

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences et Techniques

ECOLE DOCTORALE THEMATIQUE BIOLOGIE-SANTE ED N°524

UMR Inserm U1092

Anti-infectieux : supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques

Thèse N° [-----]

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline / Spécialité : Biologie, Santé

Présentée et soutenue par

Emilie STRUGEON

Le 16 décembre 2013

**Etude de la régulation de l'intégrase des intégrons de
classe 1 dans un modèle de biofilm bactérien**

Thèse dirigée par **Sandra Da Re et Marie-Cécile Ploy**

JURY :

Professeur **François Denis**

Président

Docteur **Thierry Naas**

Rapporteur

Professeur **Guillaume Arlet**

Rapporteur

Docteur **Christophe Beloin**

Examineur

Docteur **Sandra Da Re**

Directrice de thèse

Professeure **Marie-Cécile Ploy**

Co-Directrice de thèse

A mes parents, à mes frères

Remerciements

Je remercie tout d'abord très chaleureusement Marie-Cécile Ploy pour m'avoir accueillie au sein de l'équipe (et pour toujours faire en sorte que l'on s'y sente bien) et m'avoir encadrée tout au long de ces années de thèse.

Un énorme merci à Sandra Da Re qui m'a suivie, encadrée, encouragée au quotidien dans ce travail, merci pour ta patience, ta rigueur et ton sens du travail bien fait.

Je remercie Monsieur le Professeur François Denis de m'avoir fait l'honneur de présider ce jury.

Je tiens à remercier Messieurs Guillaume Arlet et Thierry Naas d'avoir accepté d'être rapporteur de ce travail et Monsieur Christophe Beloin d'avoir accepté de faire partie du jury.

Je remercie l'Inserm et la région Limousin qui ont contribué au financement de cette thèse.

J'adresse un merci tout particulier au personnel de la laverie du service de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges pour leur aide dans la préparation des bonbonnes de milieu (Béatrice, Odile, Michelle, Marlène, Bernadette et Raya).

Merci à tous ceux avec qui j'ai pu passer de bons moments au laboratoire ou en dehors (et j'espère n'oublier personne...).

Merci donc à Olivier et Delphine (mes premiers encadrants lors de mon stage de M1, merci pour votre bonne humeur, vos conseils), Martine (pour ta bonne humeur quotidienne, ton écoute, tes chocolats, tu es un peu notre « maman du labo »), Emilie (tu es la seule « Emilie » au labo maintenant ;-)), Sébastien C (merci de m'avoir si bien accueillie quand je suis arrivée et pour tous les bons moments), Aurore (merci pour ton aide dans les manips et pour tout le reste :-)), Raphaël, Fadi, Anne, Rémi, Marie-Laure, Mélissa, Carole, Charlotte.

Merci à Sophie R pour ta gentillesse, tes encouragements et ta bonne humeur, merci aussi aux autres chefs du labo pour leur bienveillance (Sébastien H, Sophie A, Fabien).

Merci à Margaux (sans oublier ton aide technique), Murielle, Déborah, Elodie et Benjamin: vous êtes formidables. Contente de vous connaître et d'avoir passé de très très bons moments en votre compagnie en cette fin de thèse.

A Yohann et Pierrette qui êtes arrivés plus récemment je vous souhaite de très belles années de thèse.

Lucie, tu as toujours été là pour m'écouter quand j'en ai eu besoin ; et même s'il nous aurait été compliqué de travailler ensemble ;-), je t'adore ! Merci d'avoir été toujours là pour moi et pour tous les bons moments passés au labo ou en dehors.

Thibault et Anthony merci pour votre amitié, votre humour, vos conseils et votre franchise, et pour tous les bons moments passés ensemble. Vous m'avez manqué mes trois/quatre derniers mois au labo.

Thomas, tu es parti quand je suis arrivée et là tu arrives alors que je pars ! Merci pour ton amitié, tes conseils, ton écoute, nos discussions scientifiques ou non. Contente pour toi que tu sois de retour sur Limoges.

Merci à mes « vieilles » amies Florie, Amandine, Fanny, Cécile et Delphine d'avoir toujours été là. Merci à Soussou, Ratinette, Gugu, Clo, Caro, Cathy et Audrey pour les « soirées fac » et pour votre amitié.

Enfin le plus grand merci va à mes frères, mes parents et à ma famille au sens large pour tous vos encouragements.

Sommaire

RESUME.....	8
ABSTRACT	9
INDEX DES TABLEAUX.....	10
INDEX DES FIGURES	11
GLOSSAIRE.....	12
PREAMBULE	13
INTRODUCTION.....	16
Chapitre I : Les intégrons	17
I. Structure des intégrons	17
I.1. Le gène <i>intI</i>	18
I.2. Le site de recombinaison <i>attI</i>	18
I.3. Le promoteur P_c	18
II. Les cassettes	19
II.1. Les gènes de cassettes.....	20
II.2. Le site <i>attC</i>	20
II.3. Mouvements des cassettes	21
II.4. Expression des gènes de cassettes.....	22
III. L'intégrase d'intégron	23
III.1. Régulation de l'expression de <i>intII</i>	23
III.2. L'intégrase <i>IntI</i>	25
IV. Les différents types d'intégrons	26
IV.1. Intégrons de multirésistance (IM)	26
IV.1.a. IM de classe 1	26
IV.1.b. IM de classe 2.....	27
IV.1.c. IM de classe 3	28
IV.1.d. Autres classes d'intégrons de multi-résistance.....	29

IV.1.e. Epidémiologie des IM	29
IV.2. Les super-intégrons (SI)	31
IV.3. Origine et évolution.....	32
Chapitre II : La réponse SOS	33
I. Acteurs et mécanisme de la réponse SOS.....	33
I.1. La protéine LexA	33
I.2. La protéine RecA	35
I.3. Mécanisme de régulation par la réponse SOS.....	35
II. Le régulon SOS	37
III. Facteurs déclenchant la réponse SOS.....	38
III.1. Signaux inducteurs de la réponse SOS	38
III.2. Induction par les antibiotiques.....	40
IV. Rôle de la réponse SOS dans l'acquisition, l'expression et la dissémination de la résistance aux antibiotiques.....	41
V. Universalité de la réponse SOS.....	43
Chapitre III : Le biofilm.....	46
I. Généralités	46
II. Modèles d'étude du biofilm	48
II.1. Les bactéries modèles	48
II.2. Les modèles de culture	48
II.2.a Les biofilms en micro-plaques	49
II.2.b Systèmes permettant l'étude de biofilms matures	49
III. Formation et structure du biofilm.....	50
III.1. Etapes de formation d'un biofilm.....	50
III.2.a. Les fimbriae de type I.....	51
III.2.b. Les curli	51
III.2.c. L'antigène 43 (Ag43).....	52

III.2.d. Les pili conjugatifs	52
III.3. La matrice extracellulaire	53
III.4. Architecture	53
IV. Spécificités du mode de vie biofilm	54
IV.1. Signature génétique	54
IV.2. Modifications phénotypiques	54
V. Signaux et régulation dans la vie du biofilm	56
V.1. Rôle du di-GMPc	56
V.2. RpoS contrôle la formation du biofilm et la réponse aux stress environnementaux ...	58
V.3. CsgD, formation de biofilm et résistance au stress	59
V.4. La réponse stringente	60
V.4.a Métabolisme du (p)ppGpp	60
V.4.b Signalisation par le (p)ppGpp	61
OBJECTIFS	64
RESULTATS	67
I. Le mode de vie biofilm induit la réponse SOS et une nouvelle régulation, biofilm-spécifique, de l'intégrase d'intégron de classe 1.	68
II. Etude de l'effet $\Delta recA$: conséquences sur l'activité de recombinaison de IntI1 ou sur la fidélité de réplication au niveau des sites <i>attC</i> ?	100
II.1. Matériel et méthodes	100
II.1.a. Souches bactériennes et plasmides.	100
II.1.b. Conditions de culture	101
II.1.c. Biofilm en culture continue	101
II.1.d. Cultures planctoniques	102
II.1.e. Test d'excision	102
II.2. Résultats	103
II.2.a. Activité de IntI1 dans la souche MG1656 $\Delta recA$ F'	103
II.2.b. Activité de IntI1 dans la souche TG1 $\Delta recA$	105
II.2.c. Hypothèse du « slippage »	106
DISCUSSION	109
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	120

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	124
ANNEXES	140
Posters et communication	141
I- Posters	141
II- Communication orale	141

Résumé

Les intégrons de classe 1 sont des systèmes de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes qui codent, la plupart du temps, des résistances aux antibiotiques. Ils jouent un rôle majeur dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries à Gram négatif. Des expériences en culture planctonique ont montré que l'expression de l'intégrase, élément-clé de ce système, était sous le contrôle de la réponse SOS bactérienne. Le mode de vie privilégié des bactéries dans les environnements naturels est le biofilm, mode de vie dans lequel les bactéries adhèrent aux surfaces et entre elles, formant des structures complexes et hétérogènes. Les biofilms sont caractérisés par une résistance accrue des bactéries aux antimicrobiens, une augmentation de l'expression des gènes de réponse au stress et sont des environnements favorables aux transferts de gènes. Ces propriétés du biofilm suggèrent qu'il pourrait constituer un environnement propice à l'expression de l'intégrase.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons comparé les niveaux d'expression d'un gène du régulon SOS, le gène *sfiA* et du gène *intI1* codant l'intégrase de classe 1, IntI1_{R32_H39}, en culture biofilm et planctonique. Nos résultats montrent que dans des conditions non-induites, les niveaux d'expression de *sfiA* et de *intI1* sont augmentés en biofilm par rapport à la culture planctonique, mais qu'ils restaient inductibles *via* la réponse SOS. En corrélation avec le niveau d'expression, une plus forte activité d'excision d'IntI1_{R32_H39} est observée en biofilm. Outre sa régulation LexA-dépendante, le gène *intI1* semble aussi être soumis à une autre régulation positive, spécifique au mode de vie biofilm, et qui impliquerait RelA, un acteur majeur de la réponse stringente.

Le biofilm étant le mode de vie privilégié des bactéries dans les conditions naturelles (environnement, tractus gastro-intestinal), nos résultats indiquent que le biofilm serait un milieu propice à l'échange de cassettes de résistance *via* les intégrons.

Title : Regulation of class 1 integrons integrase expression in a biofilm model

Class 1 integrons are systems of capture and expression of gene cassettes that mostly encode antibiotic resistance. They play a major role in the dissemination of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Planktonic culture experiments showed that the expression of the integrase, the key element of integrons, is regulated by the bacterial SOS response. In natural settings bacteria mostly live as biofilm, a lifestyle where they exhibit strongly enhanced antibiotic resistance and increased expression of stress-related genes. The biofilms also favors gene transfer. All this suggests that the biofilm could be a favorable environment for integrase expression.

To verify this hypothesis, we compared both the expression and excision activity levels of the class 1 integron integrase, IntI1_{R32_H39}, in planktonic and biofilm cultures, as well as the expression of an SOS regulon gene, *sfiA*. Our results showed that under non-induced conditions, both *sfiA* and *intI1* expression levels were increased in biofilm compared to planktonic cultures, but that they could be still further induced by the SOS response. In agreement with the expression level, the cassette excision activity of IntI1_{R32_H39} was enhanced in biofilm. Besides to be regulated by LexA, *intI1* seems also to be induced by a new biofilm-specific regulation that involves RelA, a major actor of the stringent response.

Biofilm being the preferred lifestyle of bacteria in natural settings (environment, gastrointestinal tract), our results indicate that the biofilm may be a highly favorable environment for the exchange/acquisition of antibiotic resistance cassettes *via* integrons.

Index des tableaux

Table 1 : Pourcentage d'identité et de similarité entre les séquences en acides aminés des intégrases de classe 1, 2 et 3

Table 2 : Certains gènes de la réponse SOS et leurs fonctions

Table 3 : Gènes de réponse au stress impliqués dans la formation de biofilm ou induits au sein du biofilm

Table 4 : Tables des souches et plasmides utilisés dans la deuxième partie du travail

Table 5 : Effet de la mutation Y312F dans IntI1 chez une souche $\Delta recA$

Index des figures

- Figure 1 :** Relation entre l'introduction de l'antibiothérapie et le développement de la résistance aux antibiotiques par les bactéries
- Figure 2 :** Structure d'un intégron de classe 1
- Figure 3 :** Structure des sites *attI*
- Figure 4 :** Structure des sites de recombinaison *attC*
- Figure 5 :** Schéma d'insertion et d'excision de cassettes au sein d'un intégron
- Figure 6 :** Recombinaison *attI-attC* médiée par IntI1
- Figure 7 :** Séquence et organisation des promoteurs P_c et P_{intI1}
- Figure 8 :** Structure de la protéine LexA
- Figure 9 :** Structure de la protéine RecA
- Figure 10 :** Régulation de l'expression de l'intégrase par la réponse SOS
- Figure 11 :** Le « module LexA »
- Figure 12:** Signaux et mécanismes inducteurs de la réponse SOS
- Figure 13 :** Distribution des séquences des boîtes de fixation de LexA (LexA box) à travers les domaines bactériens
- Figure 14 :** Distribution des biofilms dans différents écosystèmes
- Figure 15:** Approches utilisées dans l'étude de biofilms
- Figure 16:** Etapes de la formation d'un biofilm
- Figure 17 :** Architecture du biofilm
- Figure 18 :** Structure et fonctions physiologiques du di-GMPc
- Figure 19:** Signalisation de la transduction par (p)ppGpp déclenchée chez *E. coli* suite à la privation en nutriments
- Figure 20:** Interactions entre le facteur σ^S , le régulateur CsgD et le di-GMPc
- Figure 21 :** Schéma du test d'excision
- Figure 22:** Activité de recombinaison de l'intégrase IntI1

Glossaire

°C	Degré Celsius
A	Adénine
aa	Acide aminé
Ag43	Antigène 43
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADN-sb	ADN simple brin
Ala	Alanine
Amp	Ampicilline
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ARNP	ARN polymérase
ATP	Adénosine Triphosphate
C	Cytosine
CG	Cassette de gène
DO	Densité optique
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
G	Guanine
GDP	Guanosine diphosphate
GTP	Guanosine triphosphate
Gly	Glycine
ICE	Integrative Conjugative Element (Element Conjugatif Intégratif)
IM	Intégron de Multirésistance
LB	Luria-Bertani
Lys	Lysine
pb	Paire de bases
MF	Microfermenteur
nm	Nanomètre
ORF	Open Reading Frame (cadre ouvert de lecture)
QS	Quorum-sensing
Ser	Sérine
T	Thymine
Tet	Tétracycline
UV	Ultra-violets
VCR	<i>Vibrio cholerae</i> repeats

Préambule

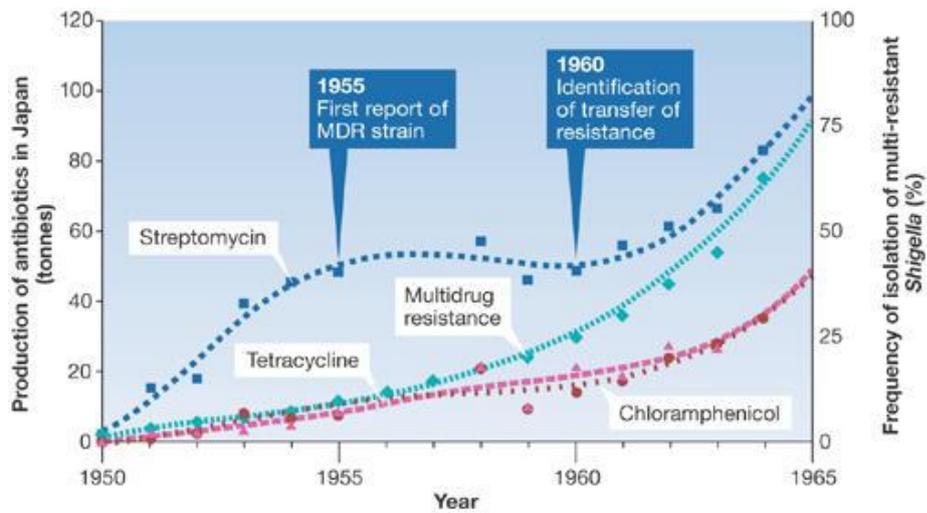


Figure 1 : Relation entre introduction de l'antibiothérapie et développement de la résistance aux antibiotiques par les bactéries.

Evolution de fréquence d'apparition chez des isolats de *Shigella* impliqués dans des dysenteries au Japon, de clones résistants ou multirésistants (MDR) en fonction de l'introduction de l'antibiothérapie entre 1950 et 1965. En 1955, première description de résistance plasmidique. (Davies, 2007)

L'histoire des antibiotiques commence en 1928 lorsque Alexander Fleming, parti en vacances, oublie dans son laboratoire une boîte de Petri contenant une culture bactérienne de *Staphylococcus*. A son retour, il constate la présence d'une moisissure (*Penicillium glaucum*) ayant empêché la croissance de bactéries (staphylocoques). Il isole par la suite la pénicilline, mais ne parvient ni à la produire, ni à la purifier en quantité suffisante et abandonne ses travaux (Andremont & Tibon-Cornillot, 2006).

Ce n'est que dix années plus tard, en 1938, que le terme d'« antibiotique » est utilisé pour la première fois par René Dubos qui isole la thyrothricine de *Bacillus brevis* (en réalité une combinaison de deux molécules s'avérant toxique pour l'homme). Un an plus tard, Howard Florey et Ernst Boris Chain reprennent les travaux de Fleming sur la pénicilline et celle-ci est utilisée dès 1944 par les soldats des armées alliées. Sa production s'accélère alors et en 1946, elle est disponible en pharmacie. De nombreuses autres molécules sont par la suite très rapidement découvertes ou synthétisées permettant de guérir des infections jusque-là fatales. Cependant, les bactéries ont su s'adapter rapidement à ces pressions de sélection en développant des mécanismes de résistance à ces antibiotiques *via* l'apparition de mutations ponctuelles au sein de leur chromosome (modification, substitution ou altération de la cible intracellulaire, modification ou expulsion de l'antibiotique).

Les premières souches multi-résistantes apparaissent dès les années 1950 (Figure 1), conséquemment à l'utilisation croissante et massive des molécules antibiotiques en médecine humaine, et à leur utilisation en production animale comme facteurs de croissance. Si l'apparition de phénotypes de résistance spécifiques à un antibiotique n'a pas été une surprise en soi, celle de phénotypes de multirésistance n'a pas été anticipée, la probabilité d'acquisition simultanée de plusieurs mutations conduisant à ces phénotypes semblant au-delà de la capacité d'évolution des bactéries. En fait, l'acquisition de multirésistances est le résultat du transfert horizontal d'ADN entre bactéries parfois très éloignées sur le plan

phylogénique. Ce transfert est très efficace et serait responsable des résistances acquises chez plus de 80% des souches résistantes isolées en clinique. Il se fait *via* des supports génétiques mobiles extrachromosomiques tels que les plasmides ou les transposons (identifiés au début des années 1950), qui servent de supports à des gènes de résistance aux antibiotiques. Les plasmides sont des molécules d'ADN indépendantes du chromosome capables d'auto-réplication et pouvant être présentes en multicopies dans la cellule. Plusieurs plasmides différents peuvent coexister au sein d'une même bactérie, et les plasmides conjugatifs sont capables de passer d'une bactérie à une autre. Les transposons sont, eux, des séquences d'ADN capables de promouvoir leurs propres transferts et intégration au sein du chromosome bactérien ou sur un plasmide, véhiculant ainsi des gènes de résistances. Ces deux éléments génétiques mobiles ont ainsi favorisé la dissémination des bactéries multi-résistantes.

En 1989, deux chercheurs australiens ont découvert un nouveau système de capture et d'expression de gènes sous forme de cassettes, qu'ils ont baptisé « intégron », et qui est considéré aujourd'hui comme jouant un rôle majeur dans les phénomènes de multi-résistance bactérienne aux antibiotiques (Stokes & Hall, 1989).

Introduction

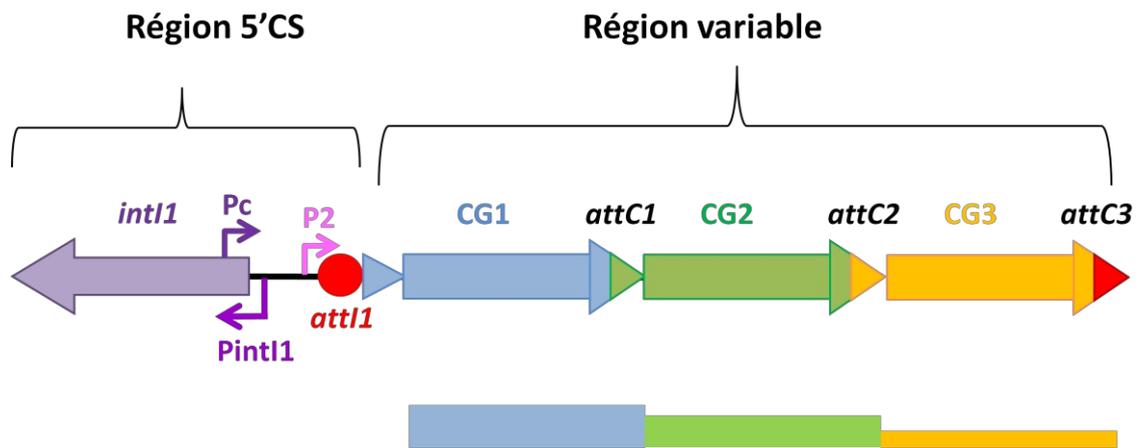


Figure 2 : Structure d'un intégron de classe 1

Elle se compose du gène *intI1* codant l'intégrase, de son propre promoteur *PintI1*, du promoteur des cassettes *Pc* ainsi que du site *attI1* au niveau duquel s'intègrent les cassettes de gènes. On peut éventuellement trouver le promoteur *P2*. Ces éléments constituent la partie 5' conservée (5'CS). Les cassettes constituent la partie variable de l'intégron, elles sont exprimées à partir du promoteur *Pc*, les plus éloignées étant les plus faiblement exprimées (l'épaisseur des traits au-dessous indique le niveau d'expression).

Chapitre I : Les intégrons

A la fin des années 1980, Hatch Stokes et Ruth Hall (Stokes & Hall, 1989) ont décrit des éléments génétiques nommés intégrons, susceptibles d'acquérir et d'exprimer des gènes sous forme de cassettes. Ces dernières sont insérées au sein d'un intégron par recombinaison spécifique de site catalysée par une intégrase (Collis & Hall, 1992). On distingue deux types d'intégrons :

- les intégrons de multirésistance (IM) portés le plus souvent par des plasmides ou des transposons. Ils contiennent peu de cassettes, qui codent pour la plupart une résistance aux antibiotiques. Ils sont connus pour leur rôle majeur dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques.

- les super-intégrons (SI) strictement chromosomiques. Ils peuvent porter plus d'une centaine de cassettes dont la plupart codent pour une fonction inconnue. Ils jouent un rôle plus large en tant que réservoir de gènes pour l'adaptation des bactéries aux pressions environnementales.

I. Structure des intégrons

Les intégrons sont définis par la présence de trois éléments-clés localisés au sein d'une plate-forme structurale, dénommée région 5' conservée (5'CS) (Bennett, 1999): un gène *intI* qui code une intégrase qui est une recombinase spécifique de site, un site spécifique de recombinaison *attI* et un promoteur Pc (pour « Promoteur des cassettes »), orienté dans le sens inverse d'*intI* et permettant l'expression des gènes contenus dans les cassettes (Figure 2).

A



B

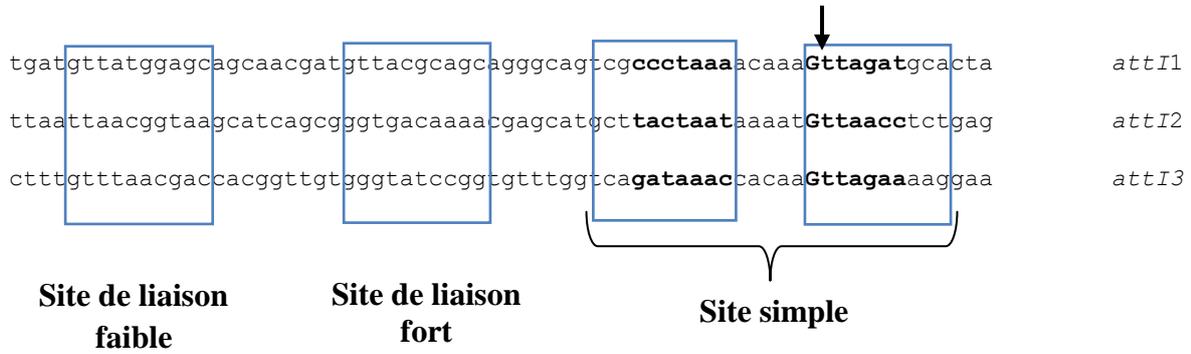


Figure 3 : Structure des sites *attI*

A / Organisation d'un site *attI* : il contient quatre sites de liaison de l'intégrase, DR1, DR2, L et R représentés schématiquement par des flèches bleues.

B / Alignement des séquences des sites *attI*₁, 2 et 3 des intégrons de classe 1 à 3. Le site simple composé des éléments L et R avec les « sites cœur » potentiels (GTTRRRY) indiqués en gras. Les sites DR1 et DR2 sont des sites secondaires d'interaction avec l'intégrase, DR1 est un site de liaison fort, indispensable à l'activité de l'intégrase, DR2 est un site de liaison faible qui sert à améliorer 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 and Hall, 2004).

I.1. Le gène *intI*

Le gène *intI* code une intégrase dont la séquence en acides aminés définit cinq classes d'intégrons chez les IM (Hall & Collis, 1995), classes dont nous reparlerons plus tard (cf. paragraphe III.1). Ce gène est transcrit à partir de son propre promoteur *PintI*, qui est orienté inversement aux cassettes contenus dans l'intégron (Figure 2).

I.2. Le site de recombinaison *attI*

Le site *attI* est composé de 63 paires de bases (suffisantes pour l'activité de recombinaison) et sa séquence est très variable d'une classe d'intégron à l'autre : il existe autant de sites *attI* que de gènes *intI* (Collis *et al.*, 1998) (le site *attI1* est associé au gène *intI1*, *attI2* au gène *intI2* et *attI3* au gène *intI3* pour les intégrons de classe 1 à 3). Malgré sa variabilité de séquence, le site *attI* est organisé en au moins deux sites de liaison de l'intégrase : la boîte R et la boîte L (constituant le « site simple »). Pour *attI1* il y également deux autres sites qui participent à la fixation d'IntI1: le site de fixation fort (DR1) et le site de fixation faible (DR2) (Figure 3). Ces derniers serviraient à conserver IntI1 près des sites cœur (boîte R) et cœur inverse (boîte L), lieu où se produit la recombinaison entre les sites *attI* et *attC* (Partridge *et al.*, 2009) (Figure 3). La recombinaison des cassettes a lieu au niveau d'un motif de sept paires de bases conservé entre les différentes classes d'intégrons, la boîte R de consensus GTTRRRY (R : purine ; Y : pyrimidine), entre le G et le premier T.

I.3. Le promoteur *Pc*

A l'exception de quelques rares cassettes, l'expression des gènes contenus dans les cassettes se fait à partir du promoteur *Pc* situé dans la région 5'CS. Le promoteur de cassettes le plus étudié est celui des intégrons de classe 1. Ce promoteur, *Pc*, est situé dans la région codante d'*intI1*, plus de 200 paires de bases en amont de la première cassette (Figure 2)

(Levesque *et al.*, 1994). Treize variants de Pc ont été identifiés sur la base des éléments promoteurs -10 et -35, et du motif « -10 étendu » (motif 5'-TG-3' localisé une base en amont de l'élément -10 créant un point de fixation supplémentaire pour l'ARN polymérase (Burr *et al.*, 2000 ; Jove *et al.*, 2010). De plus, dans environ 10 % des intégrons de classe 1 (analyse *in silico*), le Pc est associé à un second promoteur actif, P2, créé par insertion de 3 bases G entre deux boîtes -10 et -35 potentielles situées dans le site *attI* (Figure 2) (Levesque *et al.*, 1994). Ainsi il existe à ce jour, pas moins de 20 combinaisons Pc-P2 qui contrôlent l'expression des cassettes. La fréquence de ces combinaisons est très variable, cinq d'entre elles représentant 75 % des 321 combinaisons analysées *in silico*, et définissant 5 forces de promoteur, avec par ordre de fréquence croissante : PcW-P2<<PcW, PcW_{TGN-10}<PcS, PcH1 (respectivement 4,4 ;16,5 ;16,8 ;24,3 et 28% d'un ensemble de 321 séquences analysées *in silico*) et par force croissante : PcW< PcH1< PcW-P2< PcW_{TGN-10}< PcS (respectivement 4.5-, 7-, 15- et 25-fois plus actif que le promoteur dit faible, PcW) (Jove *et al.*, 2010).

Chez les IM de classe 3, le promoteur Pc est également localisé dans la séquence codante de l'intégrase (Correia *et al.*, 2003). Chez les IM de classe 2, un promoteur Pc a récemment été identifié par analyse *in silico*. Contrairement aux intégrons des classes 1 et 3, le promoteur Pc ne se trouve pas dans la séquences de l'intégrase mais au niveau du site *attI2* qui a la particularité d'être deux fois plus long que les sites *attI1* et *attI3* (da Fonseca *et al.*, 2011).

II. Les cassettes

Elles constituent la partie variable de l'intégron et sont insérées en aval de la plateforme fonctionnelle. Elles sont constituées d'un cadre ouvert de lecture et d'un site spécifique de recombinaison, *attC*, localisé en 3' du gène et reconnu par l'intégrase IntI. Les cassettes peuvent exister transitoirement sous forme libre circulaire ou intégrées dans un intégron

A



B

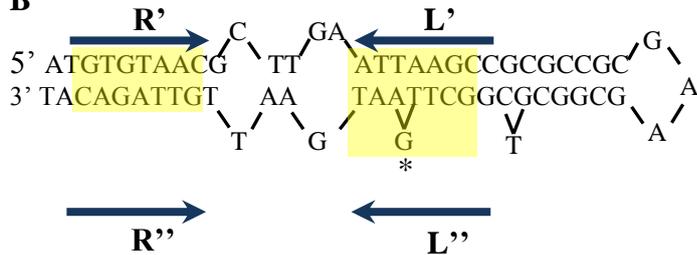


Figure 4 : Structure des sites de recombinaison *attC*

A. Séquence double-brin du site *attC* de la cassette *aadA7*.

B. Structure secondaire de l'ADN simple brin, brin du bas (« bottom strand »).

Les séquences inversées répétées (L'-L'' et R'-R'') sont indiquées par des flèches bleues, l'astérisque montre l'emplacement de la base G protubérante présente dans séquence L''. Les domaines de liaison de l'intégrase IntI sont délimités par les cadres jaunes. La flèche verticale indique le point de recombinaison. D'après (Mazel, 2006).

(Figure 2). Les IM hébergent en moyenne 2 à 3 cassettes et jusqu'à 10 ont été décrites au sein d'un même IM (numéro d'accèsion dans la GenBank : KC170993). Certains IM n'en possèdent pas.

II.1. Les gènes de cassettes

La plupart des gènes des cassettes d'IM codent des résistances à un ou plusieurs antibiotiques, d'autres codant des protéines de fonctions inconnues. En 2009, une revue australienne recense au sein des IM, 132 cassettes codant des résistances à des antibiotiques et 62 cassettes codant des protéines de fonctions inconnues (Partridge *et al.*, 2009). Quasiment toutes les familles d'antibiotiques sont concernées : β -lactamines (*bla_P*, *bla_{OXA}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*...), aminosides (*aacA*, *aacC*, *aadA*, *aadB*...), triméthoprimine (*dfrA* et *dfrB*), chloramphénicol (*catB*, *cmlA*, *cmlB*), fosfomycine (*fos*), macrolides (*ere*), lincosamides (*lin*), rifampicine (*arr*), quinolones (*qnrVC* et *acc(6')-Ib-cr*). Les cassettes *qac* confèrent la résistance aux ammoniums quaternaires.

II.2. Le site *attC*

C'est un site spécifique de recombinaison reconnu par l'intégrase IntI. Chez les IM, un site *attC* est propre à une cassette. De structure complexe, les sites *attC* des différents IM n'ont en commun que deux triplets AAC et GTT respectivement en 5' et 3' des sites. Ils contiennent deux sites cœurs potentiels appelés R''-L'' et R'-L' (ou R2-L2 et R1-L1) correspondant à des séquences inversées répétées de sept paires de bases (de séquence consensus GTTRRRY pour R' et RYYYAAC pour L'). Ces deux « sites » sont séparés par une région centrale (Figure 4A). Chez les IM, cette région centrale est très variable, en séquence et en taille (allant de 57 à 141 pb), d'une cassette à l'autre en fonction du gène

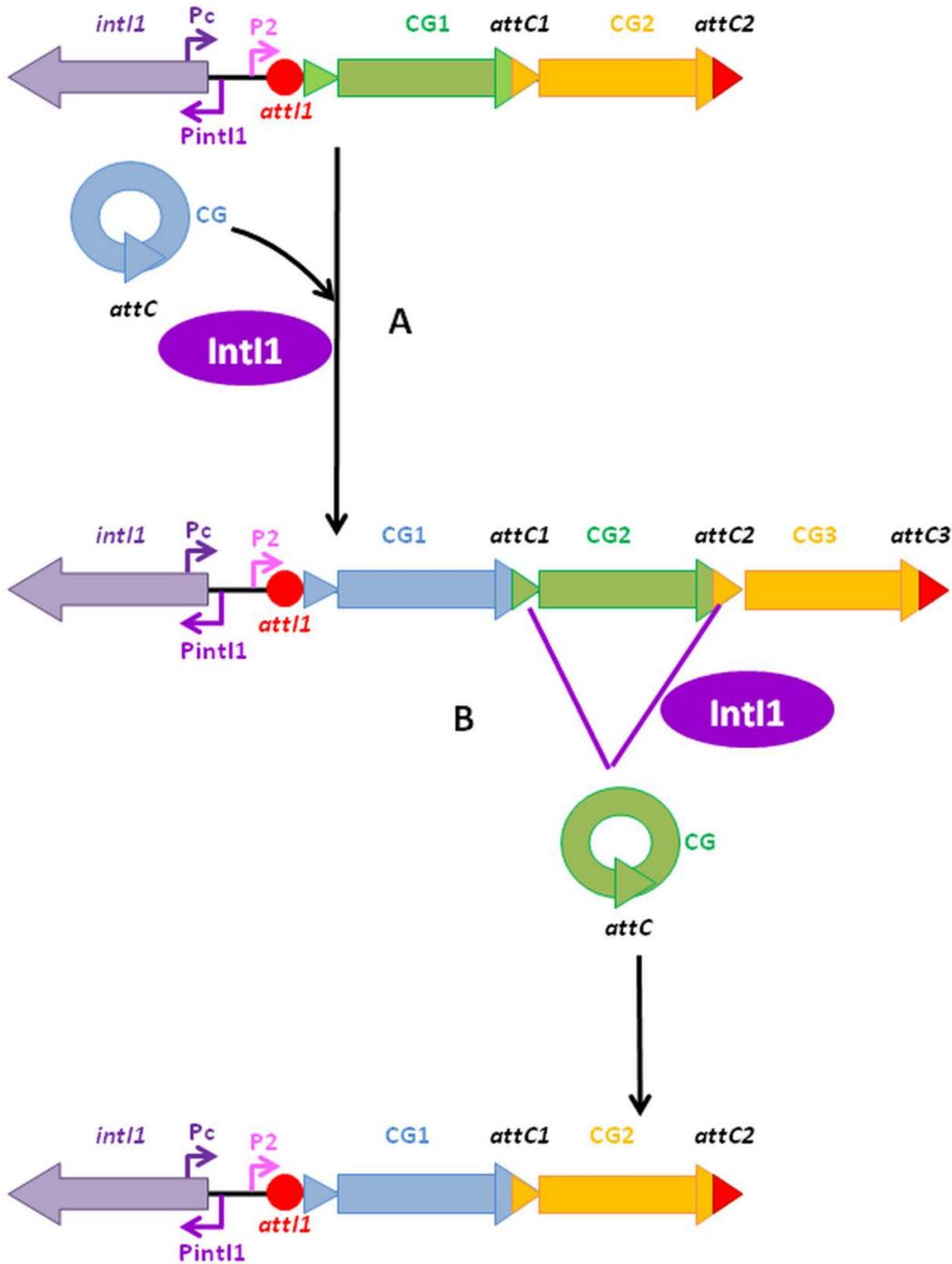


Figure 5 : Schéma d'insertion et d'excision de cassettes au sein d'un intégron de classe 1

L'intégrase catalyse aussi bien l'insertion (A) que l'excision (B) d'une cassette de gène au sein d'un intégron. **A/** insertion sous forme linéaire d'une cassette circulaire par recombinaison entre le site *attI* de l'intégron et le site *attC* de la cassette. **B/** excision d'une cassette de gène par recombinaison entre deux sites *attC*. *Pc* : promoteur des cassettes ; *Pint* : promoteur de l'intégrase ; *attI*, *attC* : sites de recombinaison ; *CG* : cassette de gène.

auquel elles sont associées (Stokes *et al.*, 1997). Chez les super-intégrons, les sites *attC* (d'un même SI) présentent un fort degré d'identité les uns par rapport aux autres (>80%), et sont nommés en fonction de la bactérie qui les héberge par exemple sites *attC*_{VCRs} (VCR pour *Vibrio cholerae* repeats) (Mazel, 2006).

Les régions R'' et L'' sont respectivement complémentaires des régions R' et L' conduisant à la formation de structures cruciformes en tige-boucle par auto-repliement de chaque brin (Figure 4B). Le site L'' comprend une base supplémentaire (G) par rapport au site L', il se crée donc un mésappariement repoussant cette base G vers l'extérieur (Figure 4B). Cette base est essentielle à la reconnaissance du brin à recombinaison par l'intégrase (Johansson *et al.*, 2004, Bouvier *et al.*, 2005). Il a été montré que IntI1 interagit avec le site *attC* sous forme simple brin, et spécifiquement avec le brin du bas (bottom strand) (Bouvier *et al.*, 2005).

II.3. Mouvements des cassettes

L'intégrase IntI est capable, par des réactions de recombinaisons spécifiques au niveau des sites *attI* et *attC*, de catalyser des réarrangements de cassettes au sein d'un intégron ou entre deux intégrons. La réaction d'excision se fait préférentiellement entre deux sites *attC* (Figure 5B) tandis que l'intégration d'une cassette au sein d'un intégron se fait par recombinaison entre le site *attI* et le site *attC* (Figure 5A) la cassette étant ainsi insérée au plus près du promoteur Pc, position la plus favorable à son expression (Collis *et al.*, 2001).

Les recombinaisons d'excisions ou d'intégrations se font toujours entre deux sites sous configuration double brin. Dans le cas du site *attC* il s'agit toujours de sa configuration de repliement tige-boucle du brin inférieur (une structure double brin) (MacDonald *et al.*, 2006, Bouvier *et al.*, 2005). La recombinaison se fait selon le schéma suivant : coupure d'un premier brin d'ADN sur chacune des deux molécules double brin, puis échange des brins clivés et enfin ligature, ce qui aboutit à la formation d'une pseudo jonction de Holliday. Cette

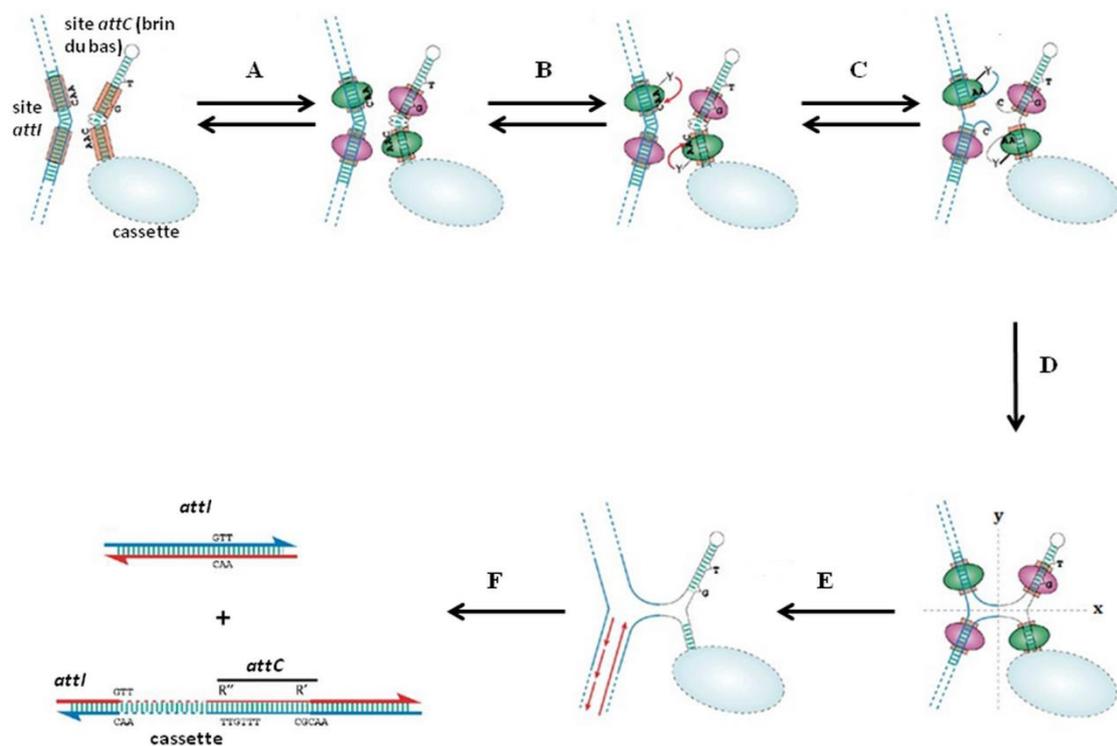


Figure 6: Recombinaison *attI-attC* médiée par IntI1

Les étapes sont identiques à celles classiques de la recombinaison site-spécifique catalysées par les tyrosine-recombinases jusqu'à l'intermédiaire jonction de Holliday.

A/ Les domaines de liaisons R et L de IntI1 du site *attI* double-brin et du site *attC* (brin du bas) sont encadrés (pour des raisons de clarté seul le brin du bas d'*attC* dans sa configuration de repliement tige-boucle est représenté) **B/** Liaison des 4 monomères de IntI1 au site cœur. En vert sont représentés les monomères correspondant aux sous-unités d'« attaque », en rose les sous-unités « non attaquantes ». **C/** Les sous-unités d'« attaque » clivent le brin d'ADN avec la tyrosine catalytique 302 pour former des liaisons 3'-phosphotyrosine (**D**) et libérer des groupes 5'-hydroxyle libres. **E et F/** Les groupes 5'-hydroxyle subissent l'attaque intermoléculaire de la phosphotyrosine partenaire pour compléter l'échange d'une paire de brins d'ADN entre les deux substrats, et former une jonction de Holliday. La résolution de cette jonction selon l'axe « y » aboutit, après réplication, à la production d'un site *attI* reconstitué à l'identique, et d'un *attI* modifié car ayant intégré la cassette de gène *via* la recombinaison avec le site *attC*. L'axe « x » est abortif, probablement à cause de la trop forte proximité des molécules dans l'espace. La résolution non-abortive nécessite une étape de réplication. Les brins d'ADN représentés en rouge sur la dernière image sont les brins nouvellement synthétisés. D'après (Mazel, 2006).

jonction ne peut être résolue par l'échange du deuxième brin, car la structure tige-boucle du brin inférieur d'un site *attC* étant impliquée dans la réaction de recombinaison, cela entraînerait une linéarisation du réplicon transportant l'intégron (Demarre *et al.*, 2007). Il a été démontré qu'il se produisait plutôt un phénomène de réplication de l'ADN générant ainsi trois produits dont l'un contient la cassette insérée (Bouvier *et al.*, 2005, Loot *et al.*, 2012) (Figure 6).

II.4. Expression des gènes de cassettes

Les cassettes sont toutes orientées dans la même direction et ne contiennent pas, à de rares exceptions près, de promoteur : les gènes sont donc co-transcrits comme dans un opéron sous la dépendance du promoteur *P_c* localisé dans la région 5' conservée de l'intégron (Figure 2). Il a été montré que l'expression d'une cassette était significativement influencée par sa position dans l'intégron, les cassettes éloignées du promoteur étant les plus faiblement exprimées (Collis & Hall, 1995). Cette propriété des intégrons peut donc conduire à sous-estimer le niveau de résistance aux antibiotiques d'une bactérie lors de son analyse phénotypique. Ainsi une cassette éloignée du promoteur peut ne pas être exprimée, et la bactérie portant l'IM contenant cette cassette paraîtra sensible à l'antibiotique dont la résistance est codée par le gène de cassette non exprimé. Sous la pression de sélection exercée par l'antibiotique, l'expression de l'intégrase peut être induite, conduisant à des réarrangements de cassettes favorisant la formation de réseaux dans lesquelles une cassette initialement en dernière position est rapprochée du *P_c*, et la bactérie initialement sensible devient alors résistante, alors qu'elle avait été identifiée comme sensible.

Certaines cassettes ne sont pas équipées de région TIR (« translation initiation region » : région d'initiation de la traduction) (Hanau-Bercot *et al.*, 2002) et dans ce cas

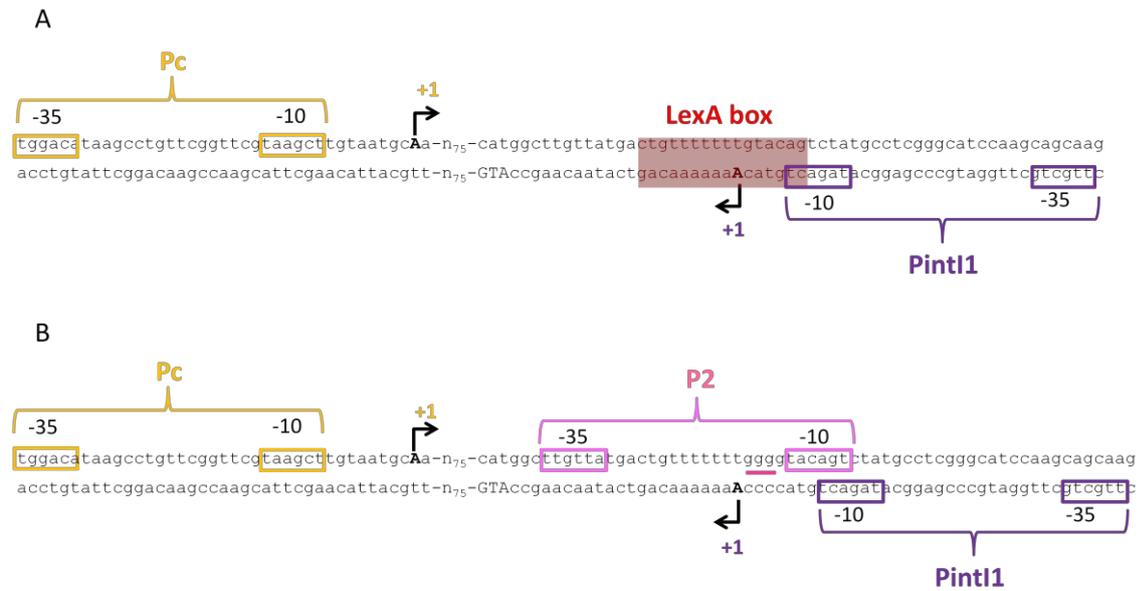


Figure 7 : Séquence et organisation des promoteurs Pc et PintI1

A/ Représentation de la région de l'intégron de classe 1, In40, contenant les régions promotrices des cassettes Pc, et de l'intégrase, PintI1. Les éléments -10 et -35 sont encadrés en violet pour PintI1 et en jaune pour Pc. Les +1 de transcription sont également indiqués par une flèche, selon le même code couleur et par une lettre en majuscule (en gras). Le site de fixation de LexA est encadré en rouge. Le codon d'initiation de la séquence codante de l'intégrase est indiqué en caractères majuscules. **B/** Organisation de la région promotrice ci-dessus lorsque le promoteur de cassette, P2, est présent. Les éléments -35 et -10 sont encadrés en rose pour P2. Les 3 bases insérées créant P2 sont soulignées en rose ; cette insertion inactive le site de fixation de LexA. (Guérin, Jové *et al.*, 2011).

l'initiation se fait au niveau d'un cadre ouvert de lecture court (ORF11) qui possède une région TIR efficace, présente au sein de la partie 5' de l'intégron.

Le niveau d'expression des gènes de cassettes pourrait aussi dépendre des sites *attC*. Ils agiraient comme des atténuateurs traductionnels, leurs structures tige-boucle pouvant en effet gêner la progression du ribosome le long de l'ARNm (Jacquier *et al.*, 2009).

III. L'intégrase d'intégron

III.1. Régulation de l'expression de *intI1*

Ce n'est qu'en 2009 qu'un promoteur d'intégrase d'intégron a été caractérisé. Cette année-là, une analyse détaillée du promoteur PintI1 de l'intégrase d'intégron de classe 1, a permis de mettre en évidence au laboratoire, l'existence d'un site de fixation de la protéine LexA au sein de cette région promotrice (Figure 7A). LexA est le répresseur transcriptionnel de la réponse SOS (cette dernière sera développée dans le chapitre II). Diverses approches expérimentales - mesure de l'activité des promoteurs de l'intégrase d'intégron de classe 1 IntI1 et de l'intégrase de *Vibrio cholerae* IntIA, dans divers fonds génétiques (sauvage, $\Delta lexA$, $\Delta recA$) , *via* l'utilisation de fusions transcriptionnelles avec un gène rapporteur *lacZ*, et estimation de l'activité de recombinaison des intégrases - ont permis de montrer que l'expression des intégrases IntI1 et IntIA est régulée par la réponse SOS (Guerin *et al.*, 2009). La découverte de cette régulation a alors permis de caractériser le promoteur PintI1 dans une souche délétée du répresseur LexA : le site d'initiation de la transcription (+1) du gène *intI1* est un résidu A situé 22 pb en amont du codon start d'*intI1* (Figure 7) (Guérin, Jové *et al.*, 2011).

La comparaison des sites *attI* des 3 classes principales d'IM et des SI de *Vibrio cholerae* avait montré que le site de fixation de LexA était conservé chez ces divers intégrons

(Guérin, Cambray *et al.*, 2009). Une analyse *in silico* a depuis identifié un site de fixation de LexA dans la région promotrice de plus de 600 intégrases d'intégrons différentes, suggérant que l'apparition du contrôle de l'expression de l'intégrase par la réponse SOS serait très ancien, l'ancêtre commun des intégrases possédant très certainement un site de fixation pour LexA (Cambray *et al.*, 2011). Toutefois, la présence d'un site LexA ne suffit pas à conclure qu'*in vivo* la régulation LexA est bien réelle. Des approches de retard sur gel ont ensuite permis de montrer que le site de fixation potentiel de LexA présent dans *attII* est bien reconnu par la protéine LexA (Guérin, Cambray *et al.*, 2009).

De nouvelles régulations du promoteur des intégrases d'intégrons ont été récemment identifiées. Baharoglu et collaborateurs ont ainsi montré que la protéine CRP (Protéine réceptrice d'AMP cyclique) pouvait réguler l'expression de l'intégrase IntIA (IntI4) de *Vibrio cholerae* et un site de fixation à la protéine CRP a été mis en évidence dans la région promotrice du gène *intIA* (Baharoglu *et al.*, 2012). Cagle et collaborateurs ont quant à eux proposé que les protéines associées aux protéines du nucleoïde, FIS (Factor for Inversion Stimulation) et H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring protein), contribueraient comme régulateurs négatifs de l'expression de l'intégrase des intégrons de classe 1 (Cagle *et al.*, 2011). FIS et H-NS interviennent respectivement en phase exponentielle précoce et tardive (Ali Azam *et al.*, 1999). Ces protéines, aussi appelées « histone-like », par homologie aux protéines eucaryotes, reconnaissent des séquences d'ADN spécifiques et sont connues pour avoir des rôles d'activation ou de répression de la transcription chez *E. coli* (Browning *et al.*, 2008).

En plus des régulations *via* des protéines régulatrices, le promoteur de l'intégrase PintI1 peut aussi, dans certains cas, être régulé par un phénomène d'interférence transcriptionnelle. En effet, PintI1 et le promoteur des cassettes, Pc, se font face (Figure 2) pouvant ainsi créer une interférence entre ces deux promoteurs. L'existence d'une telle

interférence a été récemment démontrée, mais seul le variant fort de Pc, PcS, (*cf* chapitre I.4), est capable d'inhiber l'expression d'*intI*, et ce, même lorsque celle-ci est induite par la réponse SOS, les autres variants du promoteur Pc, n'ayant aucune influence sur l'expression de l'intégrase (Guérin, Jové *et al.*, 2011).

III.2. L'intégrase IntI

L'intégrase IntI est au cœur du système intégron, elle permet en effet la capture et l'insertion des gènes contenus dans les cassettes. Cette intégrase appartient à la famille des tyrosine-recombinases ou Lambda-intégrases, qui constituent avec les résolvases-invertases, la super-famille des recombinaisons spécifiques de site. Cette super-famille a été identifiée chez des bactéries et champignons. La famille des tyrosines-recombinases inclut plus de 100 membres, qui bien que n'ayant que peu d'identité de séquence, ont toutefois un mécanisme d'action commun, proche de celui des topoisomérases I (Argos *et al.*, 1986, Gopaul & Duyne, 1999, Grainge & Jayaram, 1999). Les membres de cette famille possèdent quatre résidus conservés « Arginine-Histidine-Arginine-Tyrosine » localisés dans la partie carboxyle de la protéine, au niveau de deux régions appelées *box I* (contenant le premier résidu arginine) et *box II* (contenant les trois autres résidus). Elles possèdent également trois motifs conservés : patch I, II et III semblant jouer un rôle dans la structure secondaire de ces enzymes (Messier & Roy, 2001). Les intégrases d'intégrons, contrairement aux autres tyrosine-recombinases possèdent un groupe supplémentaire de résidus aux environs du patch III qui pourrait jouer un rôle dans la liaison à l'ADN et dans l'activité de recombinaison (Messier & Roy, 2001).

Les intégrases d'intégrons reconnaissent deux types distincts de sites de recombinaison spécifiques : les sites *attI* adjacents au gène *intI* et les sites *attC* présents à l'extrémité des cassettes. Elles peuvent catalyser aussi bien des réactions de recombinaisons entre sites *attI* x *attC* (intégration) qu'entre sites *attC* x *attC* (excision). Il existe une forte

Table 1 : Pourcentage d'identité et de similarité entre les séquences en acides aminés des intégrases de classe 1, 2 et 3.

Intégrase	Int1	Int2	Int3
Int1	100	46,5 ^(a)	59,6 ^(a)
Int2	63	100	46,3 ^(a)
Int3	72,8	59,7	100

^(a) : en bleu % d'identité. ^(b) : en vert % de similarité.

D'après (Hall, Collis *et al.*, 1999)

spécificité des intégrases pour leur site *attI* mais des recombinaisons peuvent intervenir de façon moins efficace avec les sites *attI* d'autres classes d'IM. IntI1 reconnaît ainsi très bien les sites *attI3*, par contre le site *attI1* n'est pas bien reconnu par IntI3 (Collis *et al.*, 2002b). En revanche, il n'existe pas de spécificité des différentes intégrases pour leurs sites *attC*, différents sites *attC* pouvant être reconnus par les différentes intégrases (Collis *et al.*, 2002b).

IV. Les différents types d'intégrons

IV.1. Intégrons de multirésistance (IM)

Les IM contiennent essentiellement des cassettes de gènes codant des résistances aux antibiotiques. Ils sont en général associés à des éléments mobiles tels que les plasmides ou les transposons, et sont parfois appelés « intégrons mobiles ». Ils sont largement impliqués dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Martinez-Freijo *et al.*, 1998, Leverstein-van Hall *et al.*, 2003, Daikos *et al.*, 2007). Il existe 5 classes différentes d'IM définies selon la séquence en acides aminés de leur intégrase. Les classes 1, 2 et 3 regroupent la grande majorité des intégrons décrits, et leurs intégrases respectives, IntI1, IntI2 et IntI3 présentent une très forte identité (Table 1).

Un doctorant du laboratoire, Thomas Jové, a contribué à la création d'une base de données dédiée aux intégrons : INTEGRALL. C'est un outil disponible gratuitement qui fournit un accès facile aux séquences d'ADN d'intégrons et aux arrangements génétiques au sein de ces intégrons (<http://integrall.bio.ua.pt/>) (Moura *et al.*, 2009).

IV.1.a. IM de classe 1

Ce sont les intégrons les plus répandus et les plus étudiés. Ils ont été les premiers découverts. Leur séquence 3' est généralement conservée (on parle alors de la région 3'CS),

notamment chez les intégrons d'origine clinique (Gillings *et al.*, 2008). Cette région 3'CS est constituée du gène *qacEΔ1* (codant une résistance aux ammoniums quaternaires), du gène *sulI* (codant une résistance aux sulfamides) et de la séquence *orf5* (codant une acétyltransférase de fonction inconnue). Ils ont souvent été associés au transposon Tn21. De nombreux intégrons de classe 1 différents ont été décrits, et une grande proportion des gènes de cassettes codant des résistances aux antibiotiques identifiés à ce jour a été décrite au sein de ces intégrons (Partridge *et al.*, 2009). Il est maintenant bien démontré que la multirésistance aux antibiotiques est associée à la présence d'intégrons de classe 1 (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 différentes séquences de Pc, correspondent différentes séquences d'intégrases d'activité variable (Jové *et al.*, 2010). Ainsi chez les intégrons de classe 1, il existe trois principaux variants de l'intégrase qui présentent des activités d'excision différentes (de la moins active à la plus active : IntI1_{P32_H39}, IntI1_{R32_N39} et IntI1_{R32_H39}), l'activité d'intégration elle ne variant que peu d'une intégrase à l'autre (Jové *et al.*, 2010). Il existe chez ces intégrons un équilibre entre niveau d'expression de cassette et activité d'excision de l'intégrase : plus le promoteur des cassettes est faible et plus l'activité de l'intégrase est forte (Jové *et al.*, 2010). La relation étroite entre l'aptitude des intégrons de classe 1 à recombiner et exprimer des cassettes de gènes peut être un élément-clé dans la compréhension de l'évolution à court terme des intégrons.

IV.1.b. IM de classe 2

La plupart des intégrons de classe 2 présente un réseau de cassettes très stable : *dfrA1* (résistance au triméthoprim), *sat2* (résistance à la streptothricine) et *aadA1* (résistance à la

streptomycine et à la spectinomycine), suivies d'une séquence *orfX* associée à un site *attC* tronqué. Des publications plus récentes font état d'intégrons de classe 2 avec des réseaux de cassettes différents avec une cassette *ere(A)* (Biskri & Mazel, 2003) ou *aadB* et *catB2* (Barlow & Gobius, 2006) par exemple.

Cette faible diversité du réseau de cassettes est vraisemblablement due au fait que l'intégrase IntI2 est non fonctionnelle, le gène *intI2* étant interrompu par un codon stop interne TAA (Hansson *et al.*, 2002). L'association des IM de classe 2 au transposon Tn7 leur assure néanmoins une mobilité importante (Lichtenstein & Brenner, 1982, Wolkow *et al.*, 1996). En 2006, deux souches bovines de *Providencia stuartii* porteuses d'un IM de classe 2, ont été identifiées mais, contrairement à ce qui est communément observé, la séquence d'*intI2* de cet IM n'est pas interrompue par un codon stop prématuré (le codon stop est remplacé par un codon glutamine), et permettrait ainsi l'expression d'une protéine IntI2 fonctionnelle (Barlow & Gobius, 2006). Un nouvel intégron de classe 2 avec une intégrase fonctionnelle a été identifié en 2008 chez une souche d'*E. coli* isolée de l'urine d'un patient (Marquez *et al.*, 2008).

IV.1.c. IM de classe 3

Ils sont plus rares et à l'heure actuelle moins d'une dizaine de publications font état de leur description. Ils sont caractérisés par une intégrase IntI3 fonctionnelle capable tout comme IntI1 d'effectuer des recombinaisons entre un site *attI* et un site *attC* ou entre deux sites *attC*, mais les fréquences observées sont significativement plus faibles (Collis *et al.*, 2002a). Ils associent une cassette de résistance aux β -lactamines à une cassette *aacA4* (résistance à la tobramycine, à la nétilmicine et à l'amikacine). La première découverte a eu lieu au Japon en 1995 chez une souche de *Serratia marcescens* résistante aux carbapénèmes (*bla*_{IMP-1}) (Arakawa *et al.*, 1995). D'autres IM de classe 3 contenant des cassettes de résistance aux

antibiotiques ont ensuite été découverts chez trois souches cliniques de *Pseudomonas putida* (Shibata *et al.*, 2003), de *Klebsiella pneumoniae* (Correia *et al.*, 2003), et de *E. coli* (Poirel *et al.*, 2010), et deux souches environnementales de *Delftia* (Xu *et al.*, 2007) pour lesquelles les cassettes de gènes codent des protéines de fonctions inconnues. En 2013, une publication du laboratoire rapporte l'IM de classe 3 *intI3*-*bla*_{OXA-10}-*aacA4* (résistance aux pénicillines et aux aminosides) chez une souche de *Enterobacter cloacae* isolée d'un effluent hospitalier (Barraud *et al.*, 2013).

La détection des IM de classe 3 en quantité importante à partir d'ADN extraits de souches de l'environnement (effluents) suggère qu'ils jouent un rôle bien plus important dans l'environnement qu'en milieu clinique (Moura *et al.*, 2010, Stalder *et al.*, 2013).

IV.1.d. Autres classes d'intégrons de multi-résistance

Les intégrons de classes 4 et 5 ont été identifiés *via* leur implication dans la résistance au triméthoprim et ont été décrits chez des espèces du genre *Vibrio*, associés à des transposons conjugatifs. Un seul intégron pour chacune de ces classes a été décrit à ce jour. L'intégron de classe 4 est trouvé chez *V. cholerae*, il est associé à l'élément conjugatif intégratif SXT, et contient cinq cassettes dont quatre codent pour des fonctions inconnues (Hochhut *et al.*, 2001). La classe 5 est associée au plasmide pRSV1 de *V. salmonicida* (Boucher *et al.*, 2006): cet intégron comporte sept cassettes dont six codent pour des fonctions inconnues.

IV.1.e. Epidémiologie des IM

La quasi-totalité des IM décrits sont hébergés par des bactéries à Gram négatif (BGN), et quasiment toutes les espèces de la famille des *Enterobacteriaceae* sont concernées : *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Salmonella* et *Shigella*, *Shigella sonnei* étant un hôte fréquent des IM de classe 2. Quelques descriptions existent chez d'autres *Enterobacteriaceae*

mais restent rares (*Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter*, *Yersinia*,...). *Pseudomonas aeruginosa* et *Acinetobacter baumannii* sont des hôtes fréquents (pour revue (Barraud & Ploy, 2011)). Seulement une dizaine de publications font état de la description d'IM (de classe 1 principalement) chez les bactéries à Gram positif (*Mycobacterium fortuitum*, *Corynebacterium*, *Arcanobacterium pyogenes* et *Arthrobacter*). Des travaux portant sur la litière de volailles montrent que ces bactéries à Gram positif constitueraient un réservoir majeur d'IM (Nandi *et al.*, 2004). Des travaux chinois ont aussi montré leur présence dans des souches de *Staphylococcus*, *Enterococcus* et *Streptococcus* (d'importance majeure sur le plan médical) (pour revue (Barraud & Ploy, 2011)).

Les IM de classe 1 à 3 sont retrouvés dans l'environnement avec une très large répartition et de fortes prévalences. Ainsi on les retrouve dans les eaux et les sols, avec des prévalences pouvant atteindre 30 à 40 %, notamment au niveau des bactéries isolées des eaux de stations d'épuration (Moura *et al.*, 2010, Ferreira da Silva *et al.*, 2007, Stalder *et al.*, 2012). On les retrouve également au niveau du monde animal chez des bactéries commensales ou pathogènes isolées de nombreux animaux domestiques ou sauvages (chien, cheval, animaux de zoo, tortue, mouette ...), ainsi qu'en pisciculture ou aquaculture. Le plus grand réservoir concerne les animaux de la ferme : le bétail, les porcs, la volaille. Chez la volaille, la prévalence en intégrons atteint près de 50%, et peut atteindre 100% si on considère les bactéries de la litière du poulet. Si l'on s'intéresse aux produits dérivés de la viande, les prévalences en IM sont souvent supérieures à 50% (pour revue (Barraud & Ploy, 2011)).

En microbiologie humaine, des centaines de publications décrivent la présence d'IM chez des souches cliniques isolées à partir de divers prélèvements. La présence d'IM pose un problème majeur en pratique clinique car elle est associée à une plus grande résistance aux antibiotiques. Il est difficile d'évaluer dans ce cas leur prévalence, mais concernant les BGN isolées d'infection urinaire, les prévalences décrites sont supérieures à 50%, pour les BGN

isolées d'hémocultures les taux sont de l'ordre de 10% (Heir *et al.*, 2004). Si on considère les bactéries multirésistantes, les prévalences en intégrons sont alors beaucoup plus importantes, atteignant 60 à 70% (Leverstein-van Hall *et al.*, 2003, Rao *et al.*, 2006).

IV.2. Les super-intégrons (SI)

Des études ont examiné la relation pouvant exister entre les cassettes de gènes capturées par les IM et des séquences répétées ayant une organisation similaire et identifiées sur le chromosome 2 de *V. cholerae*, appelées VCR (pour *Vibrio cholerae* repeats) (Barker *et al.*, 1994). Cela a mené à la description d'un nouveau type d'intégron, nommé Super-intégron ou SI (Mazel *et al.*, 1998). En effet, si cet intégron codait une intégrase spécifique, VchIntIA, proche de celle codée par les IM, il présentait des différences notables : (i) cet intégron est associé à un grand nombre de cassettes (variant de 72 à 200 (Mazel *et al.*, 1998) alors qu'un IM n'en contient que quelques unes) ; (ii) les gènes de cassettes ne codent pas ou codent peu pour des résistances aux antibiotiques, mais codent pour des facteurs de virulence, des fonctions métaboliques, de nombreuses activités enzymatiques, ainsi qu'un grand nombre de fonctions inconnues ; (iii) les sites *attC* de ces cassettes, nommés VCRs, présentent un fort degré d'identité entre eux (>80%) contrairement aux sites *attC* des IM ; (iv) cette structure est localisée sur le chromosome, sans être associée à aucun élément mobile (Heidelberg *et al.*, 2000). Depuis, de nombreux SI ont été identifiés sur le chromosome de différentes espèces ou genres : *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Shewanella*, *Vibrio*,... (pour revue (Mazel, 2006)). Un IM est potentiellement capable de recruter directement une cassette de gène à partir d'un SI et d'acquérir ainsi un phénotype de résistance à un antibiotique (Rowe-Magnus *et al.*, 2002). Les SI représentent ainsi un formidable réservoir de gènes permettant aux bactéries de s'adapter rapidement aux pressions environnementales.

IV.3. Origine et évolution

Les IM et les SI ont des organisations structurales identiques, et le fait que les SI soient plus anciens (la comparaison de la phylogénie des gènes d'*IntI* des SI et de leur organismes-hôtes montre une co-évolution ancienne de ces structures) suggère qu'ils pourraient être les ancêtres des IM. Cette hypothèse est étayée par diverses observations. Douze cassettes de résistances différentes trouvées chez des IM de classe 1 présentent des sites *attC* presque identiques aux sites *attC* localisés sur les SI des espèces *Xanthomonas* et *Vibrio* (Rowe-Magnus *et al.*, 2001). Ainsi, il est aujourd'hui proposé que les IM auraient évolué à partir des SI, *via* le piégeage des gènes *intI* et leurs sites *attI* par des éléments mobiles tels que les transposons (en particulier le transposon Tn402), et l'acquisition des gènes *sulA* et *qacE*. Au cours de cette évolution, des délétions, insertions et autres réarrangements auraient façonné la région 3'CS des IM de classe 1, ainsi que leur inclusion au sein de plus larges plateformes mobiles telles que les plasmides et transposons, résultant en leur dissémination chez de nombreuses bactéries, incluant des espèces pathogènes (Gillings *et al.*, 2008, Labbate *et al.*, 2009). Stokes et collaborateurs ont suggéré que les IM de classe 1 étaient probablement largement distribués chez les Protéobactéries avant l'existence même des antibiotiques, et que les gènes de cassettes de ces IM ne codaient pas des résistances aux antibiotiques, mais que les IM auraient évolué plus tard par l'acquisition de la région 3'CS et de cassettes de gènes de résistance aux antibiotiques (Stokes & Gillings, 2011). Cependant, la découverte récente d'un IM de classe 1 dans un isolat de *Pseudomonas* daté de 15 000 à 40 000 ans, provenant du permafrost sibérien et présentant toutes les caractéristiques d'un IM de classe 1 clinique (régions 5'CS et 3'CS, ainsi qu'une cassette de gène de résistance à un antibiotique : *aadA2*), localisé sur un transposon Tn5045 contredit cette hypothèse (Petrova *et al.*, 2011).

Chapitre II : La réponse SOS

En 1967, Evelyn Witkin observait une croissance en filaments de bactéries *E. coli* après exposition à la lumière UV : les bactéries croissaient mais ne se divisaient plus (Witkin, 1967). Elle émit l'hypothèse que la division bactérienne était contrôlée par un répresseur, lui-même contrôlé par un processus complexe qui démarrait par un blocage de la réplication dû à des lésions de l'ADN. En 1970, dans une note diffusée en privé, Miroslav Radman décrit pour la première fois chez *E. coli*, la réponse « SOS » comme étant un système de réparation de l'ADN dépendant des protéines LexA et RecA et induit lorsque l'ADN est endommagé et sa synthèse arrêtée, l'induction de ce système entraînant des mutations. Des publications scientifiques suivront quelques années plus tard (Prakash, 1974 ; Radman, 1975). Le nom de « SOS » a été utilisé par Radman en référence à celui utilisé par les navires en perdition (« Save Our Souls »), ce qui lui permit par la même occasion de rendre hommage à son père marin-pêcheur.

I. Acteurs et mécanisme de la réponse SOS

La réponse SOS est une réponse d'adaptation des bactéries suite à des stress induisant des dommages à l'ADN conduisant à la formation d'ADN simple brin (ADN-sb). Elle est contrôlée par deux régulateurs centraux : le répresseur LexA (locus for X-ray sensitivity A) et l'activateur RecA (recombinase A).

I.1. La protéine LexA

Chez *E. coli*, le gène *lexA* code une protéine de 202 acides aminés, LexA, constituée de deux domaines structurellement distincts reliés par une région charnière flexible (Luo *et al.*, 2001). La protéine LexA est une protéine dimérique se liant à l'ADN et capable d'auto-

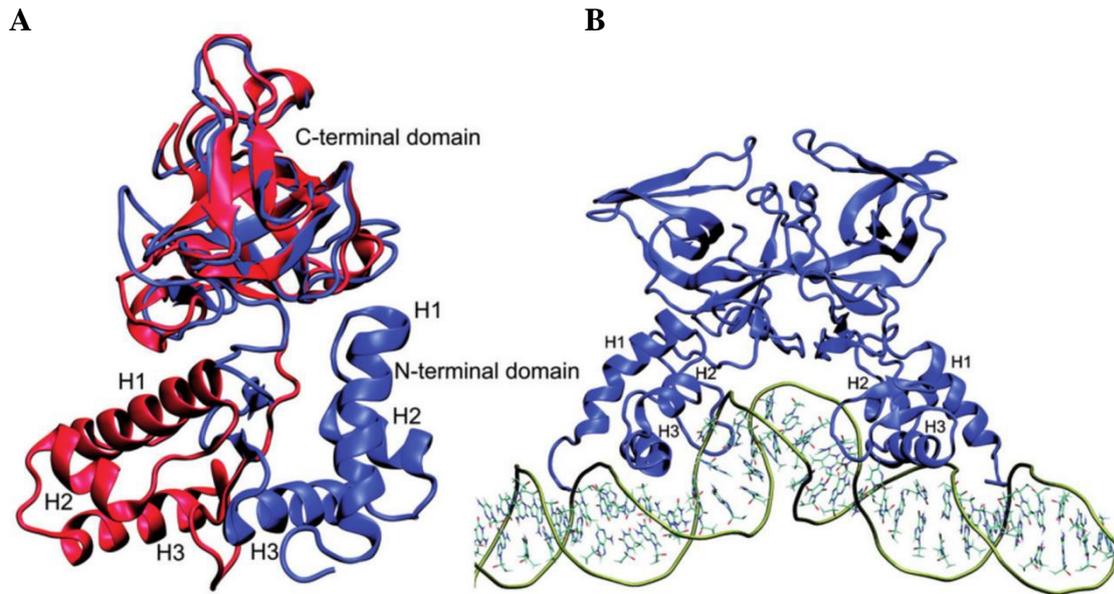


Figure 8 : Structure de la protéine LexA

A/ Structure du monomère de LexA (en rouge) et de son dérivé (en bleu) dont le changement de conformation est entraîné par la liaison à l'ADN. Les structures se superposent au niveau des CTDs, les 3 hélices α constituant le NTD sont nommées H1 à H3. **B/** Modèle du répresseur LexA sous forme dimérique, fixé au niveau de la région régulatrice du gène *cka* d'*E. coli* ; cette liaison à l'ADN se fait via le domaine N-terminal. (Butala, Zgur-Bertok *et al.*, 2009).

protéolyse. LexA se dimérise via son domaine carboxy-terminal (CTD) et se fixe à l'ADN grâce à un motif hélice-tour-hélice (HTH) situé dans son domaine amino-terminal (NTD) constitué de 3 hélices (Figure 8A). Ce sont les hélices II et III (H2 et H3) qui forment le motif HTH permettant la liaison à l'ADN, et la séquence de la région « linker » (résidus Gln70 à Glu74) est aussi importante pour la formation de contacts spécifiques avec l'ADN. Le CTD de LexA, composé de feuilletts β , fournit les éléments nécessaires à l'oligomérisation et à l'autoclivage de la protéine. Les résidus-clés sont une sérine en position 119 et une lysine en position 156, le binôme Ser119-Lys156 catalysant le clivage entre les résidus Ala84 et Gly85. Ces résidus 84 et 85 sont situés sur une boucle pouvant exister sous deux conformations différentes, dans l'une des deux conformations (celle liée à l'ADN) la boucle est située à proximité du site catalytique Ser119-Lys156, dans la seconde conformation, elle en est éloignée (Figure 8A) (Giese *et al.*, 2008). Des mutations au sein des séquences codant le site catalytique ou le site de clivage (mutations *lexA*^{ind-}) conduisent à la production d'une protéine LexA non clivable, bloquant ainsi l'induction de la réponse SOS (Butala *et al.*, 2009).

Une bactérie *E. coli* contient approximativement 1 200 molécules de LexA dont 20% de protéine LexA libre, non liée à l'ADN. LexA serait présente de façon prédominante sous forme de dimère, et le niveau de monomère serait très faible (Mohana-Borges *et al.*, 2000). Ceci appuie la théorie selon laquelle LexA reconnaît ses sites de liaison spécifiques à l'ADN, les sites LexA ou « LexA box » (développés dans le paragraphe I.3 ci-après), sous sa forme dimérique (Butala *et al.*, 2007). Il a été montré *in vitro* que la formation des dimères de LexA, ainsi que leur dissociation en monomères, étaient des processus lents, prenant quelques minutes (plutôt que quelques secondes) (Giese *et al.*, 2008).

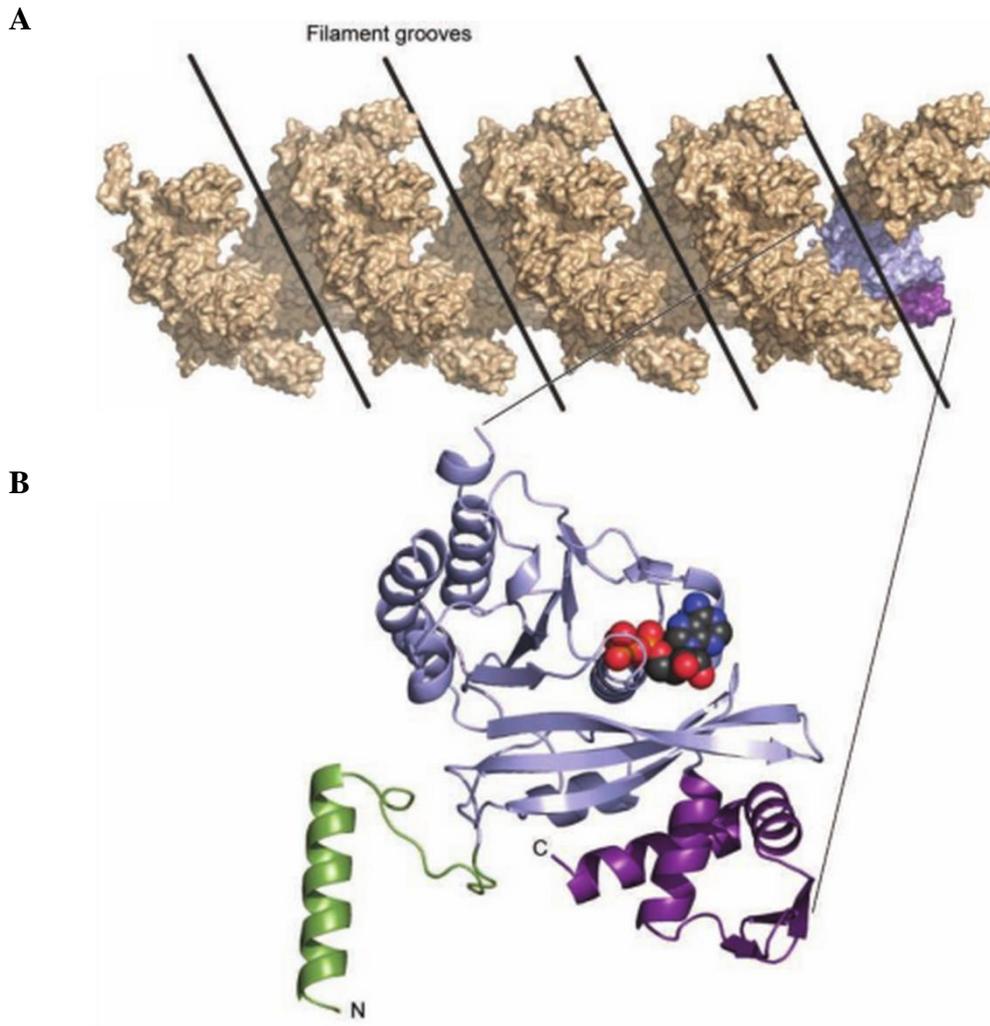


Figure 9 : Structure de la protéine RecA

A/ Structure du filament nucléoprotéique RecA/ADNsb: sont représentés ici 24 sous-unités de RecA (soit 4 tours de filament avec 6 monomères par tour). **B/** Structure d'un monomère de RecA. En bleu, le domaine cœur avec la liaison d'une molécule d'ATP ; en vert et violet, les domaines N- et C-terminaux respectivement. (Cox, 2007).

I.2. La protéine RecA

La protéine RecA, et plus largement les recombinaisons, ont pour activité principale l'échange de brins d'ADN, c'est le processus central de toute réaction de recombinaison homologue. En plus de cette activité, RecA joue également un rôle central dans la régulation de la réponse SOS dont elle est le senseur; elle faciliterait aussi la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase V malgré la présence de lésions lors de la réponse SOS (Schlacher *et al.*, 2005).

Chez *E. coli*, la protéine RecA, codée par le gène *recA*, est une chaîne polypeptidique de 352 résidus dont la structure a été élucidée en 1992 (Story & Steitz, 1992). La structure monomérique de RecA comporte un grand domaine constituant le cœur de la protéine et deux plus petits domaines N- (aa 1 à 33) et C-terminaux (aa 270 à 352) (Figure 9B). Ce domaine cœur est retrouvé chez de nombreuses autres protéines parmi lesquelles des hélicases, des protéines de transport de l'ADN, ainsi que chez l'ATPase F1 mitochondriale. C'est au niveau de ce domaine cœur, et plus précisément des résidus 47 à 74, que RecA fixe et hydrolyse l'ATP (Cox, 2003). Le site de fixation à l'ADN n'est pas très bien caractérisé (Cox, 2007). Néanmoins, il a été montré que RecA s'associait à l'ADN simple brin en formant un filament nucléoprotéique constitué de six monomères de RecA par tour d'hélice, correspondant aux 18 pb par tour que présente l'ADN dans cette conformation (lié à RecA), soit un monomère de RecA pour 3 nucléotides (Figure 9A). Cette conformation de l'ADN est inhabituelle (il est étiré de 50 à 60%), mais facilite la recherche d'homologies nécessaires à la recombinaison homologue.

I.3. Mécanisme de régulation par la réponse SOS

Lorsqu'un stress entraîne des dommages à l'ADN chez une bactérie, un mécanisme de réponse de « sauvegarde » y est déclenché. Il met en jeu principalement les protéines LexA et

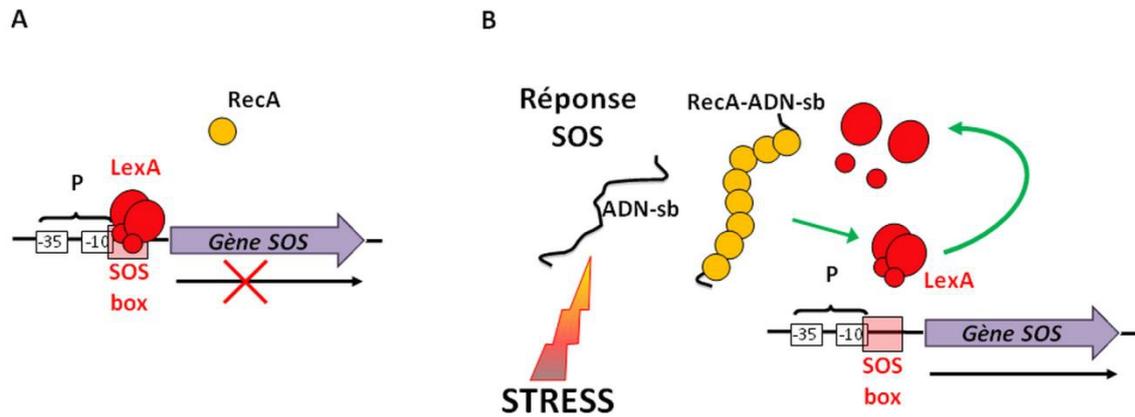


Figure 10 : Régulation de l'expression de l'intégrase par la réponse SOS

A. Dans les conditions normales, en l'absence de stress, la protéine LexA est liée à la « SOS box » dans la région promotrice d'un gène du régulon SOS dont l'expression est alors réprimée. **B.** En cas de stress générant de l'ADN simple brin (ADN-sb), la protéine RecA se lie à ces régions d'ADN simple brin pour former un filament nucléoprotéique, ce qui va provoquer l'autoprotéolyse de LexA, le gène SOS est alors exprimé. (D'après Da Re and Ploy, 2012).

RecA. En situation « normale » la protéine LexA réprime l'expression d'un ensemble de gènes appartenant à ce que l'on appelle, le régulon SOS, en se fixant sous forme d'un homodimère à une séquence appelée « LexA-box » ou « SOS-box » (Figure 10A). La LexA-box est constituée de deux éléments de liaison symétriquement inversés, chacun d'eux liant une des deux sous-unités du dimère de LexA. Il s'agit d'un motif palindromique de 16 pb situé dans la région promotrice des gènes, de consensus 5'-CTGTATATATACAG-3'. Il est situé à proximité du site de liaison de l'ARN polymérase (ARNP) de sorte que LexA interfère physiquement avec l'ARNP, les gènes du régulon SOS sont alors réprimés. Il existe néanmoins un niveau d'expression basal de certains de ces gènes, comme par exemple pour les gènes *recA* et *lexA* afin d'assurer leurs rôles dans cette réponse SOS (respectivement maintien de la répression des gènes du régulon et initiation de la réponse SOS par liaison à l'ADN-sb).

En réponse aux stress induisant la formation d'ADN-sb, la protéine RecA va interagir avec cet ADN-sb pour former un nucléofilament protéique. Ce dernier va créer une interaction directe avec le dimère de LexA (Kovacic *et al.*, 2013), ce qui va induire l'auto-protéolyse de LexA (Figure 10B). La région promotrice est alors libre pour accueillir la machinerie transcriptionnelle, et les gènes du régulon SOS initialement réprimés vont alors être pleinement exprimés (Figure 10B).

L'expression des gènes SOS se met en place selon une dynamique précise et dépend de l'affinité de leurs opérateurs pour la protéine LexA. Les promoteurs de forte affinité pour LexA seront exprimés plus tardivement (Friedman *et al.*, 2005). Il existe une grande variation dans la force et la cinétique d'induction de ces gènes. Par exemple, certains gènes sont induits fortement après les dommages à l'ADN alors qu'ils sont exprimés faiblement à l'état basal (par exemple *sfiA* et *umuDC*), alors que d'autres qui sont déjà assez fortement exprimés à l'état basal ne sont que modérément induits après les dommages (*uvrB*) (Lewis *et al.*, 1994).

Table 2 : Certains gènes de la réponse SOS et leurs fonctions, d'après (Storz and Hengge, 2011)

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

Certains gènes comme *lexA*, *dinD* et *recN* sont induits rapidement, d'autres comme *umuDC* sont induits plus tardivement (Courcelle *et al.*, 2001, Ronen *et al.*, 2002, Onnis-Hayden *et al.*, 2009). Ce système permet de faire agir chaque acteur de la réponse SOS au moment opportun et de manière proportionnelle aux dommages subis. Le stress terminé, le taux de filaments RecA-ADN-sb décroît par disparition des régions d'ADN-sb (l'ADN endommagé ayant été réparé), et la synthèse de LexA étant continue pendant la durée de la réponse SOS, les stocks sont suffisants pour rétablir la répression des gènes.

II. Le régulon SOS

En période d'homéostasie, la protéine LexA réprime un ensemble gènes (le régulon SOS constitué de plus de 30 gènes ; Table 2) dont les produits ont des rôles dans le métabolisme et la tolérance aux dommages à l'ADN et sont impliqués dans divers processus cellulaires tels que l'inhibition de la division cellulaire, la réparation et la réplication (Storz & Hengge, 2011). Certains gènes (*dinJ*, *yigN*) identifiés comme appartenant au régulon SOS de par la présence d'une LexA-box dans leur séquence promotrice, ne sont pourtant pas régulés en réponse à des dommages à l'ADN *in vitro* (Fernandez De Henestrosa *et al.*, 2000). *A contrario*, un ensemble de 19 régions promotrices ne présentant pas de séquence consensus de la LexA-box peuvent quand même lier LexA *in vitro* probablement grâce à l'aide de facteurs additionnels, les gènes contrôlés étant donc potentiellement régulés par la réponse SOS (Wade *et al.*, 2005).

Il est difficile de vraiment définir le régulon SOS (Table 2). Selon le type de dommages subis par l'ADN, sa dose, et d'autres aspects de la physiologie cellulaire, des gènes différents sont détectés comme inductibles. Ainsi, si l'on compare trois études d'analyse par macro-array, deux après traitement UV et une après traitement à la mitomycine C (Courcelle *et al.*, 2001, Khil & Camerini-Otero, 2002, Quillardet *et al.*, 2003), seuls 5 gènes

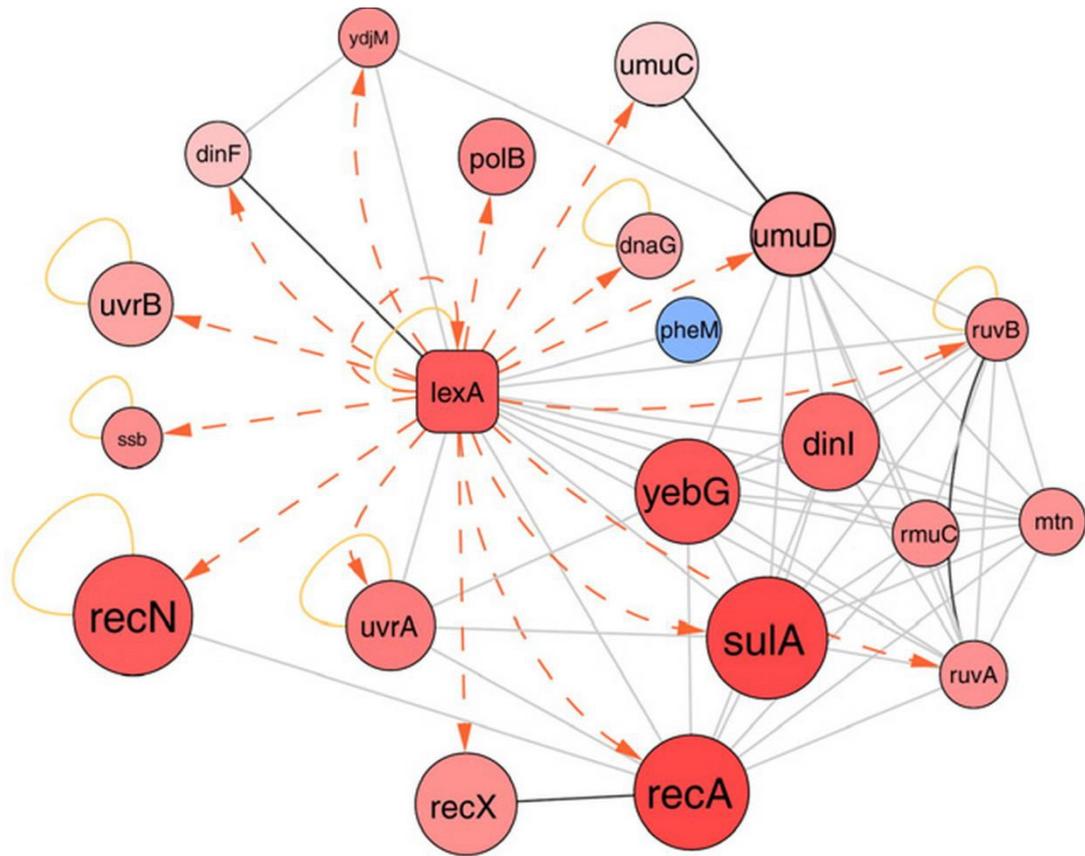


Figure 11 : Le « module LexA »

21 gènes ou protéines et 77 interactions en sont dérivés. (Hong, Ahn *et al.* 2009)

communs sont trouvés induits dans les trois études: *sfiA*, *recA*, *recN*, *dinD* et *dinB* (Storz & Hengge, 2011). Hong et coll. ont comparé l'expression de gènes induits suite à des dommages à l'ADN provoqués par sept agents différents (incluant entre autre UV, radiations ionisantes, quinolones) à partir de données issues de 69 membranes d'hybridation (Hong *et al.*, 2009). Leur analyse leur a permis de définir un réseau de gènes qu'ils ont appelé le « module LexA » (Figure 11) qui comprend les gènes : *dinI*, *dinF*, *lexA*, *polB*, *recA*, *recN*, *recX*, *ruvAB*, *ssb*, *sfiA*, *umuDC*, *uvrAB* et *ydjM* (Hong *et al.*, 2009). Dans cette même étude, deux autres gènes de fonctions inconnues appartiendraient également à ce set de gènes, *rmuC* et *yeb*, qui présentent des « LexA box » conservées mais auxquelles la fixation de LexA n'est pas démontrée (Hong *et al.*, 2009).

III. Facteurs déclenchant la réponse SOS

A l'origine, la réponse SOS a été identifiée chez des bactéries *E. coli* soumises à un traitement UV, et a été ensuite reliée à d'autres agents qui endommagent l'ADN, tels que la mitomycine C (Costa de Oliveira *et al.*, 1987), soutenant la thèse d'un système de réponse généralisée aux dommages à l'ADN. Mais depuis bien d'autres agents externes induisant la réponse SOS, parfois indirectement, ont été découverts (Figure 12).

III.1. Signaux inducteurs de la réponse SOS

En plus de l'induction directe par traitement UV, une induction de la réponse SOS en lien avec les niveaux d'AMPc a été rapportée chez des souches de *E. coli* privées de nutriments (Taddei *et al.*, 1995). Les agents alkylants endogènes, résultant d'une variété de processus métaboliques, sont aussi inducteurs de la réponse SOS par création de dommages à l'ADN (dépurinations spontanées, désamination de bases,...) (Volkert *et al.*, 1989, Drablos *et al.*, 2004). Plus récemment, une étude a conduit à l'identification de 42 gènes qui, une fois

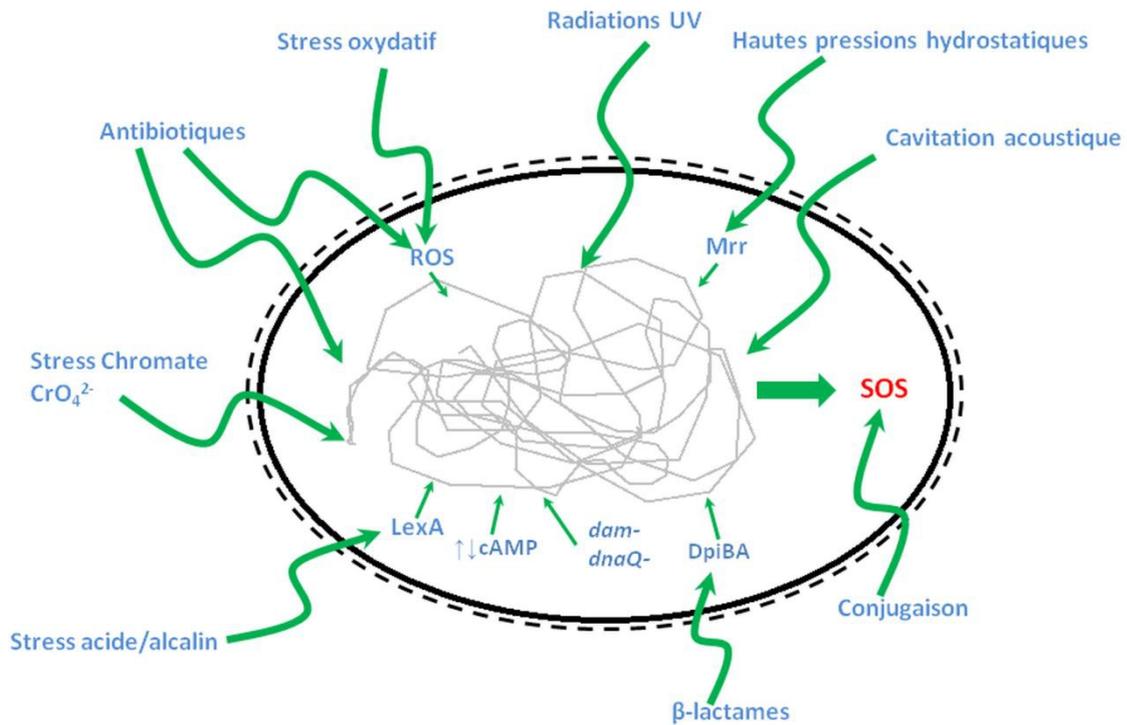


Figure 12: Signaux et mécanismes inducteurs de la réponse SOS

Liste des principaux inducteurs directs ou indirects de la réponse SOS ; dans le cas d'une induction indirecte l'intermédiaire est indiqué. (ROS : espèces réactives dérivées de l'oxygène). D'après (Erill, Campoy *et al.*, 2007) et (Da Re and Ploy, 2012).

inactivés, conduisent à une induction chronique de la réponse SOS (O'Reilly & Kreuzer, 2004), ces mutations sont en lien avec les voies de la réparation, de la réplication (comme *dam* ou *dnaQ*). Une exposition des bactéries aux ultrasons peut également déclencher la réponse SOS de manière directe (Vollmer *et al.*, 1998).

En 2010, Baharoglu et coll. ont montré que la conjugaison bactérienne induisait la réponse SOS chez *E. coli* et chez *V. cholerae* (Baharoglu *et al.*, 2010). La conjugaison consiste en une transmission d'un plasmide d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. Les premières étapes de la conjugaison impliquent la génération transitoire d'ADN-sb et se déroulent de la façon suivante : i) coupure simple brin du plasmide au niveau de son origine de transfert (*oriT*) ; ii) le brin coupé « glisse » vers la bactérie hôte dans le sens 5' vers 3' ; iii) pénétration de l'ADN-sb dans la cellule receveuse (Vielmetter *et al.*, 1968, Bialkowska-Hobrzanska & Kunicki-Goldfinger, 1977). Cet ADN-sb suite à l'entrée dans la receveuse peut être reconnu par la protéine RecA, ce qui déclenchera la réponse SOS (Baharoglu *et al.*, 2010). De même, le processus de transformation se fait sous forme d'ADN-sb, et induit également la réponse SOS et l'expression de l'intégrase IntIA chez *V. cholerae* (Baharoglu *et al.*, 2012).

Il est aussi connu que des pH élevés (basiques) peuvent induire *in vitro* l'auto-protéolyse de LexA, de façon indépendante de RecA et des dommages à l'ADN (Smith *et al.*, 1991) ; *in vivo* des niveaux bas de pH vont quant à eux favoriser une affinité non spécifique de LexA pour l'ADN (et donc une diminution de sa fixation au niveau des « LexA box »), conduisant au final à une dé-répression du système en milieu acide ou alcalin (Sousa *et al.*, 2006).

D'autres inducteurs, indirects cette fois, ont également été mis au jour, comme le stress oxydatif (Imlay & Linn, 1987), l'exposition aux chromates (polluants résultants de divers processus dans l'industrie ou de la production d'armes nucléaires) (Ackerley *et al.*,

2006). Des bactéries soumises à un stress hydrostatique peuvent aussi déclencher la réponse SOS *via* l'induction de l'endonucléase Mrr (Aertsen & Michiels, 2005).

III.2. Induction par les antibiotiques

Il a été démontré plus récemment, que des antibiotiques, comme les β -lactames, le triméthoprim, la ciprofloxacine, l'ampicilline ou le métronidazole étaient capables de déclencher directement ou indirectement la réponse SOS (Erill *et al.*, 2007, Shaw *et al.*, 2003, Baharoglu & Mazel, 2011, Beaber *et al.*, 2004, Hocquet *et al.*, 2012). L'induction ou non, de la réponse SOS semble dépendre de la bactérie et de l'antibiotique, les aminoglycosides, la tétracycline et le chloramphénicol induisant la réponse SOS chez *V. cholerae* mais pas chez *E. coli*, d'autres molécules (ciprofloxacine et triméthoprim) l'induisant chez les deux espèces (Baharoglu & Mazel, 2011).

Les fluoroquinolones, aminoglycosides, métronidazole, β -lactames induisent la réponse SOS par production de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) qui induisent chez la bactérie un stress oxydatif qui va provoquer des dommages à l'ADN (Kohanski *et al.*, 2010). Les β -lactames peuvent aussi déclencher la réponse SOS par la voie DpiBA. Dans ce système de signal de transduction à deux composants, DpiB est le senseur du stress associé à la paroi cellulaire, qui va activer, *via* une phosphorylation, le régulateur DpiA. La protéine DpiA~P lie des séquences riches en AT lors de la réplication du chromosome bactérien créant une compétition avec les protéines de réplication DnaA et DnaB qui ne peuvent plus accéder à l'ADN. La réplication est alors interrompue ce qui déclenche la réponse SOS (Miller *et al.*, 2004, Miller *et al.*, 2003).

IV. Rôle de la réponse SOS dans l'acquisition, l'expression et la dissémination de la résistance aux antibiotiques

Un des liens entre réponse SOS et résistance antibiotique est connue depuis longtemps. En effet parmi les gènes du régulon SOS, on trouve des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, dont les ADN polymérase de translésions (ADNP II, IV et V). Ces dernières, n'ayant pas d'activité « proof-reading », vont favoriser l'introduction d'erreurs lors de la réplication de l'ADN, facilitant ainsi l'émergence de mutations et l'adaptation des bactéries, parmi lesquelles des mutations de résistances (Friedberg *et al.*, 2006).

Plus récemment, d'autres liens entre réponse SOS et antibio-résistance ont été mis en évidence. En effet, la réponse SOS a été montrée comme directement impliquée d'une part, dans l'induction de la résistance, et d'autre part, dans le transfert et l'acquisition de gènes de résistance.

La résistance aux quinolones (antibiotiques à large spectre) résulte :

- soit de mutations de gènes chromosomiques codant pour les topoisomérases (cibles des quinolones) ou de gènes régulateurs de protéines de la membrane externe et de pompes d'efflux (Jacoby, 2005)

- soit de l'acquisition de gènes plasmidiques tels que les gènes *qnr* qui protègent la gyrase de l'inhibition par les quinolones, le gène *aac6'-Ib-cr* qui modifie l'agent antimicrobien, ou les gènes *qepA* ou *oqxAB* codant une pompe d'efflux (Rodriguez-Martinez *et al.*, 2011).

Il existe plusieurs familles de gènes *qnr* et les gènes *qnrA*, *B* et *S* sont très répandus. Une boîte LexA a été identifiée dans la région promotrice de l'allèle *qnrB2* de la famille des gènes *qnrB*, et il a été montré que l'expression de *qnrB2* était régulée directement par la

réponse SOS via les protéines LexA et RecA (Da Re *et al.*, 2009). Ainsi, la ciprofloxacine qui induit la réponse SOS permet l'induction d'une résistance vis-à-vis de sa propre action.

Une étude conduite au laboratoire en collaboration avec les équipes de D. Mazel, (Institut Pasteur, Paris) et J. Barbé (Barcelone, Espagne) a montré *in vitro*, que l'expression de l'intégrase d'intégron était sous le contrôle de la réponse SOS induite par la mitomycine C, la ciprofloxacine et le triméthoprime chez *E. coli* et *V. cholerae* (Guérin, Cambray *et al.*, 2009). Récemment, Hocquet et coll. ont montré que l'induction du gène de l'intégrase (*via* la réponse SOS), pouvait se produire *in vivo* (chez un patient) suite à un traitement au métronidazole conduisant à un réarrangement de cassettes chez *P. aeruginosa* (Hocquet *et al.*, 2012).

En plus d'induire l'acquisition de gènes de résistance, la réponse SOS peut aussi conduire à leur dissémination. L'élément génétique mobile SXT est un ICE (Integrative Conjugative Element) rencontré chez *V. cholerae*, qui porte des gènes de résistance au chloramphénicol, au sulfaméthoxazole, au triméthoprime et à la spectinomycine. Il a été montré que cet ICE pouvait être transféré suite à un traitement par la ciprofloxacine de la bactérie l'hébergeant, selon une voie similaire à celle de la régulation LexA/RecA de la réponse SOS (Beaber *et al.*, 2004). Dans l'élément SXT, les gènes impliqués dans le transfert sont réprimés par la protéine SetR. Lors de l'induction de la réponse SOS, RecA est activée et va entraîner l'autoclivage de SetR, libérant les promoteurs des gènes *setC* et *setD*, activateurs transcriptionnels des gènes du transfert conjugatif et d'intégration de l'élément SXT, qui peut alors être transféré à un nouvel hôte, ses gènes de résistance étant alors disséminés. Si la réponse SOS peut induire la dissémination de gènes de résistance, *a contrario* des modes de dissémination d'éléments génétiques mobiles potentiellement porteurs de gènes de résistance, tels que la conjugaison ou la transformation, peuvent induire la réponse SOS (Baharoglu *et al.*, 2010; Baharoglu *et al.*, 2012).

Une autre implication de la réponse SOS dans la résistance aux antibiotiques est le rôle qu'elle joue dans l'induction de l'état de dormance des bactéries. Sous l'action de la voie SOS, la toxine TisB serait induite chez *E. coli* (Dorr *et al.*, 2010). TisB, toxine du couple toxine/antitoxine *tisAB/tisR*, est un petit peptide hydrophobe qui se lie à la membrane interne et interrompt la force protomotrice, conduisant à une chute des niveaux d'ATP et par conséquent à un état de dormance de la bactérie. Ces bactéries dormantes, dites aussi bactéries persistantes, sont caractérisées par un ralentissement de leur métabolisme qui les rend insensibles aux antibiotiques qui agissent sur des bactéries en phase exponentielle de croissance. Les bactéries persistantes peuvent donc résister à un traitement antibiotique sans acquérir de résistance stable (Lewis, 2010). Le mode de vie biofilm, que nous développerons dans le chapitre III, est connu pour sa grande résistance aux antibiotiques qui lui serait conférée en partie par la présence de bactéries persistantes.

V. Universalité de la réponse SOS

L'identification d'un homologue de LexA et de son rôle dans la régulation de la réponse SOS chez des *Firmicutes* (plus précisément chez *Bacillus subtilis*) (Wojciechowski *et al.*, 1991), phylum qui a été retiré des *Proteobacteria* auquel appartient *E. coli*, suggère que la réponse SOS serait un moyen général d'adaptation des bactéries aux dommages à l'ADN. Des travaux plus récents chez d'autres bactéries ont confirmé cette idée. Des séquences homologues à celle du gène *lexA* ont été identifiées dans presque tous les génomes bactériens séquencés à ce jour, couvrant un très grand nombre de phyla, suggérant une origine ancienne et une très large distribution du gène *lexA* et de la réponse SOS. Ainsi, des protéines fonctionnelles homologues de LexA régulant des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ont été caractérisés chez *Actinobacterium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Thermotogae*

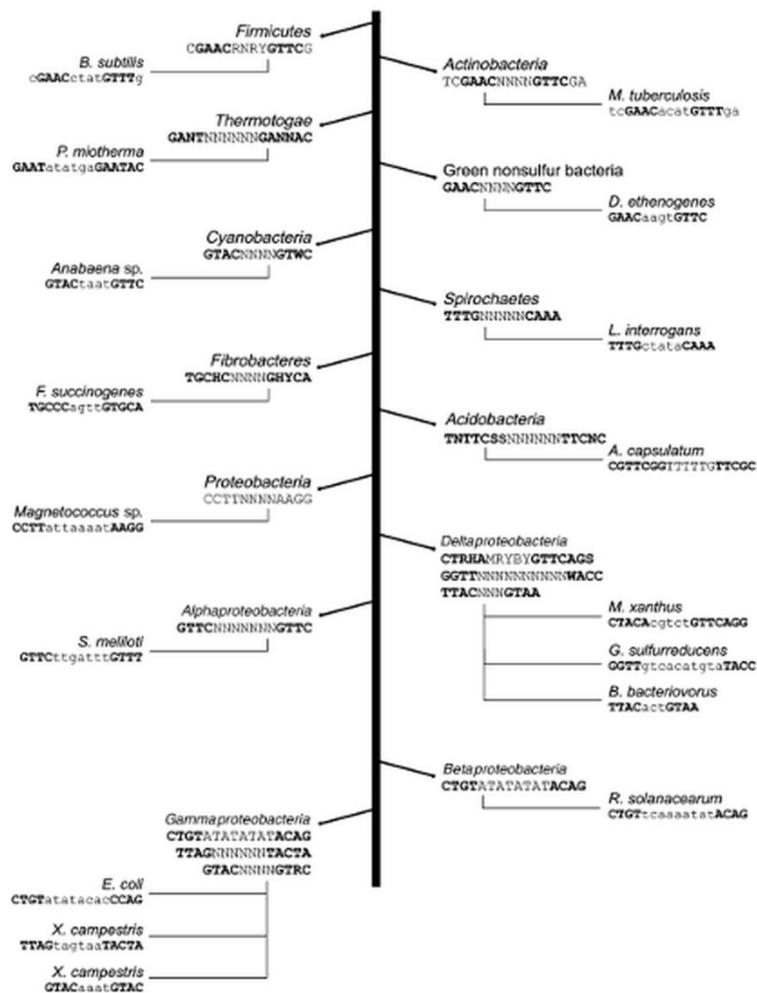


Figure 13 : Distribution des séquences des boîtes de fixation de LexA (LexA box) à travers les domaines bactériens

La figure montre les motifs consensus des « LexA box » des phyla ou des classes considérés, ainsi que les véritables séquences retrouvées chez des espèces représentatives. Ces séquences correspondent au site de fixation de LexA au sein du promoteur du gène *lexA* (excepté pour *Leptospira interrogans* où il s'agit de celui du promoteur de *recA*) (Erill, Campoy *et al.*, 2007).

Thermotoga naepolitana, *Alphaproteobacterium*, *Rhodobacter sphaeroides* ou *Cyanobacterium Anabaena* sp (Erill *et al.*, 2007).

La caractérisation chez *B. subtilis* d'une LexA box (GAAC-N₄-GTTC) remarquablement différente de celle connue pour *E. coli* a laissé penser que l'histoire de l'évolution de la réponse SOS était peut-être plus compliquée que ce qui avait été supposé (Cheo *et al.*, 1991). Cette séquence a par la suite été retrouvée chez *M. tuberculosis* et *M. smegmatis* (Movahedzadeh *et al.*, 1997), *Clostridium perfringens* (Johnston *et al.*, 1997), *Staphylococcus aureus* (Bisognano *et al.*, 2004) et chez *Streptomyces* (Mikoc *et al.*, 1997), faisant du motif GAAC-N₄-GTTC, la LexA-box monophylétique des bactéries à Gram positif. Le motif CTGT-N₈-ACAG a été défini comme celui des *Gamma-proteobacteria* et *Beta-proteobacteria* et des séquences consensus pour la fixation de la protéine LexA ont été identifiées chez de nombreuses bactéries (répertoriées Figure 13) (Erill *et al.*, 2007).

Malgré l'apparente universalité de la présence de LexA, plusieurs exceptions ont été identifiées, le gène *lexA* étant parfois absent de classes ou de phyla entiers. Ainsi, aucun homologue de LexA n'a été détecté au sein du groupe *Bacteroidetes*-Green sulfur bacteria ou dans la sous-classe des *Epsilon proteobacteria* où son absence est intrigante, puisque toutes les autres sous-classes de *Proteobacteria* produisent une protéine fonctionnelle homologue de LexA (Erill *et al.*, 2007). La perte du gène *lexA* chez les *Rickettsiae* et *Mycoplasmatacae*, qui sont des parasites intracellulaires, peut s'expliquer par des pressions évolutives qui ont conduit à la réduction de leur génome, mais également par le besoin de maintenir constitutive l'expression des gènes de réparation lorsqu'elles se trouvent dans un environnement hostile tel que le cytoplasme de leurs cellules-hôtes (Mertens *et al.*, 2005; Renesto *et al.*, 2005). La bactérie *Streptococcus pneumoniae* ne possède pas non plus de gène *lexA*. Elle semble avoir réquisitionné son régulon de compétence (impliqué dans le processus de transformation naturelle de l'ADN) pour coordonner certaines de ses réponses aux dommages à l'ADN

induits par certains antibiotiques (aminoglycosides et fluoroquinolones) ou par la mitomycine C (Prudhomme *et al.*, 2006).

Chapitre III : Le biofilm

Les chercheurs n'ont pris conscience qu'assez récemment que le mode de culture bactérien utilisé en laboratoire avait ses limites. Il est en effet éloigné du mode de vie des microorganismes dans leurs environnements naturels : sur Terre la majorité des microorganismes vivent en communautés, associés à une surface et constituent des biofilms (Monds & O'Toole, 2009). PubMed recense ainsi seulement 2 000 publications traitant du biofilm avant l'année 2000, contre plus de 20 000 de l'année 2000 à aujourd'hui (septembre 2013).

I. Généralités

En 1683, Antonie Van Leeuwenhoek observe la présence de microorganismes (animalicules) issus d'un échantillon de grattage de sa propre surface dentaire. Il peut être considéré comme le découvreur des biofilm. Mais ce n'est que 250 ans plus tard, dans les années 1940, que l'existence de ce mode de vie est envisagée par Claude E. Zobell, il parle alors de « film » (Zobell, 1943). Ce n'est qu'à la fin des années 1970 que ce concept a été généralisé et que le terme biofilm est alors utilisé pour la première fois par Bill Costerton (Costerton *et al.*, 1978). Dans les années 1990, le développement de la microscopie confocale à balayage laser permet d'observer des biofilms *in situ* dans toute leur épaisseur et de donner une définition du biofilm, éliminant ainsi certaines idées reçues comme la présence de cellules mortes en profondeur et la structure désorganisée du biofilm.

Nous définirons ici le biofilm de la façon suivante : ensemble de microorganismes englobés dans une matrice extra-cellulaire autoproduite et adhérant entre eux et aux surfaces (d'après (Costerton *et al.*, 1978)). Les agrégats microbiens des boues d'épuration (flocs) (Weber *et al.*, 2007), les pellicules microbiennes qui se développent à l'interface air-liquide (Branda *et al.*, 2001), ou encore de simples colonies poussant sur milieu gélosé (Wimpenny *et*

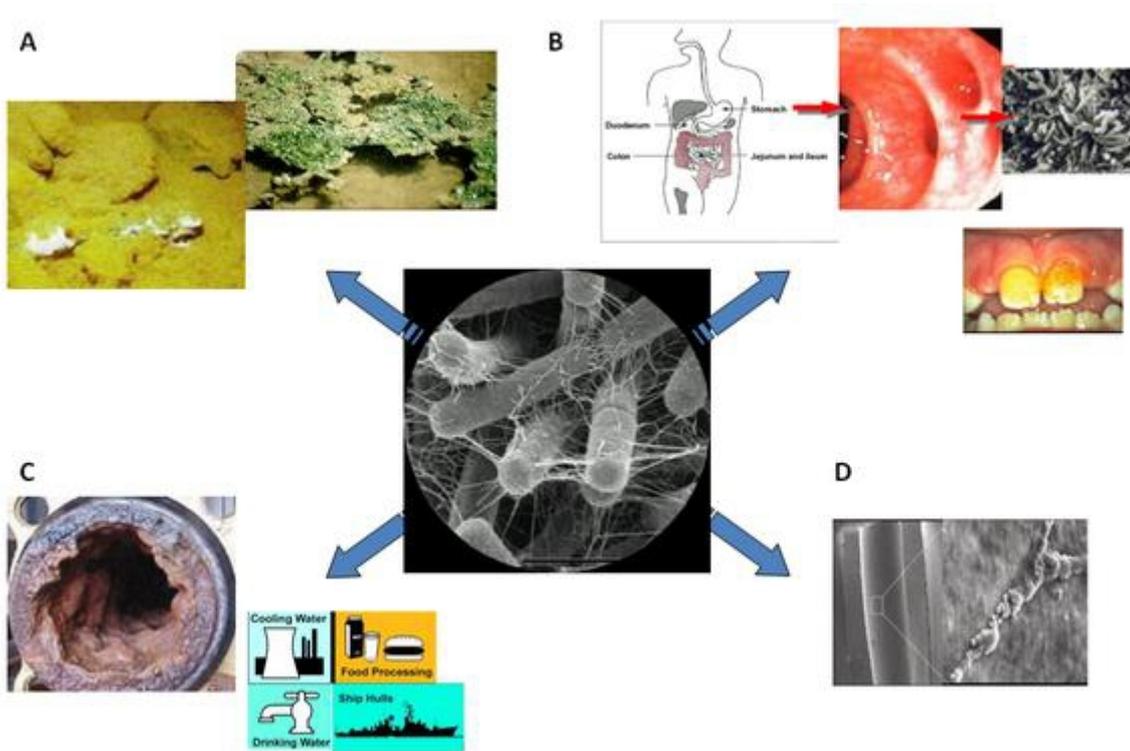


Figure 14: Distribution des biofilms dans différents écosystèmes

A : biofilms sur surface minérale ; B : biofilms humains au niveau des poumons et des dents ; C : biofilm dans l'industrie (tuyau de canalisation) ; D : biofilm sur un cathéter

al., 2000) peuvent être considérés comme des biofilms. Toutes les bactéries sont capables de former un biofilm. Dans les environnements naturels, les biofilms sont souvent hétérogènes et constitués, en plus des bactéries, de champignons, algues, moisissures et virus (Branda *et al.*, 2005). Ils peuvent se développer sur des surfaces biotiques et abiotiques d'une grande diversité (Figure 14): tissu vivant (végétal et animal), canalisations, appareillages médicaux... Les biofilms ont été beaucoup étudiés car ils causent de nombreux problèmes que ce soit dans le domaine industriel ou médical. Par exemple, les biofilms peuvent se développer sur les coques des bateaux, on parle de phénomène de « biofouling » (Coetser & Cloete, 2005) ce qui conduit à une augmentation des forces de friction, une diminution de la vitesse des bateaux et un surcoût énergétique. La formation des biofilms sur les métaux peut également engendrer des problèmes de corrosion. En effet, associés à des surfaces métalliques, les biofilms de bactéries anaérobies sont à l'origine de réactions chimiques corrosives, susceptibles d'endommager, d'obturer et de contaminer durablement les systèmes de circulation de fluides. Ils sont également très dangereux pour l'industrie agro-alimentaire, car lorsqu'ils sont constitués de micro-organismes pathogènes, les biofilms peuvent conduire à des problèmes sanitaires sérieux. Dans le domaine de la santé, les biofilms peuvent coloniser de nombreux dispositifs médicaux tels que les cathéters, prothèses de hanches, de genou, valves cardiaques où ils peuvent être à l'origine d'infections nosocomiales. Lorsqu'un biofilm se développe sur ce type de matériel, la seule possibilité pour éviter l'infection sera alors d'enlever le matériel colonisé, ce qui implique des risques pour le patient et des coûts financiers importants pour le système de santé. Selon le NIH, 80 % des infections humaines seraient dues à des biofilms (Davies, 2003). Il est donc indispensable de trouver des moyens qui permettraient de les éradiquer.

Cependant, les biofilms ne présentent pas seulement des inconvénients. Ils sont notamment utilisés dans le traitement des eaux usées, ils contribuent à la production et à la

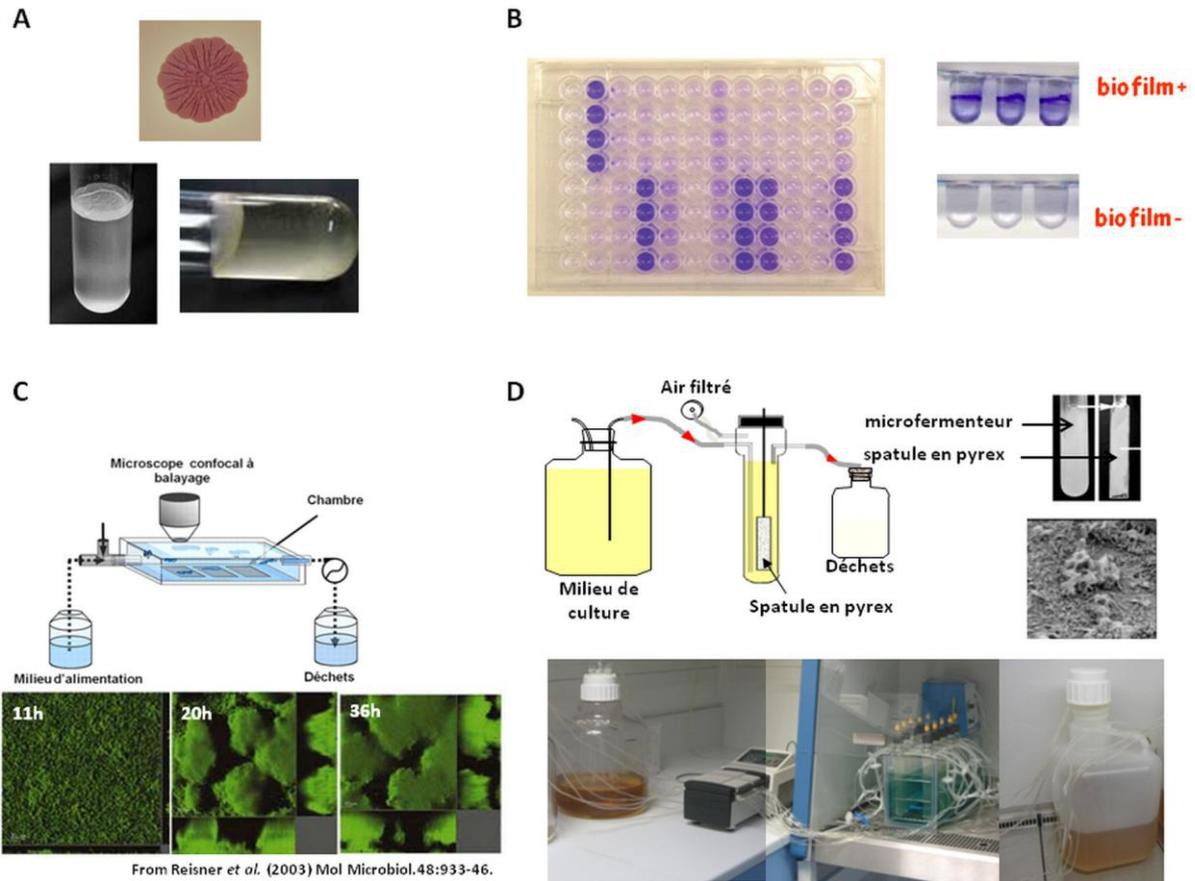


Figure 15 : Approches utilisées dans l'étude de biofilms.

A/ Colonie sur boîte et biofilm à l'interface air-liquide. **B/** Microplaque : modèle de culture de biofilm en condition statique et visualisé par coloration au cristal violet. **C/** Schéma du système dit en chambres à flux ou « flow-cell » tiré de (Bar-Zeev, Berman-Frank *et al.* 2012) et suivi de la formation d'un biofilm. **D/** Schéma de culture continue en microfermenteurs (MF) contenant une spatule amovible sur laquelle se développe le biofilm (Ghigo, 2001); photo du biofilm dans le MF et sur la spatule et en microscopie électronique. Bas : installation d'un montage de MF en série.

dégradation de matière organique, au recyclage de l'azote, du soufre et de nombreux métaux. Dans l'industrie ou dans l'environnement, ils servent aussi au traitement des déchets ou à la dépollution par un mécanisme appelé « bioremédiation » (Cohen, 2002).

II. Modèles d'étude du biofilm

Les approches expérimentales classiques pour étudier les microorganismes ne sont pas adaptées à l'étude de leur mode de vie complexe en biofilms. Les chercheurs ont donc développé différents modèles expérimentaux associant analyse moléculaire et microscopie.

II.1. Les bactéries modèles

La majorité des espèces bactériennes forme des biofilms. Les bactéries modèles les plus étudiées sont *P. aeruginosa*, *E. coli* et *V. cholerae*. Ces bactéries pathogènes ou commensales à Gram négatif sont facilement manipulables et ont permis l'identification et l'étude de nombreux facteurs moléculaires impliqués dans la formation des biofilms. Plusieurs équipes travaillent également avec la bactérie à Gram positif *Staphylococcus aureus* qui est impliquée dans de nombreuses infections nosocomiales.

II.2. Les modèles de culture

Si les colonies poussant sur boîtes ou la pellicule se formant à l'interface air-liquide constituent des biofilms (Figure 15A), les chercheurs ont mis au point des moyens d'étude nettement plus sophistiqués afin de pouvoir étudier plus finement les étapes de la formation du biofilm et sa structure.

II.2.a Les biofilms en micro-plaques

L'utilisation des modèles statiques de formation de biofilm en microplaque multi-puits, couplée à l'analyse de mutants, a permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans la formation des biofilms de *P. aeruginosa* et *E. coli* sur des surfaces abiotiques (Genevaux *et al.*, 1996 , Pratt & Kolter, 1998 , O'Toole & Kolter, 1998). Un grand nombre de laboratoires utilisent ce modèle pour étudier les étapes précoces de la formation des biofilms. La formation de biofilm est visualisée par une coloration au Cristal violet du biofilm sur les parois (Figure 15B).

II.2.b Systèmes permettant l'étude de biofilms matures

Afin d'identifier et d'étudier les facteurs moléculaires impliqués dans la maturation et la structuration du biofilm, des modèles de culture continue comme les microfermenteurs (Ghigo, 2001) ou les chambres en flux (flow-cell) sont utilisés (Tolker-Nielsen & Sternberg, 2011).

Le système de chambres en flux comporte un ensemble de chambres stériles fermées par une lamelle en verre (« flow-cells ») qui permet d'alimenter en continu les bactéries avec du milieu nutritif frais tout en évacuant les déchets ainsi que les bactéries planctoniques. Ce système permet en utilisant des souches bactériennes exprimant des protéines fluorescentes de réaliser des observations par microscopie confocale à balayage laser à différents temps de croissance du biofilm et de voir son évolution (Reisner *et al.*, 2003) (Figure 15C). Il permet l'étude des étapes précoces comme des étapes plus tardives.

En utilisant les micro-fermenteurs (MF) du laboratoire des Fermentations de l'Institut Pasteur, Jean-Marc Ghigo a développé un modèle de production de biofilm en culture continue qui repose sur l'utilisation d'un microfermenteur en verre dans lequel est insérée une spatule en pyrex[®] amovible (Figure 15D). La vitesse d'arrivée du milieu dans le MF est plus

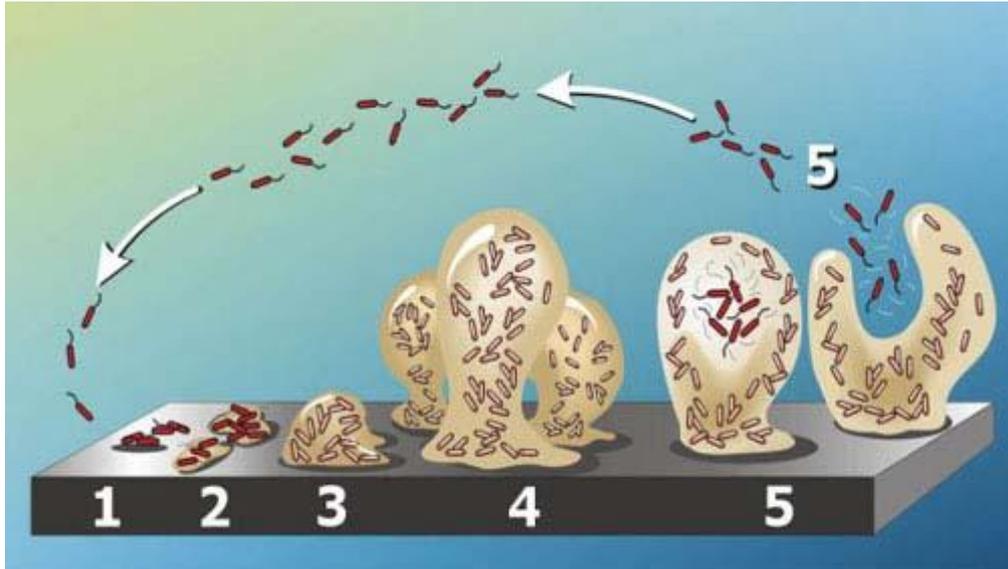


Figure 16: Etapes de la formation d'un biofilm

1. Adhésion bactérienne primaire 2. Fixation bactérienne irréversible 3. Formation et croissance des colonies 4. Sécrétion de la matrice extracellulaire et maturation du biofilm 5. Prolifération et détachement bactérien. (Schéma d'après D. Davis, Binghamton University, USA)

rapide que la vitesse de division des bactéries planctoniques et permet donc le développement du biofilm sur la spatule en pyrex. Contrairement au modèle de flow-cell, ce modèle de culture permet d'obtenir une biomasse importante qui peut ensuite être récupérée pour des analyses chimiques, génétiques (transcriptome, protéome...). Des observations en microscopie électronique peuvent aussi être réalisées à partir de petites surfaces amovibles collées sur la spatule, qui une fois récupérées pourront être fixées avant d'être observées (Figure 15D). C'est ce système de culture que nous avons utilisé au laboratoire pour étudier la régulation de l'intégrase au sein d'un biofilm bactérien.

III. Formation et structure du biofilm

III.1. Etapes de formation d'un biofilm

La transition des bactéries de l'état de croissance planctonique (libres dans un environnement naturel) à l'état sessile (fixées à un support ou à d'autres microorganismes) est un processus dynamique qui commence par une première phase d'attachement à la surface, qui va être dans un premier temps transitoire. Lorsque cette association à la surface se stabilise, il y aura formation progressive de micro-colonies, au sein desquelles les bactéries vont produire une matrice extracellulaire. Le biofilm va développer une structure tridimensionnelle et devenir un biofilm mature. Le cycle se termine par le détachement de certaines cellules qui vont pouvoir aller coloniser de nouvelles surfaces (Figure 16).

Ces différentes étapes mettent en jeu les appendices bactériens de surface. Ainsi, des travaux ont montré que le transport actif via les flagelles, pili de types I et IV, curli représentaient un important mécanisme permettant aux bactéries d'interagir avec les surfaces (Pratt & Kolter, 1998, Klausen *et al.*, 2003, Beloin *et al.*, 2008).

III.2. Appendices de surfaces

L'implication de différentes structures de surface dans l'étape d'attachement irréversible des bactéries aux surfaces et dans l'établissement de la structure tridimensionnelle du biofilm est amplement démontrée.

III.2.a. Les fimbriae de type I

Les fimbriae de type I (ou pili, du latin *pilus* : le poil ou le cheveu) sont des adhésines filamenteuses protéiques exprimées chez les isolats d'*E. coli* commensaux ou pathogènes (Sauer *et al.*, 2000). Les bactéries expriment entre 100 et 500 fimbriae à leur surface. Une fimbriae se présente sous la forme d'une structure tubulaire de 5 à 7 nm de diamètre et 0,2 à 2 µm de long. Plusieurs équipes ont démontré son rôle indispensable dans la formation du biofilm par *E. coli* sur des surfaces abiotiques (Harris *et al.*, 1990, Pratt & Kolter, 1998, Cookson *et al.*, 2002, Orndorff *et al.*, 2004). L'expression des pili de type I est induite par l'adhésion et la formation de biofilm aux stades précoces et tardifs (Schembri *et al.*, 2003, Beloin *et al.*, 2004, Ren *et al.*, 2004).

III.2.b. Les curli

Ils ont été identifiés d'abord chez *E. coli*, mais sont aussi produits par d'autres entérobactéries comme *Shigella*, *Citrobacter* et *Enterobacter* (Smyth *et al.*, 1996). Ils s'agrègent à la surface bactérienne et forment des structures de 6 à 12 nm de diamètre et de 0,5 à 1 µm de long. Ils se lient aux protéines de la matrice extra-cellulaire (fibronectine, laminine, plasminogène) (Olsen *et al.*, 1989, Ben Nasr *et al.*, 1996), et permettent aussi l'adhésion des bactéries à différentes cellules humaines. Ils jouent un rôle dans la formation de biofilm en facilitant les interactions initiales à la surface et les interactions cellules-cellules par la suite (Vidal *et al.*, 1998, Cookson *et al.*, 2002, Uhlich *et al.*, 2006). Les gènes impliqués dans la formation des curli sont organisés en deux opérons : *csgBAC* (codant les sous-unités

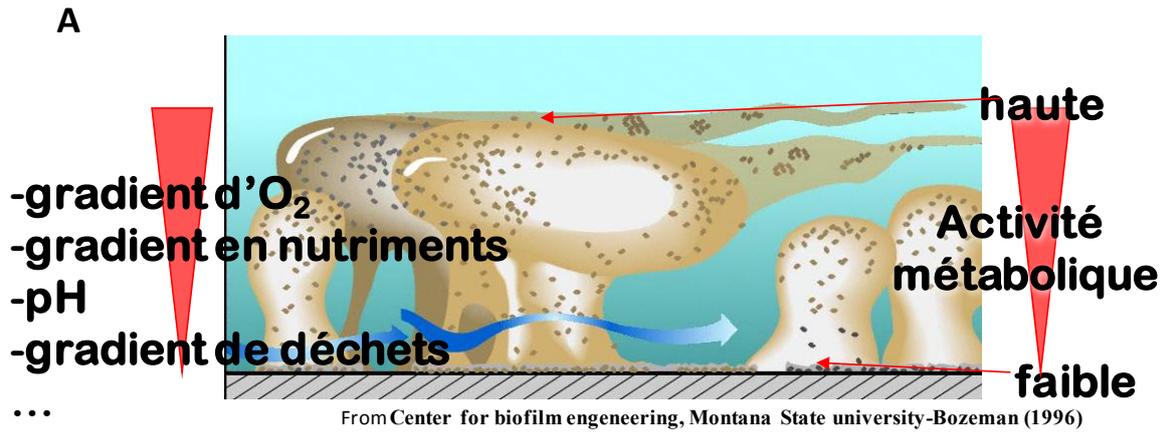
des curli) et *csgDEFG* (codant un régulateur transcriptionnel et la machinerie d'export et d'assemblage) (voir paragraphe III.3). Selon les isolats de *E. coli*, cliniques ou environnementaux, la formation des curli peut se faire à 37°C et/ou 28°C.

III.2.c. L'antigène 43 (Ag43)

Ag43 est la principale protéine membranaire rencontrée chez la plupart des *E. coli* commensales ou pathogènes. Elle est codée par le gène *agn43* (ou *flu*) (Diderichsen, 1980) dont la régulation est caractérisée par une variation de phase entre un état « ON » (expression) et un état « OFF » (pas d'expression) (Owen *et al.*, 1996). C'est une protéine de surface permettant l'auto-reconnaissance et faisant partie de la famille des auto-transporteurs (Henderson *et al.*, 1998). Elle est décrite comme affectant la morphologie des colonies, et permet la formation de biofilm en promouvant l'auto-agrégation des bactéries (Henderson *et al.*, 1997, Danese *et al.*, 2000). Elle n'est pas impliquée dans l'adhésion non spécifique aux surfaces.

III.2.d. Les pili conjugatifs

Divers travaux ont montré que l'introduction naturelle ou artificielle d'un plasmide conjugatif dans des communautés de *E. coli* conduisait à la formation d'un solide biofilm mature (Ghigo, 2001, Reisner *et al.*, 2003). Le pilus conjugatif F promeut à la fois l'adhésion initiale et la maturation du biofilm, *via* un attachement aux surfaces et l'établissement de contacts cellule-cellule importants, stabilisant la structure du biofilm (Molin & Tolker-Nielsen, 2003; Reisner *et al.*, 2003). Ces travaux ont mis en évidence une connexion générale entre biofilm et conjugaison, qui est cohérente avec de précédentes observations montrant que les contacts de surface affectaient positivement les dynamiques de transfert de plasmides (Simonsen, 1990).



B

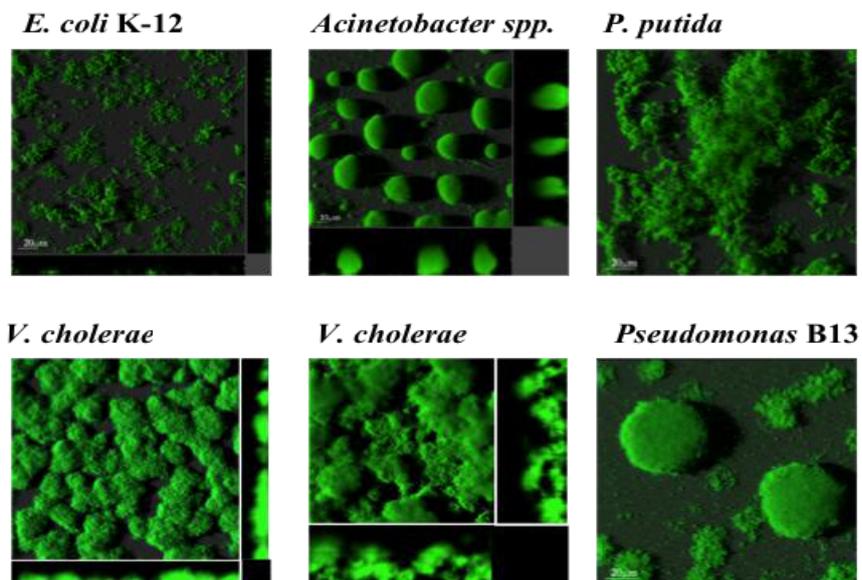


Figure 17: Architecture du biofilm

A / Schéma de biofilm mature avec microcolonies en forme de champignon et canaux. Divers gradients représentés par des flèches rouges sont observés au sein du biofilm.

B / Différentes architectures de biofilm selon l'espèce bactérienne (Soren Molin, DTU, Danemark). Biofilm de bactéries fluorescentes en flow-cell observées par microscopie confocale.

III.3. La matrice extracellulaire

La matrice extra-cellulaire qui enrobe les bactéries du biofilm est auto-produite et se compose essentiellement de polysaccharides, protéines, acides nucléiques et ions divalents (Sutherland, 2001). En fonction des conditions environnementales (oxygène, nutriments...), des espèces formant le biofilm et des conditions hydrodynamiques, la matrice extracellulaire peut avoir une composition chimique variable. Les polysaccharides, constituants majoritaires de cette matrice (jusqu'à 85% du volume total), peuvent être selon les espèces, polyanioniques (alginates chez *P. aeruginosa* (Wozniak *et al.*, 2003)) ou polycationiques (poly-N-acetylglucosamine chez *S. aureus* et *S. epidermidis* (Gotz, 2002)). L'ADN extracellulaire, autre composant de la matrice, semble jouer un rôle important dans le développement du biofilm. Il est indispensable à la formation du biofilm et permet une organisation correcte des cellules les unes par rapport aux autres (Whitchurch *et al.*, 2002, Gloag *et al.*, 2013). Cette matrice apporte au biofilm à la fois solidité et plasticité, elle permet sa structuration.

III.4. Architecture

Il existe de multiples architectures de biofilms (Figure 17B). L'architecture particulière du biofilm en forme de champignon (« mushroom ») dérive de différences dans le développement et la différenciation entre les bactéries au sein du biofilm. Au sein des biofilms, on trouve des micro-colonies séparées par des canaux aqueux qui permettent la circulation d'oxygène et de nutriments dans des régions plus profondes du biofilm, mais aussi d'évacuer les déchets. Ainsi des gradients de nutriments, d'oxygène, de pH, de déchets sont observés du sommet jusqu'à la base du biofilm (Figure 17A). L'état métabolique d'une bactérie au sein d'un biofilm dépendrait donc de la place qu'elle occupe dans la structure ; les bactéries localisées à la base du biofilm, sur la surface d'adhésion, devant probablement faire

face à plus de contraintes pour leur croissance (limitations en oxygène et nutriments, pH) que les bactéries proches de l'interface liquide en haut du biofilm (Monds & O'Toole, 2009).

IV. Spécificités du mode de vie biofilm

Des modifications génétiques (modifications du transcriptome) et phénotypiques apparaissent entre les formes planctonique et sessile.

IV.1. Signature génétique

Une étude a montré que 10% du génome de *E. coli* était différemment exprimé en biofilm et en culture planctonique (Beloin *et al.*, 2004) et que 1,9% des gènes différemment exprimés dans les deux modes de vie bactérien étaient sur- ou sous-exprimés d'au moins un facteur 2. Parmi ces gènes, les principaux étaient des gènes impliqués dans les processus cellulaires comme :

- la réponse au stress d'enveloppe (parmi lesquels *cpxP*, *spy*, *rpoE*...)
- le stress (*recA*, *dinI*)
- la synthèse de l'enveloppe et transport (*fimA*, *tatE*)
- la production d'énergie (*cyoD*, *sucA*, *sixI*, *nifU*)
- le métabolisme des carbohydrates (*rbsB*, *lamB*)

Parmi les gènes différemment exprimés en biofilm se trouvaient aussi de nombreux gènes de fonctions inconnues (à hauteur de 48%) suggérant que la vie en biofilm mettait en place des fonctions non nécessaires en culture planctonique.

IV.2. Modifications phénotypiques

Le mode de vie sous forme de biofilm protège les microorganismes qui l'ont adopté et leur confère de nombreux avantages : coopération dans certains systèmes cataboliques,

synergies entre microorganismes, expression phénotypiques de facteurs de résistance lors de situations de stress, etc (Costerton, 1999, Costerton *et al.*, 1999, Tomlin *et al.*, 2005).

La matrice extracellulaire constitue la première barrière de protection vis-à-vis d'un certain nombre d'agressions environnementales (dessiccation, action de biocides, forces de cisaillement,...) (Costerton *et al.*, 1999). Par sa viscoélasticité, elle limite la dispersion des biofilms leur permettant de mieux résister aux stress thermiques et à l'exposition aux rayonnements UV (Martinez & Casadevall, 2007).

Ceri et coll. ont mis au point un test (The Calgary Biofilm Device) permettant de comparer la concentration minimale inhibitrice de certains antibiotiques vis-à-vis de bactéries en biofilm et dans un mode vie planctonique. Ils ont montré que les biofilms tolèrent les antibiotiques à des concentrations 10 à 1000 fois plus importantes que les bactéries planctoniques (Ceri *et al.*, 1999). Certaines bactéries (*K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus*) sous forme biofilm sont viables à des concentrations minimales inhibitrices d'ampicilline et de ciprofloxacine 1 000 fois supérieures à celles mesurées pour les mêmes bactéries planctoniques (Stewart *et al.*, 2001). Le mode de vie biofilm confère donc un avantage énorme aux bactéries face à la pression de sélection antibiotique. Cette propriété fait du biofilm un ennemi majeur du corps médical (Costerton *et al.*, 1999).

Plusieurs raisons peuvent expliquer la plus forte résistance aux antibiotiques des bactéries au sein du biofilm. La présence de zones peu ou pas oxygénées dans les couches profondes du biofilm, peut contribuer à la résistance à certains biocides qui peuvent être inactivés dans ces conditions, ou qui sont peu efficaces sur les bactéries métaboliquement peu actives, ce qui est le cas de nombreuses bactéries au sein du biofilm. La résistance des bactéries en biofilm peut être aussi attribuée à un phénotype particulier des bactéries, la persistance (voir partie IV du Chapitre « Réponse SOS »), à la limitation de la diffusion de molécules dans les couches du biofilm et à la création d'un environnement local particulier.

Table 3 : Gènes de réponse au stress impliqués dans la formation de biofilm ou induits au sein du biofilm (Landini, 2009)

Gène	Protéine produite	Expression et/ou effet sur la formation de biofilm
<i>Dommmages/perturbation de la surface cellulaire</i>		
<i>cpxR/A</i>	Système de réponse au stress de l'enveloppe	Formation du biofilm
<i>cpxP</i>	Protéine chaperonne impliquée dans le stress extracytoplasmique	Structure du biofilm
<i>spy</i>	Protéine périplasmique	Structure du biofilm
<i>ompx</i>	Protéine X de la membrane externe	Inhibition de la formation de biofilm
<i>holA</i>	Possible régulateur des gènes de muréines	Formation du biofilm
<i>rfaP</i>	Biosynthèse des LPS	Formation du biofilm
<i>rpoE</i>	Facteur sigma E de la RNA polymérase	Induit en biofilm
<i>Réparation de l'ADN, réplication et division cellulaire</i>		
<i>recA</i>	Recombinaison, réparation, réponse SOS	Induit en biofilm
<i>dinI</i>	Protéine I inductible suite aux dommages à l'ADN	Induit en biofilm
<i>dcm</i>	DNA cytosine méthylase	Réprimé en biofilm
<i>sdiA</i>	Régulateur de <i>ftsQAZ</i> ; réponse SOS	Inhibition de la formation de biofilm
Stress oxydatif		
<i>msrA</i>	Méthionine sulfoxyde reductase	Induit en biofilm
<i>sodC</i>	Précurseur de la superoxyde dismutase	Induit en biofilm
<i>soxS</i>	Régulateur de la réponse au superoxyde	Induit en biofilm
<i>dps</i>	Protéine induite en phase stationnaire	Induit en biofilm
<i>Stress nutritionnel</i>		
<i>crp</i>	Protéine réceptrice de l'AMPc ; répression catabolique	Formation du biofilm
<i>csrA</i>	Régulateur de stockage de carbone	Inhibition de la formation de biofilm
<i>Autres stress environnementaux</i>		
<i>hdeD</i>	Protéine de membrane de la résistance acide	Induit en biofilm
<i>gadB</i>	Glutamate decarboxylase isoenzyme	Réprimé en biofilm
<i>cspI</i>	Protéine « cold shock-like »	Induit en biofilm
<i>hslS</i>	Petite « heat-shock » protéine HslS	Induit en biofilm
<i>hslT</i>	Petite « heat-shock » protéine HslT	Induit en biofilm

De plus, l'organisation en microcosme va favoriser les échanges de matériel génétique, avec entre autres la possibilité de transfert de caractères de résistance (Costerton *et al.*, 1999). Des études ont montré qu'un contact physique entre cellules donneuses et receveuses était hautement favorisé au sein de biofilms, favorisant le transfert horizontal de matériel génétique (Molin & Tolker-Nielsen, 2003 ; Aminov, 2011 ; Maeda *et al.*, 2006).

Il a également été démontré que les microorganismes au sein des biofilms sont plus résistants à la réponse immunitaire de l'hôte (Clutterbuck *et al.*, 2007). La taille des biofilms est tout d'abord un frein important au processus de phagocytose. Les cellules phagocytaires libèrent des enzymes qui ont très peu d'effet sur le biofilm et qui peuvent endommager les tissus (Khoury *et al.*, 1992). La matrice extracellulaire est également une barrière au système immunitaire de l'hôte car elle empêche la reconnaissance des antigènes bactériens par les anticorps (Costerton *et al.*, 1999).

V. Signaux et régulation dans la vie du biofilm

La formation de biofilm est sous le contrôle de diverses voies de régulation (Landini, 2009) et il semble exister une intime connexion entre formation de biofilm et réponse à des stress variés (Table 3). Parmi les voies de régulation, certaines vont être détaillées ci-dessous.

V.1. Rôle du di-GMPc

La transition entre les modes de vie planctonique (cellules mobiles) et biofilm (communautés cellulaires sédentaires) est régulée par le di-GMPc (di-guanosine monophosphate cyclique) pour revue (Hengge, 2009, Kalia *et al.*, 2013). Le messager secondaire di-GMPc est une molécule signal ubiquitaire et de nombreuses bactéries contiennent des gènes codant des protéines permettant la synthèse de di-GMPc. La production du di-GMPc est régulée par deux classes d'enzymes : les di-guanylate cyclases (également

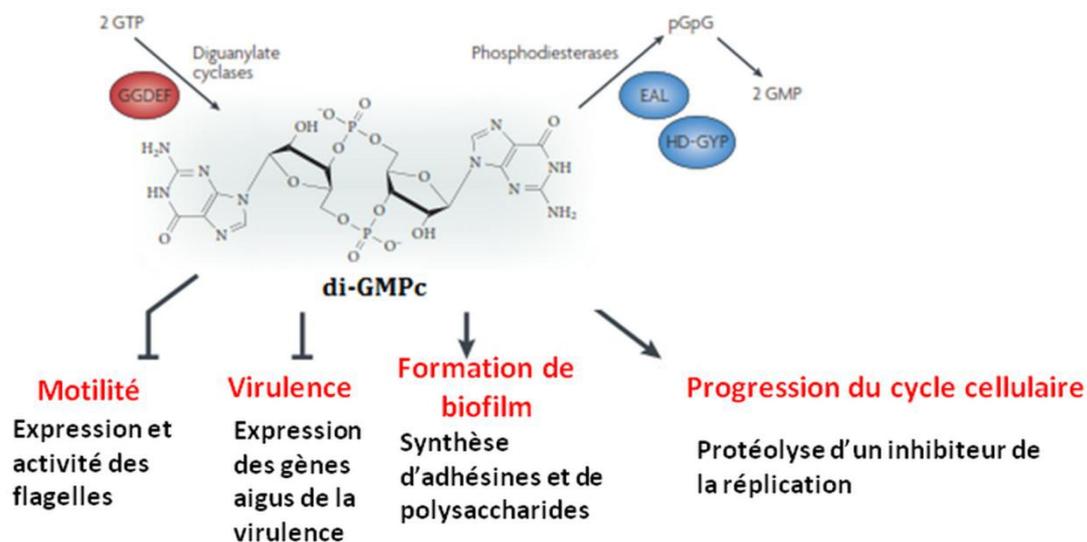


Figure 18 : Structure et fonctions physiologiques du di-GMPc

Au niveau cellulaire, la concentration en di-GMPc est contrôlée par les di-guanylate cyclases, protéines à motifs GGDEF en (rouge), et des phosphodiesterases qui portent des domaines EAL ou HD-GYP (en bleu). Le di-GMPc peut réduire la motilité en dérégulant l'expression ou l'assemblage des flagelles ou en interférant avec la fonction motrice des flagelles. Il réprime aussi l'expression des gènes de virulence aigus (par exemple chez *Vibrio cholerae*). Chez toutes les bactéries étudiées, le di-GMPc stimule la formation de biofilm en jouant sur la formation de fimbriae et autres adhésines ainsi que des exopolysaccharides de la matrice. Chez *C.crescentus*, l'action précise dans le temps et dans l'espace du di-GMPc est une étape-clé dans la progression du cycle cellulaire. D'après (Hengge, 2009).

appelées protéines GGDEF car elles contiennent un domaine GGDEF parfois GGEEF) qui synthétisent le di-GMPc, et les di-GMPc-phosphodiesterases (possédant un domaine EAL) qui dégradent le di-GMPc (Figure 18). Le di-GMPc peut réduire la motilité en régulant de façon négative l'expression des flagelles (chez *P. aeruginosa*) ou leur assemblage (chez *Caulobacter crescentus*) ou interférer avec les fonctions motrices des flagelles (chez *E. coli* ou *C. crescentus*). Chez toutes les bactéries, de hauts niveaux de di-GMPc stimulent diverses fonctions associées au biofilm comme la formation des fimbriae et d'autres adhésines, ainsi que les exopolysaccharides composant la matrice.

Chez *Salmonella* et certaines souches de *E. coli*, la cellulose est un composant essentiel de la matrice extracellulaire et est indispensable à la formation de biofilm. Chez ces dernières, la production de cellulose est en général régulée au niveau transcriptionnel par la protéine AdrA (elle même régulée par RpoS via CsgD (Romling *et al.*, 2000)) mais des régulations alternatives indépendantes de ces protéines peuvent aussi exister chez certaines souches ou dans certaines conditions (Da Re & Ghigo, 2006, Solano *et al.*, 2002). AdrA, ainsi que les autres régulateurs connus de la synthèse de cellulose, sont des protéines à motif GGDEF qui *via* la synthèse du di-GMPc vont activer le complexe cellulose synthase (le di-GMPc agissant comme un effecteur de la production du complexe cellulose synthase qui produit la cellulose). D'autres protéines GGDEF, telles que YdaM, YddV et YcgR, sont également impliquées dans la formation du biofilm, en jouant positivement sur l'agrégation cellulaire et en affectant négativement la motilité flagellaire, permettant ainsi le passage du stade planctonique au stade sessile (Mendez-Ortiz *et al.*, 2006, Weber *et al.*, 2006).

V.2. RpoS contrôle la formation du biofilm et la réponse aux stress environnementaux

Les facteurs sigma (σ) sont des protéines du complexe d'initiation de la transcription. Ils reconnaissent les séquences -35 et -10 des promoteurs et y recrutent le "core enzyme" de l'ARN polymérase composé des sous-unités α , β et γ . Il existe plusieurs facteurs σ , qui reconnaissent des promoteurs différents, grâce notamment à leur région d'interaction avec la séquence promotrice -35 qui est différente pour chaque facteur sigma (Gruber & Gross, 2003). Sept facteurs σ coexistent chez *E. coli*, le facteur σ^{70} jouant le rôle de facteur principal, les autres étant plus spécifiques à certains stress. Le facteur σ^S (codé par le gène *rpoS*), aussi appelé protéine RpoS) est le facteur σ principal de la phase stationnaire, et est aussi considéré comme le régulateur principal de la réponse générale au stress chez *E. coli* (Wosten, 1998). En culture batch en milieu complet, il a été montré que la concentration de RpoS augmentait nettement en début de phase stationnaire, l'ARN polymérase active à ce stade étant sous sa forme associée à σ^S (Jishage *et al.*, 1996). Cependant, contrairement à d'autres régulateurs comme ceux de la répression catabolique (CRP) ou de la réponse stringente (RelA), RpoS n'est pas uniquement impliqué dans la réponse au stress nutritionnel lié à l'entrée en phase stationnaire (Ihssen & Egli, 2004) mais semble plutôt réguler positivement des gènes liés à un stress cellulaire en réponse à une croissance lente (Hengge-Aronis, 1999). En plus de réguler un grand nombre de gènes impliqués dans la résistance au stress cellulaire et dans la protection de l'ADN contre des stress oxydatifs, RpoS joue aussi un rôle dans la formation de biofilm en contrôlant, de façon indirecte, la production de structures extracellulaires impliquées dans l'adhésion des bactéries aux surface (Landini, 2009). Ainsi la transcription de l'opéron *csgDEFG*, codant des protéines impliquées dans l'assemblage et la sécrétion des curli (cf Chapitre III, paragraphe I.3.b) dépend du régulateur MlrA lui-même sous le contrôle de *rpoS* (Brown *et al.*, 2001, Weber *et al.*, 2006)

V.3. CsgD, formation de biofilm et résistance au stress

CsgD, en plus de son rôle de régulateur de l'expression des curli (cf Chapitre III, paragraphe I.3.b), contrôle aussi des gènes codant des protéines et polysaccharides (EPS) extra-cellulaires, ainsi que des gènes impliqués dans des voies métaboliques. En effet, CsgD est un régulateur positif de la production de cellulose, de la production de l'antigène O et de l'expression de la protéine BapA chez *Salmonella* (Latasa *et al.*, 2005, Gibson *et al.*, 2006). De ces trois éléments, seule la protéine BapA est requise pour une formation efficace de biofilm. Les EPS dépendant de CsgD jouent plus un rôle dans la résistance aux stress environnementaux qu'un rôle dans l'adhésion (White *et al.*, 2006, Wang *et al.*, 2006, Gualdi *et al.*, 2008). Ces observations suggèrent fortement que la production de structures extra-cellulaires sous la dépendance de CsgD remplit deux rôles : transition du mode de vie planctonique au mode de vie biofilm médiée par les curli, et résistance aux stress de l'environnement *via* les EPS. Il représente ainsi un bon exemple de production coordonnée de déterminants du biofilm et de facteurs de réponse au stress (Landini, 2009). De plus, CsgD peut réguler des gènes jouant des rôles dans les processus métaboliques, en affectant l'expression de gènes impliqués dans la synthèse des acides aminés (Chirwa & Herrington, 2003). CsgD régule aussi négativement le pool de nucléotides de la cellule en réprimant les gènes de la biosynthèse des pyrimidines (comme l'opéron *pyrIB*) (Brombacher *et al.*, 2006). Par ailleurs, une régulation négative de ces gènes de biosynthèse des pyrimidines a aussi été observée en présence d'indole (un produit du métabolisme du tryptophane), l'indole ralentissant la croissance cellulaire et induisant la formation de biofilm (Martino *et al.*, 2003).

CsgD appartient de plus à une boucle de régulation avec σ^S : la transcription de *csgD* est dépendante de *rpoS* ; en retour, de fortes concentrations en CsgD conduisent à l'activation du gène *iraP* codant un facteur de stabilisation qui empêche la dégradation de σ^S ce qui conduit à terme à une régulation positive du régulon σ^S (Gualdi *et al.*, 2008).

V.4. La réponse stringente

La haute densité cellulaire qui règne au sein du biofilm peut entraîner une limitation en nutriments dans certaines couches ou niches du biofilm (Fux *et al.*, 2005, Stoodley *et al.*, 2002, Watnick & Kolter, 2000). Lorsque les bactéries se retrouvent dans des conditions de croissance très diminuées dans lesquelles l'apport en acides aminés est insuffisant pour assurer une synthèse protéique normale, elles court-circuitent un grand nombre de leurs activités, c'est ce qu'on appelle la réponse stringente (Boutte & Crosson, 2013). Cette dernière est caractérisée par l'accumulation de deux nucléotides inhabituels : le ppGpp ou guanosine tétraphosphate, et le pppGpp ou la guanosine pentaphosphate. Désignés sous l'appellation collective de (p)ppGpp ou alarmones, ces nucléotides régulent de façon coordonnée un grand nombre d'activités cellulaires.

V.4.a Métabolisme du (p)ppGpp

Chez *E. coli* et d'autres β - et γ -protéobactéries, les concentrations intra-cellulaires en (p)ppGpp sont sous le contrôle de deux protéines homologues : RelA (une synthétase) et SpoT (une hydrolase-synthétase) (Kalia *et al.*, 2013). La plupart des autres bactéries expriment un unique homologue RelA/SpoT (protéine RSH pour Rel-Spo homolog). RelA utilise du GTP et de l'ATP pour générer du pppGpp qui est ensuite converti en ppGpp. SpoT peut synthétiser à la fois le ppGpp (à partir de GDP + ATP) et le pppGpp (à partir de GTP + ADP), et elle est aussi responsable de l'hydrolyse du ppGpp et pppGpp en GDP et pyrophosphate (PPi), ou GTP et PPi respectivement (Potrykus & Cashel, 2008). Les domaines N-terminaux des protéines RelA et SpoT sont responsables de la synthèse, et de l'hydrolyse dans le cas de SpoT, de (p)ppGpp. La régulation des deux activités antagonistes de SpoT est cruciale pour la survie cellulaire. Cette régulation implique la fixation de RelA au niveau de sites A de ribosomes conduisant à la détection de l'absence d'aminacylation des tRNA, due

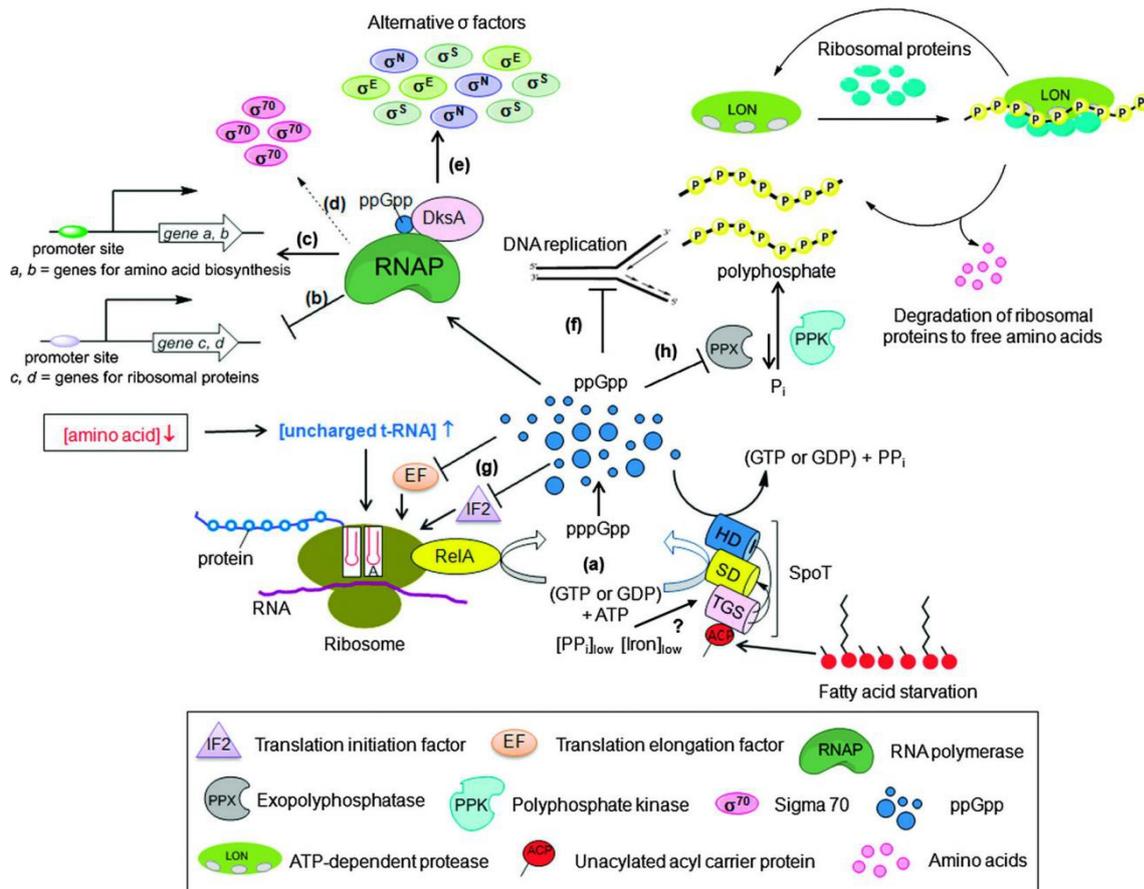


Figure 19 : Signalisation de la transduction par (p)ppGpp déclenchée chez *E. coli* suite à la privation en nutriments

(a) privation en acides aminés détectée au niveau de sites A de ribosomes en présence d'ARNt non chargés conduisant à la synthèse par RelA, de (p)ppGpp à partir de GTP (ou GDP) et d'ATP. Quand les acides aminés redeviennent disponibles, le (p)ppGpp est dégradé par SpoT. Lors d'une privation en acides gras, phosphate ou fer SpoT est activé pour synthétiser encore plus de (p)ppGpp.

le tandem ppGpp/DksA permet (b) l'inhibition de la transcription des promoteurs ribosomaux *via* une interaction directe avec l'ARNP et (c) module l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la biosynthèse des acides aminés (activation directe).

(d) activation de la transcription des gènes du stress par ppGpp et DksA qui vont délivrer l'ARNP du facteur σ général (σ^{70}) et (e) faciliter son interaction avec les facteurs σ alternatifs σ^E , σ^S , σ^N (régulation indirecte).

(f) ppGpp permet l'inhibition de l'initiation de la réplication.

(g) ppGpp module la traduction en se liant au facteur d'initiation (IF2) et aux facteurs d'élongation EF.

(h) en réponse à la privation en acides aminés, (p)ppGpp inhibe l'activité de l'exopolyphosphatase PPX, provoquant alors une accumulation de polyphosphates qui se lient aux protéines ribosomales et à la protéase Lon pour générer des acides aminés libres.

Tiré de (Kalia, Merey *et al.*, 2013)

à la privation en acides aminés. Un mécanisme similaire a été décrit pour la détection de la privation en acides gras par SpoT qui induit la liaison de protéines porteuses d'acétyl non acétylées à SpoT (pour revue (Kalia *et al.*, 2013)) (Figure 19(a)).

V.4.b Signalisation par le (p)ppGpp

(p)ppGpp régule la physiologie bactérienne *via* divers mécanismes. Il affecte plusieurs processus biochimiques dans la cellule incluant la transcription, la traduction, la réplication de l'ADN et il génère des facteurs de virulence en interagissant avec d'autres molécules signal (Figure 19).

(p)ppGpp régule la transcription :

- soit en se liant directement à l'ARN polymérase (ARNP) : il l'empêche alors de recruter des protéines partenaires impliquées dans la reconnaissance de l'ADN (Magnusson *et al.*, 2005) (Figure 19(b)). Les effets de l'interaction entre l'ARNP et le (p)ppGpp sont modulés par la protéine DksA qui en se liant à l'ARNP favorise les effets du (p)ppGpp (Paul *et al.*, 2004).

- soit de manière indirecte par un mécanisme impliquant la modulation de la liaison des facteurs sigma à l'ARNP (Figure 19 (d) et (e)). Par exemple, (p)ppGpp inhibe la liaison de l'ARNP aux promoteurs forts σ^{70} -dépendants favorisant la liaison de l'ARNP à d'autres facteurs σ associés à des gènes utiles pour combattre les stress subis (Jishage *et al.*, 2002). Un autre mécanisme indirect implique l'amélioration de la stabilité du facteur σ^S (RpoS) en induisant l'expression des protéines IraP (Bougdour & Gottesman, 2007) et IraD (Merrikh *et al.*, 2009) qui empêchent σ^S d'être redirigé vers le protéasome, empêchant ainsi sa dégradation.

(p)ppGpp inhibe la traduction à plusieurs niveaux, *via* la régulation de l'appareil de synthèse des protéines (ARNt, ARNr et protéines ribosomales), en inhibant directement

l'activité de traduction des facteurs d'élongation EF-Tu et EF-G (Cashel *et al.*, 1996), et en interagissant avec le facteur d'initiation de la traduction IF2 (Milon *et al.*, 2006), (figure 19(g)).

Chez *E. coli*, (p)ppGpp inhibe l'initiation de la réplication (Figure 19(f)) (Schreiber *et al.*, 1995). Chez *B. subtilis* c'est l'élongation lors de la réplication qui est inhibée par (p)ppGpp (Wang *et al.*, 2007). Chez *S. Typhimurium*, il promeut la dimérisation de la protéine *slyA* qui contrôle la transcription de gènes essentiels pour la virulence (Zhao *et al.*, 2008).

Chez *E. coli*, ppGpp joue également un rôle dans la régulation de la réponse au stress acide en interagissant avec l'enzyme LdcI (lysine decarboxylase inductible) et en modulant son activité. Cette enzyme est induite durant le stress acide et permet un contrôle de l'acidité cellulaire en augmentant le pH cytoplasmique (Kanjee *et al.*, 2011). Un autre exemple pour lequel (p)ppGpp interagit directement avec une enzyme et module ses fonctions est le cas de la régulation de l'exophosphatase, PPX, une enzyme qui dégrade le polyphosphate, source d'énergie pour la bactérie et molécule signal (Kuroda *et al.*, 1997). Durant un stress, (p)ppGpp inhibe PPX, ce qui conduit à une augmentation de la concentration en polyphosphate disponible dans la cellule, qui va se lier à des protéines ribosomales et à la protéase Lon, générant ainsi des acides aminés libres, et permettant aux cellules de lutter contre la privation en acides aminés (Kuroda *et al.*, 2001) (Figure 19(h)).

La voie du (p)ppGpp semble aussi interférer avec celle du quorum sensing (QS). Le QS est un système de contrôle matérialisé par des signaux moléculaires ou auto-inducteurs (AI) sécrétés et détectés par la cellule et dépendant de la quantité de cellules présentes dans le milieu (Costerton, 1999, Tomlin *et al.*, 2005). Lorsque la concentration en AI atteint une valeur seuil, des régulateurs transcriptionnels sont activés et vont exercer un contrôle au niveau de gènes spécifiques (Costerton *et al.*, 1999, Clutterbuck *et al.*, 2007, Irie & Parsek,

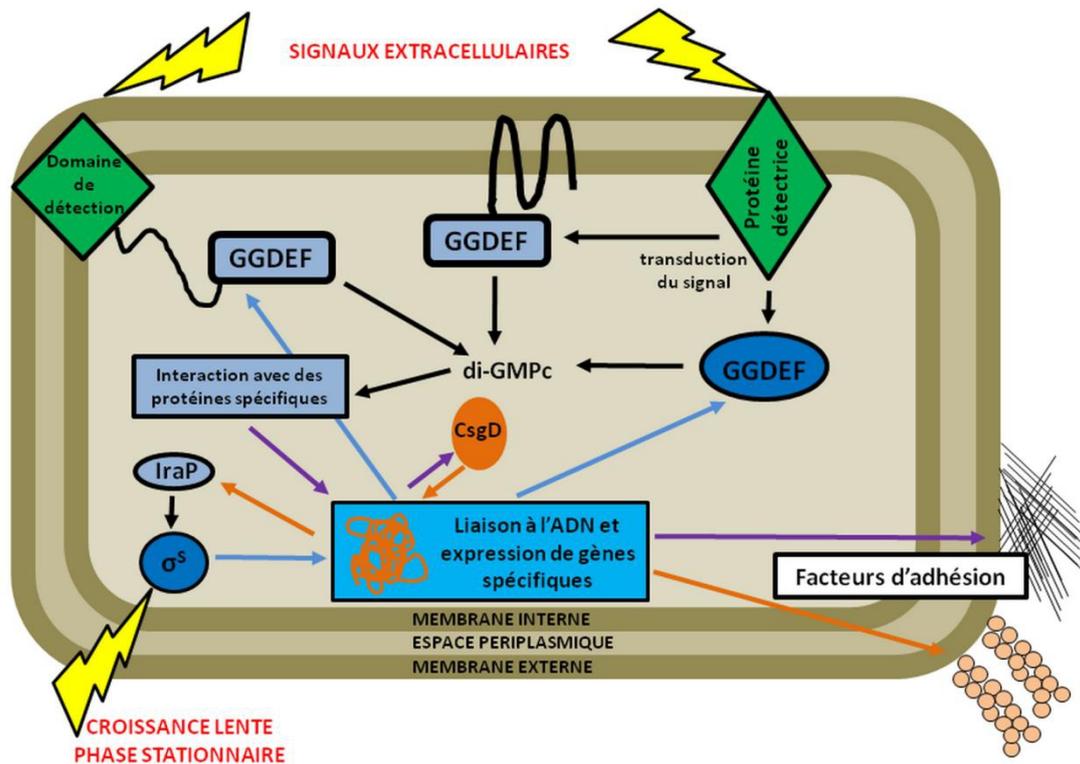


Figure 20 : Interactions entre le facteur σ^S , le régulateur CsgD et le di-GMPc.

Les protéines porteuses de domaines GGDEF peuvent synthétiser le di-GMPc de manière constitutive ou en réponse à des stimuli externes. La transcription σ^S -dépendante conduit à l'expression des protéines GGDEF (flèches bleues), entraînant une augmentation d'EPS (exopolysaccharides) et l'activation de la transcription de gènes conduisant à l'expression de CsgD (flèches violettes). CsgD active la production de curli et permet la stabilisation de σ^S via la production de IraP (flèches oranges). (Landini, 2009)

2008). Deux types d'AI peuvent être synthétisés par les bactéries : AI-1 (AHL : acylhomosérine lactone) et AI-2 (diester de furanosyl borate). Le QS peut stimuler ou réprimer l'expression de certains caractères comme la motilité ou certains facteurs de virulence (Tomlin *et al.*, 2005 , Clutterbuck *et al.*, 2007 , Irie & Parsek, 2008).

Des études ont montré un lien entre l'augmentation de l'expression du gène *relA* (codant la ppGpp synthétase) et l'augmentation de production de l'auto-inducteur AI-1 chez *P. aeruginosa* et ce de façon indépendante de la densité cellulaire (van Delden *et al.*, 2001). Cette interconnexion entre réponse stringente et QS pourrait être un moyen d'adaptation à des stress nutritionnels cellulaires (van Delden *et al.*, 2001). Chez des bactéries *S. mutans*, l'absence de *relA* conduit à une diminution de la formation de biofilm ainsi qu'à une augmentation de l'expression du gène *luxS* responsable de la synthèse de l'auto-inducteur AI-2 (Lemos *et al.*, 2004). Cependant les relations entre *relA* et *luxS* ne sont pas clairement établies à ce jour.

Les connexions qui existent entre ces différentes voies de régulation de la formation de biofilm illustrent bien que la formation de biofilm et les mécanismes de réponse au stress sont intimement liés (Figure 20).

Objectifs

Depuis plusieurs années, on observe une progression constante et alarmante du nombre de bactéries multirésistantes responsables d'infections nosocomiales mais aussi et plus récemment d'infections communautaires. Devant la rapidité de dissémination des multirésistances aux antibiotiques au sein du monde bactérien et le faible nombre de nouvelles molécules antibiotiques disponibles dans un futur proche, d'autres voies thérapeutiques sont à envisager. Les dernières décennies ont vu l'émergence des intégrons de multirésistance comme un moyen d'adaptation rapide et efficace pour les bactéries à Gram négatif face à l'utilisation des antibiotiques, aussi bien chez l'homme que chez l'animal. Dans ce contexte, il apparaît essentiel d'identifier et de développer des stratégies visant à empêcher l'expression des intégrases et ainsi limiter le recrutement ou le réarrangement de cassettes au sein des intégrons et la propagation des multirésistances. Ceci ne pourra se faire sans une meilleure compréhension des conditions d'expression et mode d'action des intégrases d'intégrons qui sont au centre de ce système adaptatif.

Des travaux du laboratoire ont permis de montrer que, en culture planctonique, l'expression des intégrases d'intégron de classe 1 et du SI de *V. cholerae*, sont sous le contrôle de la réponse SOS (Guérin, Cambray *et al.*, 2009). Or, ces conditions de culture sont assez éloignées des conditions réelles dans lesquelles peuvent s'observer la propagation des multirésistances que ce soit dans le tube digestif de l'homme ou de l'animal ou bien dans l'environnement. En effet, le biofilm est le mode de vie privilégié des bactéries dans les écosystèmes naturels dont le tube digestif et l'environnement, mais aussi sur du matériel médical (cathéters, prothèses, ...) implanté chez l'homme. C'est un mode de vie bactérien dans lequel les bactéries se développent en adhérant aux surfaces.

Mon projet de recherche a consisté à identifier les conditions/régulateurs d'expression de l'intégrase des intégrons de multirésistance de classe 1 dans un modèle de croissance

bactérienne se rapprochant plus des conditions réelles dans lesquelles l'acquisition/échange de résistance antibiotique peut être observée : le modèle de biofilm bactérien.

Les résultats de mon étude sont présentés en deux parties :

- I. Le mode de vie biofilm induit la réponse SOS et une nouvelle régulation, biofilm-spécifique, de l'intégrase d'intégron de classe 1.

Ces travaux seront présentés sous forme d'article. Ce dernier est en phase terminale de rédaction avec pour objectif une soumission à la revue *Molecular Microbiology*.

- II. Etude de l'effet $\Delta recA$: conséquences sur l'activité de recombinaison de IntI1 ou sur la fidélité de réplication au niveau des sites *attC* ?

Résultats

I. Le mode de vie biofilm induit la réponse SOS et une nouvelle régulation, biofilm-spécifique, de l'intégrase d'intégron de classe 1.

En plus d'être le mode de vie ubiquitaire des bactéries, le biofilm présente des caractéristiques particulières par rapport au mode de vie planctonique, à savoir : une résistance accrue aux antibiotiques, une augmentation de l'expression des gènes de réponse au stress et un transfert d'ADN entre bactéries facilité. Ces particularités du biofilm suggèrent que ce mode de vie pourrait être un lieu favorable à l'expression de l'intégrase d'intégron.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons utilisé un système de culture continue en microfermenteurs permettant la formation de biofilm. Nous nous sommes intéressés uniquement à l'intégrase d'intégron de classe 1, *IntI1*, et plus particulièrement à celle présentant des capacités de recombinaison maximales dans le modèle expérimental d'excision utilisé au laboratoire, *IntI1_{R32_H39}* (Jové *et al.*, 2010).

Lorsque j'ai commencé ma thèse, rien n'était connu quand à l'expression de la réponse SOS en biofilm. Il était pensé que ce stress devait être induit en biofilm, mais rien n'avait jamais été démontré. Nous avons utilisé comme modèle d'étude, une souche de *E. coli* K12, MG1656, portant un plasmide conjugatif (F') connu pour améliorer la formation de biofilm. Dans un premier temps, nous avons estimé le niveau d'expression des gènes *intI1* (intégrase) et *sfiA* (gène du régulon SOS) en biofilm par rapport au mode de vie planctonique dans différents environnements génétiques de MG1656 : sauvage, mutant $\Delta lexA$ (délétion du répresseur LexA : pas de répression) et mutant $\Delta recA$ (délétion de l'activateur RecA : répression permanente). Des fusions transcriptionnelles entre les promoteurs d'intérêt, *PintI1* et *P_{sfiA}*, et le gène rapporteur *lacZ*, ont été utilisées pour estimer les niveaux d'expression de *intI1* et de *sfiA* par des essais β -galactosidase. Cette approche a permis de montrer que,

comme il était supposé, la réponse SOS est bien plus élevée en biofilm qu'en culture planctonique, mais sans atteindre un niveau d'induction maximal. Les mêmes résultats ont été obtenus pour l'intégrase, *IntI1*, pour laquelle la plus forte expression observée en biofilm est corrélée avec une augmentation de son activité d'excision de λ log par rapport à la culture planctonique.

Pendant ces travaux, des résultats nouveaux montrant que la conjugaison influait positivement sur la réponse SOS et donc sur l'expression de l'intégrase ont été publiés (Baharoglu *et al.*, 2010). Comme nous utilisons dans notre modèle de biofilm une souche contenant un plasmide conjugatif, nous avons vérifié l'effet de la conjugaison bactérienne sur la régulation de l'expression de l'intégrase. Ceci, d'autant plus que le biofilm est connu pour favoriser l'échange de matériel génétique entre bactéries du fait de la densité bactérienne et leur interaction dans ce mode de vie (Molin & Tolker-Nielsen, 2003). Pour ce faire nous avons utilisé deux souches : une souche portant le plasmide conjugatif muté ($F'\Delta traI$) et une souche formant du biofilm suite à la sur-expression de fimbriae. Nous avons observé que la conjugaison n'influe que peu sur le niveau d'activation de *intI1* dans notre modèle, et avons confirmé que le mode de vie biofilm induisait bien l'expression de l'intégrase.

Nos premiers résultats montraient un niveau d'expression de *PintI1* plus élevé en biofilm qu'en culture planctonique dans des conditions complètement dé-réprimées, ce qui laissait suggérer l'existence d'une régulation biofilm-spécifique de l'intégrase, en plus de la régulation SOS. Nous avons alors cherché à identifier des régulateurs potentiels de l'expression de l'intégrase en biofilm. Nos résultats préliminaires indiquent que RelA permettant la synthèse de l'acteur majeur de la réponse stringente bactérienne, l'alarmone (p)ppGpp, serait impliqué dans la régulation de l'expression de l'intégrase d'intégron de classe 1 en biofilm.

II. Etude de l'effet $\Delta recA$: conséquences sur l'activité de recombinaison de IntI1 ou sur la fidélité de réplication au niveau des sites *attC* ?

Dans la suite de notre travail présenté dans l'article, nous avons voulu vérifier que les activités de recombinaison de IntI1_{R32_H39} étaient bien réprimées avec le mutant de délétion *recA*, or nous avons obtenu des résultats inattendus. En effet dans le mutant $\Delta recA$, les résultats expérimentaux ont montré une importante activité de recombinaison de l'intégrase IntI1 alors que l'expression de cette dernière était réprimée chez le mutant *recA*, que ce soit en biofilm ou en culture planctonique ((Guérin, Cambray *et al.*, 2009) et chapitre précédent). Ces résultats inattendus nous ont amenés à chercher à comprendre ce qu'il se passait chez ce mutant.

II.1. Matériel et méthodes

II.1.a. Souches bactériennes et plasmides.

Les souches bactériennes et plasmides utilisés dans cette étude sont listés dans la table 4. Deux souches nouvelles ont été utilisées dans cette partie du travail en plus de celles utilisées dans l'article présenté dans la première partie des résultats expérimentaux de ce travail de thèse:

- la souche TG1 : une souche de *E. coli* K12 portant un plasmide conjugatif F' similaire au F'^{tet}, mais sans le gène de résistance à la tétracycline.

- la souche MG1656*lexAind3*-, dérivée de MG1656 qui a été obtenue par transduction P1 de la souche K12 AB1157*lexAind3malF*- vers la souche MG1656 (Table 4).

Table 4 : Souches et plasmides utilisés lors de ce travail

Nom	Génotype ou description	Référence
Souches d' <i>E. coli</i>		
MG1656	Souche dérivative de <i>E. coli</i> MG1655; <i>lacZ</i> ⁻	(Espeli, Moulin <i>et al.</i> 2001)
MG1656Δ <i>recA</i>	délétion du gène <i>recA</i> ; répression constitutive des gènes SOS	(Guérin, Cambray <i>et al.</i> , 2009)
MG1656Δ <i>sulA</i> Δ <i>lexA</i>	délétion des gènes <i>lexA</i> et <i>sulA</i> ; expression constitutive des gènes SOS	(Guérin, Cambray <i>et al.</i> , 2009)
AB1157 <i>lexAind3malF</i> -	<i>lexAind3malF</i> ::Tn10 ^c , expression d'une protéine LexA non clivable, répression constitutive des gènes SOS ; Tet ^R	Cadeau de B. Michel
MG1656 <i>lexAind3</i> -	expression d'une protéine LexA non clivable, répression constitutive des gènes SOS; Tet ^R	Ce travail
NEB 5-alpha F' Iq	F' <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>zzf</i> ::Tn10 / <i>fhuA2</i> Δ(<i>argF-lacZ</i>)U169 <i>phoA glnV44 Φ80</i> Δ(<i>lacZ</i>)M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i> ; Tet ^R	(New England Biolabs)
TG1	F'(<i>traD36 proAB + lacI</i> ^q <i>lacZ</i> ΔM15 <i>supE hsdΔ5 thi</i> Δ(<i>lac-proAB</i>))	Cadeau de C. Beloin
TG1Δ <i>recA</i>	délétion du gène <i>recA</i> ; répression constitutive des gènes SOS	(Bernier, Lebeaux <i>et al.</i> , 2013)
TG1 <i>recA56</i>	TG1 <i>recA56srl</i> ::Tn10 ; répression constitutive de la réponse SOS; Tet ^R	Cadeau de C. Beloin
TG1 <i>lexAind3</i> -	TG1 <i>lexAind3malF</i> ::Tn10, expression d'une protéine LexA non clivable, répression constitutive des gènes SOS ; Tet ^R	(Bernier, Lebeaux <i>et al.</i> , 2013)
Plasmides		
F'	Plasmide conjugatif F' permettant une formation améliorée de biofilm; Tet ^R	(Ghigo, 2001)
p6851	Dérivé de pSU38 (origine de réplication p15A), porte la cassette excision reporter (<i>attC_{aadA7}-catT4-attC_{VCR2}-aac6'-Ib</i>) ; Km ^R , Cm ^R	(Guérin, Cambray <i>et al.</i> , 2009)
pZE1-mcs1	dérivé sans promoteur du pZE12-mcs1; origine de réplication ColE1; Amp ^R	(Guérin, Cambray <i>et al.</i> , 2009)
pZE1-IntI _w	clonage de la région comprenant le site <i>attI</i> et le gène <i>intI1</i> codant l'intégrase IntI _{R32_H39} de l'intégron de classe 1 In40 dans pZE1-mcs1; expression de l'intégrase sous le contrôle de son propre promoteur ; Amp ^R	(Guérin, Cambray <i>et al.</i> , 2009)
pBAD18	Plasmide de clonage pour expression de protéine sous le contrôle du promoteur <i>ParaB</i> inductible à l'arabinose ; Amp ^R	
pBAD- <i>intI1_w</i>	gène <i>intI1</i> codant l'intégrase IntI _{R32_H39} de l'intégron de classe 1 In40 sous le contrôle du promoteur <i>ParaB</i> inductible à l'arabinose ; Amp ^R	(Jové, Da Re <i>et al.</i> , 2010)
pBAD- <i>intI1_wY312F</i>	<i>intIY312F</i> sous le contrôle du promoteur <i>ParaB</i> inductible à l'arabinose, code la protéine IntIY312F (mutation au niveau de la séquence codant le site catalytique), Sp ^R	Cadeau de C. Loot

II.I.b. Conditions de culture

Sauf indiqué, les cultures ont été réalisées à 37°C en milieu Luria-Bertani (LB) complémenté si nécessaire en kanamycine à 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (maintien du plasmide p6851 ; Table 4), choramphénicol à 25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, ampicilline à 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ et/ou tétracycline à 7,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (sélection et maintien du plasmide F^{'tet} ou sélection du transposon Tn10 associé à la mutation *lexAind3-*).

II.I.c. Biofilm en culture continue

Le système utilisé est un système de microfermenteurs (MF) en verre mis au point à l'Institut Pasteur (Ghigo, 2001), qui se compose de (Figure 15D) :

- une ou plusieurs bonbonnes de milieu (10L)
- une pompe péristaltique utilisée à 1,1 ml/min, vitesse qui permet de renouveler le milieu plus rapidement que la vitesse de multiplication des bactéries planctoniques dans ces conditions expérimentales.
- un bain-marie à 37°C
- une série de MF (12 MF maximum par expérience). Le MF se compose d'un tube en verre comportant des tubulures en verre qui permettent l'arrivée et sortie de milieu, et l'arrivée d'air, et d'une spatule en Pyrex amovible sur laquelle se forme le biofilm.
- une arrivée d'air comprimé à la pression de 0,35 bars qui permet l'évacuation permanente du milieu en excès.
- une bonbonne de sortie de milieu pour récupérer le milieu usagé sortant des MFs.

Les MFs sont inoculés par trempage, pendant 2 minutes, de la spatule en verre dans un tube contenant 15 mL d'une culture *overnight* (o/n) diluée à une D.O_{600nm} de 2. La spatule est

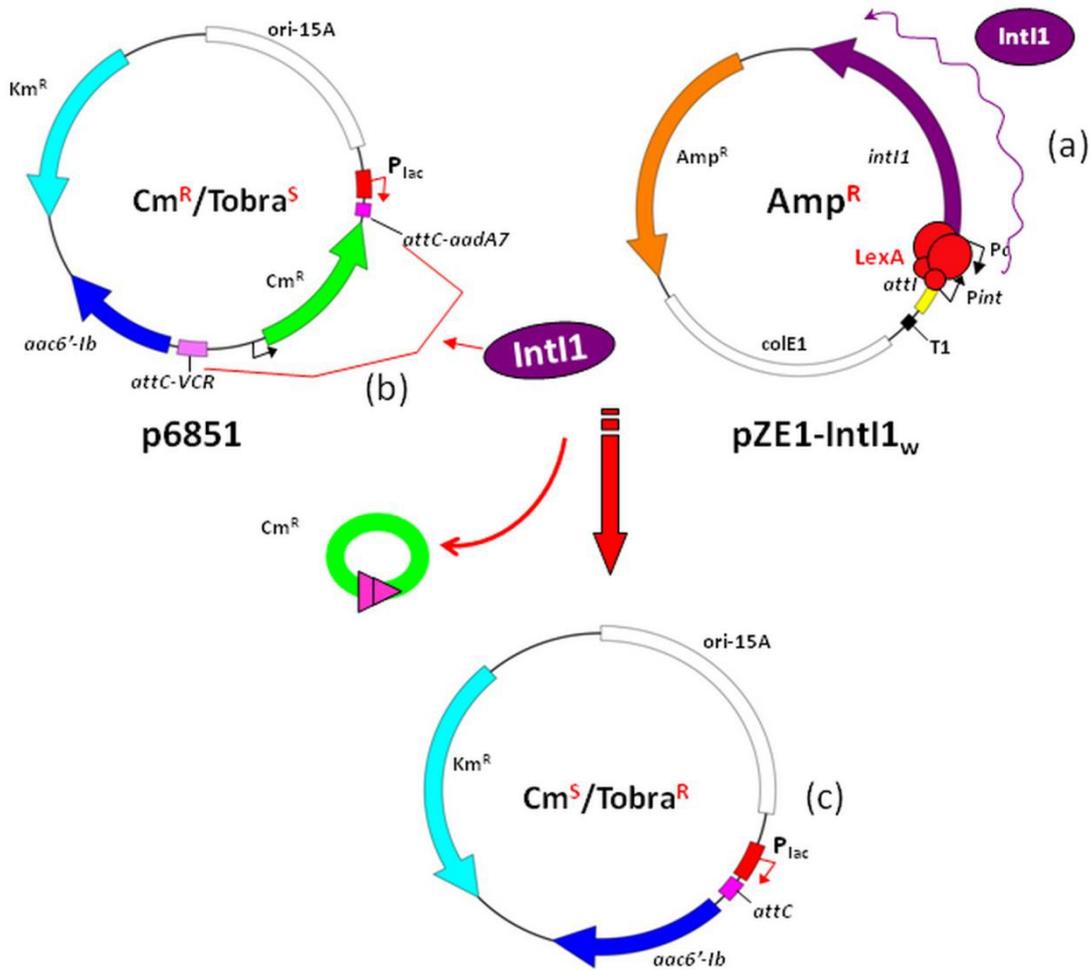


Figure 21 : Schéma du test d'excision

L'activité d'excision de l'intégrase IntI1_{R32_H39} est estimée selon le schéma suivant. Deux plasmides sont portés par la souche bactérienne : le plasmide, p6851, contient un gène de résistance au chloramphénicol (*Cm^R* en vert) et son promoteur constitutif entouré par deux sites de recombinaison *attC* (*attC_{aadA7}* et *attC_{VCR}* rectangles roses). En amont de cette structure, le promoteur *P_{lac}* (cadre rouge) et en aval le gène *aac(6')-Ib*, codant la résistance à la tobramycine, dépourvu de promoteur (flèche bleu foncé); le plasmide pZE1-IntI1_w permet l'expression de l'intégrase à partir de son propre promoteur (i.e. régulé par la réponse SOS comme schématisé). Les résistances conférées par les plasmides sont indiquées en leur centre. Lorsque l'intégrase est produite (a) (ovale violet), elle catalyse la recombinaison entre les deux sites *attC* (b), ce qui a pour résultat d'exciser la cassette de résistance au Cm et de rapprocher le promoteur *P_{lac}* du gène *aac(6')-Ib* et permettre son expression (c). La fréquence d'excision est mesurée en déterminant le ratio nombre de colonies résistantes à la tobramycine (bactéries ayant effectué l'excision) sur nombre de colonies résistantes à l'ampicilline et à la kanamycine (bactéries totales) (Guérin, Cambray *et al.* 2009; Jové, Da Re *et al.* 2010).

brièvement rincée dans du milieu frais avant d'être introduite dans le MF contenant un volume de milieu permettant de recouvrir la spatule. Une fois la spatule insérée dans le MF, la pompe est réamorçée et la culture se poursuit pendant 24 heures. A la fin de l'expérimentation, la spatule est délicatement retirée du MF et le biofilm est mis en suspension par vortexage dans 10 mL de milieu LB stérile. Lorsque le biofilm est trop fragile (dans le cas des mutants *recA*), il est remis en suspension par agitation minutieuse du MF. Le biofilm en suspension est conservé dans de la glace avant de procéder aux expériences de comptage. Des aliquotes sont prélevés et congelés pour des études ultérieures quand nécessaire.

II.I.d. Cultures planctoniques

Les cultures planctoniques sont réalisées en parallèle des cultures en MF, en diluant au 1/100^{ème} dans 10 ml de milieu LB frais les cultures diluées ayant servi à inoculer les MFs (D.O_{600nm} de 2). Pour les expériences avec les plasmides pBad, des pré-cultures o/n sont réalisées en milieu LB complété avec les antibiotiques nécessaires et du glucose 1%. Ces pré-cultures sont diluées au 1/100^{ème} en LB + antibiotiques + 0,2% d'arabinose. Les cultures sont incubées à 37°C sous agitation pendant 24 heures.

II.I.e. Test d'excision

Un réseau synthétique de deux pseudo-cassettes *attC_{aadA7}-cat(T4)-attC_{VCR}-aac(6')-Ib* précédé du promoteur de l'opéron *lac*, Plac, et conférant une résistance au chloramphenicol (le gène *cat(T4)* a son propre promoteur), est porté par le plasmide p6851 (Guérin, Cambray *et al.*, 2009, Jové *et al.*, 2010). Le test d'excision est basé sur la capacité de l'intégrase à catalyser la recombinaison entre les sites *attC*, résultant en la délétion de la pseudo-cassette synthétique *cat(T4)-attC_{VCR}* et en l'expression du gène de résistance à la tobramycine *aac(6')-Ib* à partir du promoteur Plac (Figure 21).

Les bactéries hébergent à la fois le plasmide p6851 qui contient aussi un gène de

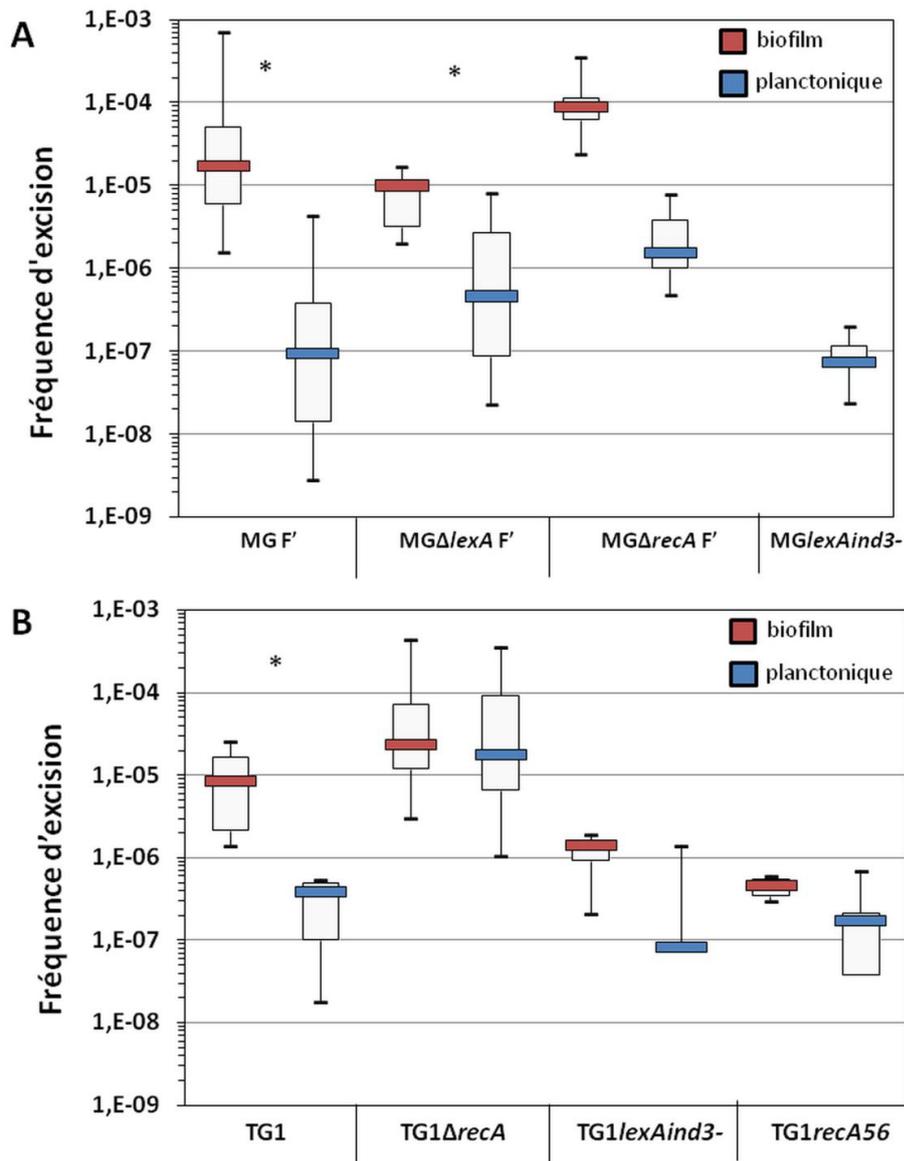


Figure 22: Activité de recombinaison de l'intégrase IntI1

Fréquences d'excision de l'intégrase IntI1_{R32_H39} exprimée à partir de son propre promoteur PintI1 en biofilm (en rouge) ou en culture planctonique (en bleu). **A/** dans les souches MG1656 F^{tet}, MG1656ΔlexA F^{tet}, MG1656ΔrecA F^{tet} et MG1656lexAind3-. **B/** dans les souches TG1, TG1ΔrecA, TG1lexAind3- et TG1recA56. Ce graphique est une représentation en boîte à moustache dans laquelle la ligne horizontale colorée à l'intérieur de la boîte représente la médiane, la ligne basse de la boîte le premier quartile, la ligne haute de la boîte correspond au troisième quartile et les « moustaches » (petits traits horizontaux terminant les lignes verticales) sont les valeurs minimales et maximales obtenues. Chaque essai a été effectué au moins 6 fois. MG : MG1656. Les * indiquent une différence significative observée entre les deux modes de culture pour une souche donnée (p<0,05).

résistance à la kanamycine ainsi que le plasmide pZE1-IntI1_{R32_H39} (portant un gène de résistance à l'ampicilline). pZE1-IntI1_{R32_H39} permet l'expression de l'intégrase sous le contrôle de son propre promoteur PintI1 (Table 4). Les cultures o/n servant à inoculer les MF ou les cultures planctoniques sont réalisées en milieu contenant du chloramphenicol afin de n'avoir en début de culture que les bactéries n'ayant pas réalisé d'excision due à l'expression « basale » de l'intégrase. Après 24h de croissance en cultures biofilm et planctonique en milieu LB, des dilutions sont déposées sur gélose LB-Amp-Km (population totale) et LB-Tobra (recombinants seulement). La fréquence d'excision est calculée en déterminant le ratio nombre de colonies Tobra^R sur nombre de colonies Amp^RKm^R. Les tests ont été effectués au moins 6 fois pour chacune des souches.

II.2. Résultats

II.2.a. Activité de IntI1 dans la souche MG1656Δ*recA* F'

Voulant vérifier que l'effet de la régulation de l'expression de PintI1 par la réponse SOS corrélait bien avec l'activité de l'intégrase, nous avons effectué des tests d'excision dans la souche MG1656 F'^{tet} et ses mutants Δ*recA*, Δ*lexA* (Table 4). Comme le montrent les résultats présentés (Figure 22A), l'intégrase IntI1 démontre une activité d'excision plus importante en culture biofilm (fréquence d'excision moyenne de $3,9 \cdot 10^{-5}$) qu'en culture planctonique ($4,4 \cdot 10^{-7}$). La fréquence maximale d'excision en biofilm semble être atteinte dans la souche sauvage en biofilm; en effet, il n'y a pas de différence vraiment significative entre cette fréquence et celle obtenue pour la souche Δ*lexA* en biofilm (respectivement $3,9 \cdot 10^{-5}$ vs $8,7 \cdot 10^{-6}$; $p=0,05$) (Figure 22A). Bien que les niveaux d'expression de PintI1 ne soient pas significativement différents entre les conditions biofilm pour la souche sauvage et planctonique dans la souche Δ*lexA* (cf. chapitre précédent, activités bêta-galactosidase respectivement de 64 et 74,1 unités Miller), la fréquence d'excision en culture planctonique

dans la souche $\Delta lexA$ n'atteint pas la fréquence d'excision obtenue pour la souche sauvage en biofilm (respectivement $1,6 \cdot 10^{-6}$ et $3,9 \cdot 10^{-5}$; $p < 0,001$) (figure 22A). En revanche, en culture planctonique, la fréquence d'excision moyenne de $MG1656\Delta lexA/F^{tet}$ est significativement supérieure à celle de la souche sauvage ($1,6 \cdot 10^{-6}$ vs $4,4 \cdot 10^{-7}$; $p < 0,001$)

De façon surprenante, la fréquence moyenne d'excision obtenue avec la souche $\Delta recA$ augmente de façon significative quel que soit le mode de culture, et ce malgré le fait que dans cette souche le niveau d'expression d'*intI1* soit réprimé puisque la réponse SOS ne peut pas être déclenchée. En biofilm, elle atteint le même niveau de fréquence maximale obtenue dans nos conditions expérimentales comparables à celles obtenues en biofilm avec les souches sauvage et $\Delta lexA$ (Figure 22A). En culture planctonique, elle est comparable à celle obtenue avec la souche $\Delta lexA$ planctonique ($2,7 \cdot 10^{-6}$ vs $1,6 \cdot 10^{-6}$, $p > 0,05$) mais significativement plus élevée que celle obtenue avec la souche sauvage dans les mêmes conditions de culture (Figure 22A).

Ces résultats suggèrent que la recombinaison est plus efficace en l'absence de protéine RecA, alors que l'expression de l'intégrase est réprimée. Afin de vérifier, si cet effet résultait de l'absence de RecA, nous avons utilisé la souche $MG1656lexAind3^-$, souche dans laquelle la protéine LexA n'est pas clivable et qui présente donc un phénotype SOS identique à celui d'une souche $\Delta recA$, i.e. un état de répression constitutive. Malheureusement, nous n'avons pas pu construire la souche $MG1656lexAind3^- F^{tet}$, le facteur F^{tet} exprimant une résistance à la tétracycline et la mutation *lexAind3*⁻ étant associée au transposon *Tn10* qui confère aussi la résistance à la tétracycline (Table 4). La souche $MG1656lexAind3^-$ ne formant pas de biofilm en quantité suffisante, les tests d'excision ont donc été réalisés en culture planctonique uniquement. Comme le montre la Figure 22A, dans cette souche la fréquence d'excision est significativement réduite par rapport à celle obtenue pour la souche $\Delta recA$ en culture planctonique (fréquence moyenne d'excision de $9,7 \cdot 10^{-8}$; $p < 0,001$). Elle est

en fait comparable à celle obtenue avec la souche sauvage MG1656 F^{'tet} en culture planctonique, un résultat plus conforme à la régulation SOS dépendante de l'intégrase. Cette différence d'activité entre les deux fonds génétiques (MG1656*lexAind3*- et MG1656 Δ *recA* F^{'tet}) correspondant à un même état de répression de la réponse SOS semble confirmer soit un rôle de la protéine RecA, soit un effet pléiotropique consécutif à la délétion *recA* et qui jouerait sur la réplication du plasmide induisant l'apparition de clones résistants à la tobramycine.

II.2.b. Activité de IntI1 dans la souche TG1 Δ *recA*

Afin de vérifier que les résultats obtenus avec la souche MG1656 Δ *recA* F^{'tet} n'étaient pas un « effet souche », nous avons effectué les mêmes tests d'excision avec une autre souche de *E. coli* K12, la souche TG1 (Table 4), capable de former du biofilm. Pour cette souche nous disposons des mutants *lexAind3*-, Δ *recA* et *recA56*. La mutation *recA56*, permet la synthèse d'une protéine RecA qui n'est plus capable de recombinaison, et qui bien qu'elle puisse toujours se lier à l'ADN simple brin, est incapable d'induire l'autoprotéolyse de LexA (Lauder & Kowalczykowski, 1993). Le phénotype SOS de la souche TG1*recA56* est donc équivalent à celui des souches TG1 Δ *recA* et TG1*lexAind3*- : répression constitutive.

La souche TG1 sauvage portant les plasmides p6851 et pZE1-IntI1_w donne des fréquences d'excision similaires à celles obtenues avec la souche MG1656 F^{'tet} : la fréquence d'excision est significativement plus importante en biofilm qu'en culture planctonique ($1,1 \cdot 10^{-5}$ vs $3,1 \cdot 10^{-7}$; $p < 0,01$; Figure 22B comparer à Figure 22A). Et de même que pour la souche MG1656 Δ *recA* F^{'tet}, la souche TG1 Δ *recA* présente des fréquences d'excision étonnamment élevées, et dans ce cas similaires en biofilm et en culture planctonique ($9,9 \cdot 10^{-5}$ vs $8,3 \cdot 10^{-5}$ respectivement ; $p = 0,4$). Ces fréquences sont tout à fait comparables à celles obtenues avec la souche MG1656 F^{'tet} en biofilm (comparer Figures 22A et 22B). Par contre,

l'effet de la délétion de *recA* sur la fréquence d'excision est plus fort en culture planctonique dans la souche TG1 que dans la souche MG1656 F^{'tet} ($8,3 \cdot 10^{-5}$ vs $2,7 \cdot 10^{-6}$ respectivement ; $p < 0,05$; Figure 22A et B).

Dans les souches TG1*lexAind3*- et TG1*recA56*, les fréquences d'excision obtenues en culture planctonique sont comparables entre elles et à celle de la souche TG1 (respectivement $3,3 \cdot 10^{-7}$, $2,1 \cdot 10^{-7}$ et $3,1 \cdot 10^{-7}$; Figure 22B). En biofilm, la fréquence d'excision pour la souche TG1*recA56* est similaire à sa fréquence d'excision en planctonique ($4,6 \cdot 10^{-7}$, aucune induction); la souche TG1*lexAind3*- a une fréquence d'excision en biofilm légèrement supérieure à sa fréquence d'excision en planctonique ($3,3 \cdot 10^{-7}$ vs $1,2 \cdot 10^{-6}$; $p < 0,05$), mais nettement inférieure à celle de la souche sauvage TG1 en biofilm ($1,2 \cdot 10^{-6}$ vs $1,1 \cdot 10^{-5}$, $p < 0,05$) (Figure 22B).

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus avec la souche MG1656 F^{'tet}. De plus, les fréquences d'excision de la souche TG1*recA56* confirment bien que l'effet observé pour les souches $\Delta recA$ est dû, soit à l'absence de la protéine RecA, soit à un effet pléiotropique consécutif à la délétion *recA* et qui jouerait sur la réplication du plasmide. Il est à noter que cet effet est aussi dépendant de la présence d'IntI1, car les tests effectués avec le plasmide pZE1-mcs1 (témoin négatif ne portant pas le gène de l'intégrase) donnent toujours des fréquences d'excision nulles, et ce, quelles que soient la souche utilisée et les conditions de culture (données non représentées).

II.2.c. Hypothèse du « slippage »

Dans le cas d'un rôle direct de la protéine RecA, une explication possible serait que RecA pourrait se lier avec l'ADN simple brin des sites *attC* (la réplication des sites *attC* impliquant le simple brin du bas) et interférer avec la liaison d'IntI1. Une autre hypothèse, peut-être plus probable, serait que dans un environnement $\Delta recA$, la réplication du plasmide

Table 5 : Effet de la mutation Y312F dans une souche $\Delta recA$.

Fréquences d'excision	pBad-18	pBad- <i>intI1_w</i> ^(a)	pBad- <i>intI1wY312F</i> ^(b)
MG1656 F ^{'tet}	0	$1,2 \cdot 10^{-5}$ ($\pm 9,1 \cdot 10^{-7}$)	0
MG1656 $\Delta recA$ F ^{'tet}	0	$1 \cdot 10^{-1}$ ($\pm 4 \cdot 10^{-2}$)	0

^(a) L'intégrase IntI_{R32_H39} est exprimée à partir du promoteur *ParaB*.

^(b) L'intégrase IntI_{Y312F} est exprimée à partir du promoteur *ParaB*.

soit perturbée au niveau des sites *attC* par un phénomène appelé le « slippage ». Dans notre cas, les brins du bas des sites *attC* seraient sous leur conformation de repliement tiges-boucles créant un décalage dans l'alignement des brins d'ADN lors de la réplication (Bzymek & Lovett, 2001). Ainsi, l'ADN polymérase, au lieu de lire la séquence en son entier, déraperait entre les sites *attC*, et la région comprise entre ces deux sites *attC* qui contient la cassette de résistance au chloramphénicol serait perdue, conduisant donc à la production d'un plasmide permettant l'expression de la résistance à la tobramycine. L'effet observé étant aussi dépendant de la présence de l'intégrase, l'hypothèse est que l'intégrase stabiliserait la conformation de repliement tiges-boucles des sites *attC*, conformation qui dans un environnement $\Delta recA$ favoriserait le phénomène de slippage.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé une intégrase qui présente une mutation Y312F au niveau de son site catalytique. Cette intégrase, IntI1Y312F, peut se lier à l'ADN, mais elle n'est plus capable d'effectuer la recombinaison (Johansson *et al.*, 2004).

Afin de comparer l'activité de cette intégrase mutée à celle de l'intégrase sauvage, nous avons électroporé les plasmides pBAD, pBAD-*intI1w* ou pBAD-*intI1wY312F* ainsi que le plasmide p6851 dans les souches MG1656 F^{'tet} et MG1656 $\Delta recA$ F^{'tet}. Dans ces constructions l'expression de l'intégrase n'est plus régulée par la réponse SOS mais induite par l'arabinose. Les expériences d'excision ont été réalisées en culture planctonique seulement. Comme observée précédemment lorsque l'expression de l'intégrase était sous le contrôle de son propre promoteur (Figure 22), l'induction de l'intégrase à partir du plasmide pBad se traduit par une fréquence d'excision nettement plus élevée dans la souche MG1656 $\Delta recA$ F^{'tet} que dans la souche sauvage (1.10^{-1} vs $1,2.10^{-5}$ respectivement ; Table 5). Ces fréquences d'excision sont supérieures à celles observées précédemment car le niveau d'expression de *intI1* est plus important à partir du promoteur ParaB. Par contre, lorsque l'intégrase mutée IntI1Y312F est produite, aucun événement d'excision n'est observé quelle

que soit la souche considérée (Table 5). Ces résultats ne semblent donc pas être en accord avec l'hypothèse du « slippage ». En effet, si ce phénomène de slippage entrait en jeu, avec l'intégrase IntI1Y312F nous ne devrions observer aucun événement de recombinaison dans la souche sauvage, mais de nombreux événements dans la souche $\Delta recA$. Nous avons vérifié que la protéine IntI1Y312F a été exprimée correctement dans nos expériences par des dosages de transcrits du gène *intI1* codant cette intégrase mutée (données non représentées).

Ces résultats suggèreraient donc que c'est l'absence de protéine RecA qui est la cause de l'augmentation de la fréquence de recombinaison observée dans la souche $\Delta recA$.

Discussion

Les intégrons constituent de formidables outils d'échange et d'acquisition de gènes, et il existe une forte corrélation entre multi-résistance bactérienne et présence d'intégron (Leverstein-van Hall et al., 2003, Barraud & Ploy, 2011). En effet, les cassettes de gènes décrites chez les intégrons de multi-résistance codent des résistances à quasiment toutes les familles d'antibiotiques existantes (Partridge et al., 2009). L'intégrase d'intégron est capable de catalyser des échanges de cassettes de gènes au sein du même intégron (réarrangement) ou entre deux intégrons différents. Avant 2009 (Guérin, Cambray et al., 2009), peu d'éléments étaient connus quant à la régulation de ce système. On sait maintenant que l'expression de *intI1* est sous le contrôle de la réponse SOS. Cependant, jusqu'à ce jour, les travaux concernant les intégrons et l'étude de leur régulation ont toujours été réalisés en culture planctonique. Ce mode de vie est assez éloigné de celui adopté par les bactéries dans les écosystèmes naturels, dont le tube digestif et l'environnement, mais aussi sur du matériel médical implanté chez l'homme, où les bactéries sont retrouvées sous forme de biofilm.

L'objectif de ce travail a donc été d'étudier l'expression de l'intégrase des intégrons de classe 1 dans un modèle expérimental se rapprochant un peu plus des conditions naturelles, i.e. un modèle de biofilm. Outre le fait qu'il représente le mode de vie majeur des bactéries dans les environnements, la particularité du mode de vie biofilm est qu'il présente des caractéristiques propres qui laissent penser qu'il pourrait constituer un mode de vie favorable à l'expression et à l'activité de l'intégrase (échange d'ADN favorisé entre bactéries, résistance accrue aux antibiotiques, présence de stress...). Nous avons choisi d'utiliser un modèle de formation de biofilm en culture continue (Ghigo, 2001) et comme souche formatrice de biofilm, la souche de *E. coli* MG1656 (dérivée *lac-* de la souche MG1655, souche séquencée et bien caractérisée) portant le plasmide conjugatif F^{'tet}. L'introduction du plasmide conjugatif avait pour but d'augmenter la capacité de la souche MG1656 à former du biofilm (meilleure adhérence aux surfaces grâce au pili conjugatifs, le biofilm formé est solide

et reproductible) (Ghigo, 2001). La régulation de l'intégrase impliquant la réponse SOS, nous sommes aussi intéressés à l'expression de cette réponse en mode de vie biofilm ce qui n'avait jamais été étudié auparavant lorsque nous avons commencé ce travail de thèse. Pour ce faire, nous avons choisi le gène *sfia* (*sulA*) comme témoin de cette réponse SOS. Il code la protéine SulA qui agit lors de la réponse SOS en bloquant la division cellulaire lors des réparations des dommages à l'ADN et qui est également sous le contrôle de LexA.

Nos résultats ont montré que le biofilm constitue bien un milieu où la réponse SOS est surexprimée, l'expression du gène *sfia* atteignant en biofilm un niveau de base 2,2 fois supérieur à celui exprimé en culture planctonique. Cependant cette induction reste bien en deçà d'une dé-repression complète du promoteur P*sfia*, car en situation dé-réprimée (mutant Δ *lexA*) l'activité du promoteur est 12,3 fois plus importante, et peut-être plus étant donné que dans la souche Δ *lexA*, le nombre de copies de plasmide par cellule est diminué de moitié par rapport à celui de la souche sauvage. Une étude parue au début de l'année 2013 a montré dans le cadre d'une étude sur l'hypertolérance à l'ofloxacin en biofilm, que l'expression de *sfia* était induite en biofilm par rapport à une culture planctonique (Bernier *et al.*, 2013). Nos résultats sont donc concordants avec cette étude et apportent quelques enseignements supplémentaires. En effet, ces deux études utilisent des modèles de biofilm et conditions de croissance différents, ainsi qu'une souche de *E. coli* K12 différente: notre biofilm, formé par la souche de *E. coli* MG1656 F^{tet}, croît en culture continue et milieu riche (LB), celui de Bernier *et al.*, formé par la souche de *E. coli* TG1, croît en culture statique et milieu minimum (M36B1+0,4% glucose) (Bernier *et al.*, 2013). Dans le modèle de biofilm statique de Bernier *et al.*, l'induction de l'expression de P*sfia* augmente progressivement dans le temps, avec une augmentation en biofilm par rapport à une culture planctonique de 1,5 fois en 24h, et de 2 fois au bout de 96h de croissance (Bernier *et al.*, 2013). Nous aurions pu croire qu'en milieu minimum et dans des conditions statiques, les bactéries du biofilm subissent plus de stress

pouvant induire un niveau basal de la réponse SOS plus élevé. Hors, dans notre modèle en culture continue en milieu riche LB, nous avons observé une induction de 2,2 fois dans un biofilm mature de 24h. Il serait intéressant de regarder l'évolution de cette réponse à des temps plus longs. Ces différences suggèrent que bien que l'induction de la réponse SOS est probablement une signature du mode de vie biofilm, son niveau d'induction variant en fonction de type de biofilm et des conditions de croissance.

La réponse SOS étant induite en biofilm, il n'a pas été surprenant d'observer que l'expression de l'intégrase de l'IM de classe 1 était aussi induite en biofilm, dans le cas d'IntI1 le facteur d'induction était de 3,6 fois dans un biofilm de 24h. Tout comme pour *sfIA*, cette induction n'était pas maximale et toujours soumise à la régulation SOS comme c'est le cas en culture planctonique (Guérin, Cambray *et al.*, 2009). En effet, en conditions dé-reprimées (mutation du promoteur PintI1 dans le site de LexA), l'activité de PintI1 est encore augmentée de 3,3 fois.

Notre choix de souche bactérienne a failli être remis en cause lors de l'avancement de ce travail, avec la publication d'un article montrant que la conjugaison induisait la réponse SOS (suivi de l'expression du gène *recN*) et une augmentation de l'expression de l'intégrase (que ce soit chez *E. coli* ou *V. cholerae*) (Baharoglu *et al.*, 2010). Hors, la capacité à former du biofilm de la souche de *E. coli* que nous utilisons dans nos expérimentations dépend de la présence du plasmide conjugatif F^{'tet}. Dans notre cas, toutes les bactéries possèdent le plasmide F^{'tet}, donc la conjugaison ne peut pas se produire de façon complète, le transfert se faisant par contact d'une bactérie F⁺ vers une bactérie F⁻. Toutefois il est possible qu'un début de transfert ait lieu, on parle alors de « conjugaison abortive », et qu'il puisse déclencher la réponse SOS. Le biofilm étant connu pour être un environnement favorisant le transfert horizontal de gènes (Maeda *et al.*, 2006, Molin & Tolker-Nielsen, 2003), nous avons donc vérifié que l'induction d'expression de PintI1 et P*sfIA* que nous observions en biofilm

dans des conditions non induites n'était pas seulement le résultat de ce phénomène. Nous avons estimé le niveau d'expression planctonique et biofilm d'*intI1* dans deux nouvelles souches: la MG1656 portant le plasmide F^{'tet} modifié, F^{'tet} Δ *traI* (mutant pour le gène de transfert *traI*) et une souche MG1656 modifiée, MG1656_zeoPcL*fim*, qui est capable de former du biofilm suite à une sur-expression de fimbriae (Korea *et al.*, 2010). Bien que l'expression d'*intI1* soit réduite dans le mutant F^{'tet} Δ *traI*, le ratio d'induction biofilm *versus* planctonique reste constant (entre 3,2 et 3,6) pour les trois souches testées. Ces résultats confirment donc que l'induction de la réponse SOS est bien une nouvelle signature du mode de vie biofilm.

Il a été récemment montré que l'expression des intégrases d'intégrons pouvaient, en plus de leur régulation par la réponse SOS, être aussi contrôlée par d'autres mécanismes. Ainsi, chez *E. coli* la protéine associée au nucléoïde FIS est capable de se lier au niveau de *PintI1* et les protéines FIS et HNS pourraient réprimer l'expression d'*intI1* (Cagle *et al.*, 2011). Chez *V. cholerae*, Baharoglu *et al.* ont montré que le gène *intIA* codant l'intégrase du SI était aussi régulé par la protéine CRP, cette régulation étant probablement indépendante de la régulation SOS (Baharoglu *et al.*, 2012). CRP est le récepteur de l'AMPc et est connue pour réguler non seulement des voies cataboliques, mais aussi de nombreux gènes impliqués dans l'adaptation et la survie dans l'environnement, gènes de virulence,... (Gorke & Stulke, 2008 ; Rojo, 2010).

Nos résultats obtenus avec le mutant Δ *lexA* montrant que le niveau d'expression de *PintI1* est plus élevé en biofilm qu'en culture planctonique alors que celui de *PsfIA* était identique dans les deux conditions de culture, indiquent qu'il y aurait, en biofilm, une régulation spécifique de l'intégrase. Cette régulation serait, de plus, indépendante de LexA, cette différence étant aussi obtenue avec le promoteur *PintI1** (*PintI1* muté au niveau du site

LexA) chez la souche sauvage et le mutant $\Delta lexA$, démontrant ainsi que l'effet observé n'est pas dû à un effet pléiotrope de la mutation $\Delta lexA$.

Aucun site de fixation de la protéine CRP ne semble être présent dans la région promotrice de *PintII* suggérant que cette régulation spécifique serait différente de celle observée chez *V. cholerae*. En fait, nos derniers résultats suggèrent que RelA, un régulateur central de la réponse stringente bactérienne, serait impliqué dans la régulation positive de *intII* en biofilm. Des expériences de complémentation sont néanmoins nécessaires afin de confirmer ce résultat. RelA est responsable de la synthèse de ppGpp, l'acteur principal avec le pppGpp de la réponse stringente qui est responsable de la réorganisation de la transcription cellulaire conduisant à une réduction du taux de croissance des bactéries, en situation de carences nutritionnelles (acides aminés, phosphates, acides gras, carbone, fer) ou d'autres stress (choc osmotique, stress acide,...) (Dalebroux & Swanson, 2012; Rojo, 2010). Les nucléotides (p)ppGpp affectent directement ou indirectement divers processus tels que transcription, la traduction, la réplication de l'ADN, la virulence, la réponse aux stress acides et facilitent l'utilisation des facteurs sigma alternatifs (σ^S , σ^E and σ^N) et stabilisent σ^S , le facteur sigma contrôlant la réponse au stress général chez *E. coli*. La régulation de *intII* par RelA n'est probablement pas directe mais fait intervenir un autre effecteur, lui-même régulé par RelA et le (p)ppGpp. L'expression de FIS est négativement régulée par la réponse stringente (Ninnemann *et al.*, 1992, Walker *et al.*, 1999), et dépend aussi de la phase de croissance des bactéries : elle est fortement produite en phase exponentielle et très peu en phase stationnaire (Ball *et al.*, 1992, Ninnemann *et al.*, 1992). Il a été montré que la régulation de FIS dépendant de la phase de croissance est indépendante de la réponse stringente, car en l'absence de RelA, FIS présente le même profil d'expression i.e. forte expression en phase exponentielle et faible expression en phase stationnaire (Ball *et al.*, 1992). Ces observations associées au fait que le biofilm est constitué en majorité de cellules

en phase stationnaire, rendent peu probable une implication de la protéine FIS dans la régulation biofilm spécifique d'*intII*.

Chez les bactéries, les nucléotides (cycliques ou linéaires : di-GMPc, di-AMPC, GMPc, AMPC, (p)ppGpp...) sont connus comme seconds messagers importants impliqués dans la régulation de nombreux processus-clés requis pour l'adaptation et impliqués dans la formation de biofilm (Kalia *et al.*, 2013 ; Landini, 2009). L'implication du (p)ppGpp *via* RelA comme régulateur de l'expression de l'intégrase en culture biofilm suggère que cette expression pourrait être localisée au sein de micro-niches dans le biofilm. En effet, les biofilms sont des milieux très hétérogènes avec des structures particulières dans lesquelles sont observés des gradients de nutriments, d'oxygène et de déchets (Monds & O'Toole, 2009). Ainsi dans le biofilm il existe des micro-niches au sein desquelles les bactéries pourraient subir une carence en nutriments (Huang *et al.*, 1998). De même, il est également possible que seule une partie des cellules au sein des biofilms expriment la réponse SOS. Dans ce cas, nos résultats ne nous donneraient qu'une valeur sous-estimée du niveau d'induction basal de la réponse SOS et de l'expression de l'intégrase. Pour estimer le niveau d'expression des gènes *intII* ou pour *sfiA*, nous calculons en effet une activité β -galactosidase par rapport à la population bactérienne totale, et non pas en considérant seulement les bactéries qui exprimeraient la réponse SOS ou l'intégrase. Il est ainsi probable qu'au sein du biofilm, les niveaux d'expression de la réponse SOS et de l'intégrase soient variables, plus ou moins induits en fonction des conditions de stress ressenties par les bactéries à l'endroit où elles se trouvent. Les bactéries expérimentant des carences en nutriment exprimeraient donc plus d'intégrase que celles vivant dans des micro-niches non carencées.

Notre étude et des études précédentes (Beloin *et al.*, 2004 , Bernier *et al.*, 2013), montrent que les gènes régulés par la réponse SOS sont induits en biofilm. Notre étude montre aussi que cette induction SOS dépendante n'est pas maximale et qu'elle peut donc

encore être augmentée. Et les signaux d'induction de la réponse SOS ne manquent pas dans ces environnements naturels ubiquitaires que sont les biofilms, ce qui peut avoir des répercussions importantes sur la propagation/acquisition de résistances aux antibiotiques. Si l'on se place dans cette perspective de résistances antibiotique, toutes les conditions semblent optimales en biofilm pour que ces phénomènes se produisent. Les biofilms sont des environnements privilégiés pour l'échange de matériels génétiques (Molin & Tolker-Nielsen, 2003, Maeda *et al.*, 2006), et donc la propagation de résistances antibiotiques. La grande promiscuité des bactéries dans cet environnement va favoriser la conjugaison qui va induire la réponse SOS (Baharoglu & Mazel, 2011). La réponse SOS peut aussi être déclenchée par des concentrations sub-inhibitrices en antibiotiques, comme cela a été montré chez *V. cholerae* avec de nombreux antibiotiques (ciprofloxacine, triméthoprim, tétracycline, chloramphénicol, rifampicine, spectinomycine, kanamycine, gentamicine, streptomycine, tobramycine, néomycine), ou encore chez *E. coli* (ciprofloxacine, triméthoprim) (Baharoglu & Mazel, 2011; Guérin, Cambray *et al.*, 2009). Certains antibiotiques (triméthoprim, ofloxacine, ciprofloxacine) peuvent être retrouvés à des concentrations parfois très importantes dans des effluents hospitaliers (Passerat *et al.*, 2010, Gomez *et al.*, 2006, Lindberg *et al.*, 2004, Duong *et al.*, 2008, Thomas *et al.*, 2007). Les bactéries au sein du biofilm pouvant résister à des concentrations 10 à 1000 fois plus élevées en antibiotiques que lorsqu'elles sont en culture planctonique (Stewart *et al.*, 2001), pourront donc déclencher la réponse SOS. L'induction de la réponse SOS intrinsèque au mode de vie, combinée aux inductions supplémentaires déclenchées par des signaux extérieurs va avoir pour conséquences de favoriser l'échange et l'acquisition de résistances aux antibiotiques. Un exemple avec SXT qui est un élément conjugatif intégratif (ICE) dérivé de *V. cholerae*, porteur de gènes conférant des résistances, notamment au triméthoprim et au sulfaméthoxazole, antibiotiques couramment utilisés (Waldor *et al.*, 1996). Il a été montré que

la réponse SOS induisait l'expression des gènes nécessaires au transfert de SXT et par conséquent augmentait sa fréquence de transfert et ainsi la propagation des résistances (Beaber *et al.*, 2004). De même avec les intégrons de classe 1, en biofilm, l'induction de l'expression de l'intégrase (par la réponse SOS induite par le mode de vie biofilm et la régulation RelA), éventuellement encore augmentée par une pression antibiotique déclenchant la réponse SOS, pourrait accroître la probabilité des bactéries à acquérir de nouvelles cassettes de résistance. L'environnement (eaux de rivière, effluents hospitaliers ou communautaires, usine de traitements des déchets, etc..) contient un grand nombre d'intégrons avec une variété de gènes cassettes remarquable (Stalder *et al.*, 2012, Stalder *et al.*, 2013), il est donc un lieu idéal d'échange/acquisition de cassettes, avec un risque réel de dissémination de résistance. Notre étude montre l'intérêt d'étudier les mécanismes de résistance et leur régulation dans des modèles plus proches des environnements naturels dans lesquels sont observés émergence et dissémination des résistances. Ces régulations positives de l'intégrase en biofilm sont d'autant plus inquiétantes si l'on considère le biofilm bactérien du tractus gastro-intestinal chez l'homme. Le tractus gastro-intestinal humain contient une quantité de bactéries impressionnante, 10^{14} bactéries représentant plus de 500 espèces (Ley *et al.*, 2006, Eckburg *et al.*, 2005). L'augmentation en biofilm des possibilités d'échange de cassettes *via* les intégrons constitue donc un risque majeur au sein de l'écosystème digestif qui contient de nombreuses bactéries à Gram négatif dont *E. coli*. Ceci est d'autant plus vrai lors de traitements antibiotiques *per os*. Un réarrangement de cassettes sur un intégron de classe 1 chez *P. aeruginosa* a d'ailleurs été récemment observé *in vivo* chez un patient suite à un traitement antibiotique (Hocquet *et al.*, 2012). La souche initialement sensible à une céphalosporine de 3^{ème} génération, la ceftazidime, portait une cassette de résistance *bla*_{OXA-28} (codant une β -lactamase à spectre élargi) précédée d'une autre cassette (*gcuF1*). Dans cette configuration (*gcuF1* précédant *bla*_{OXA-28}), la résistance à la ceftazidime n'était pas conférée

(Hocquet *et al.*, 2012). Suite au traitement du patient avec du métronidazole, la réponse SOS a été induite, la cassette *gcuFI* qui précédait la cassette *bla_{OXA-28}* a été excisée, permettant l'expression d'une forte résistance à la ceftazidime. Ainsi le traitement par un antibiotique, a induit, suite à un événement d'excision dans l'intégron, l'expression d'une résistance à un autre antibiotique chez une bactérie qui portait un gène cassette peu exprimé avant le stress antibiotique (Hocquet *et al.*, 2012). Il serait d'ailleurs intéressant de vérifier si la réponse SOS est induite *in vivo* à un niveau basal plus élevé que celui du biofilm et s'il existe dans ce contexte une régulation *intI1* spécifique.

Face à l'absence de nouveaux traitements antibiotiques dans un futur proche, de nouvelles stratégies sont requises pour lutter contre la dissémination et l'acquisition de résistance aux antibiotiques. Kalan et Wright ont récemment émis l'hypothèse de « thérapie adjuvante » qui utiliserait des adjuvants dont le rôle serait de potentialiser l'effet des antibiotiques en inhibant par exemple un mécanisme de régulation (Kalan & Wright, 2011). Le rôle de la réponse SOS dans la régulation de divers mécanismes bactériens impliqués dans la résistance aux antimicrobiens, suggère que les régulateurs de cette réponse, LexA et RecA, pourraient être des cibles potentielles intéressantes (Da Re & Ploy, 2012; Cirz *et al.*, 2005). Si l'on veut efficacement lutter contre ces mécanismes d'échanges/acquisitions de résistances, en inhibant l'expression de l'intégrase par exemple, il faut bien les connaître. Nos résultats semblent indiquer que prendre comme cible les régulateurs de la réponse SOS afin d'empêcher l'expression de l'intégrase, pourrait ne pas être suffisant si l'intégrase est induite en biofilm par un autre mécanisme de régulation indépendant de la réponse SOS. Ils soulignent aussi l'importance d'étudier les régulations des systèmes d'acquisition/expression de résistance dans des modèles plus proches des conditions naturelles où se produisent ces échanges.

Outre nos résultats sur la régulation de l'expression de l'intégrase, ce travail de thèse a permis de mettre en évidence un phénotype inattendu dans un environnement génétique $\Delta recA$: augmentation de l'activité de recombinaison de l'intégrase IntI1. Des expériences complémentaires sont en cours afin de pouvoir déterminer si cet effet est dû à l'absence de protéine RecA, ou à un effet de « slippage » lors de la réplication plasmidique chez ce mutant.

Conclusions et Perspectives

Cette étude a permis de montrer que le biofilm présente une autre caractéristique qui le différencie du mode de vie planctonique: l'induction de la réponse SOS. Cette dernière reste toutefois ouverte à la réponse à de nouveaux stress exogènes, le niveau de base atteint en biofilm n'étant pas le niveau maximal. La réponse SOS induite suffit néanmoins à activer correctement l'expression de l'intégrase d'intégron de classe 1 pour permettre l'expression de son activité de recombinaison dans le biofilm. D'autre part, nos résultats indiquent aussi que l'expression de l'intégrase *IntI1* est aussi sous le contrôle d'une régulation spécifique du biofilm qui impliquerait la réponse stringente *via* une régulation *relA* dépendante. Ces résultats confirment donc notre hypothèse initiale, selon laquelle le biofilm serait un milieu très favorable à l'expression de l'intégrase et à l'acquisition/échange de cassettes de résistance.

Ce travail n'en est encore qu'à ses débuts quant à cette nouvelle régulation biofilm-spécifique de l'intégrase. Il faut en effet tout d'abord confirmer les effets observés dans le mutant *relA* en complétant cette délétion à l'aide d'un plasmide de sur-expression de RelA, et vérifier que la régulation est alors rétablie. Cette expérience est en cours de réalisation au laboratoire.

L'étape suivante sera de rechercher les acteurs de la réponse stringente impliqués dans la régulation de l'intégrase. RelA étant le régulateur général de cette réponse, il est peu probable que l'effet observé soit direct. Le facteur σ^S , ou RpoS, est le régulateur de la réponse générale au stress chez les bactéries ; il pourrait être un candidat potentiel. Pour évaluer l'implication de RpoS dans la cascade de régulation de *intI1* en biofilm, nous pourrions réaliser un mutant de délétion de *rpoS*, mais aussi sur-exprimer le gène *rpoS* dans le mutant MG1656 Δ *relA* F^{tet} afin d'observer si cette sur-expression rétablit la régulation biofilm dépendante. En effet la présence de (p)ppGpp entre autre effets, stabilise la protéine RpoS, sa sur-expression pourrait partiellement palier l'absence de (p)ppGpp.

Il est à noter que chez 10% des intégrons de classe 1, il existe un second promoteur de cassettes P2 créé par l'insertion de 3 bases au milieu du site de fixation de LexA dans la région promotrice de *PintI1* (Collis & Hall, 1995). Dans cette configuration l'expression de l'intégrase est constitutive du fait de la destruction de la boîte LexA (Guérin, Cambray *et al.*, 2011). Il serait intéressant de vérifier si cette configuration naturelle d'un intégron de classe 1, est sensible à la régulation biofilm spécifique. Il se pourrait en effet que la présence du promoteur P2 ne permette pas à cette régulation de se faire dans ce contexte.

L'induction de l'expression de l'intégrase en biofilm pose la question suivante : la ré-organisation des gènes cassette au sein d'un intégron est-elle favorisée en biofilm en absence ou en présence d'une pression de sélection ? Ceci pourrait être testé en utilisant un intégron synthétique porté par un plasmide et comportant plusieurs cassettes de résistance. Il faudrait estimer si la probabilité de réarrangement de ces cassettes augmente en biofilm par rapport à ce qui se passe en culture planctonique avec ou sans traitement antibiotique. Une autre approche pourrait être de former un biofilm mixte et d'essayer de suivre l'acquisition de résistance entre bactéries.

Un autre point qu'il serait intéressant de tester, est l'effet des antibiotiques sur la régulation du SOS et de l'intégrase en biofilm. Lors de ce travail, nous avons essayé de tester l'effet de la ciprofloxacine sur l'expression de l'intégrase mais les essais n'ont pas été concluants.

Enfin, le biofilm étant un milieu hétérogène en termes de disponibilités de nutriments, d'O₂, pH, etc, il semble intéressant d'essayer de localiser « géographiquement » l'expression de *sfIA* et d'*intI1* au sein du biofilm. L'expression est-elle généralisée au sein du biofilm ou seulement au sein de micro-niches soumises à des stress locaux comme la carence en nutriment ? Ceci pourrait être tenté par une approche en microscopie confocale et l'utilisation de fusions transcriptionnelles entre les promoteurs d'intérêt et un gène codant une

fluorescence (GFP, protéine fluorescent dans le rouge). Nous avons fait quelques tentatives en utilisant une fusion transcriptionnelle *PintI1-gfp*. Nos résultats préliminaires semblent indiquer que le niveau d'expression de *PintI1* (ainsi que du mutant *PintI1**) est trop faible pour produire un signal GFP détectable avec notre appareillage (microscope confocal de la plateforme de microscopie de l'Université de Limoges).

L'ensemble de ces approches devrait permettre de mieux caractériser la régulation de l'intégrase en biofilm, étape essentielle pour le développement de nouvelles approches de lutte contre l'acquisition des résistances antibiotiques.

Références bibliographiques

- Ackerley, D. F., Y. Barak, S. V. Lynch, J. Curtin & A. Matin, (2006) Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **188**: 3371-3381.
- Aertsen, A. & C. W. Michiels, (2005) Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **58**: 1381-1391.
- Ali Azam, T., A. Iwata, A. Nishimura, S. Ueda & A. Ishihama, (1999) Growth phase-dependent variation in protein composition of the *Escherichia coli* nucleoid. *J Bacteriol* **181**: 6361-6370.
- Aminov, R. I., (2011) Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol* **2**: 158.
- Andremont, A. & M. Tibon-Cornillot, (2006) Le triomphe des bactéries (La fin des antibiotiques?). In: Paris: Max Milo Editions, pp.
- Arakawa, Y., M. Murakami, K. Suzuki, H. Ito, R. Wacharotayankun, S. Ohsuka, N. Kato & M. Ohta, (1995) A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene bla_{IMP}. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 1612-1615.
- Argos, P., A. Landy, K. Abremski, J. B. Egan, E. Haggard-Ljungquist, R. H. Hoess, M. L. Kahn, B. Kalionis, S. V. Narayana, L. S. Pierson, 3rd & *et al.*, (1986) The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J* **5**: 433-440.
- Baharoglu, Z., D. Bikard & D. Mazel, (2010) Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genet* **6**: e1001165.
- Baharoglu, Z., E. Krin & D. Mazel, (2012) Connecting environment and genome plasticity in the characterization of transformation-induced SOS regulation and carbon catabolite control of the *Vibrio cholerae* integron integrase. *J Bacteriol* **194**: 1659-1667.
- Baharoglu, Z. & D. Mazel, (2011) *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrob Agents Chemother* **55**: 2438-2441.
- Ball, C. A., R. Osuna, K. C. Ferguson & R. C. Johnson, (1992) Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 8043-8056.
- Barker, A., C. A. Clark & P. A. Manning, (1994) Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. *J Bacteriol* **176**: 5450-5458.
- Barlow, R. S. & K. S. Gobius, (2006) Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *J Antimicrob Chemother* **58**: 1133-1138.
- Barraud, O., M. Casellas, C. Dagot & M. C. Ploy, (2013) An antibiotic-resistant class 3 integron in an *Enterobacter cloacae* isolate from hospital effluent. *Clin Microbiol Infect* **19**: E306-308.
- Barraud, O. & M. C. Ploy, (2011) Actualités sur les intégrons de résistance aux antibiotiques : mise au point. *Journal des Antinfectieux*.
- Beaber, J. W., B. Hochhut & M. K. Waldor, (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**: 72-74.
- Beloin, C., A. Roux & J. M. Ghigo, (2008) *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 249-289.

- Beloin, C., J. Valle, P. Latour-Lambert, P. Faure, M. Kzreminski, D. Balestrino, J. A. Haagensen, S. Molin, G. Prensier, B. Arbeille & J. M. Ghigo, (2004) Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol* **51**: 659-674.
- Ben Nasr, A., A. Olsen, U. Sjobring, W. Muller-Esterl & L. Bjorck, (1996) Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**: 927-935.
- Bennett, P. M., (1999) Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. *J Antimicrob Chemother* **43**: 1-4.
- Bernier, S. P., D. Lebeaux, A. S. DeFrancesco, A. Valomon, G. Soubigou, J. Y. Coppee, J. M. Ghigo & C. Beloin, (2013) Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. *PLoS Genet* **9**: e1003144.
- Bialkowska-Hobrzanska, H. & J. H. Kunicki-Goldfinger, (1977) Mechanism of conjugation and recombination in bacteria XVI: single-stranded regions in recipient deoxyribonucleic acid during conjugation in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* **151**: 319-326.
- Biskri, L. & D. Mazel, (2003) Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 3326-3331.
- Bisognano, C., W. L. Kelley, T. Estoppey, P. Francois, J. Schrenzel, D. Li, D. P. Lew, D. C. Hooper, A. L. Cheung & P. Vaudaux, (2004) A RecA-LexA-dependent pathway mediates ciprofloxacin-induced fibronectin binding in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem* **279**: 9064-9071.
- Boucher, Y., C. L. Nesbo, M. J. Joss, A. Robinson, B. C. Mabbutt, M. R. Gillings, W. F. Doolittle & H. W. Stokes, (2006) Recovery and evolutionary analysis of complete integron gene cassette arrays from *Vibrio*. *BMC Evol Biol* **6**: 3.
- Bougdour, A. & S. Gottesman, (2007) ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12896-12901.
- Boutte, C. C. & S. Crosson, (2013) Bacterial lifestyle shapes stringent response activation. *Trends Microbiol* **21**: 174-180.
- Bouvier, M., G. Demarre & D. Mazel, (2005) Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. *EMBO J* **24**: 4356-4367.
- Branda, S. S., J. E. Gonzalez-Pastor, S. Ben-Yehuda, R. Losick & R. Kolter, (2001) Fruiting body formation by *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11621-11626.
- Branda, S. S., S. Vik, L. Friedman & R. Kolter, (2005) Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol* **13**: 20-26.
- Brombacher, E., A. Baratto, C. Dorel & P. Landini, (2006) Gene expression regulation by the Curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *J Bacteriol* **188**: 2027-2037.
- Brown, P. K., C. M. Dozois, C. A. Nickerson, A. Zuppardo, J. Terlonge & R. Curtiss, 3rd, (2001) MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol Microbiol* **41**: 349-363.
- Browning, D. F., J. A. Cole & S. J. Busby, (2008) Regulation by nucleoid-associated proteins at the *Escherichia coli nir* operon promoter. *J Bacteriol* **190**: 7258-7267.

- Burr, T., J. Mitchell, A. Kolb, S. Minchin & S. Busby, (2000) DNA sequence elements located immediately upstream of the -10 hexamer in *Escherichia coli* promoters: a systematic study. *Nucleic Acids Res* **28**: 1864-1870.
- Butala, M., M. Hodoscek, G. Anderluh, Z. Podlesek & D. Zgur-Bertok, (2007) Intradomain LexA rotation is a prerequisite for DNA binding specificity. *FEBS Lett* **581**: 4816-4820.
- Butala, M., D. Zgur-Bertok & S. J. Busby, (2009) The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell Mol Life Sci* **66**: 82-93.
- Bzymek, M. & S. T. Lovett, (2001) Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 8319-8325.
- Cagle, C. A., J. E. Shearer & A. O. Summers, (2011) Regulation of the integrase and cassette promoters of the class 1 integron by nucleoid-associated proteins. *Microbiology* **157**: 2841-2853.
- Cambray, G., N. Sanchez-Alberola, S. Campoy, E. Guerin, S. Da Re, B. Gonzalez-Zorn, M. C. Ploy, J. Barbe, D. Mazel & I. Erill, (2011) Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob DNA* **2**: 6.
- Cashel, M., D. Gentry, V. Hernandez & D. Vinella, (1996) The stringent response, in *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. ASM Press.
- Ceri, H., M. E. Olson, C. Stremick, R. R. Read, D. Morck & A. Buret, (1999) The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* **37**: 1771-1776.
- Cheo, D. L., K. W. Bayles & R. E. Yasbin, (1991) Cloning and characterization of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **173**: 1696-1703.
- Chirwa, N. T. & M. B. Herrington, (2003) CsgD, a regulator of curli and cellulose synthesis, also regulates serine hydroxymethyltransferase synthesis in *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* **149**: 525-535.
- Cirz, R. T., J. K. Chin, D. R. Andes, V. de Crecy-Lagard, W. A. Craig & F. E. Romesberg, (2005) Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLoS Biol* **3**: e176.
- Clutterbuck, A. L., E. J. Woods, D. C. Knottenbelt, P. D. Clegg, C. A. Cochrane & S. L. Percival, (2007) Biofilms and their relevance to veterinary medicine. *Vet Microbiol* **121**: 1-17.
- Coetser, S. E. & T. E. Cloete, (2005) Biofouling and biocorrosion in industrial water systems. *Crit Rev Microbiol* **31**: 213-232.
- Cohen, Y., (2002) Bioremediation of oil by marine microbial mats. *Int Microbiol* **5**: 189-193.
- Collis, C. M. & R. M. Hall, (1992) Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* **174**: 1574-1585.
- Collis, C. M. & R. M. Hall, (1995) Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* **39**: 155-162.
- Collis, C. M., M. J. Kim, S. R. Partridge, H. W. Stokes & R. M. Hall, (2002a) Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *J Bacteriol* **184**: 3017-3026.

- Collis, C. M., M. J. Kim, H. W. Stokes & R. M. Hall, (1998) Binding of the purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol Microbiol* **29**: 477-490.
- Collis, C. M., M. J. Kim, H. W. Stokes & R. M. Hall, (2002b) Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate attI site in recombination with a 59-bp site. *Mol Microbiol* **46**: 1415-1427.
- Collis, C. M., G. D. Recchia, M. J. Kim, H. W. Stokes & R. M. Hall, (2001) Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase IntI1. *J Bacteriol* **183**: 2535-2542.
- Cookson, A. L., W. A. Cooley & M. J. Woodward, (2002) The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in adherence to abiotic surfaces. *Int J Med Microbiol* **292**: 195-205.
- Correia, M., F. Boavida, F. Grosso, M. J. Salgado, L. M. Lito, J. M. Cristino, S. Mendo & A. Duarte, (2003) Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2838-2843.
- Costa de Oliveira, R., J. Laval & S. Boiteux, (1987) Induction of SOS and adaptive responses by alkylating agents in *Escherichia coli* mutants deficient in 3-methyladenine-DNA glycosylase activities. *Mutat Res* **183**: 11-20.
- Costerton, J. W., (1999) Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* **11**: 217-221; discussion 237-219.
- Costerton, J. W., G. G. Geesey & K. J. Cheng, (1978) How bacteria stick. *Sci Am* **238**: 86-95.
- Costerton, J. W., P. S. Stewart & E. P. Greenberg, (1999) Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**: 1318-1322.
- Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown & P. C. Hanawalt, (2001) Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* **158**: 41-64.
- Cox, M. M., (2003) The bacterial RecA protein as a motor protein. *Annu Rev Microbiol* **57**: 551-577.
- Cox, M. M., (2007) Regulation of bacterial RecA protein function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **42**: 41-63.
- da Fonseca, E. L., F. dos Santos Freitas & A. C. Vicente, (2011) Pc promoter from class 2 integrons and the cassette transcription pattern it evokes. *J Antimicrob Chemother* **66**: 797-801.
- Da Re, S., F. Garnier, E. Guerin, S. Campoy, F. Denis & M. C. Ploy, (2009) The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Rep* **10**: 929-933.
- Da Re, S. & J. M. Ghigo, (2006) A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 3073-3087.
- Da Re, S. & M. C. Ploy, (2012) [Resistance acquisition via the bacterial SOS response: the inductive role of antibiotics]. *Med Sci (Paris)* **28**: 179-184.
- Daikos, G. L., C. Kosmidis, P. T. Tassios, G. Petrikos, A. Vasilakopoulou, M. Psychogiou, I. Stefanou, A. Avlami & N. Katsilambros, (2007) Enterobacteriaceae bloodstream infections: presence of integrons, risk factors, and outcome. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 2366-2372.

- Dalebroux, Z. D. & M. S. Swanson, (2012) ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nat Rev Microbiol* **10**: 203-212.
- Danese, P. N., L. A. Pratt, S. L. Dove & R. Kolter, (2000) The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **37**: 424-432.
- Davies, D., (2003) Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* **2**: 114-122.
- Demarre, G., C. Frumerie, D. N. Gopaul & D. Mazel, (2007) Identification of key structural determinants of the IntI1 integron integrase that influence *attC* x *attII* recombination efficiency. *Nucleic Acids Res* **35**: 6475-6489.
- Diderichsen, B., (1980) *flu*, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **141**: 858-867.
- Dorr, T., M. Vulic & K. Lewis, (2010) Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in *Escherichia coli*. *PLoS Biol* **8**: e1000317.
- Drablos, F., E. Feyzi, P. A. Aas, C. B. Vaagbo, B. Kavli, M. S. Bratlie, J. Pena-Diaz, M. Otterlei, G. Slupphaug & H. E. Krokan, (2004) Alkylation damage in DNA and RNA-repair mechanisms and medical significance. *DNA Repair (Amst)* **3**: 1389-1407.
- Duong, H. A., N. H. Pham, H. T. Nguyen, T. T. Hoang, H. V. Pham, V. C. Pham, M. Berg, W. Giger & A. C. Alder, (2008) Occurrence, fate and antibiotic resistance of fluoroquinolone antibacterials in hospital wastewaters in Hanoi, Vietnam. *Chemosphere* **72**: 968-973.
- Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson & D. A. Relman, (2005) Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **308**: 1635-1638.
- Erill, I., S. Campoy & J. Barbe, (2007) Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol Rev* **31**: 637-656.
- Fernandez De Henestrosa, A. R., T. Ogi, S. Aoyagi, D. Chafin, J. J. Hayes, H. Ohmori & R. Woodgate, (2000) Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **35**: 1560-1572.
- Ferreira da Silva, M., I. Vaz-Moreira, M. Gonzalez-Pajuelo, O. C. Nunes & C. M. Manaia, (2007) Antimicrobial resistance patterns in Enterobacteriaceae isolated from an urban wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol* **60**: 166-176.
- Friedberg, E. C., A. Aguilera, M. Gellert, P. C. Hanawalt, J. B. Hays, A. R. Lehmann, T. Lindahl, N. Lowndes, A. Sarasin & R. D. Wood, (2006) DNA repair: from molecular mechanism to human disease. *DNA Repair (Amst)* **5**: 986-996.
- Friedman, N., S. Vardi, M. Ronen, U. Alon & J. Stavans, (2005) Precise temporal modulation in the response of the SOS DNA repair network in individual bacteria. *PLoS Biol* **3**: e238.
- Fux, C. A., J. W. Costerton, P. S. Stewart & P. Stoodley, (2005) Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**: 34-40.
- Genevaux, P., S. Muller & P. Bauda, (1996) A rapid screening procedure to identify mini-Tn10 insertion mutants of *Escherichia coli* K-12 with altered adhesion properties. *FEMS Microbiol Lett* **142**: 27-30.
- Ghigo, J. M., (2001) Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**: 442-445.

- Gibson, D. L., A. P. White, S. D. Snyder, S. Martin, C. Heiss, P. Azadi, M. Surette & W. W. Kay, (2006) *Salmonella* produces an O-antigen capsule regulated by AgfD and important for environmental persistence. *J Bacteriol* **188**: 7722-7730.
- Giese, K. C., C. B. Michalowski & J. W. Little, (2008) RecA-dependent cleavage of LexA dimers. *J Mol Biol* **377**: 148-161.
- Gillings, M., Y. Boucher, M. Labbate, A. Holmes, S. Krishnan, M. Holley & H. W. Stokes, (2008) The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. *J Bacteriol* **190**: 5095-5100.
- Gloag, E. S., L. Turnbull, A. Huang, P. Vallotton, H. Wang, L. M. Nolan, L. Mililli, C. Hunt, J. Lu, S. R. Osvath, L. G. Monahan, R. Cavaliere, I. G. Charles, M. P. Wand, M. L. Gee, R. Prabhakar & C. B. Whitchurch, (2013) Self-organization of bacterial biofilms is facilitated by extracellular DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 11541-11546.
- Gomez, M. J., M. Petrovic, A. R. Fernandez-Alba & D. Barcelo, (2006) Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters. *J Chromatogr A* **1114**: 224-233.
- Gopaul, D. N. & G. D. Duyne, (1999) Structure and mechanism in site-specific recombination. *Curr Opin Struct Biol* **9**: 14-20.
- Gorke, B. & J. Stulke, (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* **6**: 613-624.
- Gotz, F., (2002) *Staphylococcus* and biofilms. *Mol Microbiol* **43**: 1367-1378.
- Grainge, I. & M. Jayaram, (1999) The integrase family of recombinase: organization and function of the active site. *Mol Microbiol* **33**: 449-456.
- Gruber, T. M. & C. A. Gross, (2003) Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* **57**: 441-466.
- Gualdi, L., L. Tagliabue, S. Bertagnoli, T. Ierano, C. De Castro & P. Landini, (2008) Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. *Microbiology* **154**: 2017-2024.
- Guérin, E., G. Cambray, N. Sanchez-Alberola, S. Campoy, I. Erill, S. Da Re, B. Gonzalez-Zorn, J. Barbe, M. C. Ploy & D. Mazel, (2009) The SOS response controls integron recombination. *Science* **324**: 1034.
- Guérin, E., T. Jové, A. Tabesse, D. Mazel & M. C. Ploy, (2011) High-level gene cassette transcription prevents integrase expression in class 1 integrons. *J Bacteriol* **193**: 5675-5682.
- Hall, R. M. & C. M. Collis, (1995) Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* **15**: 593-600.
- Hanau-Bercot, B., I. Podglajen, I. Casin & E. Collatz, (2002) An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. *Mol Microbiol* **44**: 119-130.
- Hansson, K., L. Sundstrom, A. Pelletier & P. H. Roy, (2002) IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol* **184**: 1712-1721.
- Harris, S. L., D. A. Elliott, M. C. Blake, L. M. Must, M. Messenger & P. E. Orndorff, (1990) Isolation and characterization of mutants with lesions affecting pellicle formation and erythrocyte agglutination by type 1 piliated *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**: 6411-6418.

- 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 & C. M. Fraser, (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**: 477-483.
- Heir, E., B. A. Lindstedt, T. M. Leegaard, E. Gjernes & G. Kapperud, (2004) Prevalence and characterization of integrons in blood culture Enterobacteriaceae and gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **3**: 12.
- Henderson, I. R., M. Meehan & P. Owen, (1997) Antigen 43, a phase-variable bipartite outer membrane protein, determines colony morphology and autoaggregation in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* **149**: 115-120.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia & J. P. Nataro, (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**: 370-378.
- Hengge-Aronis, R., (1999) Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol* **2**: 148-152.
- Hengge, R., (2009) Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 263-273.
- Hochhut, B., Y. Lotfi, D. Mazel, S. M. Faruque, R. Woodgate & M. K. Waldor, (2001) Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob Agents Chemother* **45**: 2991-3000.
- Hocquet, D., C. Llanes, M. Thouverez, H. D. Kulasekara, X. Bertrand, P. Plesiat, D. Mazel & S. I. Miller, (2012) Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. *PLoS Pathog* **8**: e1002778.
- Hong, J., J. M. Ahn, B. C. Kim & M. B. Gu, (2009) Construction of a functional network for common DNA damage responses in *Escherichia coli*. *Genomics* **93**: 514-524.
- Huang, C. T., K. D. Xu, G. A. McFeters & P. S. Stewart, (1998) Spatial patterns of alkaline phosphatase expression within bacterial colonies and biofilms in response to phosphate starvation. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1526-1531.
- Ihssen, J. & T. Egli, (2004) Specific growth rate and not cell density controls the general stress response in *Escherichia coli*. *Microbiology* **150**: 1637-1648.
- Imlay, J. A. & S. Linn, (1987) Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J Bacteriol* **169**: 2967-2976.
- Irie, Y. & M. R. Parsek, (2008) Quorum sensing and microbial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**: 67-84.
- Jacoby, G. A., (2005) Mechanisms of resistance to quinolones. *Clin Infect Dis* **41 Suppl 2**: S120-126.
- Jacquier, H., C. Zaoui, M. J. Sanson-le Pors, D. Mazel & B. Bercot, (2009) Translation regulation of integrons gene cassette expression by the *attC* sites. *Mol Microbiol* **72**: 1475-1486.

- Jishage, M., A. Iwata, S. Ueda & A. Ishihama, (1996) Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of four species of sigma subunit under various growth conditions. *J Bacteriol* **178**: 5447-5451.
- Jishage, M., K. Kvint, V. Shingler & T. Nystrom, (2002) Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev* **16**: 1260-1270.
- Johansson, C., M. Kamali-Moghaddam & L. Sundstrom, (2004) Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. *Nucleic Acids Res* **32**: 4033-4043.
- Johnston, J. L., J. Sloan, J. A. Fyfe, J. K. Davies & J. I. Rood, (1997) The *recA* gene from *Clostridium perfringens* is induced by methyl methanesulphonate and contains an upstream Cheo box. *Microbiology* **143** (Pt 3): 885-890.
- Jove, T., S. Da Re, F. Denis, D. Mazel & M. C. Ploy, (2010) Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. *PLoS Genet* **6**: e1000793.
- Kalan, L. & G. D. Wright, (2011) Antibiotic adjuvants: multicomponent anti-infective strategies. *Expert Rev Mol Med* **13**: e5.
- Kalia, D., G. Merey, S. Nakayama, Y. Zheng, J. Zhou, Y. Luo, M. Guo, B. T. Roembke & H. O. Sintim, (2013) Nucleotide, c-di-GMP, c-di-AMP, cGMP, cAMP, (p)ppGpp signaling in bacteria and implications in pathogenesis. *Chem Soc Rev* **42**: 305-341.
- Kanjee, U., I. Gutsche, E. Alexopoulos, B. Zhao, M. El Bakkouri, G. Thibault, K. Liu, S. Ramachandran, J. Snider, E. F. Pai & W. A. Houry, (2011) Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase. *EMBO J* **30**: 931-944.
- Khil, P. P. & R. D. Camerini-Otero, (2002) Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**: 89-105.
- Khoury, A. E., K. Lam, B. Ellis & J. W. Costerton, (1992) Prevention and control of bacterial infections associated with medical devices. *ASAIO J* **38**: M174-178.
- Klausen, M., A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aaes-Jorgensen, S. Molin & T. Tolker-Nielsen, (2003) Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Mol Microbiol* **48**: 1511-1524.
- Kohanski, M. A., M. A. DePristo & J. J. Collins, (2010) Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol Cell* **37**: 311-320.
- Korea, C. G., R. Badouraly, M. C. Prevost, J. M. Ghigo & C. Beloin, (2010) *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environ Microbiol* **12**: 1957-1977.
- Kovacic, L., N. Paulic, A. Leonardi, V. Hodnik, G. Anderluh, Z. Podlesek, D. Zgur-Bertok, I. Krizaj & M. Butala, (2013) Structural insight into LexA-RecA* interaction. *Nucleic Acids Res.*
- Kuroda, A., H. Murphy, M. Cashel & A. Kornberg, (1997) Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **272**: 21240-21243.
- Kuroda, A., K. Nomura, R. Ohtomo, J. Kato, T. Ikeda, N. Takiguchi, H. Ohtake & A. Kornberg, (2001) Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science* **293**: 705-708.
- Labbate, M., R. J. Case & H. W. Stokes, (2009) The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol Biol* **532**: 103-125.

- Landini, P., (2009) Cross-talk mechanisms in biofilm formation and responses to environmental and physiological stress in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **160**: 259-266.
- Latasa, C., A. Roux, A. Toledo-Arana, J. M. Ghigo, C. Gamazo, J. R. Penades & I. Lasa, (2005) BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*. *Mol Microbiol* **58**: 1322-1339.
- Lauder, S. D. & S. C. Kowalczykowski, (1993) Negative co-dominant inhibition of recA protein function. Biochemical properties of the RecA1, RecA13 and RecA56 proteins and the effect of RecA56 protein on the activities of the wild-type RecA protein function in vitro. *J Mol Biol* **234**: 72-86.
- Lemos, J. A., T. A. Brown, Jr. & R. A. Burne, (2004) Effects of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **72**: 1431-1440.
- Leverstein-van Hall, M. A., M. B. HE, T. D. AR, A. Paauw, A. C. Fluit & 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* **187**: 251-259.
- Levesque, C., S. Brassard, J. Lapointe & P. H. Roy, (1994) Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene* **142**: 49-54.
- Lewis, K., (2010) Persister cells. *Annu Rev Microbiol* **64**: 357-372.
- Lewis, L. K., G. R. Harlow, L. A. Gregg-Jolly & D. W. Mount, (1994) Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **241**: 507-523.
- Ley, R. E., D. A. Peterson & J. I. Gordon, (2006) Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* **124**: 837-848.
- Lichtenstein, C. & S. Brenner, (1982) Unique insertion site of Tn7 in the *E. coli* chromosome. *Nature* **297**: 601-603.
- Lindberg, R., P. A. Jarnheimer, B. Olsen, M. Johansson & M. Tysklind, (2004) Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards. *Chemosphere* **57**: 1479-1488.
- Loot, C., M. Ducos-Galand, J. A. Escudero, M. Bouvier & D. Mazel, (2012) Replicative resolution of integron cassette insertion. *Nucleic Acids Res* **40**: 8361-8370.
- Luo, Y., R. A. Pfuetzner, S. Mosimann, M. Paetzel, E. A. Frey, M. Cherney, B. Kim, J. W. Little & N. C. Strynadka, (2001) Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. *Cell* **106**: 585-594.
- MacDonald, D., G. Demarre, M. Bouvier, D. Mazel & D. N. Gopaul, (2006) Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination. *Nature* **440**: 1157-1162.
- Maeda, S., M. Ito, T. Ando, Y. Ishimoto, Y. Fujisawa, H. Takahashi, A. Matsuda, A. Sawamura & S. Kato, (2006) Horizontal transfer of nonconjugative plasmids in a colony biofilm of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **255**: 115-120.
- Magnusson, L. U., A. Farewell & T. Nystrom, (2005) ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **13**: 236-242.
- Marquez, C., M. Labbate, A. J. Ingold, P. Roy Chowdhury, M. S. Ramirez, D. Centron, G. Borthagaray & H. W. Stokes, (2008) Recovery of a functional class 2 integron from an

- Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. *Antimicrob Agents Chemother* **52**: 4153-4154.
- Martinez-Freijo, P., A. C. Fluit, F. J. Schmitz, V. S. Grek, J. Verhoef & M. E. Jones, (1998) Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds. *J Antimicrob Chemother* **42**: 689-696.
- Martinez, L. R. & A. Casadevall, (2007) *Cryptococcus neoformans* biofilm formation depends on surface support and carbon source and reduces fungal cell susceptibility to heat, cold, and UV light. *Appl Environ Microbiol* **73**: 4592-4601.
- Martino, P. D., R. Fursy, L. Bret, B. Sundararaju & R. S. Phillips, (2003) Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Can J Microbiol* **49**: 443-449.
- Mazel, D., (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* **4**: 608-620.
- Mazel, D., B. Dychinco, V. A. Webb & J. Davies, (1998) A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* **280**: 605-608.
- Mendez-Ortiz, M. M., M. Hyodo, Y. Hayakawa & J. Membrillo-Hernandez, (2006) Genome-wide transcriptional profile of *Escherichia coli* in response to high levels of the second messenger 3',5'-cyclic diguanylic acid. *J Biol Chem* **281**: 8090-8099.
- Merrikh, H., A. E. Ferrazzoli & S. T. Lovett, (2009) Growth phase and (p)ppGpp control of IraD, a regulator of RpoS stability, in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **191**: 7436-7446.
- Mertens, K., L. Lantsheer & J. E. Samuel, (2005) A minimal set of DNA repair genes is sufficient for survival of *Coxiella burnetii* under oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci* **1063**: 73-75.
- Messier, N. & P. H. Roy, (2001) Integron integrases possess a unique additional domain necessary for activity. *J Bacteriol* **183**: 6699-6706.
- Mikoc, A., D. Vujaklija & V. Gamulin, (1997) The *recA* gene from *Streptomyces rimosus* R6: sequence and expression in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **148**: 397-403.
- Miller, C., H. Ingmer, L. E. Thomsen, K. Skarstad & 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* **185**: 6025-6031.
- Miller, C., L. E. Thomsen, C. Gaggero, R. Mosseri, H. Ingmer & S. N. Cohen, (2004) SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. *Science* **305**: 1629-1631.
- Milon, P., E. Tischenko, J. Tomsic, E. Caserta, G. Folkers, A. La Teana, M. V. Rodnina, C. L. Pon, R. Boelens & C. O. Gualerzi, (2006) The nucleotide-binding site of bacterial translation initiation factor 2 (IF2) as a metabolic sensor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 13962-13967.
- Mohana-Borges, R., A. B. Pacheco, F. J. Sousa, D. Foguel, D. F. Almeida & J. L. Silva, (2000) LexA repressor forms stable dimers in solution. The role of specific dna in tightening protein-protein interactions. *J Biol Chem* **275**: 4708-4712.
- Molin, S. & T. Tolker-Nielsen, (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 255-261.

- Monds, R. D. & G. A. O'Toole, (2009) The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends Microbiol* **17**: 73-87.
- Moura, A., I. Henriques, K. Smalla & A. Correia, (2010) Wastewater bacterial communities bring together broad-host range plasmids, integrons and a wide diversity of uncharacterized gene cassettes. *Res Microbiol* **161**: 58-66.
- Moura, A., M. Soares, C. Pereira, N. Leitao, I. Henriques & A. Correia, (2009) INTEGRALL: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics* **25**: 1096-1098.
- Movahedzadeh, F., M. J. Colston & E. O. Davis, (1997) Characterization of Mycobacterium tuberculosis LexA: recognition of a Cheo (*Bacillus*-type SOS) box. *Microbiology* **143** (Pt 3): 929-936.
- Nandi, S., J. J. Maurer, C. Hofacre & A. O. Summers, (2004) Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 7118-7122.
- Ninnemann, O., C. Koch & R. Kahmann, (1992) The *E.coli fis* promoter is subject to stringent control and autoregulation. *EMBO J* **11**: 1075-1083.
- O'Reilly, E. K. & K. N. Kreuzer, (2004) Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **186**: 7149-7160.
- O'Toole, G. A. & R. Kolter, (1998) Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**: 295-304.
- Olsen, A., A. Jonsson & S. Normark, (1989) Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**: 652-655.
- Onnis-Hayden, A., H. Weng, M. He, S. Hansen, V. Ilyin, K. Lewis & A. Z. Guc, (2009) Prokaryotic real-time gene expression profiling for toxicity assessment. *Environ Sci Technol* **43**: 4574-4581.
- Orndorff, P. E., A. Devapali, S. Palestrant, A. Wyse, M. L. Everett, R. R. Bollinger & W. Parker, (2004) Immunoglobulin-mediated agglutination of and biofilm formation by *Escherichia coli* K-12 require the type 1 pilus fiber. *Infect Immun* **72**: 1929-1938.
- Owen, P., M. Meehan, H. de Loughry-Doherty & I. Henderson, (1996) Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**: 63-76.
- Partridge, S. R., G. Tsafnat, E. Coiera & J. R. Iredell, (2009) Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 757-784.
- Passerat, J., F. Tamtam, B. Lebot, J. Eurin, M. Chevreuil & P. Servais, (2010) Antimicrobials and faecal bacteria resistant to antimicrobials in the rivers of the Seine River watershed: impacts of hospital effluents. *European Journal of Water Quality* **41**: 1-13.
- Paul, B. J., M. M. Barker, W. Ross, D. A. Schneider, C. Webb, J. W. Foster & R. L. Gourse, (2004) DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* **118**: 311-322.
- Petrova, M., Z. Gorlenko & S. Mindlin, (2011) Tn5045, a novel integron-containing antibiotic and chromate resistance transposon isolated from a permafrost bacterium. *Res Microbiol* **162**: 337-345.
- Poirel, L., A. Carattoli, S. Bernabeu, T. Bruderer, R. Frei & P. Nordmann, (2010) A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* **65**: 1594-1598.

- Potrykus, K. & M. Cashel, (2008) (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* **62**: 35-51.
- Prakash, L., Sherman, F., Miller, M. W., Lawrence, C. W. and Taber, H. W. (eds), (1974) Molecular and Environmental Aspects of Mutagenesis. *C. C. Thomas Publ., Springfield, IL*: 128-142.
- Pratt, L. A. & R. Kolter, (1998) Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**: 285-293.
- Prudhomme, M., L. Attaiech, G. Sanchez, B. Martin & J. P. Claverys, (2006) Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* **313**: 89-92.
- Quillardet, P., M. A. Rouffaud & P. Bouige, (2003) DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **154**: 559-572.
- Radman, M., (1975) SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci* **5A**: 355-367.
- Rao, A. N., M. Barlow, L. A. Clark, J. R. Boring, 3rd, F. C. Tenover & J. E. McGowan, Jr., (2006) Class 1 integrons in resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., US hospitals. *Emerg Infect Dis* **12**: 1011-1014.
- Reisner, A., J. A. Haagensen, M. A. Schembri, E. L. Zechner & S. Molin, (2003) Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* **48**: 933-946.
- Ren, D., L. A. Bedzyk, S. M. Thomas, R. W. Ye & T. K. Wood, (2004) Gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**: 515-524.
- Renesto, P., H. Ogata, S. Audic, J. M. Claverie & D. Raoult, (2005) Some lessons from *Rickettsia* genomics. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 99-117.
- Rodriguez-Martinez, J. M., M. E. Cano, C. Velasco, L. Martinez-Martinez & A. Pascual, (2011) Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. *J Infect Chemother* **17**: 149-182.
- Rojo, F., (2010) Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev* **34**: 658-684.
- Romling, U., M. Rohde, A. Olsen, S. Normark & J. Reinkoster, (2000) AgfD, the checkpoint of multicellular and aggregative behaviour in *Salmonella typhimurium* regulates at least two independent pathways. *Mol Microbiol* **36**: 10-23.
- Ronen, M., R. Rosenberg, B. I. Shraiman & U. Alon, (2002) Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 10555-10560.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout & D. Mazel, (2002) Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Mol Microbiol* **43**: 1657-1669.
- Rowe-Magnus, D. A., A. M. Guerout, P. Ploncard, B. Dychinco, J. Davies & D. Mazel, (2001) The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 652-657.
- Sauer, F. G., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. J. Martinez & S. J. Hultgren, (2000) Bacterial pili: molecular mechanisms of pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **3**: 65-72.
- Schembri, M. A., K. Kjaergaard & P. Klemm, (2003) Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **48**: 253-267.
- Schlacher, K., K. Leslie, C. Wyman, R. Woodgate, M. M. Cox & M. F. Goodman, (2005) DNA polymerase V and RecA protein, a minimal mutasome. *Mol Cell* **17**: 561-572.

- Schreiber, G., E. Z. Ron & G. Glaser, (1995) ppGpp-mediated regulation of DNA replication and cell division in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **30**: 27-32.
- Shaw, K. J., N. Miller, X. Liu, D. Lerner, J. Wan, A. Bittner & B. J. Morrow, (2003) Comparison of the changes in global gene expression of *Escherichia coli* induced by four bactericidal agents. *J Mol Microbiol Biotechnol* **5**: 105-122.
- Shibata, N., Y. Doi, K. Yamane, T. Yagi, H. Kurokawa, K. Shibayama, H. Kato, K. Kai & Y. Arakawa, (2003) PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol* **41**: 5407-5413.
- Simonsen, L., (1990) Dynamics of plasmid transfer on surfaces. *J Gen Microbiol* **136**: 1001-1007.
- Smith, M. H., M. M. Cavenagh & J. W. Little, (1991) Mutant LexA proteins with an increased rate of in vivo cleavage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 7356-7360.
- Smyth, C. J., M. B. Marron, J. M. Twohig & S. G. Smith, (1996) Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure and biogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **16**: 127-139.
- Solano, C., B. Garcia, J. Valle, C. Berasain, J. M. Ghigo, C. Gamazo & I. Lasa, (2002) Genetic analysis of *Salmonella enteritidis* biofilm formation: critical role of cellulose. *Mol Microbiol* **43**: 793-808.
- Sousa, F. J., L. M. Lima, A. B. Pacheco, C. L. Oliveira, I. Torriani, D. F. Almeida, D. Foguel, J. L. Silva & 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* **359**: 1059-1074.
- Stalder, T., O. Barraud, M. Casellas, C. Dagot & M. C. Ploy, (2012) Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. *Front Microbiol* **3**: 119.
- Stalder, T., O. Barraud, T. Jove, M. Casellas, M. Gaschet, C. Dagot & M. C. Ploy, (2013) Quantitative and qualitative impact of hospital effluent on dissemination of the integron pool. *ISME J*.
- Stewart, P. S., J. Rayner, F. Roe & W. M. Rees, (2001) Biofilm penetration and disinfection efficacy of alkaline hypochlorite and chlorosulfamates. *J Appl Microbiol* **91**: 525-532.
- Stokes, H. W. & M. R. Gillings, (2011) Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev* **35**: 790-819.
- Stokes, H. W. & R. M. Hall, (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* **3**: 1669-1683.
- Stokes, H. W., D. B. O'Gorman, G. D. Recchia, M. Parsekhian & R. M. Hall, (1997) Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol* **26**: 731-745.
- Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies & J. W. Costerton, (2002) Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187-209.
- Story, R. M. & T. A. Steitz, (1992) Structure of the recA protein-ADP complex. *Nature* **355**: 374-376.
- Storz, G. & R. Hengge, (2011) Bacterial Stress Responses. ASM Press.

- Sutherland, I. W., (2001) The biofilm matrix : an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* **9**: 222-227.
- Taddei, F., I. Matic & M. Radman, (1995) cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 11736-11740.
- Thomas, K. V., C. Dye, M. Schlabach & K. H. Langford, (2007) Source to sink tracking of selected human pharmaceuticals from two Oslo city hospitals and a wastewater treatment works. *J Environ Monit* **9**: 1410-1418.
- Tolker-Nielsen, T. & C. Sternberg, (2011) Growing and analyzing biofilms in flow chambers. *Curr Protoc Microbiol* **Chapter 1**: Unit 1B 2.
- Tomlin, K. L., R. J. Malott, G. Ramage, D. G. Storey, P. A. Sokol & H. Ceri, (2005) Quorum-sensing mutations affect attachment and stability of *Burkholderia cenocepacia* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**: 5208-5218.
- Uhlich, G. A., P. H. Cooke & E. B. Solomon, (2006) Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Appl Environ Microbiol* **72**: 2564-2572.
- van Delden, C., R. Comte & A. M. Bally, (2001) Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **183**: 5376-5384.
- Vidal, O., R. Longin, C. Prigent-Combaret, C. Dorel, M. Hooreman & P. Lejeune, (1998) Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* allele that increases curli expression. *J Bacteriol* **180**: 2442-2449.
- Vielmetter, W., F. Bonhoeffer & A. Schutte, (1968) Genetic evidence for transfer of a single DNA strand during bacterial conjugation. *J Mol Biol* **37**: 81-86.
- Volkert, M. R., F. H. Gately & L. I. Hajec, (1989) Expression of DNA damage-inducible genes of *Escherichia coli* upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents. *Mutat Res* **217**: 109-115.
- Vollmer, A. C., S. Kwakye, M. Halpern & E. C. Everbach, (1998) Bacterial stress responses to 1-megahertz pulsed ultrasound in the presence of microbubbles. *Appl Environ Microbiol* **64**: 3927-3931.
- Wade, J. T., N. B. Reppas, G. M. Church & K. Struhl, (2005) Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. *Genes Dev* **19**: 2619-2630.
- Waldor, M. K., H. Tschape & J. J. Mekalanos, (1996) A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol* **178**: 4157-4165.
- Walker, K. A., C. L. Atkins & R. Osuna, (1999) Functional determinants of the *Escherichia coli* *fis* promoter: roles of -35, -10, and transcription initiation regions in the response to stringent control and growth phase-dependent regulation. *J Bacteriol* **181**: 1269-1280.
- Wang, J. D., G. M. Sanders & A. D. Grossman, (2007) Nutritional control of elongation of DNA replication by (p)ppGpp. *Cell* **128**: 865-875.
- Wang, X., M. Rochon, A. Lamprokostopoulou, H. Lunsdorf, M. Nimtz & U. Romling, (2006) Impact of biofilm matrix components on interaction of commensal *Escherichia coli* with the gastrointestinal cell line HT-29. *Cell Mol Life Sci* **63**: 2352-2363.

- Watnick, P. & R. Kolter, (2000) Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**: 2675-2679.
- Weber, H., C. Pesavento, A. Possling, G. Tischendorf & R. Hengge, (2006) Cyclic-di-GMP-mediated signalling within the sigma network of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **62**: 1014-1034.
- Weber, S. D., W. Ludwig, K. H. Schleifer & J. Fried, (2007) Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms. *Appl Environ Microbiol* **73**: 6233-6240.
- Whitchurch, C. B., T. Tolker-Nielsen, P. C. Ragas & J. S. Mattick, (2002) Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* **295**: 1487.
- White, A. P., D. L. Gibson, W. Kim, W. W. Kay & M. G. Surette, (2006) Thin aggregative fimbriae and cellulose enhance long-term survival and persistence of *Salmonella*. *J Bacteriol* **188**: 3219-3227.
- Wimpenny, J., W. Manz & U. Szewzyk, (2000) Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 661-671.
- 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* **57**: 1275-1279.
- Wojciechowski, M. F., K. R. Peterson & P. E. Love, (1991) Regulation of the SOS response in *Bacillus subtilis*: evidence for a LexA repressor homolog. *J Bacteriol* **173**: 6489-6498.
- Wolkow, C. A., R. T. DeBoy & N. L. Craig, (1996) Conjugating plasmids are preferred targets for Tn7. *Genes Dev* **10**: 2145-2157.
- Wosten, M. M., (1998) Eubacterial sigma-factors. *FEMS Microbiol Rev* **22**: 127-150.
- Wozniak, D. J., T. J. Wyckoff, M. Starkey, R. Keyser, P. Azadi, G. A. O'Toole & M. R. Parsek, (2003) Alginate is not a significant component of the extracellular polysaccharide matrix of PA14 and PAO1 *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7907-7912.
- Xu, H., J. Davies & V. Miao, (2007) Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. *J Bacteriol* **189**: 6276-6283.
- Zhao, G., N. Weatherspoon, W. Kong, R. Curtiss, 3rd & Y. Shi, (2008) A dual-signal regulatory circuit activates transcription of a set of divergent operons in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 20924-20929.
- Zobell, C. E., (1943) The Effect of Solid Surfaces upon Bacterial Activity. *J Bacteriol* **46**: 39-56.

Annexes

Posters et communication

I- Posters

- Strugeon E., Da Re S. & Ploy M.C. (2011) Regulation of class 1 integron integrase expression in biofilm. In: FEMS 2011: 4th Congress of european microbiologists. Geneva, Switzerland. Poster n°50.

- Strugeon E., Ploy M.C. & Da Re S. (2012) Regulation of class 1 integron integrase expression in biofilm. In: ICAAC 2012: 52nd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Francisco, United States of America. Poster n° C1- 666.

- Strugeon E., Ploy M.C. & Da Re S. (2012) Regulation of class 1 integron integrase expression in biofilm. In: ASM 2012: 6th American Society for Microbiology Conference on Biofilms. Miami, United States of America. Poster n° 255-B.

II- Communication orale

- Strugeon E. (2013) Expression de l'intégrase des intégrons de résistance de classe 1 en modèle biofilm. In: SFM 2013: 9ème Congrès National de la Société Française de Microbiologie. Lille, France.

