souches ST38 dans lesquelles le diamètre du pore pour OmpC est réduit par rapport aux variants exprimés dans d'autres ST (Patiño-Navarrete et al. 2022).

Nous avons observé également que malgré l'amélioration de fitness, le plasmide pOXA-48_1 est toujours instable chez ce mutant suggérant que le système ApsAB cible activement les plasmides sans distinction du coût de fitness provoqué par ces derniers comme observé dans les fonds génétiques ST38_2 et ST38_3 dans le chapitre 2 (Figure. 32d).

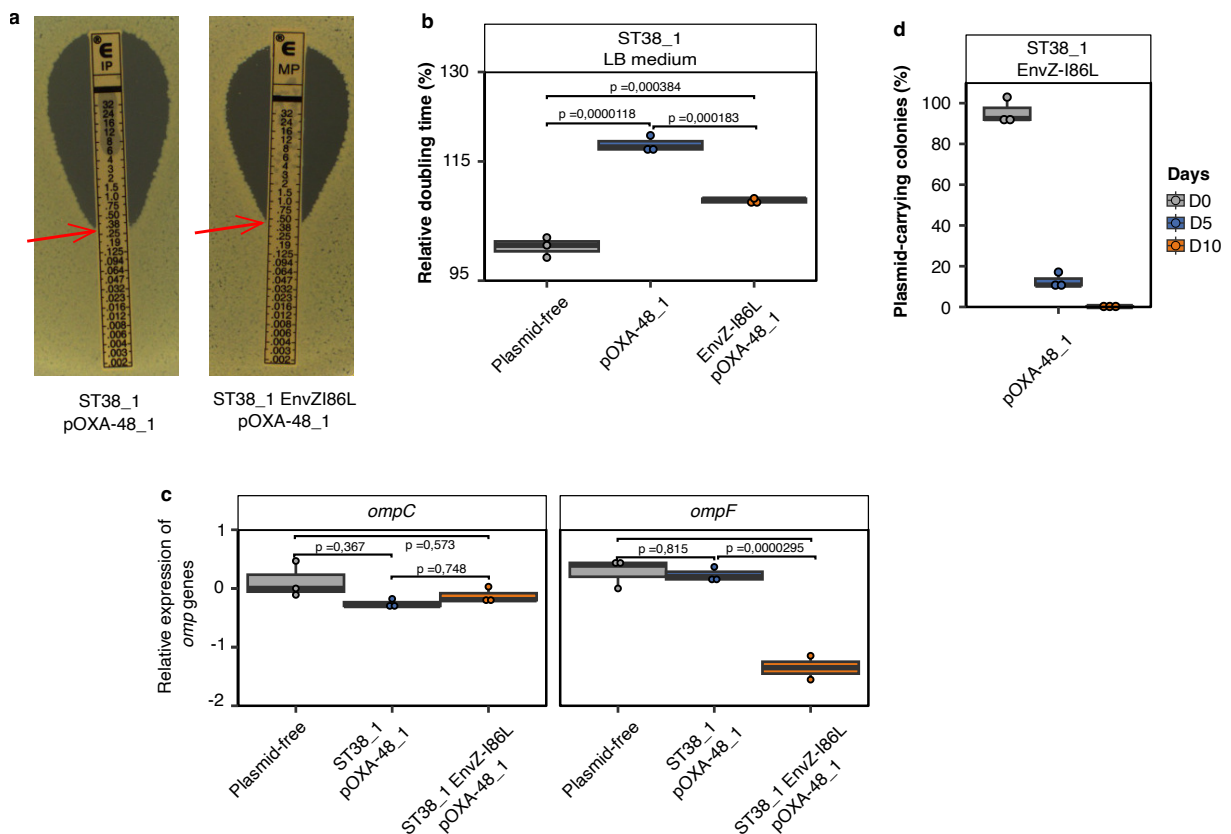


Figure 32 : Mesure du coût de fitness, de la CMI du mutant EnvZ186L ainsi que la stabilité de pOXA-48_1. a. Mesure de la CMI au mérépénème du mutant EnvZ- I86L et du transconjugant sans mutation par Etest, la flèche rouge indique l'intersection de lecture. **b.**

Mesure du temps de doublement relatif de la souche parentale, du mutant et du transconjugant sans mutation. Trois expériences indépendantes ont été réalisées et chaque point représente le temps moyen des cinq répliquas techniques. La normalité des données a été évaluée en utilisant le test de Shapiro. Les *p*-values ont été calculées avec un test t de Student à deux échantillons et deux extrémités et corrigées suivant la correction Benjamini-Hochberg (FDR). **c.** Mesure du niveau d'expression des gènes *ompF/C* chez la souche sauvage, le mutant et le transconjugant sans mutation en utilisant la formule du $\Delta\Delta Ct$. La normalité des données a été évaluée en utilisant le test de Shapiro. Les *p*-values ont été calculées avec un test t de Student à deux échantillons et deux extrémités et corrigées suivant la correction Benjamini-Hochberg (FDR). **d.** Mesure de la stabilité de pOXA-48_1 chez le mutant EnvZ-I86L après passage de 10 jours sans pression de sélection avec une dilution au 1/200. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

3. Coût de fitness des mutants pOXA-48_1 dans la souche ST38_1

Pour déterminer une origine plasmidique du coût de fitness lié à pOXA-48_1 dans la souche ST38_1, nous avons délété différentes régions du plasmide dont le gène *nuc*, le système toxine-antitoxine *pemIK*, la région *pemIK-nuc*, la région *parAB-nuc*, et les régions situées entre *mob* et *excA* et entre *nuc* et *excA* (Figure. 33a). De façon inattendue, aucune de ces délétions n'a entraîné une abolition même partielle du coût de fitness. Nous avons au contraire observé une augmentation du coût de fitness (déterminé sur la base du temps de doublement) de 3%, 18%, 64% et 74% par rapport au transconjugant original ST38_1/pOXA-48_1 chez les mutants *nuc*, *parAB-nuc*, *nuc-excA* et *pemIK-nuc* respectivement (Figure. 33b). Les délétions de *mob-excA* et *pemIK* n'entraînent pas de changement de fitness comparé au transconjugant original suggérant que le coût de fitness n'est pas lié à la fréquence de conjugaison élevée de pOXA-48_1 ni au système toxine-antitoxine du plasmide (Figure. 33b).

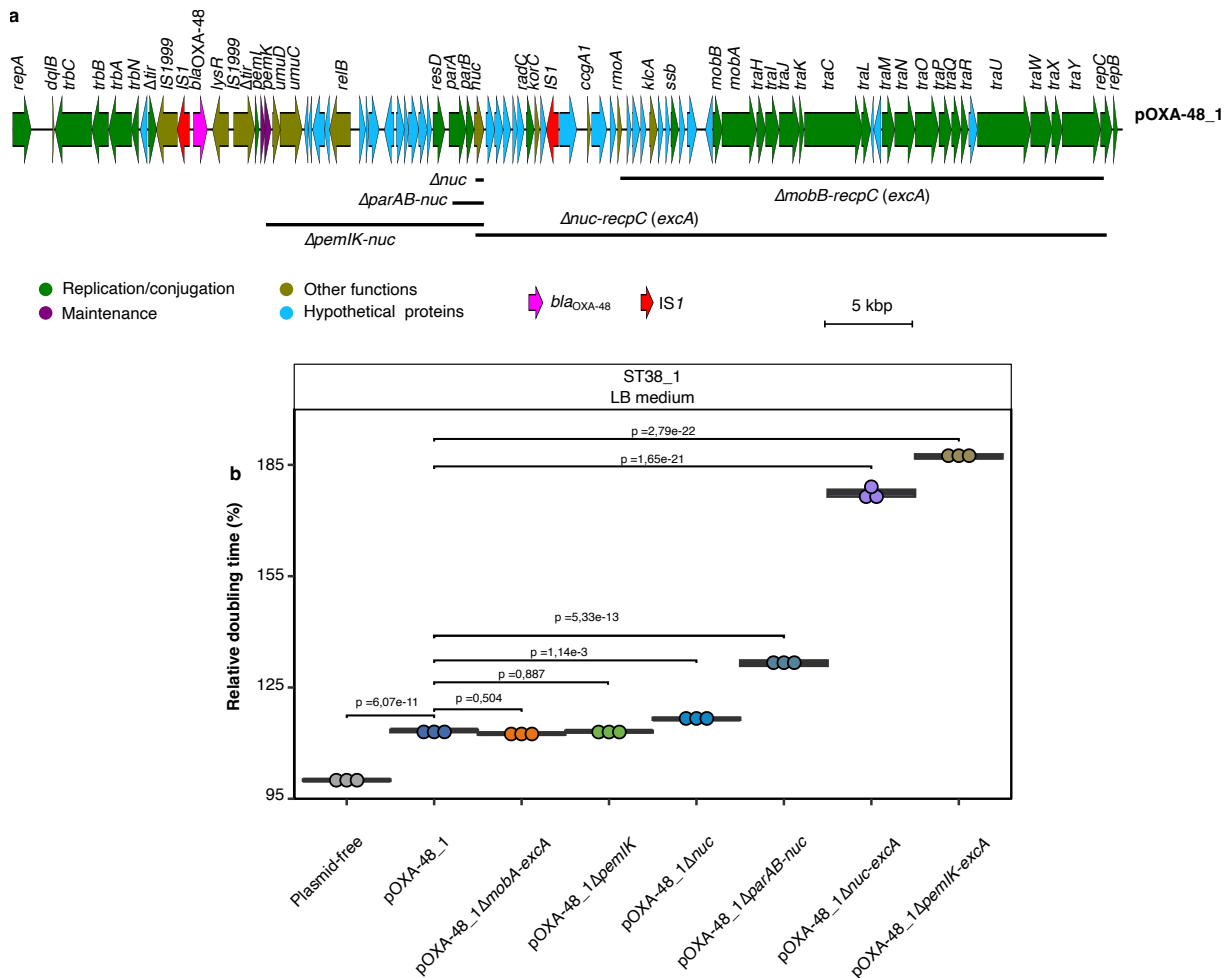


Figure 33 : Mesure du coût de fitness des mutants de délétion pOXA-4_1 dans ST38_1. a. Carte de délétion du plasmide pOXA-48_1 **b.** Mesure du temps de doublement relatif de la souche parentale, du transconjugant et des mutants délétés. Trois expériences indépendantes ont été réalisées et chaque point représente le temps moyen des cinq réplicas techniques. La normalité des données a été évaluée en utilisant le test de Shapiro. Les *p*-values ont été calculées avec un test t de Student à deux échantillons et deux extrémités et corrigées suivant la correction Benjamini-Hochberg (FDR).

4. Coût de fitness lié à l'acquisition du plasmide pKp1-3

Le plasmide pKp1-3 (N° d'accèsion CP023419.1) est un plasmide IncL apparenté aux plasmides pOXA-48. Il diffère du plasmide pOXA-48_1639 (N° d'accèsion LR025105.1) et de pOXA-48_1 de notre étude par seulement sept SNPs. En plus des sept SNPs, pKp1-3 contient un intégron de classe 1 contenant le gène *bla*_{VIM-1} et six autres ARGs (*aacA4*, *dfrB1*, *ant1*, *cat*, *emrE*, and *folP_4*) et cinq ARGs localisé à proximité de cet intégron (*catA1*, deux *msrE_1* et deux *mphE*) (Cabanel et al. 2021). À la différence de pOXA-

48_1 dans lequel le gène *tir* codant pour la protéine inhibitrice de la conjugaison est interrompu par Tn1999, ce gène est intact dans pKp1-3 (Figure. 34a). Afin de déterminer si l'interruption de *tir* pourrait intervenir dans le coût de fitness élevé de pOXA-48_1 chez ST38_1, nous avons introduit le plasmide pKp1-3 dans ST38_1 par conjugaison et mesuré le coût de fitness de ce plasmide. L'analyse du fitness du transconjugant ST38_1/pKp1-3 a révélé que le plasmide pKp1-3 induit peu de coût de fitness (environ 4%) dans ST38_1, soit un coût de fitness environ quatre fois inférieur au coût provoqué par pOXA-48_1 dans la même souche. Ceci suggère que le coût de fitness est principalement lié à la structure du plasmide IncL pOXA-48_1 (Figure. 34b) et suggère qu'il pourrait être lié à l'interruption de *tir*. Nous avons néanmoins constaté que pKp1-3 est aussi déstabilisé par le système ApsAB malgré un faible coût de fitness (Figure. 34c).

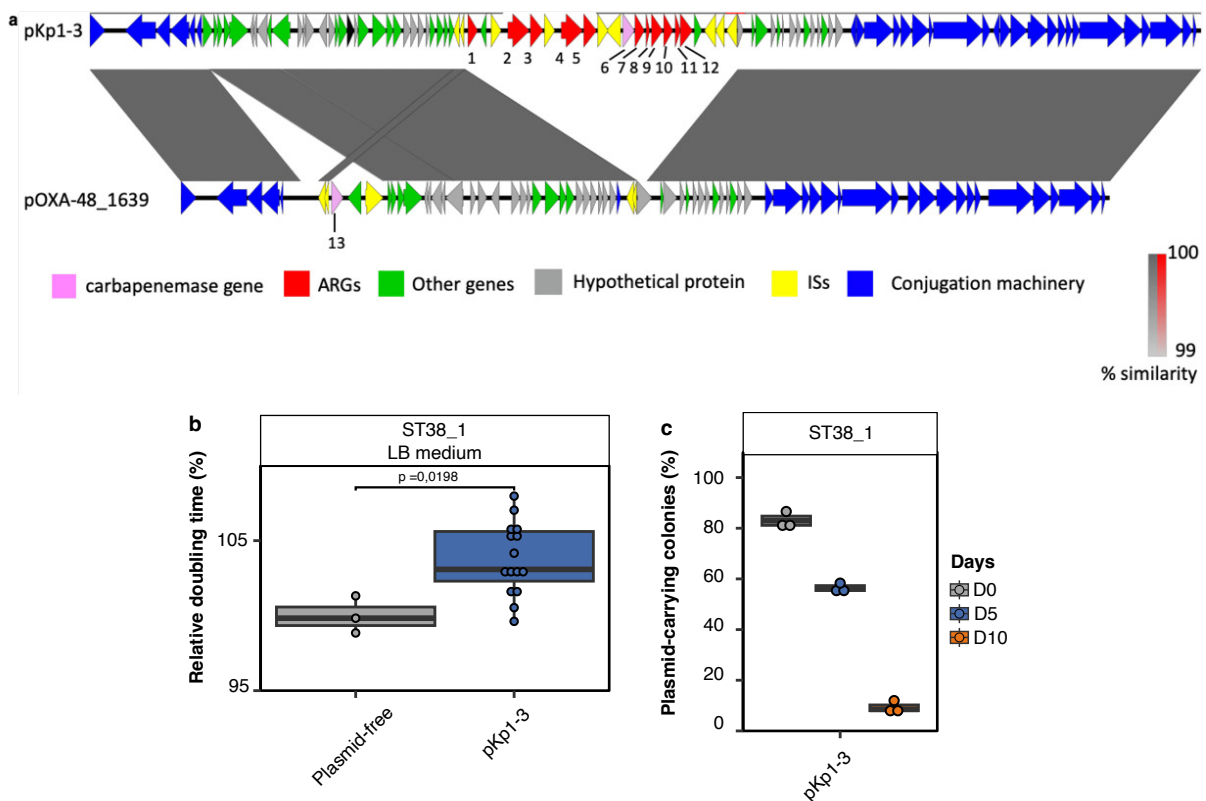


Figure 34 : Mesure du coût de fitness et de la stabilité de pKp1-3 dans ST38_1. a. Alignement de séquence entre pKp1-3 et pOXA-1639 identique à pOXA-48_1. Les ARGs en rouge sont numérotés. Adapté de (Cabanel et al. 2021). **b.** Mesure du temps de doublement relatif de la souche parentale et du transconjugant. Trois expériences indépendantes ont été réalisées et chaque point représente le temps moyen des cinq répliques techniques. La normalité des données a été évaluée en utilisant le test de Shapiro. La *p*-value a été calculée avec un test *t* de Student à deux échantillons et deux extrémités et corrigée suivant la correction Benjamini-

Hochberg (FDR). c. Mesure de la stabilité de pKp1-3 dans la souche ST38_1 après passage de 10 jours sans pression de sélection avec une dilution au 1/200. Trois expériences indépendantes ont été réalisées.

5. Discussion et perspectives des résultats préliminaires

Dans nos expériences d'évolution, le coût de fitness important induit par les plasmides pOXA-48 dans la souche ST38-1 a constitué un facteur important pour la sélection de souches possédant une copie intégrée de *bla*_{OXA-48}. Ceci m'a conduit à chercher à comprendre l'origine de ce coût de fitness. Bien que ne permettant pas de conclure, les expériences rapportées ici suggèrent que ce coût de fitness fait intervenir des éléments liés au plasmide et des éléments liés à la physiologie de la souche ST38_1. En effet le plasmide pKp1-3 qui est très proche de pOXA-48 n'induit qu'un coût de fitness réduit.

Parmi les cinq transconjugants ST38_1/pOXA-48 séquencés juste après la conjugaison, un présentait un meilleur fitness. La seule mutation détectée dans ce transconjugant concernait le gène *envZ*. Plus précisément cette mutation transforme une Isoleucine en Leucine dans le domaine périplasmique de la protéine. Le rôle du domaine périplasmique de EnvZ n'est pas encore totalement compris. Notamment il semble n'être que peu impliqué dans le sensing de l'osmolarité, l'osmorégulation constituant une des fonctions majeures de EnvZ. Par contre, il interagirait avec MzrA une protéine qui module l'activité de EnvZ, notamment en réponse à un stress de membrane (Gerken et Misra 2010). L'isoleucine 86 est proche du motif VVPPA (Aminoacides 71 à 75) requis pour l'interaction avec MzrA (Motz et Jung 2018). Une hypothèse est que sa mutation pourrait perturber l'interaction entre les deux protéines.

EnvZ est impliquée dans la régulation de l'expression des porines et il a été montré que des mutations dans le domaine C-terminal de EnvZ entraînaient une diminution de l'expression de *ompF* et une augmentation de l'expression de *ompC* associée à une augmentation de la résistance au cefotaxime (Trampari et al. 2022). Une autre étude a montré que les mutations dans EnvZ entraînaient un coût de fitness pour l'hôte (Card, Jordan, et Lenski 2021). Dans notre étude, bien que la mutation dans le senseur de EnvZ-I86L provoque une baisse de l'expression de *ompF* qui pourrait expliquer l'augmentation de la résistance au méropénème, on voit que l'expression de *ompC* n'est pas affectée comme dans le cas des mutations dans le domaine C-terminal. Ce découplage entre les variations d'expression des deux porines est

inhabituel et ne peut pas facilement s'expliquer par une variation du niveau de phosphorylation de OmpR. Sauf si le niveau d'expression de *ompC* est déjà maximum dans le milieu utilisé.

Il doit être remarqué qu'aucune variation d'expression de *ompF* dans le transconjugant de la souche sauvage par rapport à la souche sans plasmide n'est observée. De même, aucune mutation dans les gènes *ompF*, *envZ*, *ompR* ou *mzrA* ou dans les régions adjacentes ne différencie ST38_1 des souches ST38_2 et ST38_3. Ceci suggère qu'un niveau dérégulé de *ompF* n'est pas directement responsable du coût de fitness dans la souche ST38_1 sauvage. Néanmoins, cela devra être vérifié en analysant l'expression au niveau de la protéine, dans des préparations enrichies en protéines de l'enveloppe dans la souche ST38-1 sauvage porteuse ou non de pOXA-48 et dans la souche mutée. Cela permettra de déterminer si la traduction de la protéine ou son intégration dans la membrane externe ne sont pas perturbées en présence de pOXA-48.

Outre les porines OmpC et OmpF, le système EnvZ/OmpR est impliqué dans la régulation de nombreux autres gènes (Oshima et al. 2002). La variation d'expression de *ompF* dans le mutant EnvZ-I86L pourrait n'être qu'un révélateur d'autres fonctions perturbées chez le transconjugant ST38_1 et pour lesquelles une modification de l'activation du système EnvZ/ompR entraînerait un effet bénéfique. Afin d'explorer cette hypothèse, il serait intéressant d'effectuer des expériences de RNAseq (séquençage du transcriptome entier) de la souche parentale ST38_1, du mutant ST38_1-EnvZ-I86L en présence et en absence de pOXA-48 et de rechercher les voies de régulation modifiées dans le transconjugant. Les gènes régulateurs et certains de leurs gènes cibles, notamment ceux dont la séquence varie entre ST38_1 et les deux autres souches ST38 étudiées, pourraient ensuite être ciblés par des mutations dirigées pour évaluer leur rôle dans le coût de fitness.

Les plasmides pKp1-3 et pOXA-48 diffèrent essentiellement par l'insertion des gènes de résistance à des positions différentes dans le squelette des plasmides. Contrairement à pOXA-48, pKp1-3 induit peu de coût de fitness dans ST38_1. Dans pOXA-48 l'insertion de Tn1999 interrompt le gène *tir*. Cette inactivation de *tir* conduirait à l'augmentation de l'efficacité de conjugaison observée pour pOXA-48. Une protéine identique exprimée par le plasmide R100 est impliquée dans l'inhibition de transfert du plasmide RP4 (Tanimoto et al. 1985). Mais le mécanisme de cette inhibition n'a pas été élucidé. Afin de déterminer si une modification d'expression du module de conjugaison, entraînée par l'inactivation de *tir*, pourrait expliquer le coût de fitness induit par pOXA-48, nous avons délété ce module dans le plasmide pOXA-48. La délétion du module de conjugaison n'entraîne pas d'amélioration de fitness dans les

transconjugants, contrairement à ce qui a été observé pour d'autres plasmides. De manière générale aucune des délétions introduites dans le plasmide pOXA-48 n'a permis d'améliorer le coût de fitness. Au contraire nous avons observé que la délétion du système de partition *parAB-nuc* et toutes les délétions comprenant une partie de ce système entraînent une forte augmentation du coût de fitness (Figure. 33b). Il serait intéressant de vérifier, par exemple par RT-qPCR, que dans ST38-1, la diminution de fitness ne serait pas liée à une diminution de l'expression de ce système.

Le gène *tir* code pour une protéine de 217 acides aminés possédant sept hélices intramembranaires. Une analyse par Blastp suggère que la protéine Tir pourrait appartenir à la famille des protéases CAAX, une famille d'endoprotéases intramembranaires. Sa surexpression a été montrée toxique pour la croissance bactérienne, peut-être au travers d'une perturbation de la structure membranaire (Mierzejewska, Kulińska, et Jagura-Burdzy 2007). Dans pOXA-48 le gène *tir* tronqué est placé sous le contrôle d'un promoteur fort (Anaïs Potron, Poirel, et Nordmann 2014). Une autre hypothèse serait que l'insertion de Tn1999 à peu près aux deux tiers de la séquence de *tir* génère une protéine tronquée à 4 hélices transmembranaires et que la présence de cette protéine tronquée dans la membrane perturbe l'activité d'autres protéines à domaines intramembranaires. Cela serait compatible avec la réduction du coût de fitness observé après intégration du Tn6237 dans le chromosome, entraînant la perte de la partie N-terminale de Tir.

Pour vérifier si l'interruption de *tir* dans pOXA-48_1 est à l'origine du coût de fitness élevé dans ST38_1, une expérience à envisager serait d'inactiver ce gène dans le plasmide pKp1-3 par recombinaison homologue et mesurer le fitness du mutant pKp1-3- Δ *tir* dans la souche ST38_1.

Discussion générale et perspectives

1. Stratégie expérimentale

Dans ce travail de thèse j'ai choisi l'évolution expérimentale pour étudier les facteurs qui influencent l'intégration chromosomique du gène *bla_{OXA-48}* chez les souches ST38 d'*E. coli*. L'évolution expérimentale est un outil de recherche qui permet d'étudier les processus évolutifs actifs dans une population donnée dans un environnement défini suivant des conditions particulières. Elle permet d'étudier l'adaptation via un processus similaire à la sélection naturelle, d'étudier les paramètres qui influencent l'évolution mais aussi de tester des hypothèses évolutives. En la combinant avec le séquençage génomique des colonies isolées durant l'évolution ou de la population totale évoluée, il est possible de caractériser les événements génomiques qui catalysent l'évolution de la population (Barrick et Lenski 2013; Kawecki et al. 2012). Nous avons fait évoluer différentes combinaisons ST38/pOXA-48 pendant 28 jours. Au début, nous avons appliqué deux conditions d'évolution, l'ajout de méropénème tous les jours et tous les trois jours. L'absence de différence dans l'évolution du fitness des populations totales évoluées entre les deux conditions nous a amené à choisir la condition avec l'ajout du méropénème tous les trois jours. Cela afin potentiellement de réduire la pression antibiotique et de limiter la sélection de mutations de résistance, notamment dans les gènes de porines, qui peuvent influencer les résultats de l'évolution en permettant la survie des bactéries même après la perte du gène *bla_{OXA-48}*.

Il est connu que pOXA-48 induit un coût de fitness variable qui est dépendant du fond génétique (Alonso-del Valle et al. 2021). Effectivement, nous avons observé une augmentation du temps de génération d'environ 20% dans les transconjugants ST38_1 contre moins de 5% dans les transconjugants des deux autres souches en milieu riche. En revanche, cet effet était aussi dépendant du milieu puisqu'en milieu minimum l'augmentation du temps de génération est d'environ 10% dans les transconjugants ST38_1 et un peu plus de 5% dans les transconjugants ST38_2 et ST38_3 portant pOXA-48. Par conséquent, le milieu de culture choisi pour l'évolution expérimentale constitue en lui-même un facteur susceptible d'influencer le résultat de l'expérience d'évolution. Afin de conserver l'effet de ce facteur, nous avons pris soin d'utiliser un même lot de milieu durant chaque expérience d'évolution. L'évolution en milieu riche de ST38_1/pOXA-48_1 a conduit à la sélection de lignées dans lesquels *bla_{OXA-48}* était

intégré et qui étaient majoritaires après 28 jours d'évolution. Ces lignées présentaient un fitness nettement amélioré par rapport aux transconjugants. Néanmoins il est possible qu'une évolution des transconjugants ST38_1 en milieu pauvre, réduisant l'écart de fitness entre transconjugants et intégrants aurait conduit à une sélection moins franche de ces lignées portant l'intégration. Seuls les transconjugants ST38_2/pOXA-48_1 ont été évolués en milieu minimum, dans lequel leur fitness était le plus affecté. Malgré cela, ceci n'a conduit à la sélection que de deux colonies présentant l'intégration, à partir des cinq lignées évoluées parallèlement. Il aurait été intéressant de tester aussi l'évolution de la combinaison ST38_3/pOXA-48_1 en milieu minimum pour déterminer si les mêmes événements évolutifs étaient observables avec une fréquence comparable. En effet cette combinaison se comporte de la même manière que ST38_2/pOXA-48_1 en ce qui concerne le coût de fitness et la présence du système ApsAB.

Un autre point critique dans cette étude a été le choix des plasmides porteurs de *bla*_{OXA-48} et des souches donneuses. Parmi les trois plasmides transférés pOXA-48 (1 à 3), pOXA-48_1 est le seul à disposer du transposon Tn6237 (retrouvé dans les cas d'intégration chromosomique de *bla*_{OXA-48}). Ces trois plasmides provenaient de trois isolats cliniques de *K. pneumoniae*. Le choix de ces derniers comme souches donneuses a été motivé par le fait qu'en milieu hospitalier un transfert de pOXA_48 de *K. pneumoniae* vers *E. coli* a été fréquemment observé (León-Sampedro et al. 2021). Par ailleurs, cela nous a permis de facilement discriminer les transconjugants *E. coli* ST38 qui sont colorés en rose des donneuses colorées en violet sur milieu gélosé uriselect après la conjugaison. Rappelons que les plasmides pOXA-48 ont été décrits comme étant stables dans différentes espèces (Alonso-del Valle et al. 2021; Hamprecht et al. 2019; Sattler et al. 2022). Pourtant, dans notre étude, les trois plasmides sont instables dans nos receveuses ST38. Cette instabilité a été un élément clé de notre stratégie expérimentale. Elle a motivé le choix de l'ajout de méropénème lors de l'évolution expérimentale pour assurer le maintien du gène *bla*_{OXA-48} qu'il soit sur un nouveau support ou sur pOXA-48. La présence de Tn6237 dans pOXA-48_1 avec lequel nous avons observé un grand nombre d'intégrations, a permis de confirmer que l'insertion dans un nouveau réplicon se faisait par un mécanisme de transposition.

La pression antibiotique que nous avons utilisée lors de l'évolution (0,1 µg/ml de méropénème) est un point important de notre étude. Nous avons choisi cette concentration en fonction de la CMI des transconjugants (0,5 µg/ml, 0,25 µg/ml et 0,38 µg/ml de méropénème, respectivement pour ST38_1, ST38_2 et ST38_3) sans anticiper la baisse de CMI des bactéries avec

l'intégration qui est deux fois moins par rapport aux transconjugants ST38_1. Après évolution, nous avons isolé les colonies supposées avoir conservé le gène *bla*_{OXA-48} sur milieu solide en présence de la même concentration de méropénème. A partir de ces colonies isolées nous avons effectué un criblage par PCR pour déterminer celles qui avaient perdu le plasmide et pouvaient correspondre à des cas d'intégration. De manière surprenante le pourcentage de colonies qui avaient conservé le plasmide s'est révélé très supérieur lors de cette estimation à celui obtenu par séquençage de la population entière. Par exemple, lors de la première expérience d'évolution destinée à déterminer la fréquence d'ajout du méropénème avec la combinaison ST38_1/pOXA-48_1, pour les dix lignées évoluées de transconjugants, 14,75 à 93,75% des colonies obtenues après étalement avaient conservé le plasmide. En revanche, le séquençage de l'ADN des populations totales a révélé qu'au jour 28, presque 100% des colonies avait perdu pOXA-48_1 et conservé *bla*_{OXA-48}. Nous avons séquencé à partir de chaque lignée évoluée trois colonies qui avaient conservé *bla*_{OXA-48} et perdu le plasmide. Dans la majorité des cas le séquençage a révélé des sites d'intégration identiques pour les trois colonies, suggérant un nombre restreint de sites d'intégration. Au contraire, le séquençage des populations entières a révélé une hétérogénéité importante des sites d'intégration, représentés de manière variable dans la population. Ceci suggère que la majorité des bactéries avec l'intégration étaient sensibles à la concentration appliquée lors de la sélection en milieu solide et que seules celles avec la MIC la plus importante avaient été sélectionnées. Suivant l'emplacement des gènes, ceux à proximité de l'origine de répllication sont plus exprimés par rapport au reste du génome (Lato et Golding 2020). Une hypothèse pour expliquer nos résultats serait que, selon la position dans le chromosome des sites d'intégration le gène *bla*_{OXA-48} pourrait être plus ou moins exprimé, conduisant à une hétérogénéité des susceptibilités au carbapénème entre les bactéries porteuses de l'intégration. De ce fait, le séquençage des populations a révélé une proportion plus importante d'intégrations loin de *dnaA* que le séquençage des colonies isolées, suggérant que l'étalement des populations évoluées sur milieu avec antibiotique pouvait avoir modifié les populations observées. Étant donné que la même concentration de méropénème a été utilisée lors de l'évolution expérimentale et pour les étalements, ces résultats suggèrent que la pression antibiotique est différente selon que l'on fait la sélection sur milieu liquide ou solide. Ceci pourrait être lié à des effets de protection collective en milieu liquide qui pourraient ne pas être observés lors des étalements de cultures très diluées. Néanmoins, cette stratégie nous a permis de révéler la portion minoritaire de souches porteuses du plasmide dans lesquelles pOXA-48_1 était stabilisé. Le séquençage illumina de ces souches porteuses nous a permis de caractériser le système antiplasmide ApsAB sujet à des mutations récurrentes

Notre étude a été réalisée *in vitro* dans des conditions probablement très éloignées de ce qui se passe *in vivo*. Bien que les concentrations de méropénème utilisées soient potentiellement compatibles avec celles présentes dans le tube digestif, le milieu utilisé, l'absence de compétition avec la flore intestinale, l'absence de facteurs liés à l'hôte, ou d'interactions avec les bactériophages sont autant de facteurs susceptibles d'influencer la sélection des lignées après l'intégration. Une possibilité pour complexifier notre modèle serait par exemple de refaire ces expériences d'évolution *in vivo* chez une souris avec la combinaison ST38_1/pOXA-48_1 en présence de pression antibiotique et de caractériser les colonies résistantes dans les fèces en utilisant le séquençage génomique.

2. Coût de fitness et persistance des plasmides de résistance aux antibiotiques

Dans nos travaux, nous avons constaté que le coût de fitness lié à l'acquisition des plasmides pOXA-48 dans les souches ST38 avait au moins deux origines différentes. Premièrement, une origine liée à l'activité du système ApsAB observée dans les trois souches ST38. L'évolution expérimentale a conduit à la sélection de mutants ApsAB permettant de restaurer complètement le fitness des transconjugants ST38_2 et partiellement le fitness des transconjugants ST38_1. *apsAB* est localisé dans un îlot génomique donc acquis horizontalement par les souches ST38, la sélection des mutants de cet opéron indique un conflit génétique entre *apsAB* et pOXA-48. L'observation lors des expériences d'évolution expérimentale d'une interaction entre des gènes des îlots génomiques de l'hôte et des plasmides nouvellement acquis ne sont pas nouvelles :

- La mutation dans la séquence codante de l'hélicase *Xpd/Rad3* et celle en amont de l'hélicase *uvrD* augmentant son niveau d'expression, deux gènes localisés dans un îlot génomique, sont sélectionnées lors de l'évolution de la combinaison *Pseudomonas sp.*/plasmide de multirésistance RP4 conjugatif (60 kb) conduisant à une réduction du coût de RP4 et à sa stabilisation (Loftie-Eaton et al. 2017).
- Les mutations du gène PA1372 codant pour une hélicase et des deux gènes contigus PA4673.15-PA4673.16 codant pour des kinases, des gènes localisés dans des îlots génomiques, sont sélectionnées lors de l'évolution expérimentale de la combinaison *Pseudomonas aeruginosa*/plasmide de résistance pNUK73 non transmissible (5,13 kb) conduisant à une réduction du coût de pNUK73 et sa stabilisation (Millan et al. 2014).

- Les mutations dans le gène PFLU4242 codant pour une protéine hypothétique contenant un domaine endonucléase, un gène acquis horizontalement, sont sélectionnées lors de l'évolution de la combinaison *Pseudomonas fluorescens*/plasmides de résistance au mercure pQBR conjugatifs (>150kb) conduisant à une réduction du coût des plasmides pQBR et leur stabilisation (Hall et al. 2020, 2021).

Le point commun entre ces différents exemples est que les gènes ciblés sont impliqués dans le métabolisme de l'ADN, suggérant une interaction probablement directe entre les produits de ces gènes et les produits de gènes plasmidiques voire avec le plasmide lui-même générant des conflits génétiques coûteux pour l'hôte et provoquant l'instabilité des plasmides. Les mutations compensatoires de ces gènes, localisés dans des EGMs résidents, tendent donc à résoudre les conflits génétiques entre ces derniers et les EGMs nouvellement acquis. Dans notre étude, la sélection des mutants AspAB chez les ST38 suggère donc que son activité antiplasmide perturbe la physiologie de l'hôte en présence du plasmide ciblé.

Il a été montré que l'accumulation de l'ADN simple brin conduit à l'activation du système SOS chez la bactérie associée à un ralentissement de la croissance (Maslowska, Makiela-Dzbenka, et Fijalkowska 2019). On pourrait donc penser que la dégradation des plasmides pOXA-48 par ApsAB conduirait à la génération et l'accumulation d'ADN simple brin induisant le système SOS de l'hôte. Il est aussi possible que comme DdmABC qui cible le chromosome de l'hôte en présence de larges plasmides provoquant un ralentissement de la croissance (Jaskólska, Adams, et Blokesch 2022), ApsAB cible également le chromosome de l'hôte lorsqu'il est activé en présence des plasmides, ce qui provoquerait des dommages de l'ADN que l'hôte doit réparer. Ceci entraînerait aussi l'activation du système SOS de l'hôte pour la réparation de l'ADN. Afin de tester cette hypothèse, il faudrait quantifier le niveau d'expression des gènes du système SOS par RT-qPCR chez la souche hôte portant ApsAB en absence ou en présence de pOXA-48 pour détecter s'il y a une induction de leur expression.

Les plasmides pOXA-48 induisent un coût de fitness supplémentaire spécifiquement dans la souche ST38_1. L'inactivation de *apsAB* n'est pas suffisante pour compenser ce coût de fitness suggérant que ce ne sont pas uniquement les conflits génétiques entre *apsAB* et pOXA-48 qui sont à l'origine du coût de fitness élevé dans cette souche. Seule l'intégration chromosomique de *bla*_{OXA-48} associée à une perte du plasmide permet une résolution de la majorité du coût de pOXA-48 chez ST38_1 mais cette résolution n'est pas totale. En fait, contrairement à ST38_2 où l'intégration chromosomique de Tn6237 contenant *bla*_{OXA-48} entraîne une résolution

complète du coût du plasmide, chez ST38_1 on a toujours un coût résiduel d'environ 5% d'augmentation du temps de génération des souches intégrées que l'intégration soit sur le plasmide endogène IncF ou le chromosome. Cela suggérerait que Tn6237 conserverait le facteur plasmidique à l'origine du coût de fitness avec un effet réduit. En supposant que Tn6237 renferme le facteur plasmidique à l'origine du coût, on pourrait donc réaliser des délétions des gènes présents dans Tn6237 dans les souches intégrées pour rechercher un événement qui abolirait complètement le coût du plasmide. Il a également été montré qu'il y avait une corrélation entre le niveau d'expression de *bla_{OXA-48}* et le coût de pOXA-48 (DelaFuente et al. 2022). Dans cette étude, l'inactivation de *bla_{OXA-48}* abolit le coût du plasmide. Dans notre étude, l'intégration chromosomique de *bla_{OXA-48}* conduit à une réduction de deux fois de la CMI par rapport au portage plasmidique, on pourrait donc penser qu'une expression plasmidique plus élevée de *bla_{OXA-48}* génère un coût supplémentaire par la séquestration des protéines de l'hôte (San Millan et MacLean 2017).

L'intégration chromosomique de Tn6237 et l'inactivation d'*apsAB* chez ST38_2 abolissent complètement le coût de pOXA-48. Les mutants *apsAB* ST38_2 sont majoritaires au jour 28. Ceci indique qu'ils sont sélectionnés préférentiellement au détriment des intégrations. On pourrait penser qu'un processus non spécifique des intégrations de Tn6237 pourrait générer un coût pour l'hôte lorsque l'intégration se fait dans un gène important pour la croissance de la bactérie, ce qui entraînerait la contre-sélection de ces souches intégrées en faveur des mutations dans *apsAB*. Cela expliquerait la sélection des lignées *apsAB* inactivées dominantes au jour 28. Le fait que les souches intégrées soient majoritaires chez ST38_1 est dû au fait que l'intégration entraîne un gain de fitness plus important comparé aux mutants *ApsAB*. Ce qui fait que ces souches intégrées au coût réduit sont sélectionnées positivement. L'analyse des données de séquençage des populations montre que certaines intégrations apparues plus tôt chez ST38_1 ont disparu au jour 28. Cela est peut-être dû à une compétition entre les souches intégrées conduisant à la sélection de celles ayant un meilleur fitness. Il est également possible, que ce résultat soit lié à un biais de transfert notamment par la concentration de méropénème lors de l'évolution expérimentale conduisant à l'introduction d'un goulot d'étranglement dans les populations évoluées.

3. Systèmes de défense et évolution des bactéries résistantes aux antibiotiques

Les recherches récentes montrent que les interactions bactéries-EGMs sont très complexes. D'un côté, les bactéries contiennent une panoplie de systèmes de défense dont les systèmes CRISPR, RM et les pAgos très étudiés, qui les protègent contre l'invasion de l'ADN étranger tels que les phages, les plasmides et autres EGMs (Boyle et Hatoum-Aslan 2023; Doron et al. 2018; Lisitskaya et al. 2023; Mayo-Muñoz et al. 2023; Millman et al. 2022; Rousset et al. 2022; Ryazansky, Kulbachinskiy, et Aravin 2018). D'un autre côté, les EGMs tels que les plasmides et les phages ont acquis des systèmes anti-défense dirigés contre les systèmes de défense de l'hôte, tels que les systèmes anti-CRISPR, des systèmes anti-RM, des systèmes antitoxines ou des répresseurs du système SOS favorisant leur acquisition et leur persistance dans l'hôte (Duan et al. 2024; Pinilla-Redondo et al. 2020; Samuel et Burstein 2023). Cette course aux « armements » pour les systèmes de défense entre l'hôte et les EGMs joue probablement un rôle important dans la sélection des clones résistants. En effet, les plasmides de résistance bien qu'ayant généralement un large spectre d'hôtes ne s'associent avec succès qu'avec quelques lignées cliniquement importantes, suggérant l'existence de facteurs impliqués dans le succès de ces associations (Alonso-del Valle et al. 2023; MacLean et San Millan 2019). Par exemple les plasmides *bla_{KPC}-IncF* sont principalement associés au groupe clonal 258 de *K. pneumoniae* dans lequel le système CRISPR-Cas de type I susceptible de cibler ces plasmides est rarement présent (Zhou et al. 2020). Ces plasmides portent, de plus, différents systèmes anti-défense comme des systèmes anti-RM et plusieurs systèmes toxines-antitoxines (Cécile Emeraud et al. 2020; Liang et al. 2017). L'abondance des systèmes de défense chez l'hôte pourrait potentiellement expliquer le nombre limité des associations à succès entre plasmides de résistance et pathogènes cliniquement importants (Georjon et Bernheim 2023; Makarova, Wolf, et Koonin 2013; Rocha et Bikard 2022).

Dans nos travaux, nous avons montré que le système ApsAB est nécessaire pour la sélection et l'émergence des lignées ST38 porteuses de *bla_{OXA-48}* dans un nouveau réplicon. Les lignées mondialement disséminées G1, G3 et G4 d'isolats ST38 porteurs de *bla_{OXA-48}* chromosomique (Patiño-Navarrete et al. 2022) contiennent toutes le système ApsAB. Cela suggérerait que le système ApsAB a participé à la sélection dans le cas des souches ST38 de clones résistants aux carbapénèmes en favorisant l'intégration de *bla_{OXA-48}* dans leur chromosome. Ces intégrations chromosomiques confèrent un avantage évolutif en permettant une résistance aux antibiotiques

tout en réduisant le coût lié au portage des plasmides de résistance. Les souches ST38 ont, d'une part, un large spectre d'hôtes et des facteurs de virulence favorisant la colonisation de divers environnements (Roy Chowdhury et al. 2023) et d'autre part un avantage de fitness en conditions de stress antibiotique conféré par les intégrations des ARGs, ce qui a probablement favorisé leur dissémination dans le monde. Ces données montrent que le succès de certains clones résistants est fortement influencé par les systèmes de défense de l'hôte. En effet, Jaskólska et al. ont montré que la rareté des plasmides chez les souches pandémiques de *Vibrio cholerae* est associée à la présence des systèmes DdmDE et DdmABC ciblant les plasmides, ces deux systèmes sont localisés dans deux îlots de pathogénicité différents. Le plasmide IncC pVCR94 de multirésistance de la souche pandémique *V. cholerae* El Tor est ciblé par DdmABC par un mécanisme de type Abi provoquant un coût de fitness important à l'hôte. Les souches El Tor contenant ce plasmide sont progressivement en train de disparaître en faveur de celles portant l'ICE SXT/R391 portant un système anti-phage et des ARGs conférant la résistance aux antibiotiques. Ceci est probablement lié au fait que l'ICE n'est pas ciblé par DdmABC et qu'il induit un coût de fitness plus faible que le plasmide pVCR94 (Jaskólska, Adams, et Blokesch 2022).

Nous avons observé lors de l'analyse phylogénétique que les souches disposant du système *apsAB* se regroupent sur l'arbre, suggérant que ce système, et l'îlot génomique tRNA-Leu dans lequel il se situe, a été acquis au cours de l'évolution par THG. Cet événement d'intégration pourrait avoir eu lieu précocement au cours de l'émergence du lignage A (Roy Chowdhury et al. 2023) et pourrait avoir participé au succès de ce lignage. Dans ce lignage certaines souches ne contiennent pas non plus le système ApsAB probablement suite à son inactivation. En général, l'absence d'ApsAB est associée à un nombre plus élevé de plasmides (tout du moins à un plus grand nombre de réplicons). Curieusement on trouve autant d'ARG, voire plus, dans les souches des lignées contenant *apsAB*. Cela suggère que ApsAB pourrait avoir contribué à une accumulation chromosomique des ARGs dans ces souches au détriment du maintien des plasmides. On pourrait donc effectuer une caractérisation systématique des plasmides ciblés par ApsAB et porteurs d'ARGs retrouvés dans le chromosome. ApsAB est identifié dans de nombreuses espèces d'Enterobacteriaceae et comme chez *E. coli*, on trouve un certain nombre de protéines tronquées et donc un ApsAB inactivé. Cela suggère que le système serait contre-sélectionné dans un contexte de forte pression antibiotique, permettant des niveaux de résistance plus élevés favorisés par le maintien des plasmides de résistance comme nous l'avons observé avec les plasmides pOXA-48. Cela rejoint les travaux de Sheng et al. qui ont montré

que les systèmes de défense de l'hôte tels que les RM et les CRISPR sont parfois inactivés par des insertions d'ISs favorisant ainsi l'acquisition des plasmides de résistance et leur maintien (Sheng et al. 2023).

4. Domestication des ARGs d'origine plasmidique

Selon Bergström et *al.*, les plasmides ne peuvent pas persister à long terme dans l'hôte en tant qu'éléments génétiques parasites. Les gènes bénéfiques portés par le plasmide finiront par s'intégrer dans le chromosome et le plasmide sera perdu (Bergstrom, Lipsitch, et Levin 2000). Cependant, le « plasmid paradox » nous enseigne que les plasmides peuvent persister longuement dans leur hôte suivant différentes stratégies, allant d'une fréquence de conjugaison élevée, une épistasie positive entre différents plasmides, des mutations compensatoires et des transferts permanents entre les bactéries au sein d'une communauté diverse (Brockhurst et Harrison 2022).

Dans nos travaux, nous avons montré que l'inactivation du système *apsAB* de l'hôte conduisait à une stabilisation des plasmides dans les trois souches hôtes ST38. Si dans la souche ST38_2, l'inactivation entraîne une abolition complète du coût du plasmide, le coût de fitness reste toujours élevé chez les mutants *apsAB* ST38_1. Cependant l'inactivation du système est suffisante pour la persistance des plasmides dans ces mutants. L'enrichissement des lignées ST38_1 dans lesquelles *bla_{OXA-48}* est intégré dans un autre réplicon par rapport à celles dans lesquelles *apsAB* est inactivé est potentiellement lié à ce coût de fitness élevé des mutants *apsAB* ST38_1. La pression de sélection antibiotique est un élément important : elle permet la sélection des bactéries avec l'intégration par rapport aux bactéries sans plasmide malgré un coût de fitness résiduel. Elle permet aussi le maintien dans la population des mutants *apsAB* ST38_1 dans lesquelles le coût de plasmide est élevé même si leur fréquence reste faible dans le cas de ST38_1. Ceci nous a permis de caractériser *apsAB* dans cette souche. Il est à noter que nous avons utilisé lors de ces étapes de sélection une concentration inférieure à la MIC déterminée pour le transconjugant. Ceci a permis de maintenir dans la population certaines lignées porteuses de *bla_{OXA-48}* intégré malgré une CMI deux fois inférieure à celle des transconjugants.

Sheng et *al.* ont montré que la transposition des ISs principalement *IS1* et *IS10* dans les gènes *cas* est un mécanisme de subversion de l'immunité anti-plasmide conférée par les systèmes CRISPR. Cette subversion favoriserait l'acquisition et le maintien des plasmides (Sheng et al.

2023). Dans notre étude, 81,4% (70/86) mutations ciblant *apsAB* sont des insertions d'ISs avec 95,8% (67/70) d'*IS1*. Cela suggère que l'immunité conférée par ApsAB est subvertie par des mutations dans ce système dont celles sélectionnées sont préférentiellement des interruptions de l'opéron *apsAB* par transposition des ISs, principalement les *IS1*. Comme dans l'étude de Sheng et al., d'autres mutations plus rares ont été détectées mais la transposition des ISs reste le mécanisme principal. Sheng et al. ont montré que, dans leur étude, les coupures de l'ADN double brin induisaient la transposition des ISs (Sheng et al. 2023). Nous avons montré que la déstabilisation des plasmides par ApsAB est un processus actif avec l'élimination du plasmide ColE1 après l'arrêt de croissance par ajout de chloramphénicol. Le mode d'action d'ApsAB que nous avons proposé est similaire à celui de DdmDE (Jaskólska, Adams, et Blokesch 2022) avec la reconnaissance de la cible par ApsB puis sa dégradation par ApsA. Ainsi, on pourrait penser que ApsAB effectue des coupures d'ADN double brin de pOXA-48 ou toute autre séquence ciblée par ce système dans l'hôte, conduisant à une induction importante de la transposition des ISs. Cette augmentation de la fréquence de transposition expliquerait le fait que l'inactivation de *apsAB* par insertion d'ISs est très fréquente. Étant donné que le transposon composite Tn6237 contient deux *IS1*, cela impliquerait que l'introduction de coupures d'ADN double brin par ApsAB sur pOXA-48_1 ou tout autre cible induit la transposition de Tn6237 vers un autre réplicon. Sastre-Dominguez et al. ont montré lors d'une étude d'évolution expérimentale que les *IS1* de pOXA-48 se transposaient avec une fréquence élevée chez *K. pneumoniae* et *C. freundii* et contribuaient à l'évolution de ces bactéries (Sastre-Dominguez et al. 2024). De ce fait, une autre explication de la sélection des souches *bla*_{OXA-48} intégrées est que la transposition Tn6237 médiée par les deux *IS1* de pOXA-48_1 se produit premièrement donnant un état intermédiaire d'une souche portant une version chromosomique et plasmidique de *bla*_{OXA-48} donc sans gain de fitness. Puis la dégradation de pOXA-48_1 par ApsAB se produit ensuite réduisant le coût du plasmide et conduisant à l'émergence des souches intégrées. Cela expliquerait pourquoi nous n'avons pas pu détecter de cas d'intégrations de Tn6237 dans l'évolution des transconjugants ST38_1Δ*aspAB*/pOXA-48_1.

L'intégration de Tn6237 a été observée dans quelques rares cas dans d'autres STs d'*E. coli* tels que ST227, ST131, ST88, ST127 et également chez *K. pneumoniae* (Beyrouthy et al. 2014b; Hendrickx et al. 2021; Mataseje et al. 2018; de Toro et al. 2017). Cela conduit à se poser la question si dans ces différents cas, des systèmes similaires à ApsAB, ou d'autres systèmes de défense antiplasmide, pourraient être impliqués. De manière plus générale, tout système de défense antiplasmide peut-il, de la même manière que ApsAB, lorsque les conditions de coût

de fitness, de pression de sélection antibiotique et de présence des ARGs au sein d'un élément transposable sont réunies, conduire à l'intégration de ces ARGs dans un nouveau réplicon ? Différentes études ont par exemple, rapporté l'intégration de *bla_{CTX-M15}-ISEcp1* à différentes positions dans les souches ST38 (Falgenhauer et al. 2020; Guenther et al. 2017; Hendrickx et al. 2021; Shawa et al. 2021). Il serait intéressant de refaire des expériences d'évolution dans les souches ST38 avec des plasmides portant *bla_{CTX-M15}-ISEcp1* pour voir si on reproduit ces intégrations *in vitro* et surtout si ce sont les mêmes facteurs qui sont impliqués.

5. Conclusion générale

L'objectif principal de ma thèse consistait à comprendre les différents facteurs génétiques et environnementaux impliqués dans l'intégration chromosomique du gène *bla_{OXA-48}* chez les souches ST38 et de caractériser l'avantage évolutif des intégrations.

Dans cette thèse, j'ai montré que l'intégration chromosomique de *bla_{OXA-48}* est un processus multifactoriel, nécessitant la présence du gène de résistance dans un transposon actif, Tn6237, une déstabilisation du plasmide portant le transposon par le système antiplasmide ApsAB, un coût de fitness d'origine plasmidique élevé qui permet la contre-sélection des souches porteuses du plasmide en faveur des souches porteuses du gène intégré et une sélection positive par un antibiotique des souches portant *bla_{OXA-48}*.

Le système de défense antiplasmide ApsAB que nous avons découvert promeut la perte du plasmide pOXA-48_1, et permet la sélection des bactéries dans lesquelles *bla_{OXA-48}* a été intégré dans un réplicon différent. Cela signifie que les systèmes de défense de l'hôte contribuent à la sélection de certains clones résistants à succès cliniquement importants. ApsAB présent dans une grande partie des souches que nous avons analysées par phylogénie a potentiellement contribué à l'évolution de certains clones ST38 cliniquement important.

Enfin, les données de ma thèse soutiennent que l'accumulation chromosomique des gènes de résistance chez les souches cliniques ST38 (Chudejova et al. 2024; Falgenhauer et al. 2020; Hendrickx et al. 2021; Patiño-Navarrete et al. 2022; Shawa et al. 2021; Turton et al. 2016) confère un avantage adaptatif aux souches ST38 qui deviennent multirésistantes et donc capables de survivre en présence d'un grand nombre d'antibiotiques. Ceci a probablement contribué à leur dissémination mondiale. Les travaux de ma thèse permettent ainsi de mieux comprendre les facteurs impliqués dans l'émergence de certaines lignées résistantes et de découvrir une nouvelle famille de systèmes antiplasmides.

Matériels et méthodes

Cette section contient les matériels et méthodes du chapitre 3. Les matériels et méthodes des chapitres 1 et 2 des résultats sont inclus dans les manuscrits.

Bactéries-plasmides et conditions de culture

Les croissances bactériennes ont été effectuées à 37°C, sous agitation, soit en milieu LB Miller ou en milieu M9 complété avec du glucose 0,4%, MgSO₄ 1 mM et CaCl₂ 0,1 mM. Le cas échéant, des antibiotiques ont été ajoutés : méropénème (0,1 µg/ml), apramycine (40 µg/mL), zéocine (30 µg/mL) et chloramphénicol (10 µg/ml). Une liste des plasmides utilisés dans l'étude avec leurs principales caractéristiques est fournie dans le tableau 3.

Courbes de croissance

Des précultures des souches parentales ST38 sans plasmide et de leurs transconjugants isogènes sans antibiotique et avec antibiotique (MEM 0,1 µg/ml) respectivement ont été obtenues en M9 ou en LB. 100 µL de ces précultures diluées à 5*10⁵ CFU/ml en milieu LB ou M9 ont été inoculées dans des plaques de 96 puits et incubées à 37°C avec agitation pendant 6 heures (LB) ou 16 heures (M9) dans un lecteur automatique de plaques (Tecan infinite M Nano avec i-control 2.0.10). Trois expériences indépendantes ont été réalisées pour chaque souche. Pour chaque réplique biologique indépendant, le temps de doublement a été obtenu en calculant la moyenne de trois à cinq répliques techniques. Le temps de doublement a été calculé en utilisant la formule : $G = \ln(2)/\mu_{\max}$. μ_{\max} est le taux de croissance maximal, correspondant à la pente de la courbe à la phase exponentielle. Le temps de doublement relatif a été calculé en utilisant la formule : $W = G_{\text{transconjugant}}/G_{\text{souche sans plasmide}}$.

Test de stabilité des plasmides

Des précultures sur la nuit des transconjugants en LB avec MEM 0,1 µg/ml ont été fixées comme jour 0. La stabilité du plasmide a été évaluée par des passages successifs de dilutions 1:200 dans 10 ml de LB frais sans MEM pendant dix jours. Les bactéries ont été collectées et congelées à -80°C aux jours 0, 5 et 10. Le nombre de CFU a été déterminé en étalant 100 µl de

cultures diluées sur LB agar avec et sans MEM 0,05 µg/ml. Les colonies isolées sur MEM ont été utilisées comme approximation pour les bactéries porteuses du plasmide. Le comptage automatique des colonies bactériennes a été effectué avec un scan4000 (INTERSCIENCE) et la stabilité du plasmide a été calculée en faisant le rapport entre les bactéries porteuses de plasmides par rapport la population totale. En raison des biais de dilution et d'étalement, cela a pu occasionnellement entraîner des ratios légèrement supérieurs à 100%.

Expériences de conjugaison

Les précultures sur la nuit en LB des souches donneuses et receveuses ont été diluées au 1:100 dans du LB frais et incubées à 37°C jusqu'à une densité optique de 0,6 à 600 nm (OD₆₀₀). Un mélange au ratio 1:1 de 200 µl des donneuses et receveuses a été étalé sur un filtre (type MILIPORE HAEP 0,45 µM) placé sur LB agar et incubé à 37°C pendant la nuit. Les bactéries ont été ensuite transférées à partir des filtres, puis diluées en série dans de l'eau physiologique et les dilutions ont été étalées sur LB agar contenant deux antibiotiques : (MEM) 0,1 µg/ml et la tétracycline (TET) 10 µg/mL pour sélectionner les transconjugants. Les transconjugants ont été séquencés par illumina (cf chapitre 2) pour identifier les éventuelles mutations.

Quantification de l'expression des gènes par RT-qPCR

Des cultures ont été inoculées en LB à partir de trois précultures indépendantes et incubées à 37°C jusqu'en phase exponentielle (OD₆₀₀=0,4-0,5). Les culots de 2 ml de cultures ont été immédiatement congelés à -80°C. L'ARN total a été extrait en utilisant le kit Norgen Biotek suivant les recommandations du fournisseur (Norgen Biotek Corp). Les ADNc ont été générés à l'aide de la transcriptase inverse SuperScript II suivant les recommandations d'Invitrogen. Le kit SYBR Green PCR (Applied Biosystems, Life Technologies) a été utilisé la qPCR. Les amorces utilisées sont indiquées dans le tableau 3. Les paramètres d'amplification étaient les suivants : dénaturation à 95°C pendant 10 min, suivie de 40 cycles à 95 °C pendant 15 sec, 60°C pour 1 min. La qPCR a été effectuée en utilisant l'appareil BIO-RAD CFX96 real-time system et les données en temps réel ont été traitées avec le logiciel BIO-RAD CFX-manager version 3.0. Le gène ribosomique *rpsL* a été utilisé comme référence pour la qPCR. L'expression relative a été calculée en utilisant la méthode des $\Delta\Delta C_t$ (Pfaffl 2001). Trois

cultures indépendantes ont été testées pour chaque condition et le résultat pour chaque culture a été obtenu à partir de trois répliques techniques.

Test de susceptibilité aux carbapénèmes

La CMI pour le méropénème a été déterminée par Etest (Biomérieux). Les boîtes de pétri contenant du milieu Mueller-Hinton agar ont été inoculées en inondant les boîtes par 2 ml de culture bactérienne (10^6 bactérie/ml), répandue par un mouvement doux sur les boîtes, et l'excès de liquide a été retiré laissant environ 0,5 ml de la culture (+/- 10%). La méthode d'inondation a été choisie de préférence à l'étalement à l'écouvillon car elle fournit une lecture plus précise du résultat de l'Etest.

Mutagenèse du plasmide pOXA-48_1

Les délétions complètes des régions *nuc*, *pemIK*, *pemIK-nuc*, *parAB-nuc*, *mob-excA* et entre *nuc-excA* du plasmide pOXA-48_1 ont été obtenues par la méthode lambda recombinaison (Datsenko et Wanner 2000) en utilisant le vecteur p15red disponible au laboratoire portant la lambda recombinaison sous le contrôle d'un promoteur inducible pBAD (cf chapitre 2 Supplementary Data 9). Les amorces (Sigma-Aldrich) utilisées pour l'amplification PCR de la cassette ZeoR sont indiquées dans le tableau 3. Les délétions ont été confirmées par PCR et l'absence de mutation des souches délétées a été vérifiée par séquençage illumina du génome entier (Cf chapitre 2).

Tests statistiques

Tous les graphiques ont été générés avec R (version 3.6.3) en utilisant les paquets R (tidyverse, forcats, ggplot2, ggpubr, rstatix, broom). La normalité des données a été évaluée en utilisant le test de Shapiro. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant un test t de Student à deux échantillons et deux extrémités et les *p*-values ont été corrigées suivant la correction Benjamini-Hochberg (FDR).

Tableau 3 : Amorces et plasmides du chapitre 3 des résultats.

Amorces PCR		Séquences 5'-3'
excA-zeo_R		cagtaggcacatgtcgggtccgaatatttacgacaagttactatcagtaggagtggtgaatccggttagc
dnuc-zeo_F		gagtaaaacatgcaatcattccccctgttcgttcccgtgtcgttcctgtcatcgataagcttgaagtcc
resD-zeo_F		gaacactttccccctgcaaatttcccagaattcacgtagcgacgccaatcgatcgataagcttgaagtcc
mucA-zeo_F		tatgaggccaatgaacttaacctgcatgattactgcgtgcggcgctccggctcatcgataagcttgaagtcc
pemI-zeo_F		gaaatgttctcgtgggggtgattacatcagctgcccgatcagaagtggctcatcgataagcttgaagtcc
nuc-zeo_R		agtttctgccgctgctgtaggtcagtagcctggagccacgtcctttccttggagtggtgaatccggttagc
excA-verif_R		catagtctttcgccactgga
nuc-verif_R		gggtgatcacaggaacgaca
mobB-zeo_F		caaaaacgtcttggtcagggcaagccccgacccccctaacgaggttagctcatcgataagcttgaagtcc
pemI-zeo_R		catgcaggttaagttcattggcctcatagcctgcccgggctgggaaaggagtggtgaatccggttagc
parA-zeo-F		tggtgcatcttttcttttacgcgcagagatgcgtaataatcattcatcgataagcttgaagtcc
nuc-zeo_F		tgaaaaaatatgtgctgtaaccctgaccctcatcgccggcgccgtggcatcatcgataagcttgaagtcc
pemI-verif_R		ccggacacacgcaagaagta
Amorces RT-qPCR		Séquences 5'-3'
rpsl_F		cgtggcgtatgtactcgtgt
rpsl_R		gtctttaacacgaccgccac
ompF_F		acaactctgaaggcgtgat
ompF_R		tcaggcagcatatcggtgta
ompC_F		gtagtgctcatggcgaaggt
ompC_R		ctgatcccaggtacgtttgg
Plasmides	Caractéristiques	Informations supplémentaires
p15red-Apra	p15A, <i>apmR</i> , <i>araC ParaBAD-gam-bet-exo</i> , <i>sacB</i>	ApraR cloné entre SpeI et pvuI de p15Red et remplacé par CAT (cette étude)
pACYt-ZeoFRT	pACY184Δ <i>tetR</i> , <i>cat</i> , p15A ori, <i>zeoR</i>	<i>zeoR</i> -FRT inséré entre les sites HindIII et BamHI (cette étude)

Références bibliographiques

- Adeolu, Mobolaji, Seema Alnajar, Sohail Naushad, et Radhey S. Gupta. 2016. « Genome-Based Phylogeny and Taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for Enterobacterales Ord. Nov. Divided into the Families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae Fam. Nov., Pectobacteriaceae Fam. Nov., Yersiniaceae Fam. Nov., Hafniaceae Fam. Nov., Morganellaceae Fam. Nov., and Budviciaceae Fam. Nov. » *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 66(12): 5575-99. doi:10.1099/ijsem.0.001485.
- Al Mamun, Abu Amar M., Kouhei Kishida, et Peter J. Christie. 2021. « Protein Transfer through an F Plasmid-Encoded Type IV Secretion System Suppresses the Mating-Induced SOS Response » éd. Igor B. Zhulin. *mBio* 12(4): e01629-21. doi:10.1128/mBio.01629-21.
- Al Mamun, Abu Amar M., Kimberly Kisson, Kouhei Kishida, William C. Shropshire, Blake Hanson, et Peter J. Christie. 2022. « IncFV Plasmid pED208: Sequence Analysis and Evidence for Translocation of Maintenance/Leading Region Proteins through Diverse Type IV Secretion Systems ». *Plasmid* 123-124: 102652. doi:10.1016/j.plasmid.2022.102652.
- Alav, Ilyas, Jessica Kobylka, Miriam S. Kuth, Klaas M. Pos, Martin Picard, Jessica M. A. Blair, et Vassiliy N. Bavro. 2021. « Structure, Assembly, and Function of Tripartite Efflux and Type 1 Secretion Systems in Gram-Negative Bacteria ». *Chemical Reviews* 121(9): 5479-5596. doi:10.1021/acs.chemrev.1c00055.
- Algoribi, Majed F., Tarek M. Gibreel, Garry Farnham, Sameera M. Al Johani, Hanan H. Balkhy, et Mathew Upton. 2015. « Antibiotic-Resistant ST38, ST131 and ST405 Strains Are the Leading Uropathogenic *Escherichia Coli* Clones in Riyadh, Saudi Arabia ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(10): 2757-62. doi:10.1093/jac/dkv188.
- Allocati, Nerino, Michele Masulli, Mikhail Alexeyev, et Carmine Di Ilio. 2013. « *Escherichia Coli* in Europe: An Overview ». *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10(12): 6235-54. doi:10.3390/ijerph10126235.
- Alonso-del Valle, Aida, Ricardo León-Sampedro, Jerónimo Rodríguez-Beltrán, Javier DelaFuente, Marta Hernández-García, Patricia Ruiz-Garbajosa, Rafael Cantón, Rafael Peña-Miller, et Alvaro San Millán. 2021. « Variability of Plasmid Fitness Effects Contributes to Plasmid Persistence in Bacterial Communities ». *Nature Communications* 12(1): 2653. doi:10.1038/s41467-021-22849-y.
- Alonso-del Valle, Aida, Laura Toribio-Celestino, Anna Quirant, Carles Tardio Pi, Javier DelaFuente, Rafael Canton, Eduardo P. C. Rocha, et al. 2023. « Antimicrobial Resistance Level and Conjugation Permissiveness Shape Plasmid Distribution in Clinical Enterobacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120(51): e2314135120. doi:10.1073/pnas.2314135120.
- Aminov, Rustam I. 2010. « A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future ». *Frontiers in Microbiology* 1. doi:10.3389/fmicb.2010.00134.

- Ares-Arroyo, Manuel, Charles Coluzzi, et Eduardo P C Rocha. 2023. « Origins of Transfer Establish Networks of Functional Dependencies for Plasmid Transfer by Conjugation ». *Nucleic Acids Research* 51(7): 3001-16. doi:10.1093/nar/gkac1079.
- Arnold, Brian J., I-Ting Huang, et William P. Hanage. 2022. « Horizontal Gene Transfer and Adaptive Evolution in Bacteria ». *Nature Reviews Microbiology* 20(4): 206-18. doi:10.1038/s41579-021-00650-4.
- Aslam, Bilal, Wei Wang, Muhammad Imran Arshad, Mohsin Khurshid, Saima Muzammil, Muhammad Hidayat Rasool, Muhammad Atif Nisar, et al. 2018. « Antibiotic Resistance: A Rundown of a Global Crisis ». *Infection and Drug Resistance* Volume 11: 1645-58. doi:10.2147/IDR.S173867.
- Athanasopoulos, V, J Praszkie, et A J Pittard. 1995. « The Replication of an IncL/M Plasmid Is Subject to Antisense Control ». *Journal of Bacteriology* 177(16): 4730-41. doi:10.1128/jb.177.16.4730-4741.1995.
- Athanasopoulos, V., J. Praszkie, et A. J. Pittard. 1999. « Analysis of Elements Involved in Pseudoknot-Dependent Expression and Regulation of the repA Gene of an IncL/M Plasmid ». *Journal of Bacteriology* 181(6): 1811-19. doi:10.1128/JB.181.6.1811-1819.1999.
- Ba, Xiaoliang, Yingyi Guo, Robert A. Moran, Emma L. Doughty, Baomo Liu, Likang Yao, Jiahui Li, et al. 2024. « Global Emergence of a Hypervirulent Carbapenem-Resistant Escherichia Coli ST410 Clone ». *Nature Communications* 15(1): 494. doi:10.1038/s41467-023-43854-3.
- Babakhani, Sajad, et Mana Oloomi. 2018. « Transposons: The Agents of Antibiotic Resistance in Bacteria ». *Journal of Basic Microbiology* 58(11): 905-17. doi:10.1002/jobm.201800204.
- Baharoglu, Zeynep, David Bikard, et Didier Mazel. 2010. « Conjugative DNA Transfer Induces the Bacterial SOS Response and Promotes Antibiotic Resistance Development through Integron Activation » éd. Ivan Matic. *PLoS Genetics* 6(10): e1001165. doi:10.1371/journal.pgen.1001165.
- Balcázar, J.L. 2018. « How Do Bacteriophages Promote Antibiotic Resistance in the Environment? » *Clinical Microbiology and Infection* 24(5): 447-49. doi:10.1016/j.cmi.2017.10.010.
- Barrick, Jeffrey E., et Richard E. Lenski. 2013. « Genome Dynamics during Experimental Evolution ». *Nature Reviews Genetics* 14(12): 827-39. doi:10.1038/nrg3564.
- Bassett, Everett J., Margaret S. Keith, George J. Armelagos, Debra L. Martin, et Antonio R. Villanueva. 1980. « Tetracycline-Labeled Human Bone from Ancient Sudanese Nubia (A.D. 350) ». *Science* 209(4464): 1532-34. doi:10.1126/science.7001623.
- Bauernfeind, A., S. Schweighart, et H. Grimm. 1990. « A New Plasmidic Cefotaximase in a Clinical Isolate of Escherichia Coli ». *Infection* 18(5): 294-98. doi:10.1007/BF01647010.

- Baxter, Jamie C., et Barbara E. Funnell. 2014. « Plasmid Partition Mechanisms » éd. Marcelo Tolmasky et Juan Carlos Alonso. *Microbiology Spectrum* 2(6): 2.6.03. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0023-2014.
- Ben Zakour, Nouri L., Areej S. Alsheikh-Hussain, Melinda M. Ashcroft, Nguyen Thi Khanh Nhu, Leah W. Roberts, Mitchell Stanton-Cook, Mark A. Schembri, et Scott A. Beatson. 2016. « Sequential Acquisition of Virulence and Fluoroquinolone Resistance Has Shaped the Evolution of Escherichia Coli ST131 » éd. Scott J. Hultgren. *mBio* 7(2): e00347-16. doi:10.1128/mBio.00347-16.
- Bergstrom, C. T., M. Lipsitch, et B. R. Levin. 2000. « Natural Selection, Infectious Transfer and the Existence Conditions for Bacterial Plasmids ». *Genetics* 155(4): 1505-19. doi:10.1093/genetics/155.4.1505.
- Beyrouthy, R., F. Robin, J. Delmas, L. Gibold, G. Dalmasso, F. Dabboussi, M. Hamzé, et R. Bonnet. 2014a. « IS *IR* -Mediated Plasticity of IncL/M Plasmids Leads to the Insertion of *Bla*_{OXA-48} into the Escherichia Coli Chromosome ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(7): 3785-90. doi:10.1128/AAC.02669-14.
- Beyrouthy, R., F. Robin, J. Delmas, L. Gibold, G. Dalmasso, F. Dabboussi, M. Hamzé, et R. Bonnet. 2014b. « IS *IR* -Mediated Plasticity of IncL/M Plasmids Leads to the Insertion of *Bla*_{OXA-48} into the Escherichia Coli Chromosome ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(7): 3785-90. doi:10.1128/AAC.02669-14.
- Birgy, André, Fouad Madhi, Camille Jung, Corinne Levy, Aurélie Cointe, Philippe Bidet, Claire Amaris Hobson, et al. 2019. « Diversity and Trends in Population Structure of ESBL-Producing Enterobacteriaceae in Febrile Urinary Tract Infections in Children in France from 2014 to 2017 ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: dkz423. doi:10.1093/jac/dkz423.
- Bleriot, Ines, Lucia Blasco, Olga Pacios, Laura Fernández-García, Antón Ambroa, María López, Concha Ortiz-Cartagena, et al. 2022. « The Role of PemIK (PemK/PemI) Type II TA System from Klebsiella Pneumoniae Clinical Strains in Lytic Phage Infection ». *Scientific Reports* 12(1): 4488. doi:10.1038/s41598-022-08111-5.
- Boattini, Matteo, Gabriele Bianco, Laura Iglesias Llorente, Laura Alonso Acero, Daniel Nunes, Miguel Seruca, Vasco Santos Mendes, et al. 2024. « Enterobacteriales Carrying Chromosomal AmpC β -Lactamases in Europe (EuESCPM): Epidemiology and Antimicrobial Resistance Burden from a Cohort of 27 Hospitals, 2020-2022 ». *International Journal of Antimicrobial Agents*: 107115. doi:10.1016/j.ijantimicag.2024.107115.
- Bonnin, Rémy A., Patrice Nordmann, Alessandra Carattoli, et Laurent Poirel. 2013. « Comparative Genomics of IncL/M-Type Plasmids: Evolution by Acquisition of Resistance Genes and Insertion Sequences ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(1): 674-76. doi:10.1128/AAC.01086-12.
- Bonten, Marc, James R Johnson, Anita H J Van Den Biggelaar, Leonidas Georgalis, Jeroen Geurtsen, Patricia Ibarra De Palacios, Stefan Gravenstein, et al. 2021. « Epidemiology of Escherichia Coli Bacteremia: A Systematic Literature Review ». *Clinical Infectious Diseases* 72(7): 1211-19. doi:10.1093/cid/ciaa210.

- Boyle, Tori A, et Asma Hatoum-Aslan. 2023. « Recurring and Emerging Themes in Prokaryotic Innate Immunity ». *Current Opinion in Microbiology* 73: 102324. doi:10.1016/j.mib.2023.102324.
- Brauner, Asher, Ofer Fridman, Orit Gefen, et Nathalie Q. Balaban. 2016. « Distinguishing between Resistance, Tolerance and Persistence to Antibiotic Treatment ». *Nature Reviews Microbiology* 14(5): 320-30. doi:10.1038/nrmicro.2016.34.
- Brinkmann, Henner, Markus Göker, Michal Koblížek, Irene Wagner-Döbler, et Jörn Petersen. 2018. « Horizontal Operon Transfer, Plasmids, and the Evolution of Photosynthesis in *Rhodobacteraceae* ». *The ISME Journal* 12(8): 1994-2010. doi:10.1038/s41396-018-0150-9.
- Brockhurst, Michael A., et Ellie Harrison. 2022. « Ecological and Evolutionary Solutions to the Plasmid Paradox ». *Trends in Microbiology* 30(6): 534-43. doi:10.1016/j.tim.2021.11.001.
- Brown-Jaque, Maryury, William Calero-Cáceres, Paula Espinal, Judith Rodríguez-Navarro, Elisenda Miró, Juan José González-López, Thais Cornejo, et al. 2018. « Antibiotic Resistance Genes in Phage Particles Isolated from Human Faeces and Induced from Clinical Bacterial Isolates ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 51(3): 434-42. doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.11.014.
- Bush, K, G A Jacoby, et A A Medeiros. 1995. « A Functional Classification Scheme for Beta-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(6): 1211-33. doi:10.1128/AAC.39.6.1211.
- Bush, K, C Macalintal, B A Rasmussen, V J Lee, et Y Yang. 1993. « Kinetic Interactions of Tazobactam with Beta-Lactamases from All Major Structural Classes ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37(4): 851-58. doi:10.1128/AAC.37.4.851.
- Bush, Karen, et Patricia A. Bradford. 2016. « β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 6(8): a025247. doi:10.1101/cshperspect.a025247.
- Bush, Karen, et Patricia A. Bradford. 2019. « Interplay between β -Lactamases and New β -Lactamase Inhibitors ». *Nature Reviews Microbiology* 17(5): 295-306. doi:10.1038/s41579-019-0159-8.
- Bush, Karen, et George A. Jacoby. 2010. « Updated Functional Classification of β -Lactamases ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3): 969-76. doi:10.1128/AAC.01009-09.
- Butler, Mark S., et Antony D. Buss. 2006. « Natural Products — The Future Scaffolds for Novel Antibiotics? ». *Biochemical Pharmacology* 71(7): 919-29. doi:10.1016/j.bcp.2005.10.012.
- Cabanel, Nicolas, Isabelle Rosinski-Chupin, Adriana Chiarelli, Tatiana Botin, Marta Tato, Rafael Canton, et Philippe Glaser. 2021. « Evolution of VIM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Hospital Outbreak Reveals the Genetic Bases of the Loss of the Urease-Positive Identification Character » éd. Robert G. Beiko. *mSystems* 6(3): e00244-21. doi:10.1128/mSystems.00244-21.

- Cameron, Andrew, Rupinder Mangat, Heba H. Mostafa, Samantha Taffner, Jun Wang, Ghinwa Dumyati, Richard A. Stanton, et al. 2021. « Detection of CTX-M-27 β -Lactamase Genes on Two Distinct Plasmid Types in ST38 *Escherichia Coli* from Three U.S. States ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 65(7): e00825-21. doi:10.1128/AAC.00825-21.
- Cañada-García, Javier E., Eva Ramírez De Arellano, Miguel Jiménez-Orellana, Esther Viedma, Aida Sánchez, Almudena Alhambra, Jennifer Villa, et al. 2023. « Carbapenemase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* in COVID-19 Intensive Care Patients: Identification of IncL-VIM-1 Plasmid in Previously Non-Predominant Sequence Types ». *Antibiotics* 12(1): 107. doi:10.3390/antibiotics12010107.
- Cantón, Rafael, José María González-Alba, et Juan Carlos Galán. 2012. « CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion ». *Frontiers in Microbiology* 3. doi:10.3389/fmicb.2012.00110.
- Carattoli, Alessandra, Alessia Bertini, Laura Villa, Vincenzo Falbo, Katie L. Hopkins, et E. John Threlfall. 2005. « Identification of Plasmids by PCR-Based Replicon Typing ». *Journal of Microbiological Methods* 63(3): 219-28. doi:10.1016/j.mimet.2005.03.018.
- Carattoli, Alessandra, Salome N. Seiffert, Sybille Schwendener, Vincent Perreten, et Andrea Endimiani. 2015. « Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance » éd. Paul Jaak Janssen. *PLOS ONE* 10(5): e0123063. doi:10.1371/journal.pone.0123063.
- Carattoli, Alessandra, Ea Zankari, Aurora García-Fernández, Mette Voldby Larsen, Ole Lund, Laura Villa, Frank Møller Aarestrup, et Henrik Hasman. 2014. « In Silico Detection and Typing of Plasmids Using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(7): 3895-3903. doi:10.1128/AAC.02412-14.
- Card, Kyle J., Jalin A. Jordan, et Richard E. Lenski. 2021. « Idiosyncratic Variation in the Fitness Costs of Tetracycline-resistance Mutations in *Escherichia Coli* ». *Evolution* 75(5): 1230-38. doi:10.1111/evo.14203.
- Carrër, Amélie, Laurent Poirel, Haluk Eraksoy, A. Atahan Cagatay, Selim Badur, et Patrice Nordmann. 2008. « Spread of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolates in Istanbul, Turkey ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(8): 2950-54. doi:10.1128/AAC.01672-07.
- Carrër, Amélie, Laurent Poirel, Mesut Yilmaz, Özay Arikan Akan, Cilli Feriha, Gaëlle Cuzon, Ghassan Matar, Patrick Honderlick, et Patrice Nordmann. 2010. « Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(3): 1369-73. doi:10.1128/AAC.01312-09.
- Carroll, Amanda C., et Alex Wong. 2018. « Plasmid Persistence: Costs, Benefits, and the Plasmid Paradox ». *Canadian Journal of Microbiology* 64(5): 293-304. doi:10.1139/cjm-2017-0609.
- Castañeda-Barba, Salvador, Eva M. Top, et Thibault Stalder. 2024. « Plasmids, a Molecular Cornerstone of Antimicrobial Resistance in the One Health Era ». *Nature Reviews Microbiology* 22(1): 18-32. doi:10.1038/s41579-023-00926-x.

- Cavallo, J.-D., R. Fabre, F. Jehl, C. Rapp, et E. Garrabé. 2004. « Bêtalactamines ». *EMC - Maladies Infectieuses* 1(3): 129-202. doi:10.1016/j.emcmi.2004.03.003.
- Caveney, Nathanael A., Guillermo Caballero, Henri Voedts, Ana Niciforovic, Liam J. Worrall, Marija Vuckovic, Matthieu Fonvielle, et al. 2019. « Structural Insight into YcbB-Mediated Beta-Lactam Resistance in *Escherichia Coli* ». *Nature Communications* 10(1): 1849. doi:10.1038/s41467-019-09507-0.
- Chandler, Michael, Olivier Fayet, Philippe Rousseau, Bao Ton Hoang, et Guy Duval-Valentin. 2015. « Copy-out–Paste-in Transposition of IS *911* : A Major Transposition Pathway » éd. Mick Chandler et Nancy Craig. *Microbiology Spectrum* 3(4): 3.4.01. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0031-2014.
- Chaves, José, Margarita G. Ladona, Concepción Segura, Amparo Coira, Roser Reig, et Coral Ampurdanés. 2001. « SHV-1 β -Lactamase Is Mainly a Chromosomally Encoded Species-Specific Enzyme in *Klebsiella Pneumoniae* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(10): 2856-61. doi:10.1128/AAC.45.10.2856-2861.2001.
- Chen, Liang, Gisele Peirano, Barry N Kreiswirth, Rebekah Devinney, et Johann D D Pitout. 2022. « Acquisition of Genomic Elements Were Pivotal for the Success of *Escherichia Coli* ST410 ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 77(12): 3399-3407. doi:10.1093/jac/dkac329.
- Chiou, C S, et A L Jones. 1993. « Nucleotide Sequence Analysis of a Transposon (Tn5393) Carrying Streptomycin Resistance Genes in *Erwinia Amylovora* and Other Gram-Negative Bacteria ». *Journal of Bacteriology* 175(3): 732-40. doi:10.1128/jb.175.3.732-740.1993.
- Cho, Hongbaek, Tsuyoshi Uehara, et Thomas G. Bernhardt. 2014. « Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery ». *Cell* 159(6): 1300-1311. doi:10.1016/j.cell.2014.11.017.
- Cho, Shu-Ting, Emma G. Mills, Marissa P. Griffith, Hayley R. Nordstrom, Christi L. McElheny, Lee H. Harrison, Yohei Doi, et Daria Van Tyne. 2023. « Evolution of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing ST131 *Escherichia Coli* at a Single Hospital over 15 Years ». doi:10.1101/2023.12.11.571174.
- Chubiz, Lon M., et Christopher V. Rao. 2011. « Role of the Mar-Sox-Rob Regulon in Regulating Outer Membrane Porin Expression ». *Journal of Bacteriology* 193(9): 2252-60. doi:10.1128/JB.01382-10.
- Chudejova, Katerina, Tsolaire Sourenian, Jana Palkovicova, Katarina Stredanska, Lucie Nechutna, Katerina Vlkova, Vendula Studentova, et al. 2024. « Genomic Characterization of ST38 NDM-5-Producing *Escherichia Coli* Isolates from an Outbreak in the Czech Republic » éd. Boudewijn L. De Jonge. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: e00133-24. doi:10.1128/aac.00133-24.
- Clark, Alvin J., et Gareth J. Warren. 1979. « CONJUGAL TRANSMISSION OF PLASMIDS ». *Annual Review of Genetics* 13(1): 99-125. doi:10.1146/annurev.ge.13.120179.000531.

- Comeau, André M., Graham F. Hatfull, Henry M. Krisch, Debbie Lindell, Nicholas H. Mann, et David Prangishvili. 2008. « Exploring the Prokaryotic Virosphere ». *Research in Microbiology* 159(5): 306-13. doi:10.1016/j.resmic.2008.05.001.
- Coque, Teresa M., Angela Novais, Alessandra Carattoli, Laurent Poirel, Johann Pitout, Luísa Peixe, Fernando Baquero, Rafael Cantón, et Patrice Nordmann. 2008. « Dissemination of Clonally Related *Escherichia Coli* Strains Expressing Extended-Spectrum Beta-Lactamase CTX-M-15 ». *Emerging Infectious Diseases* 14(2): 195-200. doi:10.3201/eid1402.070350.
- Couturier, Agathe, Chloé Virolle, Kelly Goldlust, Annick Berne-Dedieu, Audrey Reuter, Sophie Nolivos, Yoshiharu Yamaichi, Sarah Bigot, et Christian Lesterlin. 2023. « Real-Time Visualisation of the Intracellular Dynamics of Conjugative Plasmid Transfer ». *Nature Communications* 14(1): 294. doi:10.1038/s41467-023-35978-3.
- Cuzon, Gaele, Jocelyne Ouanich, Remy Gondret, Thierry Naas, et Patrice Nordmann. 2011. « Outbreak of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Isolates in France ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(5): 2420-23. doi:10.1128/AAC.01452-10.
- Darby, Elizabeth M., Eleftheria Trampari, Pauline Siasat, Maria Solsona Gaya, Ilyas Alav, Mark A. Webber, et Jessica M. A. Blair. 2023. « Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance Revisited ». *Nature Reviews Microbiology* 21(5): 280-95. doi:10.1038/s41579-022-00820-y.
- Datsenko, Kirill A., et Barry L. Wanner. 2000. « One-Step Inactivation of Chromosomal Genes in *Escherichia Coli* K-12 Using PCR Products ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(12): 6640-45. doi:10.1073/pnas.120163297.
- Datta, Naomi, et R. W. Hedges. 1971. « Compatibility Groups among Fi- R Factors ». *Nature* 234(5326): 222-23. doi:10.1038/234222a0.
- Datta, Naomi, et Polyxeni Kontomichalou. 1965. « Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious R Factors In Enterobacteriaceae ». *Nature* 208(5007): 239-41. doi:10.1038/208239a0.
- De Oliveira, David M. P., Brian M. Forde, Timothy J. Kidd, Patrick N. A. Harris, Mark A. Schembri, Scott A. Beatson, David L. Paterson, et Mark J. Walker. 2020. « Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens ». *Clinical Microbiology Reviews* 33(3): e00181-19. doi:10.1128/CMR.00181-19.
- De Rosa, Margherita, Anna Verdino, Annunziata Soriente, et Anna Marabotti. 2021. « The Odd Couple(s): An Overview of Beta-Lactam Antibiotics Bearing More Than One Pharmacophoric Group ». *International Journal of Molecular Sciences* 22(2): 617. doi:10.3390/ijms22020617.
- Deep, Amar, Yajie Gu, Yong-Qi Gao, Kaori M. Ego, Mark A. Herzik, Huilin Zhou, et Kevin D. Corbett. 2022. « The SMC-Family Wadjet Complex Protects Bacteria from Plasmid Transformation by Recognition and Cleavage of Closed-Circular DNA ». *Molecular Cell* 82(21): 4145-4159.e7. doi:10.1016/j.molcel.2022.09.008.

- Del Solar, Gloria, Rafael Giraldo, María Jesús Ruiz-Echevarría, Manuel Espinosa, et Ramón Díaz-Orejas. 1998. « Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(2): 434-64. doi:10.1128/MMBR.62.2.434-464.1998.
- DelaFuente, Javier, Laura Toribio-Celestino, Alfonso Santos-Lopez, Ricardo León-Sampedro, Aida Alonso-del Valle, Coloma Costas, Marta Hernández-García, et al. 2022. « Within-Patient Evolution of Plasmid-Mediated Antimicrobial Resistance ». *Nature Ecology & Evolution* 6(12): 1980-91. doi:10.1038/s41559-022-01908-7.
- Delavat, François, Ryo Miyazaki, Nicolas Carraro, Nicolas Pradervand, et Jan Roelof Van Der Meer. 2017. « The Hidden Life of Integrative and Conjugative Elements ». *FEMS Microbiology Reviews* 41(4): 512-37. doi:10.1093/femsre/fux008.
- Delgado-Blas, Jose F., Cristina M. Ovejero, Sophia David, Carlos Serna, Mario Pulido-Vadillo, Natalia Montero, David M. Aanensen, Lorena Abadia-Patiño, et Bruno Gonzalez-Zorn. 2023. « Global Scenario of the RmtE Pan-Aminoglycoside-Resistance Mechanism: Emergence of the rmtE4 Gene in South America Associated with a Hospital-Related IncL Plasmid ». *Microbial Genomics* 9(3). doi:10.1099/mgen.0.000946.
- Doron, Shany, Sarah Melamed, Gal Ofir, Azita Leavitt, Anna Lopatina, Mai Keren, Gil Amitai, et Rotem Sorek. 2018. « Systematic Discovery of Antiphage Defense Systems in the Microbial Pangenome ». *Science* 359(6379): eaar4120. doi:10.1126/science.aar4120.
- Duan, Ning, Emily Hand, Mannuku Pheko, Shikha Sharma, et Akintunde Emiola. 2024. « Structure-Guided Discovery of Anti-CRISPR and Anti-Phage Defense Proteins ». *Nature Communications* 15(1): 649. doi:10.1038/s41467-024-45068-7.
- Dunny, Gary M, et Christopher M Johnson. 2011. « Regulatory Circuits Controlling Enterococcal Conjugation: Lessons for Functional Genomics ». *Current Opinion in Microbiology* 14(2): 174-80. doi:10.1016/j.mib.2011.01.008.
- Dziewit, Lukasz, Jadwiga Baj, Magdalena Szuplewska, Anna Maj, Mateusz Tabin, Anna Czyzkowska, Grazyna Skrzypczyk, et al. 2012. « Insights into the Transposable Mobilome of *Paracoccus* Spp. (Alphaproteobacteria) » éd. Laurence Van Melderén. *PLoS ONE* 7(2): e32277. doi:10.1371/journal.pone.0032277.
- Ehrlich, Paul, et S. Hata. 1910. *Die experimentelle Chemotherapie der Spirilloesen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/978-3-642-64926-4.
- Ellis, Michael J., et David B. Haniford. 2016. « Riboregulation of Bacterial and Archaeal Transposition ». *WIREs RNA* 7(3): 382-98. doi:10.1002/wrna.1341.
- Emeraud, Cecile, Delphine Girlich, Rémy A. Bonnin, Agnès B. Jousset, Thierry Naas, et Laurent Dortet. 2021. « Emergence and Polyclonal Dissemination of OXA-244–Producing *Escherichia coli*, France ». *Emerging Infectious Diseases* 27(4): 1206-10. doi:10.3201/eid2704.204459.
- Emeraud, Cécile, Khanh Villageois-Tran, Nathalie Genel, Laure Surgers, Wladimir Sougakoff, Guillaume Arlet, Rémy A. Bonnin, Dominique Decré, et Catherine Eckert. 2020. « Characterisation of Incompatibility Groups and Plasmid Addiction Systems in a

- Collection of Multiresistant-Producing *Klebsiella Pneumoniae* Strains ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 55(3): 105855. doi:10.1016/j.ijantimicag.2019.11.012.
- Escudero*, José Antonio, Céline Loot*, Aleksandra Nivina, et Didier Mazel. 2015. « The Integron: Adaptation On Demand » éd. Phoebe Rice et Nancy Craig. *Microbiology Spectrum* 3(2): 3.2.10. doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0019-2014.
- Evans, Benjamin A., et Sebastian G. B. Amyes. 2014. « OXA β -Lactamases ». *Clinical Microbiology Reviews* 27(2): 241-63. doi:10.1128/CMR.00117-13.
- Falgenhauer, Linda, Patrice Nordmann, Can Imirzalioglu, Yancheng Yao, Jane Falgenhauer, Anja M. Hauri, Petra Heinmüller, et Trinad Chakraborty. 2020. « Cross-Border Emergence of Clonal Lineages of ST38 *Escherichia Coli* Producing the OXA-48-like Carbapenemase OXA-244 in Germany and Switzerland ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 56(6): 106157. doi:10.1016/j.ijantimicag.2020.106157.
- Fisher, Jed, Robert L. Charnas, Scott M. Bradley, et Jeremy R. Knowles. 1981. « Inactivation of the RTEM β -Lactamase from *Escherichia Coli*. Interaction of Penam Sulfones with the Enzyme ». *Biochemistry* 20(10): 2726-31. doi:10.1021/bi00513a004.
- Fisher, Jed F., Samy O. Meroueh, et Shahriar Mobashery. 2005. « Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity ». *Chemical Reviews* 105(2): 395-424. doi:10.1021/cr030102i.
- Fleming, Alexander. « ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B. INFLUENZ?1E. »
- Fomenkov, Alexey, Zhiyi Sun, Iain A Murray, Cristian Ruse, Colleen McClung, Yoshiharu Yamaichi, Elisabeth A Raleigh, et Richard J Roberts. 2020. « Plasmid Replication-Associated Single-Strand-Specific Methyltransferases ». *Nucleic Acids Research* 48(22): 12858-73. doi:10.1093/nar/gkaa1163.
- Fonseca, Erica L., Sergio M. Morgado, Raquel V. Caldart, et Ana Carolina Vicente. 2022. « Global Genomic Epidemiology of *Escherichia Coli* (ExPEC) ST38 Lineage Revealed a Virulome Associated with Human Infections ». *Microorganisms* 10(12): 2482. doi:10.3390/microorganisms10122482.
- Fraikin, Nathan, Agathe Couturier, et Christian Lesterlin. 2024. « The Winding Journey of Conjugative Plasmids toward a Novel Host Cell ». *Current Opinion in Microbiology* 78: 102449. doi:10.1016/j.mib.2024.102449.
- Freire, Samanta, Jacqueline Findlay, Eva Gruner, Vera Bruderer, Patrice Nordmann, et Laurent Poirel. 2024. « Modification of the Penicillin-Binding-Protein 3 as a Source of Resistance to Broad-Spectrum Cephalosporins in *Escherichia Coli* ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*: dkae020. doi:10.1093/jac/dkae020.
- Frost, L S, K Ippen-Ihler, et R A Skurray. 1994. « Analysis of the Sequence and Gene Products of the Transfer Region of the F Sex Factor ». *Microbiological Reviews* 58(2): 162-210. doi:10.1128/mr.58.2.162-210.1994.

- Frost, Laura S, et Günther Koraimann. 2010. « Regulation of Bacterial Conjugation: Balancing Opportunity with Adversity ». *Future Microbiology* 5(7): 1057-71. doi:10.2217/fmb.10.70.
- Frost, Laura S., Raphael Leplae, Anne O. Summers, et Ariane Toussaint. 2005. « Mobile Genetic Elements: The Agents of Open Source Evolution ». *Nature Reviews Microbiology* 3(9): 722-32. doi:10.1038/nrmicro1235.
- García-Aljaro, Cristina, Elisenda Ballesté, et Maite Muniesa. 2017. « Beyond the Canonical Strategies of Horizontal Gene Transfer in Prokaryotes ». *Current Opinion in Microbiology* 38: 95-105. doi:10.1016/j.mib.2017.04.011.
- Garneau, Josiane E., Marie-Ève Dupuis, Manuela Villion, Dennis A. Romero, Rodolphe Barrangou, Patrick Boyaval, Christophe Fremaux, et al. 2010. « The CRISPR/Cas Bacterial Immune System Cleaves Bacteriophage and Plasmid DNA ». *Nature* 468(7320): 67-71. doi:10.1038/nature09523.
- Gauthier, Lauraine, Laurent Dortet, Garance Cotellon, Elodie Creton, Gaëlle Cuzon, Valérie Ponties, Rémy A. Bonnin, et Thierry Naas. 2018. « Diversity of Carbapenemase-Producing Escherichia Coli Isolates in France in 2012-2013 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(8): e00266-18. doi:10.1128/AAC.00266-18.
- Georjon, Héloïse, et Aude Bernheim. 2023. « The Highly Diverse Antiphage Defence Systems of Bacteria ». *Nature Reviews Microbiology* 21(10): 686-700. doi:10.1038/s41579-023-00934-x.
- Gerken, Henri, et Rajeev Misra. 2010. « MzrA-EnvZ Interactions in the Periplasm Influence the EnvZ/OmpR Two-Component Regulon ». *Journal of Bacteriology* 192(23): 6271-78. doi:10.1128/JB.00855-10.
- Giani, Tommaso, Viola Conte, Vincenzo Di Pilato, Richard Aschbacher, Cordula Weber, Clara Larcher, et Gian Maria Rossolini. 2012. « Escherichia Coli from Italy Producing OXA-48 Carbapenemase Encoded by a Novel Tn 1999 Transposon Derivative ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(4): 2211-13. doi:10.1128/AAC.00035-12.
- Gogarten, Maria Boekels, J. Peter Gogarten, et Lorraine Olendzenski, éd. 2009. *Horizontal gene transfer: genomes in flux*. 1st ed. New York: Springer.
- Goldlust, Kelly, Adrien Ducret, Manuel Halte, Annick Dedieu-Berne, Marc Erhardt, et Christian Lesterlin. 2023. « The F Pilus Serves as a Conduit for the DNA during Conjugation between Physically Distant Bacteria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120(47): e2310842120. doi:10.1073/pnas.2310842120.
- Golkar, Zhabiz, Omar Bagasra, et Donald Gene Pace. 2014. « Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis ». *The Journal of Infection in Developing Countries* 8(02): 129-36. doi:10.3855/jidc.3573.
- Gordeeva, Julia, Natalya Morozova, Nicolas Sierro, Artem Isaev, Tomas Sinkunas, Ksenia Tsvetkova, Mikhail Matlashov, et al. 2019. « BREX System of Escherichia Coli Distinguishes Self from Non-Self by Methylation of a Specific DNA Site ». *Nucleic Acids Research* 47(1): 253-65. doi:10.1093/nar/gky1125.

- Grindley, N. D. F., et C. M. Joyce. 1981. « Analysis of the Structure and Function of the Kanamycin-Resistance Transposon Tn903 ». *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 45(0): 125-33. doi:10.1101/SQB.1981.045.01.021.
- Guédon, Gérard, Virginie Libante, Charles Coluzzi, Sophie Payot, et Nathalie Leblond-Bourget. 2017. « The Obscure World of Integrative and Mobilizable Elements, Highly Widespread Elements That Pirate Bacterial Conjugative Systems ». *Genes* 8(11): 337. doi:10.3390/genes8110337.
- Guenther, Sebastian, Torsten Semmler, Annegret Stubbe, Michael Stubbe, Lothar H. Wieler, et Katharina Schaufler. 2017. « Chromosomally Encoded ESBL Genes in Escherichia Coli of ST38 from Mongolian Wild Birds ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(5): 1310-13. doi:10.1093/jac/dkx006.
- Guynet, Catherine, et Fernando De La Cruz. 2011. « Plasmid Segregation without Partition ». *Mobile Genetic Elements* 1(3): 236-41. doi:10.4161/mge.1.3.18229.
- Haenni, Marisa, Véronique Métayer, Agnese Lupo, Antoine Drapeau, et Jean-Yves Madec. 2022. « Spread of the *Bla*_{OXA-48} /IncL Plasmid within and between Dogs in City Parks, France » éd. Nilton Lincopan. *Microbiology Spectrum* 10(3): e00403-22. doi:10.1128/spectrum.00403-22.
- Hall, James P. J., A. Jamie Wood, Ellie Harrison, et Michael A. Brockhurst. 2016. « Source–Sink Plasmid Transfer Dynamics Maintain Gene Mobility in Soil Bacterial Communities ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(29): 8260-65. doi:10.1073/pnas.1600974113.
- Hall, James P. J., Rosanna C. T. Wright, David Guymer, Ellie Harrison, et Michael A. Brockhurst. 2020. « Extremely Fast Amelioration of Plasmid Fitness Costs by Multiple Functionally Diverse Pathways ». *Microbiology (Reading, England)* 166(1): 56-62. doi:10.1099/mic.0.000862.
- Hall, James P. J., Rosanna C. T. Wright, Ellie Harrison, Katie J. Muddiman, A. Jamie Wood, Steve Paterson, et Michael A. Brockhurst. 2021. « Plasmid Fitness Costs Are Caused by Specific Genetic Conflicts Enabling Resolution by Compensatory Mutation » éd. J. Arjan G. M. De Visser. *PLOS Biology* 19(10): e3001225. doi:10.1371/journal.pbio.3001225.
- Hallet, Bernard, et David J. Sherratt. 2006. « Transposition and Site-Specific Recombination: Adapting DNA Cut-and-Paste Mechanisms to a Variety of Genetic Rearrangements ». *FEMS Microbiology Reviews* 21(2): 157-78. doi:10.1111/j.1574-6976.1997.tb00349.x.
- Hammerum, Anette M, Lone Jannok Porsbo, Frank Hansen, Louise Roer, Hülya Kaya, Anna Henius, Karina Lauenborg Møller, et al. 2020. « Surveillance of OXA-244-Producing Escherichia Coli and Epidemiologic Investigation of Cases, Denmark, January 2016 to August 2019 ». *Eurosurveillance* 25(18). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.18.1900742.
- Hamprecht, Axel, Julian Sommer, Matthias Willmann, Christina Brender, Yvonne Stelzer, Felix F. Krause, Tsvetan Tsvetkov, et al. 2019. « Pathogenicity of Clinical OXA-48 Isolates and Impact of the OXA-48 IncL Plasmid on Virulence and Bacterial Fitness ». *Frontiers in Microbiology* 10: 2509. doi:10.3389/fmicb.2019.02509.

- Harmer, Christopher J., Robert A. Moran, et Ruth M. Hall. 2014. « Movement of IS 26 - Associated Antibiotic Resistance Genes Occurs via a Translocatable Unit That Includes a Single IS 26 and Preferentially Inserts Adjacent to Another IS 26 » éd. Karen Bush. *mBio* 5(5): e01801-14. doi:10.1128/mBio.01801-14.
- Harshey, Rasika M. 2012. « The Mu Story: How a Maverick Phage Moved the Field Forward ». *Mobile DNA* 3(1): 21. doi:10.1186/1759-8753-3-21.
- He, Dandan, Yingying Zhu, Ruichao Li, Yushan Pan, Jianhua Liu, Li Yuan, et Gongzheng Hu. 2019. « Emergence of a Hybrid Plasmid Derived from IncN1-F33:A⁻:B⁻ and Mcr-1-Bearing Plasmids Mediated by IS26 ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 74(11): 3184-89. doi:10.1093/jac/dkz327.
- He, Yunjiao, Jinping Lei, Xuehua Pan, Xuhui Huang, et Yanxiang Zhao. 2020. « The Hydrolytic Water Molecule of Class A β -Lactamase Relies on the Acyl-Enzyme Intermediate ES* for Proper Coordination and Catalysis ». *Scientific Reports* 10(1): 10205. doi:10.1038/s41598-020-66431-w.
- Henderson, D., et R. Meyer. 1999. « The MobA-Linked Primase Is the Only Replication Protein of R1162 Required for Conjugal Mobilization ». *Journal of Bacteriology* 181(9): 2973-78. doi:10.1128/JB.181.9.2973-2978.1999.
- Hendrickx, Antoni P. A., Fabian Landman, Angela De Haan, Sandra Witteveen, Marga G. Van Santen-Verheuvél, Leo M. Schouls, et the Dutch CPE surveillance Study Group. 2021. « Bla OXA-48-like Genome Architecture among Carbapenemase-Producing Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae in the Netherlands ». *Microbial Genomics* 7(5). doi:10.1099/mgen.0.000512.
- Hickman, Alison B., et Fred Dyda. 2016. « DNA Transposition at Work ». *Chemical Reviews* 116(20): 12758-84. doi:10.1021/acs.chemrev.6b00003.
- Hodgkin, D. C. 1949. « The X-Ray Analysis of the Structure of Penicillin ». *Advancement of Science* 6(22): 85-89.
- Hong, Jun Sung, Eun-Jeong Yoon, Hyukmin Lee, Seok Hoon Jeong, et Kyungwon Lee. 2016. « Clonal Dissemination of Pseudomonas Aeruginosa Sequence Type 235 Isolates Carrying *Bla*_{IMP-6} and Emergence of *Bla*_{GES-24} and *Bla*_{IMP-10} on Novel Genomic Islands PGI-15 and -16 in South Korea ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(12): 7216-23. doi:10.1128/AAC.01601-16.
- Hudault, S. 2001. « Escherichia coli strains colonising the gastrointestinal tract protect germfree mice against Salmonella typhimurium infection ». *Gut* 49(1): 47-55. doi:10.1136/gut.49.1.47.
- Hugonnet, Jean-Emmanuel, Dominique Mengin-Lecreulx, Alejandro Monton, Tanneke Den Blaauwen, Etienne Carbonnelle, Carole Veckerlé, Yves Brun V., et al. 2016. « Factors Essential for L,D-Transpeptidase-Mediated Peptidoglycan Cross-Linking and β -Lactam Resistance in Escherichia Coli ». *eLife* 5: e19469. doi:10.7554/eLife.19469.
- Huo, Binghui, DanDan Wei, QiSen Huang, Shanshan Huang, LinPing Fan, Ping Li, Jiehui Qiu, et al. 2024. « Acquisition of a Stable and Transferable Plasmid Coharboursing Hypervirulence and MDR Genes with Low Fitness Cost: Accelerating the

- Dissemination of ST11-KL64 CR-HvKP ». *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 36: 350-57. doi:10.1016/j.jgar.2024.01.010.
- Husna, Asmaul, Md. Masudur Rahman, A. T. M. Badruzzaman, Mahmudul Hasan Sikder, Mohammad Rafiqul Islam, Md. Tanvir Rahman, Jahangir Alam, et Hossam M. Ashour. 2023. « Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL): Challenges and Opportunities ». *Biomedicines* 11(11): 2937. doi:10.3390/biomedicines11112937.
- Hutchings, Matthew I, Andrew W Truman, et Barrie Wilkinson. 2019. « Antibiotics: Past, Present and Future ». *Current Opinion in Microbiology* 51: 72-80. doi:10.1016/j.mib.2019.10.008.
- Jacoby, George A. 2009. « AmpC β -Lactamases ». *Clinical Microbiology Reviews* 22(1): 161-82. doi:10.1128/CMR.00036-08.
- Jaskólska, Milena, David W. Adams, et Melanie Blokesch. 2022. « Two Defence Systems Eliminate Plasmids from Seventh Pandemic Vibrio Cholerae ». *Nature* 604(7905): 323-29. doi:10.1038/s41586-022-04546-y.
- Jiang, Xiaoying, Dan Li, Zhewei Sun, Yanyan Lu, Pei Li, Wanzhen Li, Dongliang Wang, et al. 2024. « Type I BREX System Defends against Antibiotic-Resistant Plasmids in *Escherichia Coli* » éd. Alessandra Carattoli. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 68(3): e01128-23. doi:10.1128/aac.01128-23.
- Jones, A. Louise, Peter T. Barth, et Brian M. Wilkins. 1992. « Zygotic Induction of Plasmid *Ssb* and *psiB* Genes Following Conjugative Transfer of Inc11 Plasmid Collb-P9 ». *Molecular Microbiology* 6(5): 605-13. doi:10.1111/j.1365-2958.1992.tb01507.x.
- Jousset, Agnès B., Saoussen Oueslati, Cécile Emeraud, Rémy A. Bonnin, Laurent Dortet, Bogdan I. Iorga, et Thierry Naas. 2021. « KPC-39-Mediated Resistance to Ceftazidime-Avibactam in a Klebsiella Pneumoniae ST307 Clinical Isolate ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 65(12): e0116021. doi:10.1128/AAC.01160-21.
- Kaneko, Kenichi, Ryoichi Okamoto, Ryuichi Nakano, Sayoko Kawakami, et Matsuhisa Inoue. 2005. « Gene Mutations Responsible for Overexpression of AmpC β -Lactamase in Some Clinical Isolates of *Enterobacter Cloacae* ». *Journal of Clinical Microbiology* 43(6): 2955-58. doi:10.1128/JCM.43.6.2955-2958.2005.
- Kawecki, Tadeusz J., Richard E. Lenski, Dieter Ebert, Brian Hollis, Isabelle Olivieri, et Michael C. Whitlock. 2012. « Experimental Evolution ». *Trends in Ecology & Evolution* 27(10): 547-60. doi:10.1016/j.tree.2012.06.001.
- Kelly, J. A., O. Dideberg, P. Charlier, J. P. Wery, M. Libert, P. C. Moews, J. R Knox, et al. 1986. « On the Origin of Bacterial Resistance to Penicillin: Comparison of a β -Lactamase and a Penicillin Target ». *Science* 231(4744): 1429-31. doi:10.1126/science.3082007.
- Kenney, Linda J., et Ganesh S. Anand. 2020. « EnvZ/OmpR Two-Component Signaling: An Archetype System That Can Function Noncanonically » éd. James M. Slauch. *EcoSal Plus* 9(1): ecosalplus.ESP-0001-2019. doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2019.

- Khatri, Asma, Nina Naeger Murphy, Peter Wiest, Melissa Osborn, Kathleen Garber, Michelle Hecker, Kelly Hurless, et al. 2015. « Community-Acquired Pyelonephritis in Pregnancy Caused by KPC-Producing *Klebsiella Pneumoniae* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(8): 4375-78. doi:10.1128/AAC.00553-15.
- Kim, Bongyoung, Mi Ran Seo, Jieun Kim, Yeonjae Kim, Seong Heon Wie, Moran Ki, Yong Kyun Cho, et al. 2020. « Molecular Epidemiology of Ciprofloxacin-Resistant *Escherichia Coli* Isolated from Community-Acquired Urinary Tract Infections in Korea ». *Infection & Chemotherapy* 52(2): 194-203. doi:10.3947/ic.2020.52.2.194.
- Kim, Jay W., Vega Bugata, Gerardo Cortés-Cortés, Giselle Quevedo-Martínez, et Manel Camps. 2020. « Mechanisms of Theta Plasmid Replication in Enterobacteria and Implications for Adaptation to Its Host » éd. James M. Slauch et Gregory Phillips. *EcoSal Plus* 9(1): 10.1128/ecosalplus.ESP-0026-2019. doi:10.1128/ecosalplus.esp-0026-2019.
- Kim, Semi, Ji Youn Sung, Hye Hyun Cho, Kye Chul Kwon, et Sun Hoe Koo. 2016. « Characteristics of the Molecular Epidemiology of CTX-M-Producing *Escherichia Coli* Isolated from a Tertiary Hospital in Daejeon, Korea ». *Journal of Microbiology and Biotechnology* 26(9): 1643-49. doi:10.4014/jmb.1603.03063.
- Kloos, Julia, João A Gama, Joachim Hegstad, Ørjan Samuelsen, et Pål J Johnsen. 2021. « Piggybacking on Niche Adaptation Improves the Maintenance of Multidrug-Resistance Plasmids » éd. Miriam Barlow. *Molecular Biology and Evolution* 38(8): 3188-3201. doi:10.1093/molbev/msab091.
- Kong, Hoi-Kuan, Qing Pan, Wai-U. Lo, Xuan Liu, Carmen O. K. Law, Ting-fung Chan, Pak-Leung Ho, et Terrence Chi-Kong Lau. 2018. « Fine-Tuning Carbapenem Resistance by Reducing Porin Permeability of Bacteria Activated in the Selection Process of Conjugation ». *Scientific Reports* 8(1): 15248. doi:10.1038/s41598-018-33568-8.
- Konieczny, Igor, Katarzyna Bury, Aleksandra Wawrzycka, et Katarzyna Wegrzyn. 2015. « Iteron Plasmids ». In *Plasmids*, éd. Marcelo E. Tolmasky et Juan C. Alonso. Washington, DC, USA: ASM Press, 13-32. doi:10.1128/9781555818982.ch2.
- Koonin, Eugene V, Kira S Makarova, et Feng Zhang. 2017. « Diversity, Classification and Evolution of CRISPR-Cas Systems ». *Current Opinion in Microbiology* 37: 67-78. doi:10.1016/j.mib.2017.05.008.
- Koraimann, GÃ¼nther, et Maria A. Wagner. 2014. « Social behavior and decision making in bacterial conjugation ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 4. doi:10.3389/fcimb.2014.00054.
- Kumwenda, Geoffrey Peterkins, Yo Sugawara, Yukihiro Akeda, Yuki Matsumoto, Daisuke Motooka, Kazunori Tomono, et Shigeyuki Hamada. 2021. « Genomic Features of Plasmids Coding for KPC-2, NDM-5 or OXA-48 Carbapenemases in Enterobacteriaceae from Malawi ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 76(1): 267-70. doi:10.1093/jac/dkaa387.
- Kung, Vanderlene L., Egon A. Ozer, et Alan R. Hauser. 2010. « The Accessory Genome of *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 74(4): 621-41. doi:10.1128/MMBR.00027-10.

- Kuzmenko, Anton, Anastasiya Oguienko, Daria Esyunina, Denis Yudin, Mayya Petrova, Alina Kudinova, Olga Maslova, et al. 2020. « DNA Targeting and Interference by a Bacterial Argonaute Nuclease ». *Nature* 587(7835): 632-37. doi:10.1038/s41586-020-2605-1.
- Lartigue, Marie-Frédérique, Laurent Poirel, Daniel Aubert, et Patrice Nordmann. 2006. « In Vitro Analysis of IS *Ecp1B* -Mediated Mobilization of Naturally Occurring β -Lactamase Gene *Bla*_{CTX-M} of *Kluyvera Ascorbata* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(4): 1282-86. doi:10.1128/AAC.50.4.1282-1286.2006.
- Lato, Daniella F., et G. Brian Golding. 2020. « Spatial Patterns of Gene Expression in Bacterial Genomes ». *Journal of Molecular Evolution* 88(6): 510-20. doi:10.1007/s00239-020-09951-3.
- Lauretti, Laura, Maria Letizia Riccio, Annarita Mazzariol, Giuseppe Cornaglia, Gianfranco Amicosante, Roberta Fontana, et Gian Maria Rossolini. 1999. « Cloning and Characterization of *Bla*_{VIM}, a New Integron-Borne Metallo- β -Lactamase Gene from a *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Isolate ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 43(7): 1584-90. doi:10.1128/AAC.43.7.1584.
- Lederberg, Joshua. 1952. « Cell Genetics and Hereditary Symbiosis ». *Physiological Reviews* 32(4): 403-30. doi:10.1152/physrev.1952.32.4.403.
- León-Sampedro, Ricardo, Javier DelaFuente, Cristina Díaz-Agero, Thomas Crellen, Patrick Musicha, Jerónimo Rodríguez-Beltrán, Carmen de la Vega, et al. 2021. « Pervasive Transmission of a Carbapenem Resistance Plasmid in the Gut Microbiota of Hospitalized Patients ». *Nature Microbiology* 6(5): 606-16. doi:10.1038/s41564-021-00879-y.
- Liang, Wei, Yingzhou Xie, Wei Xiong, Yu Tang, Gang Li, Xiaofei Jiang, et Yuan Lu. 2017. « Anti-Restriction Protein, KlcAHS, Promotes Dissemination of Carbapenem Resistance ». *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7: 150. doi:10.3389/fcimb.2017.00150.
- Liebert, Cynthia A., Ruth M. Hall, et Anne O. Summers. 1999. « Transposon Tn 21, Flagship of the Floating Genome ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(3): 507-22. doi:10.1128/MMBR.63.3.507-522.1999.
- Lima, Lidia Moreira, Bianca Nascimento Monteiro Da Silva, Gisele Barbosa, et Eliezer J. Barreiro. 2020. « β -Lactam Antibiotics: An Overview from a Medicinal Chemistry Perspective ». *European Journal of Medicinal Chemistry* 208: 112829. doi:10.1016/j.ejmech.2020.112829.
- Lindemann, Paul Christoffer, Torunn Pedersen, Dorthea Hagen Oma, Jessin Janice, Fredrik Grøvan, Ghantous Milad Chedid, Liv Jorunn Hafne, et al. 2023. « Intraregional Hospital Outbreak of OXA-244-Producing Escherichia Coli ST38 in Norway, 2020 ». *Eurosurveillance* 28(27). doi:10.2807/1560-7917.ES.2023.28.27.2200773.
- Lisitskaya, Lidiya, Ekaterina Kropocheva, Aleksei Agapov, Maria Prostova, Vladimir Pantelev, Denis Yudin, Sergei Ryazansky, et al. 2023. « Bacterial Argonaute Nucleases Reveal Different Modes of DNA Targeting *in Vitro* and *in Vivo* ». *Nucleic Acids Research* 51(10): 5106-24. doi:10.1093/nar/gkad290.

- Liu, Gang, Line Elnif Thomsen, et John Elmerdahl Olsen. 2022. « Antimicrobial-Induced Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes in Bacteria: A Mini-Review ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 77(3): 556-67. doi:10.1093/jac/dkab450.
- Llosa, Matxalen, F. Xavier Gomis-Rüth, Miquel Coll, et Fernando De La Cruz. 2002. « Bacterial Conjugation: A Two-step Mechanism for DNA Transport ». *Molecular Microbiology* 45(1): 1-8. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03014.x.
- Loenen, Wil A. M., et Elisabeth A. Raleigh. 2014. « The Other Face of Restriction: Modification-Dependent Enzymes ». *Nucleic Acids Research* 42(1): 56-69. doi:10.1093/nar/gkt747.
- Loftie-Eaton, Wesley, Kelsie Bashford, Hannah Quinn, Kieran Dong, Jack Millstein, Samuel Hunter, Maureen K. Thomason, et al. 2017. « Compensatory Mutations Improve General Permissiveness to Antibiotic Resistance Plasmids ». *Nature Ecology & Evolution* 1(9): 1354-63. doi:10.1038/s41559-017-0243-2.
- Lopatkin, Allison J., Hannah R. Meredith, Jaydeep K. Srimani, Connor Pfeiffer, Rick Durrett, et Lingchong You. 2017. « Persistence and Reversal of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance ». *Nature Communications* 8(1): 1689. doi:10.1038/s41467-017-01532-1.
- Lu, Xueling, Jun Xiao, Longfei Wang, Bin Zhu, et Fengtao Huang. 2024. « The Nuclease-Associated Short Prokaryotic Argonaute System Nonspecifically Degrades DNA upon Activation by Target Recognition ». *Nucleic Acids Research* 52(2): 844-55. doi:10.1093/nar/gkad1145.
- M. Patil, Sachin, et Parag Patel. 2021. « Bactericidal and Bacteriostatic Antibiotics ». In *Infections and Sepsis Development*, éd. Vincenzo Neri, Lixing Huang, et Jie Li. IntechOpen. doi:10.5772/intechopen.99546.
- Macheboeuf, Pauline, Carlos Contreras-Martel, Viviana Job, Otto Dideberg, et Andréa Dessen. 2006. « Penicillin Binding Proteins: Key Players in Bacterial Cell Cycle and Drug Resistance Processes ». *FEMS Microbiology Reviews* 30(5): 673-91. doi:10.1111/j.1574-6976.2006.00024.x.
- MacLean, R. Craig, et Alvaro San Millan. 2019. « The Evolution of Antibiotic Resistance ». *Science* 365(6458): 1082-83. doi:10.1126/science.aax3879.
- Maekawa, Takafumi, Katsuhiko Yanagihara, et Eiichi Ohtsubo. 1996. « **A Cell-free System of Tn 3 Transposition and Transposition Immunity** ». *Genes to Cells* 1(11): 1007-16. doi:10.1046/j.1365-2443.1996.d01-216.x.
- Magiorakos, A.-P., A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske, S. Harbarth, et al. 2012. « Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance ». *Clinical Microbiology and Infection* 18(3): 268-81. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x.
- Mahendra, Caroline, Kathleen A. Christie, Beatriz A. Osuna, Rafael Pinilla-Redondo, Benjamin P. Kleinstiver, et Joseph Bondy-Denomy. 2020. « Broad-Spectrum Anti-CRISPR Proteins Facilitate Horizontal Gene Transfer ». *Nature Microbiology* 5(4): 620-29. doi:10.1038/s41564-020-0692-2.

- Mahillon, Jacques, et Michael Chandler. 1998. « Insertion Sequences ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3): 725-74. doi:10.1128/MMBR.62.3.725-774.1998.
- Makarova, Kira S., Yuri I. Wolf, et Eugene V. Koonin. 2013. « Comparative Genomics of Defense Systems in Archaea and Bacteria ». *Nucleic Acids Research* 41(8): 4360-77. doi:10.1093/nar/gkt157.
- Manzano-Marín, Alejandro, Armelle Coeur D'Acier, Anne-Laure Clamens, Céline Orvain, Corinne Cruaud, Valérie Barbe, et Emmanuelle Jouselin. 2020. « Serial Horizontal Transfer of Vitamin-Biosynthetic Genes Enables the Establishment of New Nutritional Symbionts in Aphids' Di-Symbiotic Systems ». *The ISME Journal* 14(1): 259-73. doi:10.1038/s41396-019-0533-6.
- Marrero, Joeli, et Matthew K. Waldor. 2007. « Determinants of Entry Exclusion within Eex and TraG Are Cytoplasmic ». *Journal of Bacteriology* 189(17): 6469-73. doi:10.1128/JB.00522-07.
- Martens, Evan, et Arnold L Demain. 2017. « The Antibiotic Resistance Crisis, with a Focus on the United States ». *The Journal of Antibiotics* 70(5): 520-26. doi:10.1038/ja.2017.30.
- Martinez, Elena, Carolina Marquez, Ana Ingold, John Merlino, Steven P. Djordjevic, H. W. Stokes, et Piklu Roy Chowdhury. 2012. « Diverse Mobilized Class 1 Integrons Are Common in the Chromosomes of Pathogenic *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Isolates ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(4): 2169-72. doi:10.1128/AAC.06048-11.
- Masai, Hisao, et Ken-ichi Arai. 1997. « Frpo: A Novel Single-Stranded DNA Promoter for Transcription and for Primer RNA Synthesis of DNA Replication ». *Cell* 89(6): 897-907. doi:10.1016/S0092-8674(00)80275-5.
- Maslowska, Katarzyna H., Karolina Makiela-Dzbenska, et Iwona J. Fijalkowska. 2019. « The SOS System: A Complex and Tightly Regulated Response to DNA Damage ». *Environmental and Molecular Mutagenesis* 60(4): 368-84. doi:10.1002/em.22267.
- Masters, Philip A., Thomas A. O'Bryan, John Zurlo, Debra Q. Miller, et Nirmal Joshi. 2003. « Trimethoprim-Sulfamethoxazole Revisited ». *Archives of Internal Medicine* 163(4): 402. doi:10.1001/archinte.163.4.402.
- Masuda, Nobuhisa, Eiko Sakagawa, Satoshi Ohya, Naomasa Gotoh, Hideto Tsujimoto, et Takeshi Nishino. 2000. « Substrate Specificities of MexAB-OprM, MexCD-OprJ, and MexXY-OprM Efflux Pumps in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 44(12): 3322-27. doi:10.1128/AAC.44.12.3322-3327.2000.
- Mataseje, Laura F, David A Boyd, Jeffrey Fuller, David Haldane, Linda Hoang, Brigitte Lefebvre, Roberto G Melano, et al. 2018. « Characterization of OXA-48-like Carbapenemase Producers in Canada, 2011–14 ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73(3): 626-33. doi:10.1093/jac/dkx462.
- Mayo-Muñoz, David, Rafael Pinilla-Redondo, Nils Birkholz, et Peter C. Fineran. 2023. « A Host of Armor: Prokaryotic Immune Strategies against Mobile Genetic Elements ». *Cell Reports* 42(7): 112672. doi:10.1016/j.celrep.2023.112672.

- McClintock, Barbara. 1950. « The Origin and Behavior of Mutable Loci in Maize ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 36(6): 344-55. doi:10.1073/pnas.36.6.344.
- McKown, R L, C S Waddell, L K Arciszewska, et N L Craig. 1987. « Identification of a Transposon Tn7-Dependent DNA-Binding Activity That Recognizes the Ends of Tn7. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(22): 7807-11. doi:10.1073/pnas.84.22.7807.
- Mendes, Rodrigo E, Ronald N Jones, Leah N Woosley, Vincent Cattoir, et Mariana Castanheira. 2019. « Application of Next-Generation Sequencing for Characterization of Surveillance and Clinical Trial Isolates: Analysis of the Distribution of β -Lactamase Resistance Genes and Lineage Background in the United States ». *Open Forum Infectious Diseases* 6(Supplement_1): S69-78. doi:10.1093/ofid/ofz004.
- Michael, Carolyn Anne, Dale Dominey-Howes, et Maurizio Labbate. 2014. « The Antimicrobial Resistance Crisis: Causes, Consequences, and Management ». *Frontiers in Public Health* 2. doi:10.3389/fpubh.2014.00145.
- Mierzejewska, Jolanta, Anna Kulińska, et Grazyna Jagura-Burdzy. 2007. « Functional Analysis of Replication and Stability Regions of Broad-Host-Range Conjugative Plasmid CTX-M3 from the IncL/M Incompatibility Group ». *Plasmid* 57(2): 95-107. doi:10.1016/j.plasmid.2006.09.001.
- Millan, A. San, R. Peña-Miller, M. Toll-Riera, Z. V. Halbert, A. R. McLean, B. S. Cooper, et R. C. MacLean. 2014. « Positive Selection and Compensatory Adaptation Interact to Stabilize Non-Transmissible Plasmids ». *Nature Communications* 5(1): 5208. doi:10.1038/ncomms6208.
- Million-Weaver, Samuel, et Manel Camps. 2014. « Mechanisms of Plasmid Segregation: Have Multicopy Plasmids Been Overlooked? » *Plasmid* 75: 27-36. doi:10.1016/j.plasmid.2014.07.002.
- Millman, Adi, Sarah Melamed, Azita Leavitt, Shany Doron, Aude Bernheim, Jens Hör, Jeremy Garb, et al. 2022. « An Expanded Arsenal of Immune Systems That Protect Bacteria from Phages ». *Cell Host & Microbe* 30(11): 1556-1569.e5. doi:10.1016/j.chom.2022.09.017.
- Mostafa, Heba H., Andrew Cameron, Samantha M. Taffner, Jun Wang, Adel Malek, Ghinwa Dumyati, Dwight J. Hardy, et Nicole D. Pecora. 2020. « Genomic Surveillance of Ceftriaxone-Resistant Escherichia coli in Western New York Suggests the Extended-Spectrum β -Lactamase blaCTX-M-27 Is Emerging on Distinct Plasmids in ST38 ». *Frontiers in Microbiology* 11: 1747. doi:10.3389/fmicb.2020.01747.
- Motz, Magdalena, et Kirsten Jung. 2018. « The Role of Polyproline Motifs in the Histidine Kinase EnvZ ». *PloS One* 13(6): e0199782. doi:10.1371/journal.pone.0199782.
- Murray, Christopher J L, Kevin Shunji Ikuta, Fablina Sharara, Lucien Swetschinski, Gisela Robles Aguilar, Authia Gray, Chieh Han, et al. 2022. « Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis ». *The Lancet* 399(10325): 629-55. doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0.

- Naas, Thierry, Patrice Nordmann, Gérard Vedel, et Claire Poyart. 2005. « Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC in a *Klebsiella Pneumoniae* Isolate from France ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(10): 4423-24. doi:10.1128/AAC.49.10.4423-4424.2005.
- Naas, Thierry, Saoussen Oueslati, Rémy A. Bonnin, Maria Laura Dabos, Agustin Zavala, Laurent Dortet, Pascal Retailleau, et Bogdan I. Iorga. 2017. « Beta-Lactamase Database (BLDB) – Structure and Function ». *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 32(1): 917-19. doi:10.1080/14756366.2017.1344235.
- Nagy, Zita, et Michael Chandler. 2004. « Regulation of Transposition in Bacteria ». *Research in Microbiology* 155(5): 387-98. doi:10.1016/j.resmic.2004.01.008.
- Nelson, Mark L., Andrew Dinardo, Jeffery Hochberg, et George J. Armelagos. 2010. « Brief Communication: Mass Spectroscopic Characterization of Tetracycline in the Skeletal Remains of an Ancient Population from Sudanese Nubia 350–550 CE ». *American Journal of Physical Anthropology* 143(1): 151-54. doi:10.1002/ajpa.21340.
- Ni, Songwei, Baiyuan Li, Kaihao Tang, Jianyun Yao, Thomas K. Wood, Pengxia Wang, et Xiaoxue Wang. 2021. « Conjugative Plasmid-Encoded Toxin–Antitoxin System PrpT/PrpA Directly Controls Plasmid Copy Number ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 118(4): e2011577118. doi:10.1073/pnas.2011577118.
- Nicolas-Chanoine, Marie-Hélène, Xavier Bertrand, et Jean-Yves Madec. 2014. « *Escherichia Coli* ST131, an Intriguing Clonal Group ». *Clinical Microbiology Reviews* 27(3): 543-74. doi:10.1128/CMR.00125-13.
- Nikaido, Hiroshi. 1998. « Antibiotic Resistance Caused by Gram-Negative Multidrug Efflux Pumps ». *Clinical Infectious Diseases* 27(s1): S32-41. doi:10.1086/514920.
- Nikaido, Hiroshi. 2003. « Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited ». *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67(4): 593-656. doi:10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003.
- Nordmann, Patrice, Thierry Naas, et Laurent Poirel. 2011. « Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* ». *Emerging Infectious Diseases* 17(10): 1791-98. doi:10.3201/eid1710.110655.
- Norman, Anders, Lars H. Hansen, et Søren J. Sørensen. 2009. « Conjugative Plasmids: Vessels of the Communal Gene Pool ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364(1527): 2275-89. doi:10.1098/rstb.2009.0037.
- Noster, Janina, Philipp Thelen, et Axel Hamprecht. 2021. « Detection of Multidrug-Resistant Enterobacterales—From ESBLs to Carbapenemases ». *Antibiotics* 10(9): 1140. doi:10.3390/antibiotics10091140.
- Novick, R P. 1987. « Plasmid Incompatibility ». *Microbiological Reviews* 51(4): 381-95. doi:10.1128/mr.51.4.381-395.1987.
- O’Hara, Brendan J., Munirul Alam, et Wai-Leung Ng. 2022. « The *Vibrio Cholerae* Seventh Pandemic Islands Act in Tandem to Defend against a Circulating Phage » éd. Mireille Ansaldi. *PLOS Genetics* 18(8): e1010250. doi:10.1371/journal.pgen.1010250.

- « O'Neill, J. (2014) Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Health and Wealth of Nations. <https://www.who.int/news/item/29-04-2019-new-report-calls-for-urgent-action-to-avert-antimicrobial-resistance-crisis> ».
- Oshima, Taku, Hirofumi Aiba, Yasushi Masuda, Shigehiko Kanaya, Masahito Sugiura, Barry L. Wanner, Hirotsada Mori, et Takeshi Mizuno. 2002. « Transcriptome Analysis of All Two-component Regulatory System Mutants of *Escherichia Coli* K-12 ». *Molecular Microbiology* 46(1): 281-91. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03170.x.
- Oueslati, Saoussen, Patrice Nordmann, et Laurent Poirel. 2015. « Heterogeneous Hydrolytic Features for OXA-48-like β -Lactamases ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(4): 1059-63. doi:10.1093/jac/dku524.
- Palzkill, Timothy. 2018. « Structural and Mechanistic Basis for Extended-Spectrum Drug-Resistance Mutations in Altering the Specificity of TEM, CTX-M, and KPC β -lactamases ». *Frontiers in Molecular Biosciences* 5: 16. doi:10.3389/fmolb.2018.00016.
- Partridge, Sally R. 2011. « Analysis of Antibiotic Resistance Regions in Gram-Negative Bacteria ». *FEMS Microbiology Reviews* 35(5): 820-55. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x.
- Partridge, Sally R. 2015. « Resistance Mechanisms in Enterobacteriaceae ». *Pathology* 47(3): 276-84. doi:10.1097/PAT.0000000000000237.
- Partridge, Sally R., Stephen M. Kwong, Neville Firth, et Slade O. Jensen. 2018. « Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance ». *Clinical Microbiology Reviews* 31(4): e00088-17. doi:10.1128/CMR.00088-17.
- Patiño-Navarrete, Rafael, Isabelle Rosinski-Chupin, Nicolas Cabanel, Lauraine Gauthier, Julie Takissian, Jean-Yves Madec, Monzer Hamze, et al. 2020. « Stepwise Evolution and Convergent Recombination Underlie the Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Escherichia Coli* ». *Genome Medicine* 12(1): 10. doi:10.1186/s13073-019-0699-6.
- Patiño-Navarrete, Rafael, Isabelle Rosinski-Chupin, Nicolas Cabanel, Pengdbamba Dieudonné Zongo, Mélanie Héry, Saoussen Oueslati, Delphine Girlich, et al. 2022. « Specificities and Commonalities of Carbapenemase-Producing *Escherichia Coli* Isolated in France from 2012 to 2015 » éd. Zackery Bulman. *mSystems* 7(1): e01169-21. doi:10.1128/msystems.01169-21.
- Pesesky, Mitchell W., Rayna Tilley, et David A.C. Beck. 2019. « Mosaic Plasmids Are Abundant and Unevenly Distributed across Prokaryotic Taxa ». *Plasmid* 102: 10-18. doi:10.1016/j.plasmid.2019.02.003.
- Petty, Nicola K., Nouri L. Ben Zakour, Mitchell Stanton-Cook, Elizabeth Skippington, Makrina Totsika, Brian M. Forde, Minh-Duy Phan, et al. 2014. « Global Dissemination of a Multidrug Resistant *Escherichia Coli* Clone ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111(15): 5694-99. doi:10.1073/pnas.1322678111.
- Pfaffl, M. W. 2001. « A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR ». *Nucleic Acids Research* 29(9): 45e-445. doi:10.1093/nar/29.9.e45.

- Pinilla-Redondo, Rafael, Saadlee Shehreen, Nicole D. Marino, Robert D. Fagerlund, Chris M. Brown, Søren J. Sørensen, Peter C. Fineran, et Joseph Bondy-Denomy. 2020. « Discovery of Multiple Anti-CRISPRs Highlights Anti-Defense Gene Clustering in Mobile Genetic Elements ». *Nature Communications* 11(1): 5652. doi:10.1038/s41467-020-19415-3.
- Piret, Jocelyne, et Guy Boivin. 2021. « Pandemics Throughout History ». *Frontiers in Microbiology* 11: 631736. doi:10.3389/fmicb.2020.631736.
- Pitout, Johann D. D., et Rebekah DeVinney. 2017. « Escherichia Coli ST131: A Multidrug-Resistant Clone Primed for Global Domination ». *F1000Research* 6: F1000 Faculty Rev-195. doi:10.12688/f1000research.10609.1.
- Pitout, Johann D. D., Gisele Peirano, Marleen M. Kock, Kathy-Anne Strydom, et Yasufumi Matsumura. 2019. « The Global Ascendancy of OXA-48-Type Carbapenemases ». *Clinical Microbiology Reviews* 33(1): e00102-19. doi:10.1128/CMR.00102-19.
- Pitout, Johann D. D., Gisele Peirano, Yasufumi Matsumura, Rebekah DeVinney, et Liang Chen. 2024. « *Escherichia Coli* Sequence Type 410 with Carbapenemases: A Paradigm Shift within *E. Coli* toward Multidrug Resistance » éd. Pranita D. Tamma. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 68(2): e01339-23. doi:10.1128/aac.01339-23.
- Pitout, Johann Dd, Gisele Peirano, et Rebekah DeVinney. 2023. « The Contributions of Multidrug Resistant Clones to the Success of Pandemic Extra-Intestinal Pathogenic *Escherichia Coli* ». *Expert Review of Anti-infective Therapy* 21(4): 343-53. doi:10.1080/14787210.2023.2184348.
- Pogliano, Joe, Thanh Quoc Ho, Zhenping Zhong, et Donald R. Helinski. 2001. « Multicopy Plasmids Are Clustered and Localized in *Escherichia Coli* ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98(8): 4486-91. doi:10.1073/pnas.081075798.
- Poirel, Laurent, Sandrine Bernabeu, Nicolas Fortineau, Isabelle Podglajen, Christine Lawrence, et Patrice Nordmann. 2011. « Emergence of OXA-48-Producing *Escherichia Coli* Clone ST38 in France ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(10): 4937-38. doi:10.1128/AAC.00413-11.
- Poirel, Laurent, Rémy A. Bonnin, et Patrice Nordmann. 2012. « Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(1): 559-62. doi:10.1128/AAC.05289-11.
- Poirel, Laurent, Claire Héritier, et Patrice Nordmann. 2004. « Chromosome-Encoded Ambler Class D β -Lactamase of *Shewanella Oneidensis* as a Progenitor of Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(1): 348-51. doi:10.1128/AAC.48.1.348-351.2004.
- Poirel, Laurent, Claire Héritier, Venus Tolün, et Patrice Nordmann. 2004. « Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella Pneumoniae* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48(1): 15-22. doi:10.1128/AAC.48.1.15-22.2004.

- Pongchaikul, Pisut, et Paninee Mongkolsuk. 2022. « Comprehensive Analysis of Imipenemase (IMP)-Type Metallo- β -Lactamase: A Global Distribution Threatening Asia ». *Antibiotics* 11(2): 236. doi:10.3390/antibiotics11020236.
- Porse, Andreas, Kristian Schønning, Christian Munck, et Morten O.A. Sommer. 2016. « Survival and Evolution of a Large Multidrug Resistance Plasmid in New Clinical Bacterial Hosts ». *Molecular Biology and Evolution* 33(11): 2860-73. doi:10.1093/molbev/msw163.
- Potron, A, L Poirel, E Rondinaud, et P Nordmann. 2013. « Intercontinental Spread of OXA-48 Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae over a 11-Year Period, 2001 to 2011 ». *Eurosurveillance* 18(31). doi:10.2807/1560-7917.ES2013.18.31.20549.
- Potron, Anaïs, Laurent Poirel, et Patrice Nordmann. 2014. « Derepressed Transfer Properties Leading to the Efficient Spread of the Plasmid Encoding Carbapenemase OXA-48 ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(1): 467-71. doi:10.1128/AAC.01344-13.
- Pradhan, Biswajit, Amar Deep, Jessica Koenig, Martin Baaske, Kevin Corbett, et Eugene Kim. 2024. « Loop Extrusion-Mediated Plasmid DNA Cleavage by the Bacterial SMC Wadjet Complex ». doi:10.1101/2024.02.17.580791.
- Puigbò, Pere, Kira S. Makarova, David M. Kristensen, Yuri I. Wolf, et Eugene V. Koonin. 2017. « Reconstruction of the Evolution of Microbial Defense Systems ». *BMC Evolutionary Biology* 17(1): 94. doi:10.1186/s12862-017-0942-y.
- Puymège, Aurore, Stéphane Bertin, Sarah Chuzeville, Gérard Guédon, et Sophie Payot. 2013. « Conjugative Transfer and Cis-Mobilization of a Genomic Island by an Integrative and Conjugative Element of *Streptococcus Agalactiae* ». *Journal of Bacteriology* 195(6): 1142-51. doi:10.1128/JB.02199-12.
- Quèbre, Valentin, Irene Del Campo, Ana Cuevas, Patricia Siguier, Jérôme Rech, Phan Thai Nguyen Le, Bao Ton-Hoang, et al. 2022. « Characterization of the DNA Binding Domain of StbA, A Key Protein of A New Type of DNA Segregation System ». *Journal of Molecular Biology* 434(19): 167752. doi:10.1016/j.jmb.2022.167752.
- Rahman, Md Ramim Tanver, Ismail Fliss, et Eric Biron. 2022. « Insights in the Development and Uses of Alternatives to Antibiotic Growth Promoters in Poultry and Swine Production ». *Antibiotics (Basel, Switzerland)* 11(6): 766. doi:10.3390/antibiotics11060766.
- Ramírez, María Soledad, Silvia Piñeiro, et Daniela Centrón. 2010. « Novel Insights about Class 2 Integrons from Experimental and Genomic Epidemiology ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(2): 699-706. doi:10.1128/AAC.01392-08.
- Ranjitkar, Srijan, Folkert Reck, Xiaobo Ke, Qingming Zhu, Glenn McEnroe, Sara L. Lopez, et Charles R. Dean. 2019. « Identification of Mutations in the *mrDA* Gene Encoding PBP2 That Reduce Carbapenem and Diazabicyclooctane Susceptibility of *Escherichia Coli* Clinical Isolates with Mutations in *ftsI* (PBP3) and Which Carry *Bla_{NDM-1}* » éd. Patricia A. Bradford. *mSphere* 4(4): e00074-19. doi:10.1128/mSphere.00074-19.
- Rapp, Robert P., et Carl Urban. 2012. « *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemases in Enterobacteriaceae: History, Evolution, and Microbiology Concerns ».

- Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy* 32(5): 399-407. doi:10.1002/j.1875-9114.2012.01035.x.
- Reading, C., et M. Cole. 1977. « Clavulanic Acid: A Beta-Lactamase-Inhibiting Beta-Lactam from *Streptomyces Clavuligerus* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11(5): 852-57. doi:10.1128/AAC.11.5.852.
- Roberts, Adam P., Michael Chandler, Patrice Courvalin, Gérard Guédon, Peter Mullany, Tony Pembroke, Julian I. Rood, et al. 2008. « Revised Nomenclature for Transposable Genetic Elements ». *Plasmid* 60(3): 167-73. doi:10.1016/j.plasmid.2008.08.001.
- Rocha, Eduardo P. C., et David Bikard. 2022. « Microbial Defenses against Mobile Genetic Elements and Viruses: Who Defends Whom from What? » *PLOS Biology* 20(1): e3001514. doi:10.1371/journal.pbio.3001514.
- Rodríguez-Beltrán, Jerónimo, Javier DelaFuente, Ricardo León-Sampedro, R. Craig MacLean, et Álvaro San Millán. 2021. « Beyond Horizontal Gene Transfer: The Role of Plasmids in Bacterial Evolution ». *Nature Reviews Microbiology* 19(6): 347-59. doi:10.1038/s41579-020-00497-1.
- Rodríguez-Rubio, Lorena, Carlos Serna, Manuel Ares-Arroyo, Bosco R Matamoros, Jose F Delgado-Blas, Natalia Montero, Cristina Bernabe-Balas, et al. 2020. « Extensive Antimicrobial Resistance Mobilization via Multicopy Plasmid Encapsulation Mediated by Temperate Phages ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75(11): 3173-80. doi:10.1093/jac/dkaa311.
- Roer, Louise, Frank M. Aarestrup, et Henrik Hasman. 2015. « The EcoKI Type I Restriction-Modification System in *Escherichia Coli* Affects but Is Not an Absolute Barrier for Conjugation » éd. R. L. Gourse. *Journal of Bacteriology* 197(2): 337-42. doi:10.1128/JB.02418-14.
- Roer, Louise, Søren Overballe-Petersen, Frank Hansen, Kristian Schønning, Mikala Wang, Bent L. Røder, Dennis S. Hansen, et al. 2018. « *Escherichia Coli* Sequence Type 410 Is Causing New International High-Risk Clones » éd. Mariana Castanheira. *mSphere* 3(4): e00337-18. doi:10.1128/mSphere.00337-18.
- Rogers, M B, T K Bennett, C M Payne, et C J Smith. 1994. « Insertional Activation of *cepA* Leads to High-Level Beta-Lactamase Expression in *Bacteroides Fragilis* Clinical Isolates ». *Journal of Bacteriology* 176(14): 4376-84. doi:10.1128/jb.176.14.4376-4384.1994.
- Ross, Joseph A., Simon J. Wardle, et David B. Haniford. 2010. « Tn 10 /IS 10 Transposition Is Downregulated at the Level of Transposase Expression by the RNA-binding Protein Hfq ». *Molecular Microbiology* 78(3): 607-21. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07359.x.
- Ross, Karen, Alessandro M. Varani, Erik Snesrud, Hongzhan Huang, Danillo Oliveira Alvarenga, Jian Zhang, Cathy Wu, Patrick McGann, et Mick Chandler. 2021. « TnCentral: A Prokaryotic Transposable Element Database and Web Portal for Transposon Analysis » éd. Susan Gottesman. *mBio* 12(5): e02060-21. doi:10.1128/mBio.02060-21.

- Rousset, François, Florence Depardieu, Solange Miele, Julien Dowding, Anne-Laure Laval, Erica Lieberman, Daniel Garry, et al. 2022. « Phages and Their Satellites Encode Hotspots of Antiviral Systems ». *Cell Host & Microbe* 30(5): 740-753.e5. doi:10.1016/j.chom.2022.02.018.
- Roy Chowdhury, Piklu, Priyanka Hastak, Matthew DeMaere, Ethan Wyrsh, Dmitriy Li, Paarthiphan Elankumaran, Monika Dolejska, et al. 2023. « Phylogenomic Analysis of a Global Collection of *Escherichia Coli* ST38: Evidence of Interspecies and Environmental Transmission? » éd. Yogendra Singh. *mSystems* 8(5): e01236-22. doi:10.1128/msystems.01236-22.
- Rozwandowicz, M, M S M Brouwer, J Fischer, J A Wagenaar, B Gonzalez-Zorn, B Guerra, D J Mevius, et J Hordijk. 2018. « Plasmids Carrying Antimicrobial Resistance Genes in Enterobacteriaceae ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 73(5): 1121-37. doi:10.1093/jac/dkx488.
- Ruiz-Martinez, Lidia, et Lidia López-Jiménez. 2011. « A Mechanism of Carbapenem Resistance Due to a New Insertion Element (ISPa133) in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *International Microbiology* (14): 51-58. doi:10.2436/20.1501.01.135.
- Ryazansky, Sergei, Andrey Kulbachinskiy, et Alexei A. Aravin. 2018. « The Expanded Universe of Prokaryotic Argonaute Proteins » éd. Eleftherios T. Papoutsakis. *mBio* 9(6): e01935-18. doi:10.1128/mBio.01935-18.
- Salehi, Bahare, Zohreh Ghalavand, Abbas Yadegar, et Gita Eslami. 2021. « Characteristics and Diversity of Mutations in Regulatory Genes of Resistance-Nodulation-Cell Division Efflux Pumps in Association with Drug-Resistant Clinical Isolates of *Acinetobacter Baumannii* ». *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 10(1): 53. doi:10.1186/s13756-021-00924-9.
- Samuel, Bruria, et David Burstein. 2023. « A Diverse Repertoire of Anti-Defense Systems Is Encoded in the Leading Region of Plasmids ». doi:10.1101/2023.02.15.528439.
- San Millan, Alvaro, Jose Antonio Escudero, Danna R. Gifford, Didier Mazel, et R. Craig MacLean. 2016. « Multicopy Plasmids Potentiate the Evolution of Antibiotic Resistance in Bacteria ». *Nature Ecology & Evolution* 1(1): 0010. doi:10.1038/s41559-016-0010.
- San Millan, Alvaro, Karl Heilbron, et R Craig MacLean. 2014. « Positive Epistasis between Co-Infecting Plasmids Promotes Plasmid Survival in Bacterial Populations ». *The ISME Journal* 8(3): 601-12. doi:10.1038/ismej.2013.182.
- San Millan, Alvaro, et R. Craig MacLean. 2017. « Fitness Costs of Plasmids: A Limit to Plasmid Transmission » éd. Fernando Baquero, Emilio Bouza, J.A. Gutiérrez-Fuentes, et Teresa M. Coque. *Microbiology Spectrum* 5(5): 5.5.02. doi:10.1128/microbiolspec.MTBP-0016-2017.
- San Millan, Alvaro, Macarena Toll-Riera, Qin Qi, et R. Craig MacLean. 2015. « Interactions between Horizontally Acquired Genes Create a Fitness Cost in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Nature Communications* 6(1): 6845. doi:10.1038/ncomms7845.

- Sastre-Dominguez, Jorge, Javier DelaFuente, Laura Toribio-Celestino, Cristina Herencias, Pedro Herrador-Gomez, Coloma Costas, Marta Hernandez-Garcia, et al. 2024. « Plasmid-Encoded Insertion Sequences Promote Rapid Adaptation in Clinical Enterobacteria ». doi:10.1101/2024.03.01.582297.
- Satlin, Michael J., Liang Chen, Gopi Patel, Angela Gomez-Simmonds, Gregory Weston, Angela C. Kim, Susan K. Seo, et al. 2017. « Multicenter Clinical and Molecular Epidemiological Analysis of Bacteremia Due to Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) in the CRE Epicenter of the United States ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(4): e02349-16. doi:10.1128/AAC.02349-16.
- Sattler, Janko, Tsvetan Tsvetkov, Yvonne Stelzer, Sina Schäfer, Julian Sommer, Janina Noster, Stephan Göttig, et Axel Hamprecht. 2022. « Emergence of Tn *1999.7*, a New Transposon in *Bla_{OXA-48}*-Harboring Plasmids Associated with Increased Plasmid Stability ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 66(11): e00787-22. doi:10.1128/aac.00787-22.
- Sauvage, Eric, Frédéric Kerff, Mohammed Terrak, Juan A. Ayala, et Paulette Charlier. 2008. « The Penicillin-Binding Proteins: Structure and Role in Peptidoglycan Biosynthesis ». *FEMS Microbiology Reviews* 32(2): 234-58. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x.
- Schmidtke, Amber J., et Nancy D. Hanson. 2006. « Model System To Evaluate the Effect of *ampD* Mutations on AmpC-Mediated β -Lactam Resistance ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50(6): 2030-37. doi:10.1128/AAC.01458-05.
- Sethuvel, Dhiviya Prabaa Muthuirulandi, Yamuna Devi Bakthavatchalam, Maruthan Karthik, Madhumathi Irulappan, Rahul Shrivastava, Hariharan Periasamy, et Balaji Veeraraghavan. 2023. « β -Lactam Resistance in ESKAPE Pathogens Mediated Through Modifications in Penicillin-Binding Proteins: An Overview ». *Infectious Diseases and Therapy* 12(3): 829-41. doi:10.1007/s40121-023-00771-8.
- Shabalina, S, et E Koonin. 2008. « Origins and Evolution of Eukaryotic RNA Interference ». *Trends in Ecology & Evolution* 23(10): 578-87. doi:10.1016/j.tree.2008.06.005.
- Shaw, Liam P, Eduardo P C Rocha, et R Craig MacLean. 2023. « Restriction-Modification Systems Have Shaped the Evolution and Distribution of Plasmids across Bacteria ». *Nucleic Acids Research* 51(13): 6806-18. doi:10.1093/nar/gkad452.
- Shawa, Misheck, Yoshikazu Furuta, Gillan Mulenga, Maron Mubanga, Evans Mulenga, Tuvshinzaya Zorigt, Christone Kaile, et al. 2021. « Novel Chromosomal Insertions of ISEcp1-blaCTX-M-15 and Diverse Antimicrobial Resistance Genes in Zambian Clinical Isolates of Enterobacter Cloacae and Escherichia Coli ». *Antimicrobial Resistance and Infection Control* 10(1): 79. doi:10.1186/s13756-021-00941-8.
- Shen, Minjia, Kelly Goldlust, Sandra Daniel, Christian Lesterlin, et Yoshiharu Yamaichi. 2023. « Recipient UvrD Helicase Is Involved in Single- to Double-Stranded DNA Conversion during Conjugative Plasmid Transfer ». *Nucleic Acids Research* 51(6): 2790-99. doi:10.1093/nar/gkad075.
- Sheng, Yong, Hengyu Wang, Yixin Ou, Yingying Wu, Wei Ding, Meifeng Tao, Shuangjun Lin, et al. 2023. « Insertion Sequence Transposition Inactivates CRISPR-Cas Immunity ». *Nature Communications* 14(1): 4366. doi:10.1038/s41467-023-39964-7.

- Siguier, Patricia, Manuel Campos, François Cornet, Jean-Yves Bouet, et Catherine Guynet. 2023. « Atypical Low-Copy Number Plasmid Segregation Systems, All in One? » *Plasmid* 127: 102694. doi:10.1016/j.plasmid.2023.102694.
- Siguier, Patricia, Edith Gourbeyre, et Mick Chandler. 2014. « Bacterial Insertion Sequences: Their Genomic Impact and Diversity ». *FEMS microbiology reviews* 38(5): 865-91. doi:10.1111/1574-6976.12067.
- Skalova, Anna, Katerina Chudejova, Veronika Rotova, Matej Medvecký, Vendula Studentova, Eva Chudackova, Pavel Lavicka, et al. 2017. « Molecular Characterization of OXA-48-Like-Producing Enterobacteriaceae in the Czech Republic and Evidence for Horizontal Transfer of pOXA-48-Like Plasmids ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(2): e01889-16. doi:10.1128/AAC.01889-16.
- Soler, Nicolas, et Patrick Forterre. 2020. « Vesiduction: The Fourth Way of HGT ». *Environmental Microbiology* 22(7): 2457-60. doi:10.1111/1462-2920.15056.
- Song, Xinmi, Sheng Lei, Shunhang Liu, Yanqiu Liu, Pan Fu, Zhifeng Zeng, Ke Yang, et al. 2023. « Catalytically Inactive Long Prokaryotic Argonaute Systems Employ Distinct Effectors to Confer Immunity via Abortive Infection ». *Nature Communications* 14(1): 6970. doi:10.1038/s41467-023-42793-3.
- Stadler, Marc, et Petra Dersch, éd. 2016. 398 *How to Overcome the Antibiotic Crisis: Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives*. Cham: Springer International Publishing. doi:10.1007/978-3-319-49284-1.
- Starikova, I., M. Al-Haroni, G. Werner, A. P. Roberts, V. Sorum, K. M. Nielsen, et P. J. Johnsen. 2013. « Fitness Costs of Various Mobile Genetic Elements in *Enterococcus Faecium* and *Enterococcus Faecalis* ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68(12): 2755-65. doi:10.1093/jac/dkt270.
- Sukchawalit, Rojana, Paiboon Vattanaviboon, Ratiboot Sallabhan, et Skorn Mongkolsuk. 1999. « Construction and Characterization of Regulated L-Arabinose-Inducible Broad Host Range Expression Vectors in *Xanthomonas* ». *FEMS Microbiology Letters* 181(2): 217-23. doi:10.1111/j.1574-6968.1999.tb08847.x.
- Summers, D. 1991. « The Kinetics of Plasmid Loss ». *Trends in Biotechnology* 9(1): 273-78. doi:10.1016/0167-7799(91)90089-Z.
- Summers, David. 1998. « Timing, Self-control and a Sense of Direction Are the Secrets of Multicopy Plasmid Stability ». *Molecular Microbiology* 29(5): 1137-45. doi:10.1046/j.1365-2958.1998.01012.x.
- Sun, Shijun, Meng Cai, Qi Wang, Shuyi Wang, Lin Zhang, et Hui Wang. 2024. « Emergency of the Plasmid Co-Carrying blaKPC-2 and blaNDM-1 Genes in Carbapenem-Resistant Hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae* ». *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 36: 26-32. doi:10.1016/j.jgar.2023.11.008.
- Swarts, Daan C., Matthijs M. Jore, Edze R. Westra, Yifan Zhu, Jorijn H. Janssen, Ambrosius P. Snijders, Yanli Wang, et al. 2014. « DNA-Guided DNA Interference by a Prokaryotic Argonaute ». *Nature* 507(7491): 258-61. doi:10.1038/nature12971.

- Swarts, Daan C, Kira Makarova, Yanli Wang, Kotaro Nakanishi, René F Ketting, Eugene V Koonin, Dinshaw J Patel, et John Van Der Oost. 2014. « The Evolutionary Journey of Argonaute Proteins ». *Nature Structural & Molecular Biology* 21(9): 743-53. doi:10.1038/nsmb.2879.
- Swelum, Ayman A., Ahmed R. Elbestawy, Mohamed T. El-Saadony, Elsayed O.S. Hussein, Rashed Alhotan, Gamaleldin M. Suliman, Ayman E. Taha, et al. 2021. « Ways to Minimize Bacterial Infections, with Special Reference to Escherichia Coli, to Cope with the First-Week Mortality in Chicks: An Updated Overview ». *Poultry Science* 100(5): 101039. doi:10.1016/j.psj.2021.101039.
- Tacconelli, Evelina, Elena Carrara, Alessia Savoldi, Stephan Harbarth, Marc Mendelson, Dominique L Monnet, Céline Pulcini, et al. 2018. « Discovery, Research, and Development of New Antibiotics: The WHO Priority List of Antibiotic-Resistant Bacteria and Tuberculosis ». *The Lancet Infectious Diseases* 18(3): 318-27. doi:10.1016/S1473-3099(17)30753-3.
- Tanimoto, Kouichi, Tetsuo Iino, Hisako Ohtsubo, et Eiichi Ohtsubo. 1985. « Identification of a Gene, Tir of R100, Functionally Homologous to the F3 Gene of F in the Inhibition of RP4 Transfer ». *Molecular and General Genetics MGG* 198(2): 356-57. doi:10.1007/BF00383019.
- Tenaillon, Olivier, David Skurnik, Bertrand Picard, et Erick Denamur. 2010. « The Population Genetics of Commensal Escherichia Coli ». *Nature Reviews Microbiology* 8(3): 207-17. doi:10.1038/nrmicro2298.
- Tesson, F., R. Planel, A. Egorov, H. Georjon, H. Vaysset, B. Brancotte, B. Néron, et al. 2024. « A Comprehensive Resource for Exploring Antiphage Defense: DefenseFinder Webservice, Wiki and Databases ». doi:10.1101/2024.01.25.577194.
- Tesson, Florian, Alexandre Hervé, Ernest Mordret, Marie Touchon, Camille d'Humières, Jean Cury, et Aude Bernheim. 2022. « Systematic and Quantitative View of the Antiviral Arsenal of Prokaryotes ». *Nature Communications* 13(1): 2561. doi:10.1038/s41467-022-30269-9.
- « The Structure of β -Lactamases ». 1980. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences* 289(1036): 321-31. doi:10.1098/rstb.1980.0049.
- Thiaville, Jennifer J., Stefanie M. Kellner, Yifeng Yuan, Geoffrey Hutinet, Patrick C. Thiaville, Watthanachai Jumpathong, Susovan Mohapatra, et al. 2016. « Novel Genomic Island Modifies DNA with 7-Deazaguanine Derivatives ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113(11). doi:10.1073/pnas.1518570113.
- Tipper, D J, et J L Strominger. 1965. « Mechanism of Action of Penicillins: A Proposal Based on Their Structural Similarity to Acyl-D-Alanyl-D-Alanine. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 54(4): 1133-41. doi:10.1073/pnas.54.4.1133.
- Tooke, Catherine L., Philip Hinchliffe, Eilis C. Bragginton, Charlotte K. Colenso, Viivi H.A. Hirvonen, Yuiko Takebayashi, et James Spencer. 2019. « β -Lactamases and β -Lactamase Inhibitors in the 21st Century ». *Journal of Molecular Biology* 431(18): 3472-3500. doi:10.1016/j.jmb.2019.04.002.

- de Toro, María, Javier Fernández, Vanesa García, Azucena Mora, Jorge Blanco, Fernando de la Cruz, et M. Rosario Rodicio. 2017. « Whole Genome Sequencing, Molecular Typing and in Vivo Virulence of OXA-48-Producing Escherichia Coli Isolates Including ST131 H30-Rx, H22 and H41 Subclones ». *Scientific Reports* 7(1): 12103. doi:10.1038/s41598-017-12015-0.
- Trampari, Eleftheria, Chuanzhen Zhang, Kathryn Gotts, George M. Savva, Vassiliy N. Bavro, et Mark Webber. 2022. « Cefotaxime Exposure Selects Mutations within the CA-Domain of *envZ* Which Promote Antibiotic Resistance but Repress Biofilm Formation in Salmonella » éd. Matthew J. Culyba. *Microbiology Spectrum* 10(3): e02145-21. doi:10.1128/spectrum.02145-21.
- Tsuchimoto, S, H Ohtsubo, et E Ohtsubo. 1988. « Two Genes, *pemK* and *pemI*, Responsible for Stable Maintenance of Resistance Plasmid R100 ». *Journal of Bacteriology* 170(4): 1461-66. doi:10.1128/jb.170.4.1461-1466.1988.
- Turner, Paul E., Vaughn S. Cooper, et Richard E. Lenski. 1998. « TRADEOFF BETWEEN HORIZONTAL AND VERTICAL MODES OF TRANSMISSION IN BACTERIAL PLASMIDS ». *Evolution* 52(2): 315-29. doi:10.1111/j.1558-5646.1998.tb01634.x.
- Turton, Jane F., Michel Doumith, Katie L. Hopkins, Claire Perry, Daniele Meunier, et Neil Woodford. 2016. « Clonal Expansion of Escherichia Coli ST38 Carrying a Chromosomally Integrated OXA-48 Carbapenemase Gene ». *Journal of Medical Microbiology* 65(6): 538-46. doi:10.1099/jmm.0.000248.
- Ventola, C. Lee. 2015. « The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats ». *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management* 40(4): 277-83.
- Villa, Jennifer, Esther Viedma, Patricia Brañas, M^a Angeles Orellana, Joaquín R. Otero, et Fernando Chaves. 2014. « Multiclonal Spread of VIM-1-Producing Enterobacter Cloacae Isolates Associated with In624 and In488 Integrons Located in an IncHI2 Plasmid ». *International Journal of Antimicrobial Agents* 43(5): 451-55. doi:10.1016/j.ijantimicag.2014.02.006.
- Virolle, Chloé, Kelly Goldlust, Sarah Djermoun, Sarah Bigot, et Christian Lesterlin. 2020. « Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level ». *Genes* 11(11): 1239. doi:10.3390/genes11111239.
- Waksman, Selman A. 1947. « What Is an Antibiotic or an Antibiotic Substance? » *Mycologia* 39(5): 565-69. doi:10.1080/00275514.1947.12017635.
- Walsh, Timothy R, et Yongning Wu. 2016. « China Bans Colistin as a Feed Additive for Animals ». *The Lancet Infectious Diseases* 16(10): 1102-3. doi:10.1016/S1473-3099(16)30329-2.
- Walther-Rasmussen, Jan, et Niels Høiby. 2007. « Class A Carbapenemases ». *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 60(3): 470-82. doi:10.1093/jac/dkm226.
- Wang, Lifeng, Ling Guo, Kun Ye, et Jiyong Yang. 2021. « Genetic Characteristics of OXA-48-Producing Enterobacteriales from China ». *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 26: 285-91. doi:10.1016/j.jgar.2021.07.006.

- Wang, Xiaolong, Hanhui Zhang, Shenbo Yu, Donghang Li, Michael R Gillings, Hongqiang Ren, Daqing Mao, Jianhua Guo, et Yi Luo. 2024. « Inter-Plasmid Transfer of Antibiotic Resistance Genes Accelerates Antibiotic Resistance in Bacterial Pathogens ». *The ISME Journal* 18(1): wrad032. doi:10.1093/ismejo/wrad032.
- Wang, Xiaoshen, Xuzichao Li, Guimei Yu, Lingling Zhang, Chendi Zhang, Yong Wang, Fumeng Liao, et al. 2023. « Structural Insights into Mechanisms of Argonaute Protein-Associated NADase Activation in Bacterial Immunity ». *Cell Research* 33(9): 699-711. doi:10.1038/s41422-023-00839-7.
- Wardle, Simon J., Michelle O'Carroll, Keith M. Derbyshire, et David B. Haniford. 2005. « The Global Regulator H-NS Acts Directly on the Transpososome to Promote Tn10 Transposition ». *Genes & Development* 19(18): 2224-35. doi:10.1101/gad.1338905.
- Watanabe, M, S Iyobe, M Inoue, et S Mitsuhashi. 1991. « Transferable Imipenem Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 35(1): 147-51. doi:10.1128/AAC.35.1.147.
- Watanabe, Tsutomu, Hiroshi Nishida, Chizuko Ogata, Toshihiko Arai, et Sachiko Sato. 1964. « EPISOME-MEDIATED TRANSFER OF DRUG RESISTANCE IN ENTEROBACTERIACEAE VII: Two Types of Naturally Occurring R Factors ». *Journal of Bacteriology* 88(3): 716-26. doi:10.1128/jb.88.3.716-726.1964.
- Waterhouse, Peter M., Ming-Bo Wang, et Tony Lough. 2001. « Gene Silencing as an Adaptive Defence against Viruses ». *Nature* 411(6839): 834-42. doi:10.1038/35081168.
- Wawrzyniak, Paweł, Grażyna Płucienniczak, et Dariusz Bartosik. 2017. « The Different Faces of Rolling-Circle Replication and Its Multifunctional Initiator Proteins ». *Frontiers in Microbiology* 8: 2353. doi:10.3389/fmicb.2017.02353.
- Wein, Tanita, et Tal Dagan. 2020. « Plasmid Evolution ». *Current Biology* 30(19): R1158-63. doi:10.1016/j.cub.2020.07.003.
- Weiß, Manuela, Giacomo Giacomelli, Mathilde Ben Assaya, Finja Grundt, Ahmed Haouz, Feng Peng, Stéphanie Petrella, Anne Marie Wehenkel, et Marc Bramkamp. 2023. « The MksG Nuclease Is the Executing Part of the Bacterial Plasmid Defense System MksBEFG ». *Nucleic Acids Research* 51(7): 3288-3306. doi:10.1093/nar/gkad130.
- Werren, John H. 2011. « Selfish Genetic Elements, Genetic Conflict, and Evolutionary Innovation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108(supplement_2): 10863-70. doi:10.1073/pnas.1102343108.
- Westra, Edze R., Raymond H.J. Staals, Gerrit Gort, Søren Høgh, Sarah Neumann, Fernando De La Cruz, Peter C. Fineran, et Stan J.J. Brouns. 2013. « CRISPR-Cas Systems Preferentially Target the Leading Regions of MOB_F Conjugative Plasmids ». *RNA Biology* 10(5): 749-61. doi:10.4161/rna.24202.
- Wilkins, Brian M., et Angela T. Thomas. 2000. « DNA-independent Transport of Plasmid Primase Protein between Bacteria by the I₁ Conjugation System ». *Molecular Microbiology* 38(3): 650-57. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.02164.x.

- Wong, Joshua L. C., Maria Romano, Louise E. Kerry, Hok-Sau Kwong, Wen-Wen Low, Stephen J. Brett, Abigail Clements, Konstantinos Beis, et Gad Frankel. 2019. « OmpK36-Mediated Carbapenem Resistance Attenuates ST258 Klebsiella Pneumoniae in Vivo ». *Nature Communications* 10(1): 3957. doi:10.1038/s41467-019-11756-y.
- Wu, Yongli, Ziyao Li, Zichen Lei, Jiankang Zhao, Yulin Zhang, Xinmeng Liu, Yanning Hu, Feilong Zhang, et Binghuai Lu. 2024. « Coexistence of Virulent and Multidrug-Resistant Plasmids in a Uropathogenic Escherichia Coli ». *Journal of Global Antimicrobial Resistance*: S2213716524000353. doi:10.1016/j.jgar.2024.02.007.
- Wyres, Kelly L., Margaret M. C. Lam, et Kathryn E. Holt. 2020. « Population Genomics of Klebsiella Pneumoniae ». *Nature Reviews Microbiology* 18(6): 344-59. doi:10.1038/s41579-019-0315-1.
- Xiong, Xiaolin, Geng Wu, Yue Wei, Liqiong Liu, Yubing Zhang, Rui Su, Xianyue Jiang, et al. 2020. « SspABCD–SspE Is a Phosphorothioation-Sensing Bacterial Defence System with Broad Anti-Phage Activities ». *Nature Microbiology* 5(7): 917-28. doi:10.1038/s41564-020-0700-6.
- Yakobson, Emanuel, Cornelia Deiss, Ken Hirata, et Donald G. Guiney. 1990. « Initiation of DNA Synthesis in the Transfer Origin Region of RK2 by the Plasmid-Encoded Primase: Detection Using Defective M13 Phage ». *Plasmid* 23(1): 80-84. doi:10.1016/0147-619X(90)90048-H.
- Yang, Yanxian, Wenjin Shi, Shao-Yeh Lu, Jinxin Liu, Huihui Liang, Yifan Yang, Guowei Duan, et al. 2018. « Prevalence of Antibiotic Resistance Genes in Bacteriophage DNA Fraction from Funan River Water in Sichuan, China ». *Science of The Total Environment* 626: 835-41. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.01.148.
- Yao, Shiyin, Donald R. Helinski, et Aresa Toukdarian. 2007. « Localization of the Naturally Occurring Plasmid ColE1 at the Cell Pole ». *Journal of Bacteriology* 189(5): 1946-53. doi:10.1128/JB.01451-06.
- Yigit, Hesna, Anne Marie Queenan, Gregory J. Anderson, Antonio Domenech-Sanchez, James W. Biddle, Christine D. Steward, Sebastian Alberti, Karen Bush, et Fred C. Tenover. 2001. « Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella Pneumoniae* ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45(4): 1151-61. doi:10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001.
- Yong, Dongeun, Mark A. Toleman, Christian G. Giske, Hyun S. Cho, Kristina Sundman, Kyungwon Lee, et Timothy R. Walsh. 2009. « Characterization of a New Metallo-Beta-Lactamase Gene, Bla(NDM-1), and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella Pneumoniae* Sequence Type 14 from India ». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53(12): 5046-54. doi:10.1128/AAC.00774-09.
- Zahedi Bialvaei, Abed, Mohammad Rahbar, Ramin Hamidi-Farahani, Ali Asgari, Aylin Esmailkhani, Yasaman Mardani Dashti, et Saeed Soleiman-Meigooni. 2021. « Expression of RND Efflux Pumps Mediated Antibiotic Resistance in *Pseudomonas*

- Aeruginosa Clinical Strains ». *Microbial Pathogenesis* 153: 104789. doi:10.1016/j.micpath.2021.104789.
- Zakhour, Johnny, L'Emir Wassim El Ayoubi, et Souha S. Kanj. 2024. « Metallo-Beta-Lactamases: Mechanisms, Treatment Challenges, and Future Prospects ». *Expert Review of Anti-infective Therapy*: 1-13. doi:10.1080/14787210.2024.2311213.
- Zhanel, George G., Christopher D. Lawson, Heather Adam, Frank Schweizer, Sheryl Zelenitsky, Philippe R. S. Lagacé-Wiens, Andrew Denisuik, et al. 2013. « Ceftazidime-Avibactam: A Novel Cephalosporin/ β -Lactamase Inhibitor Combination ». *Drugs* 73(2): 159-77. doi:10.1007/s40265-013-0013-7.
- Zhou, Ying, Yu Tang, Pan Fu, Dongxing Tian, Lianhua Yu, Yunkun Huang, Gang Li, et al. 2020. « The Type I-E CRISPR-Cas System Influences the Acquisition of *Bla*_{KPC}-IncF Plasmid in *Klebsiella Pneumonia* ». *Emerging Microbes & Infections* 9(1): 1011-22. doi:10.1080/22221751.2020.1763209.
- Zong, Zhiyong. 2012. « Discovery of blaOXA-199, a Chromosome-Based blaOXA-48-Like Variant, in *Shewanella Xiamenensis* » éd. Paul Jaak Janssen. *PLoS ONE* 7(10): e48280. doi:10.1371/journal.pone.0048280.
- Zongo, Pengdbamba Dieudonné, Nicolas Cabanel, Guilhem Royer, Florence Depardieu, Alain Hartmann, Thierry Naas, Philippe Glaser, et Isabelle Rosinski-Chupin. 2024. « An Antiplasmid System Drives Antibiotic Resistance Gene Integration in Carbapenemase-Producing *Escherichia Coli* Lineages ». *Nature Communications* 15(1): 4093. doi:10.1038/s41467-024-48219-y.

Annexes

Article

Chiarelli et *al.* BMC Microbiology

Cet article s'intéresse à la diversification des souches *Klebsiella pneumoniae* productrices de carbapénémases passant de la forme mucoïde à la forme non-mucoïde. J'ai contribué à ce projet durant mon Master en faisant le séquençage des souches sélectionnées pour la recherche des mutations et l'analyse des données.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Diversity of mucoid to non-mucoid switch among carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*

Adriana Chiarelli^{1,2,3}, Nicolas Cabanel^{1,2}, Isabelle Rosinski-Chupin^{1,2}, Pengdbamba Dieudonné Zongo^{1,2}, Thierry Naas^{1,4}, Rémy A. Bonnin^{1,4†} and Philippe Glaser^{1,2*†} 

Abstract

Background: *Klebsiella pneumoniae* is a leading cause of intractable hospital-acquired multidrug-resistant infections and carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (CPKp) are particularly feared. Most of the clinical isolates produce capsule as a major virulence factor. Recombination events at the capsule locus are frequent and responsible for capsule diversity within *Klebsiella spp.* Capsule diversity may also occur within clonal bacterial populations generating differences in colony aspect. However, little is known about this phenomenon of phenotypic variation in CPKp and its consequences.

Results: Here, we explored the genetic causes of in vitro switching from capsulated, mucoid to non-mucoid, non-capsulated phenotype in eight clinical CPKp isolates. We compared capsulated, mucoid colony variants with one of their non-capsulated, non-mucoid isogenic variant. The two colony variants were distinguished by their appearance on solid medium. Whole genome comparison was used to infer mutations causing phenotypic differences. The frequency of phenotypic switch was strain-dependent and increased along with colony development on plate. We observed, for 72 non-capsulated variants that the loss of the mucoid phenotype correlates with capsule deficiency and diverse genetic events, including transposition of insertion sequences or point mutations, affecting genes belonging to the capsule operon. Reduced or loss of capsular production was associated with various in vitro phenotypic changes, affecting susceptibility to carbapenem but not to colistin, in vitro biofilm formation and autoaggregation.

Conclusions: The different impact of the phenotypic variation among the eight isolates in terms of capsule content, biofilm production and carbapenem susceptibility suggested heterogeneous selective advantage for capsular loss according to the strain and the mutation. Based on our results, we believe that attention should be paid in the phenotypic characterization of CPKp clinical isolates, particularly of traits related to virulence and carbapenem resistance.

Keywords: Capsule, Carbapenem, Insertion sequence, Biofilm, *Klebsiella pneumoniae*

* Correspondence: pglaser@pasteur.fr

†Rémy A. Bonnin and Philippe Glaser contributed equally to this work.

¹EERA Unit "Ecology and Evolution of Antibiotic Resistance", Institut Pasteur - Assistance Publique/Hôpitaux de Paris - University Paris-Saclay, Paris, France

²UMR CNRS 3525, 75015 Paris, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Klebsiella pneumoniae is a Gram negative, capsulated, non-motile, rod-shaped bacterium commonly found in the gut flora of healthy individuals, but it can be also found in the environment, particularly in soil and water [1]. Of great concern are infections caused by *K. pneumoniae*, mostly targeting the respiratory and urinary tracts and causing life-threatening infections including pneumonia, sepsis, meningitis, and pyogenic liver abscesses, particularly in health-care settings [2]. Colistin and carbapenems are last-line drugs for *K. pneumoniae* infections but *K. pneumoniae* lineages showing resistance to those drugs emerged and disseminated worldwide, challenging the already limited treatment options [3, 4]. World Health Organization (WHO) included carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (CPKp) in the list of PRIORITY 1 critical pathogens for new drugs [5]. An understanding of the pathobiology of *K. pneumoniae* infections would help in developing new control strategies and possible vaccines [6]. Several virulence factors, including the lipopolysaccharide (LPS), fimbriae, siderophores and the capsular polysaccharide (CPS), are contributing to *K. pneumoniae*'s ability to thrive in the environment and in the host.

The capsule can ensure resistance to antimicrobial peptides, phagocytosis, and complement-mediated killing [7–10]. More than 77 capsular-types (K-type) have been reported in clinical isolates of *K. pneumoniae* [11]. Large-scale recombination events involving the capsule biosynthesis (*cps*) region drive an extensive variation, even within the same clonal complex (CC), as described for CC258 isolates [12]. The genes responsible for capsule synthesis are organized into an operon, from *galF* through *cpsACP*, *wzi*, *wza*, *wzb*, *wzc* and *ugd*, with conserved functions and organization and additional glycosyltransferase genes [11] (Fig. 1).

Recent studies shed light on the role of the different genes orchestrating capsule production in *K. pneumoniae*. Mutations in *wza*, *wzb*, *wzc* and *wzy* resulted in reduced amount or absence of capsule, corresponding to a rough, non-mucoid appearance on plate, along with decreased serum resistance and high susceptibility to neutrophilic phagocytosis [13]. On the other hand, inactivation of *wcaJ*, a glycosyltransferase involved in colanic acid synthesis, led to a non-capsulated, non-mucoid variant, which was less efficiently phagocytosed compared to the capsulated *K. pneumoniae*, and which showed a better ability to form biofilm on polystyrene surfaces, and an altered colistin susceptibility [14]. However, capsule production is controlled by a complex regulatory network involving several genes outside the *cps* cluster [15]. Interestingly, loss of mucoid-capsular phenotype has also been reported to occur within the host due to various mutations in the *cps* cluster [16].

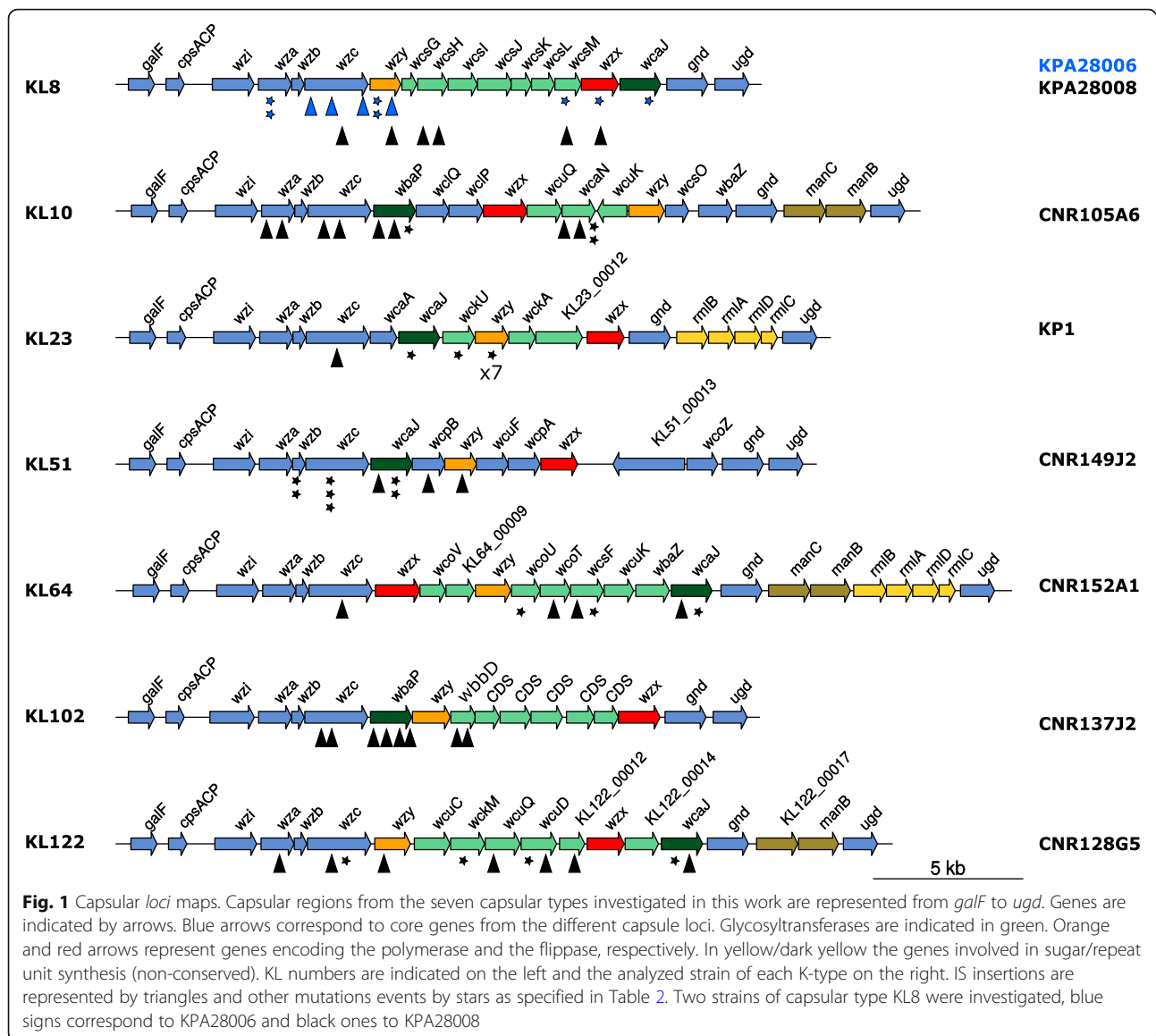
Capsule loss due to mutations in the *cps* operon has been shown to occur among clinical ST258 isolates, leading to a better ability to form biofilm and persist in the mice bladder [17]. Altogether, these data suggest an evolutionary advantage that capsule loss can confer to *K. pneumoniae* in the human host and environment under certain circumstances. When analyzed in the laboratory, clinical isolates of *K. pneumoniae* may exhibit mixed populations, noticed by the presence of heterogeneous colony appearance on solid media. This phenomenon may reflect changes in the capsule production within a clonal bacterial population. It is referred as to phenotypic variation, usually from capsulated to non-capsulated variant. However, appearance of colony variants due to changes in capsule biosynthesis might also occur in vitro depending on medium, time and temperature of incubation [18]. This could subsequently lead to the storage and transfer of mixed samples across different clinical laboratories, thus hampering the correct phenotypic characterization of clinical isolates.

Here, we explored the genetic causes of in vitro switching from capsulated, mucoid (M) to non-capsulated, non-mucoid (NM) phenotype in eight clinical CPKp isolates. The frequency of phenotypic switch was strain-dependent and increased along with colony development on plate. The loss of the mucoid phenotype resulted from diverse genetic events: Insertion Sequence (IS) transposition, deletion or point mutations occurring in genes of the *cps* locus. In one variant, a second mutation inactivated *rfaH*, a regulatory gene of capsular polysaccharide biosynthesis [19]. Variation of the impact of the phenotypic switch among the eight isolates in terms of capsule content, biofilm production and carbapenem susceptibility suggested heterogeneous selective advantage for capsular loss according to the strain and the mutations.

Results

Non-mucoid variants arise at various frequencies in different *K. pneumoniae* strains

All along a screening of clinical CPKp strains, we noticed that upon isolation from -80°C glycerol stocks, CPKp often exhibited a heterogeneous population with mostly mucoid (M) colonies but also a variable proportion of colonies with a translucent, non-mucoid (NM) appearance on plate. This observation led us to analyze more systematically the population heterogeneity. Hence, we selected eight CPKp isolates belonging to seven STs (ST107, ST16, ST11, ST147, ST383, ST39, ST855) and expressing different carbapenemases (KPC, VIM-1, OXA-48 and OXA-181), as shown in Table 1. The population heterogeneity could be better visualized on TSA medium. We also observed that, when streaked on TSA, M colonies could give rise to either a mixed



population (M and NM) or to a pure M population. Furthermore, M colonies might exhibit non-mucoid sectors (Fig. 2a). On the other hand, NM colonies re-isolated on TSA led to homogeneous NM population. The ability of M colonies to produce NM segments was dependent on the incubation time (> 24 h), indicating further selection and growth advantage of NM variants at later growth stages on solid medium.

In order to determine whether the frequency of switching from M to NM was variable among the selected strains, we quantified colony variants by counting the number of colonies exhibiting non-mucoid segments after 24 h incubation at 37 °C and after 24 and 48 additional hours of incubation at 25 °C (Fig. 2b). Re-isolation of bacteria from these segments confirmed that they led to stable NM colonies. We observed, for the

eight strains, a high rate of colony switching, ranging from 10% to more than 40% colonies with NM sectors after 72 h of incubation. We observed the highest frequency (from 15% at 24 h to 47% of the population at 72 h) for *K. pneumoniae* CNR137J2 belonging to ST107 and expressing KL102-type capsule.

Different mutational events led to a non-mucoid phenotype

To characterize the diversity of the NM variants selected on TSA plates, we isolated 6 to 11 independent NM isolates for each of the eight strains and performed whole genome sequencing (WGS) to compare them with the original isolates. In total, we analyzed 72 NM variants. Libraries were first constructed by tagmentation (>50x coverage). However, we obtained a low or even partial

Table 1 Strains analyzed in this work

Strain ^a	ST ^a	wzi	K-type ^b	Resistance genes
KP1 [20] SAMN14419408	ST39	wzi83	KL23	aminoglycoside: <i>aac(6⁺)-Ib3</i> ; <i>aac(3)-IIa</i> ; <i>aph(6)-Id</i> ; macrolide: <i>mph(E)</i> ; <i>msr(E)</i> ; phenicol: <i>catA1</i> ; <i>catB2</i> ; sulphonamide: <i>sul1</i> ; <i>sul2</i> ; tetracycline: <i>tet(D)</i> ; trimethoprim: <i>dfrA14</i> ; <i>dfrB1</i> ; β-lactam: <i>bla_{SHV-40}</i> ; <i>bla_{OXA-9}</i> ; <i>bla_{SCO-1}</i> ; <i>bla_{VIM-1}</i> ; fosfomycin: <i>fosA</i>
CNR128G5 SAMN14419403	ST383	wzi162	KL122	aminoglycoside: <i>aadA2b</i> ; <i>aac(3)-IIa</i> ; <i>aac(6⁺)-Ib3</i> ; <i>rmtB</i> ; quinolone: <i>oqxA</i> ; sulphonamide: <i>sul1</i> ; tetracycline: <i>tet(A)</i> ; β-lactam: <i>bla_{OXA-9}</i> ; <i>bla_{SHV-145}</i> ; <i>bla_{CTX-M-14i}</i> ; <i>bla_{CTX-M-15i}</i> ; <i>bla_{KPC-2i}</i> ; <i>bla_{OXA-1i}</i> ; <i>bla_{TEM-1B}</i> ; fosfomycin: <i>fosA</i>
CNR152A1 SAMN14419404	ST147	wzi64	KL64	aminoglycoside: <i>aph(3⁺)-Ib</i> ; <i>aph(6)-Id</i> ; sulphonamide: <i>sul2</i> ; trimethoprim: <i>dfrA14</i> ; β-lactam: <i>bla_{SHV-11i}</i> ; <i>bla_{CTX-M-15i}</i> ; <i>bla_{KPC-3i}</i> ; <i>bla_{TEM-1B}</i>
CNR105A6 SAMN14419407	ST855	wzi100	KL10	aminoglycoside: <i>aac(6⁺)-Ib</i> ; <i>aadA1</i> ; <i>aph(3⁺)-Ib</i> ; <i>aph(6)-Id</i> ; phenicol: <i>catA1</i> ; sulphonamide: <i>sul1</i> ; tetracycline: <i>tet(B)</i> ; β-lactam: <i>bla_{SHV-81i}</i> ; <i>bla_{KPC-2i}</i> ; <i>bla_{OXA-9i}</i> ; <i>bla_{TEM-1A}</i>
KPA28006 [21] SAMN14419405	ST11	wzi334	KL8	aminoglycoside: <i>aph(3⁺)-VIa</i> ; <i>aadA1</i> ; <i>aac(6⁺)-Iq</i> ; phenicol: <i>cmlA1</i> ; sulphonamide: <i>sul1</i> ; <i>sul2</i> ; tetracycline: <i>tet(B)</i> ; <i>tet(D)</i> ; trimethoprim: <i>dfrA15</i> ; β-lactam: <i>bla_{KPC-2i}</i> ; <i>bla_{SHV-182i}</i> ; <i>bla_{CTX-M-2}</i>
KPA28008 [21] SAMN14419406	ST11	wzi334	KL8	aminoglycoside: <i>aph(3⁺)-VIa</i> ; quinolone: <i>oqxA</i> ; <i>oqxB</i> ; tetracycline: <i>tet(D)</i> ; β-lactam: <i>bla_{KPC-2i}</i> ; <i>bla_{SHV-182i}</i> ; <i>bla_{CTX-M-2}</i>
CNR149J2 SAMN14419409	ST16	wzi50	KL51	aminoglycoside: <i>aac(6⁺)-Ib-cr</i> ; <i>aadA2</i> ; <i>aph(3⁺)-Ia</i> ; quinolone: <i>qnrS1</i> ; macrolide: <i>mph(A)</i> ; sulphonamide: <i>sul1</i> ; trimethoprim: <i>dfrA12</i> ; β-lactam: <i>bla_{SHV-145i}</i> ; <i>bla_{CTX-M-15i}</i> ; <i>bla_{OXA-1i}</i> ; <i>bla_{OXA-181i}</i> ; <i>bla_{TEM-1B}</i>
CNR137J2 SAMN14419410	ST107	wzi173	KL102	aminoglycoside: <i>aac(3)-IId</i> ; <i>aph(3⁺)-Ib</i> ; <i>aph(6)-Id</i> ; quinolone: <i>qnrS1</i> ; macrolide: <i>mph(A)</i> ; sulphonamide: <i>sul2</i> ; tetracycline: <i>tet(A)</i> ; trimethoprim: <i>dfrA17</i> ; β-lactam: <i>bla_{SHV-145i}</i> ; <i>bla_{LAP-2i}</i> ; <i>bla_{OXA-48i}</i> ; <i>bla_{TEM-1B}</i>

^aSequence accession numbers are also indicated. ^aST = Sequence Type; ^bK-type = capsular type

coverage of the AT-rich *cps* locus (Fig. S1), precluding the confident identification of mutations responsible for the NM phenotype. Similarly, Wyres et al. were recently unable to determine the K-type of 129 out of 393 *K. pneumoniae* genomes sequenced by tagmentation [22]. The 72 NM variants were sequenced following enzymatic digestion of the genomic DNA by a mix of nucleases, providing a uniform coverage of the *K. pneumoniae* genome and no discrimination of AT-rich regions (Fig. S1). We identified in all the isolates analyzed, a mutation in the *cps* locus (Fig. 1, Table 2), predicted to be responsible for the NM phenotype. In 26 NM variants, up to five additional mutations were detected elsewhere in the genome. These mutations might have also contributed to the overgrowth of the NM sector (Table S1). In particular, in the NM3 variant of strain CNR149J2 we identified a four-base pair (bp) duplication disrupting the *rfaH* gene, an activator of capsule biosynthesis [19]. Fifty-six percent (40/72) of NM mutants resulted from IS insertion (*IS1*-, *ISL3*-, *IS5*-like) in different essential genes for capsule synthesis (Table 2). In the other variants, we identified point mutations ($n = 14$), including five non-sense mutations or indels ($n = 18$) (Table 2). The genes most frequently affected were *wcaJ* (22.2%), a colanic acid biosynthesis UDP-glucose lipid carrier transferase which mediates the first step of capsule biosynthesis in *Escherichia coli* [23] and plays a role in virulence and phage sensitivity in *K. pneumoniae* [24], followed by *wzc* (20.8%), encoding a putative tyrosine-kinase and *wzy* (15.3%) encoding the polymerase. Other mutated genes encode different glycosyltransferases involved in the complex *cps* synthesis

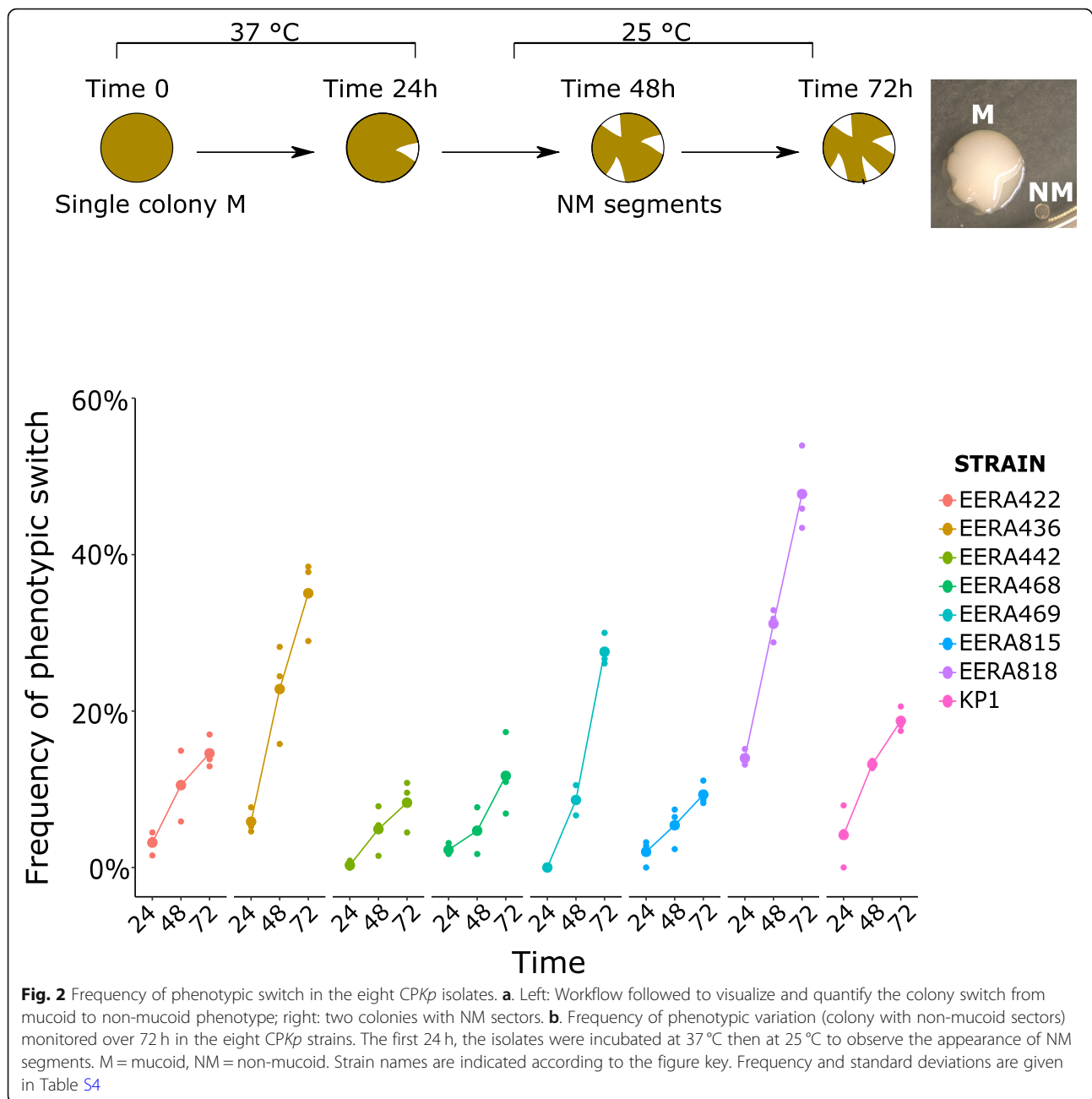
(29.2%) or essential genes like *wza*, *wzb* and *wzx* (5.6, 2.8 and 2.8%, respectively). In the case of KP1 strain, seven out of the eleven independent NM isolates analyzed shared the same mutation in *wzy*: a deletion of one T in a track of nine T residues, likely resulting from a slippage of the DNA polymerase during chromosome replication.

Phenotypic comparison of mucoid and non-mucoid variants

For each CPKp strain, we selected one NM variant with different mutations in *wcaJ*, *wzc*, *wzx*, *wzy* (indicated by the “&” symbol in Table 2) and investigated their impact on phenotypes contributing to their dissemination and persistence in the host.

To evaluate the impact of mutations on capsule production, we quantified uronic acid, a major constituent of the polysaccharidic capsule. In seven out of eight pairs, the NM variant showed a significantly lower amount of uronic acid compared to M variant, confirming that the loss of the mucoid trait resulted from the loss or the reduction of capsule production (Fig. 3). In the remaining strain, KP1, the NM variant (frameshifted in *wzy*), although it did not reach significance, showed a 2-fold decrease in the uronic acid production. The impact on the capsule synthesis in the NM variants was confirmed by capsule visualization by India ink negative staining (Fig. 3).

We investigated and compared the ability of M and NM variants to form biofilm on polystyrene surfaces. For six out of eight strains (CNR152A1, CNR105A6, KPA28006, KPA28008, CNR137J2, and KP1) the NM



variants significantly produced more biofilm after 24 h of incubation (Fig. 4a) compared to the parental M strains. However, in the case of CNR149J2 the NM variant produced less biofilm than the parental strain. This opposite phenotypic effect of capsule loss might be related to the mutation in *rfaH*, which has been shown to have a pleiotropic effect [19]. Therefore, the contribution of the capsule to biofilm formation on polystyrene was variable according to strain- and/or mutations.

Autoaggregation might contribute to biofilm formation [26, 27]. The autoaggregative behavior of M and

NM derivatives was quantified in spent M63/Glu minimal medium over 24 h at room temperature. Interestingly, all the NM variants but one (CNR149J2) showed, overall, a better ability to autoaggregate under the tested conditions (Fig. 4b). Particularly, the NM variants of CNR152A1, CNR105A6, KPA28006, KPA28008, KP1, which produce more biofilm, showed an increased autoaggregation compared to the parental isolates.

Curli production contributes to biofilm formation and capsule loss can unmask the fimbriae [28]. We compared M and NM isolates for curli production by the

Table 2 Mutations in the capsule synthesis cluster detected in non-mucoid variants

Strain	NM Variant	Gene	Mutation ^{a, b}
CNR128G5	NM1	<i>wza</i>	ISKpn25 (pos 382)
	NM2	<i>wzc</i>	IS903b (pos 2036)
	NM3	<i>wzc</i>	G1699T (D567Y)
	NM4^c	<i>wzy</i>	ISKpn25 (pos 319)
	NM5	<i>wckM</i>	Δ4 bp (AAAC) (pos 729); (*)
	NM6	<i>wcuQ</i>	ISKpn25 (pos 332)
	NM7	<i>wcuD</i>	ΔA (pos 38); (*)
	NM8	<i>wcuD</i>	ISKpn25 (pos 1073)
	NM9	<i>KL122_00012</i>	ISKpn25 (pos 796)
	NM10	<i>wcaJ</i>	insAA ^d (pos 744); (*)
	NM11	<i>wcaJ</i>	IS1-like ^e (pos 840)
CNR152A1	NM1	<i>wzc</i>	ISKpn26 (pos 738)
	NM2^c	<i>wcaJ</i>	IS903b (pos 602)
	NM3	<i>wcaJ</i>	T389A (I130N); G452C (G151A)
	NM4	<i>wcoT</i>	IS903b (pos 866)
	NM5	<i>wcsF</i>	IS903b (pos 1126)
	NM6	<i>wcsF</i>	G118T; (*)
	NM7	<i>wcoU</i>	insA ^d (pos 811); (*)
CNR105A6	NM1	<i>wza</i>	IS1-like (pos 998)
	NM2	<i>wza</i>	IS1-like (pos 998)
	NM3	<i>wzc</i>	IS903b (pos 2073)
	NM4^c	<i>wzc</i>	IS1-like (pos 542)
	NM5	<i>wbaP (wcaJ)</i>	IS903b (pos 699)
	NM6	<i>wbaP (wcaJ)</i>	IS1-like (pos 316)
	NM7	<i>wbaP (wcaJ)</i>	T997G (S333A)
	NM8	<i>wcaN</i>	Δ18bp (pos 190–208); (*)
	NM9	<i>wcaN</i>	IS1-like (pos 358)
	NM10	<i>wcaN</i>	IS1-like (pos 358)
	NM11	<i>wcaN</i>	C79A (V27L)
KPA28006	NM1^c	<i>wzc</i>	IS903b (pos 715)
	NM2	<i>wzc</i>	IS1-like (pos 244)
	NM3	<i>wzc</i>	IS1-like (pos 2146)
	NM4	<i>wzy</i>	ΔC (pos 274); (*)
	NM5	<i>wzy</i>	ΔC (pos 274); (*)
	NM6	<i>wcsM</i>	ΔA (pos 339); (*)
	NM7	<i>wcaJ</i>	ΔA (pos 1279); (*)
	NM8	<i>wzx</i>	ΔA (pos 422); (*)
	NM9	<i>wza</i>	A278T (L93Q)
KPA28008	NM1	<i>wzc</i>	IS1-like (pos 950)
	NM2	<i>wzy</i>	IS1-like (pos 319)
	NM3	<i>wcsM</i>	IS903b (pos 505)
	NM4^c	<i>wzx</i>	IS1-like (pos 342)
	NM5	<i>wcsH</i>	IS1-like (pos 605)
	NM6	<i>wcsH</i>	IS1-like (pos 914)

Table 2 Mutations in the capsule synthesis cluster detected in non-mucoid variants (Continued)

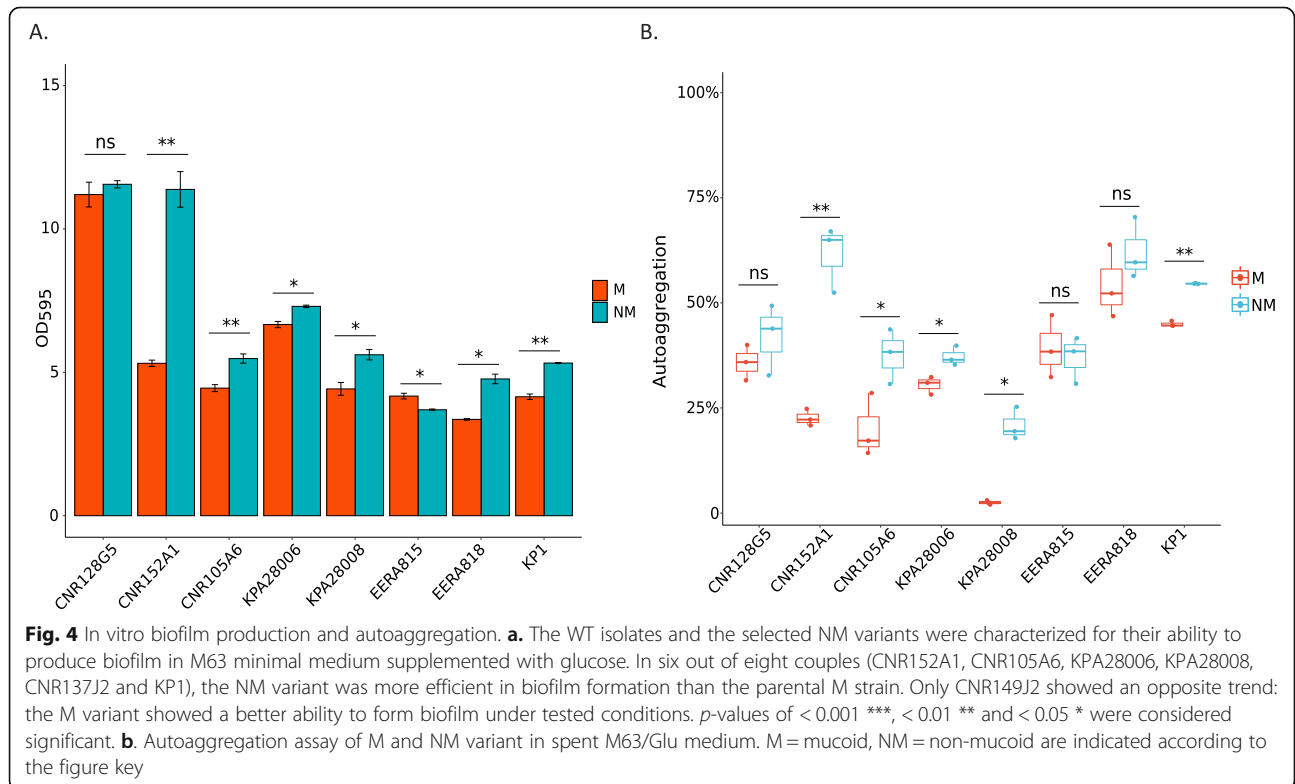
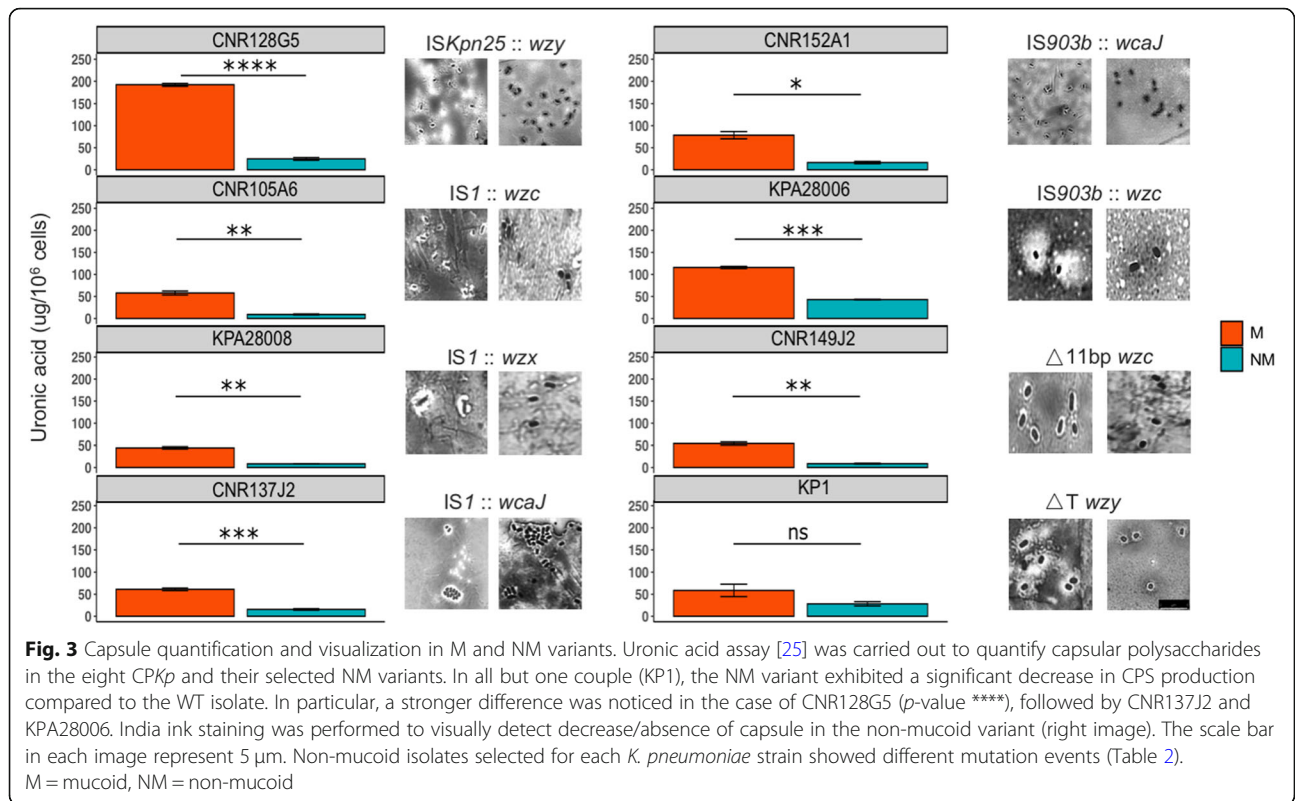
Strain	NM Variant	Gene	Mutation ^{a, b}
CNR149J2	NM1	<i>wzb</i>	C447A (*)
	NM2	<i>wzc</i>	T345A (*)
	NM3^c	<i>wzc</i>	Δ11bp (pos 635); (*)
	NM4	<i>wzc</i>	G787C (A263P)
	NM5	<i>wcaJ</i>	IS1-like (pos 905)
	NM6	<i>wcaJ</i>	T1145G (L382R)
	NM7	<i>wcaJ</i>	A111T (*)
	NM8	<i>wcpB</i>	IS1-like (pos 347)
	NM9	<i>wzy</i>	ISKox3 (pos 591)
	NM10	<i>wzb</i>	T68G (L23R)
CNR137J2	NM1	<i>wzc</i>	IS903b (pos 209)
	NM2	<i>wzc</i>	IS1-like (pos 760)
	NM3	<i>wbaP (wcaJ)</i>	IS1-like (pos 616)
	NM4	<i>wbaP (wcaJ)</i>	IS1-like (pos 1312)
	NM5	<i>wbaP (wcaJ)</i>	IS1-like (pos 247)
	NM6^c	<i>wbaP (wcaJ)</i>	IS1-like (pos 888)
	NM7	<i>wbbD</i>	IS1-like (pos 319)
	NM8	<i>wbbD</i>	IS1-like (pos 284)
KP1	NM1	<i>wzc</i>	IS1-like (pos 469)
	NM2	<i>wzy</i>	T736C (S246P)
	NM3	<i>wzy</i>	ΔT (pos 864); (*)
	NM4	<i>wzy</i>	ΔT (pos 864); (*)
	NM5	<i>wzy</i>	ΔT (pos 857); (*)
	NM6^c	<i>wzy</i>	ΔT (pos 864); (*)
	NM7	<i>wzy</i>	ΔT (pos 864); (*)
	NM8	<i>wzy</i>	ΔT (pos 864); (*)
	NM9	<i>wcaJ</i>	A31T; (*)
	NM10	<i>wckU</i>	ΔA (pos 16); (*)

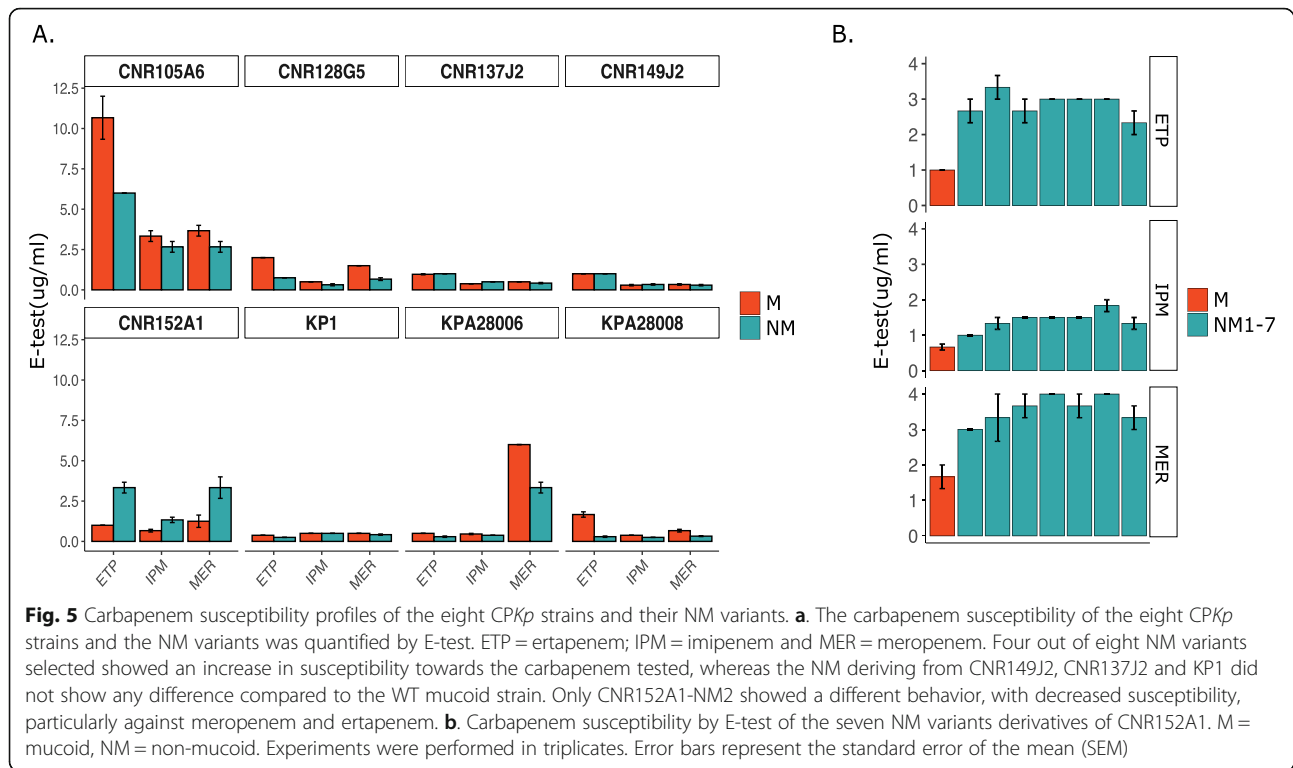
^aIn parentheses are indicated: for point mutations, the amino acid change and for other mutations, the position in the gene, ^b the star indicates either a non-sense mutation or a frameshift ^c; NM variant selected for in depth phenotypic analysis (in bold); ^d Ins for insertion; ^eIS1-like correspond to IS1R, IS1SD, IS1F, ISKpn14 and closely related ISs

Congo red (CR) assay. Among the eight strains analyzed, only one tested positive: CNR128G5, which shows a high level of biofilm formation independently of the M or NM phenotype (Fig. S2). For all the analyzed isolates, we did not observe differences between NM and M variants in the CR assay (Fig. S2), suggesting that capsule loss did not impact significantly on fimbriae production in these isolates.

Since the eight strains analyzed harbored a carbapenemase-encoding gene, we compared the susceptibility of both the parental and the NM variants towards carbapenems, which are targeting bacterial cell wall synthesis. Interestingly, we found that minimum inhibitory concentrations (MICs) for the clinically relevant carbapenems (ertapenem, meropenem, imipenem)

determined by E-test were different in five out of the eight strains for the M and NM variants. Four NM variants showed an increased susceptibility to those drugs. On the other hand, for CNR152A1, the NM variant (CNR152A1-NM2) - mutated in *wcaJ*, was surprisingly more resistant than the parental M strain (Fig. 5). In order to determine whether this effect resulted exclusively from the mutation in *wcaJ*, genomes were carefully checked for any additional mutation, IS insertion or recombination but we did not identify any in genes known to contribute to β-lactam resistance such as the major porins (*ompK35* and *ompK36*) and their regulator *ompR/envZ* and the PBPs (PBP1F, 1A, 1B, 2, 2D). In order to determine whether this effect was isolate or mutation specific, we determined the susceptibility to





carbapenems by E-test in the six other independent NM variants from CNR152A1 harboring different mutations in the *cps* locus (Table 2). Consistently with what was observed for NM3, the six other NM variants showed a reduced carbapenem susceptibility. These results confirmed that the reduced susceptibility of CNR152A1 non-mucoid variants was not specific to the *wcaJ* mutant but likely related to the loss of capsule.

Capsule has been shown to play a role in resistance to antimicrobial peptides, including polymyxin B, affecting the interaction with the bacterial outer membrane [29]. Those antibiotics show mode of action and mechanisms of resistance different from β -lactams. We measured the susceptibility levels of both the parental and the NM variants towards polymyxin B and colistin. However, we did not observe any difference between the M and the NM variant for the eight pairs (Table S2).

Discussion

Microbial populations inhabit diverse and constantly changing niches, facing oscillations between abundance of nutrients, which allows a prolific bacterial growth, and hostile environments, where individuals adopt strategies to cope with the scarcity of nutrients [30]. One of them is the phenotypic variation, where a population can switch among multiple phenotypes to survive in challenging habitats imposed, for instance, by the antibiotic pressure and the host immune system. In a

scenario where multidrug resistant (MDR) clinical isolates are incessantly emerging and spreading, the adoption of such strategies from bacterial populations can further challenge their characterization in the laboratory [31]. *K. pneumoniae* can undergo phenotypic variation, switching from mucoid to non-mucoid colony aspect [32]. Hypo- or non-mucoid appearance has been associated with the loss of capsule in *Klebsiella* and different degrees of mucoidity may indicate diverse mutations affecting capsule synthesis genes [16, 17]. These colony variants might arise in vivo, but also following their isolation in the laboratory. Colony variants can be observed on solid media, but they go frequently overlooked, as they show only subtle differences. Here, by analyzing NM variants deriving from eight clinical CPKp, we showed some phenotypic consequences of the capsule loss potentially contributing to NM variants selection. These phenotypic switches occurred at various frequencies in the different strains analyzed.

By using a newly developed high throughput method called TraDisort, Dorman et al. identified numerous *loci* involved in the regulatory network of capsule synthesis in *K. pneumoniae* [15]. However, here we showed that in vitro transition on solid media from M to NM variant ($n = 72$) of eight CPKp clinical isolates is driven by mutations occurring in the capsule locus upon the insertion of IS elements, SNPs and deletions. In a single NM variant (CNR149J2 NM3), we identified both a mutation

inactivating *wzc*, which encodes a tyrosine-protein kinase essential for capsule biosynthesis and a mutation in the *rfaH* gene encoding a transcriptional regulator of the *cps* operon [19]. In other NM variants, the disruption of *wzc* led to a non-capsulated phenotype and the contribution of the *rfaH* mutation to the phenotype remains to be determined. Except this specific case, under the conditions we used, mutations in genes involved in this regulatory network, which would reduce capsule synthesis, do not provide a sufficient selective advantage for growth. Recently, Lee et al. observed different colony aspects (mucoïd and non-mucoïd) among CPKp isolated successively from a single patient [16]. They showed that the within-host evolution of *K. pneumoniae* non-mucoïd variants was driven by IS insertion and amino acid alterations in genes essential for capsule synthesis. Likewise, we observed that the NM phenotype among CPKp clinical isolates was related to genetic events happening in the *cps* cluster, particularly targeting *wcaJ*, followed by *wzc* and *wzy* genes. These core genes are essential for capsule synthesis in *E. coli* and *Klebsiella spp.* and their disruption is associated with altered capsule polysaccharide polymerization [14, 15, 17, 33]. However, we identified among the NM variants analyzed, mutations in other genes of the *cps* operon, confirming their contribution to capsule synthesis and the selective advantage for their inactivation. For example, in the strain CNR128G5, the 11 NM variants were mutated in eight different *cps* genes. One exception is the first gene of the operon: *wzi*, as no variant harboring a mutation in this gene was observed. *Wzi* was shown to be an outer-membrane lectin contributing to the formation of the bacterial capsule [34]. Its gene inactivation will probably not lead to a metabolic advantage. However, IS insertion in this gene are predicted to have a polar effect on the downstream genes essential for capsule biosynthesis [35]. The absence of mutation in this gene might indicate a fitness cost of its inactivation under the condition used for capsule mutant selection.

Characterization of selected NM mutants unveiled a diverse landscape of mutations, with the majority (55.6%) linked to IS elements jumping into *cps* genes. Transposable elements are an important source of genetic variability. Movements of ISs are hardly detected using short-read sequencing. Therefore, this type of capsule locus inactivation might be overlooked while analyzing *K. pneumoniae* variants. Transposition is generally maintained at low level to preserve the integrity of the bacterial host genome. However, ISs can undergo bursts of transposition under stress conditions, including oxidative stress and starvation [36], which likely occurred during the prolonged incubation on TSA plates at 25 °C. In the case of KP1, the most frequent event was a thymine deletion in *wzy* (delT), occurring in 6 out of

10 NM independent variants (Table 2). These deletions occurred in a poly(T) track (nt 857–867 of the gene), which could lead to replication slippage, thus increasing the probability of frameshift errors. Similarly, we observed a high rate of frameshift mutations in KPA28006 with three adenosine deletions in *wcsM*, *wcaJ* and *wzx*, corresponding to poly-A track. Interestingly, we also isolated two variants with the same cytosine deletion. This residue is followed by a stretch of a poly-T track. These regions with stretches of nucleotides might be particularly prone to polymerase slippage. The frequency of mucoïd to non-mucoïd switch in these two strains was among the lowest we have observed. It is possible that the frequency of IS transposition in KP1 (1 out of 11 NM isolates) and KPA28006 (3 out of 9 NM isolates) was lower than in other strains under the condition used, revealing this mechanism of phase variation by increasing its relative frequency. On the other hand, the highest frequency of conversion from M to NM appearance was observed for CNR137J2 (more than 40% over 3-days incubation), followed by CNR152A1 and KPA28008. Notably, in the case of CNR137J2 and KPA28008, all mutants resulted from IS transposition (seven *IS1*-like insertions and one *IS903b* in CNR137J2 and five *IS1*-like insertions and one *IS903b* in KPA28008). One could hypothesize that the high rate of switching in these two strains is due to a higher rate of IS transposition and possibly to IS transposition bursts. In order to assess whether these differences could be related to different occurrence of IS elements in the eight parental strains, we estimated the number of the ISs that were responsible for a non-mucoïd phenotype among the 72 isolates we analyzed (Table S3). However, we were not able to correlate the transposition frequency and the number of ISs in the parental strain. Indeed, in the strains KPA28008 and CNR137J2, which contain the smallest number of the analyzed ISs ($n = 5$), all non-mucoïd mutants were predicted to result from an IS insertion. On the contrary, in KP1, which contains ten ISs, only one out of the ten non-mucoïd variants resulted from an IS transposition.

Here, we also demonstrated that the simple act of picking one colony rather than another one could lead to different interpretations on the phenotype of bacterial isolates from a clinical sample. Indeed, the colony variants exhibited several distinct phenotypic properties in addition to the capsule production, like biofilm formation, autoaggregation and susceptibility to carbapenems. Those phenotypic were predicted to result from altered capsule production. However, additional mutations in some isolates might have also contributed to the observed effect. Particularly, we observed enhanced biofilm production and autoaggregation in M63/Glu for five out of eight NM variants. Higher levels of autoaggregation

are indicative of a change in cell surface [26], which here was the loss of capsule, likely unmasking other surface components contributing to autoaggregation. CNR152A1-NM2 showed the highest increase of biofilm formation and autoaggregation, as deduced from the sedimentation rate among the eight strains analyzed (< 24 h), suggesting properties impacting on cell clumping. In-depth analysis of CNR152A1 genome compared to isolates from the same STs retrieved from the National Center for Biotechnology (NCBI) revealed an *IS903b* at codon 264 disrupting *wbbM*, belonging to the antigen O biosynthesis gene cluster. It encodes a glycosyltransferase and its disruption has been shown to induce defects in LPS biosynthesis [37], increasing the electronegative charge of the bacterial cell surface. The IS insertion was also present in the CNR152A1-NM2 and in the other NM variants included in our analysis. The loss of capsule, combined with the mutation in *wbbM*, likely caused a dramatic change from a hydrophilic to a hydrophobic bacterial surface, possibly contributing to enhance the autoaggregative and biofilm formation properties. On the other hand, CNR128G5 produces a high level of biofilm on the whole and no significant difference in biofilm production was observed between NM and M variants.

We also observed a variable impact of the NM phenotype on carbapenem susceptibility. In four out of eight isolates, the capsule loss in the NM variant resulted in an increased susceptibility to meropenem, ertapenem and imipenem. This observation suggested a protection of the mucoid-capsulated phenotype under carbapenem pressure in certain strains, possibly contributing to reduced permeability of the outer membrane to these antibiotics. Interestingly, in CNR152A1, we noticed a decrease in susceptibility in the NM2 variant, particularly towards meropenem and ertapenem. This observation went true for all the NM variants of this strain, regardless the mutated gene. Markedly, loss of O-antigen expression is likely to affect the conformation and function of various surface proteins [38]. Deep rough LPS mutants, lacking the complete core region up to the 3-deoxy-d-manno-octulopyranosic acid residues, were shown to be less capable of assisting the folding, insertion, and trimerization of porins [39]. Hence, we hypothesized that the loss of capsule in the eight CNR152A1 NM variants, combined with the defects in the O-antigen, might further disturb the assembly of outer membrane proteins, resulting in a decrease in carbapenem permeability and susceptibility. Alternatively, autoaggregation and hydrophobicity by themselves might contribute to reduce carbapenem susceptibility. On the other hand, it has been reported that capsular defective strains are more susceptible to antimicrobial peptides including polymyxin B [14, 29]. However, we did not observe the same for the

eight strains, possibly due to a strain- and mutation-dependent impact of the capsule loss.

Conclusions

Capsule loss is a common event, which can take place within monoclonal populations, generating heterogeneity, and it might have an impact on important phenotypic traits related to host adaptation and antimicrobial susceptibility. Given the phenotypic divergences observed between strains, the technical issues encountered to differentiate M and NM variants and to get an optimal sequencing coverage of the capsule biosynthesis region by using tagmentation for library construction, phenotypic characterization of clinical isolates should be performed carefully, especially when those display a multi-drug resistant phenotype.

Methods

Strains and growth conditions

The clinical *CPKp* isolates used in this study were from the National Reference Centre laboratory for Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at the Bicêtre Hospital and are listed in Table 1, together with relevant information: origin, capsular types, ST, antibiotic resistance genes repertoire. *K. pneumoniae* ATCC CIP 53153 was used as a reference strain. Bacteria were grown in Tryptic-Soy (TS) broth or lysogeny broth (LB) and on TS agar (TSA) or LB agar (LBA) plates. Antibiotic susceptibility testing was performed on Mueller-Hinton Agar (MHA) plates. M63 minimal medium was supplemented with Glucose 0.4% (M63/Glu) to perform biofilm assay. Spent M63/Glu medium used to test autoaggregation was recovered following growth of the same isolate, centrifugation at high speed (11,000 × g) for 10 min and 0.22 μm filtration of the supernatant.

Isolation of non-mucoid variants and frequency of phenotypic variation

The M and NM *K. pneumoniae* variants (MVs and NMVs) can be observed on LBA although the NMVs were more accurately distinguished on TSA. We noticed that MVs typically give rise to translucent sectors after 24 h of growth at 37 °C. Appearance of NM sectors within M colonies, referred to as phenotypic switch was quantified as follows. A single mucoid colony was resuspended in normal saline to an OD₆₀₀ of 0.1. One hundred μL of serial dilutions were plated on TSA to get c.a. 100 colonies per plate. After overnight growth, colony aspect (M or NM) was investigated optically by light contrast. The number of mucoid colonies exhibiting non-mucoid sectors was counted after 24, 48 and 72 h of incubation. The frequency of appearance of NMVs was quantified as the ratio between colonies showing NM

sectors over the total number of colonies on plate for three independent cultures.

Capsule extraction and quantification

Capsular polysaccharides were extracted and quantified using a colorimetric assay for uronic acid, a component of the *K. pneumoniae* capsule repeat unit, as described previously [25]. In parallel, serial dilutions of the bacterial culture were plated to determine the number of Colony Forming Units (CFUs). The uronic acid content was expressed in nanograms per 10^6 CFUs.

Capsule staining and microscopic visualization

Bacterial capsule was visualized by negative staining with the India Ink method, followed by counter-staining of bacterial cells with Crystal Violet as described [25]. Excess of Crystal Violet was washed away using copper sulfate 10% (wt/vol). Images were taken using a Leica DM-4 B microscope with a PL Fluotar 100x/1.32 PH3 immersion objective and photographed using the Hamamatsu ORCA Flash4.0 LT camera and the Leica Application Suite (LasX) software. The resolution was 2048×2048 (72 dpi). No downstream processing was made to enhance image resolution as well as any adjustment and/or manipulation.

In vitro biofilm production

The ability of the MVs and NMVs to form biofilm on polystyrene was analyzed using 96-well plates [40]. Briefly, stationary-phase cultures were diluted to $OD_{600} = 0.05$ in fresh M63 minimal medium supplemented with 0.4% glucose and 100 μ l of this inoculum were grown for 24 h in 96-well polystyrene plates at 37 °C. Biofilm was fixed by using Bouin's solution (acetic acid 5%, formaldehyde, 9% and picric acid, 0.9% in water) and washed with water once before adding 1% (wt/vol) crystal violet. After 10 min of staining at room temperature, the plates were washed twice with water, dried at room temperature, crystal violet was solubilized by the addition of 200 μ l of a solution of ethanol–acetone (80–20) and OD_{595} was determined. Results correspond to three independent experiments with four-replicates measurements.

Autoaggregation assay

Autoaggregation (i.e., cell clumping and sedimentation) was measured as previously described [41]. Mucoid isolates and their respective NMVs were grown overnight in M63 supplemented with glucose 0.4% and $MgSO_4$ 1 mM at 37 °C shaking. After centrifugation at 3000 *g* for 5 min, bacterial pellets were resuspended in 1 mL of spent M63/Glu minimal medium to get an $OD_{600} \sim 0.3$ –0.6. The OD_{600} of the upper layer of the cultures was read after 24 h upon static incubation at room

temperature by an Infinite® 200 PRO spectrophotometer. Autoaggregation percentage was expressed as: $(1 - OD_{600}$ upper layer 24 h/ OD_{600} bacterial suspension at time zero) *100.

Curli/cellulase expression

Curli fibers are protease resistant and bind to Congo red (CR) and other amyloid dyes [42]. However, CR binds to other bacterial extracellular features, including cellulose [42]. We therefore assess curli/cellulose production by the Congo red assay. TS agar was supplemented with 40 μ g/mL Congo red (Sigma-Aldrich) and 20 μ g/mL Coomassie brilliant blue R-250 (Thermo Fisher Scientific). Plates were inoculated with drops of 5 μ l of each overnight bacterial culture grown in TSB and incubated for 72 h at 37 °C after which colony morphology and color were inspected and recorded.

Carbapenem and colistin susceptibility assays

Antimicrobial susceptibility testing was performed by E-test (bioMérieux) on Mueller-Hinton (MH) agar for carbapenems, whereas colistin was tested by broth microdilution assay. Experiments were performed in triplicates. Results were interpreted according to EUCAST guidelines, as updated in 2018 (<http://www.eucast.org>).

Whole genome sequencing, genome assembly and variant characterization

Genomic DNA was extracted on exponentially growing *K. pneumoniae* ($OD_{600} = 0.4$ –0.6) using the Qiagen Blood and Tissue DNeasy kit according to manufacturer's recommendations. Libraries were prepared following manufacturers' instructions by using the Illumina Flex kit based on Tn5 transposase tagmentation and the NEBNext Ultra II FS DNA Library prep kit based on random enzymatic fragmentation of genomic DNA. Whole genome sequencing was performed on Illumina NexSeq500 or HiSeq2500 platform. SPAdes [43] was used for de novo assembly and genome annotation was completed using RAST [44]. Resistome, virulome and ST were determined using Kleborate (<https://github.com/katholt/Kleborate>). SNPs, IS insertion and recombination events were detected by using breseq [45] using as reference contigs of the M variant and in-house scripts based on BWA [46] and GATK [47, 48]. Mutations were visually verified by using the IGV viewer [49]. IS sequences were identified in the draft genome sequences of the eight strains by BLASTN to identify IS – chromosome junctions. IS sequences were retrieved and analyzed by using the ISfinder database [50].

Statistical analysis

R version 3.6.1 (<http://www.rstudio.com/>) was used to construct graphs and analyze data regarding phenotypic

switch frequencies, capsule quantification, carbapenem susceptibility, biofilm formation and autoaggregation. Groups were compared using unpaired t-test. *P* values of < 0.0001 ****, < 0.001 ***, < 0.01 ** and < 0.05 * were considered significant.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02007-y>.

Additional file 1.

Abbreviations

CPKp: Carbapenemase-producing *K. pneumoniae*; LPS: Lipopolysaccharides; CPS: Polysaccharidic capsule; K-type: Capsular-type; CC: Clonal complex; M: Mucoïd; NM: Non-mucoïd; IS: Insertion sequence; WGS: Whole genome sequencing; SNP: Single nucleotide polymorphism; nt: Nucleotide; TSB: Tryptic-soy broth; LB: Lysogeny broth; CFUs: Colony forming units; wt/vol: Weight/volume

Acknowledgements

The authors thank Rafael Patiño-Navarrete for his help in the bioinformatics analysis.

Authors' contributions

AC, NC, PDZ performed experiments; TN and RB collected and provided the samples for the study; AC, PG, NC, PDZ, TN and IRC analyzed the data; AC and PG designed the study; AC, IRC, RB and PG wrote the manuscript; all authors approved the manuscript prior to submission.

Funding

This work was supported by grants from the French National Research Agency (ANR-10-LABX-62-IBEID and ANR-10-LABX-33), and from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under Grant Agreement No. 773830 (Project MedVetKlebs, One Health EJP). Adriana Chiarelli is part of the Pasteur - Paris University (PPU) International PhD Program. This project has received funding from the Institut Carnot Pasteur Microbes & Santé, and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 665807.

Availability of data and materials

Fastq files were deposited at the NCBI Sequence Read Archive (SRA) with the BioProject accession number PRJNA613777. Sequence accession numbers of the eight strains are indicated in Table 1.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable. The eight strains are from laboratory collections without information on patient.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹EERA Unit "Ecology and Evolution of Antibiotic Resistance", Institut Pasteur - Assistance Publique/Hôpitaux de Paris - University Paris-Saclay, Paris, France. ²UMR CNRS 3525, 75015 Paris, France. ³Sorbonne Université, 75015 Paris, France. ⁴EA 7361 Structure, dynamic, function and expression of broad-spectrum beta-lactamases", Faculty of Medicine University Paris-Sud, University Paris-Saclay, Associated French National Reference Center for Antibiotic Resistance: Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, Le Kremlin-Bicêtre, France.

Received: 8 June 2020 Accepted: 12 October 2020

Published online: 27 October 2020

References

- Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2018;45:131–9.
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589–603.
- David S, Reuter S, Harris SR, Glasner C, Feltwell T, Argimon S, Abudhabab K, Goater R, Giani T, Errico G, et al. Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nat Microbiol*. 2019;4(11):1919–29.
- Petrosillo N, Taglietti F, Granata G. Treatment options for colistin resistant *Klebsiella pneumoniae*: present and future. *J Clin Med*. 2019;8(7):934.
- Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018;18(3):318–27.
- Feldman MF, Mayer Bridwell AE, Scott NE, Vinogradov E, McKee SR, Chavez SM, Twentyman J, Stallings CL, Rosen DA, Harding CM. A promising bioconjugate vaccine against hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(37):18655–63.
- Kabha K, Nissimov L, Athamna A, Keisari Y, Parolis H, Parolis LA, Grue RM, Schlepfer-Schafer J, Ezekowitz AR, Ohman DE, et al. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun*. 1995;63(3):847–52.
- Paczosa MK, Meccas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2016;80(3):629–61.
- Clements A, Gaboriaud F, Duval JF, Farn JL, Jenney AW, Lithgow T, Wijburg OL, Hartland EL, Strugnell RA. The major surface-associated saccharides of *Klebsiella pneumoniae* contribute to host cell association. *PLoS One*. 2008;3(11):e3817.
- Moranta D, Regueiro V, March C, Llobet E, Margareto J, Larrarte E, Garmendia J, Bengoechea JA. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide impedes the expression of beta-defensins by airway epithelial cells. *Infect Immun*. 2010;78(3):1135–46.
- Wyres KL, Wick RR, Gorrie C, Jenney A, Follador R, Thomson NR, Holt KE. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data. *Microbial genomics*. 2016;2(12):e000102.
- Wyres KL, Gorrie C, Edwards DJ, Wertheim HF, Hsu LY, Van Kinh N, Zadoks R, Baker S, Holt KE. Extensive capsule locus variation and large-scale genomic recombination within the *Klebsiella pneumoniae* clonal group 258. *Genome Biol Evol*. 2015;7(5):1267–79.
- Lin CL, Chen FH, Huang LY, Chang JC, Chen JH, Tsai YK, Chang FY, Lin JC, Siu LK. Effect in virulence of switching conserved homologous capsular polysaccharide genes from *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 into K20. *Virulence*. 2017;8(5):487–93.
- Pal S, Verma J, Mallick S, Rastogi SK, Kumar A, Ghosh AS. Absence of the glycosyltransferase WcaJ in *Klebsiella pneumoniae* ATCC13883 affects biofilm formation, increases polymyxin resistance and reduces murine macrophage activation. *Microbiology*. 2019;165(8):891–904.
- Dorman MJ, Feltwell T, Goulding DA, Parkhill J, Short FL. The capsule regulatory network of *Klebsiella pneumoniae* defined by density-TraDISort. *mBio*. 2018;9(6):e01863–18.
- Lee H, Shin J, Chung YJ, Baek JY, Chung DR, Peck KR, Song JH, Ko KS. Evolution of *Klebsiella pneumoniae* with mucoïd and non-mucoïd type colonies within a single patient. *Int J Med Microbiol*. 2019;309(3–4):194–8.
- Ernst CM, Braxton JR, Rodriguez-Osorio CA, Zagieboylo AP, Li L, Pironti A, Manson AL, Nair AV, Benson M, Cummins K, et al. Adaptive evolution of virulence and persistence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Med*. 2020;26(5):705–11.
- Tipton KA, Dimitrova D, Rather PN. Phase-variable control of multiple phenotypes in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J Bacteriol*. 2015;197(15):2593–9.
- Bailey MJ, Hughes C, Koronakis V. RfaH and the ops element, components of a novel system controlling bacterial transcription elongation. *Mol Microbiol*. 1997;26(5):845–51.
- Tato M, Coque TM, Ruiz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, Jones RN, Baquero F, Canton R. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis*. 2007;45(9):1171–8.

21. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(1):333–4.
22. Wyres KL, Nguyen TNT, Lam MMC, Judd LM, van Vinh CN, Dance DAB, Ip M, Karkey A, Ling CL, Miliya T, et al. Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from south and Southeast Asia. *Genome Med.* 2020;12(1):11.
23. Stevenson G, Andrianopoulos K, Hobbs M, Reeves PR. Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol.* 1996;178(16):4885–93.
24. Cai R, Wang G, Le S, Wu M, Cheng M, Guo Z, Ji Y, Xi H, Zhao C, Wang X, et al. Three capsular polysaccharide synthesis-related Glucosyltransferases, GT-1, GT-2 and WcaJ, are associated with virulence and phage sensitivity of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Microbiol.* 2019;10:1189.
25. Domenico P, Schwartz S, Cunha BA. Reduction of capsular polysaccharide production in *Klebsiella pneumoniae* by sodium salicylate. *Infect Immun.* 1989;57(12):3778–82.
26. Trunk T, Khalil HS, Leo JC. Bacterial autoaggregation. *AIMS Microbiol.* 2018; 4(1):140–64.
27. Davey ME, Duncan MJ. Enhanced biofilm formation and loss of capsule synthesis: deletion of a putative glycosyltransferase in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 2006;188(15):5510–23.
28. Schembri MA, Blom J, Krogfelt KA, Klemm P. Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun.* 2005;73(8):4626–33.
29. Campos MA, Vargas MA, Regueiro V, Llompart CM, Alberti S, Bengoechea JA. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun.* 2004;72(12):7107–14.
30. Phillips ZN, Tram G, Seib KL, Atack JM. Phase-variable bacterial loci: how bacteria gamble to maximise fitness in changing environments. *Biochem Soc Trans.* 2019;47(4):1131–41.
31. Ahmad I, Karah N, Nadeem A, Wai SN, Uhlin BE. Analysis of colony phase variation switch in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *PLoS One.* 2019; 14(1):e0210082.
32. Matatov R, Goldhar J, Skutelsky E, Sechter I, Perry R, Podschun R, Sahly H, Thankavel K, Abraham SN, Ofek I. Inability of encapsulated *Klebsiella pneumoniae* to assemble functional type 1 fimbriae on their surface. *FEMS Microbiol Lett.* 1999;179(1):123–30.
33. Wugeditsch T, Paiment A, Hocking J, Drummelsmith J, Forrester C, Whitfield C. Phosphorylation of Wzc, a tyrosine autokinase, is essential for assembly of group 1 capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2001; 276(4):2361–71.
34. Bushell SR, Mainprize IL, Wear MA, Lou H, Whitfield C, Naismith JH. Wzi is an outer membrane lectin that underpins group 1 capsule assembly in *Escherichia coli*. *Structure.* 2013;21(5):844–53.
35. Rahn A, Whitfield C. Transcriptional organization and regulation of the *Escherichia coli* K30 group 1 capsule biosynthesis (*cps*) gene cluster. *Mol Microbiol.* 2003;47(4):1045–60.
36. Foster PL. Stress-induced mutagenesis in bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2007;42(5):373–97.
37. Kelly SD, Clarke BR, Ovchinnikova OG, Sweeney RP, Williamson ML, Lowary TL, Whitfield C. *Klebsiella pneumoniae* O1 and O2ac antigens provide prototypes for an unusual strategy for polysaccharide antigen diversification. *J Biol Chem.* 2019;294(28):10863–76.
38. Klein G, Raina S. Regulated assembly of LPS, its structural alterations and cellular response to LPS defects. *Int J Mol Sci.* 2019;20(2):356.
39. Bolla JM, Lazdunski C, Pages JM. The assembly of the major outer membrane protein OmpF of *Escherichia coli* depends on lipid synthesis. *EMBO J.* 1988;7(11):3595–9.
40. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol.* 1998;28(3):449–61.
41. Fagan RP, Smith SG. The Hek outer membrane protein of *Escherichia coli* is an auto-aggregating adhesin and invasins. *FEMS Microbiol Lett.* 2007;269(2): 248–55.
42. Reichhardt C, McCrate OA, Zhou X, Lee J, Thongsomboon W, Cegelski L. Influence of the amyloid dye Congo red on curli, cellulose, and the extracellular matrix in *E. coli* during growth and matrix purification. *Anal Bioanal Chem.* 2016;408(27):7709–17.
43. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin VM, Nikolenko SI, Pham S, Pribelski AD, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455–77.
44. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, et al. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics.* 2008;9:75.
45. Deatherage DE, Barrick JE. Identification of mutations in laboratory-evolved microbes from next-generation sequencing data using breseq. *Methods Mol Biol.* 2014;1151:165–88.
46. Langmead B. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Current protocols in bioinformatics 2010*, Chapter 11:Unit 11.17.
47. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernysky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M, et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297–303.
48. Patino-Navarrete R, Rosinski-Chupin I, Cabanel N, Gauthier L, Takissian J, Madec JY, Hamze M, Bonnin RA, Naas T, Glaser P. Stepwise evolution and convergent recombination underlie the global dissemination of carbapenemase-producing *Escherichia coli*. *Genome Med.* 2020;12(1):10.
49. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol.* 2011;29(1):24–6.
50. Siguier P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M. ISfinder: the reference Centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res.* 2006; 34(Database issue):D32–6.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Titre : Contribution de l'intégration du gène *bla*_{OXA-48} dans la dissémination des clones ST38 d'*E. coli* producteurs de carbapénémases

Résumé : Les carbapénèmes sont des β -lactamines de dernière génération utilisées comme dernier recours dans le traitement des infections causées par les bactéries Gram négatifs multirésistantes. L'efficacité thérapeutique de cette classe d'antibiotiques est menacée avec l'apparition et la dissémination de clones résistants aux carbapénèmes dont certains sont porteurs de plasmides codant pour des carbapénémases, OXA-48 étant la carbapénémase prédominante en Europe. En France, les bactéries *Escherichia coli* productrices de carbapénémase les plus répandues appartiennent au séquence type (ST) 38, dans lequel le gène *bla*_{OXA-48} codant pour OXA-48 est essentiellement porté sur le chromosome. Ce qui est en opposition avec ce qui est généralement rencontré chez les Enterobacteriaceae où *bla*_{OXA-48} est généralement porté par un plasmide, pOXA-48, facilitant sa dissémination par conjugaison. L'objectif principal de ma thèse consistait à déchiffrer les mécanismes impliqués dans l'émergence des clones *E. coli* ST38 exprimant une OXA-48 chromosomique. Pour ce faire, nous avons d'abord analysé la phylogénie des *E. coli* ST38 et montré que les bactéries exprimant une OXA-48 chromosomique se répartissaient en quatre clones, dans lesquels le transposon Tn6237, porteur du gène *bla*_{OXA-48}, était inséré à des positions différentes dans le chromosome. Nous avons transféré par conjugaison trois variants cliniques du plasmide pOXA-48 dans trois isolats ST38 non porteurs de *bla*_{OXA-48}. Nous avons observé que l'acquisition de ces plasmides entraînait un coût de fitness variable en fonction de la souche réceptrice, mais systématiquement associé à une instabilité. Nous avons ensuite effectué des évolutions expérimentales en présence de mérépénème des différentes combinaisons plasmide/hôte et observé deux trajectoires évolutives différentes. La première consiste en l'intégration du gène *bla*_{OXA-48} dans un nouveau réplicon, ce qui abolit partiellement ou complètement le coût de fitness. La deuxième consiste en l'apparition convergente de mutations dans un opéron codant pour un nouveau système de défense antiplasmide, nommé ApsAB. Sa mutation entraîne une stabilisation du plasmide pOXA-48 et un gain de fitness variable en fonction de la souche. ApsAB cible aussi des plasmides de laboratoire à haut et bas nombre de copies. Nous avons montré que trois facteurs sont importants pour l'intégration de *bla*_{OXA-48} : un coût de fitness élevé induit par pOXA-48, la présence de *bla*_{OXA-48} dans une structure mobile, Tn6237, et la déstabilisation de pOXA-48 par ApsAB. ApsAB est trouvé dans différents phyla allant des Enterobacteriaceae aux cyanobactéries. Sa présence pourrait avoir un impact écologique sur la circulation des plasmides.

Mots clés : *E. coli* ST38, pOXA-48, Évolution, intégration, OXA-48, dissémination

Title: Selective forces involved in the emergence of carbapenemase producing *E. coli* and the role of chromosomal integration of antibiotic resistance genes

Abstract: Carbapenems are the most recent generation of β -lactam antibiotics, which are used as one of the last options to treat infections caused by multi-resistant Gram-negative bacteria. The emergence and spread of carbapenem-resistant clones containing plasmids coding for carbapenemases threatens the therapeutic efficacy of this class of antibiotics. OXA-48 is the most frequent carbapenemase in Europe. In France the most prevalent carbapenemase-producing *Escherichia coli* belong to the sequence type (ST) 38, in which the *bla*_{OXA-48} gene is mainly integrated into the chromosome. This contrasts with what is frequently observed in Enterobacteriaceae, where *bla*_{OXA-48} is carried by a plasmid, mainly the pOXA-48 plasmid, that facilitates its dissemination by conjugation.

The main goal of my thesis was to understand the mechanisms involved in the emergence of *E. coli* ST38 clones expressing chromosomal OXA-48. To do this, we first analyzed the *E. coli* ST38 phylogeny. We showed that isolates with a chromosomal *bla*_{OXA-48} belonged to four clones, differing by the chromosomal location of the Tn6237 transposon carrying *bla*_{OXA-48}. Then, we introduced by conjugation three different pOXA-48 clinical variants into three *E. coli* ST38 isolates not carrying *bla*_{OXA-48}. The acquisition of these plasmids results in variable fitness costs depending on the recipient isolate always associated with a plasmid instability. We next performed *in vitro* evolution experiments in the presence of meropenem of the different plasmid/host combinations and observed two different evolutionary trajectories. The first one was the integration of the *bla*_{OXA-48} gene into the chromosome or the resident F-plasmid. It partially or completely abolishes the plasmid-induced fitness cost. The second one consisted in convergent mutations in an operon encoding a novel anti-plasmid defense system, we named ApsAB. *apsAB* mutation resulted in pOXA-48 stabilization and variable fitness improvements depending on the strain. ApsAB also targeted both high and low copy number laboratory plasmids. We showed that three factors were critical for the emergence of lineages with chromosomally integrated *bla*_{OXA-48}: a high plasmid-induced fitness cost, the presence of *bla*_{OXA-48} in a Tn6237 structure and the destabilization of pOXA-48 plasmids by ApsAB. ApsAB is found in different phyla ranging from Enterobacteriaceae to Cyanobacteria. The presence of this anti-plasmid system might have an ecological impact on plasmid circulation.

Keywords: *E. coli* ST38, pOXA-48, Evolution, integration, OXA-48, dissemination