

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences et Techniques

ECOLE DOCTORALE THEMATIQUE Biologie-Santé

EA3175, Equipe Avenir Inserm, Biologie Cellulaire et Moléculaire des Microorganismes

Thèse N° ()

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : Biologie, Santé

Présentée et soutenue par

EMILIE GUERIN

Le 26 Novembre 2010

**Identification et analyse
des régulations SOS dépendantes
au sein des intégrons de multirésistance aux antibiotiques**

Thèse dirigée par Madame le Professeur **Marie-Cécile Ploy**

Jury :

Professeur **FRANÇOIS DENIS**

Président

Professeur **MARIE-CECILE PLOY**

Directeur de thèse

Professeur **THIERRY LAMBERT**

Rapporteur

Docteur **PATRICK TRIEU-CUOT**

Rapporteur

Professeur **JEAN FEUILLARD**

Examineur

Professeur **ROLAND LECLERCQ**

Examineur

A mes parents,

A mon mari,

A ma fille.

Remerciements

Je remercie le conseil régional de Haute-Vienne et la Fondation pour la Recherche Médicale pour leurs soutiens financiers sans lesquels ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Il a été réalisé au sein du laboratoire EA3175 « Biologie cellulaire et moléculaire des micro-organismes » équipe Avenir Inserm. Je tiens à remercier toutes les personnes ayant contribué de près comme de loin à ce travail de thèse.

Mes premiers remerciements vont à la personne qui m'a accueillie, dirigée, motivée, encouragée et aidée à tous les instants de ce travail. Merci Marie-Cécile pour la confiance que tu as eue en moi, j'espère ne pas la décevoir.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur François Denis pour son accueil au sein du laboratoire et pour avoir accepté la présidence de ce jury.

Je remercie Monsieur le Professeur Thierry Lambert, Monsieur le Docteur Patrick Trieu-Cuot, Monsieur le Professeur Roland Leclercq et Monsieur le Professeur Jean Feuillard d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également Guillaume Cambray et Didier Mazel de l'Institut Pasteur ainsi que l'équipe de Jordi Barbé pour notre fructueuse collaboration.

J'adresse des remerciements particuliers à mes collègues « intégronistes » Thomas J. et Olivier B. pour les discussions scientifiques (ou non), leur conseils (Thomas personne n'égale ton savoir « intégronesque ») et leur humour. Ces années n'auraient pas eu la même saveur sans vous.

Je tiens également à remercier tous mes compagnons de laboratoires : Martine G., pour ta bienveillance et les chocolats (qui sont désormais célèbres) ; Sébastien C., pour tes chansons (parfois tenaces) et ta bonne humeur ; Aurore T., pour ton aide et ton énergie ;

Thibault S. (le Thomas like) et Lucie M., une année déjà !, pour votre bonne humeur. Pour les nouveaux venus Emilie S. (parce qu'il faut toujours une Emilie au labo) et Raphaël C., je leur souhaite trois années de thèse passionnantes. Je remercie Sandra D.R. pour le savoir que tu as apporté, tes conseils, les diverses discussions et pour ta disponibilité. Je remercie Sophie R., Delphine C., Sébastien H., Bernadette P. D. pour leur soutien. Je n'oublie pas l'ensemble du personnel du service Bactériologie - Virologie - Hygiène. Je ne saurais citer tout le monde, mais soyez assurés de ma gratitude quel que soit votre degré d'implication dans ce travail.

Enfin des remerciements tout particuliers à ma famille pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix, pour l'énergie qu'ils ont su m'insuffler et en fait pour tellement plus de choses... merci d'être là vous m'êtes indispensables. Merci à Mickaël pour m'avoir soutenue et supportée tous les jours (et ce bien avant la thèse) et pour son affection et le réconfort dans les bons et mauvais moments. Je n'aurais pas accompli tout ça si je n'avais pas pu me ressourcer auprès de vous tous.

Sommaire

Résumé	8
Abstract	9
Index des figures	10
Index des tableaux	11
Abréviations	12
Préambule	14
INTRODUCTION	17
CHAPITRE I - Les intégrons	18
I – Structure des intégrons	18
1- Le promoteur <i>P_c</i>	18
2- Le gène <i>intI</i> et l'intégrase	19
3- Le site de recombinaison <i>attI</i>	20
II – Les cassettes	21
1- Structure des cassettes	21
a- Diversité des gènes de cassette	21
b- Le site <i>attC</i>	22
2- Mouvements des cassettes	23
3-Expression des gènes contenus dans les cassettes	24
III- Différents types d'intégrons	25
1- Les intégrons de multirésistance (IM)	25
a- Les IM de classe 1	25
b- Les IM de classe 2	27
c- Les IM de classe 3	28
d- Autres classes d'intégrons	28

e- Distribution des IM	28
2- Les super-intégrons (SI)	29
IV- Evolution des intégrons	30
CHAPITRE II - Régulation de la transcription	32
I – La transcription chez les procaryotes	32
1- L'ARN polymérase	33
2- Les facteurs σ	33
3- Les promoteurs bactériens	34
4- Les étapes de la transcription	35
II – La régulation de la transcription	36
1- Régulation par des facteurs de transcription	37
a- Mécanismes d'activation	38
b- Mécanismes de répression	39
2- Régulation par des protéines associées au nucléoïde	40
a- Mécanisme de régulation transcriptionnelle par Fis, H-NS et IHF	40
3- Régulation par interférence transcriptionnelle	41
a- Configurations donnant lieu à une interférence transcriptionnelle	42
b- Mécanismes d'interférence transcriptionnelle	43
4- Stress et régulation de la transcription	46
CHAPITRE III - La réponse SOS	47
I- Historique	47
II- Le modèle SOS	48
III- La protéine LexA	50
IV- La protéine RecA	51
V- Facteurs d'induction de la réponse SOS	52
VI- Les gènes « SOS »	54

VII- Extension de la réponse SOS	54
VIII- La réponse SOS chez les autres bactéries	57
RESULTATS	59
Présentation du travail de thèse	60
I- Les recombinaisons au sein des intégrons sont contrôlées par la réponse SOS	62
II- Réponse SOS et expression des gènes <i>qnrB</i>	79
III- Etude de l'interférence entre l'expression des cassettes et l'expression de l'intégrase	95
DISCUSSION	122
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	134
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE	136
ANNEXE	152

Résumé

Les intégrons sont des éléments génétiques impliqués dans la dissémination des résistances aux antibiotiques au sein des populations bactériennes à Gram négatif. Ce système de capture et d'expression de gènes est constitué d'un gène *intI* codant une intégrase responsable de la capture des gènes, d'un site de recombinaison *attI* et d'un promoteur *Pc* régissant l'expression des gènes capturés. Des observations suggèrent que l'expression et/ou l'activité de l'intégrase seraient faibles. L'étude de l'expression de *intI* nous a permis de montrer qu'elle était réprimée par LexA, répresseur transcriptionnel de la réponse SOS et induite lors de stress endommageant l'ADN, notamment lors de traitements antibiotiques. Nous avons montré que l'expression du gène *qnrB2*, déterminant de résistance aux quinolones, était régulée de la même façon.

Chez les intégrons de classe 1, nous avons caractérisé le promoteur *PintI1* responsable de l'expression de *intI1*, ce dernier fait face à *Pc*, dont il existe 13 variants, et chevauche un second promoteur *P2* créé dans 10% des cas. Ces configurations sont propices aux interférences transcriptionnelles, définies comme l'influence négative d'un processus transcriptionnel sur un autre de façon directe. Nous révélons qu'il existe une interférence variant-dépendante de *Pc* sur l'expression de *intI1*.

D'une part, nos travaux montrent l'existence d'une relation entre les deux fonctions des intégrons, l'expression et l'échange/capture de gènes de résistance.

D'autre part, cette étude souligne combien les intégrons sont des outils d'adaptation efficaces face aux antibiotiques, mais aussi l'implication de la réponse SOS dans la résistance aux antibiotiques.

Mots clés : intégrons, stress, réponse SOS, interférence transcriptionnelle, résistances, antibiotiques, adaptabilité.

Title : Identification and analyzes of SOS dependant regulations in antibiotic multiresistant integrons

Abstract

Integrons are genetic elements responsible for antibiotic resistance dissemination through Gram-negative bacteria. These capture and expression systems are composed of an *intI* gene, coding an integrase which control gene capture, an *attI* recombination site and a Pc promoter controlling gene expression. Several observations suggest that the expression and/or the activity of the integrase could be weak. The study of the *intI1* expression lead us to show that it was repressed by LexA, the SOS response transcriptional repressor, and induced by DNA damaging stresses, like some antibiotic treatments. We showed that *qnrB2* expression, coding quinolones resistance, was regulated in the same way.

In class 1 integrons, we characterized the PintI1 promoter responsible of the *intI1* expression. PintI1 is head to head with Pc, for which there is 13 variants, and overlapped a second promoter P2 found in 10 % of the cases. These promoter configurations are very suitable to transcriptional interference, which is described as the direct negative influence of a transcriptional process on an other. We showed the existence of Pc variant-dependant interference on *intI1* expression. On one hand, our results showed a tight relation between expression and exchange/recruitment of resistance genes, the two functions of an integron.

On the other hand, this study emphasizes the efficiency of integrons as adaptative tools in response to antibiotics as well as the SOS response implication in antibiotic resistance.

Key words: integrons, stress, SOS response, transcriptional interference, resistance, antibiotics, adaptability.

Index des figures

- Figure 1** : Structure de la plate-forme fonctionnelle des intégrons
- Figure 2** : Détail de l'organisation de la région promotrice d'un intégron de classe 1
- Figure 3** : Structure des sites *attI*
- Figure 4** : Structure d'une cassette
- Figure 5** : Structure secondaire du brin 3'-5' d'un site *attC*
- Figure 6** : Modèle de capture et d'excision des cassettes
- Figure 7** : Relation phylogénétique de gènes des intégrases au sein des protéobactéries
- Figure 8** : Activité de recombinaison des variants d'intégrase
- Figure 9** : ARN polymérase sous forme holoenzyme
- Figure 10** : Interactions entre l'ARN polymérase et le promoteur
- Figure 11** : Structure d'un promoteur procaryote
- Figure 12** : Les différents mécanismes d'activation d'un promoteur par un facteur de transcription
- Figure 13** : Les différents mécanismes de répression d'un promoteur par un facteur de transcription
- Figure 14** : Arrangement de promoteurs donnant lieu à une interférence transcriptionnelle
- Figure 15** : Mécanismes d'interférence transcriptionnelle
- Figure 16** : Représentation du mécanisme de régulation du régulon SOS
- Figure 17** : Structure et conformations de la protéine LexA
- Figure 18** : Structure de la protéine RecA
- Figure 19** : Stress induisant la réponse SOS
- Figure 20** : Distribution du gène LexA dans les grands groupes bactériens
- Figure 21** : Distribution des motifs de fixation de LexA à travers les domaines bactériens

Index des tableaux

Tableau 1 : Séquences des variants des promoteurs Pc et P2 des intégrons de classe I

Tableau 2 : Caractéristiques des facteurs sigma d'*Escherichia coli*

Tableau 3 : Caractéristiques des principales protéines associées au nucléoïde

Tableau 4 : Gènes régulés par *lexA*

Abréviations

A	Adénine/Adénosine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNsb	ADN simple brin
Ala	Alanine
AMPC	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNP	ARN polymérase
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
C	Cytidine/Cytosine
CG	Cassette de gène
CTD	Domaine carboxy-terminal
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
FT	Facteur de transcription
G	Guanine/Guanosine
Gly	Glycine
ICE	Integrative Conjugative Element (élément intégratif conjugatif)
IM	Intégron de multirésistance
IS	Insertion sequence (séquence d'insertion)
ISCR	Insertion sequence common region (région commune de séquence d'insertion)

IT	Interférence transcriptionnelle
K	Guanine ou Thymidine
kDa	kilo Dalton
Lys	Lysine
M	Adénine ou Cytidine
N	Adénine, Cytidine, Guanine ou Thymidine
ng.L ⁻¹	Nanogramme par Litre
NTD	Domaine amino-terminal
ORF	Open reading frame (cadre ouvert de lecture)
pb	paire(s) de bases
ppGpp	Guanosine 3'-5' biphosphate
R	Adénine ou Guanine
Ser	Sérine
SI	Super-intégron
T	Thymidine
TIR	Translation initiation région (région d'initiation de la traduction)
Tn	Transposon
U.V.	Ultra Violet
<i>V. cholerae</i>	<i>Vibrio cholerae</i>
VCR	<i>Vibrio cholerae</i> repeat
W	Adénine ou Thymidine
Y	Cytidine ou Thymidine
3'CS	3' Conserved Segment (Région 3' conservée)

PREAMBULE

C'est dans les années 1940 que fut développé le premier antibiotique : la Pénicilline, officiellement découverte par Sir Alexander Fleming. Dès lors, de nombreux antibiotiques ont suivi, ouvrant une nouvelle voie dans le traitement de maladies jusque-là considérées comme incurables. Considérés comme l'une des plus grandes découvertes du XXème siècle, les antibiotiques ont ainsi augmenté l'espérance de vie d'environ 15 ans. Malheureusement, l'introduction des antibiotiques en médecine humaine fut rapidement suivie par l'apparition des premières bactéries résistantes. Si en fait, l'usage des antibiotiques a permis de réduire la mortalité de certaines maladies, il n'en a pas limité la fréquence de survenue. L'usage, souvent abusif, des antibiotiques a contribué à l'apparition des résistances bactériennes et à leur extension à quasiment tous les genres bactériens et pour toutes les familles d'antibiotiques.

La résistance bactérienne peut avoir une origine naturelle ou acquise. La résistance naturelle se dit des espèces bactériennes dont les souches dites « sauvages » résistent naturellement à certains antibiotiques ; le support génétique de cette résistance est le chromosome bactérien. A contrario, la résistance acquise est une propriété nouvelle qui apparaît chez des espèces jusqu'alors sensibles aux antibiotiques, cette résistance correspond à une adaptation des bactéries aux antibiotiques. L'acquisition d'une résistance peut se faire via la mutation d'un gène chromosomique existant ou par l'acquisition d'un ou de nouveau(x) gène(s) codant une résistance à un ou plusieurs antibiotiques. Les supports des gènes de résistance acquis sont des éléments génétiques mobiles qui permettent une dissémination par transfert horizontal de gènes à travers des espèces bactériennes parfois très éloignées sur le plan phylogénique. Parmi les éléments mobiles, plasmides et transposons ont été largement étudiés. Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires auto-répliquatives indépendantes du chromosome. Ils peuvent être présents en multi-copies et porter plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques et donc conférer une multi-résistance à la bactérie. Les

transposons sont des éléments génétiques capables de transfert d'un réplicon à un autre (chromosome, plasmide). Ils peuvent également contenir plusieurs gènes de résistances aux antibiotiques et permettre leur dissémination.

C'est en 1989 que Ruth Hall et Hatch Stokes identifient des éléments appelés « intégrons ». Ces éléments constituent un système génétique élaboré capable de capturer et d'exprimer des gènes de résistance aux antibiotiques sous forme de cassettes. Aujourd'hui, les intégrons sont considérés comme des acteurs majeurs de la résistance aux antibiotiques et de sa dissémination à travers la population bactérienne.

INTRODUCTION

CHAPITRE I - Les Intégrons

Décrits à la fin des années 1980, les intégrons constituent des éléments génétiques capables de capturer et d'exprimer des gènes contenus dans des éléments mobiles appelés cassettes. Les cassettes sont insérées au sein d'un intégron par recombinaison spécifique de site catalysée par une intégrase (Collis et Hall, 1992). Il s'agit d'un système naturel de clonage et d'expression de régions codantes. Les intégrons peuvent être portés par différents supports génétiques tels que : le chromosome bactérien, des plasmides et/ou des transposons. Depuis leur description en 1989 (Stokes et Hall, 1989), les intégrons ont été très largement étudiés.

I- Structure des intégrons :

Les intégrons sont définis par une plate-forme fonctionnelle comportant différents éléments majeurs. Le premier élément indispensable à l'intégron est l'intégrase qui est une recombinase spécifique de site codée par le gène *intI*. Les autres éléments essentiels sont : le site de recombinaison *attI* et un promoteur P_c , orienté dans le sens inverse de *intI*, responsable de la transcription des gènes contenus dans les cassettes qui seront insérées au sein de l'intégron (figure 1).

I-1- Le promoteur P_c :

Le promoteur P_c est responsable de l'expression des gènes contenus dans les cassettes insérées au sein de l'intégron. La région promotrice des cassettes a été étudiée essentiellement chez les intégrons de classe 1. Chez ces derniers, le promoteur P_c se situe dans la séquence

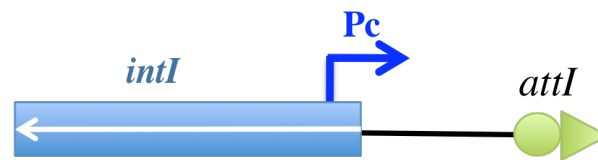


Figure 1 : Structure de la plate-forme fonctionnelle des intégrons.

Cette plate-forme est composée des trois éléments essentiels : le gène *intI* codant une intégrase, le promoteur *Pc* et le site de recombinaison *attI*.

codante de *intI1* et 8 variants de Pc ont été identifiés sur la base de leurs éléments -35 et -10 (table1) (Brizio *et al.*, 2006 ; Houang *et al.*, 2003 ; Jove *et al.*, 2010 ; Levesque *et al.*, 1994 ; Power *et al.*, 2005 ; Riccio *et al.*, 2000). Dans 10 % des intégrons de classe 1, il y a création d'un second promoteur P2 par insertion de trois résidus guanine (Levesque *et al.*, 1994) entre des éléments -35 et -10 putatifs dont l'espacement habituel est de 14 pb, rendant cette région fonctionnelle en tant que promoteur (figure 2). Il existe aussi 2 variants inactifs du P2 (P2m1 et P2m2) (Jove *et al.*, 2010) (table1).

En plus des variants de ce promoteur Pc, décrits sur la base des séquences -35 et -10, il peut exister un motif 5'-TG-3' localisé 1 base en amont de l'élément -10 (Barne *et al.*, 1997). La présence de ce motif définit un élément -10 étendu menant à la création d'un point de fixation supplémentaire pour l'ARN polymérase. Cet élément est décrit avec différents variants de Pc mais est très fréquent avec le variant PcW, faisant du promoteur PcW_{TGN-10} un variant à part entière (Jove *et al.*, 2010). De ce fait, il existe non pas 8 variants mais 13 variants de Pc chez les intégrons de classe 1 (table 1).

Globalement, en tenant compte non seulement des variants de Pc et de la présence d'un élément -10 étendu mais aussi de la création d'un P2, il existe chez les intégrons de classe 1, 20 configurations différentes de promoteurs des cassettes, à des fréquences variables.

Chez les intégrons de classe 2 le promoteur Pc n'a pas été caractérisé mais semble être dans *attI2* (Hansson *et al.*, 2002). Chez les intégrons de classe 3 le Pc a été localisé dans la séquence codante de *intI*, comme pour les intégrons de classe 1 (Collis *et al.*, 2002).

I-2-Le gène *intI* et l'intégrase

Un élément majeur, le gène *intI*, orienté en sens inverse des autres gènes localisés dans l'intégron, code une intégrase spécifique de site. L'intégrase IntI appartient à la famille des

recombinases à tyrosine spécifiques de site. Cette famille d'enzymes regroupe plus de 100 membres apparentés à l'intégrase du phage λ , ces enzymes n'ont pas de séquence commune exceptée une tétrade conservée : arginine-histidine-arginine-tyrosine au niveau de deux régions appelées *boxI* et *boxII* (Nunes-Duby et al., 1998). Les intégrases des intégrons possèdent des motifs appelés patch I, II et III dans lesquels ont été identifiés des résidus hautement conservés spécifiques des intégrases d'intégrons. Ces « patch » joueraient un rôle dans la structure secondaire des protéines, influant sur leur fixation à l'ADN et leur activité de recombinaison (Messier et Roy, 2001). L'intégrase va catalyser la recombinaison entre deux sites spécifiques localisés aussi bien sur une même molécule d'ADN que sur deux molécules d'ADN différentes. Le promoteur *PintI* responsable de l'expression de l'intégrase n'a pas été caractérisé, sa position n'est encore que supposée.

I-3- Le site de recombinaison *attI* :

Le site *attI* est un site d'attachement de l'intégrase, par lequel elle va réaliser l'intégration des cassettes. Le site *attI* est composé de 2 motifs L et R (Partridge *et al.*, 2000) (figure 3), le point de recombinaison est localisé dans le motif R appelé « core site » « GTTRRRY » (R : purine, Y : pyrimidine) entre le G et le premier T. L'élément L est moins reconnaissable que l'élément R hautement conservé, la région centrale est, quant à elle, très variable. Deux autres régions d'interaction avec l'intégrase ont été localisées en amont du site simple, ce sont les régions DR1 et DR2. Le premier site DR1 est un site de fixation fort, indispensable à l'activité de l'intégrase, le deuxième DR2 est un site de fixation plus faible qui améliore l'efficacité de recombinaison (Collis et Hall, 2004).

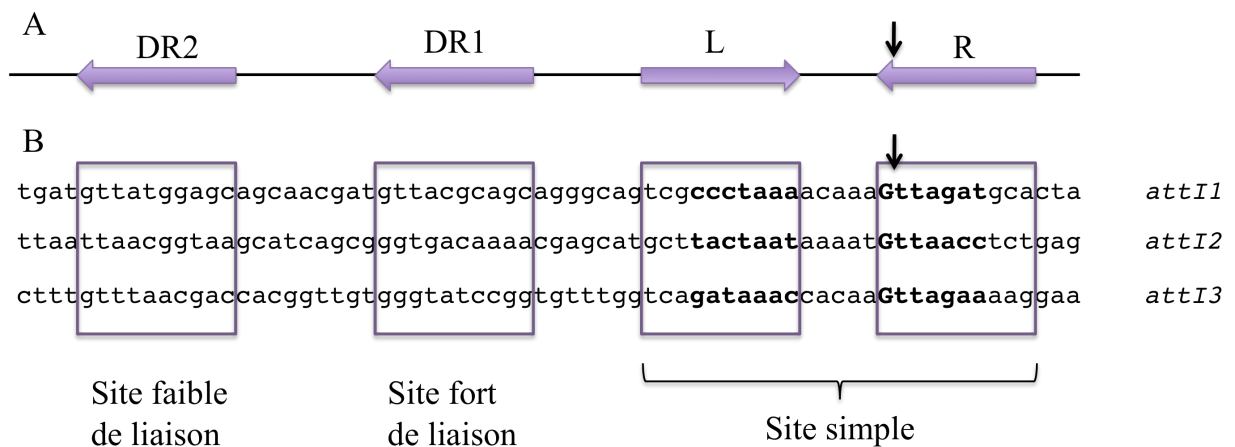


Figure 3 : Structure des sites attI. *A* : organisation d'un site attI : Les sites attI sont organisés en quatre sites de liaison de l'intégrase représentés schématiquement par des flèches en violet. *B* : alignement des séquences des attI1, 2 et 3 : Le site simple composé des éléments L et R, en gras sont indiqués les « core site » potentiels (GTTRRRY). Les sites DR1 et DR2 sont des sites secondaires d'interaction avec l'intégrase, DR1 est un site de fixation fort, indispensable à l'activité de l'intégrase alors que DR2 est un site de fixation faible qui améliore l'efficacité de recombinaison. Une flèche verticale indique le point de recombinaison, les nucléotides situés après le point de recombinaison dépendent de la première cassette. D'après (Collis et Hall, 2004)

II- Les cassettes:

Les cassettes sont des petits éléments mobiles, elles contiennent généralement une seule séquence codante et un site spécifique de recombinaison. Elles sont capturées par les intégrons, plusieurs cassettes peuvent être insérées au sein d'un même intégron formant ainsi un réseau.

II-1- Structure des cassettes :

La taille et le contenu des cassettes présentent une grande variabilité. Cette variabilité est majoritairement fonction du gène qu'elles contiennent. Malgré la diversité en taille et en fonction des gènes qu'elles peuvent contenir, les cassettes montrent des caractéristiques communes (Hall, Brookes et Stokes, 1991). Chaque cassette est composée d'un cadre ouvert de lecture, et d'un site de recombinaison *attC*, localisé en 3' du gène. Les cassettes peuvent exister sous deux formes, une forme transitoire libre circulaire ou une forme linéaire lorsqu'elles sont intégrées au sein d'un intégron (figure 4) (Collis et Hall, 1992 ; Recchia et Hall, 1995). Les cassettes ne sont pas capables de s'auto-répliquer et ne sont donc pas maintenues durant la division cellulaire, lorsqu'elles sont présentes sous leur forme circulaire.

II-1a- Diversité des gènes de cassette

A ce jour plus de 190 cassettes ont été identifiées chez les intégrons de multi-résistance, plus de 130 d'entre elles sont connues pour contenir des gènes de résistance aux antibiotiques (Partridge *et al.*, 2009). A travers ces gènes de résistance, des résistances à la quasi-totalité des familles d'antibiotiques sont représentées : aminosides, β -lactamines,

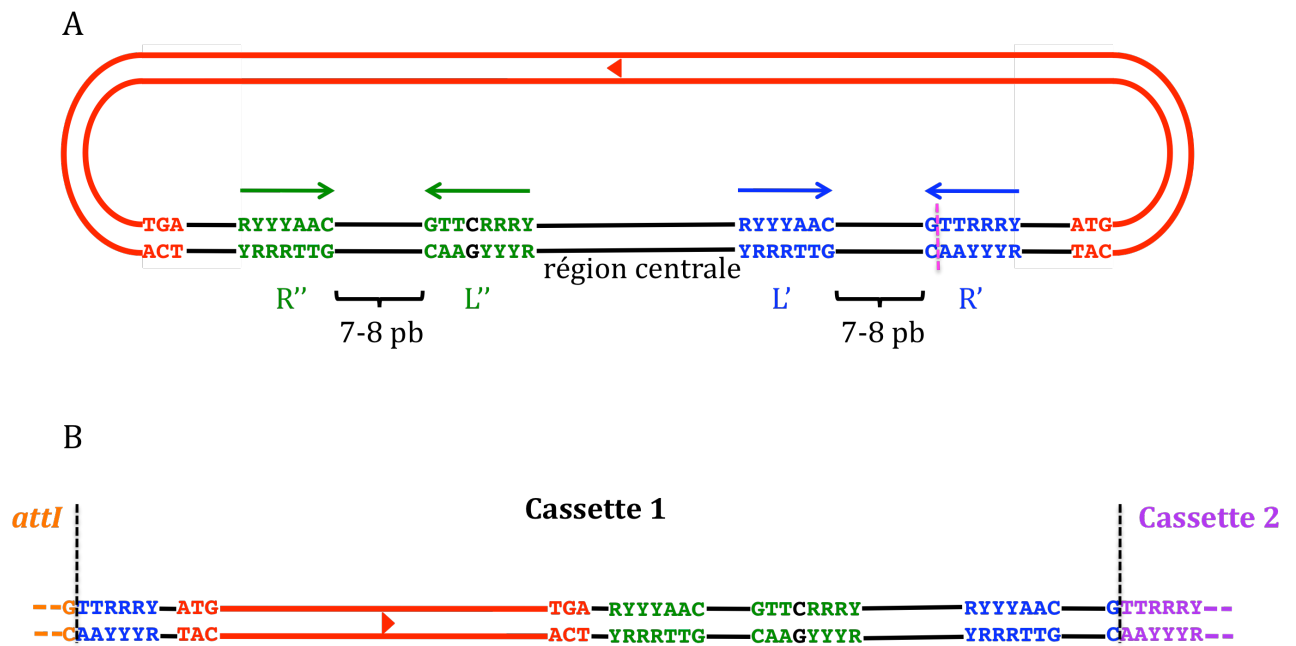


Figure 4 : Structure d'une cassette

A : Forme circulaire, libre, d'une cassette: en rouge la séquence codante du gène; en noir le site *attC* composé de deux sites simples, indiqués en bleu et en vert, séparés par une région centrale. Chaque site simple est lui-même composé de deux sites core inversés séparés par 7 à 8 pb (L'/R' et L''/R'').

B : Forme linéaire d'une cassette intégrée au sein d'un intégron: en orange le point d'insertion de la cassette au site *attI*, en violet le début de la deuxième cassette. La cassette 1 commence au premier "T" du site core R' et se termine au "G" du même site. D'après (Partridge et al., 2009).

phénicolés, triméthoprime, streptothricine, rifampicine, macrolides, lincosamides, fosfomycine, quinolones (Partridge *et al.*, 2009). Il existe également des cassettes contenant des gènes de résistance à des agents antiseptiques tels que les ammoniums quaternaires. Certaines cassettes contiennent aussi des gènes codant des protéines dont la fonction n'est pas connue.

D'autre part, il existe des cassettes atypiques, car ne correspondant pas au schéma classique d'une cassette. Parmi ces cassettes atypiques, ont été caractérisées des cassettes qui ont fusionné ou des cassettes hybrides (Gestal *et al.*, 2005).

II-1b- Le site *attC*

Le site *attC* contient deux sites simples conservés à chacune de ses extrémités, ces deux sites sont des séquences inversées répétées séparées par une région centrale variable qui est normalement elle même inversée répétée. Chacun des sites simples contient des motifs hautement conservés appelés sites core (L', R' et R'', L'') de séquence consensus GTTRRRY, l'un étant l'image inversée de l'autre (figure 4). Ces sites core permettent au site *attC* de former des structures cruciformes par l'appariement de chaque brin avec lui-même. Les sites core forment des duplex L'-L'' et R'-R'' permettant la structuration « tige-boucle » du site *attC* sous forme simple brin (Hall, Brookes et Stokes, 1991) (Mazel, 2006) (figure 5).

Il apparaît que le site L'' montre une base supplémentaire (résidu guanine) par rapport à L', lors de l'appariement de L' et L'' il existe donc un mésappariement qui repousse le G vers l'extérieur. Cette base va permettre à l'intégrase de reconnaître le brin à recombinaison (Bouvier *et al.*, 2009). L'intégrase se fixe aux sites core, le monomère fixé au duplex R'-R'' va cliver l'ADN au point de recombinaison (figure 5). Ainsi la cassette insérée se terminera par le G du site R' et commencera par le premier T du même site (Mazel, 2006). Toutes les

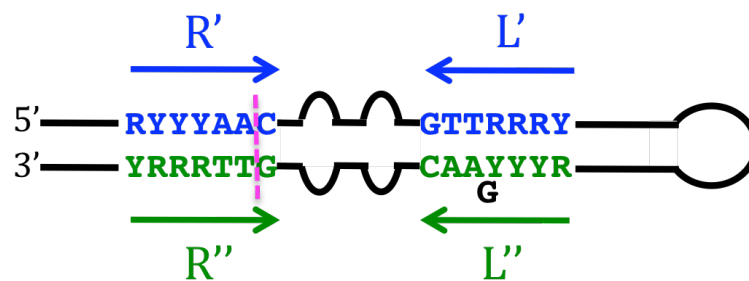


Figure 5 : Structure secondaire du brin 3'-5' d'un site attC. Les motifs inversés répétés L', L'' et R', R'' sont indiqués par des flèches au-dessus de leur séquence respective. Le site core L'' montre un G dépassant ce qui permet à l'intégrase de reconnaître le brin à recombinaison. Le point de recombinaison est indiqué par une ligne pointillée rose. D'après (Mazel, 2006)

cassettes d'un réseau au sein d'un intégron sont orientées dans le même sens, permettant ainsi leur expression à partir de Pc. Le site *attC* constitue un système permettant de s'assurer que la cassette est insérée et orientée correctement.

Chaque cassette est associée à un site *attC* unique, l'intégration des cassettes au sein d'un intégron par recombinaison de sites entraîne la formation de sites *attC* composites étant chacun constitué d'un petit fragment du site *attC* de la cassette adjacente (figure 4B).

II-2- Mouvements des cassettes :

La recombinaison est catalysée par l'intégrase, cinq réactions de recombinaison ont été décrites. Les recombinaisons *attC x attI*, *attC x attC* et *attI x attI* qui correspondent aux événements de recombinaison normaux, ne se produisent pas à la même fréquence. Il existe également des recombinaisons possibles entre un site *attI* ou *attC* et un site non spécifique contenant la séquence GTT (Recchia, Stokes et Hall, 1994).

L'insertion d'une cassette se fait de façon préférentielle au site *attI* (Collis et al., 2001), ainsi le gène qu'elle contient est placé à proximité du promoteur Pc, la position la plus favorable à son expression (Collis et Hall, 1995) (figure 6A). La recombinaison entre sites *attI* et *attC* peut se produire entre deux intégrons portés chacun par un plasmide différent, pouvant donner lieu à des co-intégrats.

Lors d'une recombinaison entre sites hétérologues, l'intégrase utilise le site *attI* double brin et le site *attC* simple brin (conformation tige-boucle figure 5). Des molécules d'intégrase fixées sur *attI* et *attC* vont mener à un échange de brin et à la formation d'une jonction de Holliday qui sera résolue au cours de la réplication (Bouvier, Demarre et Mazel, 2005).

La recombinaison entre deux sites *attC* se produit via le modèle de formation et de résolution d'une jonction de Holliday. L'intégrase va réaliser cette recombinaison par l'intermédiaire de

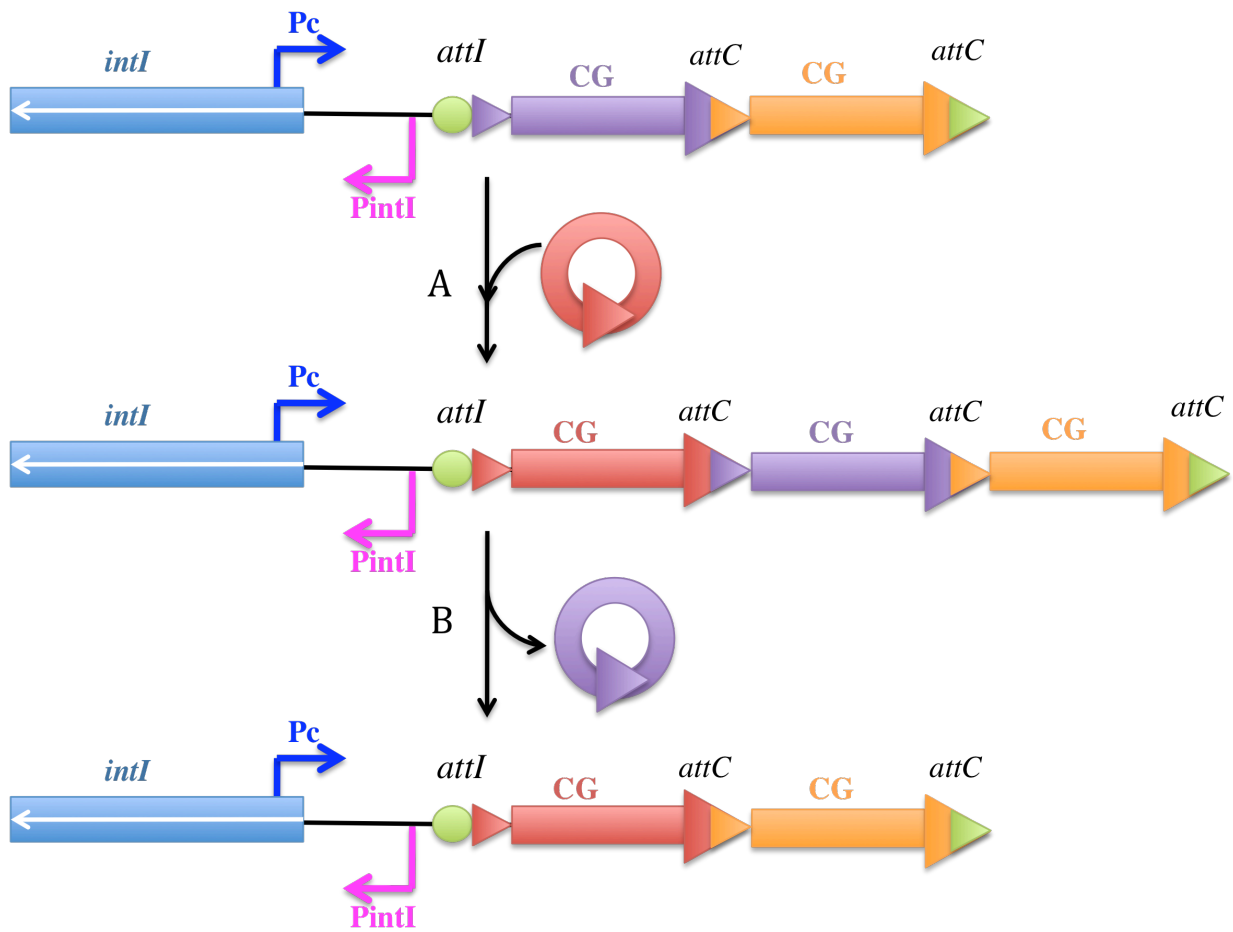


Figure 6 : Modèle de capture et d'excision des cassettes. *A* : événement de recombinaison entre un site *attC* et site *attI* menant à l'intégration d'une cassette (CG) (rouge) en première position. *B* : événement de recombinaison entre deux sites *attC* menant à l'excision d'une cassette (violet). Les recombinaisons sont catalysées par l'intégrase.

deux sites *attC* simple brin structurés en épingle à cheveux via une jonction de Holliday qui pourrait être résolue par le processus de réplication (MacDonald *et al.*, 2006). Cet événement mènera à la libération d'une cassette de gène sous une forme circulaire libre (figure 6B).

II-3- Expression des gènes contenus dans les cassettes

Les cassettes insérées au sein d'un intégron par recombinaison de site sont alors organisées sous forme d'un réseau. Une telle organisation a un impact important sur l'expression des gènes. En effet, la majorité des gènes ne possèdent pas de promoteur propre, leur expression ne dépend donc que de la région promotrice présente dans la plate forme fonctionnelle de l'intégron (Stokes et Hall, 1989). Lorsque plusieurs cassettes sont organisées en réseau dans un intégron, la distance entre Pc et un gène donné va affecter l'expression de celui-ci. Le gène de la première cassette est le plus exprimé et l'expression des gènes des cassettes suivantes va en décroissant au fur et à mesure que l'on avance dans le réseau. Ainsi, seuls les gènes de quelques-unes des premières cassettes sont exprimés, leur nombre ainsi que leur niveau d'expression variant en fonction du Pc en présence (Collis et Hall, 1995). Il existe des cassettes possédant un promoteur propre mais cela reste rare.

De même que la majorité des cassettes n'a pas de promoteur, quelques-unes ne possèdent pas de région d'initiation de la traduction (TIR) (Hanau-Bercot *et al.*, 2002). Ces cassettes de gène sont dépendantes de la plate-forme fonctionnelle de l'intégron pour trouver les éléments nécessaires à l'expression des gènes qu'elles contiennent.

De plus, les sites *attC* en plus de leur rôle dans la recombinaison peuvent avoir un impact sur l'expression des gènes. En effet, leurs structures tige-boucle pourraient empêcher la progression du ribosome le long de l'ARN messager, en effet ce phénomène est atténué lors

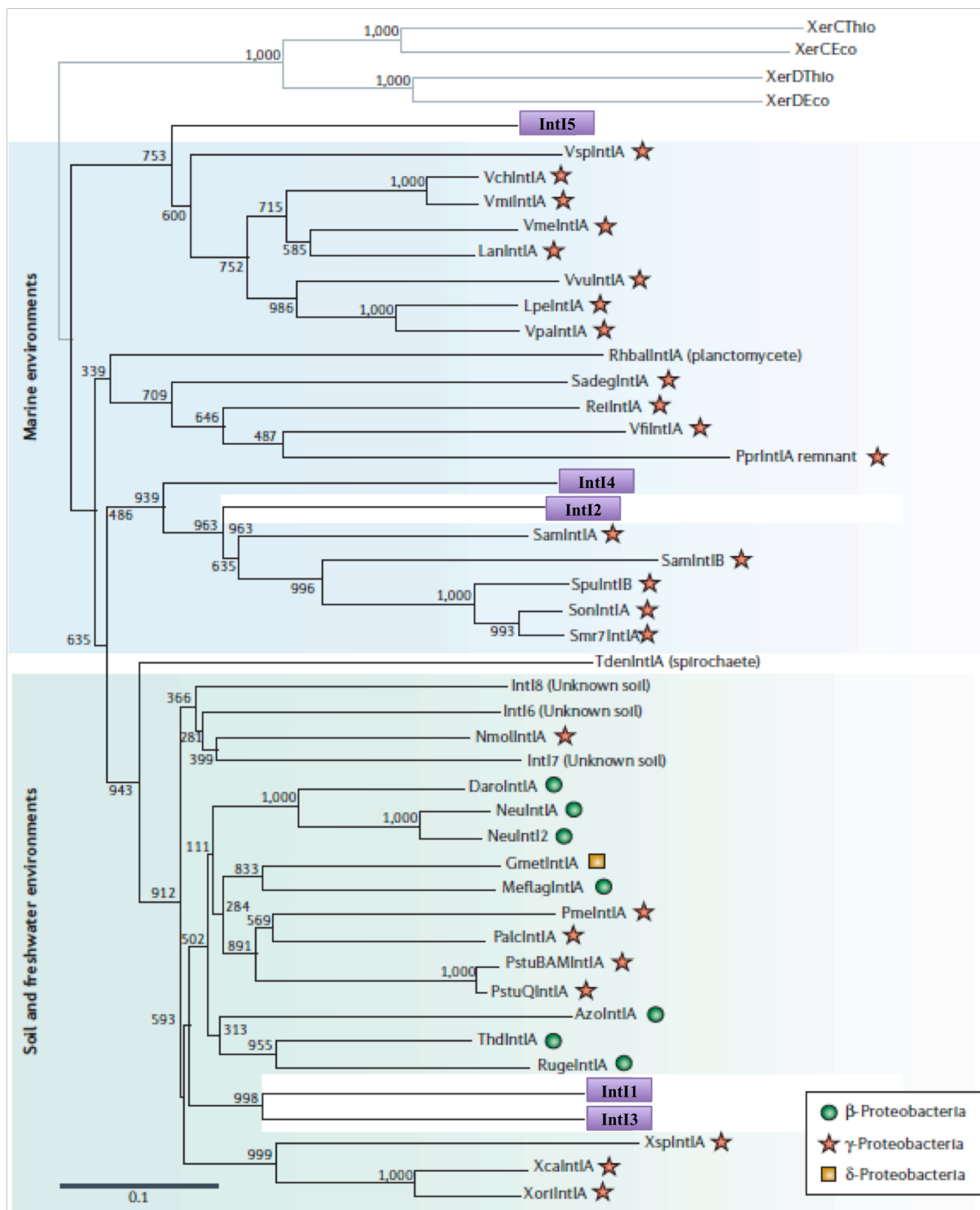


Figure 7 : Relation phylogénétique des intégrases au sein des protéobactéries.

Le dendrogramme est basé sur la séquence nucléotidique des gènes *intI* connus. Les intégrases des cinq classes d'intégrons de multirésistance sont encadrées en violet. D'après (Mazel, 2006).

de la création artificielle d'un petit cadre ouvert de lecture à l'intérieur même du site *attC* (Jacquier et al., 2009).

L'expression des gènes des cassettes serait donc dépendante de la force du *Pc*, de la localisation de la cassette dans le réseau et du site *attC* qui la précède.

III- Les différents types d'intégrons

Bien que tous les intégrons montrent une organisation et un fonctionnement très proche, il existe néanmoins des différences permettant de définir plusieurs types d'intégrons.

III-1- Les intégrons de multi-résistance (IM)

Les intégrons de multi-résistance contiennent essentiellement des cassettes de résistance aux antibiotiques et sont impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Ils sont souvent appelés intégrons mobiles bien que ne codant pas pour des fonctions de transposition, car ils sont associés à des éléments mobiles tels que les transposons et les plasmides qui permettent le transfert horizontal d'intégrons entre bactéries. Cinq classes d'intégrons de multi-résistance ont été définies sur la base de la séquence des intégrases, ces 5 classes d'IM étant associées à des résistances aux antibiotiques (figure 7).

III-1a- Les IM de classe 1

Ce sont les intégrons les plus répandus et les plus étudiés, décrits pour la première fois en 1989 (Stokes et Hall, 1989), ils furent dans un premier temps associés au transposon *Tn21*.

Le réseau de cassettes est fréquemment mais pas constamment suivi d'une séquence appelée 3' conservée (3'CS) constituée du gène *qacEΔ1* qui code une résistance aux ammoniums quaternaires, du gène *sulI* qui code une résistance aux sulfamides et d'une séquence codante *orf5* donnant un peptide de fonction inconnue. De très nombreux intégrons de classe 1 ont été décrits, le plus grand réseau de cassettes identifié à ce jour est composé de huit cassettes (Naas *et al.*, 2001). Une grande proportion des cassettes codant des résistances aux antibiotiques a été caractérisée chez ces intégrons. Les IM de classe 1 sont souvent retrouvés dans les isolats cliniques quand un profil de multi-résistance est établi, ils sont donc largement impliqués dans la dissémination de la multi-résistance aux antibiotiques (Leverstein-van Hall *et al.*, 2003). L'intégrase IntI1 est une protéine de 337 acides aminés. La présence de Pc dans la séquence même du gène *intI1* a pour conséquence qu'aux différents Pc, correspondent différentes intégrases d'activité variable (Jove *et al.*, 2010). En effet, l'intégrase d'un intégron portant un PcW ou un PcH1 aura une activité plus importante qu'une intégrase issue d'un intégron avec un PcS ou PcH2 (figure 8).

En plus de ces intégrons de classe 1 « classiques », il a été mis en évidence des intégrons dits complexes ou intégrons *sulI*-type. Ces intégrons sont de plus grande taille en raison de la duplication d'une 3'CS présentant des gènes supplémentaires. Parmi ces gènes, ont été retrouvés des gènes de résistances mais aussi une région codante *orf513* aujourd'hui appelée ISCR1 (Toleman, Bennett et Walsh, 2006) codant une transposase pouvant être impliquée dans l'intégration de nouveaux gènes de résistance aux antibiotiques comme les gènes *qnr* (résistance aux quinolones), ou les gènes codant une bêta-lactamase à spectre étendu de type CTX-M (Bae *et al.*, 2007 ; Garnier *et al.*, 2006 ; Nordmann et Poirel, 2005). De plus cette ISCR1 apporte un promoteur actif permettant l'expression des gènes en aval (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2006).

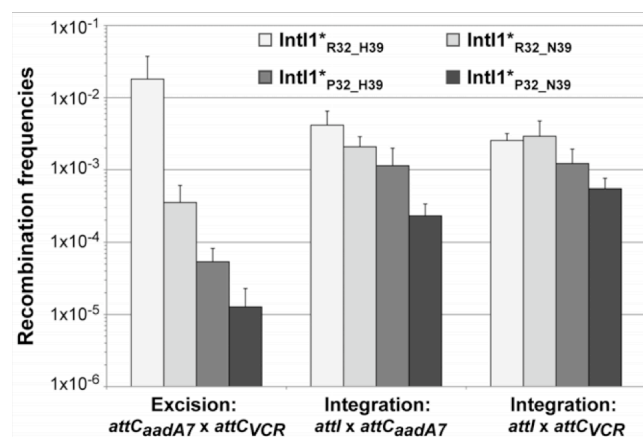


Figure 8 : Activité de recombinaison des variants d'intégrase.

Estimation des activités d'excision et d'intégration de différents variants de l'intégrase IntI1 par mesure de la fréquence de recombinaison entre deux sites attC, le site attC de la cassette aadA7 et celui des cassettes de Vibrio (activité d'excision), ou entre le site attI1 et l'un ou l'autre des sites attC précédents (activité d'intégration). Le variant de Pc contenu dans la séquence codante des variants de l'intégrase testés sont pour : IntI1*_{R32_H39} : PcW ou PcH1; IntI1*_{R32_N39} : PcS ou PcH2; IntI1*_{P32_H39} : PcW_{TGN-10} (-10 étendu), et IntI1*_{P32_N39} : PcS_{TGN-10} ou PcH2_{TGN-10} (Jove et al. 2010).

III-1b- Les IM de classe 2

C'est la classe d'intégron la plus fréquente après la classe 1, ils sont toujours associés au transposon Tn7 ou des transposons apparentés (Sundstrom, Roy et Skold, 1991 ; Tietze, Brevet et Tschape, 1987 ; Young, Qumsieh et McIntosh, 1994). La plupart des intégrons de classe 2 ont un réseau de cassettes très stable composé de la cassette *dfrA1* qui confère la résistance au triméthoprim, la cassette *sat2* qui confère la résistance à la streptothricine, la cassette *aadA1* qui code une résistance à la spectinomycine et à la streptomycine et une cassette *orfX* qui correspond à un gène putatif associé à un site *attC* incomplet (Hansson *et al.*, 2002). La faible variabilité du réseau de cassettes des intégrons de classe 2 pourrait être expliquée par le fait que la traduction de l'ARN messager de *intI2* est interrompue par un codon stop précoce (UAA), *IntI2* réduite à 178 acides aminés est donc non fonctionnelle (Hansson *et al.*, 2002). L'intégrase *IntI2* active, lors de la suppression du codon stop, présente 46 % d'identité avec *IntI1* (Collis *et al.*, 2002). Malgré une intégrase inactive, des IM 2 avec de nouveaux réseaux de cassettes ont été récemment décrits (Biskri et Mazel, 2003 ; Ramirez, Pineiro et Centron ; Ramirez *et al.*, 2005). Ces réseaux de cassettes pourraient trouver leur origine chez des bactéries portant des IM de classe 1 et 2, où l'intégrase de l'IM 1 aurait catalysé des recombinaisons sur l'IM 2 (White, McIver et Rawlinson, 2001) ou par recombinaison homologue entre des intégrons ayant une cassette commune. De plus, deux allèles du gène *intI2* dont le codon stop a été remplacé par un codon d'acide aminé ont été décrits (Barlow et Gobius, 2006 ; Marquez *et al.*, 2008). Ces intégrons de classe 2 possédant une intégrase fonctionnelle ont été décrits l'un chez une bactérie commensale du tractus intestinal bovin (*Providencia stuartii*) et l'autre chez une souche d'*E. coli* uropathogène. Ces IM 2 sont donc capables d'acquérir de nouvelles cassettes de gène de façon autonome.

III-1c- Les IM de classe 3

Les intégrons de classe 3 sont plus rares, ils sont structurellement proches des intégrons de classe 1. La protéine IntI3, contenant 346 acides aminés, présente 59 % d'identité avec IntI1 (Collis *et al.*, 2002). A ce jour, seulement quatre IM 3 ont été caractérisés (Arakawa *et al.*, 1995 ; Correia *et al.*, 2003 ; Xu, Davies et Miao, 2007). Ces intégrons sont souvent retrouvés dans des souches bactériennes environnementales, la majorité des cassettes ne sont pas impliquées dans la résistance aux antibiotiques et leur gènes codent des protéines de fonctions inconnues.

III-1d- Autres classes d'intégrons

Un intégron de classe 4 a été identifié au sein d'un élément conjugatif intégratif (SXT) chez *Vibrio cholerae* (Clark *et al.*, 2000). Cet intégron présente cinq cassettes dont une (*dfrA1*) codant une résistance au triméthoprime. Une cinquième classe d'intégron a été définie après la découverte d'un intégron inconnu sur un plasmide de *Vibrio salmonicida* (accession number AJ277063). Cet intégron de classe 5 comporte huit cassettes, le gène de l'une d'entre elles code une résistance à un antibiotique (*dfrA1*). Ces intégrons ont été identifiés, cependant ils restent peu étudiés.

III-1e- Distribution des IM

Les intégrons ont été initialement décrits dans un contexte clinique, cependant ils ont également été retrouvés chez des souches commensales humaines et animales ainsi que chez

des souches environnementales. De plus, les études montrent que la prévalence et la dissémination des intégrons augmentent avec la pression de sélection antibiotique.

Les intégrons de multi-résistance sont très largement répandus chez les bactéries à Gram négatif et particulièrement chez les entérobactéries (Leverstein-van Hall *et al.*, 2003). Les IM de classe 1 prédominent, ce sont les plus représentés d'un point de vue clinique et sont présents dans 22 à 59 % des bactéries à Gram négatif (Labbate, Case et Stokes, 2009). Les intégrons de classe 1 ont été mis en évidence au sein de nombreuses espèces d'entérobactéries telles que *Echerichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Yersinia* (Sallen *et al.*, 1995). Ils ont été retrouvés chez d'autres genres bactériens à Gram négatif tels que *Pseudomonas* (Levesque et al., 1995), *Acinetobacter* (Seward, 1999), *Vibrio cholerae* (Dalsgaard et al., 2001). La description d'intégrons dans des bactéries à Gram positif est beaucoup plus rare, des intégrons de classe 1 ont été retrouvés chez des *Corynebacterium spp* (Nesvera, Hochmannova et Patek, 1998) ou chez des *Staphylococcus* (Xu *et al.*, 2008) et *Enterococcus* (Clark et al., 1999 ; Xu et al.). Les intégrons de classe 2 sont retrouvés à des fréquences moins importantes que les IM de classe 1 dans des espèces identiques comme *E. coli* (Solberg, Ajiboye et Riley, 2006), *Acinetobacter* (Gonzalez et al., 1998 ; Ploy et al., 2000), *Shigella* (Gassama-Sow et al., 2006) ou encore *Salmonella* (Miko et al., 2003) mais aussi chez des bactéries à Gram positif comme *Aerococcus* (Byrne-Bailey et al., 2009). Enfin les IM de classe 3, très rares, sont peu retrouvés dans les isolats cliniques et semblent plus fréquents chez les β -protéobactéries environnementales (Xu, Davies et Miao, 2007).

III-2- Les super-intégrons (SI)

Des études comparatives entre les *attC* des IM et des séquences répétées appelées VCR (pour *Vibrio Cholerae* Repeats) avec une organisation similaire sur le chromosome 2 de

V. cholerae (Barker, Clark et Manning, 1994), ont mené à la découverte d'un nouveau type d'intégron (Mazel *et al.*, 1998) appelés super-intégrons (SI). Les SI divergent des IM par différents points. Tout d'abord, les SI sont généralement associés à un grand nombre de cassettes (72 à plus de 200). Parmi les cassettes décrites à ce jour, moins de 10% codent des résistances aux antibiotiques, la grande majorité des gènes des cassettes codent des protéines de fonction inconnue. Il existe un haut degré d'identité entre les sites *attC* d'un même SI, alors qu'ils varient fortement en taille et en séquence pour les IM. Enfin, contrairement aux IM, ces structures ne sont pas mobiles, les SI sont retrouvés sur le chromosome et ne sont pas associés à des éléments mobiles (Heidelberg *et al.*, 2000). Les SI sont des éléments très anciens, bien antérieurs à l'ère des antibiotiques puisqu'un représentant a été retrouvé chez *Vibrio metschnikovii* isolé en 1888 (Mazel *et al.*, 1998).

Les SI sont très répandus chez les γ -protéobactéries, caractérisés pour la première fois chez les *Vibrionaceae*, ils ont également été identifiés chez les *Xanthomonadaceae* et les *Pseudomonadaceae*. Des représentants des SI ont également été retrouvés chez des β -protéobactéries (*Nitrosomonas*) et chez les δ -protéobactéries (*Geobacter*) (Mazel, 2006).

IV- Evolution des intégrons

Les IM et SI ont des organisations structurelles proches, mais le caractère très ancien des SI laisse penser que les SI seraient les précurseurs des IM. Il serait possible que les IM aient évolué à partir des SI par capture du gène *intI* et de son site *attI* par des éléments mobiles comme les transposons. Cette théorie est supportée par plusieurs observations. Premièrement, certains sites *attC* d'IM présentent une forte identité avec des sites *attC* de SI (Rowe-Magnus *et al.*, 2001). Deuxièmement, un intégron caractérisé chez *Vibrio salmonicida*, n'étant pas un IM, et présentant de nombreuses similitudes avec un SI, pourrait

être le chaînon intermédiaire entre les SI et les IM (Labbate, Case et Stokes, 2009 ; Mazel, 2006). Le troisième élément appuyant cette théorie, est que les IM seraient capables de recruter des cassettes des SI de façon directe pour acquérir une résistance (Rowe-Magnus, Guerout et Mazel, 2002). Les SI serviraient de réservoir de cassettes pour les IM, produisant un outil d'évolution et d'adaptabilité rapide pour les bactéries.

CHAPITRE II - Régulation de la transcription

L'expression du matériel génétique se produit via deux étapes consécutives dans lesquelles l'information est convertie depuis l'une des étapes vers une autre : la transcription et la traduction. La première étape, la transcription, consiste en la conversion de l'information en un messenger intermédiaire.

I- La transcription chez les procaryotes

La transcription est le processus de copie du matériel génétique en ARN, il existe différents types d'ARN :

- ARN messenger (ARNm) : ce sont les ARN qui portent le message codé par les gènes, ils seront ensuite convertis en protéine lors de la traduction.
- ARN ribosomiaux (ARNr) : combinés à des protéines, les ARNr constituent la structure des ribosomes. Les ARNr représentent 82% des ARN totaux.
- ARN de transfert (ARNt) : ce sont des petits ARN servant à transporter les acides aminés jusqu'au ribosome.
- Petits ARN régulateurs (ARN interférents ou ARN anti sens).

Dans tous les organismes la transcription est réalisée par une ou plusieurs ARN polymérase ; chez les procaryotes, une seule ARN polymérase est responsable de la production de tous les ARN.

I-1- L'ARN polymérase

Le cœur de l'enzyme ARN polymérase (ARNP) ou apoenzyme est composée de cinq sous-unités: deux sous-unité α , une sous-unité β , une sous-unité β' et une sous-unité ω ($\alpha_2\beta\beta'\omega$). Les deux sous-unités α permettent l'assemblage de la molécule et lient des facteurs de régulation, la sous-unité β possède l'activité polymérase et β' assure la liaison à l'ADN, la sous-unité ω participe au bon repliement de la structure pentamérique. La reconnaissance spécifique des séquences promotrices par l'ARNP se fait par le biais d'une autre sous-unité : σ . L'association du facteur σ à l'ARNP crée l'holoenzyme (480 kDa) (figure 9), et diminue son affinité générale pour l'ADN, pour augmenter la reconnaissance pour certaines régions promotrices en fonction du facteur σ associé.

I-2-Les facteurs σ

Les facteurs sigma sont des éléments indispensables à l'initiation de la transcription. Leur fixation permet à l'ARNP de reconnaître de façon spécifique une séquence promotrice. Chez *E. coli*, sept facteurs sigma ont été décrits σ^{70} (σ^D), σ^{54} (σ^N), σ^{38} (σ^S), σ^{32} (σ^H), σ^{28} (σ^F), σ^{24} (σ^E) et σ^{18} (σ^{FecI}) (Wosten, 1998), chacun étant requis pour l'expression d'un groupe de gènes spécifiques pour répondre à une condition particulière. Le facteur sigma 70 (σ^{70}) est l'un des plus importants, il équipe l'ARNP pour la reconnaissance de la majorité des promoteurs responsables de l'expression des gènes dits « housekeeping ». Les autres facteurs sigma sont requis pour l'expression de gènes nécessaires lors de : la phase stationnaire (σ^{38}), la croissance en milieu à faible teneur d'azote (σ^{54}), la réponse au choc thermique (σ^{32}), le chimiotactisme (σ^{28}), le repliement de protéines dénaturées (σ^{24}) et le transport de citrate de fer (σ^{FecI}). Les facteurs sigma sont classés dans deux groupes : la famille σ^{70} , pour tous les

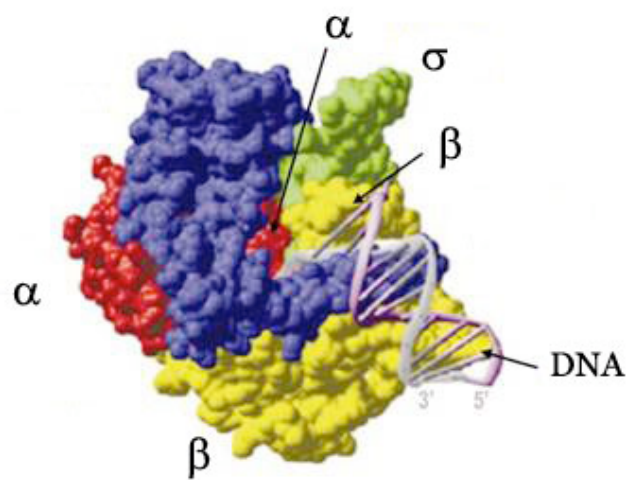


Figure 9 : ARN polymérase sous forme holoenzyme. La sous-unité β est en jaune, la sous-unité β' en violet, les sous-unités α en rouge et la sous-unité σ en vert. (Cheetham, Jeruzalmi et Steitz, 1999)

facteurs sigma structurellement proches de σ^{70} et la famille σ^{54} pour ceux qui sont structurellement différents (Wosten, 1998). Les facteurs de la famille σ^{70} présentent quatre régions conservées, région 1, 2, 3 et 4 (Paget et Helmann, 2003). Seules les régions 2 et 4 sont conservées chez tous les membres de la famille σ^{70} .

Trois éléments du promoteur vont interagir avec les différents domaines du facteur sigma (figure 10). L'élément -10 du promoteur est reconnu par le domaine σ_2 de la sous-unité σ et l'élément -35 par le domaine σ_4 . L'élément -10 étendu est également reconnu, lorsqu'il est présent, mais par la sous-unité σ_3 (Browning et Busby, 2004). Le domaine σ_1 est quant à lui, moins bien conservé et son rôle dans la transcription est peu connu.

Les représentants de la famille σ^{54} sont structurellement et fonctionnellement différents de la famille σ^{70} . Toutes les holoenzymes σ^{54} requièrent la présence d'un activateur pour initier la transcription (Wosten, 1998).

I-3- Les promoteurs bactériens

Un promoteur est une région localisée en amont d'une séquence codante, il constitue un point de contrôle important de la régulation de la transcription des gènes. Les promoteurs sont reconnus de façon spécifique par l'ARNP via le facteur sigma qui leur est associé, ce sont donc des éléments indispensables à l'initiation de la transcription. Un promoteur peut conduire la transcription de plusieurs gènes, comme dans un opéron et réciproquement un seul gène peut être sous la dépendance de plusieurs promoteurs.

L'initiation de la transcription va dépendre de la structure du promoteur et donc des différents éléments qu'il comporte. La portion minimale requise pour initier la transcription de façon adéquate est composée d'un site de démarrage de la transcription et d'un site de fixation de l'ARNP. Le point de démarrage de la transcription est traditionnellement appelé

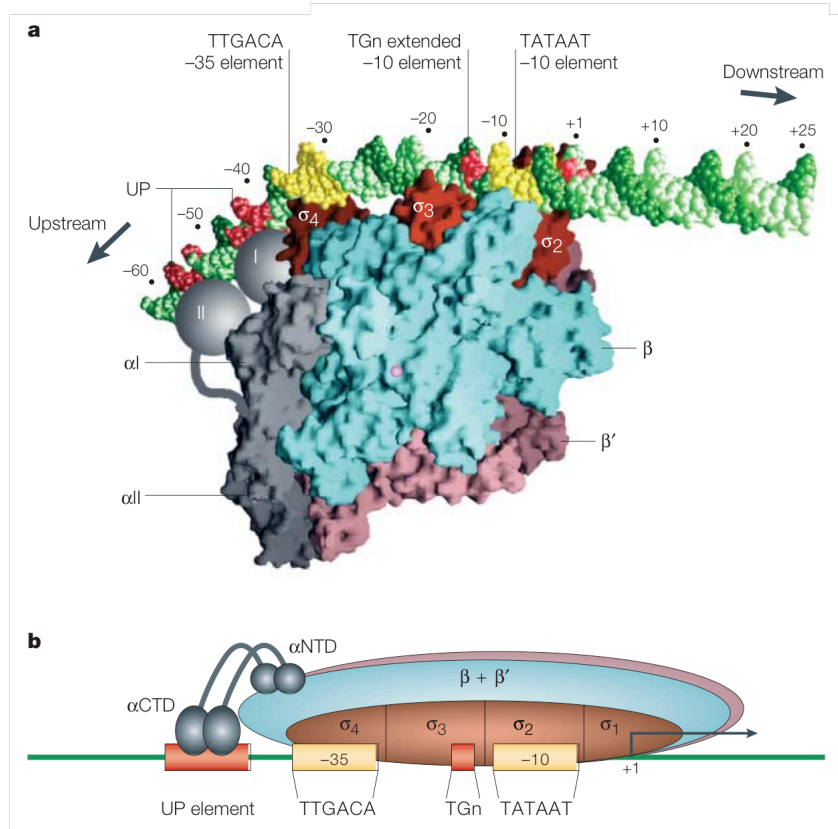


Figure 10 : Interactions entre l'ARN polymérase et le promoteur. A : modèle de fixation de l'ARNP sur l'ADN, d'après une étude cristallographique. Les éléments -35 et -10 sont en jaune et les éléments UP et TGn-10 sont en rouge. B : représentation schématique des interactions entre l'ARNP holoenzyme et les différents éléments du promoteur via les différents domaines du facteur σ 70 et des sous-unités α . (Browning et Busby, 2004)

+1, la numérotation des éléments situés avant le +1 sera négative, et sera positive pour les positions placées après. Typiquement, dans un promoteur, le facteur sigma 70 se lie à des éléments -35 et -10, qui sont des séquences hexanucléotidiques relativement bien conservées de séquence consensus TTGACA à la position -35 et TATAAT à la position -10 (Lisser et Margalit, 1993). Ces deux éléments étant séparés par 17 pb +/-1, cet espacement peut varier de 15 à 21 pb (Hawley et McClure, 1983) mais il est généralement bien conservé, ce qui n'est pas le cas de sa séquence. La force du promoteur sera déterminée en fonction du degré de conservation des éléments -35 et -10 vis-à-vis des séquences consensus. Plus ils sont proches des séquences consensus, plus le promoteur aura une activité transcriptionnelle forte. En plus des éléments -35 et -10, d'autres éléments, en amont du -10 : le motif -10 étendu et en amont du -35 : l'élément UP (upstream) (figure 11), peuvent intervenir dans la reconnaissance du promoteur par l'holoenzyme et donc influencer sur la force du promoteur (Borukhov et Nudler, 2008).

L'élément UP, situé entre les positions -40 et -60, peut augmenter la force d'un promoteur jusqu'à 300 fois, sa séquence consensus est -59 NNAAAWWTWTTTTNAAAANN -38. Le motif -10 étendu consiste en un motif 5'-TGn-3' immédiatement en amont de l'élément -10, ce motif constitue un point de fixation alternatif pour l'ARNP qui peut compenser l'absence d'un élément -35 effectif ou augmenter la force du promoteur (Kumar *et al.*, 1993). Les promoteurs dépendant des autres facteurs sigma présentent des séquences consensus différentes (tableau 2).

I-4- Les étapes de la transcription

Le processus de transcription se déroule en plusieurs étapes : initiation, élongation et terminaison.

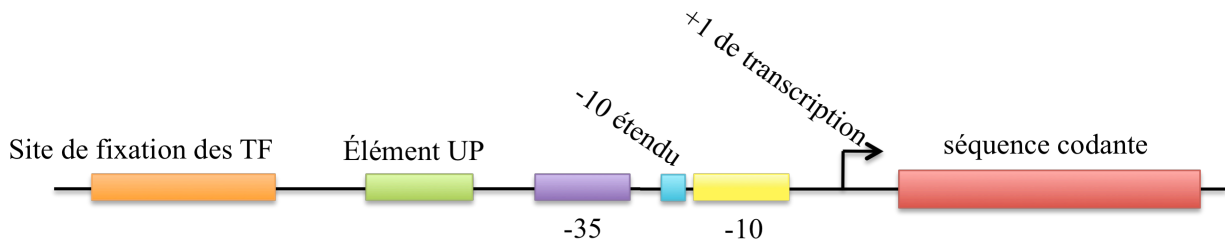


Figure 11 : Structure d'un promoteur procaryote. Un promoteur est une région sur laquelle se fixe transitoirement l'ARN polymérase et des facteurs de transcription (activateurs ou répresseurs) située en amont d'une région codante. Le corps du promoteur est constitué des éléments UP (vert), -35 (violet) et -10 (jaune) qui peut être précédé d'un motif TGn (-10 étendu en bleu). Le +1 de transcription est symbolisé par une flèche. Le site de fixation des facteurs de transcription (TF) (orange) peut chevaucher le corps du promoteur.

Nom	Régulon	Séquence consensus
σ^{70} , RpoD	Fonctions de ménage en phase exponentielle	TTGACA 17 pb TATAAT
σ^{38} , RpoS	Entrée en phase stationnaire et stress	TTGACA 16pb CTATACT
σ^{32} , RpoH	Choc thermique et stress	CCCTTGAA 14pb CCCCATNT
σ^{28} , FliA	Synthèse des flagelles et chimiotactisme	CTAAA 15pb GCCGATAA
σ^{24} , RpoE	Choc thermique extrême et stress extra cytoplasmique	ATTGAACTT 16pb TCTGAT
σ^{19} , FecI	Transport du citrate de fer ou stress extra cytoplasmique	AAGGAAAAT 17pb TCCTTT
σ^{54} , RpoN	Métabolisme de l'azote	CTGGNA 6pb TTGCA

Tableau 2 : Caractéristiques des facteurs sigma d'Escherichia coli. D'après (Wosten, 1998)

Lors de l'étape d'initiation, l'ARNP se lie à l'un des différents facteurs σ pour former l'holoenzyme et ainsi reconnaître et se fixer de façon spécifique à l'un des promoteurs. L'ADN est déroulé et s'ouvre à proximité du +1. L'holoenzyme fixée à l'ADN déroulé ouvert est appelé « complexe ouvert ». L'ARNP peut procéder à la transcription de l'ADN, mais avant l'étape d'élongation, le facteur σ se dissocie de l'enzyme. Les promoteurs bactériens peuvent varier en force et selon leur séquence, l'ARNP aura une affinité différente. Plus la séquence est proche du consensus, plus la fixation de la structure sera forte. De même, des régulateurs peuvent intervenir au stade d'initiation et affecter la stabilité de l'holoenzyme. La terminaison de la transcription peut intervenir de deux façons différentes. La première, implique la présence d'une séquence terminatrice qui va donner un signal « stop » à l'ARNP. Le terminateur est une séquence palindromique menant à la formation d'une structure en « épingle à cheveux » qui va entraîner la dissociation de l'ARNP de la matrice d'ADN. Dans le deuxième mécanisme, un facteur de terminaison va intervenir, il s'agit du facteur ρ . Le facteur ρ est une protéine qui va se fixer à l'ARNm naissant, sur un site dédié. La structure tige-boucle dans la région terminatrice va entraîner l'arrêt de l'ARNP, le facteur ρ « glissant » le long de l'ARNm va atteindre l'ARNP et entraîner sa dissociation de l'ADN et ainsi terminer la transcription.

II- La régulation de la transcription

Les bactéries réagissent aux changements environnementaux en modulant l'expression de leurs gènes. La modulation du niveau d'expression peut se faire via différentes méthodes : voie métabolique, voie traductionnelle ou voie transcriptionnelle. Première étape de l'expression, la transcription est particulièrement soumise à régulation en particulier au stade de l'initiation. Le premier niveau de régulation va intervenir au moment de la fixation plus ou

moins affine de l'ARNP au promoteur via le facteur sigma. En effet, la séquence du promoteur ainsi que la présence des éléments -10 étendu et UP vont être déterminantes pour l'étape d'initiation de la transcription. En plus de ces méthodes générales de régulation de l'expression, la cellule bactérienne peut faire intervenir des facteurs de transcription qui se lient à l'ADN à proximité ou à l'intérieur de la séquence promotrice et vont interagir avec l'ARNP.

II-1- Régulation par des facteurs de transcription

Le génome d'*E.coli* contient près de 300 gènes codant des protéines qui se lient aux promoteurs et régulent positivement ou négativement l'expression des gènes (Madan Babu et Teichmann, 2003). Ces protéines, appelées facteurs de transcription (FT), peuvent réguler de nombreux gènes pour certains alors que d'autres n'en réguleront qu'un seul. Il a été établi que sept FT (CRP, FNR, IHF, Fis, ArcA, NarL et Lrp) contrôlent 50% de tous les gènes régulés (Martinez-Antonio et Collado-Vides, 2003). Les FT peuvent être regroupés en familles sur la base de leur séquence, une douzaine de familles a ainsi été identifiée (Perez-Rueda et Collado-Vides, 2000). Les plus importantes sont : LacI, OmpR, AraC et LysR.

Les facteurs de transcription servent d'intermédiaires entre l'expression des gènes et les signaux environnementaux. Ils subissent également une régulation, soit de leur expression soit de leur activité. Il existe différents mécanismes de contrôle des FT : la modulation de leur affinité pour l'ADN, des modifications covalentes modulant leur activité ou le contrôle de la concentration cellulaire du FT. Ce contrôle étant généralement dépendant d'éléments présents dans l'environnement de la cellule comme les nutriments, les sels, les ions ou autres.

Le FT se liant au promoteur va pouvoir agir soit comme répresseur, soit comme activateur. Certains FT fonctionnent seulement comme activateur ou répresseur alors que d'autres peuvent être activateur ou répresseur en fonction du promoteur ciblé.

II-1a-Mécanismes d'activation

L'activation d'un promoteur est en général le fait d'un seul FT et peut se produire via quatre mécanismes différents (figure 12).

Dans le cas d'une activation de classe I, l'activateur se fixe à son site en amont de l'élément -35 et va interagir avec la sous-unité α de l'ARNP, entraînant la fixation de la sous-unité à la région promotrice et donc une fixation plus affine de l'ARNP (figure 12A). Le promoteur *lac* d'*E.coli* est l'exemple le plus représentatif de promoteur dépendant d'un activateur de classe I (Savery *et al.*, 2002).

Lors d'une activation de classe II, l'activateur se fixe à des séquences à proximité de l'élément -35, quelques bases en amont (figure 12B). Ainsi l'activateur est proche de toutes les sous-unités de l'ARNP, facilitant l'interaction en particulier avec la sous-unité σ ou l'extrémité N-terminale de la sous-unité α (Nickels *et al.*, 2002 ; Rhodius *et al.*, 1997).

Le troisième mécanisme d'activation se produit dans les cas où la fixation du FT entraîne un changement de conformation du promoteur cible permettant son interaction avec l'ARNP. Ce mécanisme requiert la fixation du FT dans le promoteur ou à proximité directe de celui-ci de façon à réorienter les éléments du promoteur de façon optimale pour la fixation de l'ARNP (figure 12C).

Enfin, il peut également exister une activation par modulation d'un répresseur (anti répression) (figure 12D), comme c'est le cas de l'activateur ComK chez *Bacillus subtilis* (Smits *et al.*, 2007).

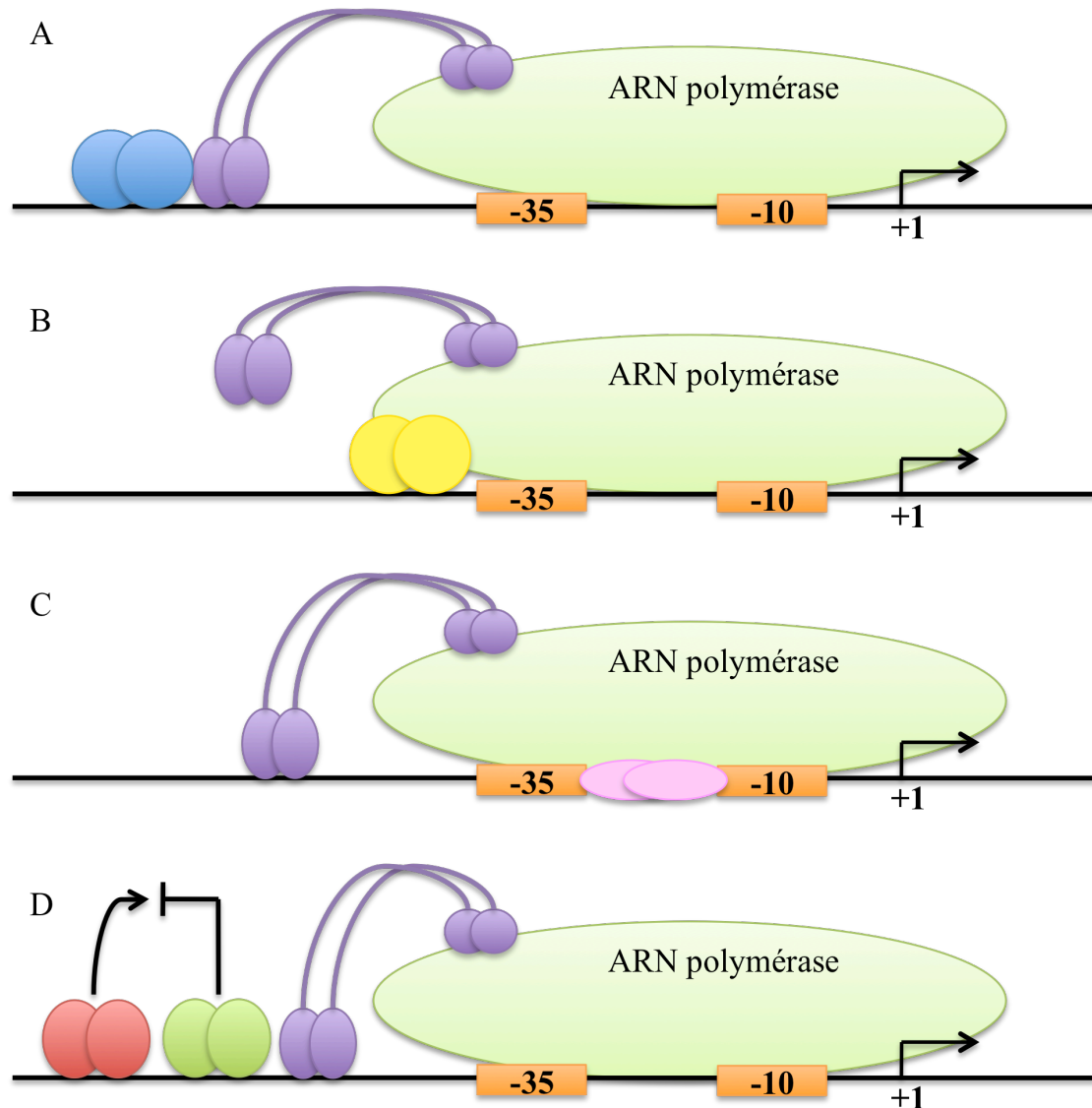


Figure 12 : Les différents mécanismes d'activation d'un promoteur par un facteur de transcription (FT). Les activateurs représentés fonctionnent en dimère comme c'est le cas de nombreux FT.

A. Activation de classe I : l'activateur (dimère bleu) se lie à un site en amont du promoteur et va interagir avec le domaine C-terminal les sous unités α (en violet) de l'ARNP pour en faciliter le recrutement au promoteur.

B. Activation de classe II : l'activateur (dimère jaune) se lie à une cible à proximité de l'élément -35 et va favoriser le recrutement de l'ARNP par des interactions avec le facteur σ .

C. Activation par changement de conformation : l'activateur (dimère rose) lié au promoteur va entraîner le réalignement des éléments -35 et -10 et permettre la fixation de l'ARNP.

D. Activation par modulation d'un répresseur : la fixation de l'activateur (dimère vert) dont le site de fixation est proche de celui du répresseur empêche l'action du répresseur (dimère rouge). D'après (Browning et Busby, 2004)

II-1b- Mécanismes de répression

Un FT répresseur peut inhiber la transcription aux étapes d'initiation ou d'élongation, comme pour l'activation, la répression est en général le fait d'un seul FT et implique quatre mécanismes d'action (figure 13) :

- La fixation d'un répresseur au niveau d'un promoteur va entraîner un encombrement stérique et prévenir la fixation de l'ARNP (figure 13A), comme c'est le cas lors de la fixation du répresseur transcriptionnel LexA impliqué dans la réponse SOS (Quinones *et al.*, 2006).
- Des répresseurs, bien qu'ils soient fixés à des sites éloignés du promoteur, peuvent empêcher la transcription en interagissant entre eux pour former une boucle, masquant ainsi le promoteur (figure 13B). C'est le cas des promoteurs de l'opéron galactose, réprimé par GalR (Irani, Orosz et Adhya, 1983).
- La fixation d'un répresseur au niveau de la séquence codante ou du point de démarrage de la transcription va entraîner l'interruption de l'élongation en bloquant le passage de l'ARNP, c'est le phénomène dit de « roadblock » (figure 13C).
- Enfin, le répresseur peut agir comme un anti-activateur (figure 13D). Dans ce cas, le site de fixation du FT répresseur peut chevaucher le site d'un FT activateur. La liaison du répresseur à son site, va empêcher la fixation de l'activateur à son site. Ce type d'interaction existe au niveau du promoteur deoP2 responsable de l'expression du gène des phosphorylases des purines et pyrimidines. La fixation d'un répresseur CytR va empêcher l'activateur CRP d'activer la transcription et prévient également l'interaction de la sous-unité α de l'ARNP avec l'ADN (Shin *et al.*, 2001).

Il existe des promoteurs qui vont présenter des sites de fixation pour deux FT ou plus qui peuvent être répresseur ou activateur. La multiplicité des FT implique que le promoteur

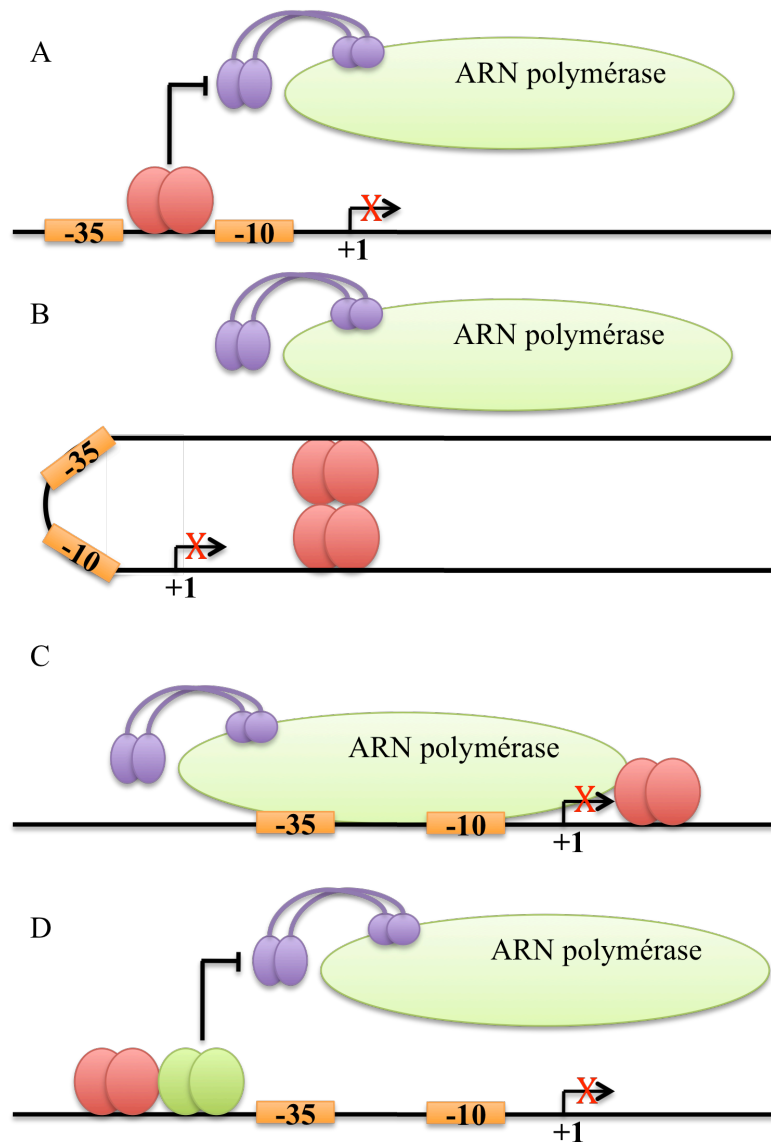


Figure 13 : Les différents mécanismes de répression d'un promoteur par un facteur de transcription.

A. Répression par encombrement stérique : le site de fixation du répresseur (dimère rouge) chevauche le promoteur, lorsque le FT est fixé, il empêche la fixation de l'ARNP.

B. Répression par formation d'une boucle : les répresseurs se fixent à des sites éloignés du promoteur, l'interaction des répresseurs entre eux va entraîner la formation d'une boucle qui va masquer le promoteur.

C. Répression par blocage de l'élongation : le répresseur en se liant au niveau du +1 de transcription ou dans la séquence codante va bloquer la transcription (phénomène de « roadblock »).

D. Répression par modulation d'un activateur : la liaison du répresseur va empêcher un activateur (dimère vert) de fonctionner, bloquant ainsi la reconnaissance du promoteur par l'ARNP. D'après (Browning et Busby, 2004)

soit soumis à plusieurs facteurs environnementaux et donc réponde à plusieurs signaux. Cependant, la réponse à plusieurs signaux requiert un niveau de régulation plus complexe dans lequel les FT vont interagir entre eux et vont avoir un effet synergique ou antagoniste.

II-2- Régulation par des protéines associées au nucléoïde

Le chromosome est lié à un grand nombre de protéines impliquées dans la réparation, la réplication, la protection et le repliement. Les protéines impliquées dans le repliement du chromosome sont appelées protéines du nucléoïde ou protéines « histone-like » par analogie aux histones des eucaryotes (Dorman, 2009). Les protéines « histone-like » ont un rôle crucial dans l'organisation du chromosome bactérien, les plus importantes sont HU, Fis, H-NS, StpA, IHF et Dps (tableau 3) (McLeod et Johnson, 2001 ; Swinger et Rice, 2004). Outre leur rôle de régulateur du sur-enroulement et de la dynamique de la chromatine, certaines protéines du nucléoïde agissent de façon spécifique sur les gènes et donc peuvent être considérées comme des facteurs de transcription globaux (McLeod et Johnson, 2001). En effet, les protéines Fis, H-NS et IHF, qui sont les plus étudiées pour leur implication dans la régulation de la transcription, ont été décrites comme reconnaissant des séquences spécifiques et pouvant avoir des effets d'activation ou de répression (Browning, Cole et Busby, 2008) (tableau 3).

II-2a- Mécanisme de régulation transcriptionnelle par Fis, H-NS, IHF

Fis est la protéine associée au nucléoïde la mieux caractérisée en ce qui concerne la régulation transcriptionnelle. Fis peut avoir un effet activateur de la transcription, comme c'est le cas au niveau des promoteurs des ARN ribosomaux où il facilite le recrutement de l'ARNP au promoteur par liaison avec la sous-unité α (Aiyar *et al.*, 2002). Cependant, Fis

Nom	Site de fixation	Expression	Autre fonction
Fis: Factor for inversion stimulation	KNNYRNNWNNYRNNM	Phase exponentielle	Recombinaison et répllication de l'ADN
HU: Histone like protein from E. coli strain U93	ADN super enroulé, distorsions de l'ADN	Phase exponentielle	Recombinaison et répllication de l'ADN
IHF: Integration Host Factor	WATCAANNNTTR	Phase stationnaire	Recombinaison et répllication de l'ADN
H-NS: Histone-like Nucleoid Structuring protein	ADN courbé	Phase exponentielle Phase stationnaire	Recombinaison site spécifique
Dps: DNA protection during starvation protein	Non spécifique	Phase stationnaire	Protection de l'ADN durant le stress oxydatif
StpA: Suppression of td- phenotype	ADN courbé	Phase exponentielle	Protéine chaperonne des ARN

Tableau 3 : Caractéristiques des principales protéines associées au nucléoïde.

$K = G$ ou T , $Y = C$ ou T , $R = A$ ou G , $W = A$ ou T , $M = A$ ou C , $N = A, T, C$ ou G

D'après (McLeod et Johnson, 2001) (Dorman, 2009) (Luijsterburg et al., 2006)

peut également agir comme répresseur, tel que pour le promoteur du gène *dps* de *E. coli*, sa fixation au niveau du corps du promoteur va empêcher son ouverture par l'ARNP (Grainger *et al.*, 2008). Comme détaillé ci-dessus pour Fis, la régulation de la transcription se fait souvent par interaction directe avec la machinerie transcriptionnelle, cependant ce type d'interaction n'est pas toujours nécessaire. C'est le cas avec IHF qui est une protéine qui va agir sur la transcription en se fixant à des cibles éloignées du promoteur. Comme Fis, IHF peut avoir un rôle d'activateur ou de répresseur. Par exemple pour l'opéron *ilvGMEDA*, IHF se lie à un site situé 92 pb en amont du site d'initiation de la transcription, la fixation d'IHF va entraîner une distorsion de l'ADN et favoriser la formation du complexe ouvert par l'ARN polymérase (Parekh et Hatfield, 1996). Pour *nirB*, IHF en se fixant à la position -88 va interférer avec l'activateur FNR et en empêcher l'action, il va ainsi agir comme « anti-activateur » (Browning, Cole et Busby, 2000). Alors que Fis et IHF peuvent être soit activateur soit répresseur, H-NS ne fonctionne qu'en tant que répresseur. H-NS peut stabiliser la formation d'une boucle d'ADN au niveau du promoteur, ayant pour effet la capture de l'ARNP, comme pour le promoteur de *hdeA* (Shin *et al.*, 2005) ou simplement prévenir la fixation de l'ARNP comme pour *proV* (Nagarajavel *et al.*, 2007).

Ces protéines ont donc des rôles essentiels tant d'un point de vue compaction qu'expression du matériel génétique.

II-3- Régulation par interférence transcriptionnelle

Outre les effets entraînés par des acteurs se fixant au niveau des régions promotrices, l'organisation même des promoteurs peut être à l'origine d'une régulation transcriptionnelle. L'interférence transcriptionnelle (IT) est définie comme l'influence négative d'un processus transcriptionnel, de façon directe et en *cis*, sur un second processus (Shearwin, Callen et

Egan, 2005). Il s'agit d'un phénomène souvent asymétrique résultant de l'existence de deux promoteurs proches, l'un subissant l'influence négative d'un autre de force plus importante. L'interférence transcriptionnelle peut être le résultat de l'arrangement particulier de promoteurs (figure 14).

II-3a- Configurations donnant lieu à une interférence transcriptionnelle

Les promoteurs dont les +1 de transcription sont séparés de moins de 200 pb sont susceptibles d'interagir entre eux. De plus, on considère que lorsque cet espacement est inférieur à 40 pb les promoteurs sont alors chevauchants.

- Promoteurs convergents (figure 14A):

Les promoteurs convergents se font face et sont séparés par moins de 200 pb. Sur les 4462 promoteurs prédits chez *E. coli*, il existe 54 promoteurs présentant cette configuration. Les promoteurs pR et pL, régissant l'entrée en cycle lytique ou lysogénique du coliphage 186, sont des promoteurs convergents. Le promoteur pR, 10 fois plus fort que pL, réduit l'activité transcriptionnelle de pL et maintient un état lysogénique stable (Callen, Shearwin et Egan, 2004).

- Promoteurs en tandem (figure 14B) :

Des promoteurs induisant un processus transcriptionnel de même direction et ayant des +1 de transcription séparés par moins de 200 pb sont dits en tandem. 166 promoteurs non chevauchants en tandem ont été identifiés chez *E. coli*. Cette organisation ne donne pas toujours lieu à une interférence transcriptionnelle telle que la définit Shearwin et coll.. En effet, dans de nombreux cas, les promoteurs en tandem vont participer ensemble au processus transcriptionnel d'un même gène, ou de façon complémentaire comme c'est le cas des

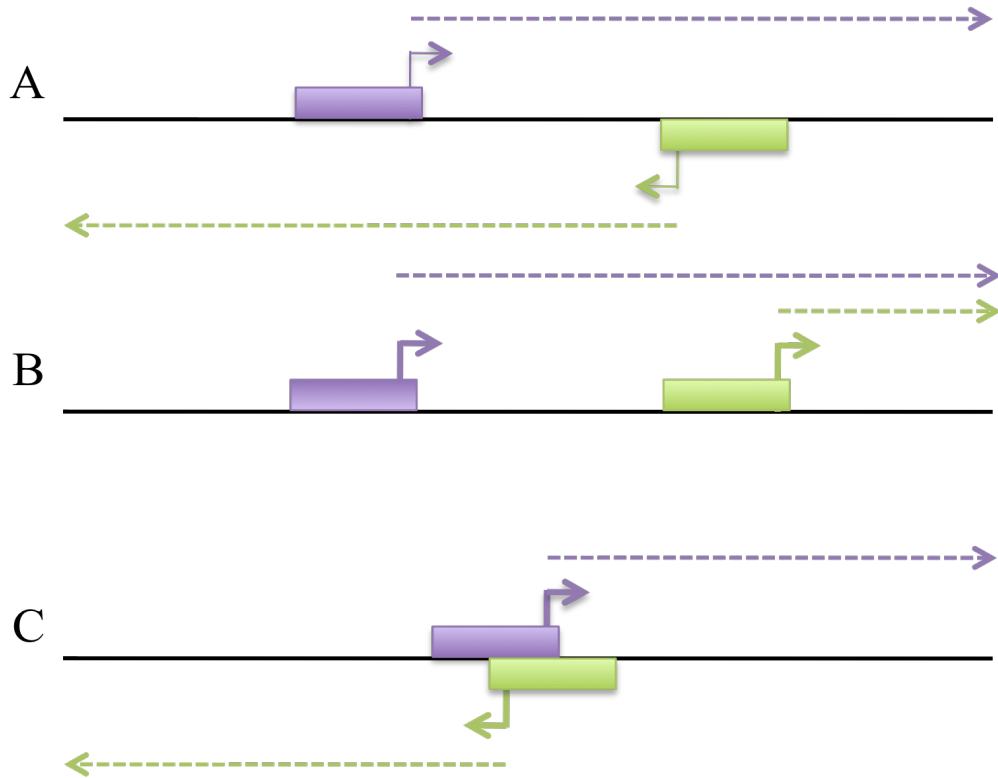


Figure 14 : *Arrangements de promoteurs donnant lieu à une interférence transcriptionnelle. A : promoteurs convergents, B : promoteurs en tandem, C : promoteurs chevauchants (divergents). Les sites de fixations de l'ARN polymérase sont représentés par des rectangles de couleur, et les +1 de transcription sont symbolisés par des flèches cassées. D'après (Shearwin, Callen et Egan, 2005).*

promoteurs permettant l'expression des ARNr. En effet les deux promoteurs P1 et P2 sont actifs, P1 permet l'expression des ARNr en phase exponentielle et P2 assure une expression minimale nécessaire durant la phase stationnaire ou durant les passages dans des milieux plus riches, ce qui permet de maintenir un niveau d'expression suffisant jusqu'à ce que le promoteur P1 redevienne actif (Murray et Gourse, 2004). De nombreux promoteurs en tandem fonctionnent sur le même modèle et font donc l'objet d'une régulation par des éléments venant se fixer la région promotrice (FT, facteurs sigma alternatifs ou autre).

- Promoteurs chevauchants (figure 14C) :

Des promoteurs sont dits chevauchants lorsque leurs +1 de transcription sont séparés par moins de 40 pb. Ces promoteurs peuvent être convergents, en tandem ou divergents et représentent 9,7% des promoteurs d'*E. coli*. Une telle configuration peut entraîner une compétition entre les promoteurs pour la fixation de l'ARNP. C'est le cas du gène *aroP* codant la perméase responsable du transport des acides aminés aromatiques, celui-ci est transcrit par le promoteur P1 chevauchant avec un promoteur P3 divergent. L'ARNP ne se fixe au P3 qu'en présence d'acides aminés aromatiques réduisant ainsi l'activité de P1, ce système fournit un contrôle par « feedback », l'accumulation d'acides aminés aromatiques dans la cellule va ainsi bloquer leur transport via une régulation de l'expression de la perméase (Wang *et al.*, 1998).

II-3b- Mécanismes d'interférence transcriptionnelle

Bien que le phénomène d'interférence transcriptionnelle soit largement documenté, peu d'études se sont attachées à en étudier les mécanismes de fonctionnement. Cependant, quelques mécanismes ont été décrits (figure 15).

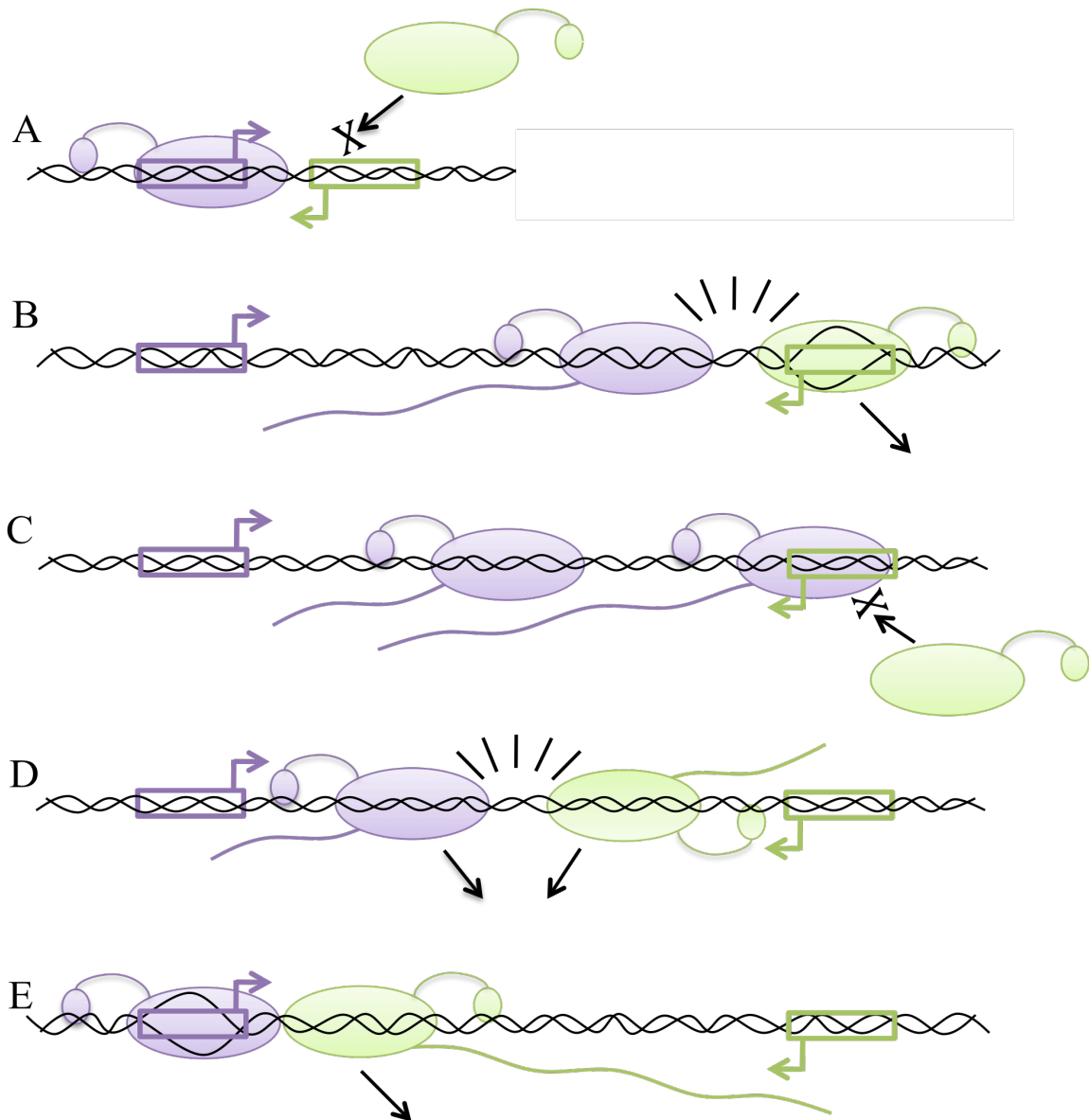


Figure 15 : Mécanismes d'interférence transcriptionnelle.

Les cinq mécanismes par lesquels il peut y avoir interférence transcriptionnelle sont :

A : Compétition entre promoteurs ; B : Interférence de type « sitting duck » ; C : Occlusion d'un promoteur ; D : Collision de complexe en élongation ; E : « Roadblock ». Les exemples présentés montrent des promoteurs convergents, les ARN polymérases sont de la même couleur que le promoteur qui les a recrutées, les promoteurs étant symbolisés par des encadrés de couleur (violet ou vert) et leur +1 de transcription représenté par une flèche cassée. L'ARN synthétisé est montré par un trait de la couleur correspondant au promoteur contrôlant l'expression. Les flèches noires dirigées vers le bas indiquent un détachement de l'ARNP et une terminaison précoce de la transcription. Une croix noire indique l'empêchement de la fixation de l'ARNP. Pour les promoteurs en tandem, tous les mécanismes peuvent s'appliquer excepté le D. D'après (Shearwin, Callen et Egan, 2005).

- Compétition entre promoteurs (figure 15A):

Une interférence transcriptionnelle peut avoir lieu lorsque l'occupation d'un promoteur par l'ARN polymérase empêche la fixation d'un deuxième complexe sur un promoteur physiquement très proche. Ainsi l'inhibition de la fixation de l'ARNP sur le premier promoteur va permettre l'induction du second. Ce type d'interférence est fréquent pour les promoteurs chevauchants du fait de la faible distance qui les séparent.

- Interférence « sitting duck » (figure 15B):

Des promoteurs de force différente, n'envoient pas des complexes en élongation à la même fréquence. Au niveau d'un promoteur de faible activité l'ARNP va mettre du temps à partir en élongation, ce complexe constituant ainsi une « cible facile » pourrait être délogé par un complexe en élongation provenant du promoteur (convergent ou en tandem) en amont. Ce mécanisme a été proposé pour expliquer l'interaction des promoteurs pL et pR du coliphage 186 (Callen, Shearwin et Egan, 2004).

- Occlusion (figure 15C):

Contrairement à un promoteur de faible activité, un promoteur fort va permettre la formation de complexe transcriptionnel à une fréquence importante. La fréquence de passage des complexes en élongation au niveau d'un second promoteur ne laisserait que peu de temps à celui-ci pour fixer à son tour une ARNP. Cependant, le temps de transit de l'ARNP sur un promoteur reste très court (2 à 3 secondes), ce type d'interférence ne réduirait donc pas de façon drastique l'activité d'un promoteur. L'interférence pourrait également être due en partie à un mécanisme de « sitting duck ». Une interférence par occlusion va dépendre de la force des promoteurs du système et de la vitesse de transcription au niveau du promoteur le plus faible.

- Collisions (figure 15D) :

Le phénomène de collision va se produire lorsque deux complexes en élongation, en provenance de deux promoteurs convergents, vont « entrer en collision », mutuellement se déstabiliser et entraîner une interruption prématurée de la transcription. Les collisions peuvent entraîner l'arrêt des ARNP, les deux complexes arrêtent la transcription, cependant cet arrêt n'est pas toujours définitif et l'un ou l'autre des complexes pourrait reprendre la transcription (Crampton *et al.*, 2006).

- « Roadblock » (figure 15E) :

Théoriquement, un complexe ouvert au niveau d'un promoteur pourrait empêcher la progression de l'ARNP en provenance d'un autre promoteur. Il est concevable que des complexes ouverts soient fixés suffisamment fortement pour « bloquer la route » de l'ARNP plutôt que d'agir comme « sitting duck » (Callen, Shearwin et Egan, 2004).

Outre les interactions entre complexes transcriptionnels, des interactions de type ARN/ARN peuvent avoir lieu. En effet, des promoteurs convergents génèrent des ARN antiparallèles, ou ARN antisens, qui peuvent s'apparier. Il a été montré que les interactions de type ARN antisens pouvaient inhiber l'expression d'un gène, soit en masquant la région d'initiation de la traduction aux ribosomes (Arthur *et al.*, 2003), soit par dégradation du duplexe ARN/ARN formé par la RNase III (Silvaggi, Perkins et Losick, 2005).

L'interférence transcriptionnelle est observée dans une grande variété d'organismes, les nombreux exemples décrits ont permis d'en déduire des mécanismes de fonctionnement, cependant le détail de certains de ces mécanismes reste à élucider.

II-4- Stress et régulation de la transcription

Les bactéries survivent et se développent grâce à des échanges avec le milieu extérieur. Une perturbation survenant dans leur environnement va rompre un équilibre qui va se traduire par un stress cellulaire. Face à ces stress, les bactéries peuvent répondre selon différentes stratégies : fuir le stress (flagelles), produire des facteurs de virulence (toxines), former des spores résistantes (*Clostridium*, *Bacillus*), se développer sous une forme différente (biofilm), éliminer le stress (dégradation de l'agent déclencheur) ou tolérer le stress (réparation, adaptation). La mise en œuvre de ces mécanismes de réponse exige l'existence de régulation d'expression de gènes en réponse à un signal environnemental. De tels réseaux existent et sont organisés de façon à exprimer un panel de gènes en réponse à un stress donné : cependant ces réseaux se chevauchent largement.

Par exemple, la privation de nutriments, notamment la carence en acides aminés va mener à la production d'une « alarmone » la guanosine 3'-5'biphosphate (ppGpp). Cette molécule va altérer la sélection du promoteur par l'ARNP, certains gènes seront alors silencieux, d'autres exprimés. ppGpp favorise également RpoS et RpoH par rapport à RpoD ($\sigma 70$) pour la fixation à l'ARN polymérase, entraînant des réponses type de stress général et de choc thermique qui sont contrôlées par les facteurs sigma alternatifs, $\sigma 38$ (Hengge-Aronis, 2002) et $\sigma 32$ (Yura, Kanemori et Morita, 2000) respectivement.

Les signaux de stress sont variables, l'un des plus retrouvés est la détérioration du matériel génétique de la bactérie qui va induire un vaste réseau de régulation capable de répondre aux stress qui l'ont généré : la réponse SOS.

CHAPITRE III – La réponse SOS

I- Historique

Après avoir découvert que les gènes étaient composés d'ADN, de nombreuses études ont été menées pour explorer les propriétés de l'ADN. La majorité des expérimentations ont été réalisées sur des bactéries ou des bactériophages, lesquels ont été traités par divers agents comme la lumière ultra-violette (UV) ou la mitomycine C. Un nombre important de données ont été recueillies suite aux expérimentations d'irradiation par la lumière UV.

En 1953, Jean Weigle a observé que l'irradiation UV d'*E. coli* avant infection par des bactériophages λ eux-mêmes irradiés résultait en un accroissement de la survie des bactériophages λ (Weigle, 1953). Cette capacité induite à « réactiver » des phages endommagés est appelée réactivation de Weigle. De plus, la majeure partie des bactériophages réactivés était composée de bactériophages mutants, le phénomène de mutagenèse après exposition à des agents endommageant l'ADN est aujourd'hui appelé mutagenèse de Weigle.

Il a également été observé que l'irradiation par la lumière UV de bactéries lysogènes entraînait l'induction du prophage en cycle lytique, la lyse des bactéries et donc la production de bactériophages (Borek et Ryan, 1958).

Après exposition d'*E. coli* à la lumière UV, EM. Witkin observe une croissance en filament des bactéries, les bactéries continuent leur croissance mais ne sont plus capables de se diviser, ce qui résulte en la formation de longs filaments. Observation qui mène à l'hypothèse d'une relation entre arrêt de la division, l'induction de prophage λ et l'induction de mutation ; et ainsi à la première description du possible fonctionnement de la réponse SOS (Witkin, 1967).

Trois ans après, l'ensemble de ces données ont mené Miroslav Radman à conclure que chez *E. coli* il existait un système de réparation de l'ADN, système dépendant des protéines LexA et RecA, qu'il était induit lorsque l'ADN était endommagé et sa synthèse arrêtée et que l'induction de ce système entraînait des mutations. Cette première description fit l'objet d'une lettre non publiée envoyée à plusieurs chercheurs en 1970. C'est dans cette lettre que fut pour la première fois utilisée l'appellation « SOS » en référence au message utilisé par les navires en perdition « Save-Our-Souls » (Bridges, 2005). La description du système SOS n'a été publiée que en 1974 dans un livre (Prakash *et al.*, 1974) puis en 1975 dans un journal scientifique (Radman, 1975). Depuis la réponse SOS fait toujours l'objet de nombreuses études.

II- Le modèle SOS

La régulation de l'expression du matériel génétique en réponse aux changements environnementaux est essentielle pour la survie cellulaire. Le modèle SOS proposé par Miroslav Radman est un mécanisme de réponse permettant l'adaptation et l'évolution de la bactérie quand les conditions l'exigent.

Dans des bactéries n'étant pas exposées à des agents entraînant des dommages à l'ADN, la protéine LexA codée par le gène *lexA* (locus for X-ray sensitivity A) va agir comme répresseur de l'expression d'environ 50 gènes (Wade *et al.*, 2005). LexA va se fixer sous forme d'un homodimère à un opérateur au niveau de gènes ou d'opérons (figure 16A). Le site de fixation de la protéine LexA appelé « LexA box » est un motif palindromique de 16 pb situé dans la région promotrice des gènes. Ce motif, de consensus 5'-CTGTATATATACAG-3' chez *E. coli*, est typiquement situé à proximité du site de fixation de l'ARNP, de telle façon que la fixation du dimère LexA va interférer physiquement

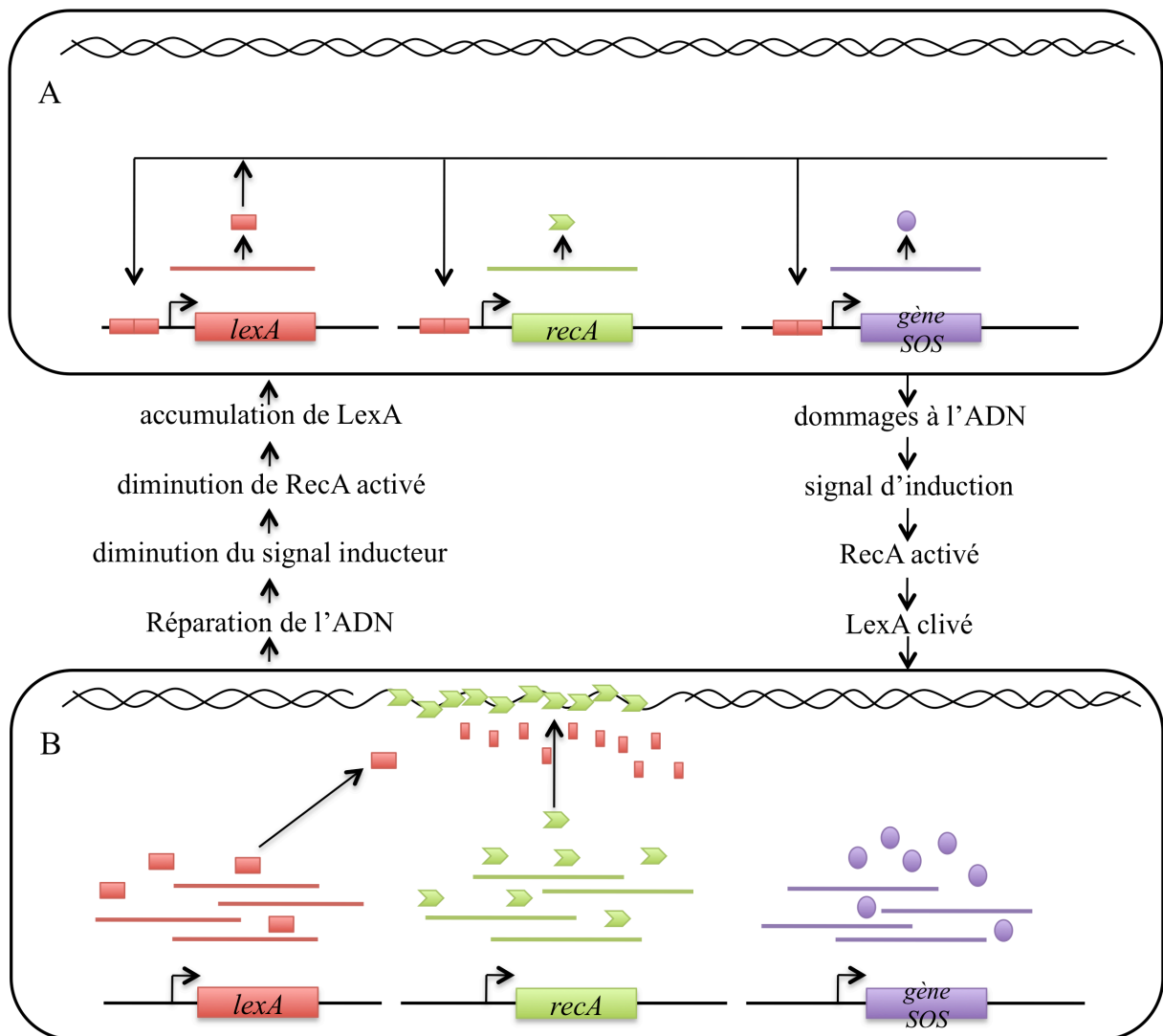


Figure 16 : Représentation du mécanisme de régulation du régulon SOS

A. Etat non induit : la bactérie ne subit aucun dommage (ADN intact) LexA réprime l'expression des gènes du régulon SOS. Ces gènes expriment un faible taux de protéines, de cette façon RecA est présent de façon constitutive dans la bactérie non induite. B. Etat induit : après la formation d'ADN endommagé (ADNsb), l'activité co-protéase de RecA est activée par liaison à l'ADN simple brin. L'interaction avec la protéine LexA conduit à l'auto-protéolyse de LexA l'empêchant ainsi d'exercer son rôle de répresseur. Les gènes qui étaient sous contrôle de LexA sont dérèprimés, cependant leur cinétique d'expression peut ne pas être la même certains gènes étant plus fortement réprimés que d'autres. Quand le signal inducteur disparaît (réparation des lésions de l'ADN), le taux de RecA décroît, LexA s'accumule et rétablit la répression sur les gènes SOS. D'après (Friedberg et al., 2006)

avec le complexe transcriptionnel (cf. mécanismes de répression de la transcription). De cette manière, les gènes du régulon SOS sont réprimés, cependant quelques-uns de ces gènes comme *recA* et *lexA* ont un niveau d'expression significatif même en étant réprimés. En effet, *recA* et *lexA* doivent être suffisamment exprimés de manière à assurer leur rôle, pour LexA réprimer les gènes du régulon SOS et pour RecA, initier la réponse SOS au moment opportun.

Quand le génome de la bactérie est endommagé ou que la réplication de l'ADN est arrêtée, un signal intracellulaire pour l'induction de la réponse est initié. Ce signal est généré par la présence d'ADN simple brin (ADNsb) produit lors de dégradation d'ADN ou de l'arrêt de la réplication (figure 16B). La fixation de la protéine RecA à ces régions d'ADNsb résulte en la formation d'un filament nucléo-protéique RecA-ADNsb. La protéine RecA ainsi activée va entraîner le clivage de la protéine LexA, ce clivage protéolytique résulte de la capacité de RecA-ADNsb à activer une fonction d'auto-clivage latente de LexA. Cette auto-protéolyse se fait par hydrolyse de la liaison peptidique entre les résidus Ala84 et Gly85, situés au milieu de la protéine. Il est intéressant de noter que le filament RecA-ADNsb va interagir de la même manière avec d'autres protéines structurellement proches de LexA, comme le répresseur du phage λ ou la protéine UmuD (voir chapitre LexA ou RecA) et entraîner leur clivage. LexA ainsi clivé perd sa propriété de répresseur et le prédispose à une dégradation, le pool de LexA fonctionnel va donc commencer à diminuer. Certains gènes, y compris *recA* sont dérèprimés et donc pleinement exprimés. Cependant, la levée de la répression ne se fait pas au même moment pour tous les gènes. En effet, les gènes qui ont un opérateur fixant LexA faiblement, vont être dérèprimés les premiers, alors que les gènes avec des opérateurs fixant LexA fortement ne seront pleinement induits que plus tard quand le taux de LexA arrivera à un niveau très bas. Ce système permet de faire agir chaque acteur de la réponse SOS au moment opportun et de manière proportionnelle aux dommages subis. A mesure que la cellule se remet du traitement induisant la réponse SOS, et que les régions d'ADNsb disparaissent suite

à la mise en œuvre de systèmes de réparation, le taux de filaments RecA-ADNsb décline également. La synthèse continue de LexA va mener à la constitution d'un taux de protéine LexA suffisant pour rétablir la répression des gènes SOS, signant la fin de la réponse SOS.

III- La protéine LexA

Le gène *lexA* d'*E. coli* code une protéine de 202 acides aminés qui se structure en deux domaines distincts reliés par une région « charnière » flexible (figure 17A). La protéine LexA se dimérise via son domaine carboxy-terminal (CTD) (Luo *et al.*, 2001) et se fixe à l'ADN via un motif hélice-tour-hélice dans son domaine amino-terminal (NTD) (figure 17B) (Schnarr *et al.*, 1988).

Les hélices II et III du NTD forment le motif hélice-tour-hélice permettant l'interaction avec l'ADN (H2 et H3 figure 17). Les études ont montré que la région entre le NTD et le CTD engendrait un changement de conformation des NTD sous forme dimérique, telle que 1 paire de bases supplémentaire dans le motif de liaison à l'ADN ne permettrait pas la fixation de LexA (Oertel-Buchheit *et al.*, 1993).

Le CTD de LexA est composé de feuilletts β fournissant les éléments pour l'oligomérisation et l'activité latente d'autoclivage (Luo *et al.*, 2001). Les résidus Ser119 et Lys156 sont les positions clefs du site catalytique de l'activité de clivage (Slilaty et Little, 1987). Le site de clivage de la protéine LexA se situe entre les résidus Ala84 et Gly85 localisés sur une boucle pouvant changer de conformation. Dans une des conformations, la boucle se situe à proximité du site catalytique, alors que dans la deuxième conformation elle en est éloignée (Giese, Michalowski et Little, 2008). L'interaction avec la protéine RecA se fait de façon préférentielle avec la conformation « clivable » et la stabilise, de façon à faciliter l'autoprotéolyse de LexA.

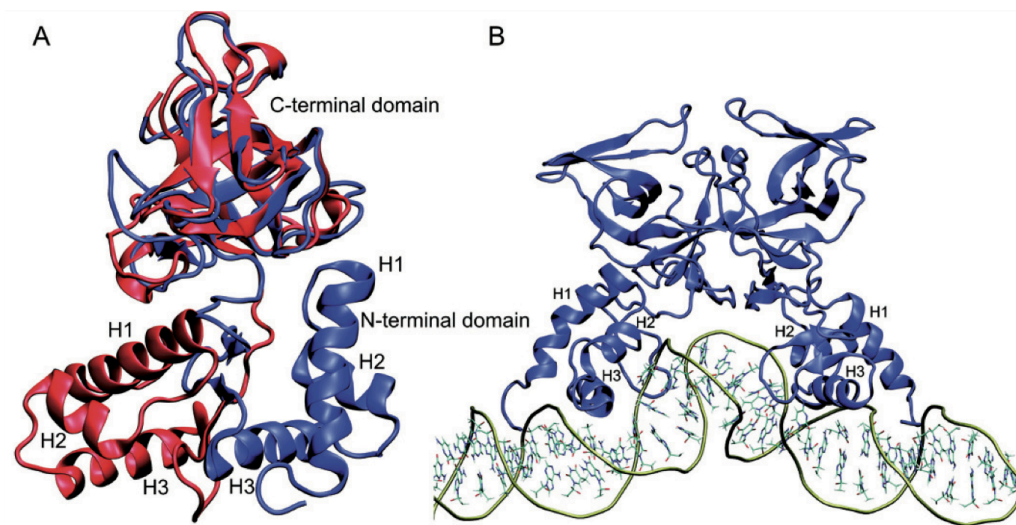


Figure 17 : Structure et conformations de la protéine LexA

Les structures libre et fixée de LexA ont été obtenues par spectrophotométrie de masse, A : LexA sous forme monomérique libre (en rouge) et le changement de conformation entraîné par sa fixation à l'ADN (en bleu). B : Modèle du répresseur LexA dimérique fixé à la région régulatrice d'un gène. La dimérisation se fait par interaction entre domaines C-term, la fixation à l'ADN via le domaine N-term. D'après (Butala, Zgur-Bertok et Busby, 2009)

Chez *E. coli* il y a environ 1300 molécules de LexA et seulement 20% des protéines sont libres, non liées à l'ADN. Il semble que LexA soit essentiellement présent sous forme dimérique, le taux de monomère étant très faible, ce qui tendrait à confirmer que LexA reconnaît son site de fixation sous forme dimérique (Mohana-Borges *et al.*, 2000). Les « LexA box » comportent deux éléments inversés qui vont assurer la fixation de chacun des monomères de LexA, et la fixation de LexA à l'ADN entraîne une augmentation (1000 fois) de la stabilité du dimère (Mohana-Borges *et al.*, 2000).

La protéine LexA est capable de s'oligomériser (tétramères ou plus) et la formation de ces agrégats diminue la quantité de dimères libres et donc pourrait jouer un rôle régulateur, RecA-indépendant. En effet, l'oligomérisation de certains répresseurs, comme c'est le cas pour le répresseur LacI de l'opéron lactose, va moduler la répression qu'il exerce (Chakerian et Matthews, 1992). Il semble que ce mécanisme d'oligomérisation de LexA se produise dans des conditions de pH bas. A un pH de 4, LexA forme des tétramères et des oligomères plus importants, résultant en une chute de la concentration de dimères qui peuvent se fixer à l'ADN et donc une diminution des possibilités de réprimer les gènes SOS. Ce mécanisme pourrait avoir un rôle dans la survie de la bactérie dans des conditions acides (Sousa *et al.*, 2006).

IV- La protéine RecA

La protéine RecA fait partie des protéines qui sont capables de coupler la fixation et l'hydrolyse de l'ATP à une action mécanique. Elle est constituée d'une chaîne polypeptidique de 352 acides aminés (38kDa) dont la structure a été élucidée en 1992 par Story et Steitz (Story et Steitz, 1992). La structure du monomère s'organise en trois domaines (figure 18), un large domaine qui constitue « le cœur » de la protéine et deux petits domaines aux extrémités

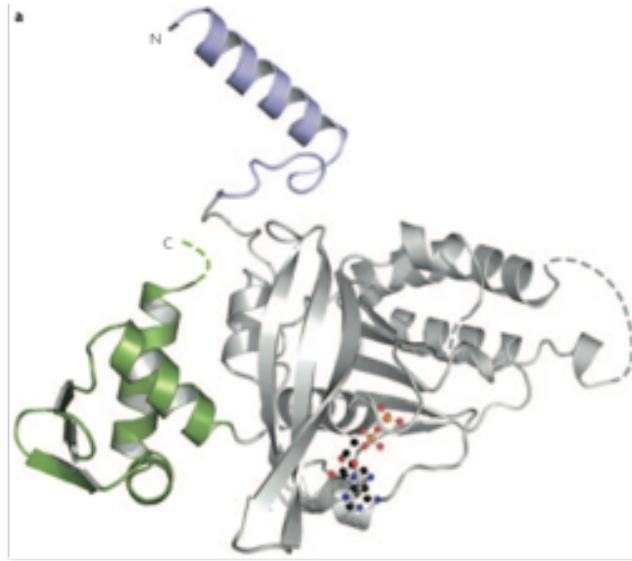


Figure 18 : Structure de la protéine RecA. En gris le domaine cœur de la protéine (avec un ATP fixé). En vert le domaine carboxy-terminal (CTD) et en violet le domaine amino-terminal (NTD). (Cox, 2007)

N- et C- terminales. Le domaine cœur de RecA contient le site de fixation de l'ATP, il est commun à de nombreuses autres protéines de la même famille, telles que des hélicases, des protéines de transports d'ADN et d'autres transporteurs (Egelman, 2000 ; Yu et Egelman, 1997). Le site de fixation de l'ATP est localisé au centre du filament, c'est également le cas de deux boucles qui constituent le site de fixation de l'ADNsb (Malkov et Camerini-Otero, 1995). Le NTD permet d'établir le contact avec la protéine RecA adjacente lors de formation du filament. Le CTD se localise à l'extérieur du filament et possède un site de fixation pour l'ADN double brin (Aihara *et al.*, 1997).

La protéine RecA de *E. coli* possède trois rôles très différents dans la cellule. Premièrement, RecA a un rôle central dans la recombinaison, permettant l'échange de brins entre deux molécules d'ADN (Cox, 2007). Deuxièmement, RecA exerce une fonction de régulateur, son activité co-protéase permettant la lyse de LexA et donc l'induction de la réponse SOS. Troisièmement, RecA facilite le passage des lésions de l'ADN par l'ADN polymérase V pendant la réponse SOS (Schlacher *et al.*, 2005). L'activation de la protéine RecA se fait via l'interaction avec l'ATP et l'ADN sous forme d'un filament nucléoprotéique. Des protéines peuvent venir aider la formation du filament, comme les protéines RecF, RecO et RecR (RecFOR) ou bien le stabiliser comme la protéine DinI (Cox, 2007). Quand la fonction assurée par RecA n'est plus nécessaire, le filament peut être dissocié par des hélicases, telles que UvrD.

V- Facteurs d'induction de la réponse SOS

Dans un premier temps, la réponse SOS a été identifiée et étudiée chez des bactéries traitées par un rayonnement UV. La réponse SOS a ensuite été liée à d'autres agents endommageant l'ADN, comme la mitomycine C. Depuis, les études de la réponse SOS se

multipliant, plusieurs procédés d'induction interne ou externe sont venus grossir la liste des inducteurs de la réponse SOS (figure 19).

Ainsi, il a été montré qu'il existait une induction de la réponse SOS par augmentation de la concentration cellulaire d'AMPc dans des bactéries privées de nutriments ou utilisant des sources de carbone particulières (Janion *et al.*, 2002 ; Taddei, Matic et Radman, 1995). Les agents alkylants, qu'ils soient endogènes ou exogènes sont connus pour induire des dommages à l'ADN et donc pour induire la réponse SOS (Volkert, Gately et Hajec, 1989). L'étude de mutants dans lesquels la réponse SOS est constitutive a mené à l'identification de 42 gènes dont l'inactivation entraîne l'induction de la réponse SOS (O'Reilly et Kreuzer, 2004). Parmi ces gènes on trouve des gènes comme *lexA* du fait de son implication directe dans la réponse SOS mais aussi des gènes impliqués dans les voies de réplication, réparation, transcription ou métabolisme, l'absence de leur produit conduisant à une instabilité génomique (O'Reilly et Kreuzer, 2004). Les agressions environnementales peuvent également donner lieu à une induction de la réponse SOS, comme le stress oxydatif (Imlay et Linn, 1987), l'exposition aux chromates (polluants) (Ackerley *et al.*, 2006), l'exposition aux ultrasons (Vollmer *et al.*, 1998) ou encore l'exposition à des fortes pressions via l'activation de Mrr, une endonucléase (Aertsen et Michiels, 2005). L'acidité du milieu va également mener à l'activation de la réponse SOS par oligomérisation de LexA le rendant inapte à la fixation de l'ADN (Sousa *et al.*, 2006).

L'induction de la réponse SOS par certains antibiotiques suscite également un grand intérêt. En effet certains antibiotiques sont connus pour induire la réponse SOS de façon plus ou moins directe (Kelley, 2006). Les quinolones agissant sur les topoisomérases IV vont induire des cassures de la molécule d'ADN et ainsi déclencher la réponse SOS (Drlica et Zhao, 1997). Le triméthoprime en inhibant la synthèse des folates va induire une diminution de la synthèse des bases azotées et à terme bloquer la réplication de l'ADN formant le signal

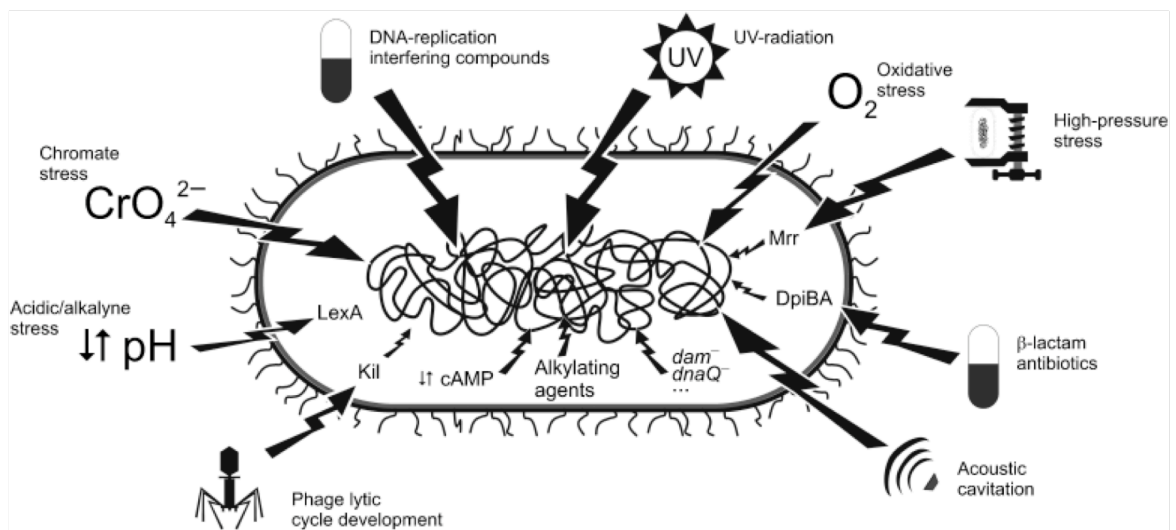


Figure 19 : Stress induisant la réponse SOS. L'induction peut se faire de façon directe ou indirecte, dans ce cas les intermédiaires sont indiqués (Erill, Campoy et Barbe, 2007).

inducteur de la réponse SOS (Lewin et Amyes, 1991). Les bêta-lactamines qui agissent sur la synthèse de la paroi bactérienne vont induire la réponse SOS de façon indirecte via la protéine DpiA qui en se fixant à l'ADN va interrompre la réplication (Miller *et al.*, 2003).

VI- Les gènes « SOS »

Les gènes régulés par LexA et induits pendant la réponse SOS sont appelés gènes SOS. La fonction initiale de la réponse SOS est de fournir à la bactérie les outils et le temps nécessaire afin d'effectuer les réparations des lésions qu'a subi l'ADN. A cette fin, la réponse SOS va entraîner une augmentation de l'expression de gènes dont les protéines sont impliquées dans la réparation, la réplication, la recombinaison de l'ADN et dans la division cellulaire (tableau 4). Ces gènes sont tous ciblés de façon directe par LexA et bien que leur régulation soit établie, leur fonction n'est pas toujours connue.

Des études font état de gènes régulés durant la réponse SOS sans pour autant qu'un site de fixation de LexA ait été identifié. La régulation de ces cibles pourrait se faire soit via un site alternatif de fixation de la protéine LexA, soit par une régulation indirecte via un intermédiaire lui-même régulé par LexA (Wade *et al.*, 2005). Si pour certains gènes la fixation de LexA n'a pu être démontrée, cela peut signifier que la fixation nécessite l'action de facteurs supplémentaires et/ou une architecture de la chromatide appropriée.

VII- Extension de la réponse SOS

Outre les gènes impliqués dans la restauration de l'homéostasie cellulaire, de nombreux gènes de fonction inconnue font également partie du régulon SOS ; cependant nous n'avons pas appréhendé, dans cette partie bibliographique, toute l'étendue du réseau SOS. Les

Gène	Protéine et Fonction	
Réparation et réplication:		
umuD/umuC	Sous unité d'UmuD'C (polymérase V)	Réplication de l'ADN lésé
recN	RecN	Réparation par recombinaison
recA	RecA	Dérépresseur du système SOS, co-protéase, réparation par recombinaison
uvrA/uvrB	UvrABC: exonucléase	Réparation par excision
uvrD	Hélicase II	Dérouler l'ADN, dissociation de recA/ADNsb
dinB	ADN polymérase IV	Réplication de l'ADN lésé
ruvA/ruvB	Sous unité de RuvAB	Réparation par recombinaison
polB (dinA)	ADN polymérase II	Synthèse d'ADN dans la lésion
dinG (rarB)	hélicase ATP dépendante	Réparation et recombinaison
ydjQ	endonucléase	Réparation par excision
ssb	Single strand binding protein	Fixation à l'ADN simple brin, favorise le déroulement de l'ADN
sbmC	Inhibiteur de gyrase	Protection de l'inhibiteur de réplication MccB17
Transcription et régulation de la transcription:		
lexA	LexA	Répresseur transcriptionnel du système SOS
dinI	DinI	Stabilise le filament RecA, inhibe l'activité co-protéase de RecA sur UmuD.
Métabolisme:		
molR	MolR	Régulateur de la synthèse de molybdate (transport)
fadE	déshydrogénase	fatty acid degradation, acyl-Coa déshydrogénase
Division cellulaire:		
sulA (sfiA)	SulA	Inhibiteur de la division cellulaire
minC	MinC	Inhibition de la formation de l'anneau FtsZ (inhibition de la division cellulaire)
ftsK (dinH)	FtsK: translocase	Transport de l'ADN lors de la division cellulaire
Autre:		
yjiW	SymE	Toxine (antitoxine SymR)
pcsA (dinD)	PcsA	Fonction inconnue
yebG	YebG	Fonction inconnue
tisA/tisB (ysdAB)	TisB: possible toxine TisA: possible ARNs	Système toxine antitoxine, défense
dinQ	DinQ	Fonction inconnue
hokE (ybdY)	host killing	Petit peptide toxicité membranaire
ydjM	Protéine membranaire	Fonction inconnue
yigN	Protéine de recombinaison de l'ADN	Fonction inconnue
yoaC	YoaC	Fonction inconnue
b3776 (yifN)	YifN	pseudogène fonction inconnue
ydeQ	Protéine d'adhésion	Fonction d'adhésion des bactéries entre elles et au support (formation de biofilm)

Tableau 4: Gènes régulés par LexA. D'après (Wade et al., 2005)

nombreuses études menées permettent de découvrir toujours plus de gènes régulés par LexA et d'étendre les fonctions de la réponse SOS.

L'étude de la région promotrice des gènes codant les colicines (E1, A, K) a révélé la présence de sites de fixation de LexA (Ebina *et al.*, 1983 ; Lloubes, Baty et Lazdunski, 1986 ; Mrak *et al.*, 2007). Bien que les colicines soient les plus étudiées, d'autres bactéries synthétisent des bactériocines dont l'expression pourrait être régulée par LexA. Ainsi, les expressions des pesticines (*Yersinia pestis*), des mégacines (*Bacillus megaterium*) et des klebcines (*Klebsiella*) seraient induites durant la réponse SOS (Chhibber et Vadehra, 1987 ; Rakin, Boolgakowa et Heesemann, 1996 ; Von Tersch et Carlton, 1983).

L'induction de l'autoclivage de LexA est un mécanisme qui est conservé chez les protéines membres de la famille de LexA qui inclut UmuD, sous-unité de la polymérase V d'*E. coli* et un certain nombre de répresseurs de bactériophages. Chez ces bactériophages, l'expression des gènes nécessaires pour entrer en cycle lytique est régulée par les répresseurs en question. L'induction de la réponse SOS va donc entraîner le clivage RecA-dépendant des répresseurs et permettre l'expression des gènes du prophage menant à terme à la libération de particules de phages. Cependant certains bactériophages sont associés à des gènes codant des facteurs de virulence ou des toxines et vont mener à la production de toxine et/ou à la dissémination des gènes lors d'une réponse SOS.

Chez le phage CTX ϕ , bactériophage tempéré qui infecte *Vibrio cholerae* et code la toxine cholérique, la réponse SOS participe à l'induction de l'expression des gènes du phage (Quinones, Kimsey et Waldor, 2005). L'induction de la réponse SOS va induire la production de particules phagiques contenant une copie du gène codant la toxine mais aussi la production de toxine cholérique dans le milieu. On observe le même schéma de production de shiga-toxine chez *E. coli* (Wagner *et al.*, 2002). De même la réponse SOS peut être à l'origine de

transfert d'îlots de pathogénicité, notamment chez *Staphylococcus aureus* (Ubeda et al., 2005).

Il a également été montré que les agents endommageant l'ADN pouvaient entraîner le transfert de gènes de résistances aux antibiotiques par induction d'éléments mobiles, tel que SXT. SXT est un élément intégratif conjugatif (ICE) présent chez *V. cholerae* qui porte des gènes de résistance au chloramphénicol, au sulphaméthoxazole, au triméthoprim et à la streptomycine. Le répresseur SetR inhibe l'expression des gènes de transfert de SXT, cependant cette répression est levée durant la réponse SOS. Ainsi la réponse SOS va induire le transfert de SXT et donc la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques qu'il contient (Beaber, Hochhut et Waldor, 2004).

De plus, la mobilisation de certains éléments transposables est également liée à la réponse SOS. En effet, un traitement UV entraîne l'excision des transposons Tn1, Tn5 et Tn10 (Aleshkin, Kadzhaev et Markov, 1998). La transposition de l'*IS10R* du Tn10 augmente durant la réponse SOS (Levy, Balbinder et Nagel, 1993), il s'agit d'une régulation indirecte dont les acteurs ne sont pas tous connus. En revanche, LexA réprime de façon directe l'expression de la transposase de Tn5 (Kuan et Tessman, 1991). Les éléments transposables sont également souvent associés à des déterminants de résistance aux antibiotiques, et l'augmentation de leur transposition durant la réponse SOS favoriserait la dissémination de tels déterminants.

Non seulement la réponse SOS est induite par une grande variété de conditions, mais l'étendue des gènes qui sont régulés est vaste et variée, démontrant un fort potentiel adaptatif de la réponse SOS.

VIII- La réponse SOS chez les autres bactéries

De nombreux procaryotes produisent des réactions en réponse à des agents tels que la mitomycine C ou les UV qui induisent la réponse SOS. Il apparaît que de nombreuses bactéries possèdent un système SOS apparenté au système d'*E. coli*, suggérant que la réponse SOS pourrait être une adaptation « universelle » des bactéries aux dommages à l'ADN. De plus, des protéines homologues à LexA fonctionnelles ou des séquences homologues au gène *lexA* ont été caractérisées dans presque tous les génomes bactériens (figure 20) (Erill, Campoy et Barbe, 2007). Cependant, ce n'est qu'une universalité apparente puisqu'il existe des bactéries qui ne possèdent pas d'homologues de *lexA* tels que dans le groupe *Bacteroidetes green sulfur* ou la sous-classe des ϵ -*proteobacteria* (figure 20).

Une étude a montré que l'expression de *recA* de *E. coli* pouvait être réprimée et induite chez différents genres de bactéries à gram négatif (Fernandez de Henestrosa, Calero et Barbe, 1991). De plus les protéines LexA de plusieurs bactéries sont capables de supprimer le phénotype de filamentation chez une souche de *E. coli* délétée de son gène *lexA* (Calero, Garriga et Barbe, 1991). Ces observations suggèrent que le site de fixation de la protéine LexA est significativement conservé à travers tous les systèmes SOS. Cependant, plus la bactérie est distante d'*E. coli*, d'un point de vue évolution, moins l'homologue de LexA qu'elle possède sera enclin à se fixer sur le site de fixation ou à être clivé par interaction avec RecA d'*E.coli*.

L'identification de la « LexA box » de *Bacillus subtilis*, GAAC-N4-GTTC qui est éloignée de celle d'*E. coli* (Cheo, Bayles et Yasbin, 1991), fut la première étape qui fit penser que les sites de fixation de LexA n'étaient peut-être pas si proches. Cette séquence a été ensuite décrite chez plusieurs bactéries à Gram négatif, *Mycobacterium smegmatis* et *M. tuberculosis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* et *Streptomyces* (Bisognano

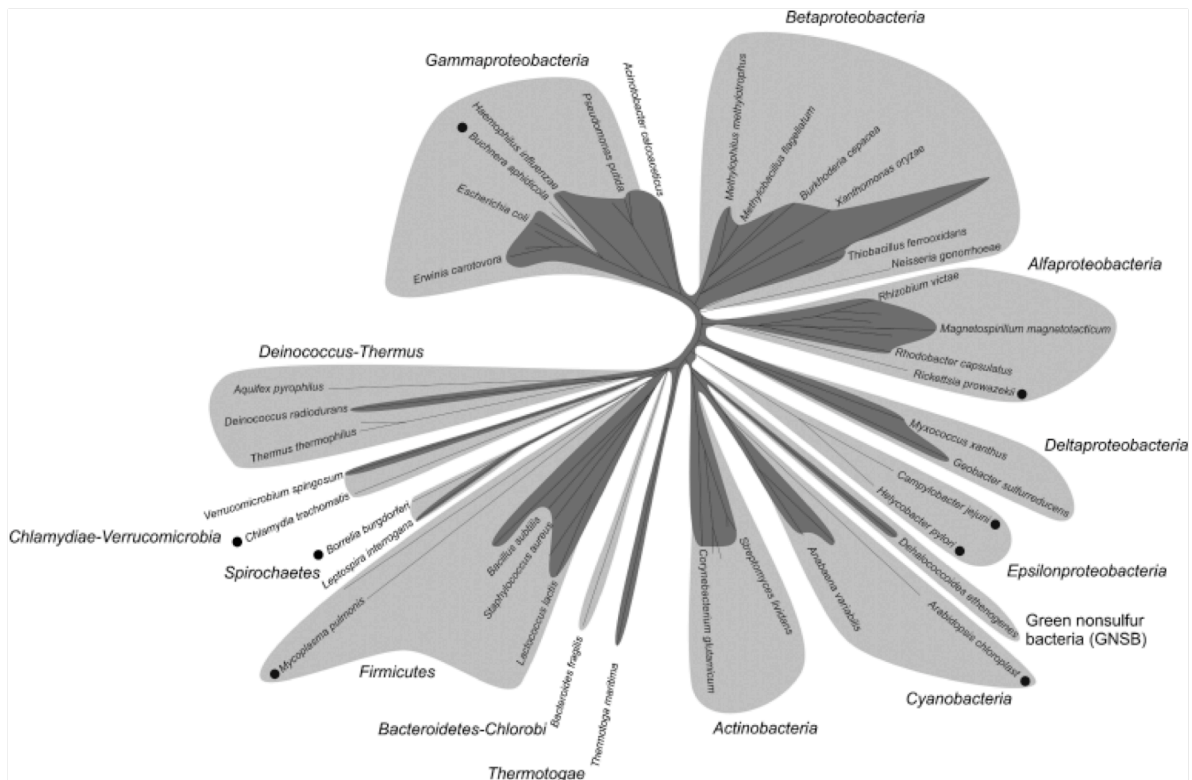


Figure 20 : Distribution du gène *lexA* dans les grands groupes bactériens. Les aires gris clair regroupent les groupes phylogénétiques et les aires gris foncé indiquent la présence de *lexA*. Les points figurent les espèces ayant subi des réductions génomiques (Erill, Campoy et Barbe, 2007).

et al., 2004 ; Johnston et al., 1997 ; Mikoc, Vujaklija et Gamulin, 1997 ; Movahedzadeh, Colston et Davis, 1997). Ce qui a eu pour effet d'établir le motif GAAC-N4-GTTC comme LexA box monophylétique des bactéries à Gram positif. De la même manière, le motif CTGT-N8-ACAG a été défini comme étant la LexA box des *γ-proteobacteria* et des *β-proteobacteria* (figure 21) (Erill, Campoy et Barbe, 2007). L'étude systématique des motifs de fixation de la protéine LexA chez de nombreuses bactéries a mené à l'identification des séquences consensus dans tous les domaines bactériens (Erill, Campoy et Barbe, 2007) (figure 21).

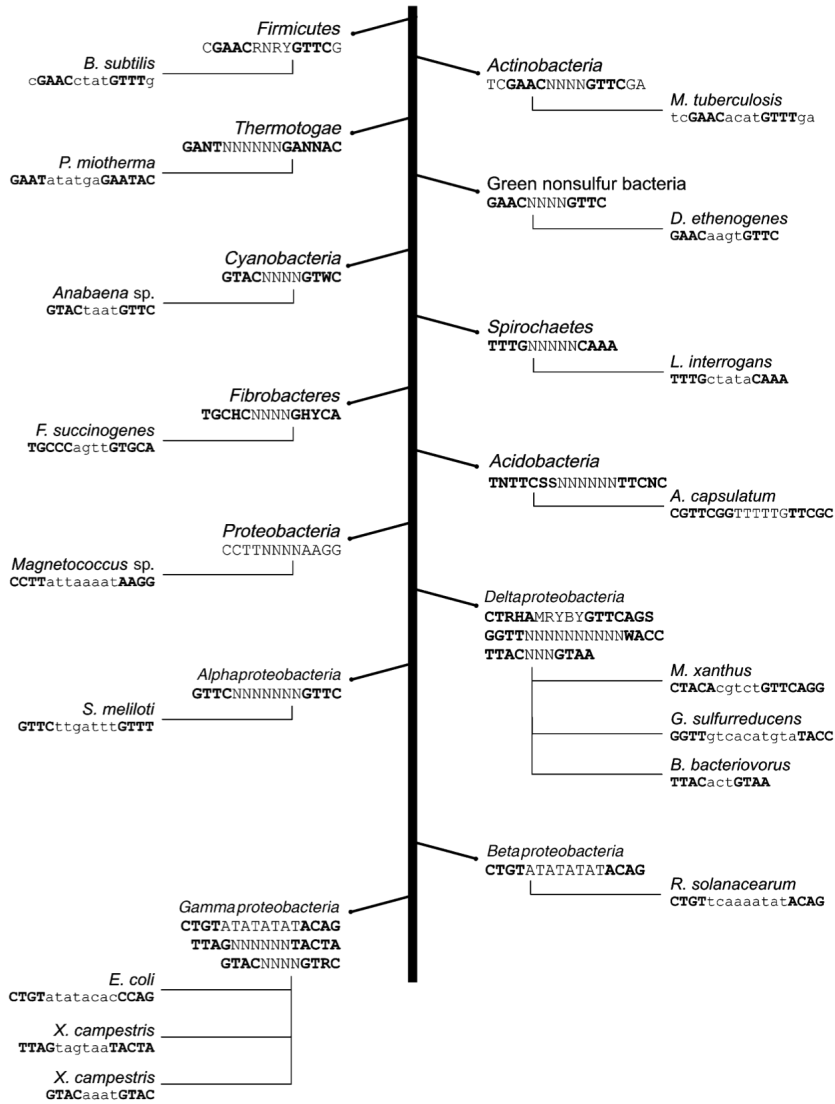


Figure 21: Distribution des motifs de fixation de LexA à travers les domaines bactériens. La figure montre le motif consensus de la classe considérée et le motif réel d'espèces représentatives (Erill, Campoy et Barbe, 2007).

RESULTATS

PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

Mon projet de recherche a porté sur l'étude de l'expression des gènes de l'intégrase et des cassettes chez les intégrons de multirésistance aux antibiotiques. Les cassettes ne contiennent généralement pas de promoteur et les gènes qu'elles contiennent sont donc co-transcrits comme dans un opéron sous la dépendance du promoteur Pc situé le plus souvent dans le gène de l'intégrase. Des travaux antérieurs dans la laboratoire ont permis d'identifier 13 variants de Pc en fonction de la séquence des éléments -35 et -10 et de la présence ou pas d'un motif 5'-TGN-3' en amont de l'élément -10 (motif -10 étendu) (Jove *et al.*, 2010). De plus chez 10% des intégrons de classe 1 l'insertion de trois résidus G 119pb en aval de Pc mène à la création d'un deuxième promoteur fonctionnel P2. Une vingtaine de combinaisons Pc + P2 sont ainsi possibles rendant multiples les possibilités d'expression des gènes de résistance aux antibiotiques. En revanche, au début de mon travail de thèse, très peu de choses étaient connues en ce qui concerne le promoteur PintI1 permettant l'expression du gène de l'intégrase (*intI1*) des intégrons de classe 1. PintI1 n'avait jusqu'alors jamais été caractérisé mais, sa position avait été supposée plaçant les promoteurs Pc et PintI1 face à face alors que P2 et PintI1 se chevauchent.

Bien que les possibilités d'échange de cassettes soient multiples, certaines données suggéraient que les intégrons seraient en fait des structures plus stables qu'il ne l'avait été supposé initialement. Tout d'abord, des intégrons comportant des réseaux de cassettes identiques ont été retrouvés chez des souches sans lien épidémiologique ou chez des espèces bactériennes phylogénétiquement éloignées. De plus, dans les réseaux de cassettes, ont été retrouvées des cassettes (comme par exemple les cassettes *aadA*) dont les gènes codent une résistance à des antibiotiques qui ne sont à ce jour pratiquement plus utilisés en médecine humaine (streptomycine, et spectinomycine). Une faible activité et / ou une faible expression

de l'intégrase pourraient jouer un rôle dans cette stabilité du réseau de cassettes. D'ailleurs, toutes les expériences de recombinaison menées *in vivo* ont nécessité une surexpression en *trans* du gène *intI1*. Une faible expression de l'intégrase pourrait être due à son promoteur PintI1 qui pourrait s'avérer être un promoteur de faible activité. De même, les promoteurs Pc et PintI1 se font face, configuration propice aux interférences transcriptionnelles, ainsi Pc et/ou P2 pourraient avoir une influence négative sur le processus transcriptionnel à partir de PintI1. D'autre part, l'expression de PintI1 pourrait être soumise à une régulation impliquant un régulateur transcriptionnel, en l'occurrence un répresseur.

Dans le but d'élucider quels mécanismes de régulations de l'expression de l'intégrase étaient en jeu, nous avons dans un premier temps étudié les conditions d'expression de l'intégrase dans des conditions de stress et avons identifié un site de fixation de LexA proche de PintI1. Nous avons montré que ce site était fonctionnel et qu'il était actif dans la régulation de l'expression de l'intégrase. Ce travail a été mené chez *Escherichia coli* (notre travail) mais aussi chez *Vibrio cholerae* (collaboration avec l'équipe de Didier Mazel à l'Institut Pasteur). Ceci a été publié dans Science en 2009, ainsi que dans Médecine Sciences en 2010 (annexe). Nos études sur LexA ont permis la mise en évidence d'un site de fixation de ce répresseur dans la région promotrice d'un gène *qnrB*, déterminant de la résistance aux quinolones, au sein d'un intégron complexe de type *sull*. Nous avons montré que l'expression de ce gène était induite, via la réponse SOS, par les quinolones elles-mêmes. Ceci a été publié dans EMBO reports en 2009.

Ensuite, nous avons étudié les possibles interférences transcriptionnelles entre les différents promoteurs Pc, P2 et PintI1. Nous avons montré que ces interférences sont Pc variant-dépendantes. Ce travail est en cours de soumission pour publication.

I – Les recombinaisons au sein des intégrons sont contrôlées par la réponse SOS

Les intégrons sont des acteurs majeurs de l'acquisition et de la dissémination des résistances aux antibiotiques. Ce sont des éléments très répandus chez de nombreuses familles de bactéries à Gram négatif et dans tous les écosystèmes bactériens. Les intégrons peuvent évoluer via l'acquisition ou le réarrangement de cassettes de résistance médiés par l'intégrase et ainsi permettre à la bactérie de s'adapter notamment face à une pression de sélection antibiotique. Malgré l'importance des intégrons, peu d'études ont été menées sur l'expression du gène *intI*. Nous nous sommes donc intéressés aux modalités d'expression de l'intégrase.

La première approche a été de rechercher un mécanisme général de réponse aux stress environnementaux capables de moduler l'expression de l'intégrase. L'analyse de la séquence de la région promotrice de *intI1* nous a permis d'identifier un site de fixation de la protéine LexA, répresseur transcriptionnel de la réponse SOS bactérienne. La réponse SOS est un système impliquant des mécanismes de réparation inductibles en réponse aux stress entraînant des dommages à l'ADN. Dans le but de vérifier l'implication de la réponse SOS dans l'expression de l'intégrase, des essais de gel retard ont été effectués afin de vérifier la fonctionnalité du site de fixation de LexA. L'expression de l'intégrase a été mesurée à l'aide d'un essai enzymatique dans différentes conditions de stress et dans des souches de fond génétique différent. Ces essais enzymatiques ont été réalisés avec des fusions transcriptionnelles entre un fragment d'intégron de classe 1 contenant le promoteur de l'intégrase *PintI1* et un gène *lacZ* dépourvu de promoteur. De plus, nous avons étudié l'effet de l'induction de l'expression de l'intégrase sur le taux de recombinaison, grâce à un système rapporteur permettant une sélection de vecteurs dans lesquels ont eu lieu une excision de

cassette. L'étude a été menée en parallèle avec un intégron de multirésistance chez *E. coli* et un super-intégron chez *V. cholerae*. Dans le cadre de mon travail, je me suis attachée à l'étude chez *E. coli* et les travaux chez *V. cholerae* ont été menés par Guillaume Cambray, doctorant dans l'unité de Didier Mazel (Plasticité du Génome Bactérien, Institut Pasteur, Paris)

Nous avons identifié un site de fixation de la protéine LexA au niveau de la région promotrice de la plupart des intégrases des IM et des SI. Le site est fonctionnel puisqu'il est effectivement lié par la protéine LexA. L'expression de l'intégrase est inductible, chez les deux types d'intégrons étudiés, par des agents connus pour entraîner une réponse SOS, comme la mitomycine C et certains antibiotiques connus pour déclencher la réponse SOS (β -lactamines, quinolones, triméthoprime). En revanche, aucune induction n'est observée lorsque la réponse SOS est altérée par mutation. De plus, l'induction de l'expression de l'intégrase chez *E. coli* et chez *V. cholerae* a un impact important sur le taux de recombinaison, comme en témoigne l'augmentation du nombre d'évènements d'excision.

Les résultats fournissent une preuve concluante que la réponse SOS régule l'expression de l'intégrase. La régulation par la réponse SOS permet des événements de réarrangement de cassette ou d'acquisition de cassettes exogènes quand cela est nécessaire, comme la nécessité d'une réponse à une exposition à un antibiotique. La réponse SOS intervient comme voie naturelle d'optimisation de l'adaptabilité que procurent les intégrons aux bactéries, sans surcoût biologique. Ainsi, une bactérie peut paraître sensible à un antibiotique donné alors qu'elle possède au sein d'un intégron un gène codant la résistance à ce même antibiotique. Sous l'effet d'un stress bactérien dont la pression de sélection antibiotique, l'activation de l'intégrase peut permettre des réarrangements de cassettes entraînant le positionnement de la cassette d'intérêt dans une position plus favorable à son expression. La bactérie préalablement considérée comme sensible à l'antibiotique exprimera

alors un phénotype de résistance permettant de répondre rapidement à la pression antibiotique.



Supporting Online Material for

The SOS Response Controls Integron Recombination

Émilie Guerin, Guillaume Cambray, Neus Sanchez-Alberola, Susana Campoy, Ivan Erill, Sandra Da Re, Bruno Gonzalez-Zorn, Jordi Barbé, Marie-Cécile Ploy, Didier Mazel*

*To whom correspondence should be addressed. E-mail: mazel@pasteur.fr

Published 22 May 2009, *Science* **324**, 1034 (2009)
DOI: 10.1126/science.1172914

This PDF file includes:

Materials and Methods
Figs. S1 and S2
Tables S1 to S3
References

II – Réponse SOS et expression des gènes *qnrB*

Parmi les antibiotiques connus pour induire la réponse SOS, les quinolones ont été largement étudiées. Découverts accidentellement en 1962 (Leshner *et al.*, 1962), les quinolones sont des antibiotiques synthétiques utilisés dans un premier temps pour traiter un nombre limité d'infections. Les recherches pharmaceutiques ont permis le développement des fluoroquinolones en 1984 par ajout d'un fluor, puis d'autres modifications conduisent, en 1994, à l'obtention de nouvelles fluoroquinolones avec un large spectre d'action (bactéries à Gram négatif et à Gram positif).

Les quinolones ont pour cibles les topoisomérases bactériennes de type 2 (ADN gyrase et topoisomérase IV) (Drlica et Zhao, 1997). Ces protéines sont impliquées dans le compactage et le changement de conformation de l'ADN lors de la réplication, la transcription et la recombinaison. En altérant le fonctionnement de ces enzymes, les quinolones vont bloquer la réplication de l'ADN et entraîner l'accumulation d'ADN coupé ce qui va conduire à l'activation de la réponse SOS.

Jusqu'en 1998, il était considéré que la résistance aux quinolones était exclusivement liée à des mécanismes de résistance chromosomiques consécutifs à des mutations. Cette hypothèse étant supportée par le fait que les quinolones induisent la réponse SOS impliquée dans la production de mutations. En 1998, la découverte de supports plasmidiques de la résistance aux quinolones chez les entérobactéries (Martinez-Martinez, Pascual et Jacoby, 1998) a ouvert une nouvelle voie d'étude. La résistance conférée par le plasmide (PMQR : plasmide mediated quinolone resistance) s'est avérée être le fait d'un gène de 657 pb appelé *qnr* pour « quinolone resistance ». Depuis cette découverte, d'autres protéines Qnr ont été identifiées et classées en six familles, sur la base de leur séquence en acides aminés : QnrA, QnrS, QnrB, QnrC, QnrD et QnrE. Les protéines Qnr appartiennent à la famille des protéines à motifs

pentapeptidiques répétés, elles vont interférer dans le complexe ADN gyrase / ADN / quinolones et vont inhiber l'action des quinolones sur leur cible.

De plus, les gènes *qnrA* et *qnrB* sont souvent associés à des structures appelées intégrons complexes *sulI*-type (Nordmann et Poirel, 2005). Les travaux menés dans l'équipe avant mon travail de doctorat avaient permis l'identification d'un gène *qnrB2* dans un intégron complexe *sulI*-type chez *Salmonella enterica* serovar Keurmassar (Garnier *et al.*, 2006).

Dans notre étude, nous avons caractérisé le promoteur du gène *qnrB2* et identifié dans cette région promotrice, un site de fixation de la protéine LexA, le répresseur de la réponse SOS. Nous avons montré que la ciprofloxacine, inducteur de la réponse SOS, régulait de façon positive l'expression du gène codant une résistance à ce même antibiotique. De plus, il semble que la régulation exercée par LexA soit conservée chez tous les gènes *qnrB*.

C'est la première description d'une induction, via la réponse SOS, de l'expression d'un gène codant une résistance contre l'antibiotique ayant causé les dommages à l'ADN .

III – Etude de l’interférence entre l’expression des cassettes et l’expression de l’intégrase

Dans le premier travail, nous avons identifié un mécanisme de régulation de l’expression de l’intégrase via la réponse SOS. Chez les intégrons de classe 1, la configuration de la région promotrice est telle que le promoteur Pc contrôlant l’expression des gènes de cassette fait face au promoteur PintI1, cette situation pourrait être propice aux interférences transcriptionnelles. Les interférences transcriptionnelles sont souvent occasionnées par des promoteurs convergents, de par les interactions entre les ARN polymérase en provenance des différents promoteurs. Cependant, lorsque le promoteur PintI1 se trouve à l’état réprimé, celui-ci ne présente que peu d’activité, cette faible activité transcriptionnelle semble donc peu encline à interférer avec celle de Pc, qui de plus diffère selon les variants. Toutefois la levée de la répression de PintI1 pourrait occasionner une interférence entre Pc et PintI1. De plus, dans certains intégrons, la création d’un second promoteur fonctionnel (P2) d’expression des cassettes vient s’ajouter au système. L’élément -10 de P2 chevauche à la fois PintI1 et le site de fixation de LexA. De par leur proximité, P2 et PintI1 pourraient également faire l’objet d’interférence transcriptionnelle d’autant plus que la création du P2 entraîne la dénaturation du site de fixation de LexA.

Afin d’élucider les conséquences de l’organisation de Pc, P2 et PintI1 sur l’expression des gènes de cassette et l’expression de l’intégrase, nous avons dans un premier temps caractérisé le promoteur PintI1. Nous avons ensuite estimé l’activité des promoteurs en mesurant l’expression de gènes rapporteurs à l’aide d’essais enzymatiques et de quantification de transcrits par PCR en temps réel dans différentes situations : le variant de Pc (PcS fort ou PcW faible), la présence ou non du P2 et l’état de répression du PintI1. Ces mesures ont été réalisées à l’aide de fusions transcriptionnelles entre un fragment d’intégron contenant les

promoteurs Pc et PintI1 et les gènes rapporteurs *uidA* et *lacZ* dépourvus de promoteur, de telle manière que Pc contrôle l'expression de *lacZ* et PintI1 l'expression de *uidA*.

Nous avons montré que, chez les intégrons de classe 1, l'interférence transcriptionnelle dépend de la force du promoteur, seul PcS inhibe l'expression de *intI1* même lorsque PintI1 est activé. De plus, la création du P2 entraîne l'expression constitutive de *intI1* sans aucune interférence transcriptionnelle.

Les résultats soulignent la relation qu'il existe entre les deux fonctions d'un intégron de multirésistance, à savoir la recombinaison des cassettes de gène et l'expression des gènes de cassettes.

High Level of Gene Cassettes Transcription Prevents Integrase Expression in Class 1 Integrons

E. Guérin^{*1,2}, T. Jové^{*1,2}, A. Tabesse¹, D. Mazel⁴, M.C. Ploy^{1,2,3†}

* These authors contributed equally to this work.

¹ INSERM, équipe Avenir, Limoges, France

² Université de Limoges, EA3175, Faculté de médecine, Limoges, France

³ CHU Limoges, Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, Limoges, France

⁴ Institut Pasteur, Unité de Plasticité du Génome Bactérien, CNRS URA2171, 75015 Paris, France

† Corresponding author.

E-mail: marie-cecile.ploy@unilim.fr

Phone (+1) 33 5 55 05 67 27; Fax: (+1) 33 5 55 05 67 22

Running head: Pc-PintI1 interference in class 1 integrons

Key words: regulation, integrons, promoters, antibiotic resistance

DISCUSSION

La force des intégrons réside dans leur capacité à échanger et acquérir des gènes et à les exprimer. A côté des super-intégrons (SI), les intégrons de multirésistance (IM) jouent un rôle primordial dans la dissémination des résistances aux antibiotiques au sein des populations bactériennes, essentiellement à Gram négatif. A ce jour, les cassettes de gène décrites chez les IM codent des résistances à quasiment toutes les classes d'antibiotiques (Partridge *et al.*, 2009). Les mouvements de cassettes, que ce soit l'échange de cassettes entre deux intégrons différents ou des réarrangements au sein d'un même intégron, sont catalysés par l'intégrase. Bien que l'activité de l'intégrase soit une des fonctions capitales d'un intégron, peu d'éléments sont connus sur les mécanismes régissant son expression. Toutefois, des études épidémiologiques montrent une certaine stabilité dans l'agencement des cassettes des IM (Martinez-Freijo *et al.*, 1999 ; White, McIver et Rawlinson, 2001), suggérant que l'expression ou l'activité de l'intégrase serait faible. De plus, toutes les expériences de recombinaison menées *in vivo* ont nécessité une surexpression en *trans* du gène *intI1* (Collis *et al.*, 2001).

Nous avons dans un premier temps choisi d'étudier l'expression de l'intégrase et recherché un éventuel mécanisme de régulation en particulier en situation de stress. En effet, les bactéries doivent s'adapter aux stress environnementaux constants, dont font partie les pressions de sélection antibiotique. Les moyens mis en œuvre pour s'adapter consistent d'une part, en la réparation des effets potentiellement délétères du stress et d'autre part, en une adaptation permettant de combattre l'élément inducteur de stress (Matic, Taddei et Radman, 2004).

Nous avons identifié l'existence d'un site de fixation de la protéine LexA, répresseur transcriptionnel de la réponse SOS, dans la région promotrice supposée de *intI1*. La séquence de ce site de fixation de la protéine LexA (5'-CTGTACAAAAAACAG-3') est proche du consensus décrit chez *E. coli* (5'-CTGTATATATATACAG-3') (Erill, Campoy et Barbe, 2007). Nous avons montré que la fixation de la protéine LexA est effective et qu'elle réprime

l'expression de *intI1*. En effet, lors d'un traitement par un inducteur de la réponse SOS (mitomycine C), nous avons montré que l'activité de PintI1 était induite de 4,5 fois. Dans cette étude, la fonctionnalité du site de fixation de LexA a aussi été montrée au sein du SI chez *Vibrio cholerae*. L'alignement des séquences promotrices du gène *intI* de plusieurs IM et de SI montre que le site LexA est conservé. La présence du site de fixation de LexA dans plusieurs représentants des SI suggère que l'apparition de cette régulation interviendrait très tôt dans l'évolution des intégrons. Cette hypothèse a fait l'objet d'une étude phylogénétique visant à identifier les différents sites LexA au sein des intégrons (Cambray, 2009). Dans cette étude, 56,6 % des séquences d'intégrons étudiés, intégrons chromosomiques et IM, présentaient des sites de fixation de LexA correspondant tous au motif consensus retrouvé chez les β/γ -Protéobactéries. L'analyse phylogénétique a montré que la régulation SOS-dépendante était très conservée chez les IM indépendamment de la phylogénie de la souche alors qu'elle était plus variable chez les intégrons chromosomiques en fonction de l'espèce bactérienne. La persistance de cette régulation chez les IM serait le témoin d'une nécessaire adaptation dans un contexte de fréquente stimulation par les antibiotiques nécessitant donc des remaniements de cassettes fréquents. De plus, cette étude montre que chez les intégrons ou espèces où il y a une perte de la régulation par LexA, il y a souvent inactivation du gène *intI* par mutation.

Cependant, dans notre expérience, chez les intégrons de classe 2 où le gène de l'intégrase est interrompu par un codon stop, bien que nous ayons identifié un site de fixation de LexA, des expériences de retard sur gel et d'analyse transcriptionnelle menées au laboratoire ont montré que LexA ne se fixe pas à ce site et que la régulation n'est pas effective dans nos conditions expérimentales. Le site de fixation (5'-CTGTATAGGCAGACAG-3') présente un motif GGC dans la région séparant les deux triplets CTG et CAG, ce qui pourrait empêcher la fixation, la séquence consensus ne contenant que des T/A. Quelques intégrons de

classe 2 ayant des intégrases fonctionnelles ont été décrits (Barlow et Gobius, 2006 ; Marquez *et al.*, 2008), mais la régulation de l'expression de l'intégrase n'a pas été testée dans ces cas-là.

Les IM sont considérés comme ayant évolué à partir des SI (Mazel, 2006) . Le fait qu'à travers leur évolution, ils aient conservé cette régulation montre que c'est un mécanisme important et que sa présence est essentielle ; dans le cas contraire, il est probable que cette régulation aurait disparue. En effet, comme pour les intégrons de classe 2, la perte de la fonctionnalité de l'intégrase pourrait avoir entraîné la perte de la régulation par LexA, celle-ci étant devenue inutile.

Nous avons montré que le gain d'expression entraîné par l'induction de la réponse SOS était suffisamment important pour augmenter de 140 fois la capacité d'excision de l'intégrase chez *E. coli*. Chez *V. cholerae*, cette augmentation est de 340 fois (Travaux de G. Cambrey). Tout stress induisant la réponse SOS peut donc potentiellement promouvoir des mouvements de cassette. Or, la réponse SOS est connue pour être induite par une large variété de stress, notamment par certains antibiotiques largement utilisés en médecine humaine comme les fluoroquinolones, le triméthoprim ou les β -lactamines (Kelley, 2006). Nos résultats ont aussi montré que l'expression de l'intégrase augmentait nettement après traitement à la ciprofloxacine ou au triméthoprim. Ces antibiotiques ont donc participé indirectement au maintien et à la dynamique d'échange des cassettes de résistance et ceux d'autant plus que des cassettes codant une résistance vis-à-vis de ces molécules existent: *aac(6')-Ib-cr* codant une résistance aux fluoroquinolones (Robicsek *et al.*, 2006) et *dfr* codant une résistance au triméthoprim (Gassama Sow *et al.*). Un traitement antibiotique pourrait donc induire l'acquisition ou le remaniement des cassettes afin de placer la cassette d'intérêt à proximité du Pc permettant ainsi son expression. Le traitement antibiotique aurait alors l'effet contraire de celui recherché, au lieu d'éliminer les bactéries, il va favoriser l'adaptation et donc la

persistance de celles-ci malgré le traitement. Il est important de tenir compte du potentiel adaptatif dont font preuve les intégrons face aux antibiotiques en particulier lorsqu'un traitement par un antibiotique connu pour induire la réponse SOS est envisagé pour traiter une infection.

D'autre part, il a été montré que la réponse SOS était impliquée dans le transfert de gènes, notamment des gènes de virulence ou de résistance. En effet, l'induction de la réponse SOS peut conduire à l'activation de prophages associés à des gènes de virulence qui vont permettre leur dissémination en entrant en cycle lytique et en allant infecter d'autres bactéries. C'est le cas du phage CTX ϕ , bactériophage tempéré de *V. cholerae*, contenant un gène qui code la toxine cholérique (Quinones, Kimsey et Waldor, 2005). L'implication de la réponse SOS dans le transfert d'éléments mobiles comme des éléments intégratifs conjugatifs (ICE) ou d'îlot de pathogénicité est connue. Ainsi le transfert de SXT, un ICE, est régi par la réponse SOS. SXT porte des gènes de résistance au chloramphénicol, au sulfaméthoxazole, au triméthoprime et à la streptomycine, l'induction de son transfert signifie aussi transfert des gènes de résistance qu'il porte (Beaber, Hochhut et Waldor, 2004). De même, la réponse SOS est liée à la mobilisation de certains éléments transposables, les transposons Tn1, Tn5 et Tn10 sont excisés après exposition à un rayonnement UV (Aleshkin, Kadzhaev et Markov, 1998). Les IM sont eux-mêmes hébergés par des éléments mobiles tels que les transposons et les plasmides conjugatifs qui permettent leur transfert d'une bactérie à l'autre. La réponse SOS va donc permettre à la fois les échanges de cassettes entre intégrons ou au sein d'intégrons mais aussi les transferts horizontaux d'intégrons d'une bactérie à une autre en mobilisant un élément mobile. De plus, il a récemment été montré que le transfert des plasmides conjugatifs d'une bactérie à une autre induisait la réponse SOS (Baharoglu, Bikard et Mazel, 2010). En effet, lors de la conjugaison, le transfert d'ADN s'effectue sous forme d'ADN simple brin, l'ADNsb va être reconnu par RecA et ainsi induire la réponse SOS. De cette façon, le

transfert d'un plasmide conjugatif portant un intégron dans une bactérie réceptrice contenant également un intégron, va fournir le signal inducteur pour permettre la recombinaison des nouvelles cassettes qu'il apporte. Bien que ce ne soit pas une adaptation répondant à un besoin, ce mécanisme peut contribuer à maintenir une variabilité génétique chez les bactéries. La répression exercée par LexA contribue donc à la stabilité des intégrons en minimisant l'expression basale de l'intégrase et en diminuant le taux de recombinaison.

La répression qu'exerce LexA est avantageuse en termes d'adaptation et d'évolution mais elle présente également des bénéfices d'un point de vue coût biologique. En effet, la dérépression du système et l'expression constitutive de l'intégrase entraînerait un coût biologique supplémentaire pour la bactérie. De même, un remaniement permanent des cassettes pourrait entraîner une déstabilisation de l'intégron et mener à la perte de cassettes, ce qui diminuerait de façon conséquente le potentiel d'adaptabilité des intégrons. Dans ce contexte, l'incorporation de la régulation SOS-dépendante chez les intégrons forme un système dans lequel des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être présents mais silencieux, car trop éloignés de Pc. Quand survient un stress, notamment un traitement antibiotique, la cassette de gène appropriée va pouvoir être rapprochée du Pc par recombinaison et ainsi être exprimée quand cela est nécessaire. De cette façon, une bactérie considérée sensible à un antibiotique donné, va pouvoir facilement et rapidement exprimer la résistance appropriée. Dans le futur, les politiques de traitement antibiotique ainsi que le développement des molécules thérapeutiques de demain devront tenir compte du potentiel d'adaptabilité que présente ce système.

Toutes ces études montrent l'implication de la réponse SOS dans l'acquisition et la dissémination de la résistance aux antibiotiques. La réponse SOS a été largement étudiée pour le taux de mutations important qu'elle engendre, en particulier les mutations conférant une

résistance aux antibiotiques. En effet, les mécanismes de réparation mis en œuvre par la réponse SOS pour combler les lésions de l'ADN entraînent l'apparition de mutations. Beaucoup de ces mutations ne sont pas favorables à la survie de la bactérie et entraînent la mort cellulaire. Cependant, certaines mutations n'altérant pas la survie de la bactérie peuvent au contraire être bénéfiques d'un point de vue adaptatif. En effet, lors d'un traitement antibiotique, parmi toutes les mutations, certaines mutations altérant les éléments impliqués dans l'action de l'antibiotique entraîneront une résistance. Parmi la population bactérienne ayant subi le traitement antibiotique, ne survivront que les mutants de résistance à l'antibiotique considéré. Ce phénomène a été décrit notamment pour la ciprofloxacine (Cirz *et al.*, 2005), le traitement par la ciprofloxacine entraîne via la réponse SOS l'apparition de mutations de résistance.

Nous avons montré que la réponse SOS était aussi impliquée dans la résistance à la ciprofloxacine via le déclenchement de l'expression des gènes *qnrB*.

Jusqu'en 1998, il était considéré que la résistance aux quinolones était exclusivement liée à des mécanismes de résistance chromosomique consécutifs à des mutations. La découverte de supports plasmidiques de la résistance aux quinolones chez les entérobactéries (Martinez-Martinez, Pascual et Jacoby, 1998) a ouvert une nouvelle voie d'étude. Cette résistance plasmidique s'est avérée être le fait entre autres de gènes appelés *qnr* pour « quinolone resistance ». Aujourd'hui, six familles de Qnr ont été identifiées, sur la base de leur séquence en acides aminés : QnrA, QnrS, QnrB, QnrC, QnrD et QnrE. Les gènes *qnrA* et *qnrB* sont souvent associés à des intégrons complexes *sulI*-type (Garnier *et al.*, 2006 ; Nordmann et Poirel, 2005). Nous avons montré que le gène *qnrB2* était régulé par LexA et que l'induction de l'expression pouvait avoir lieu à des concentrations sub-inhibitrices de ciprofloxacine. Cependant l'analyse des régions promotrices des autres familles de *qnr* révèle que cette régulation n'est pas étendue à tous les déterminants *qnr*. Seul les *qnrB* et le gène

qnrD présentent des sites de fixation de la protéine LexA. Il semble que *qnrD* soit phylogénétiquement proche des *qnrB*, il présente 61 % d'identité avec *qnrB1* (Cavaco et al., 2009). La présence de la régulation LexA-dépendante de déterminants de la résistance aux quinolones pourrait être expliquée par l'analyse du processus d'évolution des *qnr*. Des études ont montré que les *qnr* pourraient trouver leur origine dans le chromosome de bactéries marines (Poirel *et al.*, 2005 ; Sanchez *et al.*, 2008). De plus, la détection de plasmides portant des gènes *qnr* chez des bactéries aquatiques suggère qu'elles pourraient servir de réservoir de ces gènes. Les quinolones ne sont pas métabolisées par les mammifères qui les ingèrent, ainsi une grande partie va se retrouver dans l'environnement, par exemple, des quantités allant jusqu'à 55 ng.L⁻¹ d'ofloxacine ont été retrouvées dans la Seine parmi beaucoup d'autres antibiotiques (Tamtam *et al.*, 2008). Il est fort probable que l'accumulation des antibiotiques dans l'environnement ait favorisé le succès des gènes *qnr* ainsi que leur dissémination. La fonction première des Qnr n'est pas connue, mais l'existence de toxines (d'origine naturelle) ciblant la gyrase, comme CcdB (Critchlow *et al.*, 1997) peut faire penser qu'elles serviraient d'antitoxine en protégeant la gyrase. L'existence de la régulation par le système SOS pourrait faire penser que les fonctions premières de QnrB étaient liées à la protection contre des agents naturels entraînant des lésions de l'ADN.

Dans cette étude, nous avons montré pour la première fois qu'un antibiotique entraînait directement l'expression du gène lui conférant une résistance. La réponse SOS participe donc ainsi de façon directe à l'expression de la résistance aux antibiotiques.

Nous pouvons dégager un schéma général des actions mises en œuvre par la bactérie pour faire face à une pression antibiotique

L'induction de la réponse SOS va entraîner :

- Des mutations via les enzymes de réparation et donc l'apparition de mutants résistants

- La mobilisation de gènes de résistance aux antibiotiques via les intégrons
- Le transfert de certains éléments mobiles (hébergeant souvent des intégrons)
- L'expression de gènes de résistance.

En résumé, on peut voir le développement de tous les mécanismes de résistance aux antibiotiques à travers la réponse SOS dont le rôle apparaît être essentiel. Ainsi tout a été fait pour que la bactérie non seulement survive mais s'adapte aux stress auxquels elle fait face.

L'étude de l'expression de l'intégrase nous a mené à caractériser précisément le promoteur *PintI1*. Nous avons localisé le site d'initiation de la transcription 22 pb en amont du codon start de *intI1*, cette position étant compatible avec les éléments -10 et -35 proposés pour décrire *PintI1* (Guerin *et al.*, 2009 ; Martinez et de la Cruz, 1990). Le site de fixation de LexA précédemment décrit chevauche *PintI1*. Les promoteurs Pc et *PintI1* sont convergents et distants de 100 pb alors que P2 et *PintI1* se chevauchent partiellement. De plus, l'opérateur de LexA chevauche *PintI1*, mais aussi le site de création du P2, de telle manière que la création du promoteur P2 par insertion de 3 nucléotides va dénaturer le site de fixation de LexA. Ces configurations sont propices aux interférences transcriptionnelles (IT) : influence négative directe d'un processus transcriptionnel sur un deuxième processus transcriptionnel en provenance d'un second promoteur, généralement plus faible (Shearwin, Callen et Egan, 2005). Il existe 13 variants de Pc d'activité différente en fonction du polymorphisme des éléments -10, -35 et -10 étendu (Jove *et al.*, 2010). Cinq variants prédominent, parmi ceux-ci, PcS le plus fort et PcW un variant 25 fois plus faible que PcS.

Nous avons montré que l'activité de *PintI1*, même dé-réprimée, n'a aucun impact sur l'expression des cassettes, quel que soit le variant de Pc ou la présence d'un P2. De plus, la mutation du site de fixation de LexA n'ayant aucun effet positif sur l'activité de Pc, nous

pouvons conclure que l'expression des cassettes de gène n'est pas régulée par LexA et qu'elles ne font donc pas partie du régulon SOS.

Nous avons montré que seul PcS inhibait l'activité de PintI1 même lorsque celui-ci n'est pas réprimé, alors que PcW n'a aucun effet. L'activité transcriptionnelle en provenance de PcS est donc probablement suffisamment forte pour empêcher tout processus transcriptionnel à partir de PintI1. Bien que le mécanisme d'interférence ne soit pas connu, il est envisageable que PcS qui est un promoteur fort, permette la formation de complexe transcriptionnel à une fréquence importante. La fréquence de passage des complexes en élongation en provenance de Pc ne laisserait pas le temps nécessaire à la fixation d'une ARN polymérase au niveau de PintI1. Il est également possible qu'il s'agisse d'une interférence type « siting duck », dans ce cas, la fixation d'une ARNP aurait bien lieu au niveau de PintI1 mais mettrait du temps à partir en élongation, il pourrait être délogé par un complexe en élongation provenant de Pc. L'inactivation de PintI1 n'ayant aucun effet sur l'activité de Pc, le phénomène de collision semble donc peu probable puisque les deux complexes entrant en collision altèrent de façon transitoire les deux processus transcriptionnels.

En présence de PcW qui est un promoteur faible, l'activité de PintI1 n'est pas inhibée. Donc, un intégron avec PcW exprime peu ses cassettes mais conserve le potentiel d'induction de l'expression de l'intégrase via la réponse SOS et donc la capacité de réarrangement. En revanche, un intégron avec un PcS exprime fortement ses cassettes mais perd son potentiel d'adaptation, ce qui conduit à une stabilité du réseau de cassettes. De plus, comme Pc se situe dans la séquence codante de *intI1*, le polymorphisme de Pc va entraîner des changements dans la séquence en acides aminés de l'intégrase (Jove *et al.*, 2010). L'activité des variants d'intégrase en fonction du Pc en présence ne sera pas la même, le Pc le plus fort étant associé à l'intégrase la moins efficace et le plus faible à l'intégrase la plus active en terme d'excision donc plus propice aux réarrangements de cassettes (Jove *et al.*, 2010). Dans la configuration

PcW, la conservation de l'expression de *intI1* après induction entrainerait donc la production d'une intégrase active permettant à la bactérie de s'adapter plus rapidement au traitement antibiotique en plaçant la cassette de gène appropriée à proximité du Pc afin qu'elle soit transcrite.

Dans 10% des cas, il y a création d'un second promoteur, P2 par insertion de trois nucléotides. La création de P2 pourrait avoir eu lieu afin de compenser la faible activité de PcW, puisqu'il est majoritairement associé à ce dernier (Jove *et al.*, 2010). De plus, la création de P2 permettrait à la bactérie d'augmenter le niveau d'expression des cassettes tout en gardant l'intégrase la plus active. La création du P2 altère le site de fixation de LexA mais, en dehors du gain d'activité engendré par la levée de la répression, la création du P2 n'interfère pas avec PintI1. Bien qu'ils soient proches, PintI1 et P2 n'interfèrent donc pas l'un avec l'autre. Nous pouvons envisager une fixation alternative des ARNP sur les promoteurs P2 et PintI1, P2 envoyant probablement les complexes transcriptionnels en élongation plus fréquemment que PintI1. La création du P2 entraîne une augmentation de l'expression des cassettes de gène et de l'intégrase de 11 et 3 fois respectivement, il ne présente donc que des bénéfices. Cependant, les études *in silico* ont montré que la configuration PcW + P2 était faiblement représentée (Jove *et al.*, 2010), nous pouvons penser que la production constitutive de l'intégrase, en particulier la plus active, entraînerait un coût biologique important potentiellement délétère pour la bactérie. Cette hypothèse n'a en revanche pas été testée.

Les autres variants de Pc n'ont pour l'instant pas été testés en combinaison avec PintI1. Cependant, on peut envisager l'existence d'un seuil d'activité au-dessus duquel le promoteur considéré aura une influence négative sur l'expression de l'intégrase, et que celle-ci évoluera de façon proportionnelle à l'activité du promoteur. Ainsi plus un intégron exprimera fortement les gènes contenus dans ses cassettes, moins il exprimera l'intégrase et

de ce fait, moins il sera apte à procurer un outil d'adaptabilité aux changements environnementaux pour la bactérie.

Ces constatations laissent penser que l'évolution des intégrons s'est faite soit en faveur de l'expression des cassettes avec perte du pouvoir adaptatif soit en faveur de l'expression et de l'activité de l'intégrase. Nous avons mis en évidence le lien qu'il existait entre les deux fonctions des intégrons, à savoir la capacité d'acquisition de cassette de gène de résistance aux antibiotiques et celle d'exprimer ces gènes.

A travers cette étude, on constate que l'expression de l'intégrase est régie par plusieurs régulations. D'une part, une régulation « externe » via un système de réponse aux stress qui va permettre l'induction de la fonction acquisition de gènes de résistance de l'intégron. D'autre part, une régulation « interne » via le polymorphisme de Pc, permettant la liaison entre les fonctions expression et acquisition des gènes de résistance aux antibiotiques. Les intégrons confèrent donc un redoutable outil d'adaptation aux bactéries.

CONCLUSIONS

ET

PERSPECTIVES

Les travaux présentés ici, ont permis de mettre à jour les mécanismes de régulation de la recombinaison de cassette de gène de résistance aux antibiotiques au sein des intégrons. D'une part, nous avons montré le lien existant entre les deux fonctionnalités des intégrons, l'expression et la capture de gènes de résistance aux antibiotiques. En condition de stress, l'expressions des gènes de résistance et celle de l'intégrase sont inversement proportionnelles, un intégron exprimant faiblement les gènes de résistance produira plus d'intégrase et inversement. Ce phénomène résulte de l'interférence transcriptionnelle d'un processus fort d'expression des cassettes de gènes sur celui de l'intégrase. Le mécanisme moléculaire d'interférence n'est pour l'instant pas connu et pourrait faire l'objet d'une nouvelle étude.

D'autre part, nous avons montré combien le couplage de la réponse SOS, un système général de réponse au stress, et des intégrons pouvait s'avérer être un redoutable outil d'adaptabilité face aux pressions de sélection antibiotique. La réponse SOS est un acteur central de la lutte bactérienne contre les antibiotiques. Cette étude constitue une avancée majeure vers une meilleure compréhension des mécanismes régissant le potentiel d'adaptabilité des intégrons.

Le problème des résistances aux antibiotiques ne cesse de s'aggraver et les moyens de combattre les bactéries multi-résistantes s'amenuisent. Les études s'orientent désormais vers la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques. L'intégrase, ou les acteurs majeurs de la réponse SOS, LexA et RecA, pourraient constituer des cibles de choix pour réduire l'apparition de résistance aux antibiotiques.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

- Ackerley, D. F., Y. Barak, S. V. Lynch, J. Curtin et A. Martin. 2006. «Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12». *J Bacteriol.* vol. 188, no 9, p. 3371-3381.
- Aertsen, A., et C. W. Michiels. 2005. «Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*». *Mol Microbiol.* vol. 58, no 5, p. 1381-1391.
- Aihara, H., Y. Ito, H. Kurumizaka, T. Terada, S. Yokoyama et T. Shibata. 1997. «An interaction between a specified surface of the C-terminal domain of RecA protein and double-stranded DNA for homologous pairing». *J Mol Biol.* vol. 274, no 2, p. 213-221.
- Aiyar, S. E., S. M. McLeod, W. Ross, C. A. Hirvonen, M. S. Thomas, R. C. Johnson et R. L. Gourse. 2002. «Architecture of Fis-activated transcription complexes at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 and *rrnE* P1 promoters». *J Mol Biol.* vol. 316, no 3, p. 501-516.
- Aleshkin, G. I., K. V. Kadzhaev et A. P. Markov. 1998. «High and low UV-dose responses in SOS-induction of the precise excision of transposons *tn1*, *Tn5* and *Tn10* in *Escherichia coli*». *Mutat Res.* vol. 401, no 1-2, p. 179-191.
- Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato et M. Ohta. 1995. «A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene *blaIMP*». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 39, no 7, p. 1612-1615.
- Arthur, D. C., A. F. Ghetu, M. J. Gubbins, R. A. Edwards, L. S. Frost et J. N. Glover. 2003. «FinO is an RNA chaperone that facilitates sense-antisense RNA interactions». *EMBO J.* vol. 22, no 23, p. 6346-6355.
- Bae, I. K., Y. N. Lee, W. G. Lee, S. H. Lee et S. H. Jeong. 2007. «Novel complex class 1 integron bearing an *ISCR1* element in an *Escherichia coli* isolate carrying the *blaCTX-M-14* gene». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 51, no 8, p. 3017-3019.
- Baharoglu, Z., D. Bikard et D. Mazel. 2010. «Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation». *PLoS Genet.*
- Barker, A., C. A. Clark et P. A. Manning. 1994. «Identification of *VCR*, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1». *J Bacteriol.* vol. 176, no 17, p. 5450-5458.
- Barlow, R. S., et K. S. Gobius. 2006. «Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources». *J Antimicrob Chemother.* vol. 58, no 6, p. 1133-1138.
- Barne, K. A., J. A. Bown, S. J. Busby et S. D. Minchin. 1997. «Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters». *EMBO J.* vol. 16, no 13, p. 4034-4040.

- Beaber, J. W., B. Hochhut et M. K. Waldor. 2004. «SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes». *Nature*. vol. 427, no 6969, p. 72-74.
- Biskri, L., et D. Mazel. 2003. «Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron». *Antimicrob Agents Chemother*. vol. 47, no 10, p. 3326-3331.
- Bisognano, C., W. L. Kelley, T. Estoppey, P. Francois, J. Schrenzel, D. Li, D. P. Lew, D. C. Hooper, A. L. Cheung et P. Vaudaux. 2004. «A *recA*-LexA-dependent pathway mediates ciprofloxacin-induced fibronectin binding in *Staphylococcus aureus*». *J Biol Chem*. vol. 279, no 10, p. 9064-9071.
- Borek, E., et A. Ryan. 1958. «The Transfer of Irradiation-Elicited Induction in a Lysogenic Organism». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 44, no 5, p. 374-377.
- Borukhov, S., et E. Nudler. 2008. «RNA polymerase: the vehicle of transcription». *Trends Microbiol*. vol. 16, no 3, p. 126-134.
- Bouvier, M., G. Demarre et D. Mazel. 2005. «Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate». *EMBO J*. vol. 24, no 24, p. 4356-4367.
- Bouvier, M., M. Ducos-Galand, C. Loot, D. Bikard et D. Mazel. 2009. «Structural features of single-stranded integron cassette *attC* sites and their role in strand selection». *PLoS Genet*. vol. 5, no 9, p. e1000632.
- Bridges, B. A. 2005. «Error-prone DNA repair and translesion DNA synthesis. II: The inducible SOS hypothesis». *DNA Repair (Amst)*. vol. 4, no 6, p. 725-726, 739.
- Brizio, A., T. Conceicao, M. Pimentel, G. Da Silva et A. Duarte. 2006. «High-level expression of IMP-5 carbapenemase owing to point mutation in the -35 promoter region of class 1 integron among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates». *Int J Antimicrob Agents*. vol. 27, no 1, p. 27-31.
- Browning, D. F., et S. J. Busby. 2004. «The regulation of bacterial transcription initiation». *Nat Rev Microbiol*. vol. 2, no 1, p. 57-65.
- Browning, D. F., J. A. Cole et S. J. Busby. 2000. «Suppression of FNR-dependent transcription activation at the *Escherichia coli nir* promoter by Fis, IHF and H-NS: modulation of transcription initiation by a complex nucleo-protein assembly». *Mol Microbiol*. vol. 37, no 5, p. 1258-1269.
- Browning, D. F., J. A. Cole et S. J. Busby. 2008. «Regulation by nucleoid-associated proteins at the *Escherichia coli nir* operon promoter». *J Bacteriol*. vol. 190, no 21, p. 7258-7267.
- Butala, M., D. Zgur-Bertok et S. J. Busby. 2009. «The bacterial LexA transcriptional repressor». *Cell Mol Life Sci*. vol. 66, no 1, p. 82-93.

- Byrne-Bailey, K. G., W. H. Gaze, P. Kay, A. B. Boxall, P. M. Hawkey et E. M. Wellington. 2009. «Prevalence of sulfonamide resistance genes in bacterial isolates from manured agricultural soils and pig slurry in the United Kingdom». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 53, no 2, p. 696-702.
- Calero, S., X. Garriga et J. Barbe. 1991. «One-step cloning system for isolation of bacterial *lexA*-like genes». *J Bacteriol.* vol. 173, no 22, p. 7345-7350.
- Callen, B. P., K. E. Shearwin et J. B. Egan. 2004. «Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter». *Mol Cell.* vol. 14, no 5, p. 647-656.
- Cambray, G. 2009. «Evolvability- The integron case and the use of synonymous sequences for directed evolution». PARIS, Complexité du vivant, Université Paris Diderot, 296 p. En ligne. <<http://www.scribd.com/doc/19603889/EVOLVABILITY-THE-INTEGRON-CASE-AND-THE-USE-OF-SYNONYMOUS-SEQUENCES-FOR-DIRECTED-EVOLUTION>>.
- Cavaco, L. M., H. Hasman, S. Xia et F. M. Aarestrup. 2009. «*qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 53, no 2, p. 603-608.
- Chakerian, A. E., et K. S. Matthews. 1992. «Effect of *lac* repressor oligomerization on regulatory outcome». *Mol Microbiol.* vol. 6, no 8, p. 963-968.
- Cheetham, G. M., D. Jeruzalmi et T. A. Steitz. 1999. «Structural basis for initiation of transcription from an RNA polymerase-promoter complex». *Nature.* vol. 399, no 6731, p. 80-83.
- Cheo, D. L., K. W. Bayles et R. E. Yasbin. 1991. «Cloning and characterization of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*». *J Bacteriol.* vol. 173, no 5, p. 1696-1703.
- Chhibber, S., et D. V. Vadehra. 1987. «Effect of various inducing agents on bacteriocin (klebocin) production by *Klebsiella pneumoniae*». *Folia Microbiol (Praha).* vol. 32, no 2, p. 137-141.
- Cirz, R. T., J. K. Chin, D. R. Andes, V. de Crecy-Lagard, W. A. Craig et F. E. Romesberg. 2005. «Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance». *PLoS Biol.* vol. 3, no 6, p. e176.
- Clark, C. A., L. Purins, P. Kaewrakon, T. Focareta et P. A. Manning. 2000. «*The Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron». *Microbiology.* vol. 146 (Pt 10), p. 2605-2612.

- Clark, N. C., O. Olsvik, J. M. Swenson, C. A. Spiegel et F. C. Tenover. 1999. «Detection of a streptomycin/spectinomycin adenylyltransferase gene (*aadA*) in *Enterococcus faecalis*». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 43, no 1, p. 157-160.
- Collis, C. M., et R. M. Hall. 1992. «Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase». *J Bacteriol.* vol. 174, no 5, p. 1574-1585.
- Collis, C. M., et R. M. Hall. 1995. «Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 39, no 1, p. 155-162.
- Collis, C. M., et R. M. Hall. 2004. «Comparison of the structure-activity relationships of the integron-associated recombination sites *attI3* and *attI1* reveals common features». *Microbiology.* vol. 150, no Pt 5, p. 1591-1601.
- Collis, C. M., M. J. Kim, H. W. Stokes et R. M. Hall. 2002. «Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site». *Mol Microbiol.* vol. 46, no 5, p. 1415-1427.
- Collis, C. M., G. D. Recchia, M. J. Kim, H. W. Stokes et R. M. Hall. 2001. «Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase IntI1». *J Bacteriol.* vol. 183, no 8, p. 2535-2542.
- Correia, M., F. Boavida, F. Grosso, M. J. Salgado, L. M. Lito, J. M. Cristino, S. Mendo et A. Duarte. 2003. «Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 47, no 9, p. 2838-2843.
- Cox, M. M. 2007. «Motoring along with the bacterial RecA protein». *Nat Rev Mol Cell Biol.* vol. 8, no 2, p. 127-138.
- Cox, M. M. 2007. «Regulation of bacterial RecA protein function». *Crit Rev Biochem Mol Biol.* vol. 42, no 1, p. 41-63.
- Crampton, N., W. A. Bonass, J. Kirkham, C. Rivetti et N. H. Thomson. 2006. «Collision events between RNA polymerases in convergent transcription studied by atomic force microscopy». *Nucleic Acids Res.* vol. 34, no 19, p. 5416-5425.
- Critchlow, S. E., M. H. O'Dea, A. J. Howells, M. Couturier, M. Gellert et A. Maxwell. 1997. «The interaction of the F plasmid killer protein, CcdB, with DNA gyrase: induction of DNA cleavage and blocking of transcription». *J Mol Biol.* vol. 273, no 4, p. 826-839.
- Dalsgaard, A., A. Forslund, D. Sandvang, L. Arntzen et K. Keddy. 2001. «*Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the *aadA2* gene located on class 1 integrons». *J Antimicrob Chemother.* vol. 48, no 6, p. 827-838.

- Dorman, C. J. 2009. «Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology». *Adv Appl Microbiol.* vol. 67, p. 47-64.
- Drlica, K., et X. Zhao. 1997. «DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones». *Microbiol Mol Biol Rev.* vol. 61, no 3, p. 377-392.
- Ebina, Y., Y. Takahara, F. Kishi, A. Nakazawa et R. Brent. 1983. «LexA protein is a repressor of the colicin E1 gene». *J Biol Chem.* vol. 258, no 21, p. 13258-13261.
- Egelman, E. 2000. «A common structural core in proteins active in DNA recombination and replication». *Trends Biochem Sci.* vol. 25, no 4, p. 179-182.
- Erill, I., S. Campoy et J. Barbe. 2007. «Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response». *FEMS Microbiol Rev.* vol. 31, no 6, p. 637-656.
- Fernandez de Henestrosa, A. R., S. Calero et J. Barbe. 1991. «Expression of the *recA* gene of *Escherichia coli* in several species of gram-negative bacteria». *Mol Gen Genet.* vol. 226, no 3, p. 503-506.
- Friedberg, E. C., G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood, R. A. Schultz et T. Ellenberger. 2006. «The SOS Responses of Prokaryotes to DNA Damage». In *DNA Repair and Mutagenesis*, ASM Press, p. 463-507. Washington, D. C.
- Garnier, F., N. Raked, A. Gassama, F. Denis et M. C. Ploy. 2006. «Genetic environment of quinolone resistance gene *qnrB2* in a complex *sul1*-type integron in the newly described *Salmonella enterica* serovar Keurmassar». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 50, no 9, p. 3200-3202.
- Gassama Sow, A., A. Aidara-Kane, O. Barraud, M. Gatet, F. Denis et M. C. Ploy. «High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella spp* isolates». *J Infect Dev Ctries.* vol. 4, no 4, p. 207-212.
- Gassama-Sow, A., M. H. Diallo, C. S. Boye, B. Garin, J. M. Sire, A. I. Sow et A. Aidara-Kane. 2006. «Class 2 integron-associated antibiotic resistance in *Shigella sonnei* isolates in Dakar, Senegal». *Int J Antimicrob Agents.* vol. 27, no 3, p. 267-270.
- Gestal, A. M., H. W. Stokes, S. R. Partridge et R. M. Hall. 2005. «Recombination between the *dfrA12*-*orfF*-*aadA2* cassette array and an *aadA1* gene cassette creates a hybrid cassette, *aadA8b*». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 49, no 11, p. 4771-4774.
- Giese, K. C., C. B. Michalowski et J. W. Little. 2008. «RecA-dependent cleavage of LexA dimers». *J Mol Biol.* vol. 377, no 1, p. 148-161.
- Gonzalez, G., K. Sossa, H. Bello, M. Dominguez, S. Mella et R. Zemelman. 1998. «Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals». *FEMS Microbiol Lett.* vol. 161, no 1, p. 125-128.

- Grainger, D. C., M. D. Goldberg, D. J. Lee et S. J. Busby. 2008. «Selective repression by Fis and H-NS at the *Escherichia coli* *dps* promoter». *Mol Microbiol.* vol. 68, no 6, p. 1366-1377.
- Guerin, E., G. Cambray, N. Sanchez-Alberola, S. Campoy, I. Erill, S. Da Re, B. Gonzalez-Zorn, J. Barbe, M. C. Ploy et D. Mazel. 2009. «The SOS response controls integron recombination». *Science.* vol. 324, no 5930, p. 1034.
- Hall, R. M., D. E. Brookes et H. W. Stokes. 1991. «Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point». *Mol Microbiol.* vol. 5, no 8, p. 1941-1959.
- Hanau-Bercot, B., I. Podglajen, I. Casin et E. Collatz. 2002. «An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons». *Mol Microbiol.* vol. 44, no 1, p. 119-130.
- Hansson, K., L. Sundstrom, A. Pelletier et P. H. Roy. 2002. «IntI2 integron integrase in Tn7». *J Bacteriol.* vol. 184, no 6, p. 1712-1721.
- Hawley, D. K., et W. R. McClure. 1983. «Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences». *Nucleic Acids Res.* vol. 11, no 8, p. 2237-2255.
- Heidelberg, J. F., J. A. Eisen, W. C. Nelson, R. A. Clayton, M. L. Gwinn, R. J. Dodson, D. H. Haft, E. K. Hickey, J. D. Peterson, L. Umayam, S. R. Gill, K. E. Nelson, T. D. Read, H. Tettelin, D. Richardson, M. D. Ermolaeva, J. Vamathevan, S. Bass, H. Qin, I. Dragoi, P. Sellers, L. McDonald, T. Utterback, R. D. Fleishmann, W. C. Nierman, O. White, S. L. Salzberg, H. O. Smith, R. R. Colwell, J. J. Mekalanos, J. C. Venter et C. M. Fraser. 2000. «DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*». *Nature.* vol. 406, no 6795, p. 477-483.
- Hengge-Aronis, R. 2002. «Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase». *Microbiol Mol Biol Rev.* vol. 66, no 3, p. 373-395, table of contents.
- Houang, E. T., Y. W. Chu, W. S. Lo, K. Y. Chu et A. F. Cheng. 2003. «Epidemiology of rifampin ADP-ribosyltransferase (*arr-2*) and metallo-beta-lactamase (*blaIMP-4*) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 47, no 4, p. 1382-1390.
- Imlay, J. A., et S. Linn. 1987. «Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide». *J Bacteriol.* vol. 169, no 7, p. 2967-2976.
- Irani, M. H., L. Orosz et S. Adhya. 1983. «A control element within a structural gene: the gal operon of *Escherichia coli*». *Cell.* vol. 32, no 3, p. 783-788.
- Jacquier, H., C. Zaoui, M. J. Sanson-le Pors, D. Mazel et B. Bercot. 2009. «Translation regulation of integrons gene cassette expression by the *attC* sites». *Mol Microbiol.* vol. 72, no 6, p. 1475-1486.

- Janion, C., A. Sikora, A. Nowosielska et E. Grzesiuk. 2002. «Induction of the SOS response in starved *Escherichia coli*». *Environ Mol Mutagen.* vol. 40, no 2, p. 129-133.
- Johnston, J. L., J. Sloan, J. A. Fyfe, J. K. Davies et J. I. Rood. 1997. «The *recA* gene from *Clostridium perfringens* is induced by methyl methanesulphonate and contains an upstream Cheo box». *Microbiology.* vol. 143 (Pt 3), p. 885-890.
- Jove, T., S. Da Re, F. Denis, D. Mazel et M. C. Ploy. «Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons». *PLoS Genet.* vol. 6, no 1, p. e1000793.
- Kelley, W. L. 2006. «Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon». *Mol Microbiol.* vol. 62, no 5, p. 1228-1238.
- Kuan, C. T., et I. Tessman. 1991. «LexA protein of *Escherichia coli* represses expression of the Tn5 transposase gene». *J Bacteriol.* vol. 173, no 20, p. 6406-6410.
- Kumar, A., R. A. Malloch, N. Fujita, D. A. Smillie, A. Ishihama et R. S. Hayward. 1993. «The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an "extended minus 10" promoter». *J Mol Biol.* vol. 232, no 2, p. 406-418.
- Labbate, M., R. J. Case et H. W. Stokes. 2009. «The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation». *Methods Mol Biol.* vol. 532, p. 103-125.
- Leshner, G. Y., E. J. Froelich, M. D. Gruett, J. H. Bailey et R. P. Brundage. 1962. «1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents». *J Med Pharm Chem.* vol. 91, p. 1063-1065.
- Leverstein-van Hall, M. A., M. Blok HE, T. Donders AR, A. Paauw, A. C. Fluit et J. Verhoef. 2003. «Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin». *J Infect Dis.* vol. 187, no 2, p. 251-259.
- Levesque, C., S. Brassard, J. Lapointe et P. H. Roy. 1994. «Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons». *Gene.* vol. 142, no 1, p. 49-54.
- Levesque, C., L. Piche, C. Larose et P. H. Roy. 1995. «PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 39, no 1, p. 185-191.
- Levy, M. S., E. Balbinder et R. Nagel. 1993. «Effect of mutations in SOS genes on UV-induced precise excision of Tn10 in *Escherichia coli*». *Mutat Res.* vol. 293, no 3, p. 241-247.
- Lewin, C. S., et S. G. Amyes. 1991. «The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim». *J Med Microbiol.* vol. 34, no 6, p. 329-332.

- Lisser, S., et H. Margalit. 1993. «Compilation of *E. coli* mRNA promoter sequences». *Nucleic Acids Res.* vol. 21, no 7, p. 1507-1516.
- Lloubes, R., D. Baty et C. Lazdunski. 1986. «The promoters of the genes for colicin production, release and immunity in the ColA plasmid: effects of convergent transcription and Lex A protein». *Nucleic Acids Res.* vol. 14, no 6, p. 2621-2636.
- Luijsterburg, M. S., M. C. Noom, G. J. Wuite et R. T. Dame. 2006. «The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective». *J Struct Biol.* vol. 156, no 2, p. 262-272.
- Luo, Y., R. A. Pfuetzner, S. Mosimann, M. Paetzel, E. A. Frey, M. Cherney, B. Kim, J. W. Little et N. C. Strynadka. 2001. «Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage». *Cell.* vol. 106, no 5, p. 585-594.
- MacDonald, D., G. Demarre, M. Bouvier, D. Mazel et D. N. Gopaul. 2006. «Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination». *Nature.* vol. 440, no 7088, p. 1157-1162.
- Madan Babu, M., et S. A. Teichmann. 2003. «Evolution of transcription factors and the gene regulatory network in *Escherichia coli*». *Nucleic Acids Res.* vol. 31, no 4, p. 1234-1244.
- Malkov, V. A., et R. D. Camerini-Otero. 1995. «Photocross-links between single-stranded DNA and *Escherichia coli* RecA protein map to loops L1 (amino acid residues 157-164) and L2 (amino acid residues 195-209)». *J Biol Chem.* vol. 270, no 50, p. 30230-30233.
- Marquez, C., M. Labbate, A. J. Ingold, P. R. Chowdhury, M. S. Ramirez, D. Centron, G. Borthagaray et H. W. Stokes. 2008. «Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 52, no 11, p. 4153-4154.
- Martinez, E., et F. de la Cruz. 1990. «Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes». *EMBO J.* vol. 9, no 4, p. 1275-1281.
- Martinez-Antonio, A., et J. Collado-Vides. 2003. «Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria». *Curr Opin Microbiol.* vol. 6, no 5, p. 482-489.
- Martinez-Freijo, P., A. C. Fluit, F. J. Schmitz, J. Verhoef et M. E. Jones. 1999. «Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of *Enterobacteriaceae* isolated from widespread geographic regions in Europe». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 43, no 3, p. 686-689.
- Martinez-Martinez, L., A. Pascual et G. A. Jacoby. 1998. «Quinolone resistance from a transferable plasmid». *Lancet.* vol. 351, no 9105, p. 797-799.

- Matic, I., F. Taddei et M. Radman. 2004. «Survival versus maintenance of genetic stability: a conflict of priorities during stress». *Res Microbiol.* vol. 155, no 5, p. 337-341.
- Mazel, D. 2006. «Integrans: agents of bacterial evolution». *Nat Rev Microbiol.* vol. 4, no 8, p. 608-620.
- Mazel, D., B. Dychinco, V. A. Webb et J. Davies. 1998. «A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome». *Science.* vol. 280, no 5363, p. 605-608.
- McLeod, S. M., et R. C. Johnson. 2001. «Control of transcription by nucleoid proteins». *Curr Opin Microbiol.* vol. 4, no 2, p. 152-159.
- Messier, N., et P. H. Roy. 2001. «Integron integrases possess a unique additional domain necessary for activity». *J Bacteriol.* vol. 183, no 22, p. 6699-6706.
- Miko, A., K. Pries, A. Schroeter et R. Helmuth. 2003. «Multiple-drug resistance in D-tartrate-positive *Salmonella enterica* serovar paratyphi B isolates from poultry is mediated by class 2 integrons inserted into the bacterial chromosome». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 47, no 11, p. 3640-3643.
- Mikoc, A., D. Vujaklija et V. Gamulin. 1997. «The *recA* gene from *Streptomyces rimosus* R6: sequence and expression in *Escherichia coli*». *Res Microbiol.* vol. 148, no 5, p. 397-403.
- Miller, C., H. Ingmer, L. E. Thomsen, K. Skarstad et S. N. Cohen. 2003. «DpiA binding to the replication origin of *Escherichia coli* plasmids and chromosomes destabilizes plasmid inheritance and induces the bacterial SOS response». *J Bacteriol.* vol. 185, no 20, p. 6025-6031.
- Mohana-Borges, R., A. B. Pacheco, F. J. Sousa, D. Foguel, D. F. Almeida et J. L. Silva. 2000. «LexA repressor forms stable dimers in solution. The role of specific dna in tightening protein-protein interactions». *J Biol Chem.* vol. 275, no 7, p. 4708-4712.
- Movahedzadeh, F., M. J. Colston et E. O. Davis. 1997. «Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* LexA: recognition of a Cheo (*Bacillus*-type SOS) box». *Microbiology.* vol. 143 (Pt 3), p. 929-936.
- Mrak, P., Z. Podlesek, J. P. van Putten et D. Zgur-Bertok. 2007. «Heterogeneity in expression of the *Escherichia coli* colicin K activity gene *cka* is controlled by the SOS system and stochastic factors». *Mol Genet Genomics.* vol. 277, no 4, p. 391-401.
- Murray, H. D., et R. L. Gourse. 2004. «Unique roles of the *rrn* P2 rRNA promoters in *Escherichia coli*». *Mol Microbiol.* vol. 52, no 5, p. 1375-1387.

- Naas, T., Y. Mikami, T. Imai, L. Poirel et P. Nordmann. 2001. «Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes». J Bacteriol. vol. 183, no 1, p. 235-249.
- Nagarajavel, V., S. Madhusudan, S. Dole, A. R. Rahmouni et K. Schnetz. 2007. «Repression by binding of H-NS within the transcription unit». J Biol Chem. vol. 282, no 32, p. 23622-23630.
- Nesvera, J., J. Hochmannova et M. Patek. 1998. «An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*». FEMS Microbiol Lett. vol. 169, no 2, p. 391-395.
- Nickels, B. E., S. L. Dove, K. S. Murakami, S. A. Darst et A. Hochschild. 2002. «Protein-protein and protein-DNA interactions of sigma70 region 4 involved in transcription activation by lambda_{da}I». J Mol Biol. vol. 324, no 1, p. 17-34.
- Nordmann, P., et L. Poirel. 2005. «Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in *Enterobacteriaceae*». J Antimicrob Chemother. vol. 56, no 3, p. 463-469.
- Nunes-Duby, S. E., H. J. Kwon, R. S. Tirumalai, T. Ellenberger et A. Landy. 1998. «Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases». Nucleic Acids Res. vol. 26, no 2, p. 391-406.
- O'Reilly, E. K., et K. N. Kreuzer. 2004. «Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*». J Bacteriol. vol. 186, no 21, p. 7149-7160.
- Oertel-Buchheit, P., T. Schmidt-Dorr, M. Granger-Schnarr et M. Schnarr. 1993. «Spacing requirements between LexA operator half-sites can be relaxed by fusing the LexA DNA binding domain with some alternative dimerization domains». J Mol Biol. vol. 229, no 1, p. 1-7.
- Paget, M. S., et J. D. Helmann. 2003. «The sigma70 family of sigma factors». Genome Biol. vol. 4, no 1, p. 203.
- Parekh, B. S., et G. W. Hatfield. 1996. «Transcriptional activation by protein-induced DNA bending: evidence for a DNA structural transmission model». Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 93, no 3, p. 1173-1177.
- Partridge, S. R., G. D. Recchia, C. Scaramuzzi, C. M. Collis, H. W. Stokes et R. M. Hall. 2000. «Definition of the *attI1* site of class 1 integrons». Microbiology. vol. 146 (Pt 11), p. 2855-2864.
- Partridge, S. R., G. Tsafnat, E. Coiera et J. R. Iredell. 2009. «Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons». FEMS Microbiol Rev. vol. 33, no 4, p. 757-784.

- Perez-Rueda, E., et J. Collado-Vides. 2000. «The repertoire of DNA-binding transcriptional regulators in *Escherichia coli* K-12». *Nucleic Acids Res.* vol. 28, no 8, p. 1838-1847.
- Ploy, M. C., F. Denis, P. Courvalin et T. Lambert. 2000. «Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 44, no 10, p. 2684-2688.
- Poirel, L., A. Liard, J. M. Rodriguez-Martinez et P. Nordmann. 2005. «*Vibrionaceae* as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants». *J Antimicrob Chemother.* vol. 56, no 6, p. 1118-1121.
- Power, P., M. Galleni, J. Di Conza, J. A. Ayala et G. Gutkind. 2005. «Description of In116, the first *bla*CTX-M-2-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina». *J Antimicrob Chemother.* vol. 55, no 4, p. 461-465.
- Prakash, L., S. Sherman, M. Miller, C. Lawrence et W.H. Tabor. 1974. *Molecular and environmental aspects of mutagenesis*. Springfield, III: Charles C. Thomas publisher.
- Quinones, M., H. H. Kimsey, W. Ross, R. L. Gourse et M. K. Waldor. 2006. «LexA represses CTXphi transcription by blocking access of the alpha C-terminal domain of RNA polymerase to promoter DNA». *J Biol Chem.* vol. 281, no 51, p. 39407-39412.
- Quinones, M., H. H. Kimsey et M. K. Waldor. 2005. «LexA cleavage is required for CTX prophage induction». *Mol Cell.* vol. 17, no 2, p. 291-300.
- Radman, M. 1975. «SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis». *Basic Life Sci.* vol. 5A, p. 355-367.
- Rakin, A., E. Boolgakowa et J. Heesemann. 1996. «Structural and functional organization of the *Yersinia pestis* bacteriocin pesticin gene cluster». *Microbiology.* vol. 142 (Pt 12), p. 3415-3424.
- Ramirez, M. S., S. Pineiro et D. Centron. «Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 54, no 2, p. 699-706.
- Ramirez, M. S., L. J. Vargas, V. Cagnoni, M. Tokumoto et D. Centron. 2005. «Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia* isolate». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 49, no 10, p. 4418-4420.
- Recchia, G. D., et R. M. Hall. 1995. «Gene cassettes: a new class of mobile element». *Microbiology.* vol. 141 (Pt 12), p. 3015-3027.
- Recchia, G. D., H. W. Stokes et R. M. Hall. 1994. «Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase». *Nucleic Acids Res.* vol. 22, no 11, p. 2071-2078.

- Rhodijs, V. A., D. M. West, C. L. Webster, S. J. Busby et N. J. Savery. 1997. «Transcription activation at class II CRP-dependent promoters: the role of different activating regions». *Nucleic Acids Res.* vol. 25, no 2, p. 326-332.
- Riccio, M. L., N. Franceschini, L. Boschi, B. Caravelli, G. Cornaglia, R. Fontana, G. Amicosante et G. M. Rossolini. 2000. «Characterization of the metallo-beta-lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla(IMP)* allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 44, no 5, p. 1229-1235.
- Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush et D. C. Hooper. 2006. «Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase». *Nat Med.* vol. 12, no 1, p. 83-88.
- Rodriguez-Martinez, J. M., L. Poirel, R. Canton et P. Nordmann. 2006. «Common region CR1 for expression of antibiotic resistance genes». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 50, no 7, p. 2544-2546.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout et D. Mazel. 2002. «Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes». *Mol Microbiol.* vol. 43, no 6, p. 1657-1669.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, P. Ploncard, B. Dychinco, J. Davies et D. Mazel. 2001. «The evolutionary history of chromosomal super-integrations provides an ancestry for multiresistant integrations». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 98, no 2, p. 652-657.
- Sallen, B., A. Rajoharison, S. Desvarenne et C. Mabilat. 1995. «Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of enterobacteriaceae». *Microb Drug Resist.* vol. 1, no 3, p. 195-202.
- Sanchez, M. B., A. Hernandez, J. M. Rodriguez-Martinez, L. Martinez-Martinez et J. L. Martinez. 2008. «Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants». *BMC Microbiol.* vol. 8, p. 148.
- Savery, N. J., G. S. Lloyd, S. J. Busby, M. S. Thomas, R. H. Ebright et R. L. Gourse. 2002. «Determinants of the C-terminal domain of the *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit important for transcription at class I cyclic AMP receptor protein-dependent promoters». *J Bacteriol.* vol. 184, no 8, p. 2273-2280.
- Schlacher, K., K. Leslie, C. Wyman, R. Woodgate, M. M. Cox et M. F. Goodman. 2005. «DNA polymerase V and RecA protein, a minimal mutasome». *Mol Cell.* vol. 17, no 4, p. 561-572.
- Schnarr, M., M. Granger-Schnarr, S. Hurstel et J. Pouyet. 1988. «The carboxy-terminal domain of the LexA repressor oligomerises essentially as the entire protein». *FEBS Lett.* vol. 234, no 1, p. 56-60.

- Seward, R. J. 1999. «Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of *Acinetobacter spp*». Clin Microbiol Infect. vol. 5, no 6, p. 308-318.
- Shearwin, K. E., B. P. Callen et J. B. Egan. 2005. «Transcriptional interference--a crash course». Trends Genet. vol. 21, no 6, p. 339-345.
- Shin, M., S. Kang, S. J. Hyun, N. Fujita, A. Ishihama, P. Valentin-Hansen et H. E. Choy. 2001. «Repression of *deoP2* in *Escherichia coli* by CytR: conversion of a transcription activator into a repressor». EMBO J. vol. 20, no 19, p. 5392-5399.
- Shin, M., M. Song, J. H. Rhee, Y. Hong, Y. J. Kim, Y. J. Seok, K. S. Ha, S. H. Jung et H. E. Choy. 2005. «DNA looping-mediated repression by histone-like protein H-NS: specific requirement of *Esigma70* as a cofactor for looping». Genes Dev. vol. 19, no 19, p. 2388-2398.
- Silvaggi, J. M., J. B. Perkins et R. Losick. 2005. «Small untranslated RNA antitoxin in *Bacillus subtilis*». J Bacteriol. vol. 187, no 19, p. 6641-6650.
- Slilaty, S. N., et J. W. Little. 1987. «Lysine-156 and serine-119 are required for LexA repressor cleavage: a possible mechanism». Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 84, no 12, p. 3987-3991.
- Smits, W. K., T. T. Hoa, L. W. Hamoen, O. P. Kuipers et D. Dubnau. 2007. «Antirepression as a second mechanism of transcriptional activation by a minor groove binding protein». Mol Microbiol. vol. 64, no 2, p. 368-381.
- Solberg, O. D., R. M. Ajiboye et L. W. Riley. 2006. «Origin of class 1 and 2 integrons and gene cassettes in a population-based sample of uropathogenic *Escherichia coli*». J Clin Microbiol. vol. 44, no 4, p. 1347-1351.
- Sousa, F. J., L. M. Lima, A. B. Pacheco, C. L. Oliveira, I. Torriani, D. F. Almeida, D. Foguel, J. L. Silva et R. Mohana-Borges. 2006. «Tetramerization of the LexA repressor in solution: implications for gene regulation of the *E.coli* SOS system at acidic pH». J Mol Biol. vol. 359, no 4, p. 1059-1074.
- Stokes, H. W., et R. M. Hall. 1989. «A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons». Mol Microbiol. vol. 3, no 12, p. 1669-1683.
- Story, R. M., et T. A. Steitz. 1992. «Structure of the RecA protein-ADP complex». Nature. vol. 355, no 6358, p. 374-376.
- Sundstrom, L., P. H. Roy et O. Skold. 1991. «Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7». J Bacteriol. vol. 173, no 9, p. 3025-3028.
- Swinger, K. K., et P. A. Rice. 2004. «IHF and HU: flexible architects of bent DNA». Curr Opin Struct Biol. vol. 14, no 1, p. 28-35.

- Taddei, F., I. Matic et M. Radman. 1995. «cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 92, no 25, p. 11736-11740.
- Tamtam, F., F. Mercier, B. Le Bot, J. Eurin, Q. Tuc Dinh, M. Clement et M. Chevreuil. 2008. «Occurrence and fate of antibiotics in the Seine River in various hydrological conditions». *Sci Total Environ*. vol. 393, no 1, p. 84-95.
- Tietze, E., J. Brevet et H. Tschape. 1987. «Relationships among the streptothricin resistance transposons Tn1825 and Tn1826 and the trimethoprim resistance transposon Tn7». *Plasmid*. vol. 18, no 3, p. 246-249.
- Toleman, M. A., P. M. Bennett et T. R. Walsh. 2006. «Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: *IS91*-like elements evolving complex class 1 integrons». *J Antimicrob Chemother*. vol. 58, no 1, p. 1-6.
- Ubeda, C., E. Maiques, E. Knecht, I. Lasa, R. P. Novick et J. R. Penades. 2005. «Antibiotic-induced SOS response promotes horizontal dissemination of pathogenicity island-encoded virulence factors in *staphylococci*». *Mol Microbiol*. vol. 56, no 3, p. 836-844.
- Volkert, M. R., F. H. Gately et L. I. Hajec. 1989. «Expression of DNA damage-inducible genes of *Escherichia coli* upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents». *Mutat Res*. vol. 217, no 2, p. 109-115.
- Vollmer, A. C., S. Kwakye, M. Halpern et E. C. Everbach. 1998. «Bacterial stress responses to 1-megahertz pulsed ultrasound in the presence of microbubbles». *Appl Environ Microbiol*. vol. 64, no 10, p. 3927-3931.
- Von Tersch, M. A., et B. C. Carlton. 1983. «Megacinogenic plasmids of *Bacillus megaterium*». *J Bacteriol*. vol. 155, no 2, p. 872-877.
- Wade, J. T., N. B. Reppas, G. M. Church et K. Struhl. 2005. «Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites». *Genes Dev*. vol. 19, no 21, p. 2619-2630.
- Wagner, P. L., J. Livny, M. N. Neely, D. W. Acheson, D. I. Friedman et M. K. Waldor. 2002. «Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*». *Mol Microbiol*. vol. 44, no 4, p. 957-970.
- Wang, P., J. Yang, A. Ishihama et A. J. Pittard. 1998. «Demonstration that the TyrR protein and RNA polymerase complex formed at the divergent P3 promoter inhibits binding of RNA polymerase to the major promoter, P1, of the *aroP* gene of *Escherichia coli*». *J Bacteriol*. vol. 180, no 20, p. 5466-5472.
- Weigle, J. J. 1953. «Induction of Mutations in a Bacterial Virus». *Proc Natl Acad Sci U S A*. vol. 39, no 7, p. 628-636.

- White, P. A., C. J. McIver et W. D. Rawlinson. 2001. «Integrans and gene cassettes in the *enterobacteriaceae*». *Antimicrob Agents Chemother.* vol. 45, no 9, p. 2658-2661.
- Witkin, E. M. 1967. «The radiation sensitivity of *Escherichia coli* B: a hypothesis relating filament formation and prophage induction». *Proc Natl Acad Sci U S A.* vol. 57, no 5, p. 1275-1279.
- Wosten, M. M. 1998. «Eubacterial sigma-factors». *FEMS Microbiol Rev.* vol. 22, no 3, p. 127-150.
- Xu, H., J. Davies et V. Miao. 2007. «Molecular characterization of class 3 integrans from *Delftia spp*». *J Bacteriol.* vol. 189, no 17, p. 6276-6283.
- Xu, Z., L. Li, M. J. Alam, L. Zhang, S. Yamasaki et L. Shi. 2008. «First confirmation of integran-bearing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*». *Curr Microbiol.* vol. 57, no 3, p. 264-268.
- Xu, Z., L. Li, M. E. Shirtliff, B. M. Peters, Y. Peng, M. J. Alam, S. Yamasaki et L. Shi. «First report of class 2 integran in clinical *Enterococcus faecalis* and class 1 integran in *Enterococcus faecium* in South China». *Diagn Microbiol Infect Dis.*
- Young, H. K., M. J. Qumsieh et M. L. McIntosh. 1994. «Nucleotide sequence and genetic analysis of the type Ib trimethoprim-resistant, Tn4132-encoded dihydrofolate reductase». *J Antimicrob Chemother.* vol. 34, no 5, p. 715-725.
- Yu, X., et E. H. Egelman. 1997. «The RecA hexamer is a structural homologue of ring helicases». *Nat Struct Biol.* vol. 4, no 2, p. 101-104.
- Yura, T., M. Kanemori et M.T. Morita. 2000. «The heat shock response: regulation and function». In *Bacterial stress response*, ASM Press, p. 3-18. Washington.

Annexe

L'étude de la régulation de l'expression de l'intégrase a également fait l'objet d'une publication dans un journal à portée nationale.

Les antibiotiques induisent la capture de gènes de résistance par les bactéries
Émilie Guérin, Guillaume Cambray, Sandra Da Re, Didier Mazel, Marie-Cécile Ploy
Médecine/Science | Janvier 2010 | Volume 1 | n° 26