

UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES TECHNOLOGIE SANTE (547)

# THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE REIMS CHAMPAGNE-ARDENNE**

**Discipline** : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

**Spécialité** : **MICROBIOLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement par

**Anamaria BABOSAN**

Le 25 mai 2018

---

## Description d'un mécanisme, à l'origine de l'induction de la réponse SOS par les aminosides chez *Escherichia coli*, favorisant l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones

---

Thèse dirigée par **M. Thomas GUILLARD ET M. Christophe DE CHAMPS**

### JURY

M. Thomas GUILLARD,	Maître de Conférences HDR,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	<b>Directeur de thèse</b>
M. Christophe de CHAMPS,	Professeur,	Université de Reims Champagne-Ardenne,	<b>Directeur de thèse</b>
Mme Sandra DA RE,	Chargé de Recherche HDR,	Université de Limoges,	<b>Rapporteur</b>
M. Didier MAZEL,	Professeur,	Institut Pasteur Paris,	<b>Rapporteur</b>
Mme Emmanuelle CAMBAU,	Professeur,	Université Paris Diderot,	<b>Président</b>
Mme Catherine NEUWIRTH,	Professeur,	Université de Dijon,	<b>Examineur</b>

*A ma maman,*

## REMERCIEMENTS

Je remercie Mme. le Docteur Sandra DA RE, Chargée de recherche à l'Université de Limoges, d'avoir accepté de juger mon travail en qualité de rapporteur. Soyez assurée de mon profond respect.

Je remercie M. le Professeur Didier MAZEL, Professeur à l'Institut Pasteur Paris, pour avoir accepté de juger mon travail et d'en être rapporteur. Soyez assuré de ma profonde gratitude.

Mes remerciements vont également vers Mme. le Professeur Emmanuelle CAMBAU et Mme. le Professeur Catherine NEUWIRTH, pour avoir accepté de siéger parmi les membres du jury, en tant qu'examinatrices. Je suis honorée de votre présence.

Je remercie sincèrement M. le Professeur Christophe de CHAMPS, pour avoir codirigé cette thèse et de m'avoir accueillie au sein de votre équipe. Votre disponibilité permanente et la confiance témoignée dans mes choix pour ce travail, ont été un gage de réussite. Je souhaite que mon travail vous apporte satisfaction à la hauteur de votre soutien de tous les jours.

Je remercie sincèrement M. le Docteur Thomas GUILLARD pour avoir codirigé cette thèse et sans qui tout ce travail n'aurait pas pu être réalisé. Merci, Thomas, pour ton encadrement, tes conseils, ton soutien et pour la confiance que tu m'as accordée. Tu as su m'encourager avec l'enthousiasme qui te caractérise, dans ma passion pour la recherche. Nos échanges, parfois teintés d'humour, mais constructifs, m'ont beaucoup apporté au cours de ce travail, et particulièrement au niveau de l'écriture scientifique. Merci de m'avoir permis de participer à nombreuses conférences durant ma thèse.

Je tiens à remercier toute l'équipe du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène, du CHU de Reims, pour votre accueil et partager le quotidien pendant ma thèse. Un grand merci à Janick Madoux, pour toute son aide quotidienne et ses conseils. Un grand merci à Anne-Laure Lebreil, qui a été d'une grande aide pour mes expériences, pour nos fous rires, pour avoir écouté en boucle la même chanson et pour avoir écouté mes histoires quotidiennes.

Un grand merci également à Mélanie et David, qui m'ont aidée dans mon travail quotidien avec la joie et surtout une rapidité impressionnante. Je tiens à remercier également Virginie, de l'équipe de Virologie, d'avoir été proche pendant mes années de thèse. Je remercie Pascal, de l'équipe d'Hygiène, d'avoir été proche pendant mon travail.

Je remercie également tous les autres Biologistes avec qui j'ai eu l'occasion de travailler et de partager mon quotidien : Mme le Docteur Véronique Vernet-Garnier, Mme le Docteur Odile Bajolet, Anne, Julie, Lucas, Luc et Lucien. Je tiens à remercier Mme le Docteur Fanny Reffuveille pour son aide dans la réalisation des expériences des biofilms dynamiques et le traitement des images.

Je tiens à remercier nos collaborateurs outre-Atlantique : M. le Professeur Jerry Pier, M. le Professeur David Skurnik et M. le Docteur Francois Lebreton. Vous m'avez accueillie dans vos structures et m'avez appris le travail dans un autre environnement. J'espère vous rendre fiers de mon travail.

Je remercie l'équipe de la PRBI : Hélène et Lydie, qui m'ont aidée dans mon travail de quantification relative. Je remercie, Arnaud et Christine, pour l'aide dans la quantification des ROS et NO et pour l'acquisition et l'analyse des images.

Ce travail de thèse a été l'occasion de tester mes capacités pédagogiques, lors des travaux pratiques de biologie moléculaire. Je remercie M. le Professeur Pierre Jeannesson et Mme le Docteur Emilie Buache de leur confiance témoignée.

Mon quotidien durant cette thèse n'aurait pas été le même sans Jocelyne, Chantal, Mireille et Caroline, Jennifer et Céline. Je vous remercie de tout mon cœur.

Durant ma thèse j'ai rencontré de nombreux internes hospitaliers, qui sont devenus des amis. Je remercie Fred, Francis, Anaëlle, Thomas, Amy, Alexandre, Pierre, Anne-Elizabeth, Céline, Ben, Estelle pour tous nos bons moments ensemble et votre aide au quotidien.

Je remercie tous ceux que j'ai rencontré durant mes visites dans des pays différents où je me suis rendue pour les conférences et qui sont des amis chers aux quatre coins du monde : Aurore, Melissane, Evelynna, Elza, Sinan, Thomas, Alejandro, Nary, Fernando, Belinda, Fatima, Gia et Phuong.

Je remercie également toutes mes amies de Reims, que je garde près de mon cœur : Mélissa, Allison, Marie, Amina, Elise et Anaïs qui ont eu confiance en moi, quand moi je l'ai perdue. Je remercie Tina et Ioana, deux amies chères, coupables pour mes sorties en week-end. Je remercie mes amis très proches et fidèles : Julie, Géneviève, Anne, Mélanie, Jerzy, Maria et Monika. Je remercie Maxime, de m'avoir supporté, pour tes encouragements et ta patience.

Je tiens remercier mes proches. Merci à mes parents, mes sœurs, mon frère et leurs familles. Vous avez toujours cru en moi et j'espère vous avoir rendus fiers. Merci, à Catherine, une maman de cœur, dont je ne pouvais pas me passer durant toute cette thèse. Votre soutien inconditionnel et votre amour m'ont redonné confiance dans les moments de doutes et je vous remercie du fond du cœur.

Pour terminer, et aussi égoïste que cela puisse paraître, je tiens à me remercier. J'ai toujours trouvé la force et la motivation pour faire ce métier qui me passionne tant.

**RESUME****DESCRIPTION D'UN MECANISME, A L'ORIGINE DE L'INDUCTION DE LA REPOSE SOS PAR LES AMINOSIDES CHEZ *ESCHERICHIA COLI*, FAVORISANT L'EMERGENCE DE LA RESISTANCE AUX FLUOROQUINOLONES**

L'émergence des déterminants des résistances plasmidiques aux quinolones (PMQR), auxquels appartient le gène *qnrD*, participe de manière significative à la sélection des résistances de haut-niveau aux quinolones. Dans cette étude, nous rapportons pour la première fois que l'expression d'un PMQR, *qnrD*, peut être induite par les fluoroquinolones mais aussi par les aminosides qui appartiennent à une autre importante famille d'antibiotiques, et ce, en induisant la réponse SOS chez *Escherichia coli*. En effet, nous avons montré que les petits plasmides portant *qnrD* induisent la formation de monoxyde de nitrogène et l'inhibition de la voie de détoxification Hmp-dépendante. Ces processus génèrent des lésions à l'ADN qui s'ajoutent à celles occasionnées par les aminosides concourant à activer la réponse SOS chez *E. coli*. L'ensemble de nos résultats montre que l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones peut être occasionnée par l'exposition d'*E. coli* à une autre classe d'antibiotiques, ici les aminosides.

Mots-clés: Résistance aux antibiotiques- Fluoroquinolones- Plasmides- *qnrD*- SOS- Aminosides- NO.

**ABSTRACT****MECHANISM FOR AMINOGLYCOSIDES-MEDIATED SOS INDUCTION IN *ESCHERICHIA COLI* THAT CROSS-SELECTS FOR FLUOROQUINOLONES RESISTANCE**

The emerging plasmid-mediated quinolones resistance (PMQR) determinants significantly participate in the selection of high-level of resistance to the major antibiotics fluoroquinolones, leading to numerous clinical failures. In this study, we reported for the first time that PMQR expression could be triggered by the fluoroquinolones but also by another major class of antibiotics, the aminoglycosides. We were able to show that this unique cross selection of antibiotic resistance was the consequence of the PMQR determinant *qnrD* being SOS-regulated in a RecA-LexA dependent manner. We demonstrated that sub inhibitory concentration of aminoglycoside and *qnrD*-plasmid carriage in *E. coli*, induced nitric oxide formation associated with the repression of the Hmp-mediated detoxification pathway, resulting in the induction of the SOS response and thus up-regulation of the PMQR. Overall, our findings revealed an unexpected antibiotic resistance cross-selection with low aminoglycosides concentrations promoting emergence of fluoroquinolones resistance.

**Keywords:** Antibiotics resistance- Fluoroquinolones- Plasmid- *qnrD*- SOS- Aminoglycosides- NO.

## TABLE DES MATIERES

RESUME .....	1
ABSTRACT .....	2
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES .....	4
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	12
CHAPITRE 1 : LA RESISTANCE AUX QUINOLONES.....	12
CHAPITRE 2 : LES PETITS PLASMIDES <i>QNRD</i> .....	31
CHAPITRE 3 : LA REPOSE SOS .....	38
CHAPITRE 4 : STRESS OXYDATIF CHEZ <i>E. COLI</i> .....	48
CHAPITRE 5 : STRESS NITROSATIF CHEZ <i>E. COLI</i> .....	56
PARTIE EXPERIMENTALE .....	65
1.  MATERIEL ET METHODES.....	65
2.  RESULTATS ET DISCUSSIONS .....	80
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	108
BIBLIOGRAPHIE .....	110

## COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

### Communications orales

#### **Nouveau mécanisme de résistance croisée aux antibiotiques**

Babosan A., de Champs C. et Guillard T.

Journée des Jeunes Chercheurs de la Structure Fédérative de Recherche Champagne-Ardenne Picardie (SFR CAP-Santé), Reims, France, 31 Mars 2017

#### ***qnrD* regulation is SOS-mediated by sub-MIC tobramycin in *Escherichia coli***

Babosan A., Lebreton F., de Champs C., Pier G.B., Skurnik D. and Guillard T.

36<sup>ème</sup> Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, France, 12-13 Décembre 2016

#### ***qnrD* regulation is SOS-mediated and tobramycin increases *qnrD* expression under the control of SOS in *Escherichia coli***

Babosan A., Lebreton F., de Champs C., Pier G.B., Skurnik D. and Guillard T.

ASM Microbe 2016, Boston, Massachusetts, USA, 16-20 Juin 2016

\*ASM Student and Postdoctoral Travel Award 2016

### Communications affichées

#### ***qnrD* is SOS regulated by sub-MIC of tobramycin in *Escherichia coli***

Babosan A., Lebreton F., de Champs C., Pier G.B., Skurnik D. and Guillard T.

FEMS 2017, 7th Congress of European Microbiologists, Valence, Spain, 9-13 Juillet 2017

#### ***qnrD* regulation is SOS-mediated by sub-MIC tobramycin in *Escherichia coli***

Babosan A., Lebreton F., de Champs C., Pier G.B., Skurnik D. and Guillard T.

ESCMID 2017, 27th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Wien, Austria, 22-25 Avril 2017

#### ***qnrD* regulation is SOS-mediated and tobramycin increases *qnrD* expression under the control of SOS in *Escherichia coli***

Babosan A., Lebreton F., de Champs C., Pier G.B., Skurnik D. and Guillard T.

The 7th EMBO Meeting 2016, Mannheim, Germany, 10-13 Septembre 2016

#### ***qnrD* regulation is SOS-mediated and tobramycin increases *qnrD* expression under the control of SOS in *Escherichia coli***

Babosan A., Lebreton F., de Champs C., Pier G.B., Skurnik D. and Guillard T.

Journée des Jeunes Chercheurs de la Structure Fédérative de Recherche Champagne-Ardenne Picardie (SFR CAP-Santé), Amiens, France, 18 Mars 2016

## LISTE DES FIGURES

FIGURE 1. CHRONOLOGIE DE LA DECOUVERTE DES ANTIBIOTIQUES ET DE L'APPARITION DE LA RESISTANCE. .	12
FIGURE 2. EVOLUTION DU TAUX DES RESISTANCES AUX FLUOROQUINOLONES EN EUROPE EN 2015 (6).....	13
FIGURE 3. STRUCTURE CHIMIQUE DES QUINOLONES. ADAPTATION D'APRES ALDRED ET AL. 2014 (11).....	14
FIGURE 4. DOMAINES STRUCTURAUX DES TOPOISOMERASES BACTERIENNES DE TYPE II. (11).....	15
FIGURE 5. MECANISME D'ACTION DES QUINOLONES(32).....	16
FIGURE 6. INDUCTION DE LA REPONSE SOS PAR LES CASSURES D'ADN GENEREES SUITE A L'ACTION DES QUINOLONES (11). .....	17
FIGURE 7. MECANISMES DE RESISTANCE AUX QUINOLONES. ADAPTE D'APRES ALDRED ET AL, (11). .....	17
FIGURE 8. CONSERVATION DE LA MUTATION DANS SER83 CHEZ LES BACTERIES. ADAPTE D'APRES (11). .....	19
FIGURE 9. SCHEMA SIMPLIFIEE DE L'ENTREE/EFFLUX DES ANTIBIOTIQUES CHEZ LES BACTERIE A GRAM NEGATIVES (49) .....	20
FIGURE 10. POMPES D'EFFLUX CHEZ LES BACTERIES (53).....	21
FIGURE 11. MECANISMES PLASMIDIQUE DE RESISTANCE AUX QUINOLONES (67). .....	22
FIGURE 12. SEQUENCES PROTEIQUES DES PRP DES DIFFERENTES FAMILLES QNR (66).....	25
FIGURE 13. STRUCTURE CRISTALLOGRAPHIQUE DES DIMERES QNRB1 (99, 100) . .....	26
FIGURE 14. L'EFFET PROTECTEUR DE QNRB1 SUR L'ADN GYRASE EN PRESENCE DE CIPROFLOXACINE (65). ...	27
FIGURE 15. REPRESENTATION PAR CRISTALLOGRAPHIE DE LA SOUS-UNITE GYRA EN PRESENCE DE ADN ET MPPA (104) .....	28
FIGURE 16. SOS-BOX DES GENES SMAQNR, QNRD ET QNRB1 (110). .....	29
FIGURE 17. INACTIVATION ENZYMATIQUE DE LA CIPROFLOXACINE PAR AAC(6')-LB-CR (111). .....	29
FIGURE 18. STRUCTURE SECONDAIRE PREDITE DE QEP A (123).....	30
FIGURE 19. DESCRIPTION DE LA CASSETTE D'INSERTION MOBILE (MIC) PORTANT LE GENE QNRD (142).....	32
FIGURE 20. DESCRIPTION DE LA CASSETTE D'INSERTION MOBILE (MIC) CHEZ PVERM (142).....	32
FIGURE 21. STRUCTURE GENETIQUE DES PLASMIDES P2007057 ET PDIJ09-518A (GENEIOUS™).....	33
FIGURE 22. EMERGENCE ET DISSEMINATION DU GENE QNRD DE LA TRIBU PROTEEAEE VERS LES ENTEROBACTERIACEAE (142).....	34
FIGURE 23. CMI AUX QUINOLONES DES SOUCHES E. COLI ET E. COLI PORTANT LE PLASMIDE QNRD. ....	35
FIGURE 24. DISTRIBUTION DES PLASMIDES QNRD CHEZ LES ENTEROBACTERIES ET EN FONCTION DE LEUR TAILLE. .....	37
FIGURE 25. INDUCTION DE LA REPONSE SOS. ....	39
FIGURE 26. SCHEMA SIMPLIFIE DES VOIES DE REPARATION INDUITES PAR LA REPONSE SOS. ADAPTE D'APRES BAHAROGLU & MAZEL, FEMS MICROBIOL REV, 2014 (106). .....	41
FIGURE 27. SCHEMA SIMPLIFIE DES VOIES DE SYNTHESE DE L'ADNSB POUR INDUIRE LA REPONSE SOS. ....	43

FIGURE 28. INDUCTION DE LA REPONSE SOS PAR DES AGENTS EXOGENES. ADAPTE D'APRES DA RE & PLOY (173).....	44
FIGURE 29. LES PROTEINES MUT DE LA VOIE BER BLOQUENT L'EFFET MUTAGENE DE 8-OXO-G. ADAPTE D'APRES (188).....	45
FIGURE 30. SYNTHÈSE DES RADICAUX LIBRES APRES L'ACCEPTATION DES ELECTRONS PAR L'OXYGENE MOLECULAIRE (217).....	48
FIGURE 31. SOURCES EXO- ET ENDOGENES DE FORMATION DE ROS CHEZ LES BACTERIES (218).....	49
FIGURE 32. MOLECULES ENDOMMAGEES PAR LE STRESS OXYDATIF.....	51
FIGURE 33. L'AUTOREGULATION ET L'OXYDATION DE OXYR PAR H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (263).....	53
FIGURE 34. REGULATION ET FONCTION DU SYSTEME SOXRS (276).....	54
FIGURE 35. STABILITE DE RPOS, FACE AU SUB-CMI DE TOBRAMYCINE. ADAPTE D'APRES BAHAROGLU ET AL., 2013 (179). ....	55
FIGURE 36. SCHEMATISATION DES REACTIONS DE SYNTHÈSE COMMUNES DES ROS ET RNS (292).....	56
FIGURE 37. VOIES D'INDUCTION DES DOMMAGES A L'ADN PAR LE NO ET LES RNS (293). ....	57
FIGURE 38. VOIES DE REDUCTION DU MONOXYDE DE NITROGENE (310).....	59
FIGURE 39. REGULATION DU GENE HMP.....	60
FIGURE 40. SITE DE LIAISON A L'ADN DU REPRESSEUR NSRR ET ACTIVATION DE HMP (319).....	61
FIGURE 41. REGULATION DU GENE HMP PAR FNR CHEZ E. COLI (308).....	62
FIGURE 42. PRINCIPE DE L'INSERTION D'UN FRAGMENT DANS LE CHROMOSOME.....	71
FIGURE 43. PRINCIPE DE LA PCR UTILISE POUR LA SUBSTITUTION DES NUCLEOTIDES DANS LA SOS-BOX.....	72
FIGURE 44. ETUDE DE LA STABILITE DU PLASMIDE ET LA DYNAMIQUE DU PORTAGE. ....	74
FIGURE 45. PRINCIPE DE DETECTION DE LA PRODUCTION DE ROS, PAR FLUORESCENCE. ....	77
FIGURE 46. PRINCIPE DE DETECTION DE LA PRODUCTION CE NO, PAR FLUORESCENCE.....	77
FIGURE 47. CARTE DU PLASMIDE PDIJ09-518A .....	80
FIGURE 48. SEQUENCE SOS-BOX DES PLASMIDES PORTEURS DU GENE QNRD .....	81
FIGURE 49. CONTROLE DE LA REGULATION DU GENE QNRD PAR LA REPONSE SOS SOUS LA DEPENDANCE DE RECA ET LEXA, CHEZ E. COLI .....	82
FIGURE 50. L'EXPRESSION DU GENE QNRD EST AUGMENTEE APRES EXPOSITION A LA TOBRAMYCINE.....	83
FIGURE 51. INDUCTION DE LA REPONSE SOS PAR LES AMINOSIDES CHEZ E. COLI PORTANT LE PLASMIDE QNRD .....	84
FIGURE 52. LE PORTAGE DU PLASMIDE PERMET L'INDUCTION DE LA REPONSE SOS EN PRESENCE D'AMINOSIDES .....	85
FIGURE 53. LE PORTAGE DU PETIT PLASMIDE QNRD PERMET L'INDUCTION DE LA REPONSE SOS EN PRESENCE DES AMINOSIDES. ....	86

FIGURE 54. LE PLASMIDE-QNRD ET LA SUB-CMI DE TOBRAMYCINE NE FAVORISE PAS LE STRESS OXYDATIF....	87
FIGURE 55. LES AMINOSIDES INDUISENT LA REPONSE SOS CHEZ E. COLI/PDIJ09-518A DUE A L'ACCUMULATION DE 8-OXO-G.....	89
FIGURE 56. LE PETIT PLASMIDE QNRD FAVORISE LE STRESS NITROSATIF CHEZ E. COLI.....	90
FIGURE 57. LA REPONSE SOS CHEZ E. COLI/PDIJ09-518A EST INDUITE PAR LES AMINOSIDES DUE A L'INACTIVATION DE LA VOIE DE DETOXIFICATION DU NO DEPENDANTE DE HMP. ....	91
FIGURE 58. LA DELETION DU GENE HMP N'ACTIVE PAS LA REPONSE SOS CHEZ E. COLI .....	92
FIGURE 59. L'ORF3 FAVORISE LA PRODUCTION DE NO PERMETTANT L'INDUCTION DE LA SOS PAR LA TOBRAMYCINE.....	93
FIGURE 60. LA DELETION DE L'ORF4 NE BLOQUE PAS L'INDUCTION SOS CHEZ E. COLI EN PRESENCE DE TOBRAMYCINE.....	94
FIGURE 61. L'ORF4 INHIBE L'EXPRESSION DU GENE HMP PROVOQUANT UN DESEQUILIBRE DANS LA DETOXIFICATION DU NO .....	96
FIGURE 62. MODELE D'INDUCTION DE LA REPONSE SOS PAR LES AMINOSIDES CHEZ E. COLI PORTANT LE PLASMIDE QNRD. ....	97
FIGURE 63. LES SUB-CMI D'AMINOSIDES FAVORISENT LA RESISTANCE AUX QUINOLONONES CHEZ E. COLI/PDIJ09-518A .....	99
FIGURE 64. LE PORTAGE DE PDIJ09-518A EN PRESENCE DE TOBRAMYCINE INDUIT L'EXPRESSION DE L'INTEGRASE VIA SOS.....	100
FIGURE 65. LE PORTAGE DE PDIJ09-518A FAVORISE LA FORMATION DU BIOFILM CHEZ E. COLI.....	102
FIGURE 66. LE NO PRODUIT PAR LE PDIJ09-518A FAVORISE LA SURVIE EN BIOFILM CHEZ E. COLI.....	103
FIGURE 67. LA STRUCTURE DU BIOFILM CHEZ E. COLI/PDIJ09-518A .....	104
FIGURE 68. L'IMPACT DU PORTAGE DE PLASMIDE QNRD SUR LA VIABILITE D'E. COLI.....	105
FIGURE 69. AMPLIFICATION GENIQUE PAR PCR POUR LA VERIFICATION DE LA MOBILISATION DES PLASMIDES QNRD .....	106
FIGURE 70. LES PLASMIDES QNRD SONT MOBILISABLES A FAIBLE TAUX DE TRANSFERT.....	107

**LISTE DES TABLEAUX**

TABLEAU 1. CARACTERISTIQUES DES SOUCHES D'ENTEROBACTERIES QNRD POSITIVES.....	36
TABLEAU 2. LES SEQUENCES SOS-BOX IDENTIFIEES CHEZ DIFFERENTES ESPECES BACTERIENNES ET DANS LES GENES PORTES PAR LES ELEMENTS GENETIQUE MOBILES (MGE).....	40
TABLEAU 3. SOUCHES BACTERIENNES UTILISEES POUR CETTE ETUDE.....	65
TABLEAU 4. PLASMIDES UTILISES POUR CETTE ETUDE.....	66
TABLEAU 5. PROTOCOLE D'UTILISATION DU MIX GOTAQ GREEN MASTER MIX.....	67
TABLEAU 6. PROGRAMME D'AMPLIFICATION PAR PCR, AVEC L'ADN POLYMERASE HAUTE-FIDELITE.....	68
TABLEAU 7. SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES DANS CETTE ETUDE.....	68
TABLEAU 8. CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES DES INDUCTEURS DE LA REPONSE SOS.....	81

**LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique.
<b>ADNdb</b>	ADN double brin.
<b>ADNg</b>	ADN génomique.
<b>ADNsb</b>	ADN simple brin.
<b>BER</b>	Base Excision Repair ; voie de réparation par excision de base.
<b>BLSE</b>	$\beta$ -lactamase à spectre étendu.
<b>CIP</b>	Ciprofloxacine.
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice.
<b>CPM</b>	Concentration prévenant les mutants.
<b>DAF-2 DA</b>	5,6 Diaminofluoresceine diacetate.
<b>DHR-123</b>	Dihydrorhodamine 123.
<b>FNR</b>	Fumarate and nitrate reductase ; fumarate et nitrate réductase.
<b>FQ</b>	Fluoroquinolones.
<b>GM</b>	Gentamicine.
<b>IM</b>	Inner membrane ; membrane interne.
<b>IR</b>	Inverted repeat ; séquence inversée répétée.
<b>IRL</b>	Inverted repeat left ; séquence inversée répétée de gauche.
<b>IRR</b>	Inverted repeat right ; séquence inversée répétée de droite.
<b>IS</b>	Insertion sequence ; séquence d'insertion.
<b>ISCR</b>	Insertion sequence common region.
<b>LB</b>	Luria-Bertani.
<b>MFS</b>	Major facilitator superfamily.
<b>MGE</b>	Mobile Genetic Element ; élément génétique mobile.
<b>mic</b>	mobile insertion cassette ; cassette d'insertion mobile.
<b>MMC</b>	Mitomycine C.
<b>MPF</b>	Membrane Protein Fusion ; protéine membranaire accessoire de fusion.
<b>NA</b>	Acide nalidixique.

<b>NCBI</b>	National Centre for Biotechnology.
<b>NER</b>	Nucleotide Excision Repair ; voie de réparation par excision de nucléotide.
<b>OM</b>	Outer Membrane ; membrane externe.
<b>OMP</b>	Outer Membrane Protein ; canal protéique dans la membrane externe.
<b>ORF</b>	Open Reading Frame ; cadre ouvert de lecture.
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction ; amplification en chaîne d'acides nucléiques.
<b>PMQR</b>	Plasmid-mediated quinolone resistance.
<b>PRP</b>	Pentapeptide repeat protein ; protéine à motifs pentapeptidiques répétés.
<b>QRDR</b>	Quinolone resistance determining region.
<b>RND</b>	Resistance, Nodulation and Cell Division ; résistance, nodulation et division cellulaire.
<b>RNS</b>	Reactive Nitrogen Species ; espèces réactives de nitrogène.
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species ; espèces réactives d'oxygène.
<b>SOD</b>	Superoxide dismutase ; superoxyde dismutase.
<b>TLS</b>	Translesion polymerase.
<b>TMP</b>	Triméthoprime.
<b>TOB</b>	Tobramycine.
<b>UFC</b>	Unité Formant Colonies.

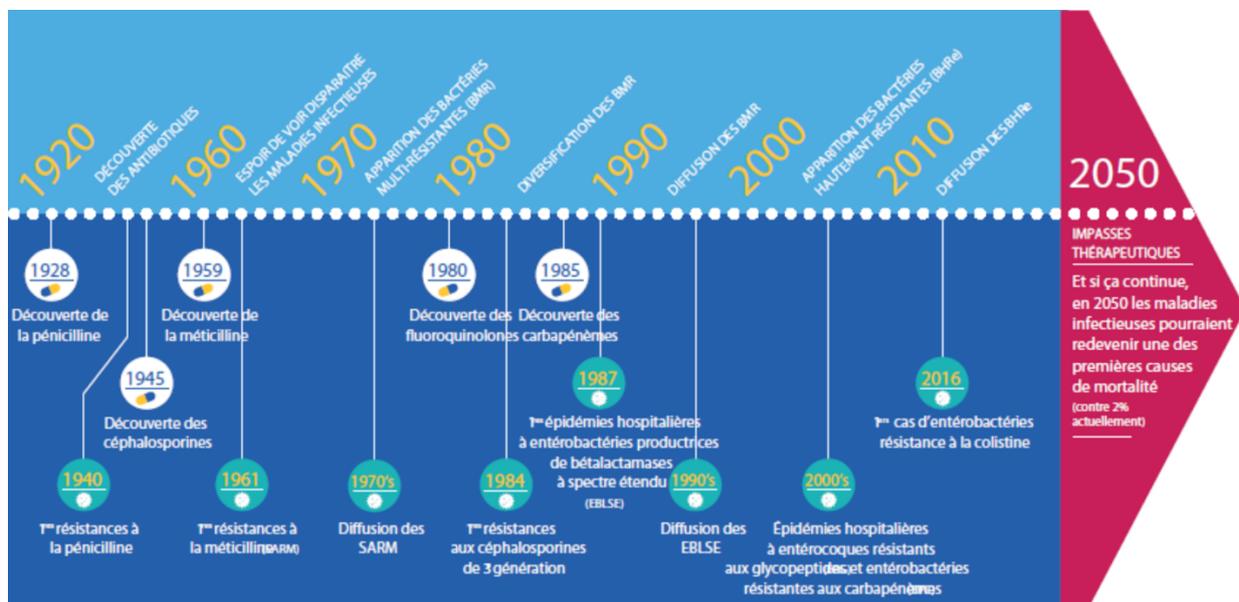
# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

# ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

## CHAPITRE 1 : La résistance aux quinolones

### 1.1. Généralités et épidémiologie

Depuis la découverte de la pénicilline en 1928 par Alexander Fleming, la médecine moderne a révolutionné les stratégies thérapeutiques face aux infections bactériennes, en enrichissant l'arsenal de diverses classes d'antibiotiques. La capacité des bactéries à ajuster sans cesse leur métabolisme pour répondre aux conditions environnementales auxquelles elles doivent faire face, engendre *in fine* des situations d'échappement thérapeutique, qui ne relèvent désormais plus de l'exceptionnel (Figure 1).



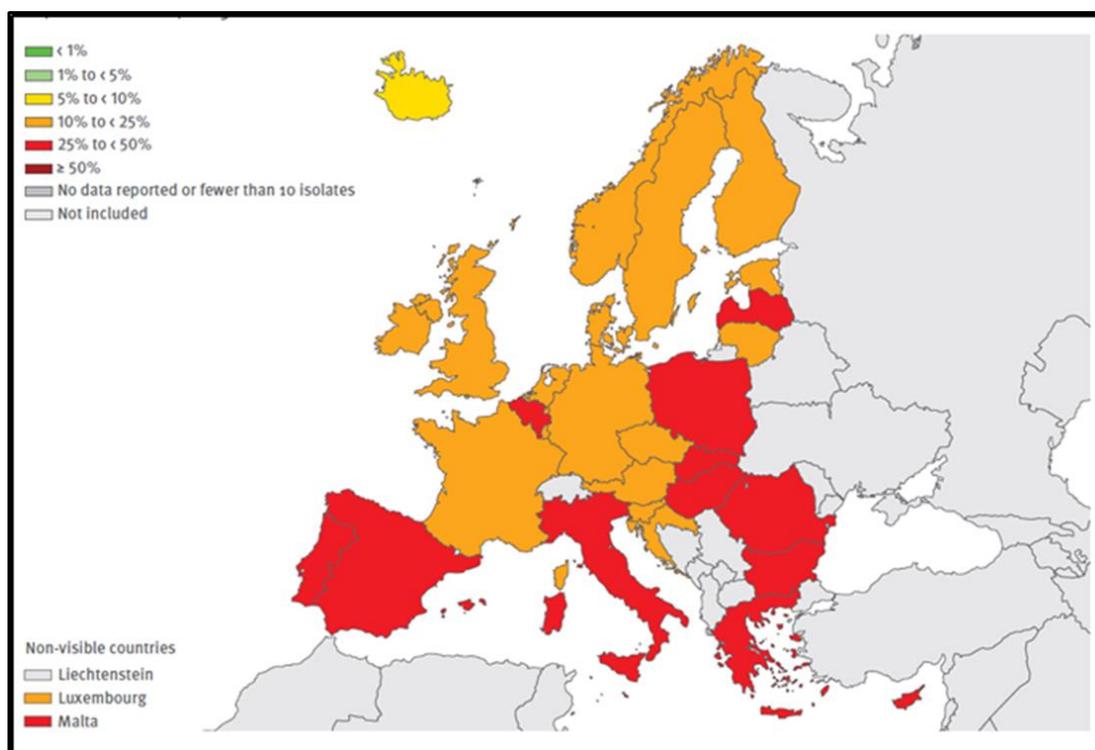
**Figure 1. Chronologie de la découverte des antibiotiques et de l'apparition de la résistance.**  
Une histoire de la découverte et de l'acquisition des résistances aux antibiotiques en santé humaine et en santé animale en France (2005-2015). Maugat S, Berger-Carbonne A et al., Santé publique France, 2016 (1).

Les quinolones qui appartiennent à la troisième classe d'antibiotique la plus prescrite en médecine humaine et animale n'échappent pas à cette observation (2)

Depuis que l'acide nalidixique a été introduit en médecine humaine, il y a plus de 40 ans (3, 4), la résistance aux quinolones est un enjeu majeur de santé publique face à une situation devenue critique. Si les premières quinolones synthétisées, étaient destinées à combattre les infections par des bactéries appartenant aux *Enterobacteriaceae*, par la suite les molécules les plus synthétisées présentaient un spectre d'action s'étendant aux bactéries à Gram positif (5).

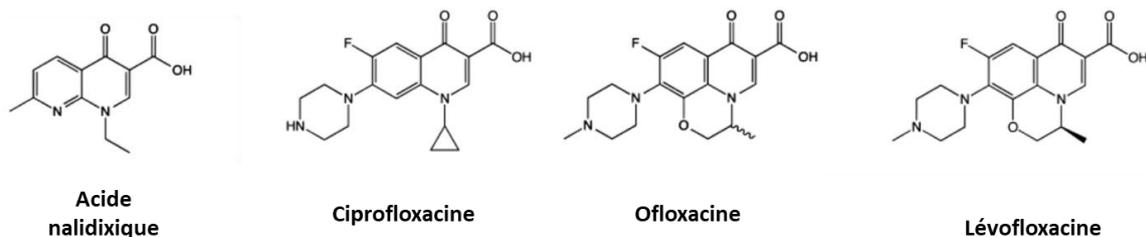
De plus, si les quinolones étaient prescrites initialement, pour les infections urinaires, actuellement ces molécules sont un des traitements de choix avec les céphalosporines ou les aminosides pour traiter les infections chez l'homme.

Le niveau de résistance aux quinolones, a fortement augmenté depuis plusieurs années. Si en 2002, le taux de résistance était de 9%, il était de 21% en Europe en 2016 (2, 6, 7). La même tendance à la hausse de la résistance aux quinolones a été observée aux Etats-Unis : entre 10 et 30%, en fonctions des régions (8–10). Sur la Figure 2, est présentée l'évolution de la résistance aux quinolones dans différents pays d'Europe en 2015.



**Figure 2. Evolution du taux des résistances aux fluoroquinolones en Europe en 2015 (11).**

Le terme de fluoroquinolones a été utilisé avec l'introduction d'un atome de fluor, en position 6 du cycle aromatique adjacent au cycle pyridine, permettant d'obtenir des molécules avec des effets pharmacocinétiques et pharmacodynamiques meilleurs que pour l'acide nalidixique (Figure 3).



**Figure 3. Structure chimique des quinolones. Adaptation d'après Aldred et al. 2014 (12).**

L'acide nalidixique appartient aux quinolones de première génération. La ciprofloxacine et l'ofloxacine, sont des antibiotiques de deuxième génération, caractérisés par la présence d'un atome de fluor ajouté (les fluoroquinolones). La lévofloxacine est une des fluoroquinolones synthétisées dès plus récentes.

La ciprofloxacine (Figure 3) a été la première molécule montrant une activité significative contre les infections bactériennes, en dehors du tractus urinaire (13–15). Après plus de 40 ans d'utilisation clinique, la ciprofloxacine reste l'antibiotique le plus prescrit pour traiter les infections à bactéries à Gram négatif (13, 15).

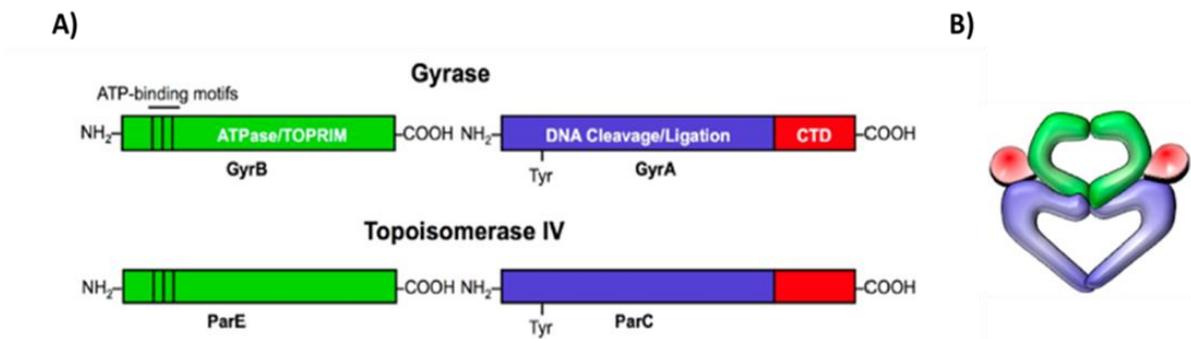
Après le succès thérapeutique de l'usage de la ciprofloxacine, une nouvelle génération de fluoroquinolones, avec un spectre d'activité plus spécifique, contre les bactéries à Gram positif, a été développée dans laquelle se trouve la lévofloxacine (Figure 3) (13, 16).

Les fluoroquinolones sont intensément utilisées dans de nombreuses infections bactériennes : tractus urinaire et pyélonéphrites, maladies sexuellement transmissibles, prostatites, peau et tissus, bronchites chroniques, pneumonies communautaires et nosocomiales et infections pelviennes (17, 18).

## 1.2. Les cibles des quinolones

Les cibles moléculaires des quinolones sont les topoisomérases bactériennes de type II, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV (19–24). Ces enzymes sont importantes pour de nombreux processus impliquant la molécule d'ADN et sa topologie.

Ces deux enzymes sont constituées de deux sous-unités fonctionnelles, organisées en hétérotétramère (22). L'ADN gyrase est constituée des deux sous-unités GyrA et deux sous-unités GyrB. La topoisomérase IV est constituée des deux sous-unités ParC et deux sous-unités ParE (Figure 4) (23–26).



**Figure 4. Domaines structuraux des topoisomérases bactériennes de type II. (12).**

A) La sous-unité GyrA ou ParC, contient dans le site actif un résidu de tyrosine, nécessaire à la liaison covalente à l'ADN (bleu et rouge). Le domaine C-terminal de la sous-unité GyrA (rouge) peut être variable et permet à l'ADN gyrase d'introduire des surenroulements négatifs. La sous-unité GyrB ou ParE, contient l'ATPase et le domaine de liaison des ions métalliques, nécessaires à l'activité de l'enzyme. B) Structure tridimensionnelle de la topoisomérase de type II.

Malgré leur similitudes mécanistiques et structurales, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, ont des fonctions physiologiques différentes.

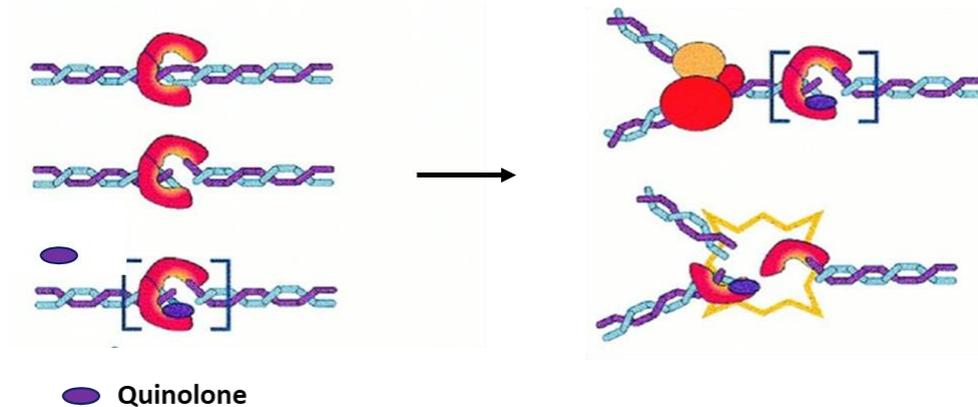
L'ADN gyrase est la seule à pouvoir introduire des surenroulements négatifs dans l'ADN (Figure 4, rouge) et ainsi limiter le stress topologique pouvant bloquer la fourche de réplication et/ou la machinerie transcriptionnelle (23–25). La topoisomérase IV enlève le stress topologique dû aux nœuds formés sur le chromosome à cause de la densité chromosomique (25, 27, 28).

Les deux enzymes modulent la topologie de l'ADN par le passage d'une double hélice dans une cassure d'ADN double brin (ADNdb) transitoire. Les processus de clivage et de religature constituent les fonctions principales de ces deux enzymes (22, 23, 25, 29).

Pour maintenir l'intégrité génomique durant ces processus, l'enzyme se lie de manière covalente, à l'extrémité 5' de l'ADN générée lors de la coupure, via le résidu tyrosine, présent dans le site actif (Figure 4, GyrA, domaine bleu) et forme un complexe enzyme-ADN clivé ou complexe de clivage (12, 25, 29).

### 1.3. Mécanisme d'action des quinolones

Les quinolones se lient de manière non covalente aux complexes de clivage enzyme-ADN (14, 20, 24, 30–32) (Figure 5).



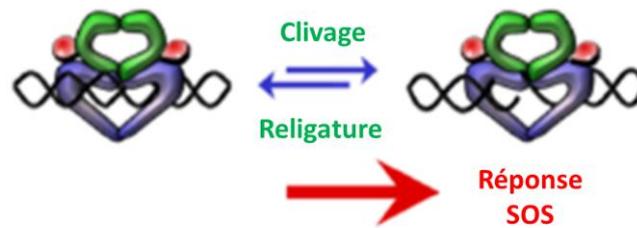
**Figure 5. Mécanisme d'action des quinolones (33).**

Les quinolones lient le complexe enzyme-ADN, en interagissant avec l'enzyme et en s'intercalant dans l'ADN. Une conséquence majeure de cette interaction est la constitution d'une barrière physique empêchant la religature des brins d'ADN.

La première conséquence de l'interaction entre les quinolones et le complexe de clivage, enzyme-ADN, est l'inhibition de la religature des cassures d'ADNdb (14, 19, 34). L'interaction entre les quinolones et le complexe de clivage, enzyme-ADN, stabilise le complexe ternaire: quinolone-enzyme-ADN (14, 19, 20, 34). Ces antibiotiques agissent donc aussi comme des inhibiteurs de ces enzymes, affectant des nombreux processus.

La seconde conséquence de cette interaction est le blocage du complexe stable quinolone-enzyme-ADN au site de la cassure. Ce phénomène provoque des collisions avec la fourche de réplication et/ou la machinerie transcriptionnelle, transformant ces cassures transitoires en cassures permanentes (19).

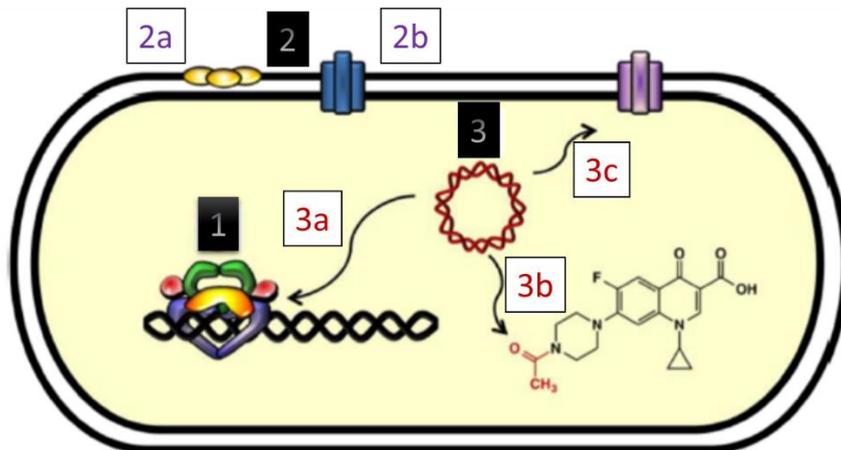
La genèse des cassures d'ADNdb, active la réponse SOS et autres voies de réparation de l'ADN (Figure 6). Une accumulation importante de ce type de lésions de l'ADN et une inefficacité de réparation rapide des lésions, peut causer la mort cellulaire (12, 29, 35). Ceci explique l'activité bactéricide des quinolones.



**Figure 6. Induction de la réponse SOS par les cassures d'ADN générées suite à l'action des quinolones (12).**  
 Les topoisomérases bactériennes de type II, sont des enzymes toxiques. Le maintien d'une balance entre les deux fonctions principales (clivage/religature) est très important. Si le taux de clivage est bas, la croissance est affectée, mais à contrario si le niveau du clivage est très haut, ceci peut générer des cassures ADNdb. Ces dernières induisent la réponse SOS et autres mécanismes de réparation de l'ADN.

#### 1.4. Mécanismes de résistance aux quinolones

Les mécanismes de résistance aux quinolones développés par les bactéries peuvent être classés selon leur support génétique : les résistances chromosomiques et les résistances plasmidiques. Indépendamment du support, les mécanismes engendrant une résistance aux quinolones sont soit dus (i) à des mutations dans les cibles des quinolones, (ii) à l'inactivation enzymatique de l'antibiotique ou (iii) à la diminution de la concentration d'antibiotique à l'intérieur de la bactérie par efflux ou imperméabilité (porines) (12, 29) (Figure 7). Ces mécanismes peuvent s'accumuler et engendrer ainsi une résistance de haut niveau aux quinolones.



**Figure 7. Mécanismes de résistance aux quinolones. Adapté d'après Aldred et al, (12).**

1) Résistance chromosomique par mutation dans la cible enzymatique diminuant l'affinité des quinolones et leur activité. 2) Résistances chromosomiques engendrant soit 2a) une baisse expression des porines qui mène à une faible pénétration de l'antibiotique, soit une 2b) une sur-expression des pompes d'efflux qui augmente l'extrusion de l'antibiotique à l'extérieur de la bactérie. 3) Résistance plasmidiques, parmi lesquelles, 3a) la protéine Qnr qui protège le complexe de clivage et 3b) l' AAC(6')-Ib-cr qui inactive l'antibiotique par acétylation et. 3c) les pompes d'efflux QepA et OqxAB qui favorisent la sortie de l'antibiotique.

### 1.4.1. Résistances chromosomiques aux quinolones

#### 1.4.1.1. Résistance par mutations des cibles

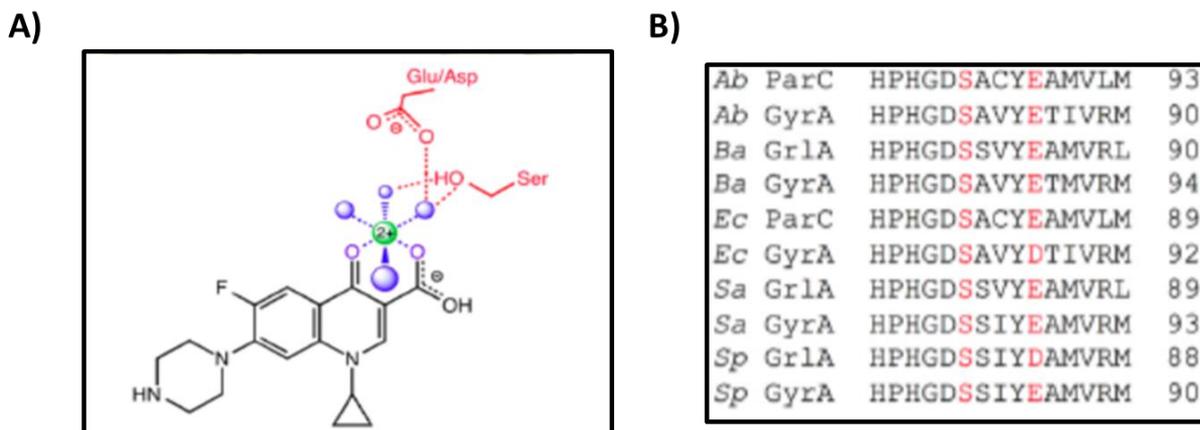
L'ADN gyrase a été la première cible des quinolones caractérisée, en 1977 (36, 37). Peu de temps après, il a été montré que chez les bactéries à Gram négatif, l'ADN gyrase était la cible primaire des quinolones tandis que la topoisomérase IV était la cible primaire chez les bactéries à Gram positif (38, 39).

Les mutations se situent dans les sous-unités fonctionnelles de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV au niveau des sites de liaison à l'ADN (12, 29). Ce domaine très conservé, parmi les bactéries, où s'accumulent les mutations a été nommé la région déterminante des résistances aux quinolones (Quinolones-Résistance-Détermining-Region ou QRDR) par Yoshida *et al.*, en 1991 (40).

En se basant sur la numérotation des acides aminés de l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, chez *E. coli*, les mutations sont localisées dans le domaine N-terminal de GyrA (Figure 4, bleu) entre les résidus 67 à 106 ou dans le domaine N-terminal de ParC entre les résidus 63 à 102.

Des mutations dans les enzymes GyrB et ParE ont été aussi identifiées, mais il a été montré que le retentissement clinique en terme de résistance pour ces mutations était moindre que celui dû aux mutations dans GyrA et ParC (40, 41).

Par ailleurs, il existe des positions où les mutations sont préférentiellement retrouvées. Ces régions sont appelées « hot spots » de mutation. Ainsi, les acides aminés fréquemment associés à la résistance aux quinolones sont la sérine en position 83 (Ser83, basé sur la numérotation chez *E. coli*) et un acide aminé en position 87 (variable d'une espèce à une autre) (Figure 8) (19–22, 39, 42–45).



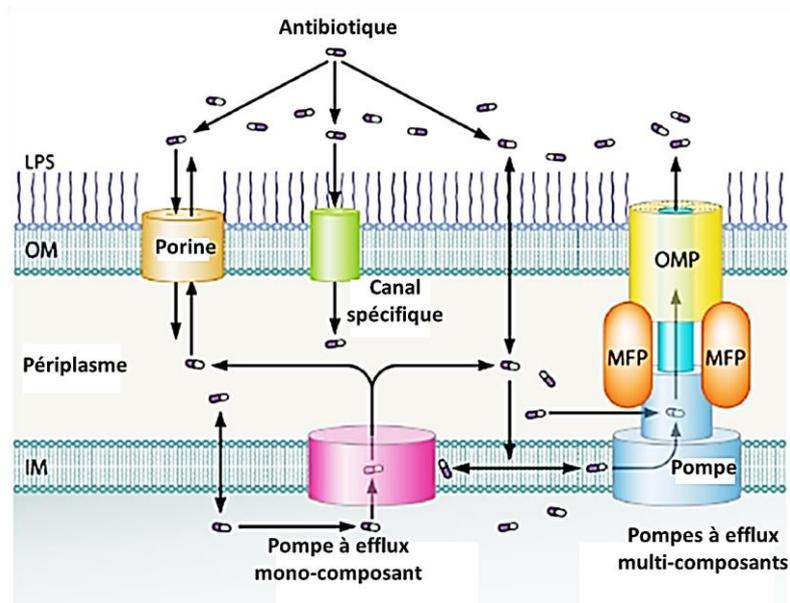
**Figure 8. Conservation de la mutation dans Ser83 chez les bactéries. Adapté d'après (12).**

A) Schéma simplifié de l'interaction entre la ciprofloxacine et l'ADN gyrase via le pont eau-ion métal. Par souci de clarté, seule l'interaction avec l'enzyme est représentée et pas celle avec l'ADN. B) Conservation des résidus Ser83 et le résidu en position 87, en fonction des numérotations des différentes souches bactériennes. Ab- *Acinetobacter baumannii* ; Ba- *Bacillus anthracis* ; Ec- *E. coli* ; Sa- *Staphylococcus aureus* ; Sp- *S. pneumoniae*.

Les mutations dans les enzymes cibles des quinolones, mènent à une baisse significative d'affinité de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV pour les quinolones. Les mutations, dans ces deux enzymes, bloquent la capacité des fluoroquinolones à synthétiser des complexes ternaires stables (FQ-enzyme-ADN) et empêchent l'inhibition de la religature des cassures transitoires (22, 34, 46–49).

#### 1.4.1.2. Efflux et imperméabilité

La membrane externe des bactéries à Gram négatif constitue une barrière naturelle contre les différents stress, comme les quinolones qui doivent la franchir pour atteindre leur cible. La Figure 9 schématise les différents mécanismes d'entrée/efflux des antibiotiques, retrouvés chez les bactéries à Gram négatif.



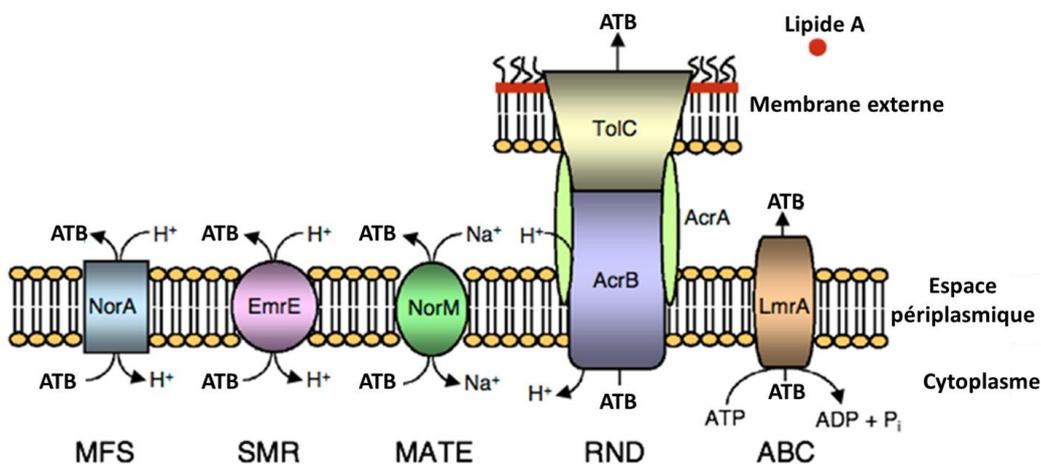
**Figure 9. Schéma simplifié de l'entrée/efflux des antibiotiques chez les bactéries à Gram négatives (50).**  
 L'entrée des antibiotiques via la membrane externe (OM) peut être possible par les porines (OmpF chez *E. coli*), par des canaux protéiques spécifiques (OprD chez *P. aeruginosa* pour les carbapénèmes) et le LPS-lipides. Après leur entrée dans l'espace périplasmique, les antibiotiques peuvent pénétrer la membrane interne (IM) par diffusion. Mais ces antibiotiques peuvent aussi être expulsés en dehors de la cellule, via les pompes à efflux (unique ou multiples composants comme AcrAB-TolC). L'homéostasie entre l'entrée et l'efflux des antibiotiques est un processus important pour la cellule. OMP- canal protéique dans la membrane externe ; MFP-protéine membranaire accessoire de fusion.

La réduction de la concentration intracellulaire des quinolones est le résultat des deux systèmes avec des mécanismes d'action opposés : une augmentation du système de transport actif en dehors de la bactérie, via les pompes à efflux, et une baisse du système de transport passif d'entrée, via les porines qui sont des canaux d'entrée des petites molécules et nutriments (51–53).

L'entrée des quinolones chez les bactéries à Gram négatif est principalement due à la baisse d'expression des porines. Les porines sont des protéines transmembranaires formant des pores dans la membrane externe, permettant l'entrée des petites molécules hydrophiles (comme la ciprofloxacine) et différents nutriments nécessaires à la bactérie hôte (Figure 9, porine).

Le contrôle de la perméabilité et de l'intégrité membranaire joue un rôle important dans cette défense naturelle des bactéries (12, 29). La réduction de l'expression des porines peut contribuer à l'acquisition des résistances aux antibiotiques.

Il existe un certain nombre de pompes d'efflux chez les bactéries (Figure 10).



**Figure 10. Pompes d'efflux chez les bactéries (54)**

Les différentes familles des pompes à efflux caractérisées chez les bactéries. ATB: Antibiotiques; MFS: Major Facilitator Superfamily; SMR: Small Multidrug Resistance; MATE: Multidrug And Toxic compound Extrusion family; RND: Resistance-Nodulation-cell Division superfamily; ABC : ATP Binding cassette superfamily.

Chez les entérobactéries, le principal mécanisme de résistance par efflux est le résultat de la surexpression des pompes d'efflux de type RND (Resistance Nodulation and Cell Division [résistance/nodulation/division cellulaire]), en particulier ArcAB-TolC. L'opéron *acrAB* est régulé par l'opéron *mar* (multiple antibiotic resistance) qui agit comme régulateur transcriptionnel des gènes *acrA* et *acrB* (55). Des mutations des constituants de l'opéron *mar* (*marR*, surtout) peuvent donc induire la surexpression de AcrAB-TolC et jouer ainsi un rôle dans l'acquisition des multi-résistances aux antibiotiques (56–58).

La principale porine chez *E. coli* est la protéine OmpF. Le mécanisme à la base de la baisse de l'expression de l'*ompF* est une modification de la régulation post-transcriptionnelle (59). L'opéron *mar* régule l'expression de *ompF* en réprimant, via MarA, l'expression de *micF* qui code un petit ARN antisens. Ce dernier agit en déstabilisant l'ARNm transcrit à partir de *ompF* (55). Toute mutation dans l'opéron *mar* induit une augmentation de synthèse de MicF et donc une diminution de l'expression des porines.

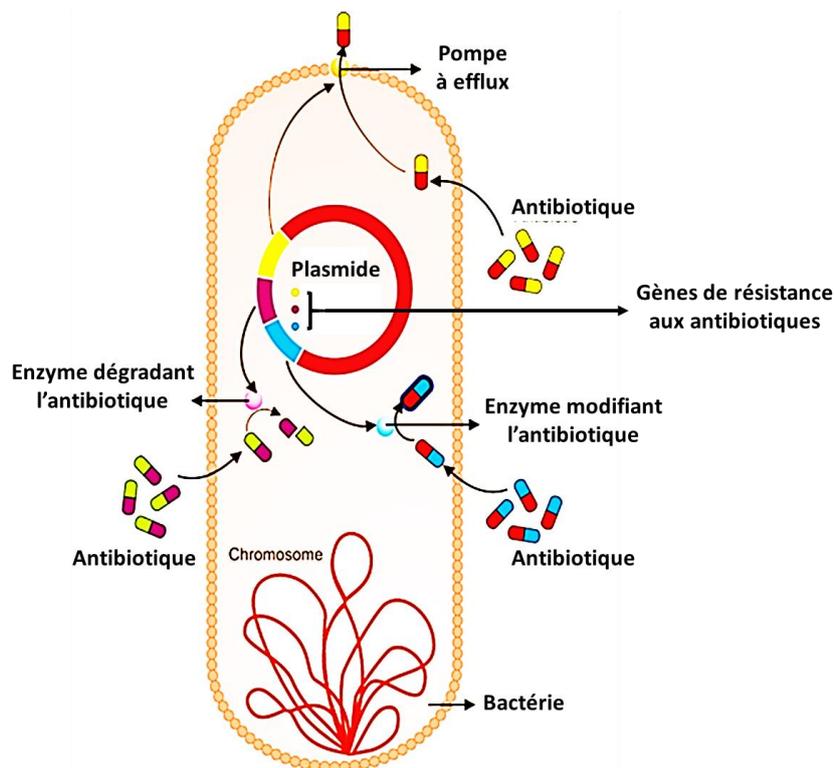
Une action simultanée de ces deux processus, une baisse de l'influx et de l'efflux des antibiotiques, conduit à la résistance aux quinolones (29, 50). En effet les phénotypes de résistance occasionnés par l'un ou l'autre de ces mécanismes sont de bas niveau (60). En revanche, ils favorisent l'acquisition des résistances à haut niveau, voire de multi-résistances (61, 62).

### 1.4.2. Résistances plasmidiques

Pendant longtemps, il était considéré impossible que la résistance aux quinolones puisse avoir un support plasmidique et faire l'objet d'un transfert horizontal, du fait du caractère synthétique de cette famille d'antibiotiques. Ceci était quasiment un dogme jusqu'à la description du gène *qnrA* (nommé par la suite *qnrAI*) porté par une souche clinique de *K. pneumoniae* isolée en Alabama. (63, 64).

Par la suite, d'autres déterminants moléculaires, de résistance aux quinolones, transmissibles ont été décrits. Tous ces gènes de résistance plasmidique sont regroupés sous l'appellation PMQR (Plasmid-Mediated Quinolones Resistance) (65–67). La Figure 11, schématise les trois PMQR.

Depuis 1998, beaucoup d'études se sont intéressées aux PMQR. Ainsi, une recherche sur PubMed effectuée le 25 mars 2018, en utilisant PMQR comme mot clé dans le moteur de recherche, retrouve 1508 publications.



**Figure 11. Mécanismes plasmidiques de résistance aux quinolones (68).**

Les trois mécanismes plasmidiques caractérisés sont décrits. En jaune, le gène codant les pompes à efflux, baisse la concentration de l'antibiotique dans la bactérie. En violet, le gène codant la protéine Qnr, protège la cible des quinolones. En bleu, l'aminoside acétyltransférase, AAC(6')Ib-cr, acétyle le nitrogène libre de l'antibiotique et baisse leur activité.

#### 1.4.2.1. Protection des enzymes cibles des quinolones par les protéines Qnr

Depuis la première description de *qnrA1* (63) de nombreux autres gènes *qnr* ont été décrits et classés en 6 familles *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD* et *qnrVC* (69–73), avec des nombreux allèles (8 *qnrA*, 94 *qnrB*, 9 *qnrS*, 1 *qnrC*, 3 *qnrD* et 7 *qnrVC*) répertoriés sur le site de la Lahey Clinic, au 25 Mars 2018 (<http://www.lahey.org/qnrStudies/>).

##### 1.4.2.1.1. Origine et supports génétiques des protéines Qnr

Chez les entérobactéries les gènes *qnr* sont quasiment tous portés par des plasmides de tailles variables et appartenant à différents groupes d'incompatibilité (12, 66). Des homologues chromosomiques ont été retrouvés chez les  $\gamma$ -protéobactéries, les firmicutes et chez les actinomycètes, ainsi que chez les espèces anaérobies comme *Clostridium difficile* (74–77). Les gènes *qnr* caractérisés chez les bactéries à Gram positif sont tous chromosomiques (75, 77).

Le réservoir naturel de tous les gènes *qnr* n'est pas encore connu, car les souches où le gène a pu être isolé sont soit cliniques, soit environnementales (101, 102). Une revue très explicite et comprenant tous les gènes *qnr* chromosomiques et plasmidique, a été publiée par Jacoby *et al.* en 2014 (66).

Il a été rapporté que le progéniteur des gènes *qnrA* serait *Shewanella algae* (78). Les gènes *qnrA* sont communément portés par des plasmides conjugatifs de 20-30Kb, qui contiennent d'autres gènes de résistance, en particulier des gènes de  $\beta$ -lactamase à spectre étendu (BLSE) ou des céphalosporinases plasmidiques (67, 79–81). Les gènes *qnrA* sont très souvent décrits comme appartenant à un environnement génétique de type intégron de classe 1 contenant des cassettes de gènes de résistance aux autres antibiotiques (82).

Les gènes *qnrB* sont les gènes les plus fréquemment rapportés dans les études. Le chromosome de *Citrobacter youngae* a été rapporté comme la source de *qnrB* (70, 83–85). Il est intéressant de noter que le gène *smqnr* qui a été identifié dans le chromosome de *Serratia marcescens*, partage 80% d'identité avec le gène *qnrB*, lui-même très proche phylogénétiquement du gène *qnrD* (86).

L'origine de *qnrC* demeure encore inconnue, car un seul allèle a été décrit jusqu'à présent. Ce gène est identique à 72% avec le *qnr* chromosomique retrouvé chez *V. cholerae* (71). Le gène *qnrC* est porté par un plasmide de 120Kb et il est entouré par une séquence d'insertion *ISPmi1* et une *OrfD* de fonction inconnue (71).

Les gènes *qnrS* ont été décrits comme apparentés à *Vibrio* sp et plus particulièrement *V. splendidus* (87). En effet, il existe des gènes *qnr* chromosomiques présents dans certaines espèces appartenant aux *Vibrionaceae*, partageant 40-67% d'identité avec les gènes plasmidiques (88). L'environnement génétique de *qnrS* est moins conservé et il est souvent associé avec des séquences d'insertion (IS) *ISEcl* et *IS26* (89, 90). Les gènes *qnrS* sont majoritairement portés par des petits plasmides non conjugatifs, mais mobilisables (90). Le gène est présent à proximité d'un transposon de type Tn3 (69, 83, 90, 91).

La dernière famille de gènes *qnr* est celle regroupant les *qnrVC*. Ils sont fréquemment décrits chez les *Vibrionaceae*. Les environnements génétiques sont des intégrons (73, 92–95), voir des superintégrons dans le cas de *qnrVC1*, où il est lié au site de recombinaison *attC* (96). Le gène *qnrVC3* a été décrit, chez *V. cholerae*, intégré dans des éléments conjugatifs intégratifs (SXT-ICE) chez (94, 97).

#### 1.4.2.1.2. Structure et nomenclature des Qnr

Un récent consensus définit le gène *qnr* comme un gène codant une protéine présentant un motif pentapeptidique répété, qui confère un bas-niveau de résistance aux fluoroquinolones.

Les protéines à motifs pentapeptidiques répétés (PRP) sont constituées d'une série de répétition en tandem de cinq acides aminés (98, 99). Aucune position n'est entièrement conservée au sein des répétitions pentapeptidiques (98).

Cependant, dans la séquence primaire, deux domaines de répétitions sont séparés par un acide aminé, le plus souvent la glycine (Figure 12) (67).

A. QnrA1

MDIIDKVFQQ
EDFSR QDLS D SRFRR CRFYQ
CDFSH CQLQD AS FED CSFIE
SGAV E G
CHFSY ADLRD AS FKA CRLSL
ANFSG ANCFG IEFRE CDLKG
ANFSR ARFYN QVSHK MYFCS
AYISG CNLAY TNL S G QCLEK
CELFE NNWSN ANLSG ASLMG
SDLS R GTFSR DCWQQ VNLRG
CDLTF ADLDG LDPRR VNLEG
VKI CAWQQ
EQLLEPLGVIVLPD

B. QnrB1

MALALVG
EKI D R NRFTG EK I EN STFFN
CDPSG ADLSG TEFIG CQFYD
RESQK G
CNFSR AMLKD AIFKS CDLSM
ADFRN S S ALG IEIRH CRAQG
ADFRG ASFMN MITTR TWPCS
AYITN TNLSY ANFSR VVLEK
CELWE NRW I G A QVLG AT FSG
SDLSG GEF S T FDWR A AN FTH
CDLTN SELGD LD R R G VDLOG
VKLD N
YQAS L L M ER LG I A V I G

C. QnrS1

METYN H TYRH
HN FSH R DLS D L TFTA CTFIR
S D FRR ANLRD T T F V N CKFIE
QGDIE G
CHFD V ADLRD AS FQQ CQLAM
ANFSN ANCYG I E F R A CDLKG
ANFSR T N F A H QVSNR MYFCS
AFI S G CNLSY ANMER VCLEK
CELFE NRWIG T N L A G ASLKE
SDLSR GV FSE DVWQQ FS
LQGAN LCHAE LDG
LDPRKVDTSGIKIA N Q O E L I E A L G I V V I P D

D. QnrC

MNYSHKTYDQ
IDFSG QDLS D H H FSH CKFFG
CNFNR VNLRD AKFMG CTFIE
SNDPE G
CNFIY ADLRD AS FMN CMLSM
ANFQG ANCFG LELRE CDLKG
ANFSQ ANFVN HVSNK MYFCS
AYITG CNLSY ANFDK QCLEK
CDLFE NKWVG ASLQG ASPKE
SDLSR GS FSD DFWEQ CRIQG
CDLTH SELNG LEPRK VDLTG
VKICS
WQQEQLLEQLGVIVIPDKVF

E. QnrD

MEKHFIN
EKFSR DQFTG NR VKN IAFSN
CDPSG VDLTD TEFVD CSFYD
RNSLE G
CDFNR AKLKN AS FKS CDLSM
SNFKN ISALG LEISE CLAQG
ADFRG ANFMN MITTR SWPCS
AYITK TNLSY ANFSR VILEK
CELWE NRWNG TVITG AVFRG
SDLSC GEFSS FDWSL ADFTG
CDLTG GALGE LDARR INLDG
VKLDG
EQALQLVESLGIVVHR

**Figure 12. Séquences protéiques des PRP des différentes familles Qnr (67)**

Les répétitions pentapeptidiques avec le motif répétitif [Ser, Thr, Ala ou Val]-[Asp ou Asn]-[Leu ou Phe]-[Ser, Thr ou Arg]-[Gly], sont représentées par groupe de cinq. Les nucléotides communs dans les répétitions pentapeptidiques sont en gras et les différentes positions sur les allèles sont encadrées.

La structure cristallographique de QnrB1 a permis de montrer que les protéines Qnr sont constituées de deux monomères en  $\beta$ -hélice quadrilatère droite, et dimérisées à leur extrémité C-terminale au niveau de la glycine (100, 101).

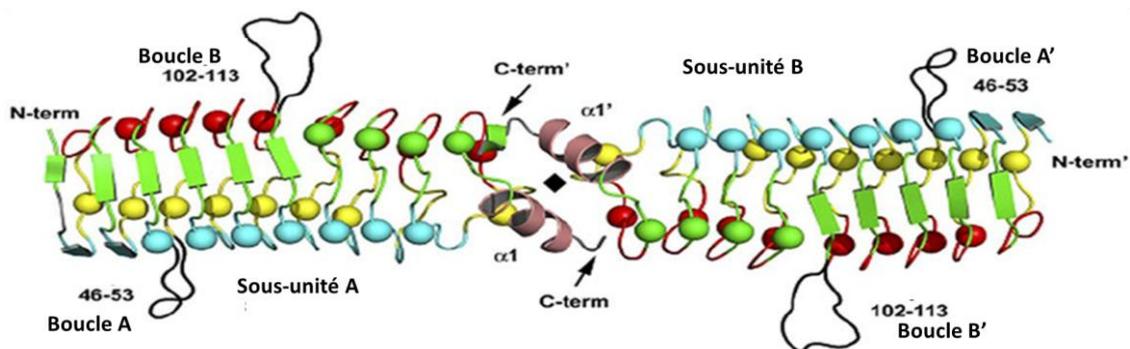


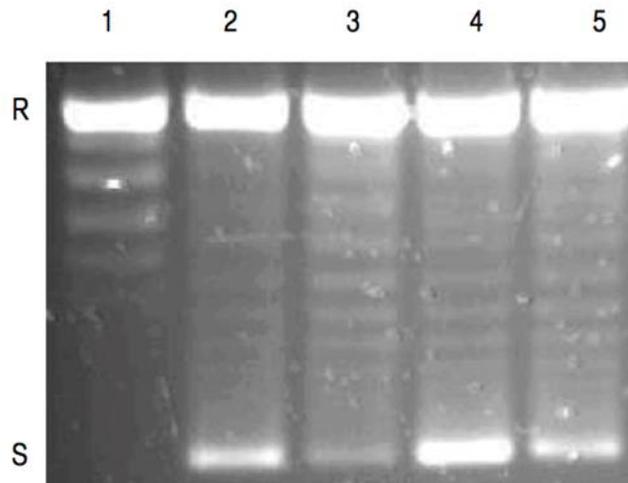
Figure 13. Structure cristallographique des dimères QnrB1 (100, 101).

Chaque monomère est constitué de 10 tours, chacun étant composé de quatre motifs pentapeptidiques, avec la partie N-terminale présentant un motif pentapeptidique atypique. Deux boucles A et B (Figure 13, décrites comme Boucle A' et B'), sont respectivement situées entre la face 2 et 3 du deuxième tour et entre la face 4 et 1 du quatrième et cinquième tour. D'un point de vue fonctionnel, la suppression de la boucle A, diminue l'effet du QnrB1 face aux quinolones, tandis que la suppression de la boucle B l'annule complètement (102).

Les protéines Qnr empêchent l'action des quinolones sur l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, mais le rôle des protéines Qnr dans la physiologie bactérienne est encore inconnu. L'hypothèse communément avancée est que ces protéines seraient des inhibiteurs du "poison naturel" des topoisomérases de type II.

#### 1.4.2.1.3. Mécanismes d'action des protéines Qnr

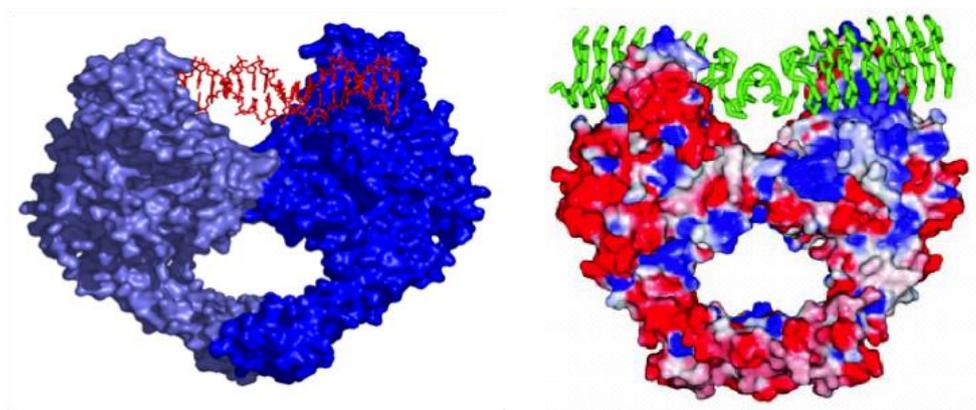
Les protéines Qnr agissent en protégeant les topoisomérases de type II de l'action des quinolones (66). L'ADN gyrase est inhibée par la ciprofloxacine (Figure 14, puit 3). En présence de QnrB1, cette inhibition est levée et l'ADN gyrase assure à nouveau son action de surenroulement de l'ADN (Figure 14, puits 4 et 5).



**Figure 14. L'effet protecteur de QnrB1 sur l'ADN gyrase en présence de ciprofloxacine (66).**  
 Puit 1 : ADN seul. Puit 2 : ADN + ADN gyrase. Puit 3 : ADN + ADN gyrase + CIP. Puit 4 : ADN + ADN gyrase + CIP + Qnr à haute concentration. Puit 5 : ADN + ADN gyrase + CIP + Qnr à basse concentration. Dans le puit 2 l'ADN gyrase permet le surenroulement de l'ADN. Dans le puit 3 la CIP inhibe l'ADN gyrase et diminue le surenroulement de l'ADN. Dans le puit 4 et 5, Qnr inhibe, de manière concentration dépendante, l'action de la CIP et permet le surenroulement de l'ADN par l'ADN gyrase. CIP : ciprofloxacine ; R : ADN sous forme relâchée ; S : ADN sous forme surenroulé.

Il a été proposé que les protéines Qnr se lient aux topoisomérases de type II de manière à déstabiliser le complexe ternaire quinolone-ADN-enzyme, provoquant la religature et l'activation de l'activité catalytique des enzymes cibles (100, 102).

La structure en  $\beta$ -hélice quadrilatère de Qnr du même type que celle des PRP retrouvées chez les mycobactéries, en particulier McbG (103) et MfpA (104). Leurs structures ressemblant à la double hélice d'ADN ont conduit à proposer un mécanisme par mimétisme de l'ADN au niveau du site actif de l'ADN gyrase des protéines Qnr (Figure 15).



**Figure 15. Représentation par cristallographie de la sous-unité GyrA en présence de ADN et MfpA (105).**  
Le mimétisme de l'ADN (à gauche en rouge) par la protéine MfpA, appartenant aux PRP (à droite en vert).

Néanmoins, des études ont montré que la protéine MfpA et QnrB4 ont des effets différents sur l'activité catalytique de l'ADN gyrase et sur le complexe ternaire quinolones-ADN-gyrase. La protéine MfpA peut inhiber l'activité de l'ADN gyrase, tandis que QnrB4 ne peut pas réactiver l'activité catalytique de l'ADN gyrase bloquée par les quinolones (106).

Un mécanisme de « sauvetage des complexes » dépendant de la concentration en protéine Qnr a ensuite été proposé (98, 100). Ces études suggèrent qu'à faible concentration, les Qnr se fixent aux complexes clivés et déstabilisent le complexe ternaire, tandis qu'à haute concentration Qnr inhibe l'ADN gyrase (Figure 14, puit 4) (98, 105).

#### 1.4.2.1.4. La régulation des gènes *qnr*

L'expression du gène *qnrA* est régulée par la température. En effet, il a été démontré que le choc thermique froid induisait l'expression de *qnrA* chez *S. algae* (138). Ceci semblerait permettre à *S. algae* une bonne adaptation aux conditions environnementales et une croissance à basse température. Les autres types de stress physique ou chimique (dommage à l'ADN, stress oxydatif, stress osmotique ou les températures hautes) n'ont pas stimulé l'expression de du gène *qnrA*.

La réponse SOS est un mécanisme de défense propre aux bactéries, contre les agressions (107). Les gènes *qnrB*, *qnrD* et *smaqnr*, contiennent dans leur région promotrice la SOS-box (Figure 16), nécessaire à la régulation de leur expression par le système SOS. La régulation de *qnrB* par le système a clairement été établie et incomplètement pour *qnrD* et *smaqnr* (108, 109). Aucun site de fixation de LexA n'a été identifié pour *qnrA*, *qnrS1* et *qnrV1* (110).

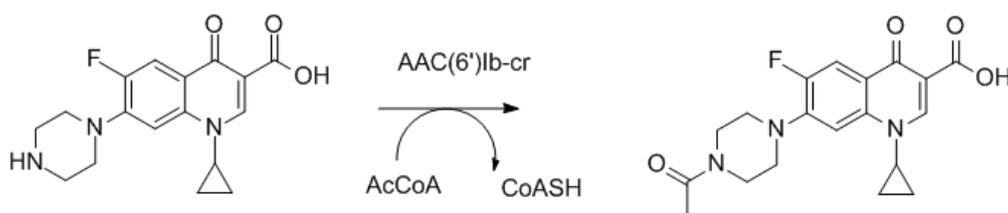


**Figure 16. SOS-box des gènes *smaqnr*, *qnrD* et *qnrB1* (111).**

La SOS-box ou le site de liaison de la LexA est un palindrome de 16nt (entouré). Le codon start +1 est représenté par un point et les séquences promotrices -35 et -10 sont surlignées (108).

#### 1.4.2.2. AAC(6')-Ib-cr

L'enzyme AAC(6')-Ib-cr est un variant de l'acétyltransférase AAC(6')-Ib connue pour inactiver les aminosides (kanamycine, tobramycine et amikacine). Ce variant -cr est aussi capable d'acétyler les fluoroquinolones avec un groupement aminé (ciprofloxacine, norfloxacine) (112) (Figure 17).



**Figure 17. Inactivation enzymatique de la ciprofloxacine par AAC(6')-Ib-cr (112).**

Deux substitutions dans le gène *aac(6')-Ib-cr*, Trp102Arg et Asp179Tyr suffisent pour N-acétyler le radical aminé du groupe pipérazine de la ciprofloxacine. Ces deux modifications n'affectent pas l'activité contre les aminosides.

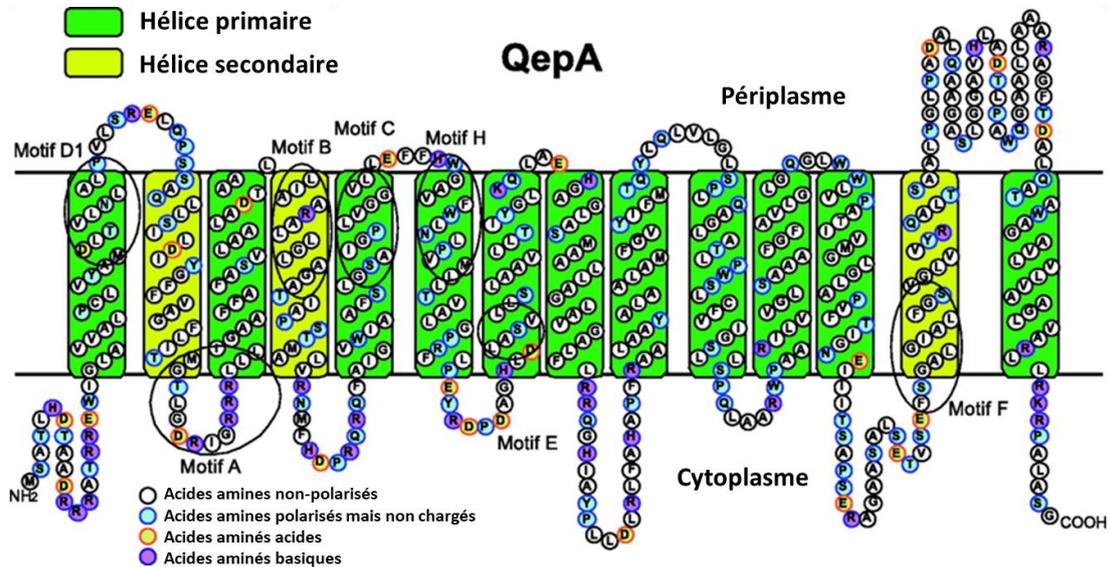
Le spectre d'action sur la ciprofloxacine et la norfloxacine est le résultat de deux substitutions d'acides aminés, Trp102Arg et Asp179Tyr. La présence concomitante des substitutions est nécessaire pour observer une activité de l'enzyme vis à vis des fluoroquinolones. Comme les protéines Qnr, l'enzyme AAC(6')-Ib-cr occasionne un bas niveau de résistance (112).

Le gène *aac(6')-Ib-cr* est généralement retrouvé dans les intégrons de classe 1 porté par des plasmides multi-résistants et qui peuvent porter, d'une part, d'autres gènes PMQR, et d'autre part, des gènes de résistance à d'autres classes d'antibiotiques (113–119). Ce gène a été abondamment rapporté chez diverses bactéries à Gram négatif comme les entérobactéries et *P. aeruginosa* (114, 117, 120–122).

Le gène a été récemment décrit dans le chromosome de *E. coli*, *K. pneumoniae* et *K. oxytoca* (66, 123). Dans ces cas l'intégration au chromosome serait la conséquence d'une mobilisation associée à la séquence d'insertion IS26 (120, 123).

### 1.4.2.3. Pompes d'efflux QepA et OqxAB

QepA est une pompe d'efflux appartenant à la superfamille des transporteurs facilitateurs majeurs (MFS), ayant 14 segments transmembranaires (Figure 18) (124).



**Figure 18. Structure secondaire prédite de QepA (124).**

La structure secondaire transmembranaire de QepA (511aa) a été calculée et illustrée par le système SOSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>). Les 14 segments transmembranaires et les 7 motifs spécifiques sont indiqués. Les classes des acides aminés sont différenciées par 4 couleurs.

La présence de QepA induit une baisse de la sensibilité aux fluoroquinolones hydrophiles, comme la ciprofloxacine (124, 125) (Figure 18, gène et pompe représentés en jaune). Même si le réservoir naturel reste encore inconnu, il a été montré que QepA présente une identité en acides aminés avec un transporteur retrouvé chez les Actinomycètes (124).

OqxAB est une pompe à efflux appartenant à la famille des RND (Resistance-Nodulation Division cellulaire), initialement caractérisée sur un plasmide responsable de la résistance aux olaquinox, un antibiotique utilisé comme promoteur de croissance porcin (126, 127). Cette pompe d'efflux a de nombreux substrats, parmi lesquels des molécules appartenant aux quinolones (128).

OqxAB présente une structure proche de celle de AcrAB-TolC et la régulation de l'opéron *oqxAB* est sous la dépendance de la protéine, RarA, appartenant à la famille des régulateurs AraC. L'augmentation d'expression de OqxAB confère un bas-niveau de résistance à de multiples antibiotiques (129, 130). Cet opéron, associé à la séquence d'insertion IS26, a été retrouvé sur de nombreux plasmides portés par diverses entérobactéries (128, 131–135).

De plus il a été décrit sur le chromosome de *Klebsiella* sp et *Raouletella* sp., faisant de ces genres le progéniteur vraisemblable de OqxAB (131).

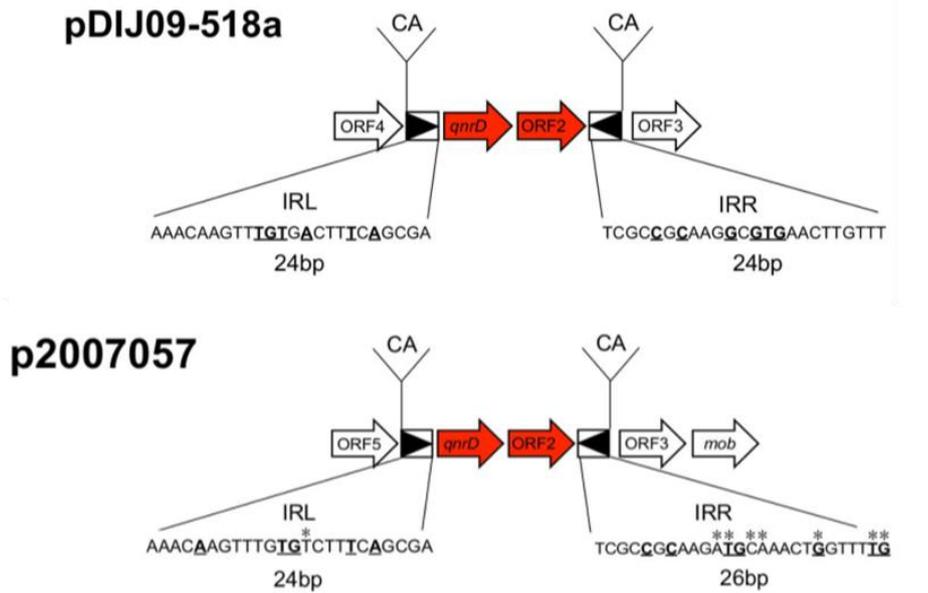
## CHAPITRE 2 : Les petits plasmides *qnrD*

### 2.1. Origine des petits plasmides-*qnrD*

Le gène *qnrD* a été décrit pour la première fois en 2009 chez *S. enterica* serovar *Bovismorbificans*, porté par un petit plasmide non-conjugatif de 4270pb, nommé p2007057 (72). La protéine QnrD avait 48% d'identité protéique avec QnrA1, 61% avec QnrB1 et 41% avec QnrS1 (72). Une analyse phylogénétique de ce nouveau gène plasmidique a révélé que le gène *qnrD* est le plus proche du gène *qnrB*, mais leur évolution s'est produite de manière indépendante.

Depuis cette première description plusieurs études ont été publiées, suggérant l'émergence chez les entérobactéries, de deux type de plasmides porteurs du gène *qnrD* et le possible réservoir naturel dans la tribu des *Proteeae* (136–142). Contrairement à p2007057, les plasmides isolés chez les *Proteeae* ont une taille d'approximativement 2,7 Kb (137, 138).

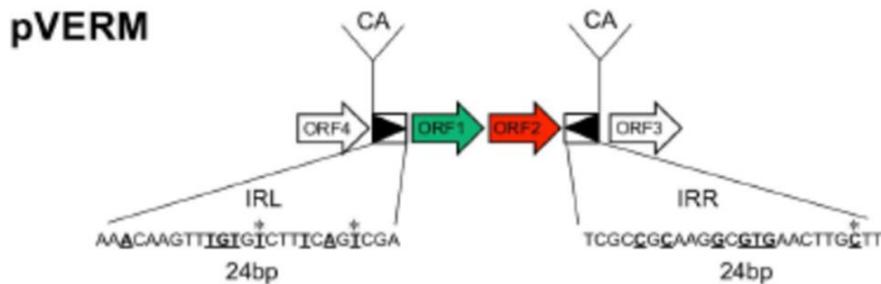
L'émergence de *qnrD* pourrait être la conséquence de la mobilisation du gène via une structure de type *mic* (mobile insertion cassette) (Figure 19) (143) à partir d'un progéniteur encore inconnu sur des petits plasmides du même type que pVERM.



**Figure 19. Description de la cassette d'insertion mobile (mic) portant le gène qnrD (143)**

Comparaison entre les deux plasmides qnrD, de taille différente. Les flèches rouges montrent les ORFs identiques entre les deux plasmides, portées par mic. Des séquences inversées répétées (gauche IRL et droite IRR) et le site de duplication (CA) sont indiquées par des triangles noirs. Les séquences IRL et IRR sont indiquées et les différences par rapport au pDIJ09-518a sont surlignées.

En effet, notre équipe a découvert et caractérisé ce plasmide cryptique de 3,7 Kb chez *Providencia vermicola* (Figure 20).



**Figure 20. Description de la cassette d'insertion mobile (mic) chez pVERM (143)**

La flèche rouge montre l'ORF identique et la flèche verte l'ORF différente, comparée à pDIJ09-518a, portées par mic.

## 2.2. Structure génétique des petits plasmides-*qnrD*

Le plasmide p2007057, isolé chez *S. enterica* (72), est constitué de 5 cadres de lecture ouverts ou open reading frame (ORF) en comptant le gène *qnrD*. Le plasmide pDIJ09-518a, isolé chez *P. rettgeri*, est constitué de 4ORFs, dont *qnrD* (137) (Figure 21).

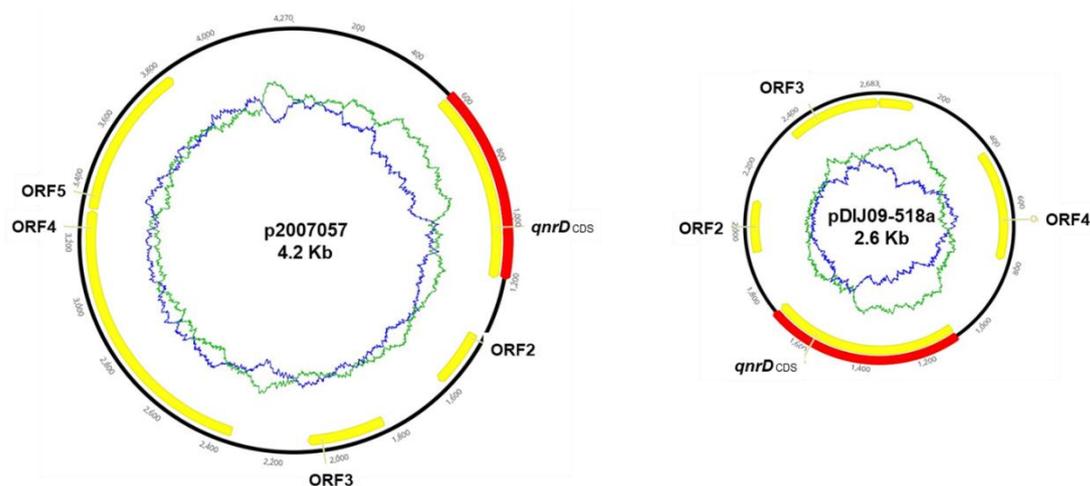


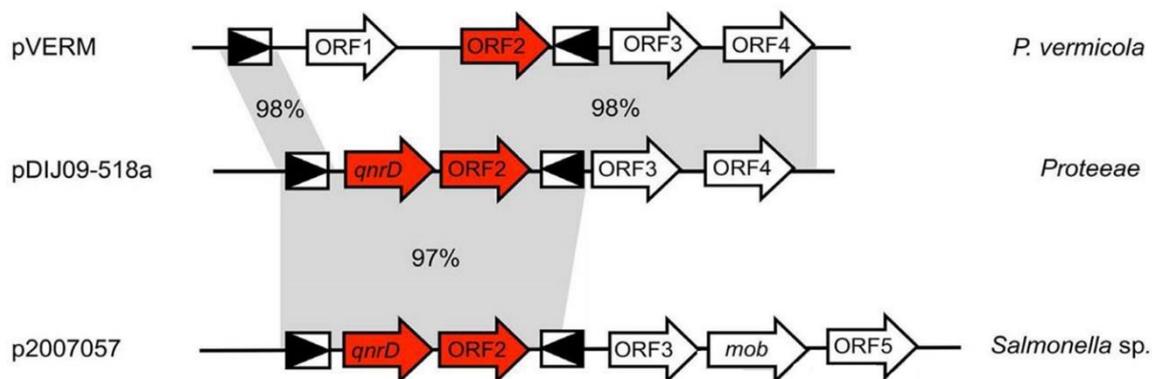
Figure 21. Structure génétique des plasmides p2007057 et pDIJ09-518a (Geneious™).

Les deux plasmides *qnrD* ont en commun 2 ORFs, le gène *qnrD* (100% d'identité de séquence) et l'ORF2 (une protéine hypothétique, 96% d'identité de séquence). Le rôle de l'ORF3 et l'ORF4 sera détaillé dans la partie résultats de la présente étude.

L'ORF4, avait initialement été envisagée comme codant une protéine de réplication (144), mais des études sur des plasmides isolés chez *Proteus vulgaris* (141) et chez *Proteus* spp (139) ont rapporté soit une inactivation de la protéine due à une délétion d'un nucléotide en position 145, dans le plasmide pEAD1-2, soit par la création d'un codon stop prématuré, due à une mutation G304A dans le plasmide p22499. En conclusion, la protéine codée par ORF4 n'est pas une protéine de réplication ou il existe une deuxième origine de réplication. Ce dernier argument est à envisager, car le système de réplication de nombreux plasmides décrits chez les *Proteaeae* reste à élucider (144).

Les travaux précédents de notre équipe portant sur pVERM avaient permis de mettre en évidence de grandes similitudes de séquence avec pDIJ09-518a. En effet, pVERM porte 4 ORFs, dont 3 sont similaires à celles identifiés chez pDIJ09-518a.

Dans la Figure 22, les différents ORFs, hébergés par les plasmides p2007057, pDIJ09-518a et pVERM et les pourcentages d'identité sont schématisés.

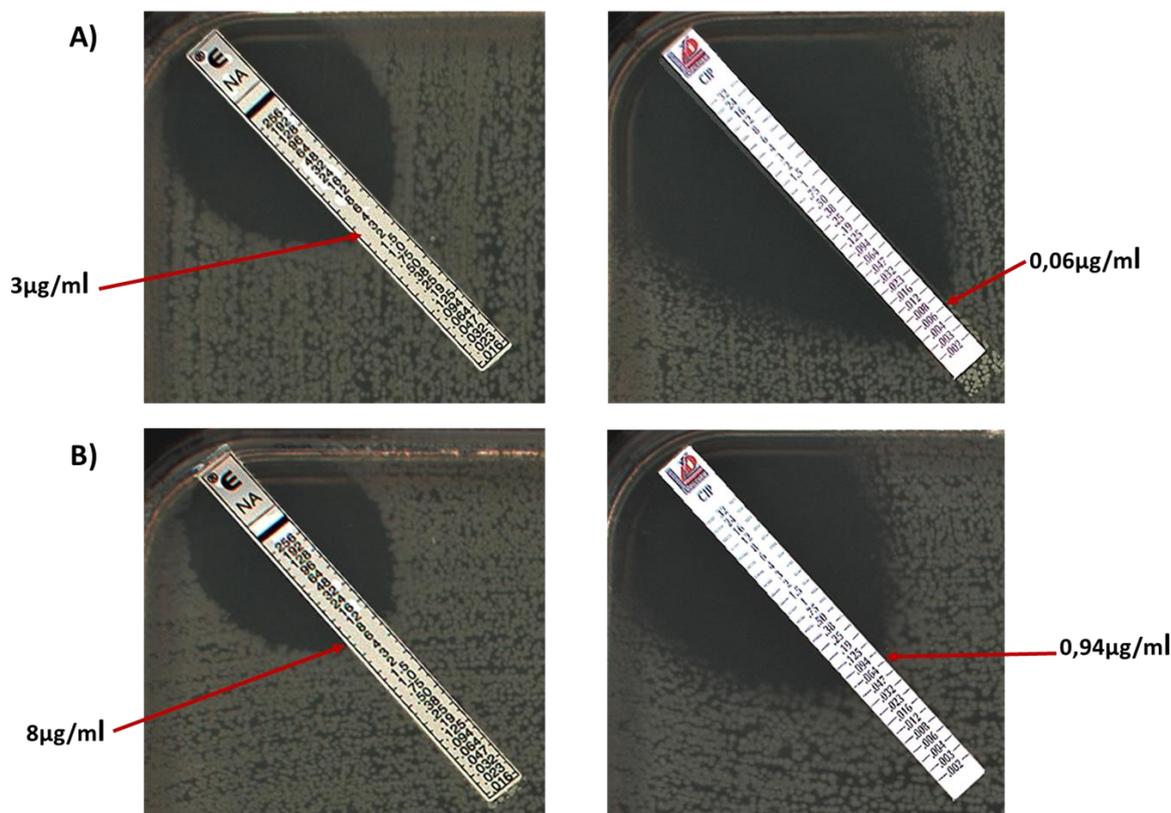


**Figure 22. Emergence et dissémination du gène *qnrD* de la tribu Proteeae vers les Enterobacteriaceae (143)**  
 Comparaison des structures génétiques des plasmides pVERM, pDIJ09-518a et p2007057. Les ORFs sont indiqués par des flèches avec la direction de transcription. L'élément mic-*qnrD* est indiqué en rouge. Dans le plan gris sont montrées les homologies entre les plasmides.

Un gène de mobilisation est porté par le plasmide p2007057 qui pourrait expliquer la mobilité des plasmides de taille 4,2Kb chez les entérobactéries.

### 2.3. Résistance aux quinolones des plasmides *qnrD*

Les études de caractérisation des plasmides *qnrD* ont montré qu'ils confèrent un bas niveau de résistance à l'acide nalidixique, mais la concentration minimale inhibitrice (CMI) de la ciprofloxacine est augmentée de 32 fois par rapport à celle d'une souche sans *qnrD* (72). Des résultats similaires ont été obtenus au laboratoire avec la souche MG1656 *E. coli* K-12 portant ou pas le plasmide pDIJ06-518a (Figure 23). Les CMI de l'acide nalidixique (NA, gauche) et de la ciprofloxacine (CIP, droite) ont été obtenues en utilisant les bandelettes E-test.



**Figure 23. CMI aux quinolones des souches *E. coli* et *E. coli* portant le plasmide *qnrD*.**  
 Les CMI ont été mesurées par bandelettes E-test NA et CIP pour les souches : A) *E. coli* MG1656 et B) MG1656/pDIJ09-518a. Le plasmide *qnrD* induit une augmentation de la CMI de CIP d'un facteur 16.

## 2.4. Distribution des plasmides *qnrD*

Malgré leur caractère non conjugatif et leur mobilisation non démontrée, la dissémination des plasmides *qnrD* en particulier chez les entérobactéries reste surprenante. Afin de nous rendre compte de l'étendue de la dissémination, nous avons réalisé une étude bibliographique.

Dans la base de données NCBI, nous avons utilisé le mot clé *qnrD* et nous avons trouvé 258 articles publiés dont 96 en utilisant le filtre best match. Seulement 42 plasmides porteurs du gène *qnrD* ont été entièrement séquencés et déposés dans la base GenBank. Par ailleurs, il existe plus de 100 séquences du gène *qnrD* déposées dans la base de données. Mais malheureusement, elles ne contiennent pas la région promotrice du gène. Nous avons pu ainsi établir une liste des caractéristiques des plasmides *qnrD* actuellement décrits (Tableau 1). Parmi ces plasmides, trois n'appartiennent pas aux *Enterobacteriaceae*, et ont été isolés à partir d'un pathogène opportuniste, *Ochrobactrum anthropi* (résultats non publiés).

**Tableau 1. Caractéristiques des souches d'Entérobactéries *qnrD* positives.**

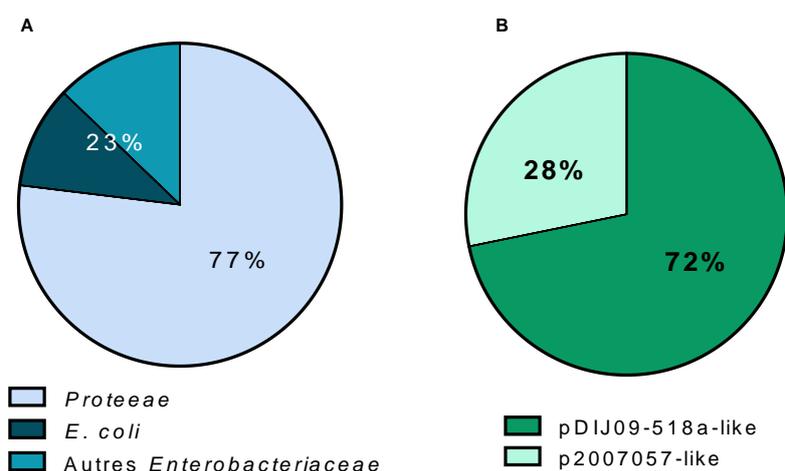
Numéro d'accès	Nom des souches et plasmides- <i>qnrD</i> positifs	Taille (pb)	Déterminant PMQR
JQ776501	<i>Escherichia coli</i> pCGP246	4270	
JQ776502	<i>Escherichia coli</i> pCGP169	4270	<i>qnrS</i>
JQ776504	<i>Escherichia coli</i> pCGB40	4269	
JQ776506	<i>Escherichia coli</i> pCGS13	2687	<i>aac(6')-lb-cr</i>
JQ776505	<i>Citrobacter freundii</i> pCGF41	4268	
JQ776509	<i>Klebsiella pneumoniae</i> pCGH25	4270	<i>aac(6')-lb-cr</i>
JN183061	<i>Morganella morganii</i> p831	2684	
JQ7765010	<i>Morganella morganii</i> pCGH69	2683	<i>aac(6')-lb-cr</i>
KF813021	<i>Morganella morganii</i> pM60	2683	
LGYCO1000065	<i>Morganella morganii</i> pINSRALV892	2683	
KU165030	<i>Morganella morganii</i> pSE10MM	2683	
JN183060	<i>Proteus mirabilis</i> pT80	2687	
JX982605	<i>Proteus mirabilis</i> pCGP180	4270	<i>aac(6')-lb-cr</i>
JQ776503	<i>Proteus mirabilis</i> pCGP248	2683	
JQ776507	<i>Proteus mirabilis</i> pCGS49	2683	<i>aac(6')-lb-cr</i>
JQ776508	<i>Proteus mirabilis</i> pCGH15	2683	
JX982606	<i>Proteus mirabilis</i> pCGH40	4270	
KF364953	<i>Proteus mirabilis</i> pRS12-11	2683	
KF364955	<i>Proteus mirabilis</i> pRS12-104	2683	
KF364956	<i>Proteus mirabilis</i> pRS12-189	2656	
KF364957	<i>Proteus mirabilis</i> pRS12-304	2658	
KJ190020	<i>Proteus mirabilis</i> pM510	2683	
KF498971	<i>Proteus mirabilis</i> pEAD1-2	2669	
KP330456	<i>Proteus mirabilis</i> p1042	2682	
KP313759	<i>Proteus mirabilis</i> pPMZXF	2683	
MF062089	<i>Proteus mirabilis</i> p33184	2657	
MF062090	<i>Proteus mirabilis</i> p36854	2669	
MF062091	<i>Proteus mirabilis</i> p39190	2669	
MF062094	<i>Proteus mirabilis</i> p39224	2683	
JX514065	<i>Proteus sp.</i> p3M-2A	2656	
KF364954	<i>Proteus vulgaris</i> pRS12-78	4286	
KF498970	<i>Proteus vulgaris</i> pEAD1-1	2683	
MF062093	<i>Proteus vulgaris</i> p36852	2683	

MF062092	<i>Proteus penneri</i> p22499	2683	
HQ834472	<i>Providencia rettgeri</i> pDIJ09-518a	2683	
HQ834473	<i>Providencia rettgeri</i> pGHS09-09a	2683	
FJ228229	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Bovismorbificans</i> p2007057	4270	
KJ158441	<i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Hadar</i> pQnrD2	4268	
MEC001000032	<i>Proteus mirabilis</i> pCGS49	4144	

Parmi les plasmides *qnrD*, il existe aussi des plasmides conjugatifs, associés à d'autres PMQR ou à d'autres déterminants de résistance aux antibiotiques mais leur séquence n'est pas disponible dans GenBank (133, 145, 146).

La majorité des plasmides *qnrD* a été isolée à partir des souches appartenant à la tribu des *Proteeae* (77%, 30/39), tandis que 23% (9/39) ont été isolés chez d'autres *Enterobacteriaceae* (Figure 24). Parmi ces dernières, *E. coli* a été l'espèce bactérienne la plus rapportée et la seule décrite comme portant les deux types de plasmides *qnrD* (136).

L'ensemble des plasmides se répartissent en deux groupes de tailles différentes (Figure 24). Ceux proches de pDIJ09-518a (< 2,7 Kb) et ceux proches de p2007057 (< 4,7 Kb). Soixante-douze pour cent des plasmides déposés sont similaires à pDIJ09-518a, tandis que seulement 28% sont similaires à p2007057 (Figure 24).



**Figure 24. Distribution des plasmides *qnrD* chez les Entérobactéries et en fonction de leur taille.**

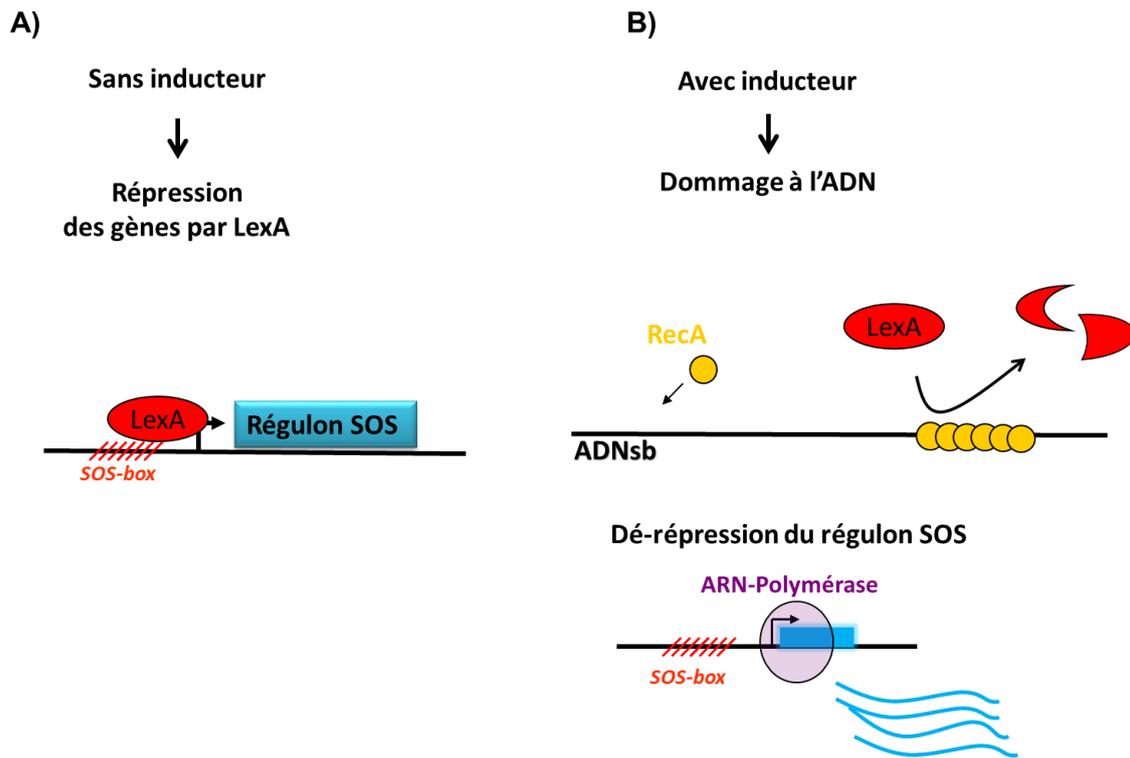
## CHAPITRE 3 : La réponse SOS

### 3.1. Description du système de défense bactérien, la réponse SOS

Les bactéries vivent dans des environnements changeants et sont constamment exposées à différents stress (stress oxydatif, carences nutritives, changement de pH ou de température) et aux agents endommageant leur ADN (rayonnements UV, antibiotiques). Pour s'adapter et survivre à ces stress, les bactéries ont développé plusieurs stratégies, dont des systèmes de régulation, qui consistent en un changement de l'expression de gènes et du métabolisme (147–150). Pour maintenir l'intégrité structurale de la molécule d'ADN, les bactéries possèdent des voies de réparation de leur ADN, capables de reconnaître et de réparer des nombreux types de lésions.

Décrite par Miroslav Radman, en 1975, la réponse SOS est l'un des principaux mécanismes de défense bactérien contre des agents génotoxiques qui endommagent l'ADN ou inhibent la réplication (147). De nombreuses études ont été menées pour étudier ce mécanisme de défense, ainsi que les acteurs moléculaires impliqués (107, 151, 152).

La réponse SOS est induite lorsque des quantités anormales d'ADN simple brin (ADNsb) sont ressenties dans la cellule, suite à un dommage à l'ADN ou lorsque des régions ADNsb se forment pendant la réparation de l'ADN ou lors d'arrêts de la réplication suite à une lésion (153). Une description du mécanisme est schématisée dans la Figure 25.



**Figure 25. Induction de la réponse SOS.**

(A) Dans les conditions normales de croissance, le répresseur LexA se lie à une séquence spécifique, la SOS-box, dans la région promotrice des gènes constituant le régulon SOS, limitant et inhibant leur activité. (B) Après un dommage à l'ADN par des inducteurs génotoxiques, et quand le niveau d'ADNsb est élevé, un filament nucléoprotéique RecA, est formé au site des lésions. Ceci active l'autoclivage du répresseur LexA permettant l'expression des gènes-SOS.

Les deux protéines clés dans la régulation du système SOS sont : le répresseur LexA et l'activateur RecA (sous forme de filament nucléoprotéique). Ces deux protéines fonctionnent ensemble pour réguler l'expression d'un ensemble de gènes définis comme appartenant au régulon SOS. A titre d'exemple, plus de 40 gènes ont été décrits chez *E. coli*, et près de 33 chez *Bacillus subtilis*. Ces gènes ont un rôle dans différents processus cellulaires (réparation de l'ADN, recombinaison, mutagenèse, etc.) (154).

En conditions normales, le répresseur, LexA se lie à une séquence spécifique dans la région promotrice d'un gène du régulon SOS et inhibe son expression (Figure 25A). En cas de quantités anormales d'ADNsb, la recombinase RecA se fixe à l'ADN pour former un complexe nucléoprotéique (Figure 25B). La formation de ce filament-RecA induit la réponse SOS par protéolyse autocatalytique du répresseur LexA. Ceci conduit à la libération des promoteurs des gènes du régulon dont la transcription est nécessaire à la réparation de l'ADN endommagé et au maintien de l'intégrité du génome.

En plus d'induire l'expression des protéines impliquées dans la réparation des lésions et des polymérases mutagènes, la réponse SOS retarde la division cellulaire, causant un phénotype filamenteux (155).

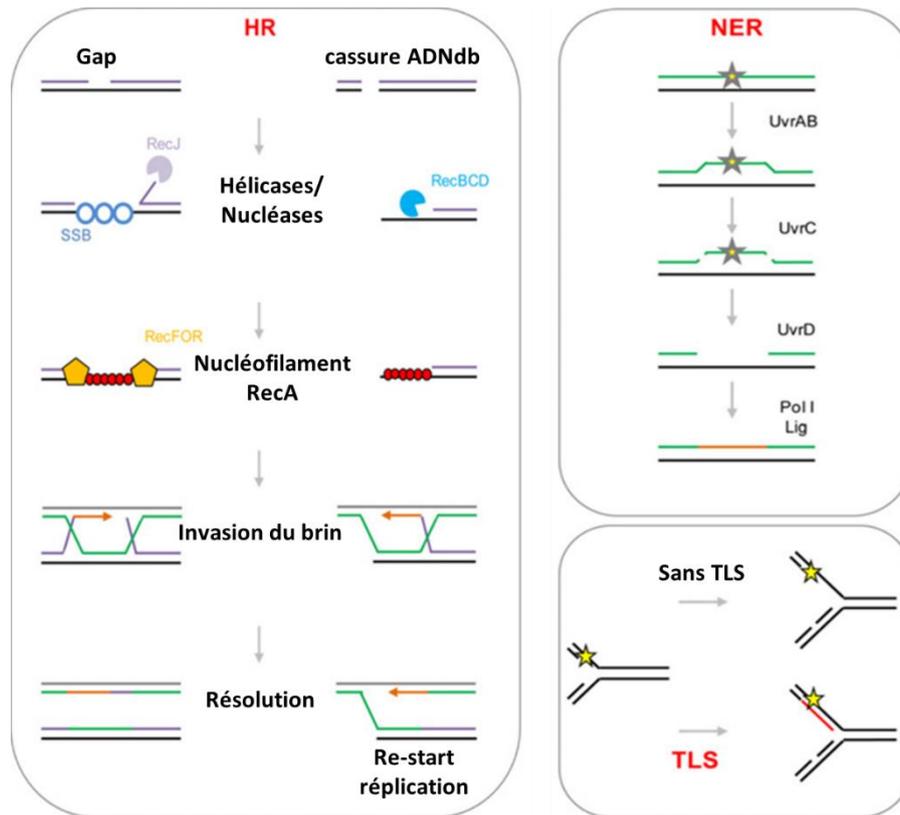
La régulation des gènes par le répresseur LexA est dépendante de la séquence dans la région promotrice, communément appelée LexA box ou SOS-box, mais aussi de sa position par rapport au site +1, ainsi que de l'efficacité du promoteur spécifique de chaque gène. La réponse SOS a été étudiée intensément chez *E. coli* et de nombreuses autres espèces bactériennes, à Gram négatif et à Gram positif.

Deux séquences consensus pour la SOS-box de *E. coli* ont été proposées : 5' -CTGTN<sub>8</sub>ACAG-3' (156) et 5' -TACTG(TA)<sub>5</sub>ACAGTA-3' (157, 158). Le Tableau 2 liste quelques exemples de séquences connues de la SOS-box et inclut différentes séquences des gènes PMQR décrits, dans la littérature.

**Tableau 2. Les séquences SOS-box identifiées chez différentes espèces bactériennes et dans les gènes portés par les éléments génétique mobiles (MGE).**

Organismes	Consensus 5'-3'	Références
<b>GRAM NEGATIVES</b>		
<i>Beta- et Gammaproteobacteriaceae</i>	CTGTN <sub>8</sub> ACAG	(152)
<i>Alphaproteobacteriaceae</i>	GAACN <sub>7</sub> GTAC	(159)
<i>Cyanobacteriaceae</i>	RGTACN <sub>3</sub> DGTWCB	(160)
<i>Spirocheate</i>	TTTGN <sub>5</sub> CAAA	(161)
<i>Acidobacteriaceae</i>	GTTCN <sub>7</sub> GTTC	(162)
<b>GRAM POSITIVES</b>		
<i>Firmicutes</i>	CGAACRNRYGTTYC	(163)
<i>Choloroflexi</i>	GAACN <sub>4</sub> GTAC	(164)
<i>Actinobacteriaceae</i>	TCGAACN <sub>4</sub> GTTCGA	(165)
<i>Deinococcus</i>	CGAACRNRYGTTCG	(166)
<b>GENES PORTES PAR DES ELEMENTS GENETIQUES MOBILES</b>		
<b>INTEGRONS</b>	ACTGTW <sub>8</sub> ACAGT	(167)
<i>qnrB</i>	CTGTATAAAAAAACAG	(108)
<i>smaqnr</i>	CTGTATAAATAAACAG	(111)
<i>qnrD</i>	CTGTATAAATAACCAG	<b>Présent étude</b>

La majorité des gènes induits par la réponse SOS favorise la réparation des lésions à l'ADN. Dans une revue récente, il a été schématisé les trois principales voies de réparations de l'ADN induites lors de la réponse SOS (Figure 26) (107).



**Figure 26. Schéma simplifié des voies de réparation induites par la réponse SOS. Adapté d'après Baharoglu & Mazel, FEMS Microbiol Rev, 2014 (107).**

HR, recombinaison homologue ; NER, réparation par excision de nucléotides ; TLS, synthèse de translétions. Ces trois processus de réparation sont activés lors de l'induction de la réponse SOS. **La recombinaison homologue (HR)**: pour initier la HR, lorsque des gaps ou des lésions ADNdb se retrouvent dans la séquence du génome, des hélicases/nuclease vont dégrader les cassures ADNdb afin de produire de l'ADNsb et recruter la protéine RecA. Le nucléofilament RecA recherche des séquences identiques sur le génome par invasion de brin. Ce processus de réparation des « gaps » ou cassures ADNdb se déroule sans l'intégration des mutations dans le chromosome (redémarrage de la fourche de réplication). **La voie de réparation par excision de nucléotides (NER)** : Le complexe UvrAB reconnaît la lésion à l'ADN. UvrC coupe des deux côtés de la lésion et l'ADNsb portant le dommage, excisé par l'hélicase UvrD. L'ADN polymérase resynthétise la séquence ADN manquante. La ligase colle le nouvel ADN à la matrice. Ce processus se déroule sans l'intégration des mutations. Si le signal d'induction de la réponse SOS persiste, des ADN polymérases **synthétisant des translétions (TLS)** sont exprimées. En absence de ces ADN polymérases, la fourche de réplication est bloquée. Les ADN polymérases (Pol IV, Pol V) peuvent répliquer l'ADN endommagé, mais la conséquence est l'augmentation du taux de mutagenèse dans la bactérie hôte.

La première voie de réparation est la recombinaison homologue (HR). La protéine est une recombinase qui assure le recrutement des protéines nécessaires pour réparer les cassures d'ADNdb dans le génome (Figure 26, HR).

La deuxième voie de réparation est la voie d'excision de nucléotides (NER, Nucleotide Excision Repair). Le complexe protéique, UvrABC est l'acteur clé de cette voie (168). Ces endonucléases reconnaissent les lésions ADNdb et coupent l'ADN, de chaque côté de la lésion.

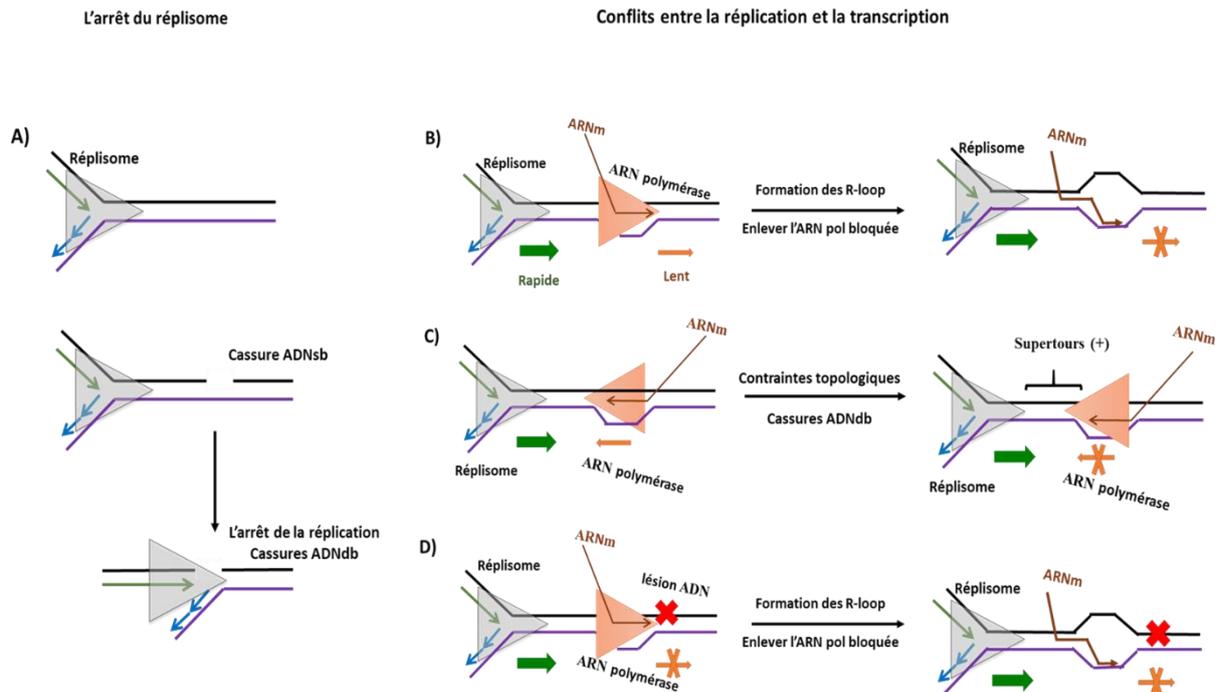
Une hélicase va ensuite exciser la séquence portant la lésion (169) permettant à l'ADN polymérase I de resynthétiser la séquence manquante (170).

La troisième voie de réparation est la voie de réparation dite de synthèses de translésions (TLS). Malgré des processus de réparation rapide (HR et/ou NER), des lésions peuvent persister et bloquer la fourche de réplication. Pour éviter l'effet délétère du blocage de la fourche de réplication, des ADN polymérases spécialisées, PolIV (codée par *umuCD*), PolIII (codée par *polB*) et/ou PolIV (codée par *dinB*) peuvent entrer en jeu (171). Durant cette voie TLS, la bactérie « gagne du temps » pour réparer la lésion avant que la réplicase ne complète la duplication du génome. Ce mécanisme de tolérance des dommages est souvent associé avec un risque augmenté de mutagenèse, car les ADN polymérase synthétisent l'ADN sans activité exonucléase 3'-5' (manque de l'activité exonucléase 3'-5').

### **3.2. Induction de la réponse SOS**

L'induction de SOS est liée, entre autre, à l'augmentation du taux de mutations et joue un rôle dans l'évolution des bactéries, dans leur adaptabilité et dans l'acquisition de nouveaux gènes de résistances.

Comme décrit précédemment, le signal inducteur de la réponse SOS est l'ADNsb. Ces lésions peuvent se former soit (i) durant le processus de réparation des lésions d'ADNdb et/ou spontanément durant la réplication, soit (ii) par expositions à des agents exogènes génotoxiques. Les dommages de l'ADN, causés par des erreurs de réplication et de recombinaison, peuvent constituer des stimuli importants pour l'induction de SOS s'ils ne sont pas réparés (Figure 27A).



**Figure 27. Schéma simplifié des voies de synthèse de l'ADNsb pour induire la réponse SOS.**

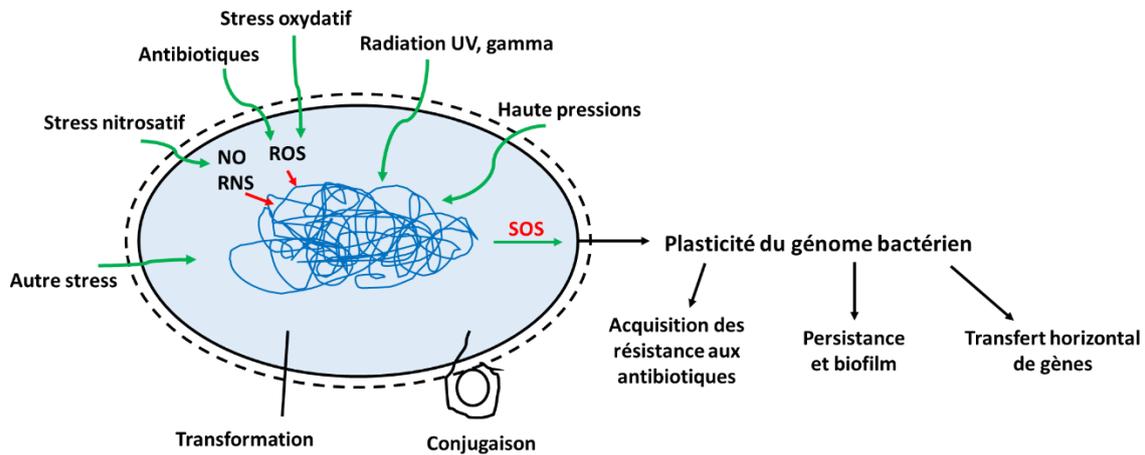
*Adapté d'après Baharoglu & Mazel, 2014 (107) et McGlynn et al., 2012(172)*

A) La fourche de réplication peut être bloquée ce qui peut mener à des cassures ADN spontanées. L'arrêt de la fourche conduit à la synthèse d'ADNsb qui peut constituer le signal d'induction de la réponse SOS. Quand la machinerie de réplication avance sur le chromosome, elle peut rencontrer différents obstacles. La machinerie de la transcription arrêtée (B) ou bloquée par une lésion à l'ADN (D), des complexes protéiques liant l'ADN et/ou des hybrides ARN/ADN ou R-loops. B) La machinerie de la réplication est bloquée par l'appareil transcriptionnel du fait de leur activité sur le même brin matrice et leur vitesse : conflits co-directionnels. C) La fourche de réplication et la transcription, cette dernière étant arrêtée transitoirement, mènent à la formation des surenroulements positifs, résultant en cassures ADNsb : conflits face à face. D) Lorsque l'ARN polymérase rencontre un obstacle (lésion ADN, complexe protéique), elle s'arrête au site de la lésion. Dans B) et D) pour éviter la formation des R-loop, des mécanismes existent pour enlever l'ARN polymérase bloquée.

La réplication et la transcription utilisent le même brin matrice et ont souvent lieu en même temps. Ceci implique donc des conflits entre ces deux mécanismes conduisant à des collisions (172) (Figure 27B et C). Ces collisions causent la synthèse des cassures ADNsb, soit par la formation des R-loops (Figure 27B), soit par un stress topologique dû aux surenroulements positifs (Figure 27C). Les R-loops sont des hybrides ARN/ADN formés du brin transcrit en synthèse (ARN) hybridé au simple brin matrice homologue (ADN) (172). Ils sont la conséquence du blocage de l'ARN polymérase sur l'ADN. Les R-loops sont des inducteurs connus de la réponse SOS (107, 173).

En absence des mécanismes pour enlever l'ARN polymérase bloquée sur l'ADN, par une lésion par exemple (Figure 27D), la réplication est arrêtée et la réponse SOS est induite (107, 172).

L'exposition à des agents exogènes génotoxiques peut endommager l'ADN et produire des lésions à l'ADN qui conduiront à l'apparition de cassures d'ADNsb. La Figure 28, résume et schématise les différents agents génotoxiques induisant la réponse SOS.



**Figure 28. Induction de la réponse SOS par des agents exogènes. Adapté d'après Da Re & Ploy (174).**

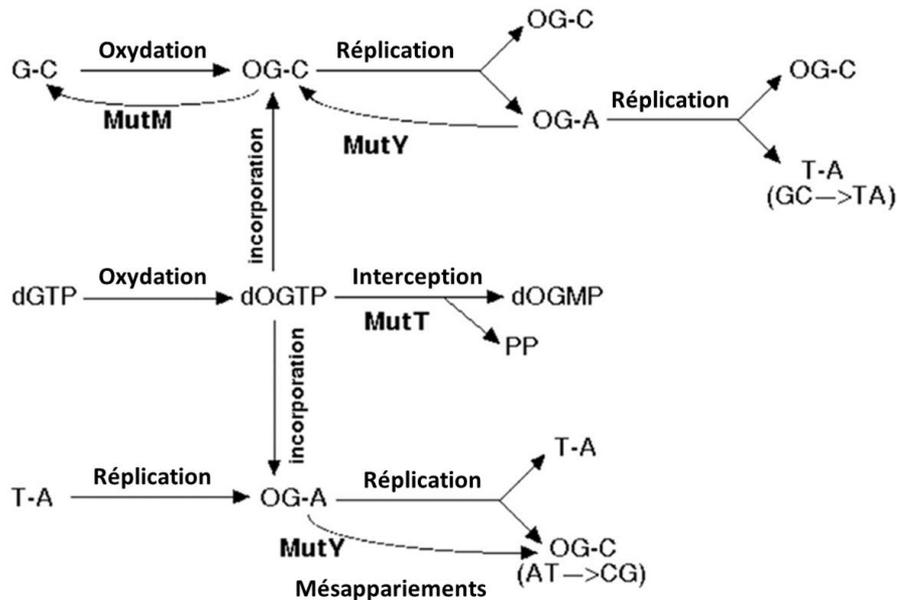
Exemples d'agents exogènes connus pour induire la réponse SOS suite à la formation de dommages directs ou indirects à l'ADN, par l'oxydation des protéines ou par blocage des processus importants pour la survie bactérienne. La réponse SOS conduit à une plasticité génomique dont les principales conséquences sont exposées. \* ROS, pour espèces réactives d'oxygène ; NO, pour le monoxyde d'azote ; RNS, pour espèces réactives de nitrogène.

Les radiations ultraviolettes (UV) causent différents types de lésions à l'ADN qui nécessitent d'être réparées, afin d'assurer la survie de la bactérie. Ces types de lésions sont réparées par les mécanismes HR et/ou TLS (175, 176).

Les espèces réactives d'oxygène (ROS) et les espèces réactives de nitrogène (RNS) sont des radicaux libres qui sont génotoxiques pour l'ADN. Les ROS et les RNS peuvent causer des dommages directs ou indirects à l'ADN en oxydant les protéines et/ou les lipides (177–181).

Les deux principales lésions de l'ADN, à l'origine d'ADNsb, sont l'incorporation de guanine oxydée (8-oxo-G ou 7,8-dihydro-8-oxo-guanine) et nitrosylée (8-nitro-G ou 2-amino-8-nitro-3,7-dihydropurin-6-one) (173, 180, 182, 183) durant la réplication. Ces lésions sont réparées par la voie de réparation par excision de base (BER). La Figure 29 représente, sous forme de schéma, le mécanisme de réparation de ce type de lésions à l'ADN.

Les protéines MutT et/ou MutY vont hydrolyser et corriger la guanine oxydée, qui peut se former non seulement dans le pool de nucléotides mais aussi sur l'ADN lui-même, causant des mésappariements de type GC-TA. L'ADN glycosylase MutY va limiter l'incorporation des mésappariements dans l'ADN (184–187). Une action incomplète dans la réparation par la voie BER peut générer des cassures ADNsb. Sans réparation de ces cassures par le système SOS ces lésions peuvent être cytotoxiques (188).



**Figure 29. Les protéines Mut de la voie BER bloquent l'effet mutagène de 8-oxo-G. Adapté d'après (189).**

Les dGTP dans le pool de nucléotides, tout comme les résidus guanine sur l'ADN, sont exposés aux ROS. Le dommage oxydatif sur l'ADN induit des transversions GC→TA qui sont bloquées par MutM et MutY (réaction du haut et du bas). L'existence des 8-oxo-G dGTP dans le pool de nucléotides (réaction du milieu) induit des transversions AT→CG (réaction du bas) et GC→AT (réaction du haut), les deux étant inhibées par la protéine MutT qui hydrolyse la 8-oxo-G dGTP. Les mécanismes (oxydation, réplification, incorporation) sont indiqués par des flèches.

Par ailleurs, le stress nitrosatif, peut générer des cassures ADNdb chez la bactérie qui vont bloquer la réplification via l'arrêt de l'ARN polymérase en transcription (190). Ces cassures sont réparées via la HR.

Les antibiotiques peuvent provoquer des lésions dans l'ADN de la bactérie. La réponse SOS peut être induite par différentes familles d'antibiotiques incluant les antibiotiques ciblant la synthèse de la molécule d'ADN, comme les fluoroquinolones (FQ) (191) et le triméthoprime (TMP) (192), les inhibiteurs de la traduction (aminosides, AGs) ou la transcription (rifampicine) ainsi que les inhibiteurs de la synthèse de la paroi bactérienne (β-lactamines).

Cette induction de la réponse SOS est possible à différentes concentrations d'antibiotique : létales ou sub-inhibitrices (sub- CMI ou sub- concentration minimale inhibitrice) (193–195).

Il a été montré que les antibiotiques, utilisés à des concentrations sub-CMI, conduisent souvent à l'induction de la réponse SOS et à une mutagenèse élevée, ayant comme conséquences majeures l'acquisition des résistances aux antibiotiques et/ou le transfert des déterminants de virulence (193, 194, 196, 197).

La mitomycine C est un agent génotoxique menant à une liaison croisée de la double hélice d'ADN, ce qui empêche la séparation des deux brins donc par conséquent mène à la formation des cassures dans l'ADN (198).

### **3.3. Les concentrations sub-inhibitrices des antibiotiques et leurs conséquences**

La résistance aux antibiotiques est un problème de santé publique inquiétant et est considéré, d'une part, comme une conséquence de l'usage excessif des antibiotiques et, d'autre part, comme une adaptation évolutive des microorganismes. Les antibiotiques sont utilisés en médecine humaine et vétérinaire, ainsi que dans l'agriculture et l'aquaculture, afin de prévenir et/ou traiter des infections par des microorganismes (199–203). Ces molécules sont plus ou moins métabolisées, et après leur administration des quantités faibles peuvent subsister chez le sujet au niveau du foyer infectieux profond ou être excrétées dans l'environnement (204, 205).

Les sub-CMI n'affectent pas la croissance bactérienne mais peuvent favoriser l'émergence de résistance, la synthèse de facteurs de virulence et la formation de biofilm (206–212). L'émergence de la résistance favorisée par les sub-CMI peut être le fait d'une augmentation du transfert horizontal et de la mobilité (206, 207, 210–212) mais aussi de l'augmentation du taux de mutagenèse (194).

A titre d'exemple, la tolérance aux fluoroquinolones est directement liée à l'induction de la réponse SOS (206, 213, 214). Les sub-CMI de fluoroquinolones sont connues pour moduler l'expression des gènes pour l'induction de la réponse SOS, suite aux dommages à l'ADN et au stress oxydatif que ces antibiotiques génèrent (215–218).

Il a été montré par Kohanski *et al.*, que les concentrations sub-inhibitrices des antibiotiques peuvent favoriser l'apparition des mutations ponctuelles et que cette mutagenèse est liée à une augmentation des ROS connues pour induire la réponse SOS (194).

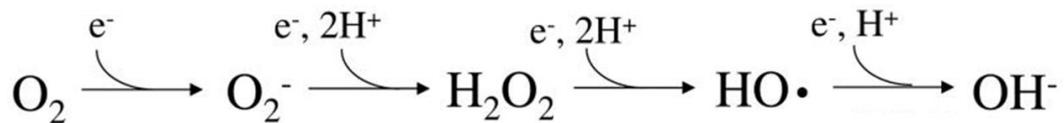
Les sub-CMI d'aminosides et d'autres familles d'antibiotiques, ne ciblant pas la synthèse de la molécule d'ADN induisent la réponse SOS en favorisant la formation des ROS et l'incorporation des résidus de guanine oxydée (173, 180, 193, 195). A contrario, ce processus n'a pas été observé chez *E. coli*, où il a été mis en évidence un mécanisme protecteur contre le stress oxydatif via le régulateur transcriptionnel du stress général, RpoS (180).

## CHAPITRE 4 : Stress oxydatif chez *E. coli*

### 4.1. Sources des espèces réactives d'oxygène

Le stress oxydatif est un déséquilibre entre la genèse des espèces réactives d'oxygène (ROS) et les défenses antioxydantes de l'organisme, en faveur des premières (219). Les bactéries utilisent l'oxygène pour respirer et sont en contact permanent avec les ROS qui sont des produits intermédiaires des réactions d'auto-oxydation (220).

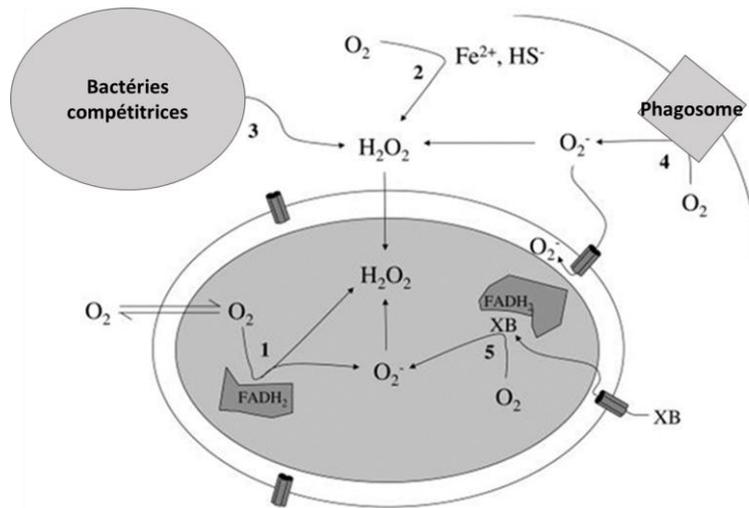
L'oxygène a un nombre pair d'électrons mais l'arrangement impair des deux derniers électrons contraint l'oxygène à en accepter un par un (221). Cependant, son affinité pour cet électron est basse nécessitant le recours à des cofacteurs transporteurs d'électrons dans la chaîne respiratoire (métaux, flavines et quinones) (222, 223). Sa réactivité augmente après l'acceptation de 1,2 ou 3 électrons pour la synthèse des radicaux libres : superoxyde ( $O_2^-$ ), peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et radical hydroxyle ( $OH^\cdot$ ) (224) (Figure 30).



**Figure 30. Synthèse des radicaux libres après l'acceptation des électrons par l'oxygène moléculaire (224).**  
Le superoxyde par dismutation produit du peroxyde d'hydrogène qui va réagir directement avec le Fe pour générer de radical hydroxyle.

Le superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle, communément appelés ROS, sont des facteurs de stress pour la bactérie (225, 226). La production de ROS chez les bactéries est principalement due à des enzymes ubiquitaires et abondantes : les flavoenzymes (227). La concentration de ROS, formés, dépend essentiellement de la concentration intracellulaire de l'oxygène moléculaire. Chez *E. coli* une fraction mineure des ROS résulte de l'auto-oxydation de la menaquinone dans l'espace périplasmique (228).

La Figure 31 résume les principales voies de synthèses des radicaux libres chez les bactéries.



**Figure 31. Sources exo- et endogènes de formation de ROS chez les bactéries (225).**

1) Auto-oxydation des enzymes intracellulaires. 2) Réactions redox environnementales. 3) Excrétion de peroxyde d'hydrogène par les compétiteurs. 4) Production de peroxyde d'hydrogène par les NADPH oxydases phagocytaires. 5) Antibiotiques ou autres agents qui disposent d'un cycle redox dans leur métabolisme.

La production de peroxyde d'hydrogène est très étudiée car le radical hydroxyle peut être généré par la réduction du Fe, via la réaction de Fenton (177).



Le radical hydroxyle est capable de réagir avec toute biomolécule pouvant générer des dommages irréversibles (229).

Le peroxyde d'hydrogène ne porte pas de charge et peut pénétrer la membrane facilement, ainsi le stress dû au  $\text{H}_2\text{O}_2$  est maintenu dans la cellule tant que des concentrations importantes existent à l'extérieur de la bactérie (250, 254, 255). Des agents exogènes, qui ont un cycle redox, dont les antibiotiques, peuvent générer du  $\text{H}_2\text{O}_2$  en réagissant avec le superoxyde via sa dismutation.

#### 4.2. Dommages causés par les espèces réactives d'oxygène

La première étude montrant l'effet du stress oxydatif sur la croissance des bactéries date de 1976 (230). Cette étude avait démontré que le défaut de croissance de *E. coli* en présence de stress oxydatif résultait de l'effet de l'anion superoxyde sur la synthèse des acides aminés (230).

Les bactéries sont vulnérables aux niveaux élevés des ROS qui peuvent provoquer des dommages importants dans toutes les molécules et qui favorisent l'apparition des mutations (231).

Les ROS sont des molécules très réactives et peuvent endommager l'ADN, les protéines et les lipides. Ces réactions ont pour conséquences la perte de fonction des protéines, la mutagénèse et finalement la mort cellulaire (220).

#### **4.2.1. Inactivation de enzymes-dépendantes des clusters [Fe-S]**

Le radical hydroxyle, le superoxyde et le peroxyde d'hydrogène sont des agents qui oxydent le fer des enzymes dépendantes à clusters [Fe-S]. Ceci a pour conséquence d'inactiver ces enzymes (207). Par exemple, il a été montré chez *E. coli* qu'en cas de délétion du gène codant la superoxyde dismutase (SOD), le superoxyde détruit le cluster [4Fe-4S] d'une déshydratase importante dans le métabolisme de la bactérie (208).

#### **4.2.2. Dommages à l'ADN**

La conséquence principale du stress oxydatif sur la bactérie est la mutagénèse qu'il induit sur l'ADN bactérien. Les radicaux hydroxylés, formés lors de la réaction de Fenton, peuvent oxyder ainsi les bases et les sucres constituant la molécule d'ADN (209, 210). Ces lésions à l'ADN peuvent bloquer la progression de la fourche de réplication ou l'activation des ADN polymérase de translésions (TLS pour Translesions synthesis Polymerases), et par conséquent l'induction de la réponse SOS (107, 229). La base la plus affectée est la guanine car elle a un potentiel redox très bas et la lésion la plus commune est la 8-oxo-G qui est très mutagène durant la réplication (185, 186, 211).

#### **4.2.3. Dommages aux lipides et protéines**

La peroxydation des lipides a pour conséquence l'altération de la membrane et la rupture des liaisons entre protéines et membrane (212, 232, 233). L'action des radicaux hydroxyles sur les protéines est un cercle vicieux. En effet, ils peuvent endommager directement les protéines (234-237). Les protéines ainsi oxydées qui ont un rôle dans la transcription et la traduction, vont induire des dysfonctionnements de ces processus et générer des erreurs de synthèse protéique conduisant à la synthèse des protéines oxydées (238).

La Figure 32 résume l'ensemble de dommages occasionnés aux bactéries par le stress oxydatif qui favorise l'induction de la réponse SOS.

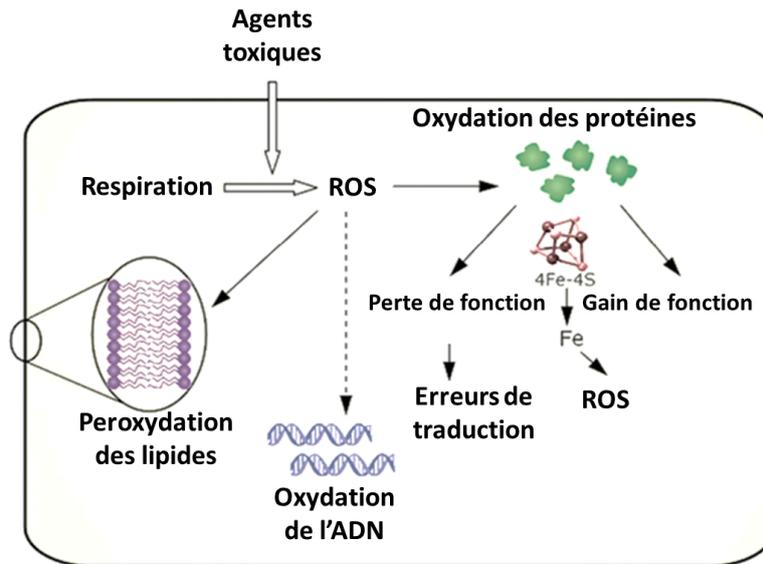


Figure 32. Molécules endommagées par le stress oxydatif.

### 4.3. Mécanismes de défense contre le stress oxydatif

Les bactéries ont développé des mécanismes de protection contre le stress oxydatif, comme la prévention de la production de ROS, l'arrêt de la propagation et de la formation, et la réparation des cassures. La réponse génétique des bactéries face au stress oxydatif est contrôlée par plusieurs facteurs de transcription.

#### 4.3.1. Défenses enzymatiques contre les ROS

Les mécanismes enzymatiques face aux agressions des ROS comprennent des nombreuses enzymes comme la superoxyde dismutase, les catalases et des peroxydases.

##### Superoxyde dismutase ou SOD.

*E. coli* contient trois SOD. Deux SOD sont cytoplasmiques avec le manganèse (Mn) et le fer (Fe) comme cofacteurs. MnSOD est codée par le gène *sodA* et FeSOD est codée par le gène *sodB*. L'enzyme Cu-ZnSOD codée par le gène *sodC* est retrouvée dans l'espace périplasmique (239–241).

La SOD génère du peroxyde d'hydrogène par dismutation du superoxyde selon la réaction suivante (241) :



Cette réaction est spontanée et peut se produire même en absence de l'enzyme. En effet chez *E. coli*, le superoxyde n'est pas très toxique en phase exponentielle de croissance, même si la Cu-ZnSOD est seulement synthétisée en phase stationnaire de croissance (240). Les autres enzymes cytoplasmiques sont régulées en réponse aux concentrations élevées de Fe (242).

### ***Catalases***

Les catalases sont des métallo-enzymes antioxydantes ubiquitaires qui catalysent la dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène moléculaire.



Il existe trois catalases chez *E. coli*. L'alkyl hydroperoxyde réductase (Ahp), la catalase G (KatG) et la catalase E (KatE) (243, 244). L'enzyme Ahp est une composante d'un système à deux composants (AhpC-AhpE) qui catalyse le transfert d'électrons de NADH vers le peroxyde d'hydrogène en le réduisant (243). Les enzymes KatG et KatE appartiennent à la famille des catalases-peroxydase et sont produites seulement en phase stationnaire de croissance (245, 246).

### ***Thiol-peroxydases***

Les bactéries oxygène-tolérantes synthétisent des enzymes alternatives ayant une activité peroxydase. Chez *E. coli*, il a ainsi été décrit, une thiol-peroxydase (247), une protéine de stockage de Fe (248) et une glutathion-peroxydase, pour optimiser la production de NADPH (249).

### ***Méthionine sulfoxyde réductase***

L'oxydation de la méthionine est une conséquence du stress oxydatif (250, 251). Il a ainsi été démontré qu'une mutation du gène *msrA*, codant la méthionine sulfoxyde réductase chez *E. coli* présentait une sensibilité augmentée au peroxyde d'hydrogène.

### ***Protéines modulatrices de l'homéostasie des ions de Fe libres***

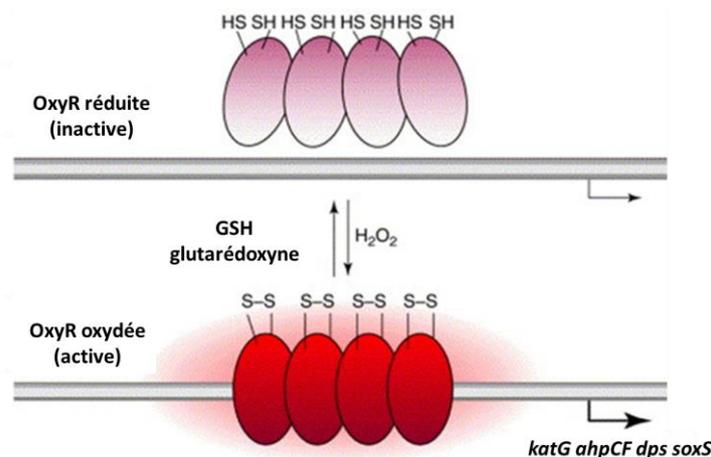
Afin de limiter la production du radical hydroxyle, via la réaction de Fenton, les bactéries peuvent favoriser la séquestration du fer (252, 253). Le fer est important pour la viabilité des bactéries, mais sa disponibilité en milieu aérobie est limitée et son abondance induit le stress oxydatif. La régulation de ces processus est réalisée par des protéines d'acquisition et de stockage (253, 254).

### 4.3.2. Réponse génétique aux ROS

Chez *E. coli* comme d'autres espèces bactériennes, plusieurs facteurs de transcription induits lors du stress oxydatif ont été caractérisés.

#### *Le régulon OxyR*

Le facteur de transcription OxyR est le principal régulateur de la détoxification de peroxyde d'hydrogène. Cet homo-tétramère est un constituant de la famille des facteurs de transcription LysR (245, 255, 256). Etant non chargé, le peroxyde d'hydrogène peut traverser la membrane. Quand des concentrations élevées de peroxyde d'hydrogène sont ressenties dans la cellule, le facteur OxyR est activé via l'oxydation de ses résidus Cys (245, 255, 256). Dans cette forme oxydée, il induit la transcription de 28 gènes et la répression de 10 gènes chez *E. coli* (257–262) (Figure 33). A titre d'exemple, la transcription des gènes codant les catalases Ahp et KatG est activée par OxyR (261, 262).



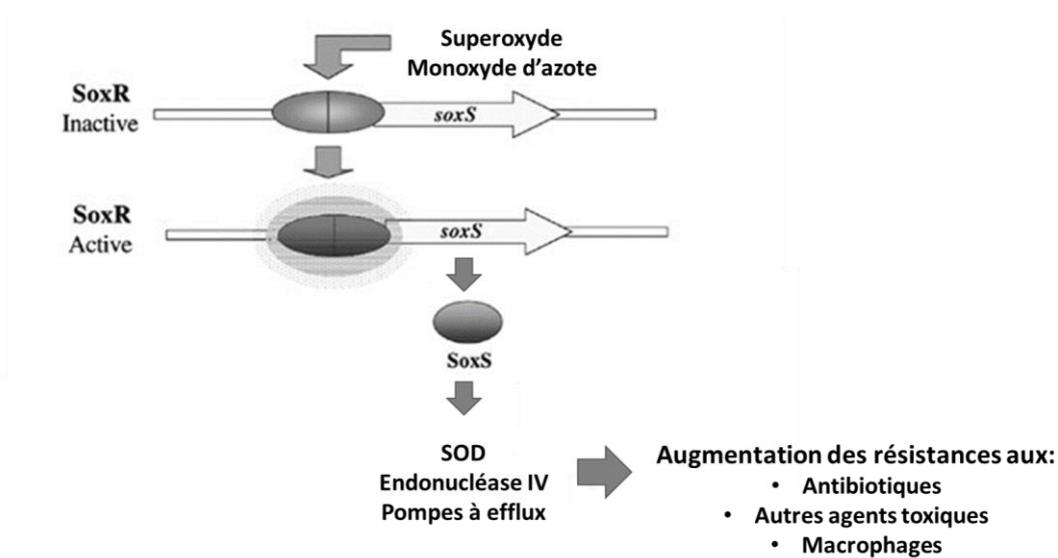
**Figure 33. L'auto-régulation et l'oxydation de OxyR par H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (263).**

OxyR est oxydé au niveau de ces 2 résidus Cys présents sur chacune des sous-unités. La forme oxydée lie le promoteur des gènes cibles ayant un rôle direct/indirect dans la protection contre le stress oxydatif. Il est re-réduit par la glutathionne (GSH), réduit par une GSH réductase. OxyR il s'auto-régule.

#### *Le régulon SoxRS*

Le système SoxRS est le principal régulateur transcriptionnel en réponse au radical superoxyde. La protéine SoxR est un régulateur transcriptionnel homo-dimérique, contenant un cluster [2Fe-2S] sur chacune de ses sous-unités. Le gène *soxS* est adjacent et la protéine codée agit comme second facteur de transcription (263–265).

Durant un stress oxydatif, les clusters [2Fe-2S] présents sur SoxR sont oxydés. OxyR, sous sa forme oxydée, se fixe au promoteur de *soxS* et active sa transcription. (265–269). SoxS active à son tour la transcription des gènes constituant le régulon, dont *sodA* (codant MnSOD), le gène codant l'endonucléase IV (réparation de l'ADN), le gène *yggX* (protection des protéines [Fe-S]) et l'opéron *arcBA* (contrôle de la respiration) (263, 270, 270, 271) (Figure 34). Il faut noter que les effets du monoxyde d'azote (NO) peuvent induire l'opéron SoxRS (272–274). Une conséquence importante de l'activation du système SoxRS est l'acquisition des résistances aux antibiotiques et à d'autres agents toxiques (275).



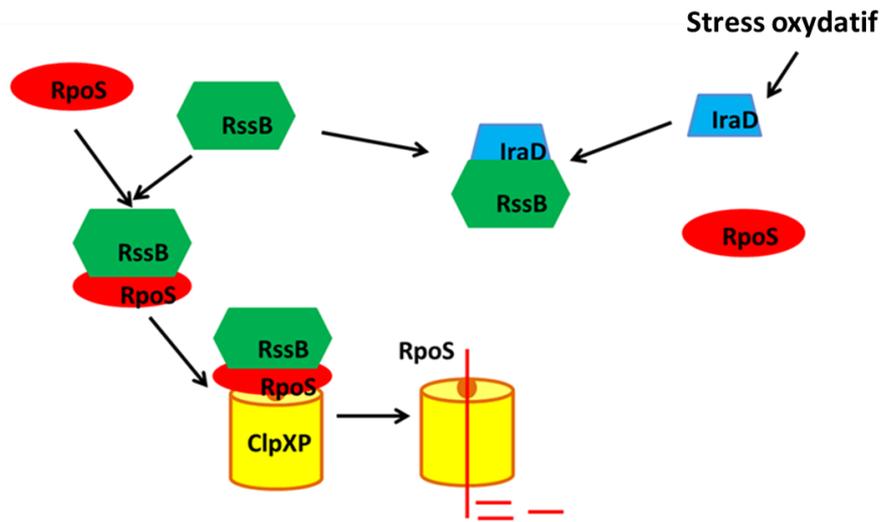
**Figure 34. Régulation et fonction du système SoxRS (276).**

Dans son état réduit, la protéine SoxR reste attachée sur le promoteur de *soxS*. L'oxydation et la réaction avec le monoxyde de nitrogène (NO) permet l'activation de *soxS*, dont la protéine codée va activer l'expression de plus de 100 gènes.

### ***Le régulateur de la réponse au stress général, RpoS ou $\sigma$ S***

Le facteur de transcription  $\sigma$ S est un régulateur du stress général en phase stationnaire. La protéine RpoS (RNA polymerase of stationary phase) appartient à la famille des facteurs de transcription  $\sigma$ 70 (277, 277, 278). A l'entrée en phase stationnaire de croissance bactérienne, le niveau de RpoS augmente et favorise la transcription de plus de 200 gènes en réponse au stress oxydatif (279–281). Par exemple les gènes codant la Dps (liaison à l'ADN), la catalase KatE, l'exonucléase III (réparation d'ADN) et Cu-ZnSOD (148, 279, 282, 283) présentent une transcription augmentée.

Il a été montré qu'en présence de concentrations sub-inhibitrices de tobramycine, *E. coli* est plus résistante face aux ROS, dû à une meilleure stabilité du facteur RpoS. Cette stabilité est assurée par la protéine IraD qui protège la protéine RpoS de la dégradation par la protéase Clp (180) (Figure 35).



**Figure 35. Stabilité de RpoS face au sub-CMI de tobramycine. Adapté d'après Baharoglu et al., 2013 (180).** RpoS est lié à une protéine adaptateur, RssB et est sujet à la dégradation par la protéase ClpXP. En condition de stress oxydatif induit par des concentrations sub-inhibitrices de tobramycine chez *E. coli*, la réponse est plus efficace car le facteur RpoS est protégé par la protéine anti-adaptateur IraD. Cette protéine est absente chez d'autres bactéries.

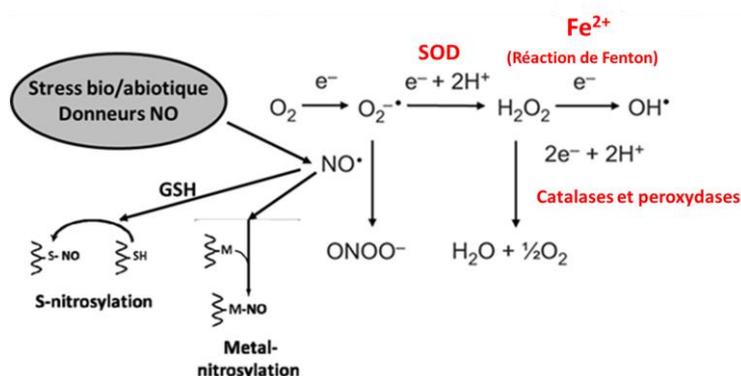
## CHAPITRE 5 : Stress nitrosatif chez *E. coli*

Le stress nitrosatif est la conséquence de l'incapacité des organismes à éliminer le monoxyde de nitrogène et ses produits dérivés et de sa réaction avec les espèces réactives d'oxygène.

### 5.1. Génération de monoxyde de nitrogène (NO) et dérivés

La capacité des microorganismes pour se protéger contre le stress nitrosatif est importante pour leur survie, surtout durant le processus d'infection. La phagocytose des micro-organismes peut causer un stress oxydatif, due à l'activation de l'oxydase NADH-dépendante, et le NO peut traverser la membrane bactérienne (284–287).

Même si le NO est un radical libre, il n'est pas particulièrement sensible à l'oxydation/réduction (288). Le NO peut agir avec les ROS, comme le superoxyde et l'oxygène moléculaire, pour former les espèces réactives de nitrogène (RNS) comme le peroxyde de nitrogène (ONOO<sup>-</sup>), le radical oxyde de nitrogène ( $\cdot$ NO<sub>2</sub>), le trioxyde de di-nitrogène (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), cation nitrosé (NO<sup>+</sup>) et l'anion nitrosyle (NO<sup>-</sup>). Ces espèces réactives intermédiaires peuvent donner lieu à la formation d'autres radicaux libres comme le radical hydroxyle (OH $\cdot$ ). Ce dernier, comme détaillé dans le chapitre 4, est un puissant agent génotoxique pour la bactérie. La présence de fortes concentrations de NO peut causer une augmentation de la mutagenèse (289) et le peroxyde de nitrogène peut directement oxyder les résidus guanine (8-oxo-G) et causer des cassures de l'ADN chez *E. coli* (290, 291). Les RNS peuvent être considérés comme une forme directe de stress oxydatif chez les bactéries (Figure 36).



**Figure 36. Schématisation des réactions de synthèse communes des ROS et RNS (292).**

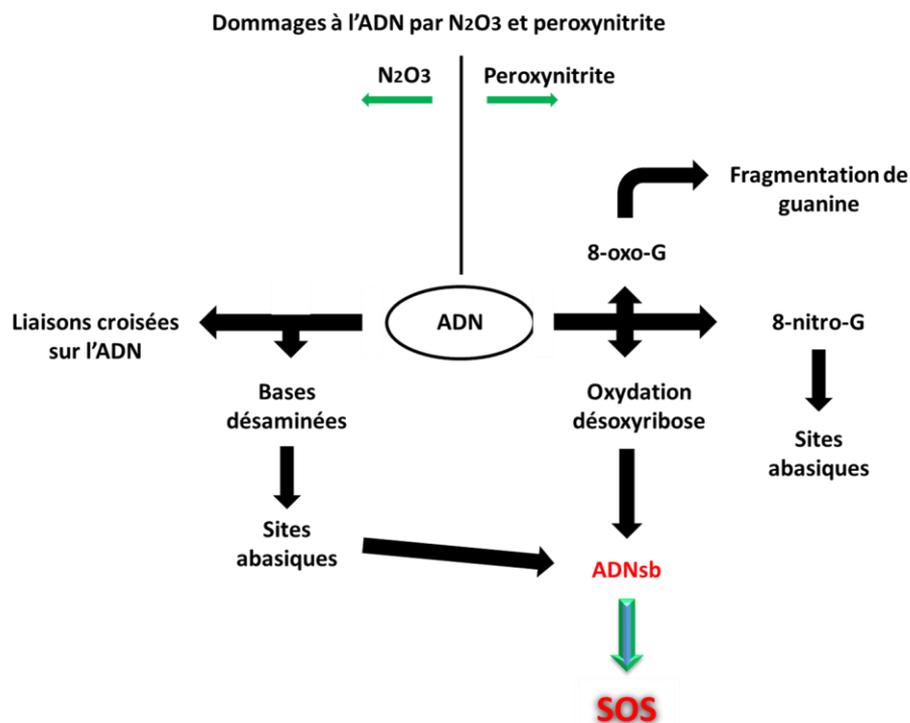
Les réactions les plus importantes de synthèse de ROS (revues dans le chapitre 4) et RNS. Le peroxyde de nitrogène en présence des groupements thiols peut être oxydé et donner d'autres dérivés RNS. Le pool des ions métalliques peut conduire à la formation des complexes nitrosyle qui vont synthétiser en présence d'oxygène d'autre RNS. Le NO peut réagir avec le GSH pour synthétiser le glutathion S-nitrosylé. En rouge sont représentés les antioxydants et la formation de radical hydroxyle via la réaction de Fenton.

## 5.2. Dommages causés par le NO et les RNS

Le NO et les RNS causent des dommages à l'ADN à type de nitrosylation/nitration des protéines et/ou une peroxydation des lipides (291, 293).

### 5.2.1. Dommage à l'ADN

Le NO ne réagit pas directement avec l'ADN, mais ses dérivés, le trioxyde d'azote ( $N_2O_3$ ) et le peroxydinitrite ( $ONOO^-$ ) sont de très puissants agents nitrosatifs (293). Les lésions créées après exposition à des concentrations élevées de NO et RNS sont résumées sur la Figure 37.



**Figure 37. Voies d'induction des dommages à l'ADN par le NO et les RNS (293).**

Les réactions du trioxyde d'azote et de peroxydinitrite conduisent à la désamination des bases et à l'oxydation de la guanine ou des sucres. Ces lésions créent des sites abasiques qui mènent à la synthèse d'ADNsb, inducteur de la réponse SOS.

Le  $N_2O_3$  endommage l'ADN par désamination des bases nucléotidiques (remplacement du groupement amino par un groupement hydroxyle (293–295). La désamination de l'adénine, de la cytosine, de 5-méthyle cytosine et de la guanine, peut donner lieu à des transversions de type GC→AT ou AT→GC. Ces lésions à l'ADN sont réparées par des endonucléases de la voie de réparation BER, comme schématisé dans la Figure 29 (293–295). La réparation de ces lésions peut conduire à des cassures ADNsb et donc activer la réponse SOS.

L'ONOO<sup>-</sup> n'agit pas sur l'ADN par déamination mais par un dommage oxydatif. Le mécanisme n'est pas encore très clair mais il semble que le peroxy-nitrite peut agir sur les sucres des nucléotides constituant l'ADN et engendrer des cassures ADNsb (291, 293). Par exemple l'ONOO<sup>-</sup> agit spécifiquement avec la guanine et cause son oxydation (8-oxo-G) et sa nitration (8-nitro-G). Ces lésions sont réparées via le système BER (182, 291, 296, 297). En cas de réparation incomplète, les bases modifiées 8-nitro-G étant instables, leur dépurination peut créer des sites abasiques et ainsi générer des cassures de l'ADNsb. Dans ce cas, la réponse SOS peut être induite permettant la réparation de l'ADN grâce au mécanisme de recombinaison homologue (HR), comme vu dans la Figure 26 (181, 297–300).

### 5.2.2. Dommages des protéines et lipides

Dû à ces propriétés chimiques, le NO peut interagir avec les centres métal des métalloprotéines et former des complexes métal-nitrosyle avec le Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> et Cu<sup>2+</sup>. Les complexes métal-nitrosyle conduisent à la formation des groupements S-nitrosothioles (301). La formation de complexes métal-nitrosyle a un impact sur la conformation des protéines, causant leur inactivité. En effet, le NO et les groupements S-nitrosothioles peuvent mobiliser les ions métal des métalloprotéines, comme par exemple le zinc (302). Ces ions métal se déposent ensuite sur l'ADN inhibant la progression de la fourche de répliation et donc favorisant l'apparition de mutations d'ADN.

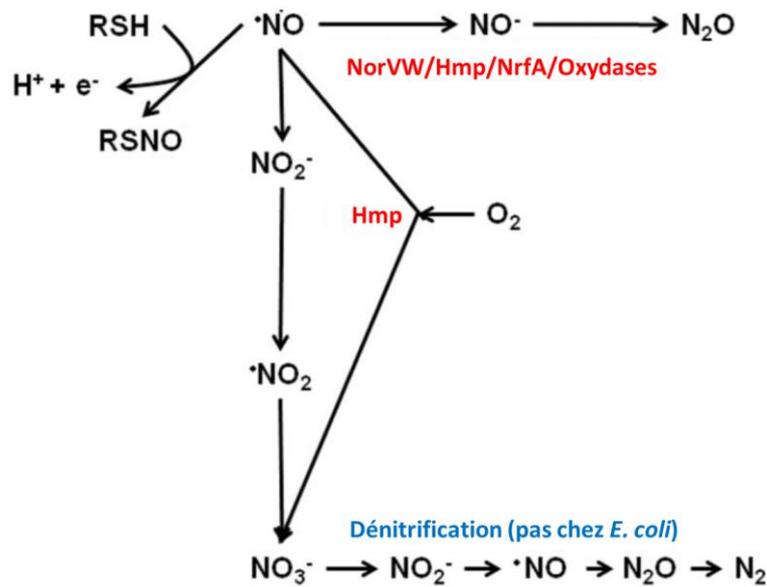
La nitration des résidus tyrosine protéique par le N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et ONOO<sup>-</sup> résulte en la formation d'un résidu 3-nitrotyrosine (303). Dans le cas de la ribo-nucléotides réductase, ceci a pour conséquence la limitation de la disponibilité des précurseurs de la synthèse de la molécule d'ADN (304).

La S-nitrosylation est une réaction réversible de liaison du NO à un résidu cystéine sur la protéine cible, dont les conséquences sont soit une modification de son activité enzymatique, soit la perte de sa fonction.

### 5.3. Mécanismes de défense contre l'effet toxique de NO et les RNS

#### 5.3.1. Défenses enzymatiques pour détoxifier le NO et les RNS

Des enzymes spécialisées pour la résistance au stress nitrosatif ont été identifiées chez *E. coli* : la flavorubredoxine (NorVW) (305), la cytochrome c nitrite réductase périplasmique (NrfA) (306) et la flavohaemoglobine (Hmp) (307–309). La Figure 38 résume les voies de détoxification impliquant ces trois protéines.



**Figure 38. Voies de réduction du monoxyde de nitrogène (310).**

Les enzymes de réduction de  $\text{NO}$  chez *E. coli* sont indiquées en rouge. En bleu, est présentée la voie de dénitrification des espèces bactériennes capables de ce processus.

#### ***La flavorubredoxine (NorVW)***

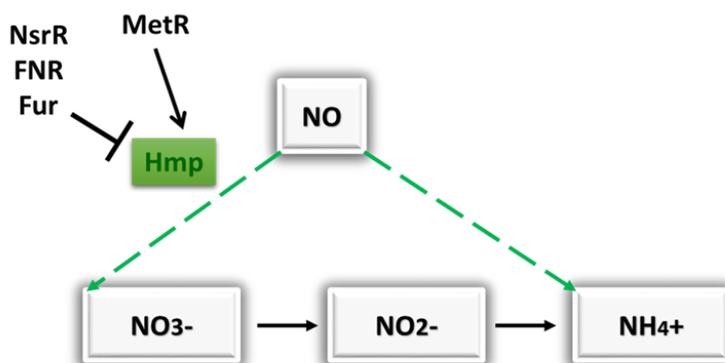
Chez *E. coli* en conditions anaérobie, la dégradation directe de  $\text{NO}$  est réalisée par la flavorubredoxine NorV (codée par le gène *ygaK*), qui est une  $\text{NO}$  réductase, et son partenaire oxydoréductase NorW (codée par le gène *ygbD*) (311). La protéine NorV contient un centre Fe non-hème pour lier le  $\text{NO}$  et le NorW constitue un donneur d'électrons  $\text{NADH}$ . NorV catalyse la réduction de  $\text{NO}$  en  $\text{N}_2\text{O}$  en anaérobiose (Figure 38).

### *La cytochrome c nitrite réductase périplasmique, NrfA*

Le cytochrome c périplasmique nitrite réductase, NrfA a un rôle primordial dans la respiration en réduisant les nitrites. En effet, NrfA utilise l'ion nitrite comme accepteur d'électron en réduisant à l'ammonium. En parallèle, NrfA peut réduire le NO en N<sub>2</sub>O (312, 313) (Figure 38).

### *La flavohaemoglobine, Hmp*

Le système de détoxification de NO le mieux caractérisé est celui impliquant la flavohaemoglobine, Hmp (309, 314, 315) (Figure 38). Hmp est une NO di-oxygénase, qui convertit le NO en NO<sub>3</sub> en condition d'aérobie (309, 314). L'expression du gène *hmpA* est régulée par plusieurs facteurs de transcription. La Figure 39 indique les principaux régulateurs de l'expression du gène *hmpA* (307, 308, 314, 315). Même si le mécanisme est encore mal compris, l'expression de *hmp* est induite par le NO (307).



**Figure 39. Régulation du gène *hmp*.**

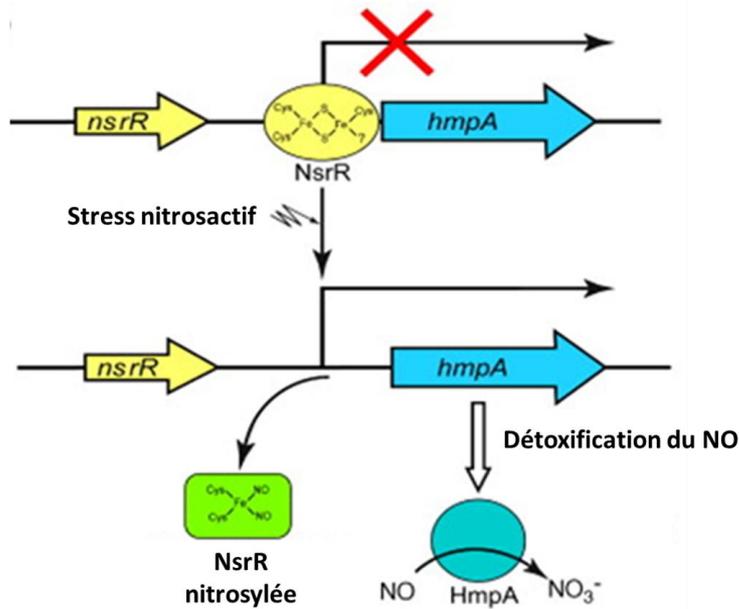
Le répresseurs NO spécifiques ou secondaires, NsrR, FNR et Fur. La protéine MetR agit comme un inducteur de son expression.

### **5.3.2. Régulateurs senseurs spécifiques de NO**

Chez les microorganismes, le NO est une molécule relâchée durant la respiration. A fortes concentrations, intra- et extracellulaires, le NO et ses produits dérivés, en présence d'O<sub>2</sub> et des ROS peuvent constituer des importants agents génotoxiques (316–318).

### *Le facteur de transcription NsrR*

La protéine NsrR est une protéine appartenant à la superfamille des facteurs de transcription Rrf2 (319). Chez *E. coli*, la protéine NsrR contrôle l'expression de plus de 60 gènes dont des gènes contrôlant la détoxification de NO, comme le gène *hmp* et *nrfA*, ainsi que des gènes (*ytfE*) impliqués dans la réparation des clusters endommagés [Fe-S] (320–322). L'exemple de la régulation du gène *hmp* par NsrR est représentée sur la Figure 40.



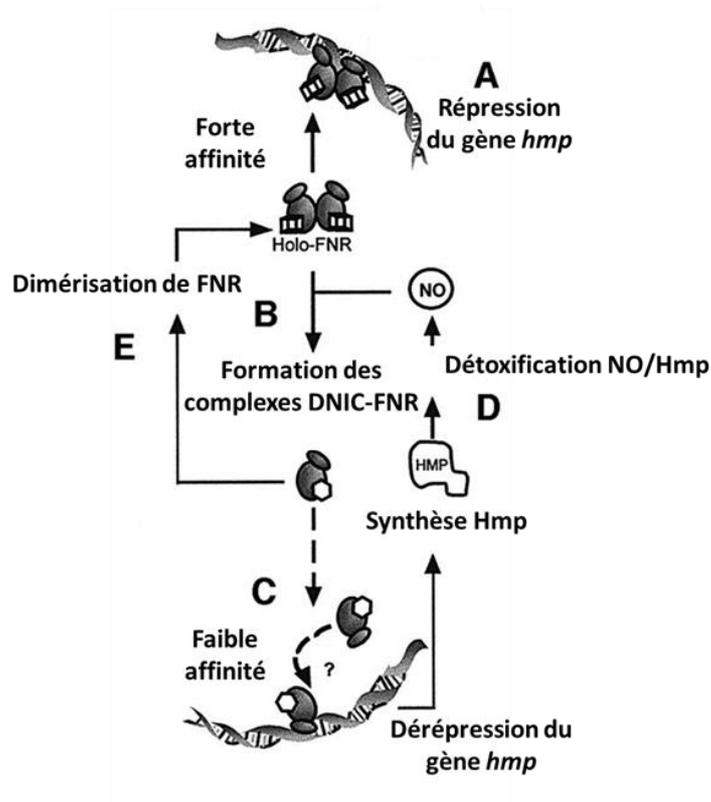
**Figure 40. Site de liaison à l'ADN du répresseur NsrR et activation de Hmp (320).**

Le NO se lie aux clusters [Fe-S] du NsrR. Cette réaction de nitrosylation a pour conséquence l'expression du gène *hmp*.

### *Le facteur de transcription FNR (fumarate and nitrate reductase)*

La protéine FNR est une protéine appartenant à la superfamille des facteurs de transcription Crp/FNR (323). Chez *E. coli*, la protéine FNR réagit non seulement avec l'oxygène moléculaire, mais aussi avec le monoxyde d'azote (308, 324) et contrôle l'expression de plus de 200 gènes dont l'activation des gènes impliqués dans l'oxydation en condition anaérobie (*norVW*) et en réprimant les gènes utilisés pour la détoxification de NO en aérobie (*hmp*) (309, 325, 326). En condition anaérobie, la protéine FNR chez *E. coli* contient un cluster [4Fe-4S] ou état holo-FNR qui favorise sa dimérisation et sa liaison aux protéines cibles. En présence d'O<sub>2</sub> et du NO, le cluster est converti en [2Fe-2S] qui a pour conséquence la monomérisation du FNR ou état apo-FNR, en l'inactivant (309).

L'exemple de l'induction du gène *hmp* par la FNR est représenté sur la Figure 41.



**Figure 41. Régulation du gène *hmp* par FNR chez *E. coli* (308)**

A) En condition anaérobie, le dimère holo-FNR inhibe l'expression du gène *hmp*. B) En présence de NO ou O<sub>2</sub>, le cluster [4Fe-4S] est converti en [2Fe-2S] via une modification transcriptionnelle (DNIC-FNR). Cette réaction va inactiver le FNR qui est dans sa forme monomère ou Apo-FNR. C) L'Apo-FNR peut lier le promoteur de *hmp* à faible affinité, pour éviter une dé-répression totale de ce gène. D) Apo-FNR détecte le NO et active le gène *hmp*, qui le détoxifie en N<sub>2</sub>O ou NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, en absence ou en présence d'O<sub>2</sub>, respectivement. E) Quand la concentration de NO intracellulaire baisse, le cluster [4Fe-4S] est reformé et FNR passe dans sa forme Holo-FNR.

## OBJECTIFS DE L'ETUDE

La résistance aux quinolones est un enjeu majeur de santé publique face à une situation devenue critique. Les Qnr sont des déterminants de résistance aux fluoroquinolones, récemment décrits et portés par des plasmides. Si la caractérisation des nouveaux allèles des différents PMQR est en pleine progression, la régulation des gènes *qnr* est encore très peu étudiée dans la littérature.

Au cours de ce travail, nous avons focalisé notre attention d'une part, sur la régulation du gène *qnrD*, porté par un petit plasmide pDIJ09-518a chez *E. coli*, par la réponse SOS, et d'autre part, sur la dissémination de ce petit plasmide chez les entérobactéries.

A ce jour, seule la régulation de l'expression du gène *qnrB* par la réponse SOS, en présence de fluoroquinolones, a été clairement établie. Chez *E. coli*, la réponse SOS est induite par des concentrations sub-inhibitrices de fluoroquinolones, mais pas d'aminosides. En effet, chez cette bactérie, ce dernier antibiotique ne favorise pas la formation des ROS.

Le but de ce travail a donc été d'étudier la régulation de l'expression de *qnrD* par la réponse SOS chez *E. coli*. Pour cela, les objectifs étaient:

- Déterminer la régulation du gène *qnrD* par la réponse SOS RecA-LexA dépendante :
  - o Par la quantification relative de son expression en présence de concentrations sub-inhibitrices des différentes classes d'antibiotiques.
- Déterminer le mécanisme moléculaire d'induction de la réponse SOS chez *E. coli* par les aminosides :
  - o Par la quantification des niveaux de formation de ROS et RNS.
  - o Par la délétion des ORFs présentes sur le plasmide *qnrD*.
- Déterminer l'impact clinique des plasmides *qnrD* chez les entérobactéries :
  - o Par la mesure de la formation de biofilm.
  - o Par la mesure de la stabilité et de la viabilité de *E. coli* portant le plasmide *qnrD*.
  - o Par la sélection de résistances à haut-niveau de fluoroquinolones, en présence d'aminosides.

# **PARTIE EXPERIMENTALE**

## PARTIE EXPERIMENTALE

### 1. MATERIEL ET METHODES

#### 1.1. Souches bactériennes, plasmides et conditions de culture

Les souches bactériennes et les plasmides utilisés sont indiqués dans les Tableau 3 et Tableau 4. La souche *E. coli* JW2536  $\Delta hmp$  nous a été fournie gracieusement par M. J-M Ghigo (Institut Pasteur Paris) (327). Les souches *E. coli* K12 MG1656, le mutant *recA* et *E. coli* DM49 *lexAind* ont été généreusement fournies par Mme. Z. Baharoglu (Institut Pasteur Paris)(108). Les expériences ont été réalisées dans un milieu Luria-Bertani (LB) ou milieu minimum, à 37°C.

**Tableau 3. Souches bactériennes utilisées pour cette étude.**

Souches	Génotype/description	Références/Sources
<b><i>Escherichia coli</i></b>		
MG1656 ( <i>E. coli</i> )	$\Delta lacI-lacZ$ derivative of MG1655	(108, 109)
MG1656 $\Delta recA$	Le gène <i>recA</i> remplacé par le Tn10	(108, 109)
DM49 ( <i>E. coli</i> )	<i>thr-1, araC14, leuB6, \Delta(gpt-proA), lacY1, tsx-33, qsr'-0, glnV44, galK2, LAM-, Rac-0, hisG4, rfbC1, mgl-51, rpsL31, kdgK51, xylA5, mtl-1, argE3, thi-1, lexA3(Ind-), TET<sup>R</sup></i>	(108, 109)
<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a	MG1656 portant le pDIJ09-518a, CIP <sup>R</sup>	Cette étude
<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a $\Delta qnrD$	MG1656 portant le pDIJ09-518a délété du gène <i>qnrD</i> , CIP <sup>R</sup>	Cette étude
<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a $\Delta ORF3$	MG1656 portant le pDIJ09-518a délété du ORF3, CIP <sup>R</sup>	Cette étude
<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a $\Delta ORF4$	MG1656 portant le pDIJ09-518a délété du ORF4, CIP <sup>R</sup>	Cette étude
<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a $\Delta ORF3$ /pORF3	<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a $\Delta ORF3$ , transformée avec pTOPO:: <i>ORF3</i> , CIP <sup>R</sup> , KAN <sup>R</sup>	Cette étude
<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a $\Delta ORF4$ /pORF4	WT/pDIJ09-518a $\Delta ORF4$ , transformée avec pTOPO:: <i>ORF4</i> , CIP <sup>R</sup> , KAN <sup>R</sup>	Cette étude
<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a $\Delta ORF3$ $\Delta ORF4$	MG1656 portant le pDIJ09-518a délété des ORF3 et ORF4, CIP <sup>R</sup>	Cette étude
<i>E. coli</i> :: <i>qnrD</i>	<i>qnrD</i> inséré dans le chromosome de MG1656	Cette étude
<i>E. coli</i> ::pDIJ09-518a	pDIJ09-518a inséré dans le chromosome de MG1656	Cette étude
<i>E. coli</i> :: <i>qnrD</i> /pDIJ09-518a $\Delta qnrD$	<i>E. coli</i> :: <i>qnrD</i> transformée avec pDIJ09-518a $\Delta qnrD$	Cette étude

<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a/pØ	<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a portant le pTOPO vide	Cette étude
<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a/pMutY	<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a surexprimant MutY	Cette étude
<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a/pMutT	<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a surexprimant MutT	Cette étude
<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a/pHmp	<i>E. coli</i> /pDIJ09-518a surexprimant Hmp	Cette étude
$\Delta hmp$	<i>E. coli</i> délété du gène <i>hmp</i>	
$\Delta hmp$ /pDIJ09-518a	Le mutant <i>hmp</i> portant le pDIJ09-518a	Cette étude
ATCC 25922	Souche multisensible	Collection de laboratoire
ATCC 25922/pDIJ09-518a	ATCC25922 portant le pDIJ09-518a, CIP <sup>R</sup>	Cette étude
DH10B	Bactérie receveuse, STR <sup>R</sup>	Invitrogen
TOP10	Souche utilisée pour les clonages pTOPO	Invitrogen
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>		
<i>K. pneumoniae</i> /pRP4	Souche donneuse, AMX <sup>R</sup>	Collection de laboratoire
<i>K. pneumoniae</i> /pRP4/pDIJ09-518a	<i>K. pneumoniae</i> /pRP4 portant le pDIJ09-518a, souche donneuse, AMX <sup>R</sup> et CIP <sup>R</sup>	Cette étude

Les antibiotiques, pour les sélections génétiques, ont été utilisés aux concentrations suivantes : ampicilline 100 µg/mL, ciprofloxacine 0,06 µg/mL, kanamycine 25 ou 50 µg/mL, streptomycine 50µg/mL et amoxicilline 100 µg/mL. Pour chacune des souches, la concentration minimale inhibitrice (CMI) a été déterminée en duplicats, en utilisant les bandelettes E-test (BioMérieux). Les concentrations sub-inhibitrices ou sub-CMI des agents inducteurs de la réponse SOS sont les suivantes (concentrations finales [µg/mL]) : ciprofloxacine (CIP) 0,06, tobramycine (TOB) 0,001, gentamicine (GM) 0,00125 et Mitomycine C (MMC) 0,1.

**Tableau 4. Plasmides utilisés pour cette étude.**

Nom de plasmide	Caractéristiques	Références/Sources
pDIJ09-518a	CIP <sup>R</sup>	Collection de laboratoire
pDIJ09-518a <i>lexA</i> *	pDIJ09-518a exprimant <i>qnrD</i> constitutivement	Cette étude
pDIJ09-518a $\Delta$ <i>qnrD</i>	pDIJ09-518a délété du gène <i>qnrD</i> , CIP <sup>R</sup>	Cette étude
pDIJ09-518a $\Delta$ ORF3	pDIJ09-518a délété de l'ORF3, CIP <sup>R</sup>	Cette étude
pDIJ09-518a $\Delta$ ORF4	pDIJ09-518a délété de l'ORF4, CIP <sup>R</sup>	Cette étude
pDIJ09-518a $\Delta$ ORF3 $\Delta$ ORF4	pDIJ09-518a délété de l'ORF3 et de l'ORF4, CIP <sup>R</sup>	Cette étude
pØ	pCR2.1®-TOPO® TA, KAN <sup>R</sup>	Thermo Fischer

pORF3	pTOPO::ORF3, KAN <sup>R</sup>	Cette étude
pORF4	pTOPO::ORF4, KAN <sup>R</sup>	Cette étude
pMutT	pTOPO::MutT, KAN <sup>R</sup>	Cette étude
pHmp	pTOPO::Hmp, KAN <sup>R</sup>	Cette étude

## 1.2. Ingénierie de l'ADN et techniques génétiques

### 1.2.1. Extraction et purification de l'ADN

L'ADN génomique a été extrait et purifié en utilisant le kit de purification Qiagen DNeasy (Qiagen). L'extraction des différents ADN plasmidiques (ADNp) a été effectuée en utilisant le kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen). Les extractions sur gel des amplicons et leur purification ont été réalisées à l'aide des kits QIAquick Gel Extraction (Qiagen) et QIAquick PCR Purification (Qiagen). Ces différentes techniques ont été réalisées conformément aux instructions du fournisseur.

### 1.2.2. Amplification génique par PCR

La technique de PCR sur colonie (Polymerase Chain Reaction) a été réalisée dans un premier but de vérification des différentes constructions et modifications géniques. Pour se faire, le mix Go Taq Green Master Mix (Promega) a été utilisé. Le programme utilisé est indiqué dans le Tableau 5, ci-après :

**Tableau 5. Protocole d'utilisation du mix GoTaq Green Master Mix.**

ETAPE	TEMPERATURE	TEMPS
<b>Dénaturation initiale</b>	95°C	2 min
<b>Amplification 30 cycles</b>	95°C	30 s
	55°C	30 s
	72°C	1min/kb
<b>Elongation finale</b>	72°C	5min
<b>Hold</b>	4°C	∞

Les PCR nécessitant de l'ADN Polymérase à haute-fidélité ont été effectuées avec le kit Q5<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLab) comme indiqué par le fournisseur. Le programme utilisé pour cette expérience est le suivant (Tableau 6).

**Tableau 6. Programme d'amplification par PCR, avec l'ADN polymérase haute-fidélité.**

ETAPE	TEMPERATURE	TEMPS
<b>Dénaturation initiale</b>	98°C	30s
<b>Amplification 30 cycles</b>	98°C	10s
	*55°-68°C	30s
	*68°-72°C	30s/kb
<b>Elongation finale</b>	*68°-72°C	2min
<b>Hold</b>	4°C	∞

\*température changeante en fonction des amorces et le but de l'expérience.

L'enzyme de restriction *DpnI* a été utilisée pour digérer tout ADNp parental (New England BioLabs). Cette enzyme de restriction clive seulement l'ADN parental méthylé, sans cliver les amplicons. En effectuant cette étape avant la purification des amplicons et avant toute transformation bactérienne, le taux de transformation de l'ADN parental est très faible. Les produits PCR et les plasmides ont été vérifiés par migration sur gel d'agarose de 1% et 0,8% respectivement. Toute les constructions ont été vérifiées par séquençage Sanger, par la société GENEWIZ Europe (Takeley, England). Les amorces utilisées sont indiquées dans le Tableau 7.

**Tableau 7. Séquences des amorces utilisées dans cette étude.**

NOM	Séquence (5'-3')	Description
TG01	GGA→TGATTTTCGAGGG	Verification <i>qnrD</i> par séquençage
TG02	AGAAAAATTAGCGTAACTAAGATTT GTC	Verification <i>qnrD</i> par séquençage
LC3	ATGACGTGGCGATTCAAAA	Pour amplifier <i>dxs</i> (qRT-PCR)
LC4	AGCCGGTATAGAGCATCTGG	Pour amplifier <i>dxs</i> (qRT-PCR)
AB01	GTTGTCTATCGCGAAGATCAG	Pour amplifier <i>sfiA</i> (qRT-PCR)
AB02	GAGCTGGCTAATCTGCATTAC	Pour amplifier <i>sfiA</i> (qRT-PCR)
AB03	GCACACCAGCTTCCAGATCA	Pour amplifier <i>hmp</i> (qRT-PCR)
AB04	CCTTCCCAACCACGGCTTT	Pour amplifier <i>hmp</i> (qRT-PCR)
AB05	GGTTGTTCAAATTAATGTACAATGAT T	Pour amplifier <i>qnrD</i> et son propre promoteur
AB06	TTTTATCGGTGAACAATAACACCTAA	Pour amplifier <i>qnrD</i> et son propre promoteur
AB07	CAGTTAAGCCGAAGTATTGA	Pour amplifier le plasmide natif en entier
AB08	AATTCCCATCGCCTGATAA	Pour amplifier le plasmide natif en entier
AB09	GCGACGCTTGTTCTGCG	<i>cynX</i> For pour l'insertion du <i>qnrD</i>

AB10	GTACATTAATTTGAACAACCTCTACA T	<i>cynX-qnrD</i> Rev pour l'insertion du <i>qnrD</i>
AB11	GAACTTCCTCGCTGAACTTGTA	<i>qnrD-lacA</i> For pour insertion du <i>qnrD</i>
AB12	GAATCGTCAGTTTAATTATAAAAATT GC	<i>lacA</i> Rev pour l'insertion du <i>qnrD</i>
AB13	GACAACAACCACTCCGGTTC	<i>cynX</i> For pour l'insertion du plasmide
AB14	CGGCTTAACTGTCTACATTAGC	<i>cynX</i> -pDIJ09-518a Rev pour l'insertion du plasmide
AB15	GATGGGAATTTGCTGAACTTG	pDIJ09-518a- <i>lacA</i> For pour l'insertion du plasmide
AB16	GTATGAGTTTAATCACTCGCATC	<i>lacA</i> Rev pour insertion plasmide
AB17	CTTTCAGCGTAGATTTGGG	Vérifier l'insertion du plasmide par séquençage
AB18	GTTCGCACTTTTCTAATATGACT	Vérifier l'insertion du plasmide par séquençage
TG04	AAGTGTCTGAAAACGGGCA	Pour amplifier <i>mutY</i> et son propre promoteur
TG05	TCTTTATCGACTCACGCGCT	Pour amplifier <i>mutY</i> et son propre promoteur
TG06	TGTTGAAGTAAAAGGCGCAGG	Pour amplifier <i>mutT</i> et son propre promoteur
TG07	GGCCATTTTGCTCCAAACGT	Pour amplifier <i>mutT</i> et son propre promoteur
TG08	CATCCGCATCTCCTGACTCA	Pour amplifier <i>hmp</i> et son propre promoteur
TG09	GCGCAAACCGGCAAATCG	Pour amplifier <i>hmp</i> et son propre promoteur
TG10	GTAAAACGACGGCCAGT	Vérifier l'insert clonage pTOPO, séquençage
TG11	CAGGAAACAGCTATGAC	Vérifier l'insert clonage dans pTOPO, séquençage
AB19	GATGCAAGGCGAATTAATTTAGATG	Délétion <i>qnrD</i>
AB20	CTACACCTGGTTATTTATACAGTG	Délétion <i>qnrD</i>
AB21	TACTGTCTCCGTTACACATGATCGG AGGGTGTCTCCGTTAGGTTTAC	Délétion <i>ORF3</i>
AB22	GAGACACCCTCCGATCATGTGTGAA CGGAG	Délétion <i>ORF3</i>
AB23	GGAGCTTGGTAAACCTCATAAA	Pour amplifier <i>ORF3</i> et son propre promoteur
AB24	TAGGTAAACCTAACGTCAGCG	Pour amplifier <i>ORF3</i> et son propre promoteur
AB25	TTGCACCCCATGATACTTTCAGTATC CTTTCAGCGATTTC	Délétion <i>ORF4</i>
AB26	GATACTGAAAGTATCATGGGGTGCA A	Délétion <i>ORF4</i>
AB27	CCCGTTATTGCACCCAATTTA	Pour amplifier <i>ORF4</i> et son propre promoteur
AB28	CTGACAAGTAAAACGATGCGA	Pour amplifier <i>ORF4</i> et son propre promoteur
AB29	TACTGTCTCCGTTACACATGATCGG AGGGTGTCTCCGTTAGGTTTAC	Délétion <i>ORF3</i> et <i>ORF4</i>

AB30	GATACTGAAAGTATCATGGGGTGCA A	Délétion <i>ORF3</i> et <i>ORF4</i>
AB31	ACTGCGTTCGTCTGACCAC	Pour vérifier la présence du pDIJ09-518a
AB32	TGCGGGCTTCTGAGTGCG	Pour vérifier la présence du pDIJ09-518a
AB33	TTATTTTTGCTGCTGCGCGTTC	Pour vérifier la présence du pRP4
AB34	TGGCGACGCGAGAGCAACAA	Pour vérifier la présence du pRP4

### 1.3. Constructions des souches bactériennes

#### 1.3.1. Etape préliminaire : préparation des souches électro-compétentes.

Après mise en culture pendant une nuit, les bouillons ont été dilués 100 fois en milieu LB frais et cultivés jusqu'à l'obtention d'une  $DO_{600nm}$  comprise entre 0,3-0,5. Ensuite, ils ont été centrifugés durant 3 minutes à 13000rpm. Le culot a été lavé à l'eau stérile. Toutes les étapes ont été répétées trois fois et ont été effectuées à température ambiante (328). Après la dernière centrifugation le culot bactérien a été repris dans 200  $\mu$ L d'eau stérile.

#### 1.3.2. Insertion du gène *qnrD* et du plasmide pDIJ09-518a dans le chromosome.

Les insertions dans le chromosome de *E. coli* WT, du gène *qnrD* ainsi que du plasmide natif entier ont été réalisées dans la région intergénique (102pb) des gènes *cynX* et *lacA*. Le principe de la méthode est schématisé dans la Figure 42. Nous avons amplifié trois fragments correspondant au fragment amont *cynX*, *qnrD* avec son propre promoteur ou pDIJ09-518a et au fragment aval *lacA*. Les amorces utilisées sont présentées dans le Tableau 7.

Les trois fragments (amont *cynX*- insert -aval *lacA*) ont été digérés avec l'enzyme *DpnI* et ensuite assemblés en un seul grand fragment avec le kit Gibson Assembly (New England Biolabs), conformément au protocole du fournisseur. La souche *E. coli* WT, précédemment rendue électro-compétente a été transformée avec le fragment ADN assemblé. Les transformants ont été sélectionnés sur géloses contenant de la ciprofloxacine 0,06 $\mu$ g/mL après 24h de culture à 37°C.

L'insertion, dans le chromosome a été vérifiée par PCR sur colonie en utilisant les couples d'amorces *cynX\_F1* et *qnrD\_R* ou pDIJ09-518a \_R. Les produits PCR ont été séquencés en utilisant la paire d'amorces *cynX\_F1/lacA-R2*.

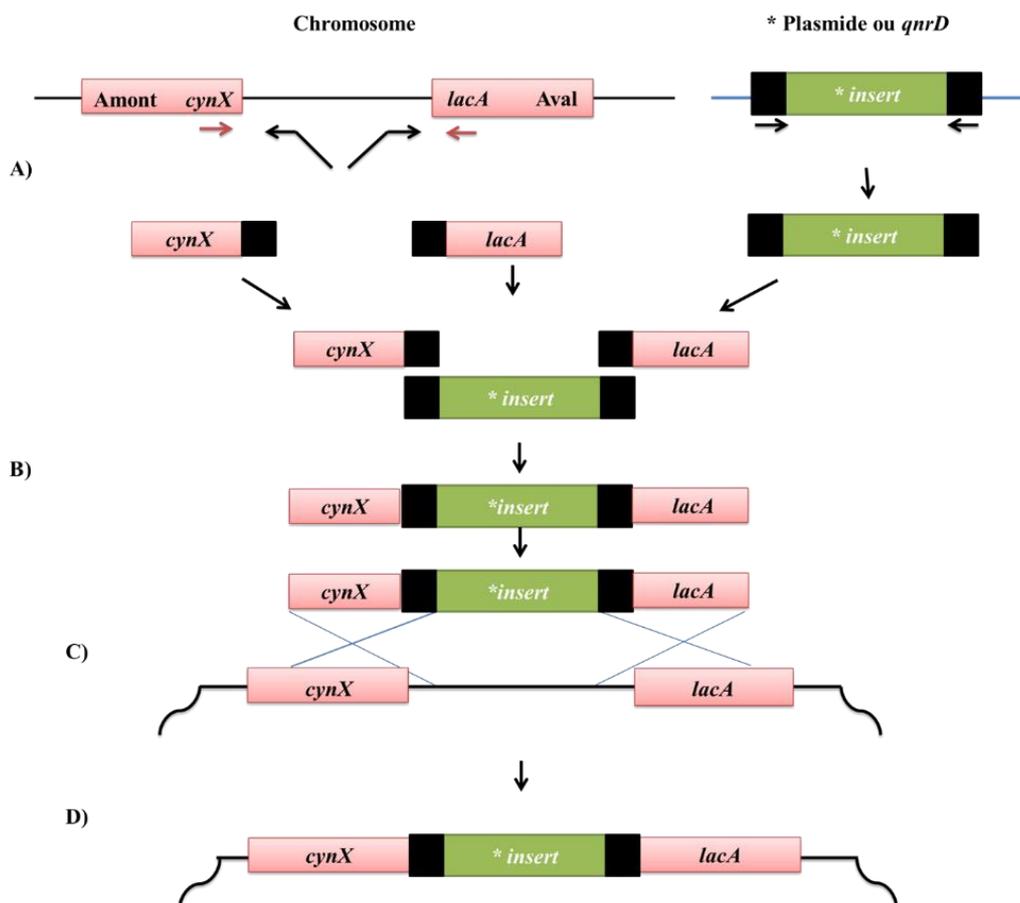
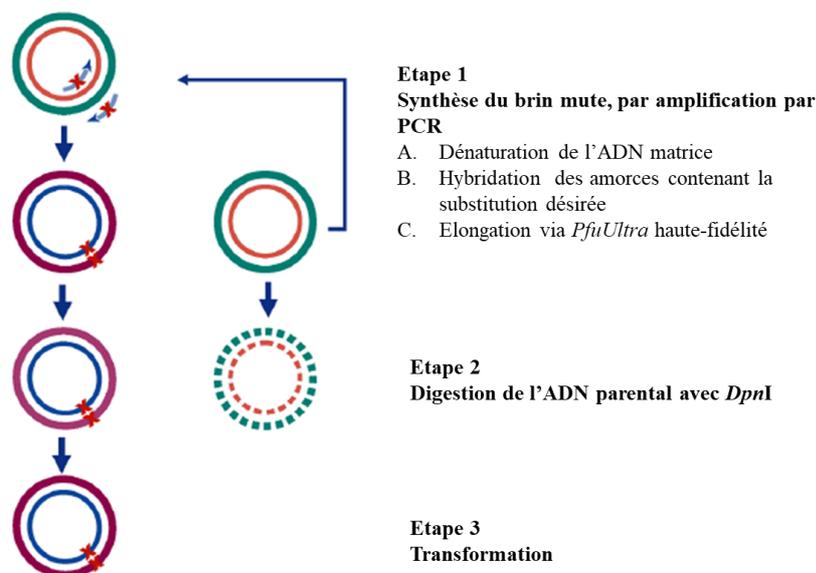


Figure 42. Principe de l'insertion d'un fragment dans le chromosome.

#### 1.4. Constructions des plasmides

**pDIJ09-518a LexA\*** est le plasmide utilisé pour mesurer l'expression constitutive du gène *qnrD* dont la séquence de fixation du répresseur LexA sur la SOS-box a été mutée. Une substitution CGT en AGC a été produite en utilisant le kit Quick Change II Site-Directed Mutagenesis (Agilent). Le principe de l'expérience est schématisé et adapté d'après le protocole du fournisseur (Figure 43 ).



**Figure 43. Principe de la PCR utilisé pour la substitution des nucléotides dans la SOS-box.**

Les primers utilisés contiennent les trois nucléotides à modifier (Tableau 7). La température d'élongation utilisée était de 68°C, pour deux minutes. Cette température permet à l'ADN polymérase d'amplifier sans haute-fidélité et donc permettre la substitution de 3 nucléotides. Dix-huit cycles d'amplification ont été nécessaires pour obtenir une concentration suffisante de matériel génétique modifié. Après digestion avec l'enzyme *DpnI*, le fragment a été transformé chez *E. coli* chimio-compétentes TOP10 (Thermo Fischer). Les transformants ont été sélectionnés sur géloses contenant 0,06µg/mL de ciprofloxacine puis la vérification de la mutagenèse a été effectué par séquençage de Sanger.

**pDIJ09-518a  $\Delta qnrD$**  a été obtenu par amplification génique par PCR d'un fragment amont et aval du gène *qnrD* utilisant le pDIJ09-518a comme ADN matrice et les primers indiqués dans le Tableau 7. La paire d'amorces utilisée a été construite en utilisant l'outil NEBuilder Assembly Tool (New England Biolabs) (Tableau 7). Après la digestion *DpnI* pour éliminer toute trace d'ADN parental, l'amplicon a été électroporé chez *E. coli* ou *E. coli::qnrD* (préalablement rendues électro-compétentes). Les transformants ont été sélectionnés sur géloses sans antibiotiques ou géloses contenant de la ciprofloxacine 0,06µg/mL. Des PCR sur colonies ont été réalisées pour vérifier la transformation et le portage du plasmide en utilisant les amorces indiquées dans le Tableau 7. Le même protocole a été utilisé pour obtenir les mutants pDIJ09-518a $\Delta$ ORF3, - $\Delta$ ORF4 et - $\Delta$ ORF3 $\Delta$ ORF4, en utilisant les amorces décrites dans le Tableau 7.

**pMutY, pMutT, pHmp.** Les gènes *mutY*, *mutT* et *hmp*, contenant leurs propres promoteurs, ont été amplifiés à partir de l'ADNg *E. coli* MG1656 avec les primers Forward/Reverse correspondants indiqués dans le Tableau 7. Les amplicons ont été purifiés et clonés dans le vecteur pCR2.1®, communément appelé pTOPO (ThermoFischer Scientific, France) pour générer les plasmides pMutY, pMutT et pHmp. Les transformants ont été sélectionnés sur géloses contenant de la kanamycine (50µg/mL), conformément aux indications données par le fournisseur.

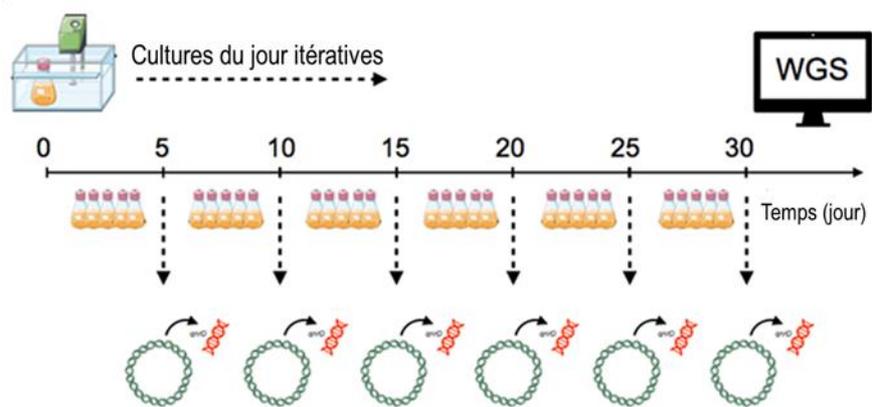
Le même protocole a été utilisé pour la complémentation de l'ORF3 et l'ORF4, pour générer pORF3 et pORF4. Ces ORFs ont été amplifiées à partir du plasmide pDIJ09-518a. La souche *E. coli* TOP10 (Thermo Fischer) a été transformée avec le plasmide vecteur vide afin de réaliser tous les contrôles nécessaires aux expériences.

### **1.5. Courbes de croissance**

Les bouillons de culture d'une nuit ont été dilués 100 fois dans in milieu LB frais. La croissance a été suivie par la mesure de la turbidimétrie (Bioscreen C, LabSystem) à 37°C, pour 24h. La DO<sub>600nm</sub> a été mesurée toutes les 5 minutes avec 10 secondes d'agitation précédant la lecture. Les mesures de DO<sub>600nm</sub>, corrigées avec les valeurs des contrôles négatifs ont été utilisées pour générer les courbes de croissance de chacune des souches étudiées. Trois expériences indépendantes ont été réalisées, pour les deux souches, en triplicats.

### **1.6. Stabilité et dynamique du portage bactérien.**

Les bouillons de culture d'une nuit ont été dilués 100 fois dans in milieu LB frais. La croissance a été suivie durant 30 jours, à 37°C (Figure 44). Chaque jour un aliquots de 100 µl de bouillon de culture d'une nuit, était ajouté à un nouveau milieu LB frais. En parallèle, des dilutions appropriées étaient étalées sur géloses contenant ou non des fluoroquinolones à différentes concentrations. Les antibiotiques utilisés étaient : la ciprofloxacine, la lévofloxacine et l'ofloxacine. Les concentrations d'antibiotique utilisées étaient les suivantes : 0,03, 0,06, 0,125, 0,5, 1, 1,5, 2 et 2,5µg/ml. Trois expériences indépendantes ont été réalisées, pour les deux souches, en triplicats.



**Figure 44. Etude de la stabilité du plasmide et la dynamique du portage.**  
Les souches ont été utilisées pour le séquençage du génome bactérien

### 1.7. Séquençage du génome bactérien.

Pour réaliser le séquençage des génomes bactériens de l'étude, afin d'éliminer tout biais dû aux mutations compensatrices, nous avons réalisé des repiquages quotidiens en milieu liquide des deux bactéries, *E. coli* et *E. coli*/pDIJ09-518a, durant 30 jours. Des aliquots étaient prélevés quotidiennement et étalés sur géloses contenant ou non de la ciprofloxacine à 0,06  $\mu\text{g/mL}$  finale. La Figure 44 schématise l'expérience. Tous les 5 jours des PCR sur colonies étaient réalisées afin de vérifier la présence ou la perte du plasmide.

Le séquençage du génome bactérien a été réalisé par séquençage haut débit. Les bibliothèques génomiques des souches *E. coli* et *E. coli*/pDIJ09-518a ont été réalisées en utilisant le kit Nextera DNA Library Preparation (Illumina, USA), en suivant les instructions du fournisseur. Les deux génomes ont été séquencés sur un MiSeq Sequencer Illumina (Illumina, USA). La qualité des reads a été vérifiée par Tape Station DNA Bioanalyser (Genomics Agilent). L'assemblage *de novo* a été réalisé sur la souche *E. coli* (avant la transformation génétique avec le pDIJ09-518a) et les reads obtenus lors du séquençage de la souche *E. coli*/pDIJ09-518a ont été «mappés» sur un génome de *E. coli* de référence), en utilisant le logiciel CLC Genomics Workbench (Qiagen). Les annotations des deux génomes ont été réalisées sur la plateforme web RAST annotations.

## 1.8. Conjugaison bactérienne

Les bouillons des cultures de nuit, de la souche donneuse *K. pneumoniae* et de la souche receveuse *E. coli* DH10B, ont été dilués 100 fois dans 5 mL de LB. Lorsque la mesure de  $DO_{600nm} = 0,5$  était atteinte, 1 mL du bouillon de culture de la bactérie donneuse a été mélangé avec 1 mL du bouillon de culture de la bactérie receveuse. La conjugaison a été réalisée sur filtre  $0,45\mu m$ , pour 24h à  $37^{\circ}C$ .

Les bactéries présentes sur filtre ont été ensuite re-suspendues dans 5 mL de LB frais, et 500  $\mu L$  de la suspension ont été étalés sur des géloses LB contenant de la streptomycine (50  $\mu g/mL$ ), de la ciprofloxacine (0,06  $\mu g/mL$ ) et l'amoxicilline (100  $\mu g/mL$ ) pour la sélection des deux plasmides (pRP4 et pDIJ09-518a). Les taux de transfert ont été calculés en effectuant le rapport entre le nombre des transconjugants (Unité Formant Colonies: UFC/mL) et le nombre des bactéries donneuses (UFC/mL). Les histogrammes représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes de conjugaisons.

## 1.9. Extraction de l'ARN et qRT-PCR

Des bouillons de cultures d'une nuit ont été dilués 100 fois en milieu LB frais et cultivés à  $37^{\circ}C$ , sous agitation (250rpm), jusqu'à la phase exponentielle ( $DO_{600nm} = 0,5-0,7$ ). Six réplicats biologiques ont été préparés pour chacune des souches étudiées. Ensuite, 1% de la CMI des antibiotiques a été ajoutée au milieu pour une culture d'une durée de 30 min, afin de permettre l'induction de la réponse SOS. Un tube de chaque culture sans antibiotique a été gardé comme contrôle. Un volume de 500  $\mu L$  de bouillon des bactéries, exposées aux antibiotiques, a été traité avec un agent stabilisateur des ARNs du kit RNAprotect Bacteria Reagent (Qiagen).

Le culot bactérien obtenu par centrifugation (6 min à 6000g/min) a été traité avec du lysozyme (Qiagen) et l'extraction des ARN totaux a été réalisée en utilisant le kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). Les éventuelles traces de contamination par l'ADNg ont été éliminées avec la DNase TURBO DNA-free (Ambion, ThermoFisher Scientifics), utilisée à  $37^{\circ}C$  pendant 30 minutes.

La synthèse du premier brin ADNc et la PCR quantitative en temps réel ont été réalisées en utilisant les réactifs KAPA SYBR® FAST (CliniSciences), sur un thermocycleur LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Les primers utilisés sont indiqués dans le Tableau 7. Le nombre de transcrits générés a été normalisé avec le gène *dxs*, utilisé comme gène de référence contrôle.

L'expression de gènes a été déterminée dans le respect des règles MIQE (349). La quantification relative a été calculée soit par rapport à la culture sans antibiotique de la souche étudiée, soit par rapport à la culture de la souche sauvage *E. coli* en LB.

Toutes les expériences ont été réalisées sur 6 réplicats biologiques, tous testés en triplicats techniques. Les valeurs Cq des réplicats techniques, pour chaque expérience biologique, ont permis de calculer le  $\Delta Cq$  moyen. Après une transformation exponentielle de la valeur de  $\Delta Cq$  pour les conditions étudiées et la normalisation, la médiane, le minimum (min) et le maximum (max) ont été calculés, comme décrit précédemment (350, 351).

Nous avons aussi étudié l'expression de l'intégrase *intI*, dans des souches exposées à une concentration sub-CMI de tobramycine comparées avec des souches non traitées avec l'antibiotique. L'expression du gène *intI* et du gène référence *dxs* a été réalisée par un approche de quantification absolue.

### **1.10. Détection de la formation de ROS, en utilisant la dihydrorhodamine 123 (DHR123)**

Après une nuit de culture, les bouillons de *E. coli* et *E. coli*/pDIJ09-518a ont été dilués 100 fois dans du milieu LB frais supplémenté de dihydrorhodamine 123 (DHR123, Sigma) à une concentration finale de  $2,5 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ . A la  $DO_{600\text{nm}}$  de 0,7, des concentrations sub-CMI de ciprofloxacine et de tobramycine ont été ajoutées aux cultures bactériennes, pendant 30 min à 37°C, sous agitation, en gardant des tubes non exposés aux antibiotiques comme contrôles. Des aliquots de 200  $\mu\text{L}$ , ont été déposés dans une plaque noire de 96 puits à fond plat (Corning), en triplicats. La mesure de la fluorescence a été mesurée à 507nm/529nm (bande d'excitation/d'émission) dans un lecteur SAFAS Xenius XC (Safas, Monaco). Les valeurs générées ont été corrigées avec celles des contrôles négatifs (sans réactif DHR123). Les expériences ont été répétées au moins trois fois en triplicats. Le principe de la méthode est schématisé dans la Figure 45.

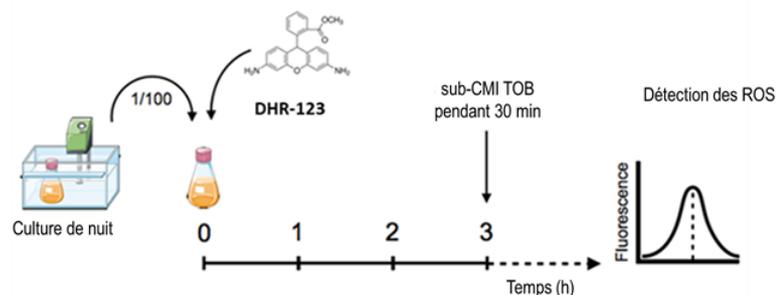


Figure 45. Principe de détection de la production de ROS, par fluorescence.

### 1.11. Détection de la production de monoxyde d'azote (NO) avec la DAF-2 DA

Après une nuit de culture, les bouillons des souches étudiées ont été dilués 100 fois dans du milieu LB frais, supplémenté de 5,6 Diaminofluorescein diacétate (DAF-2 DA, Sigma) à une concentration finale de  $2,24 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ . A la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,7, la tobramycine a été ajoutée aux cultures bactériennes, pendant 30 min à  $37^\circ\text{C}$ , sous agitation, en gardant des tubes non exposés aux antibiotiques comme contrôles. Des aliquots, de  $200 \mu\text{L}$  ont été déposés dans une plaque noire de 96 puits à fond plat (Corning), en triplicats. La mesure de la fluorescence a été mesurée à  $491\text{nm}/513\text{nm}$  (bande d'excitation/d'émission) dans un lecteur SAFAS Xenius XC. Les valeurs générées ont été corrigées avec celles des contrôles négatifs (sans réactif DAF-2 DA). Les expériences ont été répétées au moins trois fois en triplicats. Le principe de la technique est schématisé dans la Figure 46.

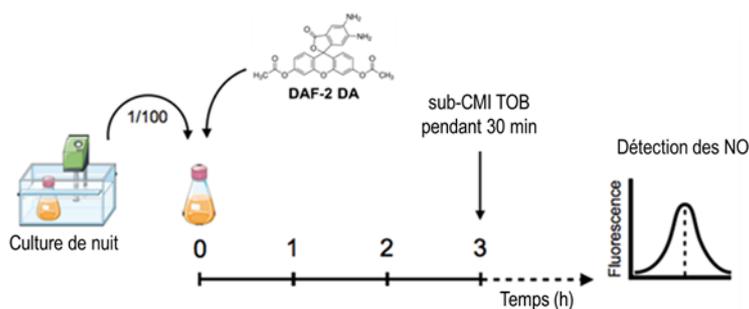


Figure 46. Principe de détection de la production de NO, par fluorescence.

### 1.12. Mesure statique de la formation du biofilm

Des plaques de 48 puits ont été utilisés pour suivre la formation du biofilm comme décrit précédemment (352). Le milieu minimum frais a été inoculé avec une dilution au 100ème du bouillon de culture d'une nuit (effectuée dans un milieu riche LB et contenant l'antibiotique nécessaire au maintien du plasmide). Ensuite les plaques de culture ont été incubées à 37°C pendant 24h sans agitation.

Nous avons récupéré la suspension bactérienne des puits et fait une lecture de  $DO_{600nm}$ , afin de déterminer la culture planctonique de chacune des souches étudiées. Après un rinçage à l'eau stérile de la plaque, 500  $\mu$ L d'une solution de cristal violet 0,1%, a été ajouté à chacun des puits. Les plaques ont été incubées à température ambiante pour 20 min puis rincées.

La formation du biofilm a été mesurée comme suit : le cristal violet a été solubilisé par l'addition de 200  $\mu$ L d'éthanol à 95% et une lecture de  $DO_{595nm}$  a été effectuée. Les résultats sont présentés comme la moyenne des 6 expériences indépendantes en triplicats.

### 1.13. Modèle dynamique de formation de biofilm

Le modèle dynamique de la mesure de la formation du biofilm a été décrit précédemment (352). Des bouillons de culture d'une nuit ont été dilués à une  $DO_{600nm}$  de 0,05. Ensuite, un volume de 400  $\mu$ L de ces cultures a été injecté dans des chambres à flux avec des canaux ayant les dimensions suivantes : 1/4/40mm. Les chambres ont été laissées sans flux pendant 2h. Le milieu minimum a été pompé dans le système à un taux constant de 2mL/h durant 24h à 37°C. Les biofilms ont été marqués en utilisant le kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability (Molecular Probes, Eugene) ou le fluorochrome SYTO-9 seul avant les expériences de microscopie confocale. Un ratio 1:5 a été utilisé entre Syto-9 (fluorescence verte, cellules vivantes) et iodure de propidium (IP) (fluorescence rouge, cellules mortes). La microscopie confocale par scanner (Zeiss LSM 710) et des reconstructions 3D ont été générées, et la surface d'un biofilm en  $\mu$ m<sup>3</sup> a été calculée en utilisant le logiciel Image J (NIH).

### 1.14. Concentration prévenant les mutations (CPM)

Des bouillons de culture d'une nuit de la bactérie multisensible aux antibiotiques *E. coli* ATCC 252992, ainsi que les souches ATCC 252992 portant le petit plasmide, délété du gène *qnrD* ou non, ont été cultivés à 37°C avec agitation en présence ou en absence de tobramycine à 1% de la CMI.

Des aliquots de 100  $\mu$ L, contenant  $10^{10}$  UFC/mL (estimées par une mesure de la  $DO_{600nm}$ ), ont été étalés sur des géloses contenant différentes concentrations de fluoroquinolones (ciprofloxacine, lévofloxacine et ofloxacine) et des géloses contrôles sans antibiotique. Les colonies viables ont été comptées après 72h d'incubation à 37°C. Les concentrations prévenant les mutations ont été réalisées en trois expériences indépendantes et les courbes de survie ont été générées comme  $\log_{10}$  UFC/mL viables comptées, en fonction de la concentration d'antibiotique utilisée.

### 1.15. Analyse bioinformatique et statistique

La prévalence des petits plasmides *qnrD* chez les *Enterobacteriaceae* a été étudiée à l'aide de la base de données National Centre for Biotechnology Information (NCBI). Les petits plasmides *qnrD* ont été classés, d'une part, en trois groupes selon le type de bactéries dans lesquels ils avaient été décrits (*Proteaeae*, *E. coli* et autres *Enterobacteriaceae*), et d'autre part, en deux classes selon leurs tailles (pDIJ09-581a-like, 2,6 Kb ou p2007057-like, 4,2 Kb).

Pour constituer le logo des 16 nt, correspondant à la séquence consensus de la SOS-box présente dans les plasmides portant le *qnrD*, nous avons utilisé la plateforme WebLogo <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi> (353).

Pour les expériences de quantification relative de l'expression d'un gène, un test Wilcoxon à deux groupes appariés a été utilisé pour l'analyse des deux pools de valeurs de  $\Delta Cq$  ou le nombre de copies pour chaque comparaison (350) \* $p < 0,05$ .

Pour la mesure de la formation intracellulaire de ROS et NO, les données générées par la mesure de la fluorescence ont été analysées en utilisant une méthode ANOVA à deux facteurs (avec des tests de comparaison multiple de Tukey's et Kruskal-Wallis, respectivement). Tous ces tests ont été réalisés avec le logiciel GraphPad Prism version 6. Les valeurs ayant des corrélations significatives sont données avec le degré de significativité indiqué (\*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSIONS

### 2.1. La régulation du gène *qnrD* par les aminosides chez *E. coli*

#### 2.1.1. L'expression du gène *qnrD* est régulée par la réponse SOS chez *E. coli*/pDIJ09-518a

Da Re et collaborateurs ont démontré pour la première fois, en 2009, la régulation du gène *qnrB* (108) par la réponse SOS. Récemment, l'implication de la réponse SOS dans la régulation du gène *qnrD* a été partiellement mise en évidence. En effet, dans cette étude, aucune démonstration du rôle du répresseur LexA n'a été mise en évidence (111).

La carte du plasmide pDIJ09-518a est représentée dans la Figure 47.

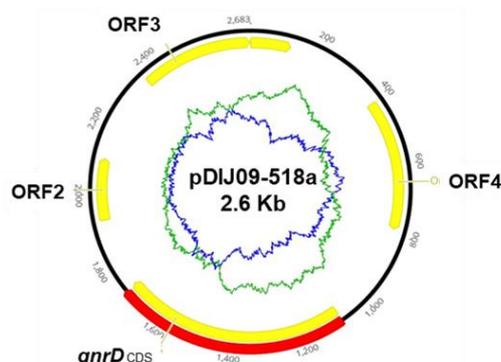
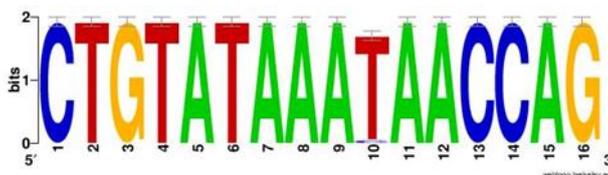


Figure 47. Carte du plasmide pDIJ09-518a

Une analyse *in silico* a montré que dans la région régulatrice du gène *qnrD* porté par le pDIJ09-518a une LexA ou SOS-box putative était présente : 5' CTGTATAAATAACCAG 3'. Afin de pouvoir étudier la régulation du gène *qnrD* dans notre plasmide d'étude, nous avons tout d'abord effectué un alignement multiple des SOS-box putatives de tous les plasmides *qnrD* entièrement séquencés et dont les séquences étaient disponibles dans la base de données GenBank. Nous avons ainsi généré la séquence consensus de la SOS-box de *qnrD* (329). La représentation graphique de cette séquence consensus est indiquée sur la Figure 48 et montre une séquence très conservée parmi ces petits plasmides *qnrD*.



**Figure 48. Séquence SOS-box des plasmides porteurs du gène *qnrD***

L'alignement des séquences et logo ont été effectués sur la plateforme <http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>

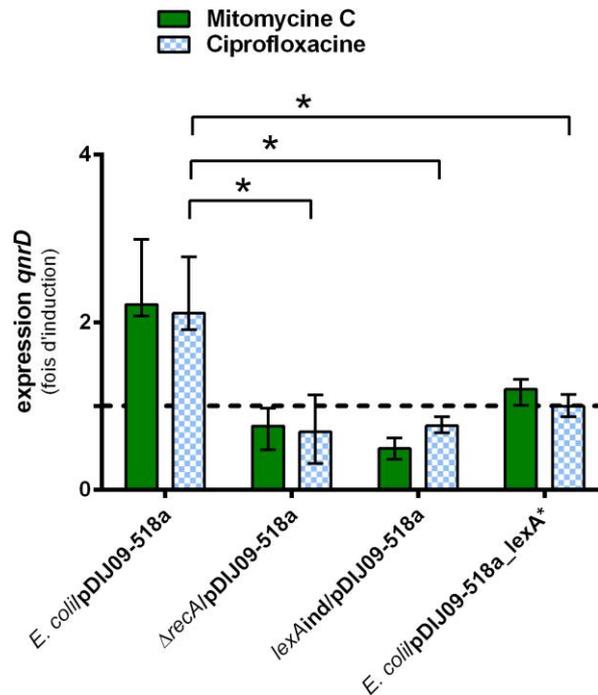
Afin de démontrer la fonctionnalité de cette SOS-box putative et la dépendance RecA-LexA de la réponse SOS, nous avons quantifié l'expression relative du gène *qnrD*, porté par le plasmide natif pDIJ09-518a, après traitement avec la ciprofloxacine, à des concentrations sub-inhibitrices et à la mitomycine C, utilisée comme témoin positif d'induction de la réponse SOS (330). Le Tableau 8 présente les CMI des antibiotiques utilisés pour cette étude.

**Tableau 8. Concentrations minimales inhibitrices des inducteurs de la réponse SOS.**

Nom de la souche	Tobramycine ( $\mu\text{g/mL}$ )	Gentamycine ( $\mu\text{g/mL}$ )	Ciprofloxacine ( $\mu\text{g/mL}$ )
<i>E. coli</i>	0.125	0.125	0.004
<i>E. coli/pDIJ09-518a</i>	0.125	0.125	0.047

Comme attendu, chez *E. coli/pDIJ09-518a*, la mitomycine C et la ciprofloxacine, induisent l'expression du gène *qnrD*, avec une augmentation d'un rapport de l'ordre de 2 par rapport à la souche non traitée (Figure 49).

Pour confirmer le rôle de la réponse SOS, dans la régulation du gène *qnrD*, nous avons quantifié son expression dans des souches isogéniques où le système SOS est bloqué, soit par la délétion de son activateur (RecA), soit par une modification dans la séquence de liaison à l'ADN de son répresseur (LexA, non-clivable). Dans ces deux souches, où l'induction de la réponse SOS est bloquée, l'expression du gène *qnrD* n'était pas augmentée par l'action des agents génotoxiques comparée à celle observée en milieu LB non traité (Figure 49  $\Delta recA$  et *lexA*ind).



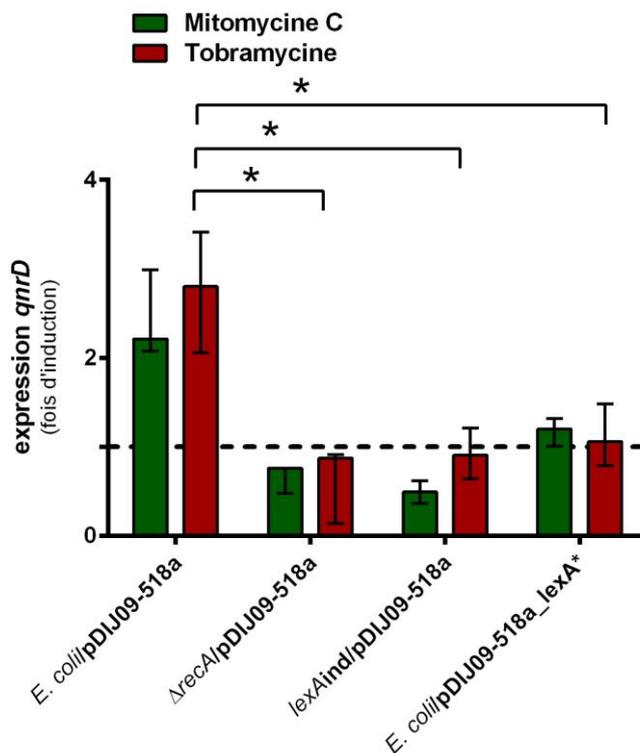
**Figure 49. Contrôle de la régulation du gène *qnrD* par la réponse SOS sous la dépendance de *RecA* et *LexA*, chez *E. coli***

La quantification relative du niveau d'expression du gène *qnrD* a été réalisée après exposition pendant 30 minutes à des concentrations sub-CMI des antibiotiques. L'expression relative a été calculée avec la méthode  $2^{-\Delta\Delta Cq}$ , avec le gène *qnrD* comme gène cible et le gène *dxs* comme gène de référence. Les histogrammes représentent la médiane de 6 expériences indépendantes, réalisées en triplicats techniques, après exposition à la mitomycine C (vert) et à la ciprofloxacine (bleu) par rapport à l'expression en LB (trait pointillé au niveau 1). Les barres d'erreurs représentent les valeurs les plus hautes et les plus basses. Les résultats ont été analysés statistiquement par le test de rang bilatéral de Wilcoxon. \* $P < 0.05$ .

Pour appuyer nos résultats, nous avons substitué trois nucléotides dans la SOS-box du gène *qnrD* porté par le plasmide natif (108) : CTG  $\rightarrow$  AGC (WT/pDIJ09-518a\_lexA\*). En modifiant cette séquence dans la SOS-box, nous avons observé un niveau d'expression constitutif du gène *qnrD* avec une augmentation du niveau d'expression du gène *qnrD* d'un rapport 2 entre la souche exposée à un agent inducteur du SOS et la souche non exposée.

### 2.1.2. Les aminosides induisent la réponse SOS chez *E. coli* portant le petit plasmide *qnrD*

Contrairement à ce qui est observé chez *Vibrio cholerae* (173, 180, 193), les sub-CMI d'aminosides n'induisent pas la réponse SOS chez *E. coli*. Nous avons donc décidé d'utiliser cette famille d'antibiotique comme un contrôle négatif de l'induction de la réponse SOS pour nos expériences de quantification relative. De manière inattendue, nous avons observé que le niveau d'expression du gène *qnrD* était augmenté d'un facteur de l'ordre de 2,8 fois, après exposition à la tobramycine (Figure 50) de *E. coli* portant le petit plasmide *qnrD* par rapport à celui mesuré dans un milieu sans antibiotique.



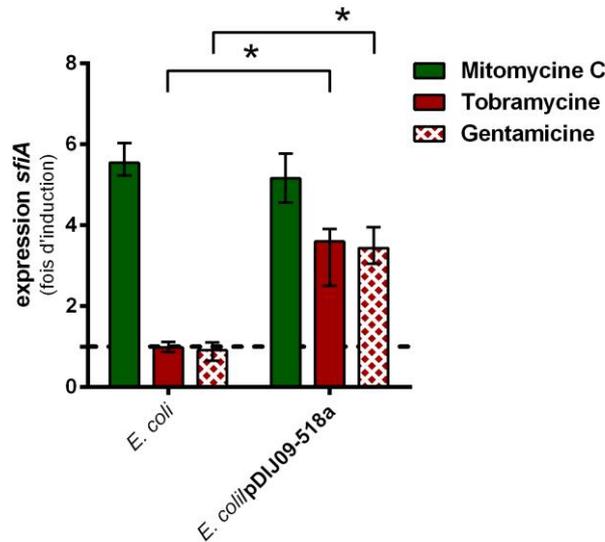
**Figure 50. L'expression du gène *qnrD* est augmentée après exposition à la tobramycine**

La quantification relative du niveau d'expression du gène *qnrD* a été réalisée après exposition pendant 30 minutes à des concentrations sub-CMI d'antibiotiques. Les histogrammes représentent la médiane de 6 expériences indépendantes (chacune en triplicats techniques) du rapport d'augmentation de l'expression du gène *qnrD*, après exposition à la mitomycine C (vert, contrôle positif) ou à la tobramycine (rouge) par rapport à son niveau d'expression en LB (trait pointillé au niveau 1). Le gène *dxs* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation. Les barres d'erreurs représentent la valeur la plus haute et la plus basse obtenue. \* $P < 0.05$ , test de rang bilatéral de Wilcoxon.

Pour confirmer l'augmentation de l'expression du gène *qnrD* dans l'espèce *E. coli* exposée à la tobramycine, nous avons mesuré l'expression du gène *qnrD* pour les souches isogéniques ayant un système SOS bloqué (Figure 50,  $\Delta recA$  and *lexAind*), et pour la souche dont la SOS-box de *qnrD* avait été modifiée (Figure 50, *pDIJ09-518a\_lexA\**). Les résultats obtenus étaient comparables à ceux obtenus après traitement avec la ciprofloxacine (Figure 49, bleu).

Nous avons ensuite quantifié le niveau d'expression du gène *sfiA*, un gène bien décrit du régulon SOS (331) afin de vérifier si l'expression de *qnrD* après exposition aux aminosides était liée à l'induction de la réponse SOS.

Comme montré dans la Figure 51, nous avons observé que les aminosides (tobramycine et gentamicine) n'avaient pas d'effet sur l'expression du gène *sfiA* chez *E. coli* sauvage. En revanche, nos expériences ont confirmé que l'expression de *sfiA* était augmentée d'un rapport de 3,60 et 3,43 dans la souche *E. coli/pDIJ09-518a* exposée à de la tobramycine et à la gentamicine, respectivement.

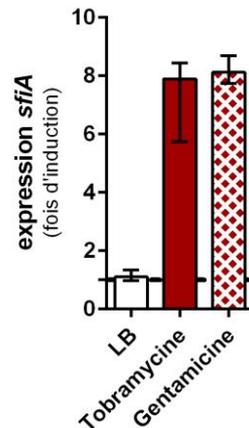


**Figure 51. Induction de la réponse SOS par les aminosides chez *E. coli* portant le plasmide *qnrD***

La quantification relative du niveau d'expression du gène *sfiA* a été réalisée après traitement par les aminosides. Les histogrammes représentent la médiane d'augmentation du rapport d'expression du gène *sfiA* après exposition à la mitomycine C (vert, contrôle positif), tobramycine (rouge) et gentamicine (rouge et blanc) relativement au LB (trait pointillé au niveau 1). Le gène *dxs* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation. Six réplicats biologiques ont été testés (chacun en triplicats). Les barres des erreurs représentent la valeur la plus haute et la plus basse quantifiée. \* $P < 0.05$ , test de rang bilatéral de Wilcoxon.

Afin d'éviter tout biais pouvant mener à une mauvaise interprétation de cette induction de la réponse SOS par les concentrations sub-inhibitrices d'aminosides chez *E. coli*-pDIJ09-518a, nous avons confirmé que le portage de plasmide n'induisait pas en lui-même la réponse SOS (332) (Figure 52). Nous avons également calculé le nombre de copies de plasmide pDIJ09-518a chez *E. coli*. Le nombre de copies de pDIJ09-518a obtenu était de 55 plasmides/bactérie, correspondant à un bas nombre de copies.

Ainsi, nous avons comparé le niveau d'expression du gène *sfiA* mesuré pour la souche portant le plasmide *qnrD* à celui mesuré pour la souche sauvage, dans les différentes conditions. Nos résultats montrent que le plasmide ne favorise pas la régulation du gène *sfiA* en LB comparé à la souche sauvage, tandis qu'en présence de sub-CMI de tobramycine et de gentamicine, une augmentation de 7,89 et de 8,12 est observée.



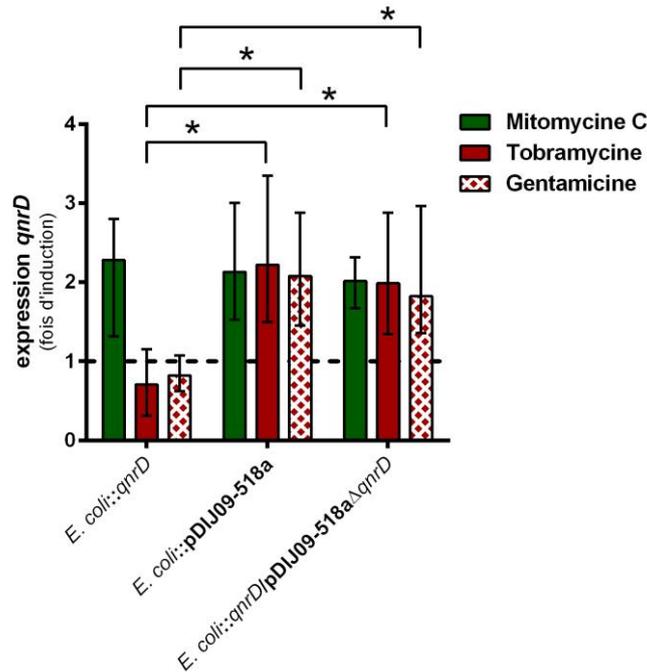
**Figure 52. Le portage du plasmide permet l'induction de la réponse SOS en présence des aminosides**  
 La quantification relative du niveau d'expression du gène *sfiA* a été réalisée après traitement par les aminosides. Les histogrammes représentent la médiane du rapport d'augmentation d'expression du gène *sfiA* en présence ou en absence de tobramycine (rouge) et de gentamicine (rouge et blanc) chez *E. coli* portant le plasmide, en comparaison à la souche sauvage (WT; trait pointillé au niveau 1). Six réplicats biologiques, chacun évalué en triplicats techniques dans chaque PCR ont été réalisés. Le gène *dxs* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation.

## 2.2. Mécanisme moléculaire à l'origine de l'induction de la réponse SOS par les aminosides chez *E. coli* portant le petit plasmide *qnrD*

### 2.2.1. Le rôle du squelette plasmidique dans l'induction de la réponse SOS, par les sub-CMI d'aminosides chez *E. coli qnrD*

Pour établir le rôle du plasmide pDIJ09-518a dans l'induction de la réponse SOS après traitement par les concentrations sub-inhibitrices d'aminosides, nous avons étudié la régulation du gène *qnrD* par la réponse SOS, dans des souches isogéniques portant ou pas ce plasmide dans leur chromosome.

Premièrement, nous avons inséré le seul gène *qnrD* et son promoteur dans le chromosome de *E. coli* sauvage (*E. coli::qnrD*). Deuxièmement, nous avons inséré dans le chromosome de *E. coli* la totalité du plasmide natif (*E. coli::pDIJ09-518a*) (Figure 53).



**Figure 53. Le portage du petit plasmide *qnrD* permet l'induction de la réponse SOS en présence d'aminosides.** La quantification relative du niveau d'expression du gène *qnrD* a été réalisée après traitement par les aminosides, comme précédemment décrit. Les histogrammes représentent la médiane du rapport d'augmentation d'expression du gène *qnrD*, en présence de mitomycine C (vert, contrôle positif), de tobramycine (rouge) et de gentamicine (rouge et blanc) chez *E. coli* portant le plasmide, en comparaison à l'expression en LB (trait pointillé au niveau 1). Six réplicats biologiques, chacun évalué en triplicats technique dans chaque PCR ont été réalisés. Le gène *dxs*, a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation. Les barres d'erreur représentent la valeur la plus haute et la plus basse quantifiée. \* $P < 0.05$ , test de rang bilatéral de Wilcoxon.

Comme indiqué dans la Figure 53, nous avons montré que pour les deux souches, l'expression du gène *qnrD* était augmentée (2,27 et 2,13 fois plus ; \* $P < 0.05$ ) en réponse au traitement à la mitomycine C, confirmant ainsi que ni l'insertion du gène *qnrD*, ni l'insertion du plasmide, n'empêchaient l'induction de la réponse SOS.

Nous avons ensuite quantifié l'expression du gène *qnrD* en présence des concentrations sub-CMI de tobramycine et de gentamicine. Nous n'avons pas observé de changement d'expression du gène *qnrD* pour la souche *E. coli::qnrD* exposée aux aminosides.

En revanche, le niveau d'expression du gène *qnrD* était augmenté (2,22 et 2,08 fois plus, \* $P < 0.05$ ) pour la souche avec la totalité du plasmide inséré dans le chromosome, après exposition aux aminosides (*E. coli::pDIJ09-518a*).

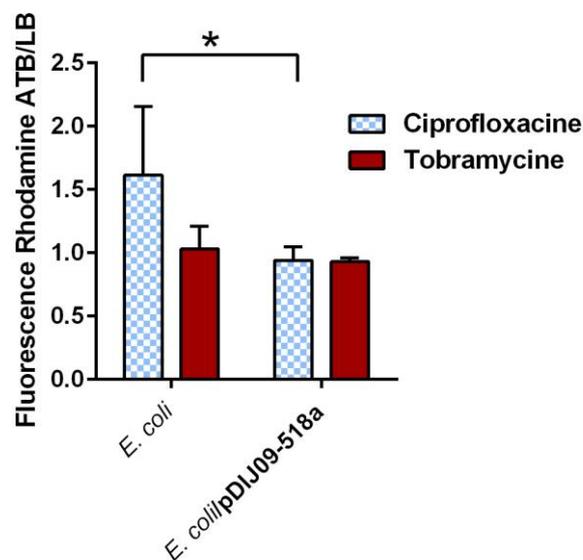
Pour démontrer le rôle du squelette plasmidique dans l'induction de la réponse SOS, par les aminosides, chez *E. coli*, nous avons quantifié l'expression de *qnrD* dans une souche *E. coli::qnrD* complétée avec le plasmide pDIJ09-518a, dans lequel le gène *qnrD* avait été préalablement délété (*E. coli::qnrD/pDIJ09-518aΔqnrD*).

En présence de concentrations sub-CMI d'aminosides (tobramycine et gentamicine), les niveaux d'expression mesurés étaient similaires à ceux observés pour la souche *E. coli*::pDIJ09-518a.

L'ensemble de ces résultats confirme que le squelette plasmidique de pDIJ09-518a est suffisant pour induire l'activation de la réponse SOS et l'augmentation de l'expression du gène *qnrD* chez *E. coli* après exposition aux aminosides.

### 2.2.2. Le portage du plasmide et la tobramycine n'induisent pas le stress oxydatif

Chez *E. coli*, l'exposition aux sub-CMI d'aminosides ne favorise pas la formation des ROS grâce à l'efficacité du système de lutte contre le stress oxydatif dépendant de RpoS (180). Toutefois, comme la formation et accumulation des ROS peuvent favoriser l'induction de la réponse SOS (107), nous avons déterminé l'effet du portage du pDIJ09-518a dans la formation des radicaux libres sur une souche de *E. coli* exposée à des concentrations faibles de différents antibiotiques. La Figure 54 représente la fluorescence mesurée comme témoin de la production des ROS suite à l'exposition à des concentrations sub-inhibitrices des antibiotiques indiqués.



**Figure 54. Le plasmide-*qnrD* et la sub-CMI de tobramycine ne favorise pas le stress oxydatif**

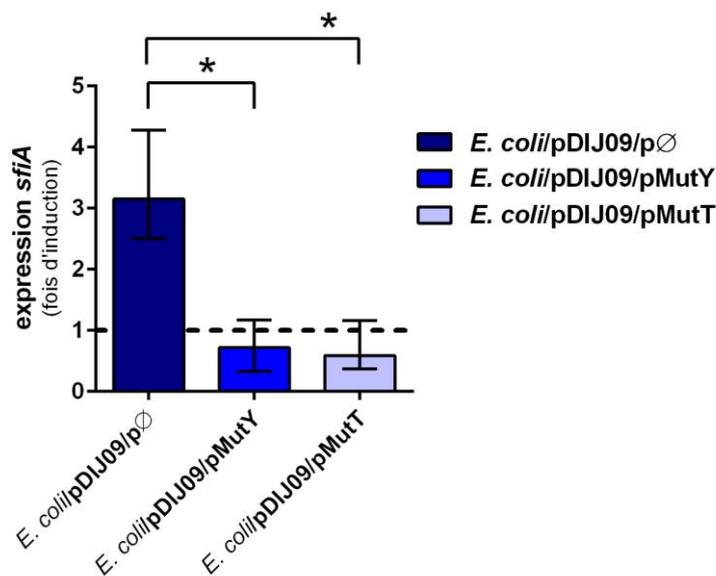
La production des espèces réactive d'oxygène a été calculée comme ratio entre la fluorescence induite par la rhodamine 123 des cultures traitées avec les antibiotiques à des faibles doses (ciprofloxacin, en bleu et tobramycine, rouge) par rapport aux cultures non traitées. Six réplicats biologiques, chacun évalué en triplicats techniques dans chaque expérience, ont été réalisés. Les données ont été analysées par ANOVA à deux facteurs. \* $P < 0.05$  avec un test de Tukey's utilisé pour la comparaison multiple. La différence de moyenne pour *E. coli* comparée à *E. coli*/pDIJ09-518a exposée à la ciprofloxacin était de 0,6753, IC 95% de la différence [0,07565, 1,294]. Les barres d'erreur représentent l'écart type.

Nos résultats montrent l'absence d'augmentation de la production de ROS chez la souche sauvage et la souche portant le plasmide, en présence de concentration sub-inhibitrices de tobramycine, comparativement aux mêmes souches non exposées à l'antibiotique (ratio <1, histogrammes rouges). La ciprofloxacine est utilisée pour cette expérience comme inducteur connu des ROS chez *E. coli* (194). Nos résultats confirment les données déjà décrites dans la littérature.

Ces résultats nous ont permis de conclure que les dommages à l'ADN nécessaires à l'induction de la réponse SOS dans la souche *E. coli*/pDIJ09-518a exposée à la tobramycine ne sont pas une conséquence de la formation ou de l'accumulation des ROS dans la bactérie.

### **2.2.3. La voie de réparation BER est impliquée dans l'induction de la réponse SOS par les aminosides, chez *E. coli* portant le petit plasmide *qnrD***

Les concentrations sub-inhibitrices d'aminosides peuvent favoriser l'incorporation de 8-oxo-G dans l'ADN (173, 180) donnant lieu à des mésappariements A/G durant la réplication. Chez *E. coli*, la voie de réparation BER impliquant les protéines MutT et MutY répare ces lésions à l'ADN (173, 188, 333). Nous avons donc fait l'hypothèse que l'induction de la réponse SOS par les aminosides pouvait être la conséquence d'une réparation inefficace de ces mésappariements par la voie BER. Pour répondre à cette question, nous avons mesuré l'induction de la réponse SOS chez *E. coli*/pDIJ09-518a avec ou sans surexpression des protéines MutT et MutY (Figure 55).



**Figure 55. Les aminosides induisent la réponse SOS chez *E. coli/pDIJ09-518a* due à l'accumulation de 8-oxo-G.** La quantification relative du niveau d'expression du gène *sfIA* a été réalisée après traitement avec des sub-CMI de tobramycine, chez *E. coli/pDIJ09-518a* surexprimant la voie BER. Les histogrammes représentent la médiane de changement d'expression du gène *sfIA* de 6 expériences indépendantes (en triplicats techniques), en présence de tobramycine (1% de la CMI) comparativement à l'expression en LB (trait pointillé au niveau 1). Le gène *dxs* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation; \* $P < 0.05$ , test de rang bilatéral de Wilcoxon. Les barres d'erreur correspondent aux valeurs les plus hautes et les plus basses.

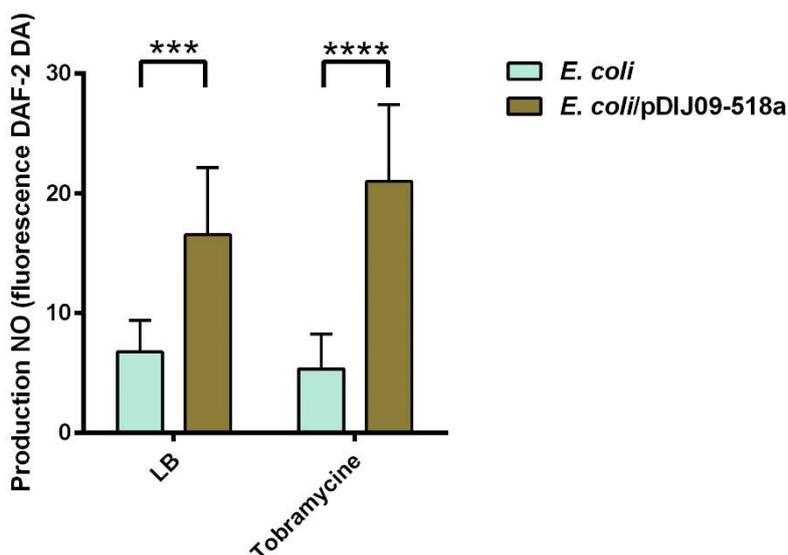
Comme présenté dans la Figure 55, la réponse SOS est induite (augmentation de l'expression de *sfIA* de 3,15 fois ; \* $P < 0.05$ ) en présence de tobramycine chez *E. coli/pDIJ09-518a* portant le vecteur vide.

En revanche, le niveau d'expression du gène *sfIA* n'est pas augmenté, et donc la réponse SOS n'est pas induite chez *E. coli/pDIJ09-518a* surexprimant MutY et MutT (augmentation d'un facteur de 0,71, et 0,59 respectivement; \* $P < 0.05$ ).

Ces résultats montrent que la voie de réparation BER ne peut faire face à l'accumulation des mésappariements dus à l'effet de la tobramycine sur *E. coli* portant le plasmide *qnrD*.

#### 2.2.4. Le petit plasmide *qnrD* favorise le stress nitrosatif chez *E. coli*

Le NO et les RNS peuvent donner lieu à des mésappariements suite à la formation de 8-oxo-G et 8-nitro-G(291). Nous avons déterminé si la production intracellulaire de NO était augmentée chez *E. coli*. Nous avons observé que la production de NO était augmentée, de manière significative, pour les souches portant le plasmide *qnrD* exposées ou non à des concentrations sub-inhibitrices de tobramycine (Figure 56).



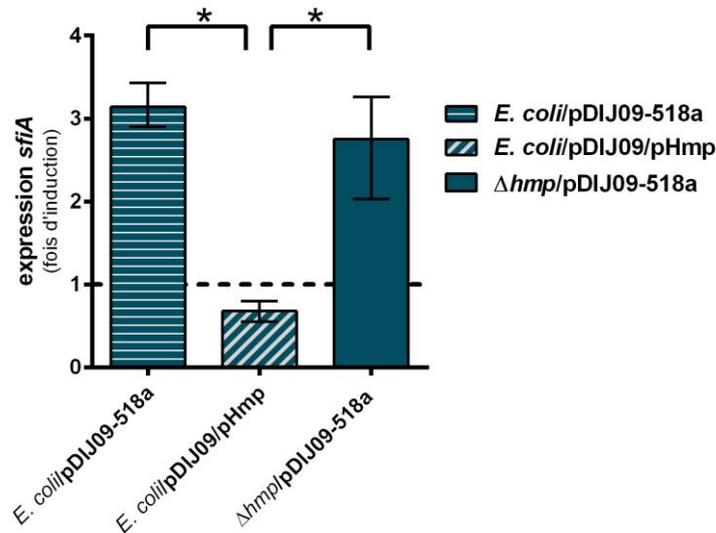
**Figure 56. Le petit plasmide *qnrD* favorise le stress nitrosatif chez *E. coli***

La production NO a été mesurée à l'aide d'un agent fluorescent ajouté aux cultures bactériennes traitées ou pas avec de la tobramycine à faible dose (0,001 µg/ml). Les histogrammes représentent la moyenne de la fluorescence DAF-2A mesurée pour 9 expériences indépendantes (à chaque fois en triplicats techniques). Les données ont été analysées en utilisant un test ANOVA à deux facteurs, avec une comparaison multiple par un test de Tukey's. \*\*\* $p < 0.001$  ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ . La différence des moyennes entre *E. coli* comparée à *E. coli/pDIJ09-518a* en LB était de -9,790, IC 95% de la différence de [-15,75 ; -3,825], tandis qu'en présence de tobramycine la différence était de -15,66, IC 95% [-21,62 ; -9,695]. Les barres d'erreur représentent les écarts type.

### 2.2.5. L'induction de la réponse SOS par les aminosides chez *E. coli* portant le plasmide *qnrD* est la conséquence de l'inefficacité de la voie de détoxification du NO dépendante de Hmp

Chez *E. coli*, la flavohaemoprotéine Hmp est l'acteur clé de la voie de détoxification du NO en conditions d'aérobiose (307). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que l'induction de la réponse SOS pouvait résulter d'une accumulation du NO consécutive à l'accumulation des lésions à l'ADN de type 8-oxo-G et 8-nitro-G à cause de l'inefficacité de la voie de détoxification dépendante de Hmp.

Pour confirmer notre hypothèse, nous avons mesuré l'impact de la surexpression de la protéine Hmp chez *E. coli/pDIJ09-518a* exposée des concentrations sub-inhibitrices de tobramycine. L'expression du gène *sfIA* était augmentée d'un facteur 3,14 (\* $P < 0.05$ ) pour la souche *E. coli/pDIJ09-518a* exposée à la tobramycine comparée à l'absence d'exposition à l'antibiotique (Figure 57).



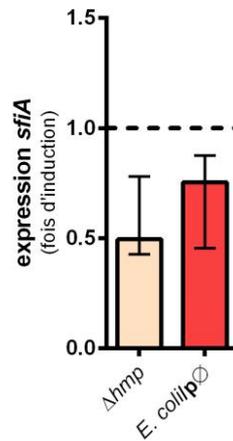
**Figure 57. La réponse SOS chez *E. coli*/pDIJ09-518a est induite par les aminosides due à l'inactivation de la voie de détoxification du NO dépendante de Hmp.**

La quantification relative du niveau d'expression du gène *sfIA* a été réalisée après traitement par des sub-CMI de tobramycine chez *E. coli*/pDIJ09-518a surexprimant la protéine Hmp ou chez le mutant *hmp* portant le plasmide *qnrD*. Les histogrammes représentent le changement d'expression du gène *sfIA* en présence de tobramycine (1% de la CMI) comparé à l'expression en LB (trait pointillé au niveau 1). Le gène *dxs* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation. Les histogrammes représentent la médiane de 6 expériences indépendantes (à chaque fois en triplicats techniques) et les barres d'erreur correspondent aux valeurs les plus hautes et les plus basses.  $P < 0.05$ , test de rang bilatéral de Wilcoxon.

A l'opposé, en cas de surexpression de *hmp* chez *E. coli*/pDIJ09-518a, l'expression du gène *sfIA* n'était pas augmentée en cas d'exposition à la tobramycine (facteur de 0,85;  $P < 0.05$ ) (Figure 57).

Pour confirmer nos résultats, nous avons quantifié l'expression relative du gène *sfIA* chez une souche isogénique d'*E. coli* portant le plasmide *qnrD*, mais où le gène *hmp* avait été délété auparavant. Dans cette souche incapable de détoxifier le NO produit par le portage de plasmide, le niveau d'expression du gène *sfIA* était augmenté (2,66 fois de plus) après exposition à la tobramycine (Figure 57,  $\Delta$ *hmp*/pDIJ09-518a).

Par ailleurs, nous avons aussi confirmé que ni la délétion du gène *hmp*, ni le portage du vecteur vide, utilisé pour la surexpression de la protéine Hmp, n'avaient d'effet sur l'expression du gène *sfIA* (Figure 58).



**Figure 58. La délétion du gène Hmp n'active pas la réponse SOS chez *E. coli***

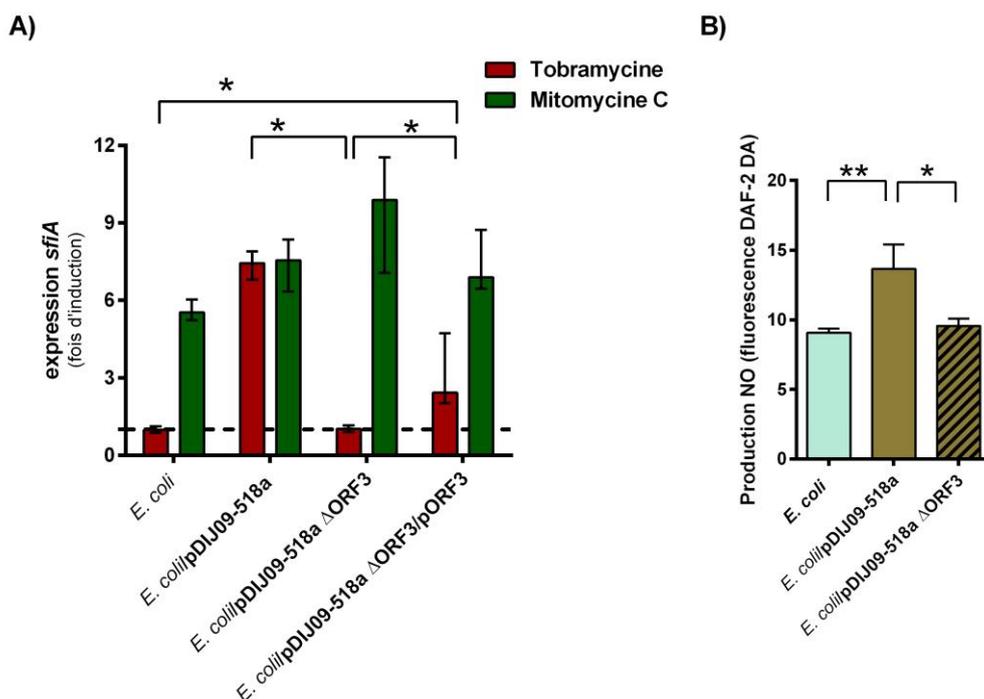
La quantification relative du niveau d'expression du gène *sfIA* a été réalisée chez le mutant *hmp* et chez *E. coli*, portant le vecteur vide. Les histogrammes représentent le changement d'expression du gène *sfIA* en LB, comparativement au niveau d'expression mesuré dans la souche sauvage (trait pointillé au niveau 1). Le gène *dxs* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation.

### 2.2.6. L'ORF3 code une FAD-binding oxydoréductase et favorise la production de NO

Nous avons essayé d'établir quel cadre de lecture ouvert, (ORF, Open ReadinG Frame), présent sur pDIJ09-518a, favorisait la production de NO et induisait la réponse SOS chez *E. coli* exposé aux aminosides.

En utilisant une analyse *in silico* par pBLAST/phiBLAST, nous avons déterminé que l'ORF3 codait une protéine avec de fortes homologues avec une FAD-binding oxydoréductase ayant un domaine Rossmann-fold NAD(P) (36% de couverture sur 43% d'identité avec la protéine FAD-binding oxydoréductase, chez *Erythrobacter sp.*).

Pour caractériser le rôle de la protéine codée par ORF3, nous avons délété l'ORF3 de pDIJ09-518a et testé l'induction de la réponse SOS chez *E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF3 après traitement à 1% de la CMI de tobramycine. Comme déjà retrouvé auparavant, l'expression du gène *sfIA*, était augmentée dans une souche *E. coli*/pDIJ09-518a exposée à la tobramycine (Figure 59A).



**Figure 59. L'ORF3 favorise la production de NO permettant l'induction de la SOS par la tobramycine**

A) La quantification relative du niveau d'expression du gène *sfiA* a été réalisée après traitement à des sub-CMI de tobramycine chez *E. coli* portant ou pas pDIJ09-518a, ou le mutant ORF3. Les histogrammes représentent la médiane de changement d'expression du gène *sfiA*, en présence de tobramycine (1% de la CMI) ou de mitomycine C, en comparaison au niveau d'expression mesuré en LB (trait pointillé au niveau 1). Le gène *dxs* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation. N=6 en triplicats techniques; \*P<0.05, test de rang bilatéral de Wilcoxon. Les barres d'erreur représentent la valeur la plus haute et la plus basse. B) La production de NO a été mesurée avec l'agent DAF-2 DA ajouté aux cultures bactériennes en LB. Les barres représentent les moyennes des 6 expériences indépendantes (à chaque fois en triplicats techniques) avec les barres d'erreur montrant l'écart type. \*P<0.05, \*\*P<0.01, avec une analyse statistique par ANOVA à un facteur et avec un test de comparaison multiple Kruskal-Wallis.

Toutefois, en cas de délétion de l'ORF3 (*E. coli/pDIJ09-518aΔORF3*), l'exposition à la tobramycine n'induisait pas une augmentation de l'expression de *sfiA* (facteur de 1, p<0.05).

En cas de complémentation de cette souche par ORF3 (*E. coli/pDIJ09-518aΔORF3/pORF3*), l'expression du gène *sfiA* était augmentée signant la restauration de l'induction de la réponse SOS (Figure 59A).

Nous avons ensuite mesuré la production de NO chez *E. coli/pDIJ09-518aΔORF3* et montré qu'en l'absence de l'ORF3, la production de NO était comparable à celle mesurée chez une souche ne portant pas le plasmide pDIJ09-518a (Figure 59B).

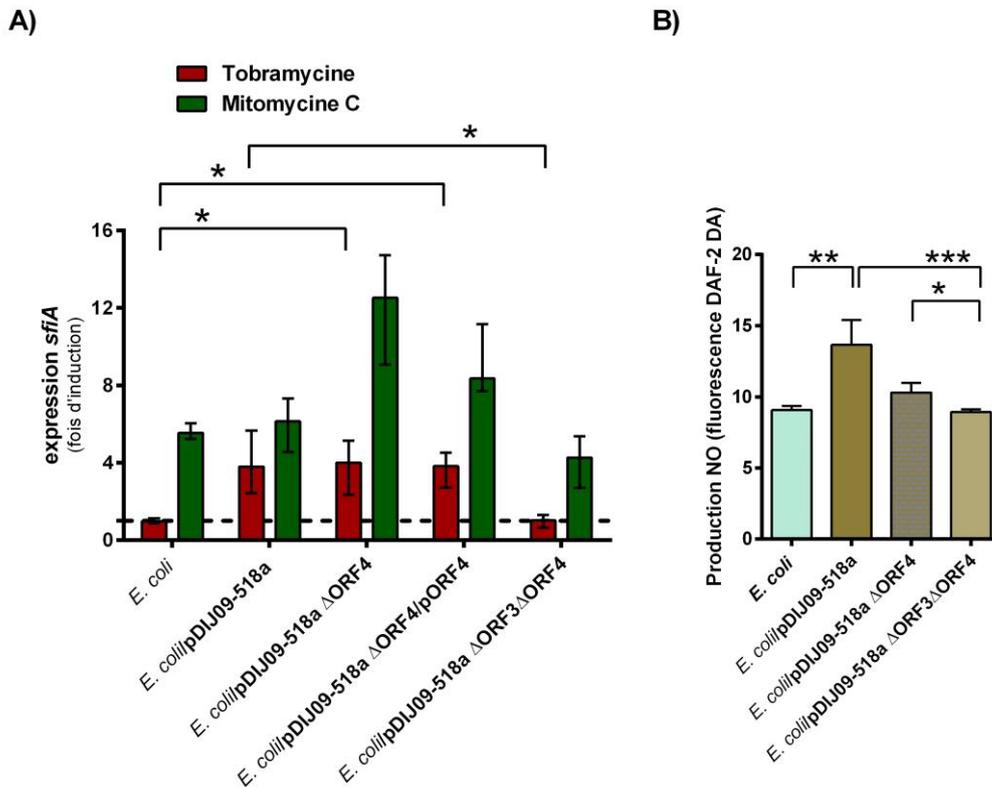
Au final, ces résultats montrent que ORF3 induit la formation de NO et qu'en présence de tobramycine, la réponse SOS est induite.

### 2.2.7. L'ORF4 code une Crp/FNR-like protéine et inhibe l'expression du gène *hmp*

Par la même approche que décrite dans le paragraphe précédent, nous avons déterminé que l'ORF4 codait une protéine avec de fortes homologies avec une protéine Crp/FNR-like (34% de couverture sur 71% identité avec la protéine chez *Pedobacter panaciterrae*).

L'expression du gène *hmp* est sous le contrôle d'un facteur transcriptionnel de type FNR (307–309). Nous avons donc déterminé si l'ORF4 régulait négativement l'expression de *hmp* conduisant ainsi à un déséquilibre dans l'homéostasie du NO chez *E. coli*.

Dans un premier temps, nous avons quantifié l'expression du gène *sfiA* chez une souche *E. coli* portant le plasmide délété de l'ORF4 (*E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF4) (Figure 60A), après traitement par la mitomycine C (contrôle positif) ou la tobramycine.



**Figure 60. La délétion de l'ORF4 ne bloque pas l'induction SOS chez *E. coli* en présence de tobramycine**

A) La quantification relative du niveau d'expression du gène *sfiA* a été réalisée après traitement par des sub-CMI de tobramycine chez *E. coli* portant ou pas pDIJ09-518a, ou le mutant ORF4. Les histogrammes représentent la médiane du changement d'expression du gène *sfiA* en présence de tobramycine (1% de la CMI) ou de mitomycine C, en comparaison l'expression en LB sans antibiotique (trait pointillé au niveau 1). Le gène *dxs* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation. \* $P < 0.05$ , le test de rang bilatéral de Wilcoxon a été utilisé pour l'analyse des médianes obtenues des 6 expériences indépendantes en triplicats techniques. Les barres d'erreur représentent la valeur la plus haute et la plus basse. B) La production NO a été mesurée avec l'agent DAF-2 DA ajouté aux cultures bactériennes en LB. Les barres représentent les moyennes des 6 expériences indépendantes (à chaque fois en triplicats techniques) avec les barres d'erreur montrant l'écart type. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , avec une analyse statistique par ANOVA à un facteur et avec un test de comparaison multiple Kruskal-Wallis.

D'une part, nous avons observé que la délétion de ORF4 n'influçait pas la capacité d'induction de la réponse SOS chez *E. coli* puisque l'expression de *sfiA* était augmentée chez *E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF4 exposé à la mitomycine C (rapport de 12,53). D'autre part, nous avons constaté que ni la délétion de l'ORF4, ni sa complémentation (*E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF4/pORF4), n'avaient d'effet sur l'expression du gène *sfiA* chez *E. coli* exposé à la tobramycine (Figure 60A) (rapport de 4 et 3,83, respectivement). En parallèle, nous avons mesuré la production de NO dans une souche *E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF4. Malgré l'absence de significativité statistique, nous avons observé que sans l'ORF4, *E. coli* avait tendance à produire moins de NO comparativement à la souche portant le plasmide pDIJ09-518a dans sa forme complète (Figure 60B).

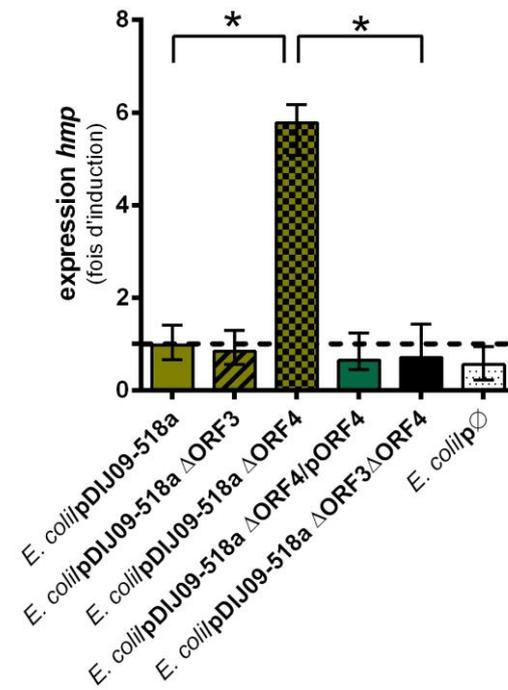
Dans un second temps, nous avons, quantifié l'expression du gène *sfiA* chez une souche *E. coli* portant le plasmide délété de l'ORF3 et de l'ORF4 (*E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF3 $\Delta$ ORF4) (Figure 60A). Comme pour la souche *E. coli*, la réponse SOS n'était pas induite par la tobramycine (Figure 60A) (rapport de 1). En parallèle, nous avons mesuré la production de NO, chez la souche portant le plasmide sans ORF3 et ORF4 (*E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF3 $\Delta$ ORF4). Chez ce double mutant, la production de NO baisse significativement par rapport à la souche *E. coli*/pDIJ09-518a (Figure 60B).

Dans un troisième temps, nous avons quantifié relativement l'expression du gène *hmp* chez des souches isogéniques de *E. coli*, soit portant le plasmide pDIJ09-518a entier, soit portant le plasmide pDIJ09-518a délété des différents ORFs (*E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF3, *E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF4 et *E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF3 $\Delta$ ORF4) par rapport à la souche sauvage.

Nos résultats, présentés sur la Figure 61, montrent que sans ORF4 (*E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF4) le niveau d'expression du gène *hmp* augmente (rapport de 5,78,  $p < 0.05$ ), tandis que le niveau d'expression de *hmp* pour cette même souche isogénique complétement avec ORF4 (*E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF4/pORF4) est similaire à la souche portant le plasmide entier (*E. coli*/pDIJ09-518a) (rapport de 0,84 et 0,64, respectivement). Ceci implique que ORF4 inhibe l'expression de *hmp*. ORF3 n'a pas de rôle direct dans la régulation de *hmp*, puisque l'expression de ce gène n'est pas affectée par la délétion ORF3 (Figure 61).

Des résultats similaires ont été observés pour le double mutant (*E. coli*/pDIJ09-518a $\Delta$ ORF3 $\Delta$ ORF4) (Figure 61). Ceci s'explique par le fait qu'en l'absence de ORF3, la production de NO est diminuée et ne requiert pas d'activation de la voie de détoxification dépendante de Hmp.

Dans toutes nos expériences, nous avons confirmé (*E. coli*/p $\emptyset$ ) que le plasmide vecteur vide (utilisé pour les complémentations) n'influençait pas l'expression du gène *hmp*.

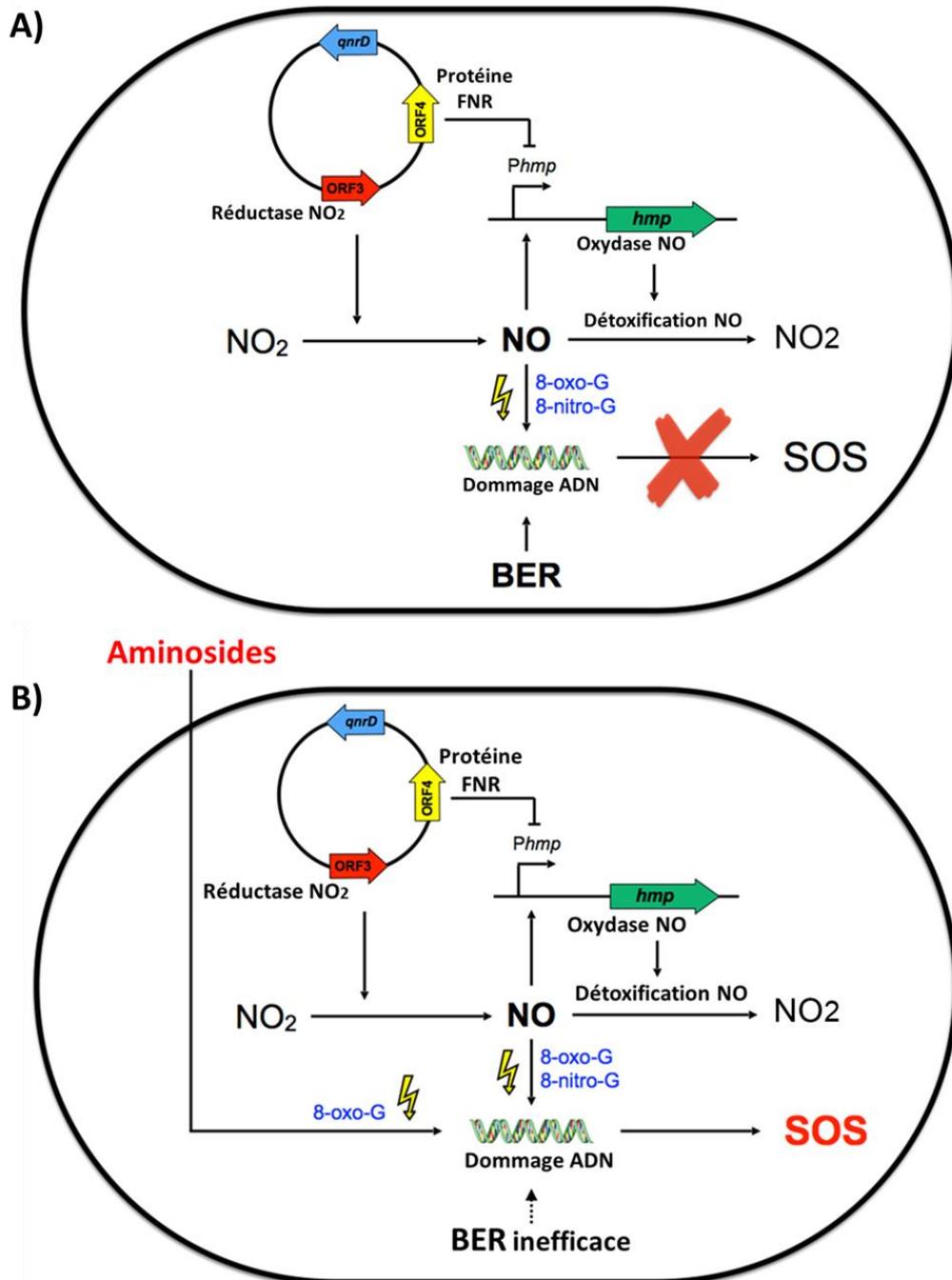


**Figure 61. L'ORF4 inhibe l'expression du gène *hmp* provoquant un déséquilibre dans la détoxification du NO**  
La quantification relative du niveau d'expression du gène *hmp* a été réalisée en LB chez *E. coli* portant pDIJ09-518a ou les différents mutants plasmidiques. Les histogrammes représentent la médiane du changement d'expression du gène *hmp* en LB en comparaison à la souche sauvage (*E. coli*, trait pointillé au niveau 1) pour 6 réplicats biologiques indépendants (à chaque fois en triplicats techniques). Le gène *dxs* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation. Les barres d'erreurs représentent la valeur mesurée la plus haute et la plus basse. \* $P < 0.05$ , test de rang bilatéral de Wilcoxon.

L'ensemble de nos résultats nous a permis de proposer le mécanisme à l'origine de l'activation du SOS par exposition aux aminosides. Chez *E. coli* portant le petit plasmide *qnrD*, la formation de NO est le résultat de (i) la production par la ORF3, codant une FAD-oxydoréductase, et (ii) le blocage de la détoxification de NO par la ORF4, codant une protéine CRP/FNR-like, inhibitrice du gène *hmp*.

En absence d'aminosides, la voie de réparation BER est efficace face aux dommages (8-oxo-G et 8-nitro-G) causés par le portage du plasmide, et ne requiert pas l'induction de la réponse SOS (Figure 62A).

En présence de concentrations sub-inhibitrices d'aminosides, les concentrations de 8-oxo-G et 8-nitro-G atteignent un niveau génotoxique et la voie BER est dépassée, conduisant à l'induction de la réponse SOS (Figure 62B).



**Figure 62. Modèle d'induction de la réponse SOS par les aminosides chez *E. coli* portant le plasmide *qnrD*.** Représentation du mécanisme moléculaire d'induction de la réponse SOS chez *E. coli*/pDIJ09-518a en présence (B) ou en absence (A) de concentrations sub-inhibitrices d'aminosides.

## 2.3. L'impact clinique de la régulation du gène *qnrD* par les aminosides

### 2.3.1. Le plasmide *qnrD* permet l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones chez *E. coli* non exposé aux fluoroquinolones, mais exposé à la tobramycine

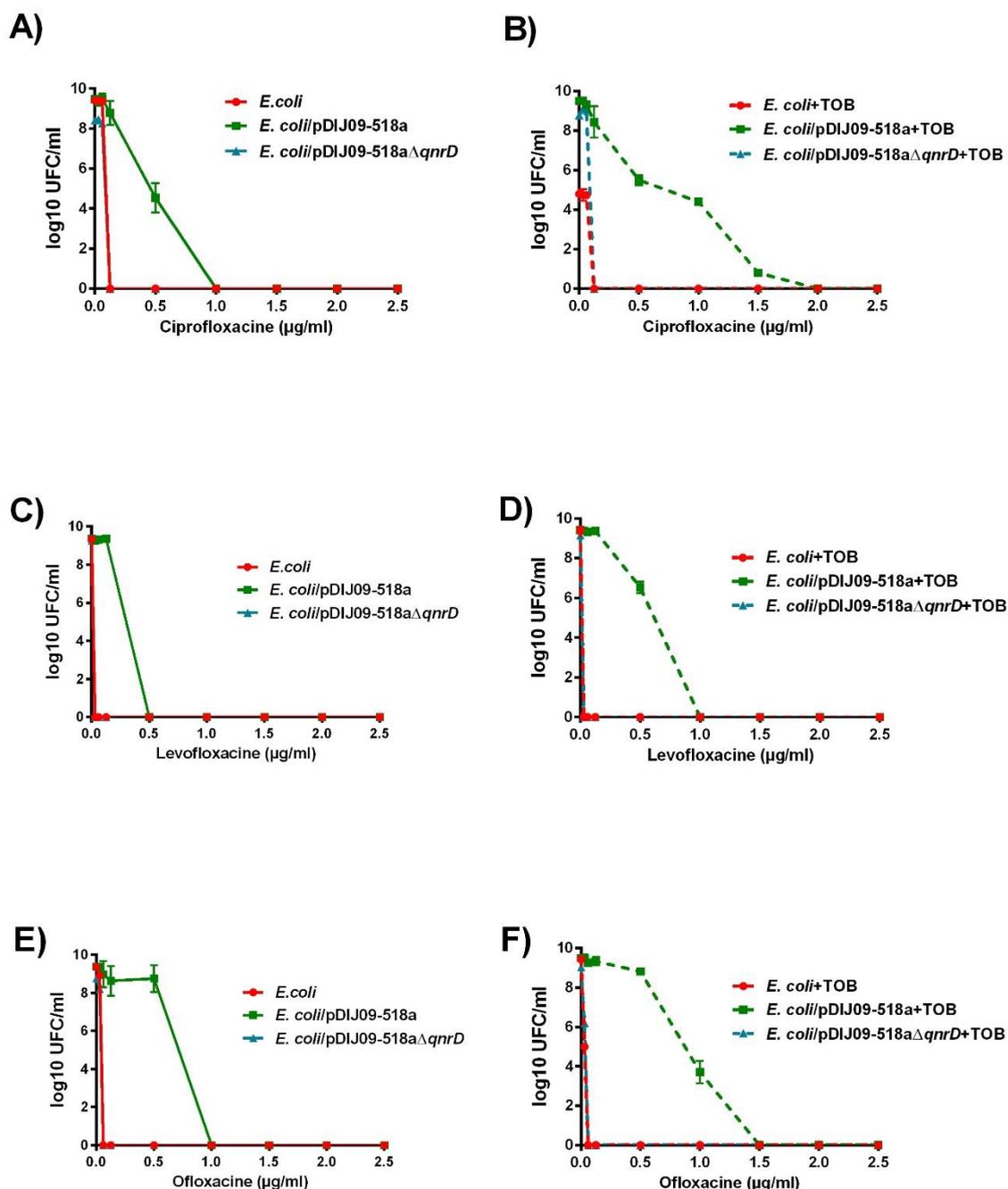
Chez les *Enterobacteriaceae*, le haut niveau de résistance aux fluoroquinolones est principalement dû à l'accumulation des mutations dans les régions QRDR (Quinolones Resistance Determining Regions) (4). Les PMQR (Plasmid Mediated Quinolones Resistance) donnent lieu à un bas niveau de résistance aux quinolones, mais il a été rapporté qu'ils pourraient favoriser l'émergence de la résistance de haut niveau chez des souches exposées à des concentrations sub-inhibitrices de fluoroquinolones (63, 65).

Nous avons testé la possibilité que les aminosides (ici, la tobramycine) pourraient favoriser l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones, en permettant la survie de bactéries productrices de QnrD. Pour cela, nous avons comparé les concentrations prévenant les mutations (CPM) (de la ciprofloxacine, la lévofloxacine et l'ofloxacine, d'une souche multisensible d'*E. coli* (ATCC 25922) et ses dérivés portant le plasmide pDIJ09-518a ou pDIJ09-518a $\Delta$ *qnrD*, avec ou sans un pré-traitement à la tobramycine (1% de la CMI; 0,001 $\mu$ g/ml) (Figure 63).

La présence du plasmide pDIJ09-518a dont le gène *qnrD* a été délété n'augmente pas les CPM aux trois fluoroquinolones testées, que les souches aient été ou non pré-traitées avec la tobramycine. Aucune colonie viable n'a été observée aux concentrations de 0,125, 0,06 et 0,06  $\mu$ g/ml de ciprofloxacine, de lévofloxacine et d'ofloxacine respectivement (Figure 63A, C et E, courbes bleues). Ceci était attendu car il n'y avait pas de PMQR pouvant favoriser l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones.

Conformément aux résultats déjà rapportés, la présence d'un PMQR, ici le gène *qnrD* porté par le plasmide pDIJ09-518a, favorise l'élévation de la CPM à la ciprofloxacine, la lévofloxacine et l'ofloxacine (CPM = 1, 0,5 et 1 $\mu$ g/ml respectivement) chez *E. coli* ATCC25922 sans pré-traitement à la tobramycine.

En revanche, en cas de pré-traitement par la tobramycine induisant la réponse SOS et l'expression de *qnrD* chez *E. coli*/pDIJ09-518a, des colonies viables étaient dénombrées à des concentrations de 2 µg/mL pour la ciprofloxacine, de 1 µg/mL pour lévofloxacine et 1,5 µg/mL pour l'ofloxacine.



**Figure 63. Les sub-CMI d'aminosides favorisent la résistance aux quinolones chez *E. coli*/pDIJ09-518a**

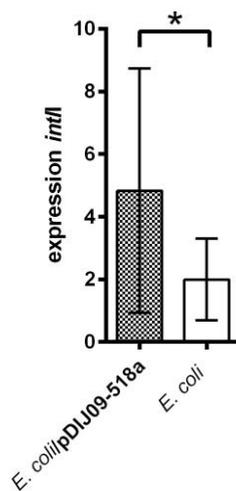
Les souches bactériennes ont été cultivées pendant 18h en présence ou en absence de sub-CMI de tobramycine. Des dilutions appropriées ont été étalées sur géloses contenant ou non différentes concentrations de fluoroquinolones (ciprofloxacine, A-B ; lévofloxacine, C-D ; ofloxacine, E-F). Après 72h d'incubation à 37°C, les colonies viables ont été comptées. Les courbes représentent la moyenne des colonies viables (en échelle logarithmique) de trois expériences, en fonction de la concentration de l'antibiotique utilisée.

Ceci implique donc la possible émergence de la résistance aux fluoroquinolones par l'intermédiaire d'un PMQR, ici *qnrD*, par exposition à une autre famille d'antibiotiques (ici, les aminosides).

Le plasmide *qnrD* permet l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones chez *E. coli* non exposée aux fluoroquinolones, mais exposé à la tobramycine.

### 2.3.2. Le plasmide *qnrD* permet les réarrangements des intégrons de classe 1 chez *E. coli* exposé à la tobramycine

Il a été précédemment rapporté que l'induction de la réponse SOS par les fluoroquinolones ou les  $\beta$ -lactamines pouvait favoriser la dissémination de la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* par réarrangement des cassettes de gène de résistance dans les intégrons de classe 1 (334). Le réarrangement des cassettes est sous le contrôle de l'intégrase codée par le gène *intI1* Figure 64.



**Figure 64. Le portage de pDIJ09-518a en présence de tobramycine induit l'expression de l'intégrase via SOS.** Le nombre de copies du gène *intI1* a été déterminé par la quantification absolue du gène *intI1*, en présence de tobramycine, chez *E. coli* portant ou pas pDIJ09-518a. Le gène *dxs* a été utilisé comme gène de référence pour la normalisation et a été quantifié de la même façon. Les histogrammes représentent la médiane de six expériences individuelles (à chaque fois en triplicats biologiques) et les barres d'erreurs correspondent à la valeur obtenue la plus haute et la plus basse. \* $P < 0.05$ , test de rang bilatéral de Wilcoxon.

Nous avons donc déterminé si l'expression de *intI1* était augmentée suite à l'induction de la réponse SOS par exposition à la tobramycine. Les résultats présentés dans la Figure 64, montrent que l'expression du gène codant l'intégrase était augmentée chez *E. coli* portant le plasmide pDIJ09-518a exposé à des concentrations sub-inhibitrices de tobramycine.

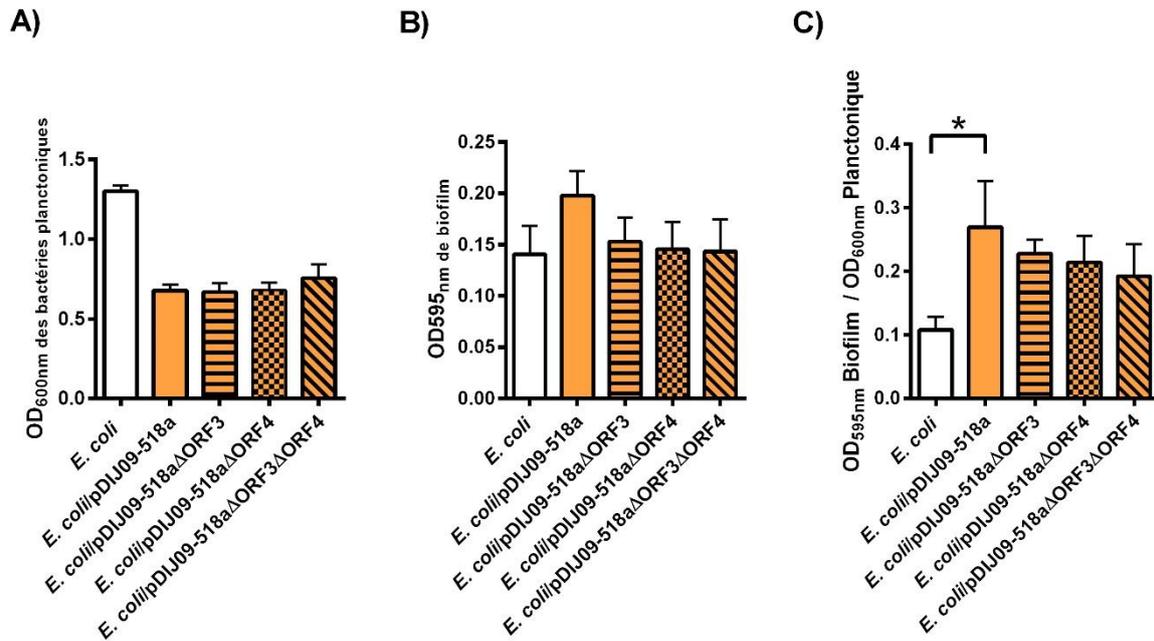
### 2.3.3. Les petits plasmides *qnrD* favorisent la formation de biofilm chez *E. coli*

Le rôle du NO dans la formation du biofilm chez *E. coli* est un sujet toujours débattu. Plusieurs études rapportent que le NO aurait un effet dans la dispersion des biofilms en conditions d'aérobiose (335), tandis que d'autres montrent que le NO pourrait favoriser la formation de biofilm. Ce dernier point serait une stratégie de défense de la bactérie contre les agents toxiques ou la réponse immunitaire eucaryote (336).

Compte tenu de cette dernière donnée, nous avons évalué si la présence du plasmide *qnrD*, pouvait donner un avantage sélectif à *E. coli* en augmentant sa résistance à son environnement grâce à la formation de biofilm.

Premièrement nous avons quantifié la biomasse des cellules organisées en biofilm et planctoniques, en utilisant la technique de marquage au cristal violet (337) (Figure 65).

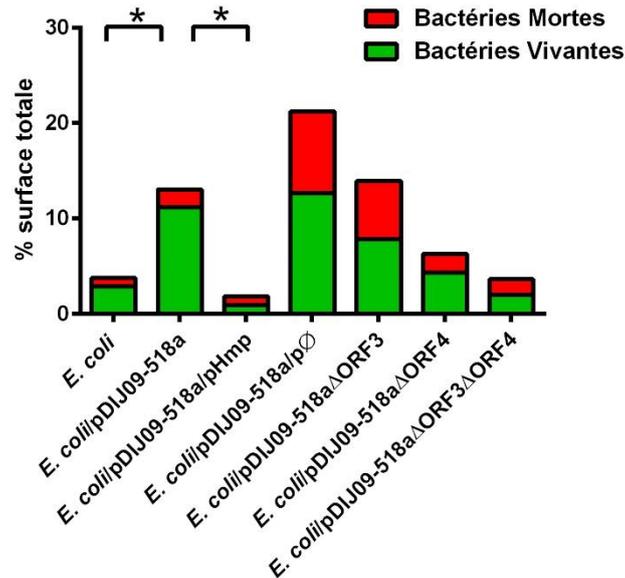
Nous avons observé que la production de biofilm est statistiquement plus importante chez *E. coli* portant le plasmide *qnrD* que chez la souche sauvage (Figure 65B et C). Nous n'avons pas obtenu de diminution, statistiquement significative, de la production de biofilm pour les souches portant les plasmides pDIJ09-518a délétés de ORF3, ou ORF4 ou les deux ( $\Delta$ ORF3,  $\Delta$ ORF4 et/ou  $\Delta$ ORF3 $\Delta$ ORF4). En revanche nos résultats, montrant une tendance à la baisse de la production de biofilm nous ont conduit à utiliser une approche plus sensible.



**Figure 65. Le portage de *pDIJ09-518a* favorise la formation du biofilm chez *E. coli***

Test de formation du biofilm par cristal violet, chez *E. coli* sauvage et *E. coli* portant *pDIJ09-518a* (orange) et ses dérivés ( $\Delta$ ORF3, orange et traits noirs ;  $\Delta$ ORF4, orange et carrés noirs ;  $\Delta$ ORF3 $\Delta$ ORF4, orange et diagonales noires). A) Absorbance mesurée des cellules planctoniques à 600nm, B) Absorbance mesurée des cellules organisées en biofilm à 595nm et C) le rapport entre l'absorbance biofilm sur l'absorbance planctonique pour chacune des souches étudiées. Les histogrammes représentent la moyenne des 6 expériences individuelles en triplicats techniques. Les résultats ont été analysés statistiquement par le test Mann-Whitney, \* $P < 0.05$ .

Nous avons étudié la dynamique de formation du biofilm à l'aide d'une méthode de formation de biofilm en flux continu (338, 339). Nous avons ainsi évalué l'épaisseur et la structure du biofilm (Figure 66).

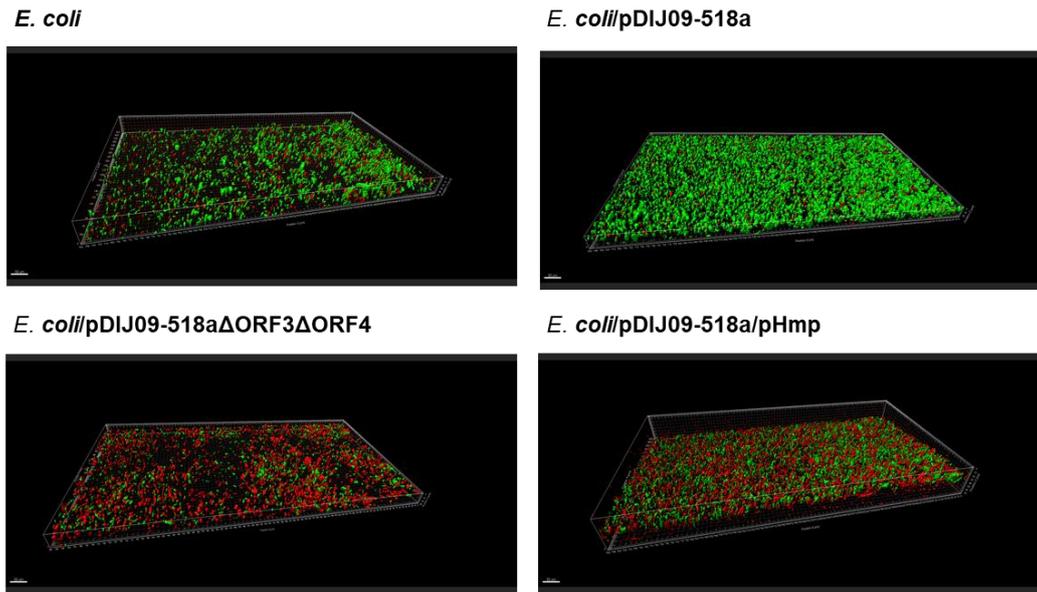


**Figure 66. Le NO produit par le pDIJ09-518a favorise la survie en biofilm chez *E. coli***

Les biofilms obtenus dans les chambres à flux, après 72h de culture en milieu minimum, ont été marqués avec des fluorochromes afin de caractériser la population cellulaire constituant le biofilm (SYTO-9, fluorescence verte= cellule vivante ; IP, fluorescence rouge= cellule morte), pour chacune des souches étudiées. Les histogrammes représentent la moyenne des trois expériences indépendantes, en duplicats biologiques. Les résultats ont été analysés statistiquement par un test Mann-Whitney, \* $P < 0.05$ .

L'évaluation de la viabilité cellulaire lors de la formation dynamique du biofilm a montré que le biofilm formé par *E. coli/pDIJ09-518a* était plus épais ( $35\mu\text{m}$  vs  $25\mu\text{m}$ ) avec une structure beaucoup plus dense (Figure 67), et constitué de plus des cellules vivantes (Figure 66) en comparaison au biofilm produit par la souche sauvage *E. coli*.

En revanche, quand la voie de détoxification du NO dépendante de Hmp est fonctionnelle (par surexpression de Hmp, *E. coli/pDIJ09-518a/pHmp* ; par délétion des ORFs incriminés, *E. coli/pDIJ09-518a ΔORF3ΔORF4*), la formation de biofilm n'est pas augmentée (Figure 66).



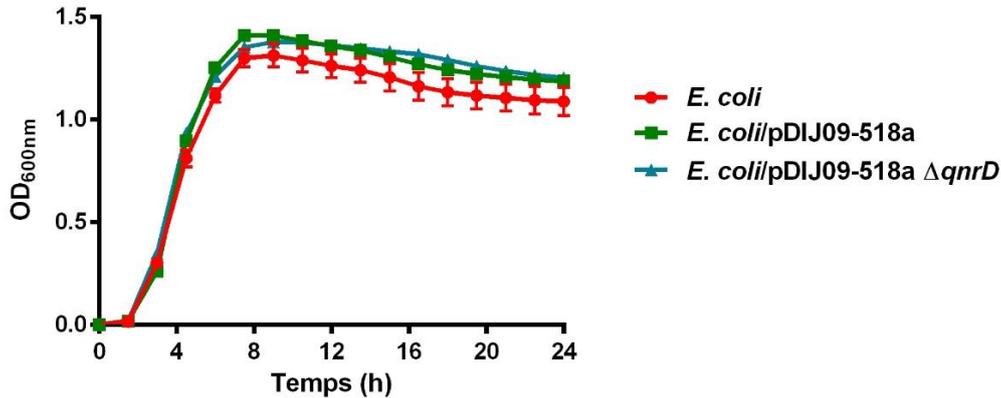
**Figure 67. La structure du biofilm chez *E. coli*/pDIJ09-518a**  
La reconstruction des images en 3D des biofilms des différentes souches étudiées, par le modèle dynamique.

#### 2.3.4. Le petit plasmide *qnrD* est stable et ne diminue pas la croissance de *E. coli*

Le risque associé à la présence du plasmide *qnrD* et l'ensemble de nos résultats sont directement corrélés à sa capacité de dissémination entre différentes souches et à son coût métabolique.

Dans un premier temps, nous avons déterminé la croissance des souches ne portant pas pDIJ09-518a, portant pDIJ09-518a ou bien pDIJ09-518aΔ*qnrD*. Les courbes de croissance bactérienne obtenues par culture dans un milieu sans pression de sélection sont présentées sur la Figure 68 et ne montrent pas de modification de la croissance avec ou sans les plasmides.

Dans un second temps, nous avons déterminé la stabilité de la présence de pDIJ09-518a chez *E. coli* sans pression de sélection. Nous avons observé que le plasmide pDIJ09-518a n'était pas perdu après 30 jours de culture sans pression de sélection.



**Figure 68. L'impact du portage de plasmide *qnrD* sur la viabilité d'*E. coli***

Des cultures de nuit ont été diluées 1000x en milieu LB frais. Les courbes représentent la densité optique à 600nm mesurée durant 24h à 37°C, à chaque temps indiqué. Les résultats sont la moyenne des 3 expériences indépendantes, effectuées en triplicats techniques, et les barres d'erreurs représentent l'écart type.

Dans un troisième temps, nous avons séquencé le génome bactérien après les 30 jours de cultures itératives. Nous avons obtenu « 55 contigs » pour la souche *E. coli* sauvage qui a été utilisée pour l'assemblage *de novo* d'un génome de référence. Nous avons obtenu 56 « contigs » lors du séquençage de *E. coli/pDIJ09-518a*. Cinquante-cinq reads correspondaient au chromosome de référence *E. coli*. Un seul « contig » ne pouvait être assemblé et correspondait, après analyse par BLAST, à pDIJ09-518a. Nous avons donc pu confirmer moléculairement la présence de pDIJ09-518a et pu montrer l'absence de mutation compensatrice dans le plasmide *qnrD* ou dans le chromosome d'*E. coli*.

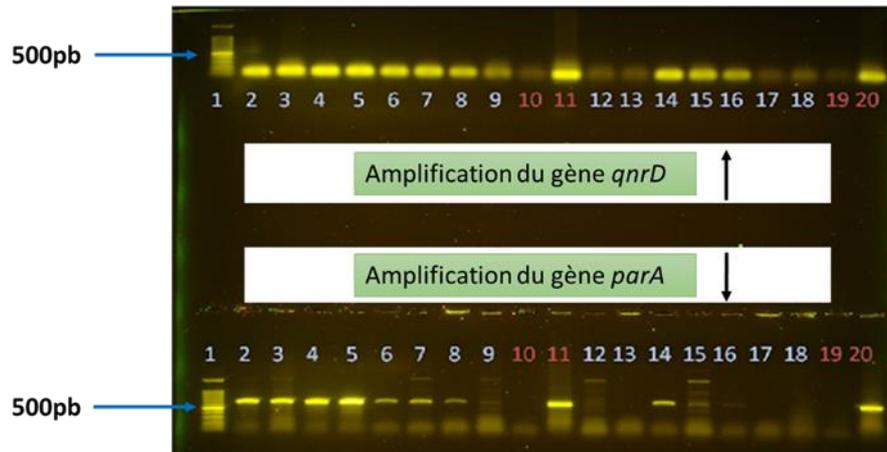
### 2.3.5. Les petits plasmides *qnrD* sont mobilisables

Compte tenu de la stabilité du plasmide pDIJ09-518a (démontrée au-dessus) et de la description de plasmides *qnrD* du même type que pDIJ09-518a dans différentes espèces d'entérobactéries, il semble envisageable que ces petits plasmides puissent être transférés horizontalement. Or aucune étude n'a décrit une telle propriété jusqu'à maintenant.

Lors de la description du plasmide pDIJ09-518a, notre équipe avait conclu que pDIJ09-518a était un plasmide non conjugatif (137).

Nous avons déterminé si ce plasmide pouvait être transférable (ou mobilisable). Nous avons réalisé des expériences de conjugaison entre des souches donneuses de *Klebsiella pneumoniae* portant le plasmide conjugatif RP4 (340, 341) ou co-portant les plasmides pRP4 et pDIJ09-518a.

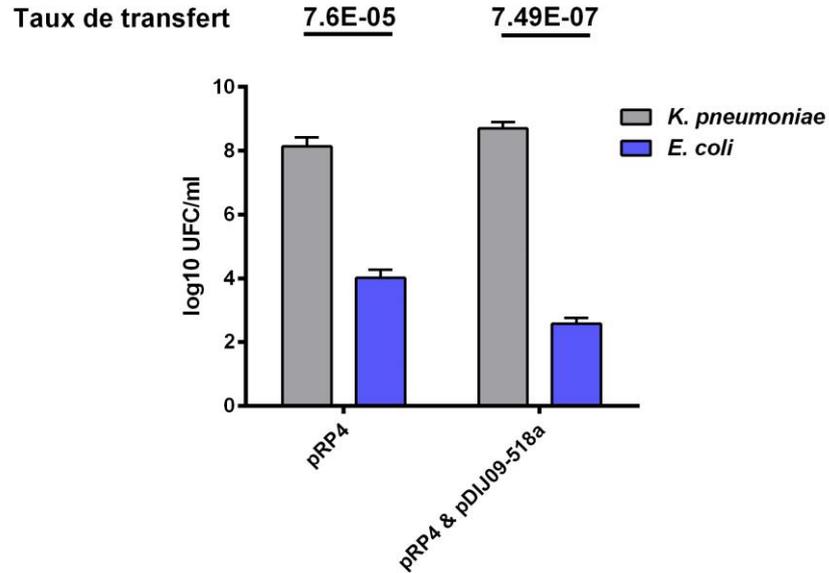
Après 24h de conjugaison sur filtre, nous avons obtenus des *E. coli* transconjugants portant soit pRP4 seul, soit pRP4 et pDIJ09-518a. Nous avons vérifié par PCR (gène *qnrD* pour le plasmide *qnrD* et gène *parA* pour pRP4) la présence des plasmides dans les transconjugants (Figure 69). Nos résultats montraient la présence des plasmides *qnrD* en présence de pRP4.



**Figure 69. Amplification génique par PCR pour la vérification de la mobilisation des plasmides *qnrD***

Amplification génique par PCR des différents transconjugants. La tailles des amplicons attendue était de 105 pb, pour le gène *qnrD* (pDIJ09-518a) et 650 pb pour l'amplification du gène *parA* (pRP4). Légende du gel : 1) Marqueur de taille (100pb); 2-9, transconjugants *E. coli*/pRP4/pDIJ09-518a; 10) T<sup>-</sup>; 11) T<sup>+</sup> pDIJ09-518a (ligne du haut) et pRP4 (ligne du bas); 12-18, transconjugants *E. coli*/pRP4/pDIJ09-518a; 19) T<sup>-</sup>; 20) T<sup>+</sup> pDIJ09-518a (ligne du haut) et pRP4 (ligne du bas).

Le transfert de pRP4 depuis *K. pneumoniae* vers *E. coli* a permis de valider l'expérience. Nos résultats nous ont permis de démontrer que pDIJ09-518a est mobilisé en utilisant la machinerie de conjugaison (protéine couplé au système de sécrétion de type 4 (T4CP) et/ou système de sécrétion de type 4 (T4SS) porté par le plasmide conjugatif pRP4. L'efficacité de transfert de pDIJ09-518a est faible ( $7,49 \times 10^{-7}$ ) comparé à celle de pRP4 ( $7,6 \times 10^{-5}$ ) (Figure 70).



**Figure 70. Les plasmides *qnrD* sont mobilisables à faible taux de transfert**

Des expériences de conjugaison ont été réalisées pendant 24h, sur filtre, entre les souches donneuses *K. pneumoniae* (portant soit pRP4 seul, soit pRP4 et pDIJ09-518a) et les souches receveuses *E. coli* (transconjugants pRP4 contrôle, pRP4/pDIJ09-518a). Les histogrammes représentent la moyenne des trois expériences indépendantes, obtenue par le nombre des colonies viables comptées sur différents milieux de cultures pour les souches donneuses et les transconjugants. Le taux de transfert a été calculé en effectuant le rapport entre le nombre de transconjugants obtenus sur le nombre de souches donneuses (avant conjugaison).

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

L'importance clinique des PMQR, comme les Qnr, résulte de leur effet en diminuant l'activité bactéricide des fluoroquinolones. Le travail réalisé dans le cadre de ce doctorat a donc été entrepris pour démontrer la régulation du gène *qnrD* par la réponse SOS et son impact clinique chez les entérobactéries.

Nous avons démontré que tous les plasmides *qnrD* entièrement séquencés portent une SOS-box très conservée et que le gène *qnrD* est régulé par la réponse SOS sous la dépendance de RecA et LexA. Nous avons montré pour la première fois que les aminosides induisent la réponse SOS chez *E. coli* et nous avons apporté la preuve que le squelette plasmidique des petits plasmides *qnrD* est à l'origine de cette induction.

Nous avons montré que l'induction de la réponse SOS par les aminosides n'est pas due à une augmentation de la production des ROS. En revanche, nous avons pu établir l'inefficacité de la voie BER à réparer les lésions créées par l'exposition à l'antibiotique, dont le résultat est l'induction de la réponse SOS après exposition aux aminosides.

La formation de NO est une voie métabolique complexe, mais la nitrate réductase est une source clé de NO chez la bactérie. En aérobie, *E. coli* contrôle la production endogène de NO via la voie de détoxification médiée par Hmp. Nous avons montré que les petits plasmides *qnrD* favorisent la formation de NO en plus de l'induction de la réponse SOS, en présence de concentrations sub-inhibitrices d'aminosides chez *E. coli*.

Le travail de cette thèse de doctorat a permis la démonstration complète du mécanisme à l'origine de l'activation du SOS par exposition aux aminosides. Chez *E. coli* portant le petit plasmide *qnrD*, la formation de NO est le résultat de (i) la production par ORF3 codant une FAD-oxydoréductase, et (ii) le blocage de la détoxification de NO par ORF4 codant une protéine CRP/FNR-like, inhibitrice du gène *hmp*. En absence d'aminosides, la voie de réparation BER est efficace face aux dommages (8-oxo-G et 8-nitro-G) causés par le portage du plasmide, et ne requiert pas l'induction de la réponse SOS. En présence de concentrations sub-inhibitrices d'aminosides, les concentrations de 8-oxo-G et 8-nitro-G atteignent un niveau génotoxique et la voie BER est dépassée, conduisant à l'induction de la réponse SOS.

L'émergence des haut-niveaux de résistances chez les entérobactéries exposées aux concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques est un problème non seulement lors du traitement des patients, mais aussi au niveau environnemental. Dans ces deux cas l'émergence de résistance peut conduire à des échecs thérapeutiques.

Nous avons montré que le portage des petits plasmides *qnrD* permet non seulement l'induction de la réponse SOS par les aminosides, mais aussi la formation des biofilms. Ce phénotype est inquiétant, car dans les foyers d'infection profonds et sur les matériels médicaux, les traitements antibiotiques ne peuvent atteindre leur concentration bactéricide optimale. En conséquence, nos résultats soulignent que dans ces situations, les aminosides prescrits pour traiter *E. coli* portant ces petits plasmides peuvent sélectionner une résistance de haut-niveau aux fluoroquinolones, chez une bactérie non exposée à cet antibiotique.

En perspective, il sera essentiel de caractériser l'origine de répllication et de transfert de ces petits plasmides *qnrD* et de réaliser une étude similaire chez *Providencia rettgeri*. De plus, l'étude biochimique et la caractérisation des fonctions de protéines codées par ORF3 et ORF4, sera également une étude importante afin de comprendre la voie métabolique de détoxification de NO impliquant ces deux enzymes.

## BIBLIOGRAPHIE

1. Consommation d'antibiotiques et résistance aux antibiotiques en France : nécessité d'une mobilisation déterminée et durable / 2016 / Maladies infectieuses / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil, (available at <http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2016/Consommation-d-antibiotiques-et-resistance-aux-antibiotiques-en-France-necessite-d-une-mobilisation-determinee-et-durable>).
2. E. Montassier, F. Ballereau, G. Potel, De la consommation d'antibiotiques aux résistances bactériennes : l'exemple de la résistance d'*Escherichia coli* aux quinolones. *17*, 8 (2011).
3. J. S. Wolfson, D. C. Hooper, Bacterial resistance to quinolones: mechanisms and clinical importance. *Rev. Infect. Dis.* **11**, S960–S968 (1989).
4. D. C. Hooper, Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Emerg. Infect. Dis.* **7**, 337–341 (2001).
5. D. C. Hooper, Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* **31**, S24–S28 (2000).
6. M. E. da Costa, H. S. Machado, Evolution of antimicrobial resistance in Europe: a factual review. *J. Allergy Ther.* **8**, 1–14 (2017).
7. J. Garau *et al.*, Emergence and dissemination of quinolone-resistant *Escherichia coli* in the community. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2736–2741 (1999).
8. B. Spellberg, Y. Doi, The rise of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* in the community: carrier than we thought. *J. Infect. Dis.* **212**, 1853–1855 (2015).
9. A. Colpan *et al.*, *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **57**, 1256–1265 (2013).
10. G. V. Sanchez *et al.*, *Escherichia coli* antimicrobial resistance increased faster among geriatric outpatients compared with adult outpatients in the USA, 2000–10. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 1838–1841 (2013).
11. evolution-of-antimicrobial-resistance-in-europe-a-factual-review-2155-6121-1000250.pdf, (available at <https://www.omicsonline.org/open-access/evolution-of-antimicrobial-resistance-in-europe-a-factual-review-2155-6121-1000250.pdf>).
12. K. J. Aldred, R. J. Kerns, N. Osheroff, Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry (Mosc.)*. **53**, 1565–1574 (2014).

13. A. M. Emmerson, A. M. Jones, The quinolones: decades of development and use. *J. Antimicrob. Chemother.* **51**, 13–20 (2003).
14. L. A. Mitscher, Bacterial topoisomerase inhibitors: quinolone and pyridone antibacterial agents. *Chem. Rev.* **105**, 559–592 (2005).
15. V. T. Andriole, The quinolones: past, present, and future. *Clin. Infect. Dis.* **41**, S113–S119 (2005).
16. Stein Gary E., The 4-quinolone antibiotics: past, present, and future. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* **8**, 301–314 (2012).
17. A. Dalhoff, Resistance surveillance studies: a multifaceted problem—the fluoroquinolone example. *Infection.* **40**, 239–262 (2012).
18. A. Dalhoff, Global fluoroquinolone resistance epidemiology and implications for clinical use. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2012** (2012), doi:10.1155/2012/976273.
19. K. Drlica *et al.*, Quinolones: action and resistance Updated. *Curr. Top. Med. Chem.* **9**, 981–998 (2009).
20. D. C. Hooper, Mode of action of fluoroquinolones. *Drugs.* **58 Suppl 2**, 6–10 (1999).
21. K. Drlica, X. Zhao, DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 377–392 (1997).
22. V. E. Anderson, N. Osheroff, Type II topoisomerases as targets for quinolone antibacterials turning Dr. Jekyll into Mr. Hyde. *Curr. Pharm. Des.* **7**, 337–353 (2001).
23. J. J. Champoux, DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **70**, 369–413 (2001).
24. Y. Pommier, E. Leo, H. Zhang, C. Marchand, DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem. Biol.* **17**, 421–433 (2010).
25. C. Levine, H. Hiasa, K. J. Mariani, DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* **1400**, 29–43 (1998).
26. J. E. Deweese, N. Osheroff, The DNA cleavage reaction of topoisomerase II: wolf in sheep's clothing. *Nucleic Acids Res.* **37**, 738–748 (2009).
27. E. L. Zechiedrich *et al.*, Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**, 8103–8113 (2000).
28. R. W. Deibler, S. Rahmati, E. L. Zechiedrich, Topoisomerase IV, alone, unknots DNA in *E. coli*. *Genes Dev.* **15**, 748–761 (2001).

29. D. C. Hooper, G. A. Jacoby, Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1354**, 12–31 (2015).
30. A. Wohlkonig *et al.*, Structural basis of quinolone inhibition of type IIA topoisomerases and target-mediated resistance. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 1152–1153 (2010).
31. I. Laponogov *et al.*, Structural basis of gate-DNA breakage and resealing by Type II topoisomerases. *PLoS ONE*. **5** (2010), doi:10.1371/journal.pone.0011338.
32. I. Laponogov *et al.*, Structural insight into the quinolone–DNA cleavage complex of type IIA topoisomerases. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 667–669 (2009).
33. Brody's Human Pharmacology - 5th Edition, (available at <https://www.elsevier.com/books/brodys-human-pharmacology/crespo/978-0-323-05374-7>).
34. V. E. Anderson, R. P. Zaniewski, F. S. Kaczmarek, T. D. Gootz, N. Osheroff, Action of quinolones against *Staphylococcus aureus* topoisomerase IV: basis for DNA cleavage enhancement. *Biochemistry (Mosc.)*. **39**, 2726–2732 (2000).
35. H. Hiasa, D. O. Yousef, K. J. Marians, DNA strand cleavage is required for replication fork arrest by a frozen topoisomerase-quinolone-DNA ternary complex. *J. Biol. Chem.* **271**, 26424–26429 (1996).
36. A. Sugino, C. L. Peebles, K. N. Kreuzer, N. R. Cozzarelli, Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 4767–4771 (1977).
37. M. Gellert, K. Mizuuchi, M. H. O'Dea, T. Itoh, J.-I. Tomizawa, Nalidixic acid resistance: A second genetic character involved in DNA gyrase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**, 4772–4776 (1977).
38. A. B. Khodursky, E. L. Zechiedrich, N. R. Cozzarelli, Topoisomerase IV is a target of quinolones in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 11801–11805 (1995).
39. Z. Li *et al.*, Alteration in the GyrA subunit of DNA gyrase and the ParC subunit of DNA topoisomerase IV in quinolone-resistant clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 3293–3295 (1998).
40. H. Yoshida, M. Bogaki, M. Nakamura, L. M. Yamanaka, S. Nakamura, Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**, 1647–1650 (1991).

41. D. M. Breines *et al.*, Quinolone resistance locus *nfxD* of *Escherichia coli* is a mutant allele of the *parE* gene encoding a subunit of topoisomerase IV. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 175–179 (1997).
42. B. Fournier, X. Zhao, T. Lu, K. Drlica, D. C. Hooper, Selective targeting of topoisomerase IV and DNA gyrase in *Staphylococcus aureus*: different patterns of quinolone- induced inhibition of DNA synthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2160–2165 (2000).
43. L. B. Price *et al.*, In vitro selection and characterization of *Bacillus anthracis* mutants with high-level resistance to ciprofloxacin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2362–2365 (2003).
44. S. K. Morgan-Linnell, L. B. Boyd, D. Steffen, L. Zechiedrich, Mechanisms accounting for fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 235–241 (2009).
45. M. Wang, D. F. Sahm, G. A. Jacoby, Y. Zhang, D. C. Hooper, Activities of newer quinolones against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* containing the plasmid-mediated quinolone resistance determinant *qnr*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1400–1401 (2004).
46. K. J. Aldred *et al.*, Drug interactions with *Bacillus anthracis* topoisomerase IV: biochemical basis for quinolone action and resistance. *Biochemistry (Mosc.)*. **51**, 370–381 (2012).
47. K. J. Aldred *et al.*, Topoisomerase IV-quinolone interactions are mediated through a water-metal ion bridge: mechanistic basis of quinolone resistance. *Nucleic Acids Res.* **41**, 4628 (2013).
48. C. J. Willmott, A. Maxwell, A single point mutation in the DNA gyrase A protein greatly reduces binding of fluoroquinolones to the gyrase-DNA complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 126–127 (1993).
49. V. E. Anderson, T. D. Gootz, N. Osheroff, Topoisomerase IV catalysis and the mechanism of quinolone Action. *J. Biol. Chem.* **273**, 17879–17885 (1998).
50. X.-Z. Li, P. Plésiat, H. Nikaido, The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-Negative bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* **28**, 337–418 (2015).
51. R. E. W. Hancock, The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends Microbiol.* **5**, 37–42 (1997).
52. H. Nikaido, Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 3905–3908 (1994).

53. H. Nikaido, Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*. **264**, 382–388 (1994).
54. A. Kumar, H. P. Schweizer, Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **57**, 1486–1513 (2005).
55. M. N. Alekshun, S. B. Levy, The *mar* regulon: multiple resistance to antibiotics and other toxic chemicals. *Trends Microbiol.* **7**, 410–413 (1999).
56. E. W. Yu, J. R. Aires, H. Nikaido, AcrB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*: composite substrate-binding cavity of exceptional flexibility generates its extremely wide substrate specificity. *J. Bacteriol.* **185**, 5657–5664 (2003).
57. E. W. Yu, J. R. Aires, G. McDermott, H. Nikaido, A periplasmic drug-binding site of the AcrB multidrug efflux pump: a crystallographic and site-directed mutagenesis study. *J. Bacteriol.* **187**, 6804–6815 (2005).
58. X.-Z. Li, H. Nikaido, Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*. **64**, 159–204 (2004).
59. J. H. Chou, J. T. Greenberg, B. Dimple, Posttranscriptional repression of *Escherichia coli* OmpF protein in response to redox stress: positive control of the *micF* antisense RNA by the *soxRS* locus. *J. Bacteriol.* **175**, 1026–1031 (1993).
60. K. Poole, Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. *Ann. Med.* **39**, 162–176 (2007).
61. J. D. Goldman, D. G. White, S. B. Levy, Multiple antibiotic resistance (*mar*) locus protects *Escherichia coli* from rapid cell killing by fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 1266–1269 (1996).
62. R. Singh *et al.*, Temporal interplay between efflux pumps and target mutations in development of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 1680–1685 (2012).
63. L. Martínez-Martínez, A. Pascual, G. A. Jacoby, Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*. **351**, 797–799 (1998).
64. J. H. Tran, G. A. Jacoby, Mechanism of plasmid-mediated quinolone resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 5638–5642 (2002).
65. A. Robicsek, G. A. Jacoby, D. C. Hooper, The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect. Dis.* **6**, 629–640 (2006).
66. G. A. Jacoby, J. Strahilevitz, D. C. Hooper, Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Microbiol. Spectr.* **2** (2014), doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0006-2013.

67. J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, D. C. Hooper, A. Robicsek, Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **22**, 664–689 (2009).
68. C. Negrei, D. Boda, in *Trends in Helicobacter pylori Infection*, B. M. Roesler, Ed. (InTech, Rijeka, 2014; <http://dx.doi.org/10.5772/57081>).
69. C. Kehrenberg, S. Friederichs, A. de Jong, G. B. Michael, S. Schwarz, Identification of the plasmid-borne quinolone resistance gene *qnrS* in *Salmonella enterica* serovar Infantis. *J. Antimicrob. Chemother.* **58**, 18–22 (2006).
70. G. A. Jacoby *et al.*, *qnrB*, Another plasmid-mediated gene for quinolone resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1178–1182 (2006).
71. M. Wang *et al.*, New plasmid-mediated quinolone resistance gene, *qnrC*, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1892–1897 (2009).
72. L. M. Cavaco, H. Hasman, S. Xia, F. M. Aarestrup, *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* Serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 603–608 (2009).
73. R. Xia, X. Guo, Y. Zhang, H. Xu, *qnrVC*-like gene located in a novel complex class 1 integron harboring the ISCR1 element in an *Aeromonas punctata* strain from an aquatic environment in Shandong Province, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3471–3474 (2010).
74. M. B. Sánchez, A. Hernández, J. M. Rodríguez-Martínez, L. Martínez-Martínez, J. L. Martínez, Predictive analysis of transmissible quinolone resistance indicates *Stenotrophomonas maltophilia* as a potential source of a novel family of Qnr determinants. *BMC Microbiol.* **8**, 148 (2008).
75. G. A. Jacoby, D. C. Hooper, Phylogenetic analysis of chromosomally determined Qnr and related proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1930–1934 (2013).
76. S. Arsène, R. Leclercq, Role of a *qnr*-like gene in the intrinsic resistance of *Enterococcus faecalis* to fluoroquinolones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3254 (2007).
77. J. M. Rodríguez-Martínez *et al.*, Qnr-like pentapeptide repeat proteins in Gram-positive bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 1240–1243 (2008).
78. L. Poirel, J.-M. Rodríguez-Martínez, H. Mammeri, A. Liard, P. Nordmann, Origin of plasmid-mediated quinolone resistance determinant QnrA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3523–3525 (2005).

79. H. Nikaido, Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593–656 (2003).
80. D. L. Paterson *et al.*, Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. *Clin. Infect. Dis.* **30**, 473–478 (2000).
81. E. Lautenbach *et al.*, Epidemiological investigation of fluoroquinolone resistance in infections due to extended-spectrum  $\beta$ -Lactamase—producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 1288–1294 (2001).
82. M. Wang *et al.*, Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2242–2248 (2003).
83. P. Andres *et al.*, Differential distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical Enterobacteria with unusual phenotypes of quinolone susceptibility from Argentina. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 2467–2475 (2013).
84. J. W. P. Teo, K. Y. Ng, R. T. P. Lin, Detection and genetic characterisation of *qnrB* in hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **33**, 177–180 (2009).
85. Y.-T. Chen *et al.*, Mobilization of *qnrB2* and ISCR1 in plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1235–1237 (2009).
86. C. Velasco *et al.*, *Smaqnr*, a new chromosome-encoded quinolone resistance determinant in *Serratia marcescens*. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 239–242 (2010).
87. V. Cattoir, L. Poirel, D. Mazel, C.-J. Soussy, P. Nordmann, *Vibrio splendidus* as the source of plasmid-mediated *qnrS*-like quinolone resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2650–2651 (2007).
88. L. Poirel, A. Liard, J.-M. Rodriguez-Martinez, P. Nordmann, *Vibrionaceae* as a possible source of *qnr*-like quinolone resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 1118–1121 (2005).
89. V. Cattoir, L. Poirel, C. Aubert, C.-J. Soussy, P. Nordmann, Unexpected occurrence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in environmental *Aeromonas* spp. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 231–237 (2008).
90. C. Kehrenberg, K. L. Hopkins, E. J. Threlfall, S. Schwarz, Complete nucleotide sequence of a small *qnrS1*-carrying plasmid from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhimurium DT193. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 903–905 (2007).

91. M. Hata *et al.*, Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 801–803 (2005).
92. É. L. da Fonseca, A. C. P. Vicente, Spread of the *qnrVC* quinolone resistance determinant in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 457–457 (2011).
93. K. Wu *et al.*, Class 1 integron gene cassettes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria in southern China. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **40**, 264–267 (2012).
94. H. B. Kim *et al.*, Transferable quinolone resistance in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 799–803 (2010).
95. K. Vinothkumar, G. N. Kumar, A. K. Bhardwaj, Characterization of *Vibrio fluvialis qnrVC5* gene in native and heterologous hosts: synergy of *qnrVC5* with other determinants in conferring quinolone resistance. *Front. Microbiol.* **7** (2016), doi:10.3389/fmicb.2016.00146.
96. É. L. Fonseca, F. dos Santos Freitas, V. V. Vieira, A. C. P. Vicente, New *qnr* gene cassettes associated with superintegron repeats in *Vibrio cholerae* O1. *Emerg. Infect. Dis.* **14**, 1129–1131 (2008).
97. P. Kumar, S. Thomas, Presence of *qnrVC3* gene cassette in SXT and class 1 integrons of *Vibrio cholerae*. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **37**, 280–281 (2011).
98. M. W. Vetting *et al.*, The pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry (Mosc.)*. **45**, 1–10 (2006).
99. E. Cambau, T. Guillard, Antimicrobials that affect the synthesis and conformation of nucleic acids. *Rev. Sci. Tech. OIE.* **31**, 77–87 (2012).
100. M. W. Vetting *et al.*, Structure of QnrB1, a plasmid-mediated fluoroquinolone resistance factor. *J. Biol. Chem.* **286**, 25265–25273 (2011).
101. S. S. Hegde, M. W. Vetting, L. A. Mitchenall, A. Maxwell, J. S. Blanchard, Structural and biochemical analysis of the pentapeptide repeat protein EfsQnr, a potent DNA gyrase inhibitor. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 110–117 (2011).
102. X. Xiong, E. H. C. Bromley, P. Oelschlaeger, D. N. Woolfson, J. Spencer, Structural insights into quinolone antibiotic resistance mediated by pentapeptide repeat proteins: conserved surface loops direct the activity of a Qnr protein from a Gram-negative bacterium. *Nucleic Acids Res.* **39**, 3917–3927 (2011).
103. M. C. Garrido, M. Herrero, R. Kolter, F. Moreno, The export of the DNA replication inhibitor Microcin B17 provides immunity for the host cell. *EMBO J.* **7**, 1853–1862 (1988).

104. C. Montero, G. Mateu, R. Rodriguez, H. Takiff, Intrinsic Resistance of *Mycobacterium smegmatis* to Fluoroquinolones May Be Influenced by New Pentapeptide Protein MfpA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 3387–3392 (2001).
105. S. S. Hegde *et al.*, A Fluoroquinolone Resistance Protein from *Mycobacterium tuberculosis* That Mimics DNA. *Science.* **308**, 1480–1483 (2005).
106. A. Mérens *et al.*, The Pentapeptide Repeat Proteins MfpAMt and QnrB4 Exhibit Opposite Effects on DNA Gyrase Catalytic Reactions and on the Ternary Gyrase-DNA-Quinolone Complex. *J. Bacteriol.* **191**, 1587–1594 (2009).
107. Z. Baharoglu, D. Mazel, SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol. Rev.* **38**, 1126–1145 (2014).
108. S. Da Re *et al.*, The SOS response promotes qnrB quinolone-resistance determinant expression. *EMBO Rep.* **10**, 929–933 (2009).
109. M. Wang, G. A. Jacoby, D. M. Mills, D. C. Hooper, SOS Regulation of qnrB Expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 821–823 (2009).
110. H. B. Kim, C. H. Park, M. Gavin, G. A. Jacoby, D. C. Hooper, Cold Shock Induces qnrA Expression in *Shewanella* algae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 414–416 (2011).
111. A. Briales *et al.*, Exposure to diverse antimicrobials induces the expression of qnrB1, qnrD and smaqr genes by SOS-dependent regulation. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**, 2854–2859 (2012).
112. A. Robicsek *et al.*, Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat. Med.* **12**, 83–88 (2006).
113. M. Perilli *et al.*, Evidence for qnrB1 and aac(6′)-Ib-cr in CTX-M-15–producing uropathogenic Enterobacteriaceae in an Italian teaching hospital. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **64**, 90–93 (2009).
114. J. D. D. Pitout, Y. Wei, D. L. Church, D. B. Gregson, Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of aac(6′)-Ib-cr. *J. Antimicrob. Chemother.* **61**, 999–1002 (2008).
115. G. L. Jones *et al.*, Prevalence and distribution of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of *Escherichia coli* lacking extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 1245–1251 (2008).
116. P. J. Baudry *et al.*, Mechanisms of resistance and mobility among multidrug-resistant CTX-M–producing *Escherichia coli* from Canadian intensive care units: the 1st report of QepA in North America. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **63**, 319–326 (2009).

117. S. Sabtcheva, M. Kaku, T. Saga, Y. Ishii, T. Kantardjiev, High Prevalence of the *aac(6′)-Ib-cr* Gene and Its Dissemination among Enterobacteriaceae Isolates by CTX-M-15 Plasmids in Bulgaria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 335–336 (2009).
118. T. Guillard *et al.*, Ciprofloxacin Treatment Failure in a Murine Model of Pyelonephritis Due to an AAC(6′)-Ib-cr-Producing *Escherichia coli* Strain Susceptible to Ciprofloxacin In Vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 5830–5835 (2013).
119. E. Literacka *et al.*, blaCTX-M Genes in *Escherichia coli* Strains from Croatian Hospitals Are Located in New (blaCTX-M-3a) and Widely Spread (blaCTX-M-3a and blaCTX-M-15) Genetic Structures. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 1630–1635 (2009).
120. J. Ruiz, M. J. Pons, C. Gomes, Transferable mechanisms of quinolone resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **40**, 196–203 (2012).
121. C. H. Park, A. Robicsek, G. A. Jacoby, D. Sahm, D. C. Hooper, Prevalence in the United States of *aac(6′)-Ib-cr* Encoding a Ciprofloxacin-Modifying Enzyme. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3953–3955 (2006).
122. J. Yang *et al.*, Characterization of clinical *Escherichia coli* isolates from China containing transferable quinolone resistance determinants. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**, 453–459 (2010).
123. E. Ruiz *et al.*, New genetic environments of *aac(6′)-Ib-cr* gene in a multiresistant *Klebsiella oxytoca* strain causing an outbreak in a pediatric intensive care unit. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **69**, 236–238 (2011).
124. K. Yamane *et al.*, New Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Efflux Pump, QepA, Found in an *Escherichia coli* Clinical Isolate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3354–3360 (2007).
125. B. Périchon *et al.*, Sequence of Conjugative Plasmid pIP1206 Mediating Resistance to Aminoglycosides by 16S rRNA Methylation and to Hydrophilic Fluoroquinolones by Efflux. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 2581–2592 (2008).
126. A. H. Sørensen, L. H. Hansen, E. Johannesen, S. J. Sørensen, Conjugative Plasmid Conferring Resistance to Olaquinox. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 798 (2003).
127. L. H. Hansen, E. Johannesen, M. Burmølle, A. H. Sørensen, S. J. Sørensen, Plasmid-Encoded Multidrug Efflux Pump Conferring Resistance to Olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 3332–3337 (2004).
128. L. H. Hansen, L. B. Jensen, H. I. Sørensen, S. J. Sørensen, Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 145–147 (2007).

129. S. De Majumdar, M. Veleba, S. Finn, S. Fanning, T. Schneiders, Elucidating the Regulon of Multidrug Resistance Regulator RarA in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 1603–1609 (2013).
130. M. Veleba, P. G. Higgins, G. Gonzalez, H. Seifert, T. Schneiders, Characterization of RarA, a Novel AraC Family Multidrug Resistance Regulator in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 4450–4458 (2012).
131. H. B. Kim *et al.*, oqxAB Encoding a Multidrug Efflux Pump in Human Clinical Isolates of Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3582–3584 (2009).
132. A. Norman, L. H. Hansen, Q. She, S. J. Sørensen, Nucleotide sequence of pOLA52: A conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. *Plasmid.* **60**, 59–74 (2008).
133. J. Zhao *et al.*, Prevalence and Dissemination of oqxAB in *Escherichia coli* Isolates from Animals, Farmworkers, and the Environment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 4219–4224 (2010).
134. M. H. Y. Wong, S. Chen, First Detection of oqxAB in *Salmonella* spp. Isolated from Food. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**, 658–660 (2013).
135. L. Li *et al.*, Spread of oqxAB in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium predominantly by IncHI2 plasmids. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 2263–2268 (2013).
136. S. Zhang *et al.*, Prevalence and Plasmid Characterization of the qnrD Determinant in Enterobacteriaceae Isolated from Animals, Retail Meat Products, and Humans. *Microb. Drug Resist.* **19**, 331–335 (2013).
137. T. Guillard *et al.*, Description of a 2,683-Base-Pair Plasmid Containing qnrD in Two *Providencia rettgeri* Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 565–568 (2012).
138. A. Mazzariol *et al.*, Description and plasmid characterization of qnrD determinants in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii*. *Clin. Microbiol. Infect.* **18**, E46–E48 (2012).
139. E. Schultz *et al.*, Complete sequences of qnrD-carrying plasmids in *Proteus* spp. collected from French animals. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **10**, 306–307 (2017).
140. H. Abgottspon, K. Zurfluh, M. Nüesch-Inderbinen, H. Hächler, R. Stephan, Quinolone Resistance Mechanisms in *Salmonella enterica* Serovars Hadar, Kentucky, Virchow, Schwarzengrund, and 4,5,12:i:-, Isolated from Humans in Switzerland, and Identification of a Novel qnrD Variant, qnrD2, in S. Hadar. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 3560–3563 (2014).

141. E. Albornoz *et al.*, Analysis of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical isolates of the tribe Proteeae from Argentina: First report of qnrD in the Americas. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2**, 322–326 (2014).
142. L. Chen *et al.*, Description and plasmid characterization of the qnrD determinant in Proteeae in Wenzhou, Southern China. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **51**, 115–122 (2018).
143. T. Guillard *et al.*, Mobile Insertion Cassette Elements Found in Small Non-Transmissible Plasmids in Proteeae May Explain qnrD Mobilization. *PLoS ONE*. **9** (2014), doi:10.1371/journal.pone.0087801.
144. M. R. Galac, B. P. Lazzaro, Comparative pathology of bacteria in the genus *Providencia* to a natural host, *Drosophila melanogaster*. *Microbes Infect. Inst. Pasteur.* **13**, 673–683 (2011).
145. D. O. Ogbolu, O. A. Daini, A. Ogunledun, A. O. Alli, M. A. Webber, High levels of multidrug resistance in clinical isolates of Gram-negative pathogens from Nigeria. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **37**, 62–66 (2011).
146. J. Zhao, H. Dang, Coastal Seawater Bacteria Harbor a Large Reservoir of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinants in Jiaozhou Bay, China. *Microb. Ecol.* **64**, 187–199 (2012).
147. M. Radman, SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. *Basic Life Sci.* **5A**, 355–367 (1975).
148. H. Weber, T. Polen, J. Heuveling, V. F. Wendisch, R. Hengge, Genome-Wide Analysis of the General Stress Response Network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -Dependent Genes, Promoters, and Sigma Factor Selectivity. *J. Bacteriol.* **187**, 1591–1603 (2005).
149. H. Merrikh, A. E. Ferrazzoli, S. T. Lovett, Growth phase and (p)ppGpp control of IraD, a regulator of RpoS stability, in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **191**, 7436–7446 (2009).
150. P. C. Loewen, B. Hu, J. Strutinsky, R. Sparling, Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **44**, 707–717 (1998).
151. B. Michel, After 30 Years of Study, the Bacterial SOS Response Still Surprises Us. *PLOS Biol.* **3**, e255 (2005).
152. I. Erill, S. Campoy, J. Barbé, Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 637–656 (2007).
153. B. Michel, H. Boubakri, Z. Baharoglu, M. LeMasson, R. Lestini, Recombination proteins and rescue of arrested replication forks. *DNA Repair.* **6**, 967–980 (2007).

154. J. Courcelle, A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown, P. C. Hanawalt, Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics*. **158**, 41–64 (2001).
155. T. M. Hill, B. Sharma, M. Valjavec-Gratian, J. Smith, sfi-independent filamentation in *Escherichia coli* Is *lexA* dependent and requires DNA damage for induction. *J. Bacteriol.* **179**, 1931–1939 (1997).
156. M. Butala, D. Žgur-Bertok, S. J. W. Busby, The bacterial LexA transcriptional repressor. *Cell. Mol. Life Sci.* **66**, 82 (2009).
157. J. T. Wade, N. B. Reppas, G. M. Church, K. Struhl, Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. *Genes Dev.* **19**, 2619–2630 (2005).
158. A. R. Fernández De Henestrosa *et al.*, Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **35**, 1560–1572 (2000).
159. A. Tapias, S. Fernández, J. C. Alonso, J. Barbé, *Rhodobacter sphaeroides* LexA has dual activity: optimising and repressing *recA* gene transcription. *Nucleic Acids Res.* **30**, 1539–1546 (2002).
160. G. Mazón *et al.*, Reconstruction of the evolutionary history of the LexA-binding sequence. *Microbiol. Read. Engl.* **150**, 3783–3795 (2004).
161. L. S. Fonseca *et al.*, *Leptospira interrogans* serovar *copenhageni* harbors two *lexA* genes involved in SOS response. *PloS One.* **8**, e76419 (2013).
162. G. Mazón, S. Campoy, I. Erill, J. Barbé, Identification of the *Acidobacterium capsulatum* LexA box reveals a lateral acquisition of the Alphaproteobacteria *lexA* gene. *Microbiol. Read. Engl.* **152**, 1109–1118 (2006).
163. K. W. Winterling *et al.*, The *Bacillus subtilis* DinR Binding Site: Redefinition of the Consensus Sequence. *J. Bacteriol.* **180**, 2201–2211 (1998).
164. A. R. Fernández de Henestrosa, J. Cuñé, I. Erill, J. K. Magnuson, J. Barbé, A Green Nonsulfur Bacterium, *Dehalococcoides ethenogenes*, with the LexA Binding Sequence Found in Gram-Positive Organisms. *J. Bacteriol.* **184**, 6073–6080 (2002).
165. E. O. Davis, E. M. Dullaghan, L. Rand, Definition of the mycobacterial SOS box and use to identify LexA-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **184**, 3287–3295 (2002).
166. F. Khan, S. P. Singh, B. N. Mishra, Conservation of the LexA repressor binding site in *Deinococcus radiodurans*. *J. Integr. Bioinforma.* **5** (2008), doi:10.2390/biecoll-jib-2008-86.

167. G. Cambray *et al.*, Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons. *Mob. DNA*. **2**, 6 (2011).
168. A. Sancar, W. D. Rupp, A novel repair enzyme: UVRABC excision nuclease of *Escherichia coli* cuts a DNA strand on both sides of the damaged region. *Cell*. **33**, 249–260 (1983).
169. K. Kumura, M. Sekiguchi, A. L. Steinum, E. Seeberg, Stimulation of the UvrABC enzyme-catalyzed repair reactions by the UvrD protein (DNA helicase II). *Nucleic Acids Res.* **13**, 1483–1492 (1985).
170. I. Husain, B. Van Houten, D. C. Thomas, M. Abdel-Monem, A. Sancar, Effect of DNA polymerase I and DNA helicase II on the turnover rate of UvrABC excision nuclease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **82**, 6774–6778 (1985).
171. M. F. Goodman, R. Woodgate, Translesion DNA Polymerases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5** (2013), doi:10.1101/cshperspect.a010363.
172. P. McGlynn, N. J. Savery, M. S. Dillingham, The conflict between DNA replication and transcription. *Mol. Microbiol.* **85**, 12–20 (2012).
173. Z. Baharoglu, A. Babosan, D. Mazel, Identification of genes involved in low aminoglycoside-induced SOS response in *Vibrio cholerae*: a role for transcription stalling and Mfd helicase. *Nucleic Acids Res.* **42**, 2366–2379 (2014).
174. S. D. Re, M.-C. Ploy, Antibiotiques et réponse SOS bactérienne - Une voie efficace d'acquisition des résistances aux antibiotiques. *médecine/sciences*. **28**, 179–184 (2012).
175. S. Fujii, A. Isogawa, R. P. Fuchs, RecFOR proteins are essential for Pol V-mediated translesion synthesis and mutagenesis. *EMBO J.* **25**, 5754–5763 (2006).
176. S. Rangarajan, R. Woodgate, M. F. Goodman, Replication restart in UV-irradiated *Escherichia coli* involving pols II, III, V, PriA, RecA and RecFOR proteins. *Mol. Microbiol.* **43**, 617–628 (2002).
177. E. S. Henle *et al.*, Sequence-specific DNA Cleavage by Fe<sup>2+</sup>-mediated Fenton Reactions Has Possible Biological Implications. *J. Biol. Chem.* **274**, 962–971 (1999).
178. J. A. Imlay, Pathways of Oxidative Damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 395–418 (2003).
179. A. A. M. Al Mamun, S. Gautam, M. Z. Humayun, Hypermutagenesis in *mutA* cells is mediated by mistranslational corruption of polymerase, and is accompanied by replication fork collapse. *Mol. Microbiol.* **62**, 1752–1763 (2006).

180. Z. Baharoglu, E. Krin, D. Mazel, RpoS Plays a Central Role in the SOS Induction by Sub-Lethal Aminoglycoside Concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* **9** (2013), doi:10.1371/journal.pgen.1003421.
181. I. I. Lobysheva, M. V. Stupakova, V. D. Mikoyan, S. V. Vasilieva, A. F. Vanin, Induction of the SOS DNA repair response in *Escherichia coli* by nitric oxide donating agents: dinitrosyl iron complexes with thiol-containing ligands and S-nitrosothiols. *FEBS Lett.* **454**, 177–180 (1999).
182. T. Nakano *et al.*, Repair activity of base and nucleotide excision repair enzymes for guanine lesions induced by nitrosative stress. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2181–2191 (2005).
183. T. Nakano, K. Asagoshi, H. Terato, T. Suzuki, H. Ide, Assessment of the genotoxic potential of nitric oxide-induced guanine lesions by in vitro reactions with *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Mutagenesis.* **20**, 209–216 (2005).
184. A. R. Richardson *et al.*, The Base Excision Repair System of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Counteracts DNA Damage by Host Nitric Oxide. *PLoS Pathog.* **5** (2009), doi:10.1371/journal.ppat.1000451.
185. R. W. Sobol, For MutY, It's All about the OG. *Chem. Biol.* **19**, 313–314 (2012).
186. T. Tajiri, H. Maki, M. Sekiguchi, Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res. Repair.* **336**, 257–267 (1995).
187. K. G. Au, S. Clark, J. H. Miller, P. Modrich, *Escherichia coli* mutY gene encodes an adenine glycosylase active on G-A mispairs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 8877–8881 (1989).
188. J. J. Foti, B. Devadoss, J. A. Winkler, J. J. Collins, G. C. Walker, Oxidation of the Guanine Nucleotide Pool Underlies Cell Death by Bactericidal Antibiotics. *Science.* **336**, 315–319 (2012).
189. E. Rotman, A. Kuzminov, The mutT Defect Does Not Elevate Chromosomal Fragmentation in *Escherichia coli* Because of the Surprisingly Low Levels of MutM/MutY-Recognized DNA Modifications. *J. Bacteriol.* **189**, 6976–6988 (2007).
190. C. Darrigo, E. Guillemet, R. Dervyn, N. Ramarao, The Bacterial Mfd Protein Prevents DNA Damage Induced by the Host Nitrogen Immune Response in a NER-Independent but RecBC-Dependent Pathway. *PLOS ONE.* **11**, e0163321 (2016).
191. K. G. Newmark, E. K. O'Reilly, J. R. Pohlhaus, K. N. Kreuzer, Genetic analysis of the requirements for SOS induction by nalidixic acid in *Escherichia coli*. *Gene.* **356**, 69–76 (2005).

192. C. S. Lewin, S. G. B. Amyes, The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim. *J. Med. Microbiol.* **34**, 329–332 (1991).
193. Z. Baharoglu, D. Mazel, *Vibrio cholerae* Triggers SOS and Mutagenesis in Response to a Wide Range of Antibiotics: a Route towards Multiresistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 2438–2441 (2011).
194. M. A. Kohanski, M. A. DePristo, J. J. Collins, Sub-lethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. *Mol. Cell.* **37**, 311–320 (2010).
195. K. J. Shaw *et al.*, Comparison of the Changes in Global Gene Expression of *Escherichia coli* Induced by Four Bactericidal Agents. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **5**, 105–122 (2003).
196. S. H. Gillespie, S. Basu, A. L. Dickens, D. M. O’Sullivan, T. D. McHugh, Effect of subinhibitory concentrations of ciprofloxacin on *Mycobacterium fortuitum* mutation rates. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 344–348 (2005).
197. E. Maiques *et al.*,  $\beta$ -Lactam Antibiotics Induce the SOS Response and Horizontal Transfer of Virulence Factors in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **188**, 2726–2729 (2006).
198. T. Dörr, K. Lewis, M. Vulić, SOS Response Induces Persistence to Fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* **5** (2009), doi:10.1371/journal.pgen.1000760.
199. Q. Chang, W. Wang, G. Regev-Yochay, M. Lipsitch, W. P. Hanage, Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evol. Appl.* **8**, 240–247 (2015).
200. P. C. Collignon *et al.*, World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies to Control Antimicrobial Resistance From Food Animal Production. *Clin. Infect. Dis.* **63**, 1087–1093 (2016).
201. J. A. Paulson, T. E. Zaoutis, T. C. on E. Health, T. C. on I. Diseases, Nontherapeutic Use of Antimicrobial Agents in Animal Agriculture: Implications for Pediatrics. *Pediatrics.* **136**, e1670–e1677 (2015).
202. A. A. Salyers, An Overview of the Genetic Basis of Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Implications for Agriculture. *Anim. Biotechnol.* **13**, 1–5 (2002).
203. Y. You, E. K. Silbergeld, Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. *Front. Microbiol.* **5** (2014), doi:10.3389/fmicb.2014.00284.

204. K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment--a review--part II. *Chemosphere*. **75**, 435–441 (2009).
205. E. Kristiansson *et al.*, Pyrosequencing of Antibiotic-Contaminated River Sediments Reveals High Levels of Resistance and Gene Transfer Elements. *PLOS ONE*. **6**, e17038 (2011).
206. H. Gotoh, N. Kasaraneni, N. Devineni, S. F. Dallo, T. Weitao, SOS involvement in stress-inducible biofilm formation. *Biofouling*. **26**, 603–611 (2010).
207. H. C. Sutton, C. C. Winterbourn, On the participation of higher oxidation states of iron and copper in fenton reactions. *Free Radic. Biol. Med.* **6**, 53–60 (1989).
208. C. F. Kuo, T. Mashino, I. Fridovich, alpha, beta-Dihydroxyisovalerate dehydratase. A superoxide-sensitive enzyme. *J. Biol. Chem.* **262**, 4724–4727 (1987).
209. F. Hutchinson, in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, W. E. Cohn, K. Moldave, Eds. (Academic Press, 1985; <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079660308603475>), vol. 32, pp. 115–154.
210. M. Dizdaroglu, G. Rao, B. Halliwell, E. Gajewski, Damage to the DNA bases in mammalian chromatin by hydrogen peroxide in the presence of ferric and cupric ions. *Arch. Biochem. Biophys.* **285**, 317–324 (1991).
211. M. Hogg, S. S. Wallace, S. Doublé, Bumps in the road: how replicative DNA polymerases see DNA damage. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **15**, 86–93 (2005).
212. K. M. Schaich, D. C. Borg, Fenton reactions in lipid phases. *Lipids*. **23**, 570–579 (1988).
213. S. P. Bernier *et al.*, Starvation, Together with the SOS Response, Mediates High Biofilm-Specific Tolerance to the Fluoroquinolone Ofloxacin. *PLOS Genet.* **9**, e1003144 (2013).
214. R. S. Mueller *et al.*, Proteome changes in the initial bacterial colonist during ecological succession in an acid mine drainage biofilm community. *Environ. Microbiol.* **13**, 2279–2292 (2011).
215. G. Yim, J. McClure, M. G. Surette, J. E. Davies, Modulation of Salmonella gene expression by subinhibitory concentrations of quinolones. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **64**, 73–78 (2011).
216. M. Goswami, S. H. Mangoli, N. Jawali, Involvement of Reactive Oxygen Species in the Action of Ciprofloxacin against Escherichia coli. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 949–954 (2006).

217. D. J. Dwyer, M. A. Kohanski, B. Hayete, J. J. Collins, Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Syst. Biol.* **3**, 91 (2007).
218. G. V. Smirnova, A. V. Tyulenev, N. G. Muzyka, M. A. Peters, O. N. Oktyabrsky, Ciprofloxacin provokes SOS-dependent changes in respiration and membrane potential and causes alterations in the redox status of *Escherichia coli*. *Res. Microbiol.* **168**, 64–73 (2017).
219. D. J. Betteridge, What is oxidative stress? *Metab. - Clin. Exp.* **49**, 3–8 (2000).
220. Z. N. Kashmiri, S. A. Mankar, Free radicals and oxidative stress in bacteria, *7* (2014).
221. A. Naqui, B. Chance, and E. Cadenas, Reactive Oxygen Intermediates in Biochemistry. *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 137–166 (1986).
222. L. Kussmaul, J. Hirst, The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 7607–7612 (2006).
223. K. R. Messner, J. A. Imlay, The Identification of Primary Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation in the Aerobic Respiratory Chain and Sulfite Reductase Complex of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **274**, 10119–10128 (1999).
224. S. B. Farr, T. Kogoma, Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**, 561–585 (1991).
225. J. A. Imlay, Pathways of Oxidative Damage. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**, 395–418 (2003).
226. A. Ligeza, A. N. Tikhonov, J. S. Hyde, W. K. Subczynski, Oxygen permeability of thylakoid membranes: electron paramagnetic resonance spin labeling study. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* **1365**, 453–463 (1998).
227. V. Massey *et al.*, The production of superoxide anion radicals in the reaction of reduced flavins and flavoproteins with molecular oxygen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **36**, 891–897 (1969).
228. S. Korshunov, J. A. Imlay, Detection and Quantification of Superoxide Formed within the Periplasm of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 6326–6334 (2006).
229. D. J. Dwyer, J. J. Collins, G. C. Walker, Unraveling the Physiological Complexities of Antibiotic Lethality. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **55**, 313–332 (2015).

230. B. H. J. Bielski, H. W. Richter, A study of the superoxide radical chemistry by stopped-flow radiolysis and radiation induced oxygen consumption. *J. Am. Chem. Soc.* **99**, 3019–3023 (1977).
231. J. A. Imlay, Diagnosing oxidative stress in bacteria: not as easy as you might think. *Curr. Opin. Microbiol.* **24**, 124–131 (2015).
232. K. M. Schaich, D. C. Borg, Fenton reactions in lipid phases: iron solubility, .OH production, and initiation of lipid oxidation. *Basic Life Sci.* **49**, 153–156 (1988).
233. Schaich Karen M., Thinking outside the classical chain reaction box of lipid oxidation. *Lipid Technol.* **24**, 55–58 (2012).
234. K. J. Davies, Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J. Biol. Chem.* **262**, 9895–9901 (1987).
235. K. J. Davies, M. E. Delsignore, S. W. Lin, Protein damage and degradation by oxygen radicals. II. Modification of amino acids. *J. Biol. Chem.* **262**, 9902–9907 (1987).
236. K. J. Davies, M. E. Delsignore, Protein damage and degradation by oxygen radicals. III. Modification of secondary and tertiary structure. *J. Biol. Chem.* **262**, 9908–9913 (1987).
237. K. J. Davies, S. W. Lin, R. E. Pacifici, Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J. Biol. Chem.* **262**, 9914–9920 (1987).
238. S. Dukan *et al.*, Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 5746–5749 (2000).
239. J. A. Imlay, Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu. Rev. Biochem.* **77**, 755–776 (2008).
240. L. T. Benov, I. Fridovich, Escherichia coli expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **269**, 25310–25314 (1994).
241. J. M. McCord, I. Fridovich, Superoxide Dismutase AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049–6055 (1969).
242. E. C. Niederhoffer, C. M. Naranjo, K. L. Bradley, J. A. Fee, Control of Escherichia coli superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by the ferric uptake regulation (fur) locus. *J. Bacteriol.* **172**, 1930 (1990).
243. L. C. Seaver, J. A. Imlay, Alkyl Hydroperoxide Reductase Is the Primary Scavenger of Endogenous Hydrogen Peroxide in Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **183**, 7173–7181 (2001).

244. L. C. Seaver, J. A. Imlay, Are respiratory enzymes the primary sources of intracellular hydrogen peroxide? *J. Biol. Chem.* **279**, 48742–48750 (2004).
245. M. F. Christman, G. Storz, B. N. Ames, OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 3484 (1989).
246. H. E. Schellhorn, H. M. Hassan, Transcriptional regulation of *katE* in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **170**, 4286–4292 (1988).
247. M. K. Cha, H. K. Kim, I. H. Kim, Mutation and Mutagenesis of thiol peroxidase of *Escherichia coli* and a new type of thiol peroxidase family. *J. Bacteriol.* **178**, 5610–5614 (1996).
248. W. Jeong, M.-K. Cha, I.-H. Kim, Thioredoxin-dependent Hydroperoxide Peroxidase Activity of Bacterioferritin Comigratory Protein (BCP) as a New Member of the Thiol-specific Antioxidant Protein (TSA)/Alkyl Hydroperoxide Peroxidase C (AhpC) Family. *J. Biol. Chem.* **275**, 2924–2930 (2000).
249. F. A. Arenas *et al.*, The *Escherichia coli* BtuE Protein Functions as a Resistance Determinant against Reactive Oxygen Species. *PLoS ONE.* **6** (2011), doi:10.1371/journal.pone.0015979.
250. J. Moskovitz *et al.*, *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J. Bacteriol.* **177**, 502–507 (1995).
251. J. Moskovitz, Methionine sulfoxide reductases: ubiquitous enzymes involved in antioxidant defense, protein regulation, and prevention of aging-associated diseases. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics.* **1703**, 213–219 (2005).
252. B. Halliwell, J. M. Gutteridge, Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* **219**, 1–14 (1984).
253. M. L. Guerinot, Microbial Iron Transport. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 743–772 (1994).
254. K. Keyer, J. A. Imlay, Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13635–13640 (1996).
255. I. Kullik, M. B. Toledano, L. A. Tartaglia, G. Storz, Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for oxidation and transcriptional activation. *J. Bacteriol.* **177**, 1275–1284 (1995).

256. K. Tao, K. Makino, S. Yonei, A. Nakata, H. Shinagawa, Molecular cloning and nucleotide sequencing of *oxyR*, the positive regulatory gene of a regulon for an adaptive response to oxidative stress in *Escherichia coli*: Homologies between OxyR protein and a family of bacterial activator proteins. *Mol. Gen. Genet. MGG.* **218**, 371–376 (1989).
257. M. Zheng *et al.*, DNA Microarray-Mediated Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Response to Hydrogen Peroxide. *J. Bacteriol.* **183**, 4562–4570 (2001).
258. S. Altuvia, D. Weinstein-Fischer, A. Zhang, L. Postow, G. Storz, A Small, Stable RNA Induced by Oxidative Stress: Role as a Pleiotropic Regulator and Antimutator. *Cell.* **90**, 43–53 (1997).
259. G. Storz, L. A. Tartaglia, B. N. Ames, Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science.* **248**, 189–194 (1990).
260. M. B. Toledano *et al.*, Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: A mechanism for differential promoter selection. *Cell.* **78**, 897–909 (1994).
261. M. F. Christman, R. W. Morgan, F. S. Jacobson, B. N. Ames, Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell.* **41**, 753–762 (1985).
262. B. González-Flecha, B. Demple, Homeostatic regulation of intracellular hydrogen peroxide concentration in aerobically growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179**, 382–388 (1997).
263. P. J. Pomposiello, M. H. J. Bennik, B. Demple, Genome-Wide Transcriptional Profiling of the *Escherichia coli* Responses to Superoxide Stress and Sodium Salicylate. *J. Bacteriol.* **183**, 3890–3902 (2001).
264. Korshunov Sergei S., Imlay James A., A potential role for periplasmic superoxide dismutase in blocking the penetration of external superoxide into the cytosol of Gram-negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **43**, 95–106 (2002).
265. T. Nunoshiba, E. Hidalgo, Z. Li, B. Demple, Negative autoregulation by the *Escherichia coli* SoxS protein: a dampening mechanism for the soxRS redox stress response. *J. Bacteriol.* **175**, 7492–7494 (1993).
266. J. T. Greenberg, P. Monach, J. H. Chou, P. D. Josephy, B. Demple, Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **87**, 6181–6185 (1990).
267. I. R. Tsaneva, B. Weiss, soxR, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **172**, 4197–4205 (1990).

268. E. Hidalgo, B. Demple, An iron-sulfur center essential for transcriptional activation by the redox-sensing SoxR protein. *EMBO J.* **13**, 138–146 (1994).
269. P. Gaudu, B. Weiss, SoxR, a [2Fe-2S] transcription factor, is active only in its oxidized form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 10094–10098 (1996).
270. P. J. Pomposiello, A. Koutsolioutsou, D. Carrasco, B. Demple, SoxRS-Regulated Expression and Genetic Analysis of the *yggX* Gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**, 6624–6632 (2003).
271. J. D. Levin, A. W. Johnson, B. Demple, Homogeneous *Escherichia coli* endonuclease IV. Characterization of an enzyme that recognizes oxidative damage in DNA. *J. Biol. Chem.* **263**, 8066–8071 (1988).
272. T. Nunoshiba, T. deRojas-Walker, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, B. Demple, Activation by nitric oxide of an oxidative-stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 9993–9997 (1993).
273. M. Manchado, C. Michán, C. Pueyo, Hydrogen Peroxide Activates the SoxRS Regulon In Vivo. *J. Bacteriol.* **182**, 6842–6844 (2000).
274. T. Nunoshiba, T. DeRojas-Walker, S. R. Tannenbaum, B. Demple, Roles of nitric oxide in inducible resistance of *Escherichia coli* to activated murine macrophages. *Infect. Immun.* **63**, 794–798 (1995).
275. P. F. Miller, L. F. Gambino, M. C. Sulavik, S. J. Gracheck, Genetic relationship between *soxRS* and *mar* loci in promoting multiple antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 1773–1779 (1994).
276. González-Flecha Beatriz, Demple Bruce, Genetic Responses to Free Radicals: Homeostasis and Gene Control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**, 69–87 (2006).
277. Lange R., Hengge-Aronis R., Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**, 49–59 (2006).
278. M. Lonetto, M. Gribskov, C. A. Gross, The sigma 70 family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* **174**, 3843–3849 (1992).
279. A. Eisenstark, M. J. Calcutt, M. Becker-Hapak, A. Ivanova, Role of *Escherichia coli* *rpos* and associated genes in defense against oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* **21**, 975–993 (1996).
280. Farewell Anne, Kvint Kristian, Nyström Thomas, Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition. *Mol. Microbiol.* **29**, 1039–1051 (2002).

281. M. Jishage, A. Iwata, S. Ueda, A. Ishihama, 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 (1996).
282. Gort Amy Strohmeier, Ferber Daniel M., Imlay James A., The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **32**, 179–191 (2002).
283. S. Mukhopadhyay, H. E. Schellhorn, Identification and characterization of hydrogen peroxide-sensitive mutants of *Escherichia coli*: genes that require OxyR for expression. *J. Bacteriol.* **179**, 330–338 (1997).
284. R. K. Poole, Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 176–180 (2005).
285. F. C. Fang, Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 820–832 (2004).
286. J. O. Lundberg, E. Weitzberg, J. A. Cole, N. Benjamin, Nitrate, bacteria and human health. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 593–602 (2004).
287. J. R. Lancaster, A Tutorial on the Diffusibility and Reactivity of Free Nitric Oxide. *Nitric Oxide.* **1**, 18–30 (1997).
288. M. D. Bartberger *et al.*, The reduction potential of nitric oxide (NO) and its importance to NO biochemistry. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10958–10963 (2002).
289. D. A. Wink *et al.*, DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science.* **254**, 1001–1003 (1991).
290. L. Brunelli, J. P. Crow, J. S. Beckman, The Comparative Toxicity of Nitric Oxide and Peroxynitrite to *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 327–334 (1995).
291. S. Burney, J. C. Niles, P. C. Dedon, S. R. Tannenbaum, DNA Damage in Deoxynucleosides and Oligonucleotides Treated with Peroxynitrite. *Chem. Res. Toxicol.* **12**, 513–520 (1999).
292. L. Tomanek, Proteomic responses to environmentally induced oxidative stress. *J. Exp. Biol.* **218**, 1867–1879 (2015).
293. S. Burney, J. L. Caulfield, J. C. Niles, J. S. Wishnok, S. R. Tannenbaum, The chemistry of DNA damage from nitric oxide and peroxynitrite. *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.* **424**, 37–49 (1999).
294. L. A. Loeb, B. D. Preston, Mutagenesis by Apurinic/Apyrimidinic Sites. *Annu. Rev. Genet.* **20**, 201–230 (1986).

295. T. Lindahl, A. Andersson, Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry (Mosc.)*. **11**, 3618–3623 (1972).
296. V. Yermilov *et al.*, Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxyxynitrite in vitro. *Carcinogenesis*. **16**, 2045–2050 (1995).
297. L. J. Kennedy, K. Moore, J. L. Caulfield, S. R. Tannenbaum, P. C. Dedon, Quantitation of 8-Oxoguanine and Strand Breaks Produced by Four Oxidizing Agents. *Chem. Res. Toxicol.* **10**, 386–392 (1997).
298. M. V. Stupakova, I. I. Lobysheva, V. D. Mikoyan, A. F. Vanin, S. V. Vasilieva, A role of iron ions in the SOS DNA repair response induced by nitric oxide in *Escherichia coli*. *Biochem. Biokhimiia*. **65**, 690–695 (2000).
299. Yermilov Vladimir, Rubio Julieta, Ohshima Hiroshi, Formation of 8-nitroguanine in DNA treated with peroxyxynitrite in vitro and its rapid removal from DNA by depurination. *FEBS Lett.* **376**, 207–210 (2000).
300. H. Ihara, T. Sawa, Y. Nakabeppu, T. Akaike, Nucleotides function as endogenous chemical sensors for oxidative stress signaling. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **48**, 33–39 (2011).
301. P. N. Serrano *et al.*, Nitrosylation of Nitric-Oxide-Sensing Regulatory Proteins Containing [4Fe-4S] Clusters Gives Rise to Multiple Iron–Nitrosyl Complexes. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **55**, 14575–14579 (2016).
302. J. M. Schapiro, S. J. Libby, F. C. Fang, Inhibition of bacterial DNA replication by zinc mobilization during nitrosative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8496–8501 (2003).
303. B. S. Berlett, B. Friguet, M. B. Yim, P. B. Chock, E. R. Stadtman, Peroxyxynitrite-mediated nitration of tyrosine residues in *Escherichia coli* glutamine synthetase mimics adenylation: relevance to signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1776–1780 (1996).
304. B. Roy, M. Lepoivre, Y. Henry, M. Fontecave, Inhibition of Ribonucleotide Reductase by Nitric Oxide Derived from Thionitrites: Reversible Modifications of Both Subunits. *Biochemistry (Mosc.)*. **34**, 5411–5418 (1995).
305. N. P. Tucker, B. D'Autréaux, S. Spiro, R. Dixon, Mechanism of transcriptional regulation by the *Escherichia coli* nitric oxide sensor NorR. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 191–194 (2006).
306. H. Wang, R. P. Gunsalus, The *nrfA* and *nirB* Nitrite Reductase Operons in *Escherichia coli* Are Expressed Differently in Response to Nitrate than to Nitrite. *J. Bacteriol.* **182**, 5813–5822 (2000).

307. H. Corker, R. K. Poole, Nitric Oxide Formation by *Escherichia coli* DEPENDENCE ON NITRITE REDUCTASE, THE NO-SENSING REGULATOR Fnr, AND FLAVOHEMOGLOBIN Hmp. *J. Biol. Chem.* **278**, 31584–31592 (2003).
308. H. Cruz-Ramos *et al.*, NO sensing by FNR: regulation of the *Escherichia coli* NO-detoxifying flavohaemoglobin, Hmp. *EMBO J.* **21**, 3235–3244 (2002).
309. R. K. Poole *et al.*, Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of hmp (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **178**, 5487–5492 (1996).
310. J. Green, M. D. Rolfe, L. J. Smith, Transcriptional regulation of bacterial virulence gene expression by molecular oxygen and nitric oxide. *Virulence.* **5**, 794–809 (2014).
311. A. M. Gardner, R. A. Helmick, P. R. Gardner, Flavorubredoxin, an Inducible Catalyst for Nitric Oxide Reduction and Detoxification in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 8172–8177 (2002).
312. T. A. Clarke *et al.*, in *Methods in Enzymology*, R. K. Poole, Ed. (Academic Press, 2008; <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687907370043>), vol. 437 of *Globins and Other Nitric Oxide-Reactive Proteins, Part B*, pp. 63–77.
313. S. R. Pooch, E. R. Leach, J. W. B. Moir, J. A. Cole, D. J. Richardson, Respiratory Detoxification of Nitric Oxide by the Cytochrome c Nitrite Reductase of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 23664–23669 (2002).
314. T. M. Stevanin, R. C. Read, R. K. Poole, The hmp gene encoding the NO-inducible flavohaemoglobin in *Escherichia coli* confers a protective advantage in resisting killing within macrophages, but not in vitro: Links with swarming motility. *Gene.* **398**, 62–68 (2007).
315. A. Mühlig, J. Kabisch, R. Pichner, S. Scherer, S. Müller-Herbst, Contribution of the NO-detoxifying enzymes HmpA, NorV and NrfA to nitrosative stress protection of *Salmonella Typhimurium* in raw sausages. *Food Microbiol.* **42**, 26–33 (2014).
316. Vine Claire E., Cole Jeffrey A., Unresolved sources, sinks, and pathways for the recovery of enteric bacteria from nitrosative stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **325**, 99–107 (2011).
317. C. E. Vine, J. A. Cole, Nitrosative stress in *Escherichia coli*: reduction of nitric oxide. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 213–215 (2011).
318. S. Spiro, Nitrous oxide production and consumption: regulation of gene expression by gas-sensitive transcription factors. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **367**, 1213–1225 (2012).

319. Shepard William *et al.*, Insights into the Rrf2 repressor family – the structure of CymR, the global cysteine regulator of *Bacillus subtilis*. *FEBS J.* **278**, 2689–2701 (2011).
320. N. P. Tucker, N. E. L. Brun, R. Dixon, M. I. Hutchings, There's NO stopping NsrR, a global regulator of the bacterial NO stress response. *Trends Microbiol.* **18**, 149–156 (2010).
321. N. Filenko *et al.*, The NsrR Regulon of *Escherichia coli* K-12 Includes Genes Encoding the Hybrid Cluster Protein and the Periplasmic, Respiratory Nitrite Reductase. *J. Bacteriol.* **189**, 4410–4417 (2007).
322. D. F. Browning, D. J. Lee, S. Spiro, S. J. W. Busby, Down-Regulation of the *Escherichia coli* K-12 *nrf* Promoter by Binding of the NsrR Nitric Oxide-Sensing Transcription Repressor to an Upstream Site. *J. Bacteriol.* **192**, 3824–3828 (2010).
323. Körner Heinz, Sofia Heidi J, Zumft Walter G, Phylogeny of the bacterial superfamily of Crp-Fnr transcription regulators: exploiting the metabolic spectrum by controlling alternative gene programs. *FEMS Microbiol. Rev.* **27**, 559–592 (2006).
324. J. C. Crack, M. R. Stapleton, J. Green, A. J. Thomson, N. E. Le Brun, Mechanism of [4Fe-4S](Cys)<sub>4</sub> Cluster Nitrosylation Is Conserved among NO-responsive Regulators. *J. Biol. Chem.* **288**, 11492–11502 (2013).
325. J. Crack, J. Green, A. J. Thomson, Mechanism of Oxygen Sensing by the Bacterial Transcription Factor Fumarate-Nitrate Reduction (FNR). *J. Biol. Chem.* **279**, 9278–9286 (2004).
326. S. Spiro, J. R. Guest, FNR and its role in oxygen-regulated gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **75**, 399–428 (1990).
327. T. Baba *et al.*, *Mol. Syst. Biol.*, in press, doi:10.1038/msb4100050.
328. Q. Tu *et al.*, Room temperature electrocompetent bacterial cells improve DNA transformation and recombineering efficiency. *Sci. Rep.* **6**, 24648 (2016).
329. G. E. Crooks, G. Hon, J.-M. Chandonia, S. E. Brenner, WebLogo: A Sequence Logo Generator. *Genome Res.* **14**, 1188–1190 (2004).
330. C. J. Kenyon, G. C. Walker, DNA-damaging agents stimulate gene expression at specific loci in *Escherichia coli*. 1980. *DNA Repair.* **4**, 1049–1053 (2005).
331. R. D'Ari, O. Huisman, DNA replication and indirect induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Biochimie.* **64**, 623–627 (1982).

332. Z. Baharoglu, D. Bikard, D. Mazel, Conjugative DNA Transfer Induces the Bacterial SOS Response and Promotes Antibiotic Resistance Development through Integron Activation. *PLoS Genet.* **6** (2010), doi:10.1371/journal.pgen.1001165.
333. H. Maki, M. Sekiguchi, MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate for DNA synthesis. *Nature.* **355**, 273–275 (1992).
334. É. Guerin *et al.*, The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science.* **324**, 1034–1034 (2009).
335. D. P. Arora, S. Hossain, Y. Xu, E. M. Boon, Nitric oxide regulation of bacterial biofilms. *Biochemistry (Mosc.).* **54**, 3717–3728 (2015).
336. L. Plate, M. A. Marletta, Nitric oxide modulates bacterial biofilm formation through a multi-component cyclic-di-GMP signaling network. *Mol. Cell.* **46**, 449–460 (2012).
337. S. Stepanović, D. Vuković, I. Dakić, B. Savić, M. Švabić-Vlahović, A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J. Microbiol. Methods.* **40**, 175–179 (2000).
338. F. Reffuveille, C. de la Fuente-Núñez, S. Mansour, R. E. W. Hancock, A broad-spectrum antibiofilm peptide enhances antibiotic action against bacterial biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**, 5363–5371 (2014).
339. C. de la Fuente-Núñez, F. Reffuveille, E. F. Haney, S. K. Straus, R. E. W. Hancock, Broad-spectrum anti-biofilm peptide that targets a cellular stress response. *PLOS Pathog.* **10**, e1004152 (2014).
340. X. Nassif, J. M. Fournier, J. Arondel, P. J. Sansonetti, Mucoïd phenotype of *Klebsiella pneumoniae* is a plasmid-encoded virulence factor. *Infect. Immun.* **57**, 546–552 (1989).
341. V. Vernet *et al.*, Virulence factors (aerobactin and mucoïd phenotype) in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* blood culture isolates. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**, 51–57 (1995).

---

## DESCRIPTION D'UN MECANISME, A L'ORIGINE DE L'INDUCTION DE LA REPONSE SOS PAR LES AMINOSIDES CHEZ ESCHERICHIA COLI, FAVORISANT L'EMERGENCE DE LA RESISTANCE AUX FLUOROQUINOLONES

---

L'émergence des déterminants des résistances plasmidiques aux quinolones (PMQR), auxquels appartient le gène *qnrD*, participe de manière significative à la sélection des résistances de haut-niveau aux quinolones. Dans cette étude, nous rapportons pour la première fois que l'expression d'un PMQR, *qnrD*, peut être induite par les fluoroquinolones mais aussi par les aminosides qui appartiennent à une autre importante famille d'antibiotiques, et ce, en induisant la réponse SOS chez *Escherichia coli*. En effet, nous avons montré que les petits plasmides portant *qnrD* induisent la formation de monoxyde de nitrogène et l'inhibition de la voie de détoxification Hmp-dépendante. Ces processus génèrent des lésions à l'ADN qui s'ajoutent à celles occasionnées par les aminosides concourant à activer la réponse SOS chez *E. coli*. L'ensemble de nos résultats montre que l'émergence de la résistance aux fluoroquinolones peut être occasionnée par l'exposition d'*E. coli* à une autre classe d'antibiotiques, ici les aminosides.

---

Résistance aux antibiotiques, Fluoroquinolones, plasmides, *qnrD*, SOS, aminosides, NO

---

## MECHANISM FOR AMINOGLYCOSIDES-MEDIATED SOS INDUCTION IN *ESCHERICHIA COLI* THAT CROSS-SELECTS FOR FLUOROQUINOLONES RESISTANCE

The emerging plasmid-mediated quinolones resistance (PMQR) determinants significantly participate in the selection of high-level of resistance to the major antibiotic fluoroquinolones, leading to numerous clinical failures. In this study, we reported for the first time that PMQR expression could be triggered by the fluoroquinolones but also by another major class of antibiotics, the aminoglycosides. We were able to show that this unique cross selection of antibiotic resistance was the consequence of the PMQR determinant *qnrD* being SOS-regulated in a RecA-LexA dependent manner. We demonstrated that sub inhibitory concentration of aminoglycoside and *qnrD*-plasmid carriage in *E. coli*, induced nitric oxide formation associated with the repression of the Hmp-mediated detoxification pathway, resulting in the induction of the SOS response and thus up-regulation of the PMQR. Overall, our findings revealed an unexpected antibiotic resistance cross-selection with low aminoglycosides concentrations promoting emergence of fluoroquinolones resistance.

---

Antibiotics resistance, Fluoroquinolones, plasmids, *qnrD*, SOS, aminoglycosides, NO

---

**Discipline :** SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

**Spécialité :** MICROBIOLOGIE

Université de Reims Champagne-Ardenne  
Pathologies Pulmonaires et Plasticité Cellulaire  
UMR-S 1250  
45 rue Cognacq-Jay  
51100 REIMS, France

