Thèse de doctorat

Université de Limoges

École Doctorale Bio-Santé (ED 524)

INSERM UMR 1092 : Anti-Infectieux supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques (RESINFIT)

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Spécialité : Immunologie, oncologie et infectiologie

Présentée et soutenue par

Élodie Couvé-Deacon

Le 14 décembre 2017

Épidémiologie et régulation des intégrons de classe 1 chez *Acinetobacter baumannii*

Thèse dirigée par M. le Dr Fabien GARNIER et Mme le Pr Marie-Cécile PLOY

JURY :

Rapporteurs

Mme le Pr Marie KEMPF, PU-PH, Equipe 06 ATOMycA, Université d'Angers

M. le Pr Didier HOCQUET, PU-PH, UMR 6249 Chrono-environnement, université de Besançon

Examinateur

M. le Pr Christophe BURUCOA, PU-PH, LITEC EA 4331, Université de Poitiers

Invités

Mme le Pr Marie-Cécile PLOY, PU-PH, UMR 1092, université de Limoges

M. le Dr Fabien GARNIER, PH, UMR 1092, université de Limoges

Elodie Couvé-Deacon | Thèse de doctorat | Université de Limoges | 2017
BY-NC-ND

A Mike, à Éléa, à Éva Julia

BY-NC-ND

Elodie Couvé-Deacon | Thèse de doctorat | Université de Limoges | 2017
BY-NC-ND

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Christophe Burucoa, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Chef du service de Bactériologie et Hygiène du CHU de Poitiers, je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury et de m'avoir fait l'honneur d'être examinateur de ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect pour votre travail.

A Madame le Professeur Marie Kempf, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Responsable médical - Unité fonctionnelle de Bactériologie – Hygiène du CHU d'Angers, et **Monsieur le Professeur Didier Hocquet**, Professeur des Universités, Praticien hospitalier dans le service d'Hygiène Hospitalière du CHU de Besançon, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect pour votre travail à tous les deux.

A Madame le Professeur Marie-Cécile Ploy, Professeur des Universités, Praticien hospitalier, Chef du laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges, je vous remercie de m'avoir transmis un peu de votre immense passion pour la science ainsi que pour vos conseils scientifiques toujours constructifs. Je vous remercie pour vos encouragements, de croire en mon potentiel depuis toutes ces années et pour ces mots qui remettent le monde à l'endroit quand je suis « au fond du fait-tout ». Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Fabien Garnier, Praticien hospitalier au laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène du CHU de Limoges, je te remercie de m'avoir accompagnée et surtout supportée toutes ces années. Merci d'avoir été un guide pour ce long travail, d'avoir apporté tes conseils scientifiques et stratégiques, de m'avoir orientée, aidée et d'avoir toujours été disponible. Notre parcours commun avait commencé avec un M2R, c'est une joie de le voir aboutir avec cette thèse. Je te prie de bien vouloir trouver ici l'expression de toute ma gratitude et de mon profond respect.

BY-NC-ND

Je tiens à remercier **l'équipe de l'UMR 1092** pour ces années de travail à vos côtés, tout particulièrement **Marie-Cécile** et **Fabien** pour votre accompagnement dans les bons moments et aussi dans les plus difficiles de cette thèse qui, je l'espère, marque le début d'une encore plus grande aventure.

Un grand merci à **Thomas**, **Emilie G**, **Emilie S**, **Valentin**, **Pierrette**, qui m'ont aussi accompagnée et ont apporté leur pavé à ce long chemin, vos conseils et aides m'ont été précieux.

Je n'oublie pas les autres membres de l'équipe **Olivier**, **Christian**, **Sandra**, **Christophe**, **Sophie A**, **Sophie R**, **Sébastien**, **Bruno**, **Pierre-Yves**, **Thibault**, **Anthony**, **Romain**, **Margaux**, **Melissa**, **Nicolas**, **Martine**, **Laetitia**, **Emmanuelle**, **Isabelle**, car sans une équipe solide le travail n'avance pas !

Je remercie tout particulièrement mes co-doctorants, **Murielle** (**Lamu**) pour ton soutien « spychologique » sans faille et ta princessitude, **Yohann** (**mon Yo**), mon coach technique, pour ta gentillesse sans limites, **Déborah** (**Deyby**) pour tous les à-côtés et projets communs (couture, japan expo, Sharel…), **Claire** (**Clairounette**) pour tes discussions hautement intéressantes, **Chloé (^人^)** pour ta motivation toujours au rendez-vous (Claire et Chloé : see you on the other side !), **Florence** (**la Flo**) pour en un mot : LICORNE, sans oublier **Elena** for the right words at the right time et mes stagiaires la douce et brillante **Paméla** et **Mathilde**.

Merci aussi à **Erwan**, sidekick de Lamu et aux autres doctorants qui ont marqué la route, **Maxime**, **Chloé** et **Clothilde**.

Tout cela n'aurait pas été possible sans l'aide du **Laboratoire de Bactériologie-Virologie-Hygiène** et en premier lieu le soutien et la patience de l'unité d'Hygiène, merci à **Nathalie** car je sais que mon absence a pesé, mais que tu as tenu bon, et merci à vous **Marie-Christine**, **Annick**, **Marie-Claire**, **Hélène**, **Sylvie**, **Laurence**, **Hervé**, **Isabelle**, **Stéphanie**, **Camille** et **Audrey**. Merci aussi à **Laure**, **Jérôme**, **Sylvie**, **Nadia** et **tous les autres membres du laboratoire**.

A mes parents, **Pierre-Yves** et **Marie-Christine**, je sais que vous trouvez que la voie que j'ai choisie est difficile, mais tout en essayant de me protéger, vous m'avez toujours soutenu et je peux voir qu'aujourd'hui vous êtes fiers de ce que j'ai accompli. Allez pour un millon un, un millon deux, bon un millon c'est grâce à vous tout ça !

A mes frères et soeurs, **PO** et **Maud**, **Gwen** et **Jo**, **Perrine** et **Mat** et les marmailles qui sont nées pendant ces années de dur labeur (**Enoa**, **Galy** et **Ayun**, **Arnaud**, **Clément**, **Hanivai** et **Maiana**), merci d'avoir été les pilliers de ma santé mentale, de m'avoir fait rire et penser à autre chose.

A mes grands-parents, **Mamico** et **Grand Père Roland**, **Mimie** et **Nounou**, je sais que vous êtes fiers de moi, ici ou là-bas, merci pour votre amour et votre soutien inconditionnel.

Merci aussi aux autres membres de ma grande famille. **Badette**, **Olivier**, **Félix** et **Diane**, ma famille canado-bretonne, merci à vous qui m'avez suivie de près comme une grande fille et cousine. A **Catou**, **Laetitia**, **Christophe**, **Fanny**, merci d'être toujours là avec votre bonne humeur et votre soleil ! **Alain**, **Caro**, **Lucie**, **Alix**, **Florian**, merci pour votre soutien et votre accueil en toute circonstance. **Thierry** et **Mauricette**, merci aussi à vous deux pour votre

BY-NC-ND

amour et soutien. A special thanks to my English family, **Sandra** and **Phil**, **Alan** and **Karen**, **Erin** and **Finley**, **Lawrence** and **Rachel**, **Bob** and **Mo**, **Lucy**, **Elsie** and **Derrick**, even far away you always had a supportive thought for me and always understood my choices.

Merci aussi aux amis qui sont devenus famille, **Evelyne**, **Alain**, **Flora** et **Paul**, famille de la bonne fée ! **Valérie**, **Clémentine** et **Nicolas**, **François** et **Cécile**, chez qui grandir a été doux, **Christelle**, **Pierre**, **Auriane** et **Maëlle** les habitants du Peyroux, **Matoum**, mon jumeau de signe astral et de mangeage d'œuf au plat. Merci aux Amis de l'ASABB **DD** et **Béa**, **Miguel**, **Cyril** et **Murielle**, **Waldé**, **Philippe**, j'ai l'extrême honneur de vous avoir pour grand frères et en tant que tel vous avez fait un travail exceptionnel.

Nastya et **tatie Delphine**, merci à vous qui avez pris soins de mes Doudoues pendant que je travaillais, et merci à toi **Martin**, mon répétiteur officiel.

Merci à tous les autres pour votre soutien **Clélia**, **Sandrine**, **Delphine** et **Greg**, **Céleste**, **Charline** et **Niels**, la petite famille de Valentin : **Amélie**, **Simon** et **Aurore**. De près ou de loin vous avez été présent et m'avez donné de la force.

Merci à mes amis **Drédré** et **Julien B**, **Mika**, **Kiki** (**Maître Kitus**, je suis à jamais ta padawan), **Aude**, **Sandra** et **Tom**, **Marie-Claire**, **Malvina** et **David**, **Marie la ptite**, **Nico**, **Jo Q** et **Marlène**, **Saket**, **Dub**, **Stéphane**, **MatizZz** et **Julien G** vous qui m'avez supportée pendant toutes ces années d'études pendant lesquelles je vous ai vu commencer et terminer les vôtres. Je vous Kiffe.

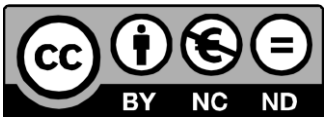
A mes amis du basket, merci d'avoir été ma soupape de sécurité, **Thomas M**, **Aurélie**, **Olivier**, **Marie-Brique**, **Baptiste**, **Doudou**, **Jo**, **Sophie**, **Margaux**, **Fanny**, **Mégane**, **Marie**, **Ilana**. Merci aux membres d'ADN de m'avoir permi de retrouver mes ailes (à roulettes) **Thomas S**, **Laurent**, **Bastien**, **Emmanuel**, **Thomas V**, **Sébastien**.

Mes derniers remerciements vont à **Mike** mon mari et mes filles **Éléa** et **Éva Julia**, car je sais que c'est vous qui avez fait les plus gros sacrifices pour me permettre d'aller au bout de ma thèse. You make me live. You're my sunshine and I want you to know that my feeling are true, I really love you! You're my best friends. In rain or shine you've stood by me guys, I'm happy at home. You're my best friends!

BY-NC-ND

Droits d’auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : *http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/*



BY-NC-ND

SOMMAIRE

Sommaire 1
Glossaire 4
Index des tableaux 7
Index des figures 8
liste des annexes 10
Préambule 11
Introduction 15
Chapitre 1 : revue bibliographique sur les intégrons de résistance 17
1.1 Définition et structure des intégrons de résistance 19
1.1.1 La plateforme fonctionnelle 19
1.1.2 La région variable : les cassettes 23
1.1.3 L'activité de recombinaison de l'intégrase ou le mouvement des cassettes 27
1.1.4 Région 3' Conserved Segment (3'CS) 32
1.2 La régulation de l'expression des gènes de l'intégron 33
1.2.1 Expression des cassettes de résistance 33
1.2.2 Gène de l'intégrase 36
1.3 Origine des intégrons 40
1.4 Épidémiologie des intégrons 43
1.4.1 Bactéries hôtes d'IM 43
1.4.2 Intégrons de classe 1 : la diversité 44
1.4.3 Intégrons de classe 2 : la stabilité 44
1.4.4 Intégrons de classe 3 : la rareté 45
1.4.5 Intégrons de classe 4 et 5 45
1.4.6 Épidémiologie des IM dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques 46
Chapitre 2 : *Acinetobacter baumannii* 51
1.5 *A. baumannii*, bactérie environnementale et pathogène multi-résistant émergeant 51
1.5.1 Pathogène émergeant 51
1.5.2 Pouvoir pathogène et réservoir 53

BY-NC-ND

1.5.3 Pouvoir épidémiogène : 57
1.6 Acquisition de mécanismes de résistance chez *A. baumannii* 58
1.7 Traitement : 61
1.8 *A. baumannii* porte des ilôts de resistance complexes de grande taille 62
1.9 Epidémiologie des intégrons de résistance chez A. baumannii 67
Chapitre 3 : la réponse SOS 69
3.1. Acteurs et mécanismes de la réponse SOS 69
3.1.1. La protéine LexA 69
3.1.2. La protéine RecA 72
3.2. Mécanismes de régulation par la réponse SOS 74
3.3. Le régulon SOS 76
3.4. Signaux inducteurs de la réponse SOS 78
3.4.1. Dommages de l'ADN 78
3.4.2. Les éléments génétiques mobiles 78
3.4.3. Les antibiotiques et le rôle de la réponse SOS dans la génération de l'antibio-résistance 79
3.5. Universalité de la réponse SOS 81
3.6. Particularité de la réponse aux dommages de l'ADN de *A. baumannii* 82
Présentation du travail de thèse 87
Partie 1 : axe épidémiologique : étude des intégrons de classe 1 dans une collection de souches de *A. baumannii* 93
Partie 2 : axe fondamental : étude de la régulation des intégrons de classe 1 chez *A. baumannii* 127
1.1. Matériel et méthodes 128
1.1.1. Souches bactériennes et plasmides 128
1.1.2. Les PCR 130
1.1.3. Digestions 131
1.1.4. Purification des digestions enzymatiques et des produits de PCR 131
1.1.5. Clonages 132
1.1.6. Extractions plasmidiques 134
1.1.7. Séquençage 134
1.1.8. Tests d'activité enzymatique de la β-galactosidase 134
1.1.9. Courbes de croissance 135
1.1.10. Détermination du nombre de copies de plasmide 135

BY-NC-ND

1.1.11. Quantification des transcrits 135
1.2. Résultats 136
1.2.1. Modèle d'étude de l'activité des promoteurs Pc et PintI1 chez *A. baumannii* 136
1.2.2. Analyse par essais beta-galactosidase de la force des variants de Pc en présence de Pint. 138
1.2.3. Analyse par quantification de transcrits de la force des variants de Pc et de Pint. 141
1.2.4. Effet du nombre de copies de plasmides et des courbes de croissance 145
1.3. Discussion 147
Discussion 149
Conclusions et perspectives 163
Références bibliographiques 167
Annexes 197
Annexe 1 : séquence de pPcSPintI1oriA 197
Annexe 2 : Communications scientifiques sur le travail de thèse 201
Annexe 3 : publications 202

BY-NC-ND

GLOSSAIRE

3' CS :	région 3' conservée
5' CS :	région 5' conservée
°C :	degré Celsius
µl :	microlitre
µg/ml :	microgramme par mililitre
µM :	micromolaire
A :	Adénine
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
ADNdb :	ADN double brin
ADNsb :	ADN simple brin
ADP :	Adénosine DiPhosphate
AFLP :	Amplified Fragment-Length Polymorphism
ARN :	Acide RiboNucléique
ATP :	Adénosine TriPhosphate
BGN :	Bactérie à Gram Négatif
BGP :	Bactérie à Gram Positif
BHI :	Brain Heart Infusion
C :	Cytosine
CMI :	Concentration Minimale Inhibitrice
DO :	Densité Optique
EGM :	Elément Génétique Mobile
G :	Guanine
GCA :	Gene Cassette Array
GFP :	Green Fluorescent Protein
ICE :	Integrative and Conjugative Element
IM :	Intégron Mobile
IM1 :	Intégron Mobile de classe 1

BY-NC-ND

IM2 :	Intégron Mobile de classe 2
IM3 :	Intégron Mobile de classe 3
IM4 :	Intégron Mobile de classe 4
IM5 :	Intégron Mobile de classe 5
Kb :	Kilo base
Km :	Kanamycine
LB :	Lysogeny Broth
LPS :	LipoPolySaccharide
ml :	millilitre
MLST :	MultiLocus Sequence Typing
NGS :	Next Generation Sequencing
ng :	nanogramme
nm :	nanomètre
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
pb :	paire de base
PCR :	Polymérase Chain Reaction
PFGE :	Pulsed Field Gel Eletrophoresis
Pi :	pyruvate
qPCR :	PCR en temps réel (quantitative PCR)
R :	purine
RAPD :	Random Amplified Polymorphic DNA
T :	Thymine
TLR4 :	Toll-Like Receptor 4
UV :	UltraViolet
WGS :	Whole Genome Sequencing
XDR :	eXtensively Drug Resistant
Y :	pyrimidine

BY-NC-ND

BY-NC-ND

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Combinaison des séquences Pc-P2 des IM1.

Tableau 2 : Effet du polymorphisme de Pc sur les fonctions de l'intégron.

Tableau 3 : Quelques gènes du régulon SOS et leur fonction.

Tableau 4 : Exemples de séquence palindromiques de sites LexA pour différentes espèces bactériennes.

Tableau 5 : Spécificités de *A. baumanni* concernant les gènes de la réponse au dommages de l'ADN.

Tableau 6 : résistances théoriques conférées par les différents réseaux de cassettes identifiés dans la collection de 83 isolats de *A. baumannii* hébergeant un IM1.

Tableau 7 : souches et plasmides utilisés dans ce travail.

Tableau 8 : Amorces utilisées dans ce travail.

BY-NC-ND

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Relation entre les EGM.

Figure 2 : Structure des intégrons.

Figure 3 : Alignement de la séquence C-terminale des intégrases d'intégron avec d'autres tyrosine-recombinases.

Figure 4 : Structure du site *attI1*.

Figure 5 : Structure du site de recombinaison *attC*.

Figure 6 : Structure schématique d'un IM1 et mécanisme de mobilisation des cassettes.

Figure 7 : Mécanisme moléculaire de la recombinaison site-spécifique entre les sites *attI* et *attC* au cours de l'insertion des cassettes de gène.

Figure 8 : Mécanisme moléculaire de recombinaison spécifique entre deux sites *attC* au cours de l'excision d'une cassette.

Figure 9 : Séquence et organisation de la région promotrice contenant Pc et PintI1 des IM1.

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

Figure 11 : Modèle de l'origine des IM1.

Figure 12 : Origine, expansion et diffusion des IM1 cliniques.

Figure 13 : Nombre de citations trouvées dans Pubmed entre 1990 et 2016 en utilisant « *Acinetobacter baumannii* » et « *Acinetobacter baumannii* and antibiotic resistance ».

Figure 14 : Devenir de l'hôte au cours de l'infection à *A. baumannii*.

Figure 15 : Biologie de *Acinetobacter baumannii*.

Figure 16 : Proportion des isolats invasifs de *Acinetobacter* spp résistants aux fluoroquinolones, aminosides et carbapénèmes en europe en 2012 (gauche) et 2015 (droite).

Figure 17 : Organisation des différents variant de AbaR

Figure 18 : Représentation schématique de la localisation des AbGRI1, 2 et 3 sur le chromosome de *A. baumannii* du clone GC2.

Figure 19 : représentation schématique de AbGRI1.

BY-NC-ND

Figure 20 : représentation schématique de la structure des AbGRI2.

Figure 21 : structure des AbGRI3.

Figure 22 : Modélisation moléculaire de la structure tertiaire de la protéine LexA de *E.coli.*

Figure 23 : Structure de la protéine RecA et du filament nucléoprotéique.

Figure 24 : La réponse SOS.

Figure 25 : Le « module LexA ».

Figure 26 : Signaux et mécanismes inducteurs de la réponse SOS

Figure 27 : Distribution des variants de Pc selon l'organisme hôte de l'IM1.

Figure 28 : représentation du vecteur de clonage pAL4000.

Figure 29 : Représentation schématique de la construction des vecteurs simples de notre étude.

Figure 30 : Plasmide pWH1266.

Figure 31 : Représentation schématique de la construction des vecteurs doubles de notre étude.

Figure 32 : Représentation schématique des constructions plasmidiques doubles réalisées.

Figure 33 : Expression des variants de Pc en fonction de l'hôte.

Figure 34 : Expression des variants de Pc en unité Miller en fonction de l'hôte et des panels mutés des constructions plasmidiques.

Figure 35 : Activité de transcription des promoteur Pc et Pint.

Figure 36 : Activité de transcription des promoteurs Pc et Pint dans les constructions comportant une mutation du Pint.

Figure 37 : Représentation des activités de transcription des promoteurs Pint présentés dans les figures 35 et 36.

Figure 38 : Courbes de croissance des souches de *E. coli* MG1656 et de *A. baumannii* CM152, naturelles et contenant les différents plasmides recombinants.

BY-NC-ND

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Séquence de pPcSPintI1oriA

Annexe 2 : Communications scientifiques sur le travail de thèse

Annexe 3 : Publications

BY-NC-ND

PRÉAMBULE

« Vaccines and antibiotics have made many infectious diseases a thing of the past;
we've come to expect that public health and modern science can conquer all microbes.
But nature is a formidable adversary »
Tom Frieden

La découverte des antibiotiques a été marquée par le sentiment d'avoir gagné la guerre contre les maladies infectieuses. Mais le répit n'a été que de courte durée car rapidement les micro-organismes ont développé des moyens pour devenir insensibles aux anti-infectieux. En médecine, l'infectiologie à cette particularité que la lutte est dirigée contre un autre organisme vivant qui est indépendant et très rapidement adaptatif. L'antibio-résistance est un phénomène naturel, mais celui-ci a été accéléré par l'usage des antibiotiques chez l'homme et l'animal. Les antibiotiques sont évidemment nécessaires pour lutter contre l'infection, mais dans le même temps, ont été trop utilisés dans certaines situations ne nécessitant pas une antibiothérapie, générant ainsi une pression de sélection importante. L'utilisation d'antibiotiques induit un stress important, qui va sélectionner des bactéries pour lesquelles des évènements génétiques rares ont eu lieu, comme le transfert de fragments d'ADN ou la mutation de gènes, leur permettant alors de résister à l'antibiotique en question. Le paradoxe est que bien que nécessaire, l'utilisation des antibiotiques crée la résistance ! Il faut en permanence renouveler ses connaissances et surveiller de façon continue l'épidémiologie de la résistance. Cela demande aussi de coordonner cette lutte, aussi bien au niveau de la consommation des antibiotiques que de la surveillance de la résistance, sans oublier les moyens de contrôle de la dissémination des bactéries. Nous sommes arrivés à une période critique où nous sélectionnons des bactéries émergentes qui peuvent présenter des résistances à l'ensemble des antibiotiques que nous avons à notre disposition. Dans ces situations, il devient quasiment impossible de proposer au patient un traitement pour son infection.

En France, le nombre d'infections dues aux bactéries multi-résistantes a été estimé pour l'année 2012 à 157 000, dont environ 16 000 infections invasives et le nombre de décès à

BY-NC-ND

12 400 (Colomb-Cotinat *et al.*, 2016). L'European Center for Disease prevention and Control (ECDC) a rapporté en 2009, que les bactéries multi-résistantes étaient responsables de 25 000 décès par an, avec des coûts s'élevant à plus de 900 millions d'euros en frais de santé et pertes de productivité ("ECDC/EMEA Joint Technical Report," 2009). Ces chiffres confirment que l'antibio-résistance est un problème majeur en France comme en Europe.

L'OMS a apporté la preuve, dans son rapport sur la surveillance mondiale des résistances aux antimicrobiens de 2014, que la résistance aux anti-microbiens est d'un problème de santé publique d'ampleur mondial ("WHO | Antimicrobial resistance," 2014). Même si nous parvenons à mettre au point de nouveaux médicaments, l'antibio-résistance demeurera une grave menace tant que nos comportements n'auront pas évolué. On peut adopter 3 approches concomitantes pour lutter contre l'apparition de nouvelles résistances aux antibiotiques : i) limiter la sélection des bactéries résistantes en améliorant l'utilisation des antibiotiques (posologies, durée, indications, diagnostic rapide etc.) ; ii) limiter la dissémination et la transmission des bactéries résistantes par l'application de mesures d'hygiène ; iii) prévenir la dissémination bactérienne des gènes de résistance par une meilleure connaissance des mécanismes d'acquisition et de transmission de ces gènes. Sur ce dernier aspect, la complémentarité entre la recherche clinique et la recherche fondamentale est primordiale.

La résistance aux antibiotiques des bactéries passe par de nombreux mécanismes impliquant plusieurs familles de protéines, elles-mêmes divisées en plusieurs sous-groupes. Cette variabilité mécanistique se traduit par une très grande diversité des gènes impliqués dans l'antibio-résistance.

Les bactéries ont développé des capacités d'adaptation de leur patrimoine génétique par mutation ou par acquisition de matériel génétique extérieur. Elles possèdent des supports génétiques très élaborés, les éléments génétiques mobiles (EGM), leur permettant le transfert de gènes entre bactéries de même espèce ou non (transfert horizontal), mais aussi aux bactéries filles (transfert vertical). Lorsque ces éléments génétiques mobiles intègrent des gènes de résistance aux antibiotiques, une bactérie initialement sensible peut alors acquérir la capacité à résister à un grand nombre de classes différentes d'antibiotiques. Les mécanismes de transfert de matériel génétique sont maintenant considérés comme responsables d'au moins 80% de la multi-résistance aux antibiotiques mais aussi à l'origine de

BY-NC-ND

la dissémination rapide de ces résistances. Les principaux EGM qui participent à cette dissémination sont :

- Les transposons, EGM flanqués de séquences inversées répétées (IRL et IRR) qui encadrent des gènes dont ceux nécessaires à leur mobilité au sein d'une même bactérie mais aussi, pour certains transposons appelés ICE (Integrative and Conjugative Element), entre bactéries. Ils peuvent porter un ou plusieurs gènes accessoires et lorsque ceux-ci sont des gènes d'antibio-résistance, les transposons sont alors responsables de leur dissémination (Darmon et Leach, 2014).
- Les plasmides, des ADN extra-chromosomiques en général circulaires capables de réplication autonome grâce à leur origine de réplication et pouvant intégrer dans leur ADN des gènes de résistance. Les plasmides sont aussi capables d'intégrer d'autres EGM non-conjugatifs comme les séquences d'insertion, les transposons ou encore les intégrons (Figure 1). Les EGM se servent donc les uns des autres pour disséminer des gènes de résistances.
- Les intégrons sont des structures génétiques découvertes à la fin des années 80. Ils ne sont pas doués de mobilité propre, mais tirent profit des EGM comme les plasmides ou les transposons. Le système de l'intégron permet l'acquisition, l'expression et la dissémination de gènes de résistance. Ils représentent un vecteur majeur de multi-résistance chez les bactéries à Gram négatif (Cambray *et al.*, 2010; Stokes et Hall, 1989).

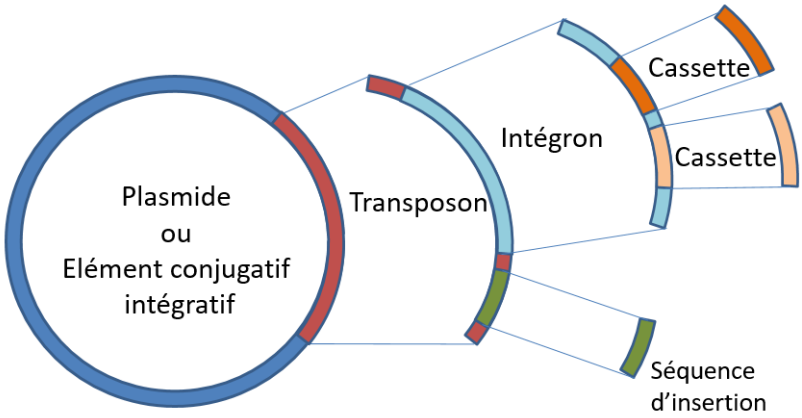


Figure 1 : Relation entre les EGM. Les EGM sont des éléments très plastiques qui peuvent s'imbriquer les uns dans les autres.

BY-NC-ND

Certains pathogènes résistants à de nombreuses familles d'antibiotiques, appelées bactéries multi-résistantes, ont acquis un potentiel de transmission difficile à contrôler. L'émergence mondiale et la prévalence parfois importante de ces pathogènes multi-résistants sont devenus de réelles menaces pour les structures de soins. Les infections causées par des bactéries multi-résistantes telles que *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ou les Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi +/- carbapénémase, sont difficiles à traiter. Elles sont associées à un mauvais pronostic clinique, une prolongation des hospitalisations, une augmentation des dépenses médicales et une hausse de la mortalité. La résistance aux antibiotiques constitue aujourd'hui une grave menace pesant sur la santé mondiale, la sécurité alimentaire et le développement. Elle peut toucher toute personne, à n'importe quel âge et dans n'importe quel pays.

BY-NC-ND

INTRODUCTION

BY-NC-ND

BY-NC-ND

Chapitre 1 : revue bibliographique sur les intégrons de résistance

Hatch Stokes et Ruth Hall découvrent dans les années 80, une plateforme conservée qu'ils baptisent intégron, capable de capturer et d'exprimer des gènes de résistance aux antibiotiques sous forme de cassettes (Stokes et Hall, 1989). Par la suite ont été définies deux grandes familles d'intégrons :

- Les intégrons de multirésistance (IM) ou intégrons mobiles (Nivina *et al.*, 2016), caractérisés par un nombre limité de cassettes, qui le plus souvent hébergent des gènes de résistance aux antibiotiques et qui peuvent être véhiculés par des EGM tels que plasmides et/ou transposons.
- Les intégrons chromosomiques sédentaires (Nivina *et al.*, 2016), pouvant porter jusqu'à 200 cassettes, dont le gène code une protéine de fonction souvent inconnue et qui sont strictement chromosomiques. Ils servent de réservoir de gènes adaptatifs aux stress environnementaux pour les bactéries.

Les IM jouent un rôle majeur dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques, surtout chez les bactéries à Gram négatif. Ils représentent des régions recombinogènes de variabilité génétique permettant de générer de la diversité phénotypique. Structurellement les intégrons sont formés d'une plateforme fonctionnelle qui assure les fonctions d'intégration, d'excision et d'expression des cassettes, et d'une partie variable représentée par un réseau de cassettes (Figure 2).

BY-NC-ND

BY-NC-ND

1.1 Définition et structure des intégrons de résistance

1.1.1 La plateforme fonctionnelle

La plateforme fonctionnelle aussi appelée région 5' conservée (« 5' CS ») comporte 3 éléments clés : un gène *intI* et son promoteur PintI qui code une intégrase IntI, un site de recombinaison spécifique *attI*, et un promoteur Pc (« Promoteur des cassettes ») (Figure 2) (Escudero *et al.*, 2015; Stokes et Hall, 1989).

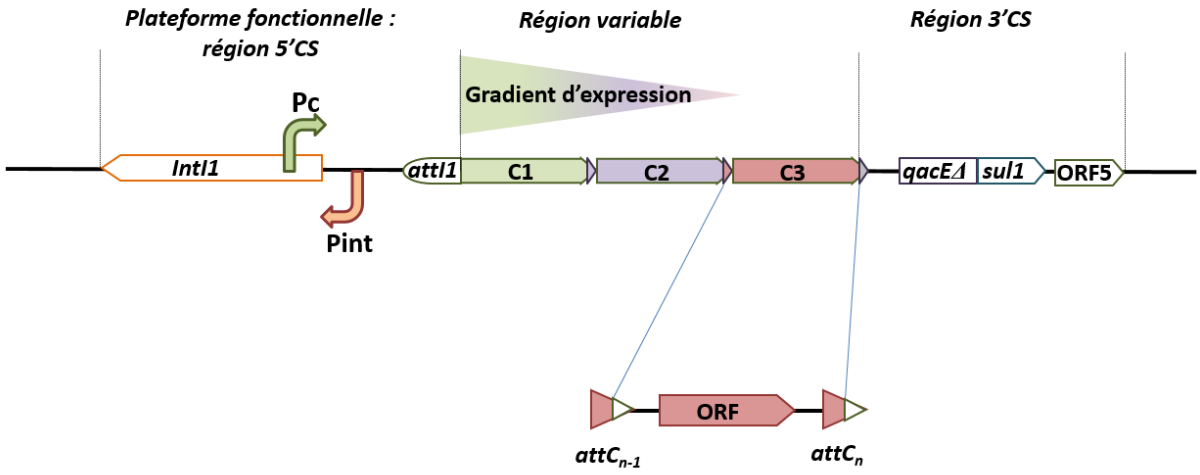


Figure 2 : Structure des intégrons. La plateforme fonctionnelle ou région 5'CS d'un intégron de multirésistance est composée de 3 éléments clés : un gène, *intI* codant une intégrase IntI avec son propre promoteur PintI, un promoteur d'expression des cassettes Pc et un site spécifique de recombinaison *attI*. En aval de la plateforme fonctionnelle se trouve le réseau de cassettes (C1, C2, C3), ORF est le cadre de lecture ouvert et *attC* le site de recombinaison de la cassette. L'expression des cassettes se fait à partir du promoteur Pc avec un gradient d'expression représenté par un dégradé de couleur. La région 3'CS des intégrons de classe 1 clinique se compose en général des gènes *qacEΔ1*, *sul1* et d'un cadre ouvert de lecture, ORF5, de fonction inconnue.

1.1.1.1 Gène de l'intégrase intI et son promoteur

Le gène *intI* code une intégrase IntI qui appartient à la famille des recombinases à tyrosine spécifique de site (Nunes-Düby *et al.*, 1998). La famille des tyrosine-recombinases compte plus

BY-NC-ND

de 100 membres qui présentent entre eux une faible identité de séquence, mais qui partagent le même mécanisme d'action, proche de celui des topo-isomérases I (Argos *et al.*, 1986; Gopaul et Duyne, 1999; Grainge et Jayaram, 1999). Quatre résidus conservés « Arginine-Histidine-Arginine-Tyrosine » sont localisés dans la partie carboxyle de la protéine et sont compris dans deux régions : box I (contenant le premier résidu arginine) et box II (contenant les trois autres résidus). Trois motifs conservés sont aussi identifiés : patch I, II et un patch III, ce dernier étant spécifique des intégrases d'intégron, ils jouent un rôle dans la structure secondaire de ces enzymes (Messier et Roy, 2001). A la différence des autres tyrosine-recombinases, les intégrases d'intégron possèdent, au niveau du patch III, un groupe supplémentaire de résidus, qui pourrait jouer un rôle dans la liaison à l'ADN et dans l'activité de recombinaison (figure 3) (Messier et Roy, 2001).

L'intégrase est l'élément clé du système intégron, en étant responsable de sa plasticité. En effet elle est capable de catalyser des recombinaisons (excisions et intégrations) de cassettes grâce à la reconnaissance des sites de recombinaison *attI* et *attC*. Le gène *intI* a une orientation antisens par rapport aux cassettes (Mazel, 2006). Il existe des dizaines d'intégrases, tous intégrons confondus.

Parmi les IM, 5 classes ont été définies sur la base de la séquence en acides aminés de leur intégrase (Hall et Collis, 1995) :

- Les IM de classe 1 (IM1) codent l'intégrase IntI1, proteine de 337 acides aminés.
- Les IM de classe 2 (IM2) codent l'intégrase IntI2, protéine de 325 acides aminés. Elle est le plus souvent non fonctionnelle du fait de la présence d'un codon stop prématuré dans le gène *intI2* et comporte alors 178 acides aminés (Hansson *et al.*, 2002).
- Les IM de classe 3 (IM3) codent l'intégrase IntI3, protéine de 346 acides aminés.
- Les IM des classes 4 (IM4) et 5 (IM5) ont été identifiés par leur implication dans l'augmentation de la résistance au triméthoprime codée par le gène *dfrA1* chez des espèces de *Vibrio*.

Malgré tout, les séquences protéiques de ces intégrases présentent une forte similitude avec 40 % à 60 % d'identité entre elles (Hall *et al.*, 1999).

BY-NC-ND

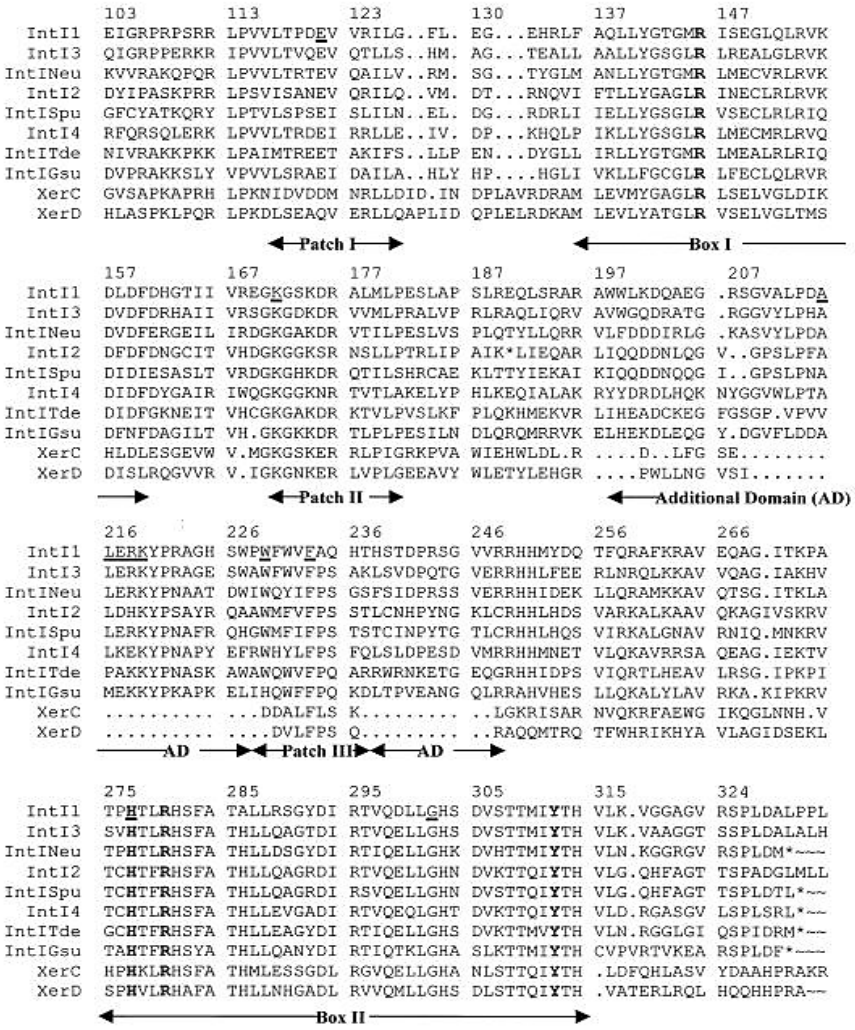


Figure 3 : Alignement de la séquence C-terminale des intégrases d'intégron avec d'autres tyrosine-recombinases. IntI1, intégrase d'intégron de classe 1 du plasmide pVS1 ; IntI2, intégrase d'intégron de classe 2 du transposon Tn*7* ; IntI3, intégrase d'intégron de classe 3 du plasmide de *Serratia marcescens* ; IntI4, intégrase d'intégron de classe 4 de *Vibrio cholerae* ; IntISpu, intégrase d'intégron de *Shewanella putrefaciens* ; IntINeu, intégrase d'intégron de *Nitrosomonas europaea* ; IntITde, intégrase d'intégron de *Treponema denticola* ; IntIGsu, intégrase d'intégron de *Geobacter sulfurreducens* ; XerC, recombinase de *E. coli* ; XerD, recombinase de *E. coli.* La numération des résidus est basée sur celle de la sequence d'IntI1 et les résidus mutés sont soulignés. Le domaine additionnel des intégrases d'intégron, les différents box et motifs sont indiqués sous l'alignement. Les résidus conservés de la tétrade (RHRY) sont indiqués en gras. (Messier et Roy, 2001)

BY-NC-ND

1.1.1.2 Site de recombinaison attI

Le site *attI* est composé de 63 paires de bases (pb), mais sa séquence varie beaucoup d'une classe d'intégron à l'autre (Rowe-Magnus *et al.*, 2001). Ainsi, à chaque classe d'intégron correspond son site *attI* (Collis *et al.*, 2002b; Hall *et al.*, 1999). Il est situé juste en aval de la plateforme fonctionnelle et fait la jonction avec le réseau de cassettes. Il est reconnu spécifiquement par la protéine IntI et sert de point d'insertion pour les cassettes.

Les intégrases les plus étudiées sont l'intégrase des IM1, IntI1 et l'intégrase de l'intégron chromosomique sédentaire de *Vibrio cholerae*, IntIVch. Chez IntI1, ont été identifiés 2 sites de liaison pour l'intégrase (Figure 4) constitués de deux séquences inversées répétées, appelées boîte L et boîte R, qui forment le « site simple » ou « site cœur », indispensable à la recombinaison par IntI (Collis et Hall, 2004). La boîte R, motif conservé de 7pb, de consensus GTTRRRY (R : purine, Y : pyrimidine), correspond au point de recombinaison. La réaction de recombinaison a lieu dans la boîte R au niveau du motif conservé GTT (Stokes *et al.*, 1997). Deux autres sites de fixation sont décrits pour la protéine IntI1, DR1 et DR2 (Gravel *et al.*, 1998). Ils ne sont pas nécessaires à l'activité de IntI1, mais ils augmentent son efficacité (Partridge *et al.*, 2000) en favorisant l'intéraction entre IntI et la boîte R où a lieu la recombinaison entre le G et le premier T (Hall *et al.*, 1991; Partridge *et al.*, 2000). Les séquences inversées répétées permettent d'adopter une structure secondaire tige-boucle, indispensable à la recombinaison ; l'intégrase se fixe sur 2 brins du site *attI* et sur le brin inférieur du site *attC* sous la tige boucle (Figure 5) (Bouvier *et al.*, 2005; Francia *et al.*, 1999).

Bien que chaque intégrase d'intégron soit fortement spécifique de son site *attI* associé, certaines sont capables de recombiner, moins efficacement, avec d'autres sites *attI* de classe différente. Par exemple IntI1, outre *attI1* peut reconnaître *attI2* et *attI3* (Collis *et al.*, 2002b).

BY-NC-ND

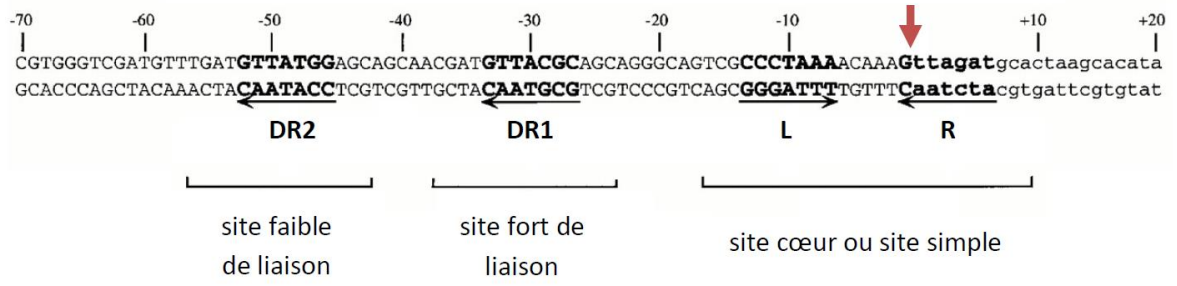


Figure 4 : Structure du site *attI1*. Le site *attI1* contient quatre points de liaison à l'intégrase, L, R, DR1 et DR2. Les flèches horizontales indiquent l'orientation des sites de liaison. Le motif conservé d'initiation de la réaction de recombinaison, GTT est indiqué par une flèche rouge. (D'après Partridge *et al.*, 2000)

1.1.1.3 Promoteur des cassettes

De façon générale, les cassettes ne possèdent pas de promoteur. La majorité des études sur l'expression des gènes des cassettes ont été réalisées sur les IM1, où l'expression des cassettes est assurée par le promoteur Pc, localisé dans la séquence codante du gène *intI1*, environ 200 pb en amont de la première cassette. Il est dans 10% des cas associé à un deuxième promoteur des cassettes, P2, localisé dans le site *attI1* (Cambray *et al.*, 2010; Vinué *et al.*, 2011). Il peut varier en séquence, ainsi chez les IM1, différents variants de Pc, de forces différentes, ont pu être décrits (Jové *et al.*, 2010; Papagiannitsis *et al.*, 2009). Chez les IM2, il a été mis en évidence la co-existence de 2 promoteurs Pc2A et Pc2B dans le site *attI2* capables d'assurer l'expression des gènes de cassette (Hansson *et al.*, 2002; Jové *et al.*, 2017). Chez les IM3, le promoteur Pc est localisé dans la séquence du gène *intI3*. A ce jour 4 variants chez les IM3 sont décrits (Simo Tchuinte *et al.*, 2016) et seule la force d'un de ces variants a été évaluée (Collis *et al.*, 2002b).

1.1.2 La région variable : les cassettes

En aval de la plateforme fonctionnelle se trouve la région variable qui est constituée d'un réseau de gènes qui sont eux-mêmes intégrés au sein de cassettes ou « cassettes de gène ». Une cassette est composée en général d'un cadre ouvert de lecture (ORF) et d'un site de recombinaison *attC* reconnu par l'intégrase IntI. Chez les IM, les cassettes sont en nombre limités, 2 ou 3 en moyenne (Partridge *et al.*, 2009), mais certains réseaux plus grands pouvant

BY-NC-ND

aller jusqu'à 10 cassettes ont aussi été décrits (GenBank : KC170993). A l'inverse, il est aussi rapporté des IM sans cassette (Bissonnette et Roy, 1992).

1.1.2.1 La nature des cassettes

Les gènes contenus dans les cassettes des IM codent principalement pour des résistances aux antibiotiques. Une revue en 2009 a rapporté plus de 130 cassettes différentes correspodant à la plupart des familles d'antibiotiques (β-lactamines, aminosides, triméthoprime, chloramphénicol, fosfomycine, macrolides, rifampicine mais aussi quinolones) (Partridge *et al.*, 2009). Certaines cassettes appelées *gcu* (gene of unknown function) codent des protéines de fonction inconnue.

1.1.2.2 Site de recombinaison attC

Les sites *attC* sont des éléments qui varient en taille (57 to 141 bp) et en séquence (Stokes *et al.*, 1997). Ils présentent une organisation palindromique conservée (Hall *et al.*, 1991) qui consiste en deux séquences R''-L'' et L'-R', séquences inversées répétées encadrant une région variable (Stokes *et al.*, 1997). Les sites R et R'' sont constitués de 7pb de consensus RYYYAAC et GTTRRRY (R : purines, Y : pyrimidine) les résidus 5'-AAC-3' et 5'-GTT-3' sont conservés (Stokes *et al.*, 1997). Ces séquences inversées répétées permettent au site *attC* d'adopter une structure secondaire cruciforme de type « tige-boucle » (Figure 5) qui est reconnue par l'intégrase et qui sert de substrat à la réaction de recombinaison (Francia *et al.*, 1999; Johansson *et al.*, 2004). Une fois que l'intégrase a fixé le site *attC*, elle catalyse la recombinaison en mettant en jeu les site R'' et R' qui constituent une boîte R fonctionnelle contenant le triplet AAC conservé (Bouvier *et al.*, 2009).

L'intégrase peut aussi se fixer sur des sites *attC* non totalement structurés (Loot *et al.*, 2014). Les sites ne sont pas reconnus sur la base de leur séquence, mais sur leur structure secondaire, et c'est pour cela que l'intégrase peut reconnaitre et recombiner des sites *attC* de séquences très différentes.

BY-NC-ND

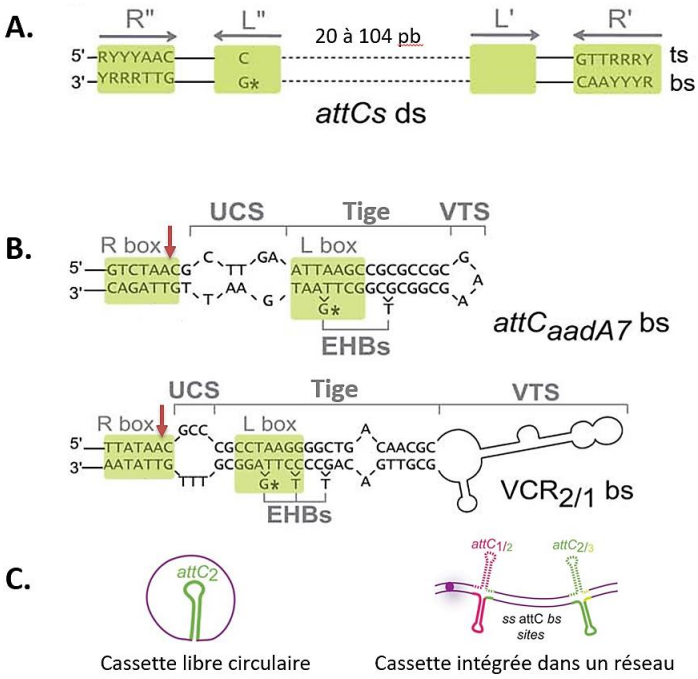


Figure 5 : Structure du site de recombinaison *attC*. A. Site *attC* double brin non structuré. Présence de deux séquences inversées répétées R''-L'' et L'-R' séparées par une région de taille variable de 20 à 120 pb. En s'appariant sous forme simple brin, ces séquences inversées répétées vont conduire à la structuration du site *attC*. Ts, brin du haut (top strand) ; bs : brin du bas (bottom strand). **B. Structuration du site *attC* : apparition d'un motif cruciforme composé de deux motifs « tige-boucle » simple brin. Exemples des sites *attCaadA7* et *attCVCR2/1*.** Une fois structuré sous forme simple brin, le site *attC* présente deux boîtes R et L qui seront reconnues par la protéine IntI. La réaction de recombinaison aura lieu dans la boîte R entre le deuxième A et le C du motif AAC conservé (flèche rouge). La recombinaison s'opère sur le brin du bas (bs) plus recombinogène. Trois éléments structuraux importants sont à remarquer : (i) la tige qui contient des bases dites extra-hélicoïdales ou EHB issues de mésappariements entre les séquences inversées répétées, (ii) la région UCS (Unpaired Central Spacer) comprise entre les boîtes R et L, (iii) la boucle ou région VTS (Variable Terminal Structure) de taille et de structure variable. **C. Représentations schématique de sites *attC* dans une cassette libre sous forme circulaire et dans un réseau de cassettes.** Les gènes de cassette sont représentés en violet, les sites *attC1*, *2* et *3* en rose, vert et jaune respectivement. (D'après Escudero *et al.*, 2015)

BY-NC-ND

BY-NC-ND

1.1.3 L'activité de recombinaison de l'intégrase ou le mouvement des cassettes

Les cassettes peuvent se trouver sous deux formes : linéaire lorsqu'elles sont insérées dans un intégron et circulaire lorsqu'elles sont en dehors de l'intégron. La cassette sous forme circulaire est non réplicative mais mobilisable (Collis et Hall, 1992). C'est l'intégrase IntI qui catalyse les mécanismes de recombinaison des cassettes en faisant intervenir les sites *attI* et *attC* (Figure 6). La recombinaison se fait au niveau d'un site indispensable au mécanisme, caractérisé par la présence d'un triplet GTT au sein du motif GTTRRRY. La recombinaison des cassettes s'effectue entre le G du premier site de recombinaison et le premier T du deuxième site (Recchia *et al.*, 1994). Trois types de recombinaisons ont été décrits : ***attI* x *attC* ; *attI* x *attI* et *attC* x *attC*.** Les évènements impliquant deux sites *attI* sont moins efficaces que ceux impliquant deux sites *attC*. Par contre la recombinaison *attI* x *attC* est la plus efficace et la plus fréquente des trois (Collis *et al.*, 2001).

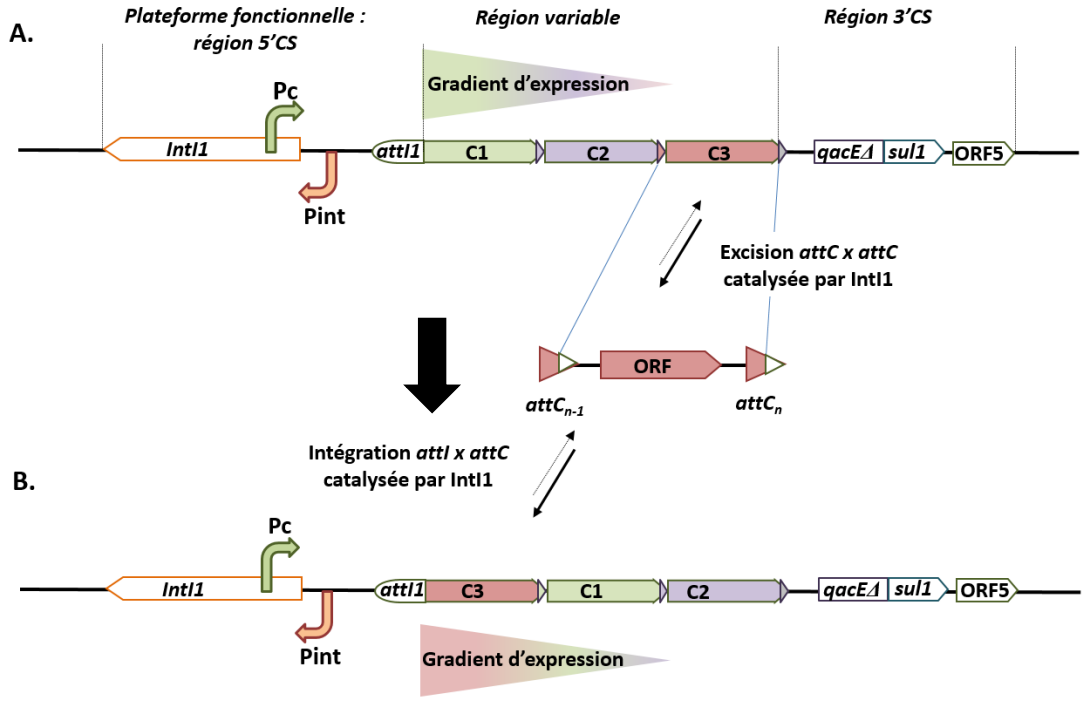


Figure 6 : Structure schématique d'un IM1 et mécanisme de mobilisation des cassettes. A. Excision de la cassette C3 par recombinaison spécifique entre deux sites *attC* et intégration de la cassette C3 en amont du réseau de cassette par recombinaison spécifique entre un site *attC* et le site *attI1*. Pc : promoteur des cassettes, Pint Promoteur de l'intégrase, *intI1* : gène de l'intégrase, C1, C2, C3 : cassettes de gène, *attI1*, *attC*$_n$ et *attC*$_{n-1}$: sites de recombinaison spécifique. **B.** Schéma de l'intégron après intégration de la cassette C3 en amont du réseau.

BY-NC-ND

1.1.3.1 Recombinaison attI/attC : insertion des cassettes

L'**intégration** d'une cassette se fait préférentiellement par recombinaison entre un site *attI* et un site *attC.* Ainsi l'insertion d'une cassette se fait au début du réseau de cassettes, le plus proche possible du promoteur Pc (Collis *et al.*, 1993; Hall *et al.*, 1991). Cette caractéristique est importante car les cassettes n'étant en général exprimées qu'à partir du promoteur Pc, avec un gradient d'expression, celles qui sont les plus proches du promoteur ont une expression plus forte (Cambray *et al.*, 2010; Hall et Collis, 1995).

Il a été montré que l'intégrase IntI1 catalyse la recombinaison entre la séquence double brin du site *attI1* et la séquence simple brin (brin inférieur) du site *attC1* (Figure 7). Ce mécanisme entraine un échange de brin d'ADN entre les 2 sites conduisant à la formation d'une jonction de Holliday atypique qui sera résolue par réplication (Bouvier *et al.*, 2005; Loot *et al.*, 2012). Les recombinaisons *attI x attC* peuvent aussi se produire entre 2 intégrons portés chacun par un plasmide différent et conduire ainsi à la formation de co-intégrats (Collis *et al.*, 2001).

BY-NC-ND

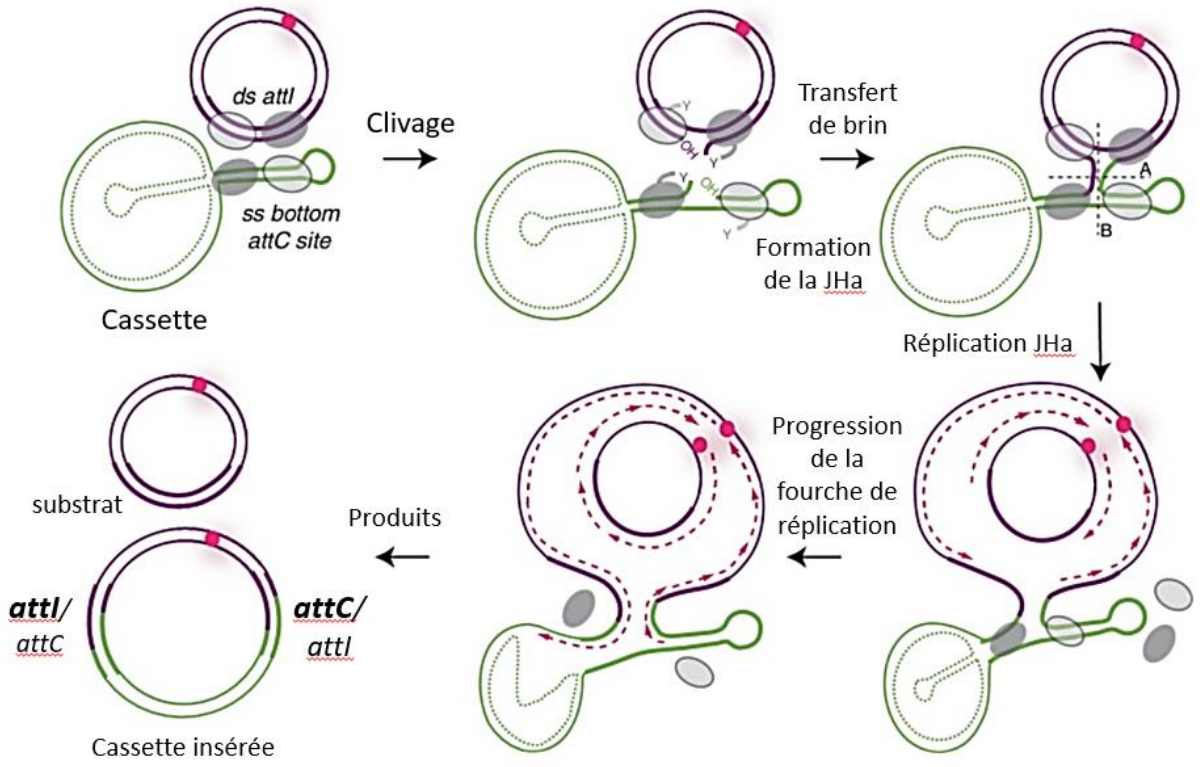


Figure 7 : Mécanisme moléculaire de la recombinaison site-spécifique entre les sites *attI* et *attC* au cours de l'insertion des cassettes de gène. La recombinaison se fait entre une molécule portant le site *attI* double brin (*ds attI*) et une cassette contenant le site *attC* avec le brin du bas replié en tige-boucle (*ss bottom attC site*). Les sites de recombinaison *attI* et *attC* sont représentés en traits gras, violet et vert respectivement. Le brin du haut du site *attC* est représenté en pointillés verts. Lors de la recombinaison, le complexe synaptique est formé et comprend les 4 protomères d'intégrase liés aux 2 duplex d'ADN à recombiner. Le brin d'ADN courbé détermine quel protomère est activé et donc qui clive le brin. Les deux protomères actifs sont représentés par des ovales gris foncés et les deux protomères inactifs par des ovales gris clairs. Un brin de chaque duplex est clivé, transféré et ligaturé afin de former des jonctions de Holliday atypiques (JHa). La résolution classique par transfert du second brin aboutirait à des molécules linéaires fermées de façon covalentes et non viables. La résolution non abortive implique une étape de réplication. L'origine de réplication est représentée par un cercle rose et l'ADN synthètisé par des lignes pointillées violettes et roses. Les produits issus de cette réaction sont la molécule contenant la cassette nouvellement insérée provenant du brin du bas et le substrat initial provenant de la réplication du brin du haut. (D'après Loot *et al.*, 2012)

BY-NC-ND

1.1.3.2 Le recombinaison attC/attC : excision des cassettes

L'**excision** d'une cassette de l'intégron conduit à la libération de la cassette sous forme circulaire (Figure 8) (Collis et Hall, 1992). Les mouvements d'excision font intervenir le plus souvent les réactions *attC* x *attC* et plus rarement les réactions *attI* x *attC* (Bennett, 1999). Les cassettes excisées étant dépourvues d'origine de réplication, elles seront perdues lors de la division cellulaire bactérienne si elles ne sont pas rapidement réintégrées dans un intégron ou un autre site secondaire de recombinaison (Recchia et Hall, 1995). Un site secondaire est défini par un consensus GNT (GWT) (Recchia *et al.*, 1994) ou GWTMW (Francia *et al.*, 1993) (W : a/t et M : a/c).

L'ensemble de ces réarrangements au sein de la région variable, module l'expression des cassettes. Ainsi, une étude récente a montré que sous la pression de sélection exercée par le chloramphénicol, l'intégrase IntI1 assurait le réarrangement de cassettes *via* l'excision des cassettes adjacentes à la cassette *catB9* (codant la résistance au chloramphénicol) facilitant ainsi le rapprochement de cette dernière du promoteur Pc (Barraud et Ploy, 2015).

BY-NC-ND

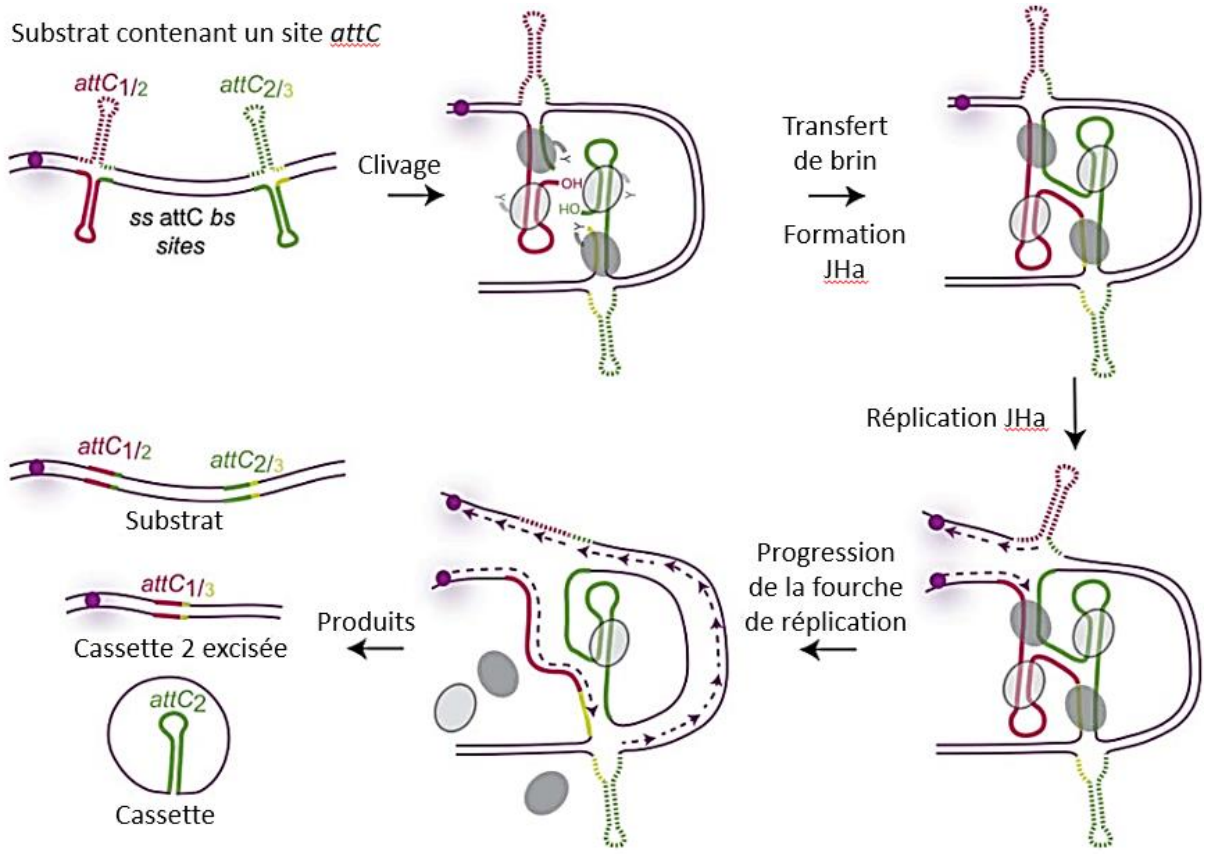


Figure 8 : Mécanisme moléculaire de recombinaison spécifique entre deux sites *attC* au cours de l'excision d'une cassette. La recombinaison a lieu entre deux simples brins repliés en tige-boucle (*ss attC bs site*), indiqués en traits gras vert et rose. Les brins du haut de *attC* sont représentés en pointillés. Le complexe synaptique est formé pas la liaison de deux duplex d'ADN à recombiner avec les 4 protomères de l'intégrase. Les deux protomères activés sont représentés par des ovales gris foncés et les protomères inactifs par des ovales gris clairs. Un brin de chaque duplex est clivé et transféré pour former une jonction de Holliday atypique (JHa) qui est résolue par une étape de réplication comme celle réalisée lors de la recombinaison *attI* x *attC*. L'origine de réplication est représentée par un cercle violet et l'ADN synthétisé par des traits pointillés violets. Les produits issus de l'excision de la cassette sont le substrat initial, issu de la réplication du brin du haut, la molécule d'ADN ne contenant plus la cassette excisée et la cassette excisée, ces deux derniers provenant de la réplication du brin du bas. Les sites *attC* hybrides sont indiqués. (D'après Escudero *et al.*, 2015)

BY-NC-ND

1.1.4 Région 3' Conserved Segment (3'CS)

La séquence de cette région dépend de la classe de l'intégron. Elle est intéressante en terme de résistance chez les IM1 où l'on retrouve le plus fréquemment une structure « *sul1*-type » ou « clinique » (Partridge, 2011). Cette structure dérive d'un transposon Tn*402*-like dans lequel s'est inséré le gène *sul1*, aboutissant à la perte d'une partie du gène *qacE* et d'une partie du tni_{402} (Gillings *et al.*, 2008; Stokes *et al.*, 2006) (voir Figure 11). Ainsi, la région 3'CS correspond au gène *qacEΔ1* (dérivé tronqué de *qacE*) chevauchant le gène s*ul1*, puis orf*5*. Le gène *qacEΔ1* (348 pb) code une pompe d'efflux et confère à la bactérie une résistance de bas niveau aux antiseptiques et désinfectants, tels que les ammoniums quaternaires et les agents intercalants (Paulsen *et al.*, 1993). Le gène *sul1* (840 pb) code une dihydroptéroate synthétase intervenant dans la synthèse des folates qui confère une résistance aux sulfamides. La séquence codante *orf5* (501 pb) code une protéine de fonction inconnue (Bissonnette et Roy, 1992). Initialement la région en 3' des IM a été dénommée région 3'CS à l'image de la région 5'CS, cependant un grand nombre de publications rapportent des modifications importantes de cette région, notamment des régions 3'CS incomplètes ou manquantes (Antunes *et al.*, 2007; Bischoff *et al.*, 2005; Gillings *et al.*, 2008; Hall *et al.*, 1994; Partridge *et al.*, 2001, 2009; Sáenz *et al.*, 2010; Sunde *et al.*, 2008; Toleman *et al.*, 2007), ce qui d'ailleurs prend en défaut bon nombre de PCR utilisées pour amplifier la région variable, voire même pour détecter un IM1 (Lee *et al.*, 2011).

Chez les IM2, la région en aval du réseau de cassettes comporte les 5 gènes *tns* impliqués dans des fonctions de transposition (Flores *et al.*, 1990) ; chez les IM3, elle est très peu décrite.

BY-NC-ND

1.2 La régulation de l'expression des gènes de l'intégron

1.2.1 Expression des cassettes de résistance

Les cassettes sont orientées dans la même direction et ne contiennent pas, à de rares exceptions près, de promoteur : les gènes sont donc co-transcrits comme dans un opéron à partir du promoteur Pc localisé dans la région 5' conservée de l'intégron (Figures 6 et 9).

Pc variant	TXN-10 motif[a]	P2 form	Total number	Frequency (%)[b]	Occurrence (%)[c]
PcS	-	-	76	97.4	23.7
	TGN-10*	-	1	1.3	0.3
	-	P2	1	1.3	0.3
			78	**100**	**24.3**
PcW	-	-	53	39.6	16.5
	TGN-10*	-	54	40.3	16.8
	TGN-10*	P2	1	0.7	0.3
	TGN-10*	P2m1	1	0.7	0.3
	TAN-10	-	1	0.7	0.3
	-	P2	23	17.2	7.2
	-	P2m2	1	0.7	0.3
			134	**100**	**41.7**
PcH1	-	-	84	93.3	26.2
	TTN-10	-	2	2.2	0.6
	-	P2	3	3.3	0.9
		P2m1	1	1.1	0.3
	-		**90**	**100**	**28.0**
PcH2	-	-	9	64.3	2.8
	TGN-10*	-	5	35.7	1.6
			14	**100**	**4.4**
PcPUO	-	-	**2**	**100**	**0.6**
PcIn42	-	-	**1**	**100**	**0.3**
PcIn116	-	-	**1**	**100**	**0.3**
PcSS	-	-	**1**	**100**	**0.3**

a The TGN-10 configuration refers to an extended −10 promoter and is indicated by a star [19].
b Frequency of each Pc-P2 combination within the Pc variant group.
c Occurrence of each Pc-P2 combination among the 321 analyzed integrons.
doi:10.1371/journal.pgen.1000793.t002

Tableau 1 : Combinaison des séquences Pc-P2 des IM1. (Jové *et al.*, 2010)

Chez les IM1, à ce jour 13 variants sont définis dans la littérature (Tableau 1) (Jové *et al.*, 2010) sur la base de la séquence consensus des éléments -10 et -35 des promoteurs reconnus par la sous-unité σ^{70} chez *E. coli*, ainsi que du motif en amont de la séquence -10. La force du variant de Pc dépend du degré d'identité qu'il a avec cette séquence consensus (Collis *et al.*, 2002b; Collis et Hall, 1995; Correia *et al.*, 2003; Hansson *et al.*, 2002; Lévesque *et al.*, 1994). Il a été démontré expérimentalement que plus le variant de Pc est fort, plus les gènes de cassette

BY-NC-ND

seront exprimés. Parmi ces différents variants, 5 sont retrouvés plus fréquemment : PcW-P2<PcW≈PcW_{TGN-10}<PcS≈PcH1. Pour le variant PcW, il a été montré qu'une mutation de C en G 2 pb en amont de l'élément -10 créait un motif TGN-10 étendu et augmentait la force du promoteur d'un facteur 5 à 15 (Figure 9) (Jové *et al.*, 2010; Nesvera *et al.*, 1998). Cette mutation est aussi connue pour augmenter l'efficacité de la transcription des promoteurs reconnus par le facteur σ^{70} chez *E. coli* (Burr *et al.*, 2000). Le motif TGN-10 n'a pas d'effet significatif sur l'efficacité des promoteurs PcS ou PcH2 (variant du promoteur Pc classé dans les promoteurs forts), probablement parce qu'ils ont déjà une efficacité importante (Jové *et al.*, 2010). Par conséquent, par ordre de force croissante on classe : PcW<PcH1<PcW-P2<PcW_{TGN-10}<PcS (respectivement 4.5-, 7-, 15- et 25-fois plus actif que PcW) (Jové *et al.*, 2010). La force relative est définie par rapport au promoteur le plus faible PcW (pour weak).
De plus, un second promoteur P2 a été décrit en aval de Pc chez environ 10% des IM1 (Jové *et al.*, 2010). Il est formé par l'insertion de 3 G qui crée l'espace suffisant entre les deux boîtes -10 et -35 pour créer un promoteur fonctionnel (Collis et Hall, 1995). Il est situé dans le site *attI*, dans la 5'CS, et est souvent associé au PcW dont il améliore l'efficacité (Jové *et al.*, 2010).

Enfin, le niveau d'expression des gènes de cassette pourrait aussi dépendre des sites *attC* qui agiraient comme des atténuateurs traductionnels, leurs structures tige-boucle pouvant en effet gêner la progression du ribosome le long de l'ARNm (Jacquier *et al.*, 2009).
Chez les IM2, lorsqu'ils sont présents, les Pc2A et Pc2B sont capables d'assurer l'expression des gènes de cassette (Hansson *et al.*, 2002). Chez les IM3 seule la force d'un des 4 variants a été évaluée (Collis *et al.*, 2002a).

BY-NC-ND

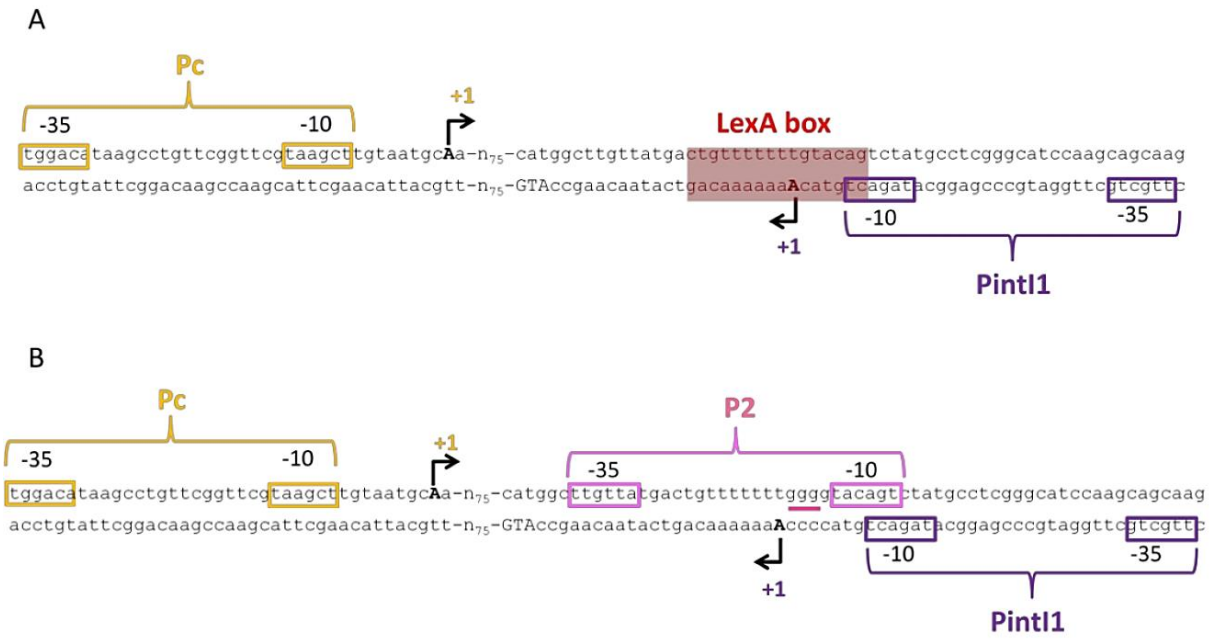


Figure 9 : Séquence et organisation de la région promotrice contenant Pc et PintI1 des IM1. **A.** En l'absence du promoteur P2 : les éléments -10 et -35 sont encadrés en violet pour PintI1 et en jaune pour Pc, les +1 de transcriptions sont indiqués avec des flèches en trait gras, le codon d'initiation de la traduction de l'intégrase est indiqué en lettres majuscules et le site de fixation de la protéine LexA est encadré en rouge. **B.** En présence du promoteur P2 : les éléments -10 et -35 sont encadrés en rose pour P2. L'insertion de 3 G créant le promoteur P2 est soulignée en rose, cette insertion est responsable de l'inactivation du site de fixation de LexA. D'après Guérin *et al.*, 2011.

BY-NC-ND

1.2.2 Gène de l'intégrase

Il a été montré que la présence d'une intégrase fonctionnelle avait un coût biologique pour la bactérie et qu'en contrepartie il était bénéfique d'en réguler l'expression (Harms *et al.*, 2013; Lacotte *et al.*, 2017). L'expression du gène *intI1* est assurée par le promoteur PintI1, identifié en 2009 (Figure 9).

1.2.2.1 Activité des variants de l'intégrase

Dans les IM1, le promoteur Pc est situé dans la séquence codante du gène *intI1*. Certaines substitutions de bases des motifs -35, -10 et -10 étendue qui définissent des variant de Pc, induisent des changements dans la séquence en acides aminés de l'intégrase IntI1. Ces variations permettent de caractériser 3 variants catalytiques de IntI1 possédant des capacités d'excision différentes (Tableau 2). De façon assez intéressante la force relative du promoteur est inversement proportionnelle à l'activité d'excision de l'intégrase : plus le promoteur est faible, plus l'activité d'excision de l'intégrase est importante (Jové *et al.*, 2010). Il existe donc une relation étroite entre la capacité de recombinaison de l'intégrase et l'expression des cassettes, donc de la résistance.

BY-NC-ND

Variant de Pc	Séquence -35 -10	Fréquence	Force relative	Variant IntI1	Efficacité de recombinaison
σ^{70}	TTGACA – $N_{17+/-1}$ – TATAAT	-	-	-	-
PcW	TGGACA – N_{14} – TCNTAAGCT	16.5 %	1	$IntI1_{R32_H39}$	+++++
PcH1	TGGACA – N_{14} – TCNTAAACT	28 %	6	$IntI1_{R32_H39}$	+++++
PcW_{TGN-10}	TGGACA – N_{14} – TGNTAAGCT	16.8 %	18	$IntI1_{P32_H39}$	+
PcH2	TTGACA – N_{14} – TCNTAAGCT	4.4 %	20	$IntI1_{R32_N39}$	++
PcS	TTGACA – N_{14} – TCNTAAACT	24.3 %	25	$IntI1_{R32_N39}$	++

Tableau 2 : Effet du polymorphisme de Pc sur les fonctions de l'intégron. On peut remarquer que les variants qui sont classés comme faibles (PcW et PcH1) sont associés à une intégrase ayant une activité de recombinaison importante alors que les variants dit forts (PcW_{TGN-10}, PcH2, PcS) sont eux associés à des intégrases ayant une activité de recombinaison faible. Il existe donc un équilibre entre activité de recombinaison et force d'expression des cassettes. D'après Jové *et al.*, 2010.

BY-NC-ND

1.2.2.2 Réponse SOS

La protéine LexA est le répresseur transcriptionnel de la réponse SOS, qui est un processus de réparation des dommages de l'ADN subits lors d'un stress (Walker, 1984). Un site de fixation pour la protéine LexA est retrouvé de façon conservée au sein des régions promotrices du gène de l'intégrase des 3 classes principales d'IM et des intégrons chromosomiques de *V. cholerae* (Guerin *et al.*, 2009). Expérimentalement, chez les IM1, Il a été montré que LexA se fixait bien sur son site de fixation potentiel présent dans *attI1* (Guerin *et al.*, 2009) et qu'ainsi la réponses SOS régulait l'expression de l'intégrase IntI1 via une répression par la proteine LexA (Figure 10) (Guerin *et al.*, 2009). Il a été montré que les antibiotiques induisant la réponse SOS étaient capables d'activer l'expression de *intI1* et les mouvements de cassettes.

Plus récemment, il a été montré expérimentalement que, dans le biofilm, la réponse stringente, induite par la déplétion en nutriments, augmente l'expression basale de l'intégrase et qu'il s'agit d'une régulation spécifique au biofilm, médiée par la protéase Lon (Strugeon *et al.*, 2016).

1.2.2.3 Interférence transcriptionnelle entre le promoteur des cassettes et le promoteur du gène de l'intégrase

Les promoteurs Pint et Pc étant dirigés l'un vers l'autre dans la région promotrice des IM1 (voir Figure 9), il a été montré que le promoteur de l'intégrase PintI1 pouvait être régulé par Pc par un phénomène d'interférence transcriptionnelle. Cette interférence a été mise en évidence uniquement pour le variant fort de PcS qui est alors capable d'inhiber l'expression de *intI1*, même lorsque celle-ci est induite par la réponse SOS. Les autres variants du promoteur Pc n'influencent pas l'expression de l'intégrase (Guérin *et al.*, 2011).

BY-NC-ND

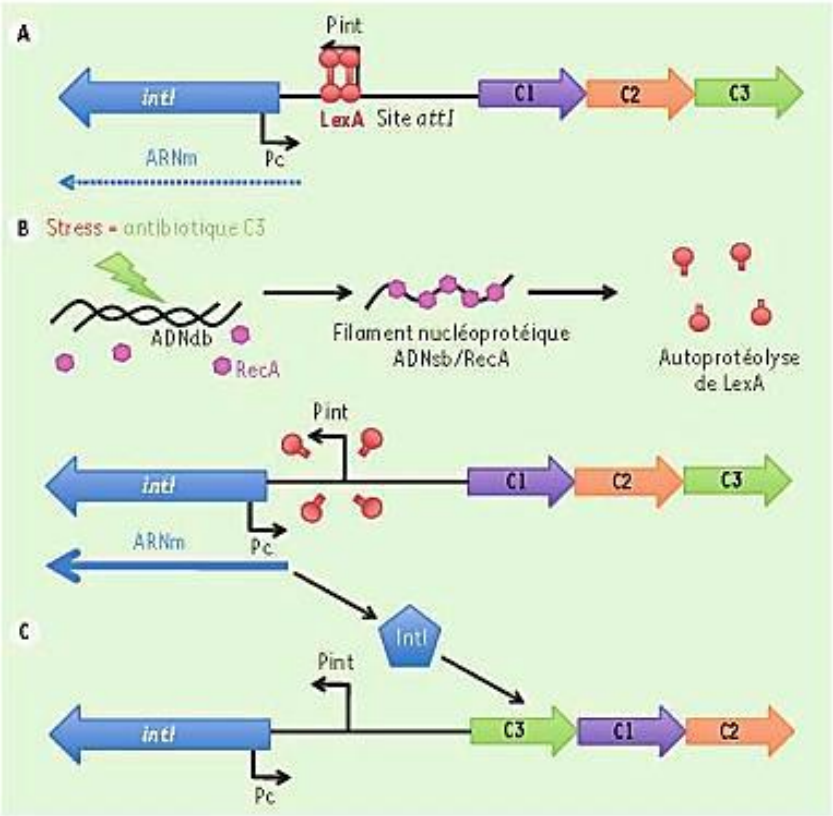


Figure 10 : Régulation de l'expression de l'intégrase par la réponse SOS. A. La protéine LexA est fixée sur le promoteur de l'intégrase Pint, réprimant ainsi l'expression de IntI. **B**. Lors d'un stress conduisant à la formation d'ADN simple brin, par exemple par un antibiotique dont la résistance est codée par la cassette C3, la proteine RecA se fixe sur l'ADN simpe brin et forme le filament nucléoprotéique ADNsb/RecA. Ce filament nucléoprotéique catalyse l'autoprotéolyse de LexA et donc l'activation de la réponse SOS. Le promoteur de l'intégrase est alors libéré et *intI* est exprimé. **C**. L'intégrase produite, par recombinaison site spécifique, peut alors induire un réarrangement de cassettes ramenant ainsi la cassette C3 en première position (plus proche du Pc) et ainsi permettre à la bactérie de résister au stress antibiotique qu'elle subit. Pc : Promoteur des cassettes ; *attI*, *attC1, attC2, attC3* : sites spécifiques de recombinaison ; *intI* : gène de l'intégrase, Pint : promoteur de l'intégrase, C1, C2 et C3 : cassettes de résistance. D'après Guérin *et al.*, 2010.

BY-NC-ND

1.3 Origine des intégrons

En 2011, Petrova *et al.* ont isolé d'un échantillon de permafrost sibérien âgé entre 15 000 et 40 000 ans, une souche de *Pseudomonas putid*a portant un IM1 localisé dans le transposon composite Tn*5045* situé sur le chromosome bactérien (Petrova *et al.*, 2011). L'intégron décrit présentait toutes les caractéristiques classiques d'un IM1 contemporain, à savoir : une région conservée 5' CS avec le gène *intI1* et le promoteur Pc*,* une cassette de gène *aadA2*, et une région 3' CS typique avec les gènes *qacE∆1, sul1* et *orf5* (Petrova *et al.*, 2011). De plus, la présence de gènes de cassette associés à une intégrase ont aussi été décrits dans des bactéries du genre *Vibrio* isolées en 1888 (Mazel *et al.*, 1998). Ces travaux témoignent de l'ancienneté des intégrons et de leur existence avant l'utilisation des antibiotiques en médecine. Pour aller dans ce sens, la comparaison phylogénique des gènes *intI* des intégrons chromosomiques sédentaires avec les génomes de leurs hôtes montrent une coévolution ancienne de ces structures, suggérant que ce système était probablement présent avant la spéciation des genres bactériens et qu'ils ont impacté l'évolution des bactéries depuis des centaines de millions d'années (Mazel, 2006).

L'organisation structurelle des IM proche de celle des intégrons chromosomiques sédentaires suggère que les IM dérivent des intégrons chromosomiques sédentaires, il y aurait un continuum d'évolution de structure d'intégron entre ces deux entités. D'autant plus qu'il a été montré que l'intégrase de l'intégron chromosomique sédentaire de *V. cholerae* (Vch*intIA*) a une activité recombinante et que les intégrases des IM sont capables de catalyser la capture des cassettes au sein des intégrons chromosomiques sédentaires (Rowe-Magnus *et al.*, 2002). Les IM1 se seraient formés par capture du gène de l'intégrase *intI1* et des sites de recombinaison *attC via* des éléments mobiles tels que les transposons (Rowe-Magnus *et al.*, 2001), en particulier le transposon *Tn402* (Figure 11). Des candidats pour être l'élement *Tn402*-like avant la capture de *intI1* peuvent être mis en évidence dans la flore commensale humaine (Gillings *et al.*, 2008). Les IM auraient évolué en s'adaptant aux pressions de sélection environnementale à partir d'un ancêtre intégron chromosomique.

BY-NC-ND

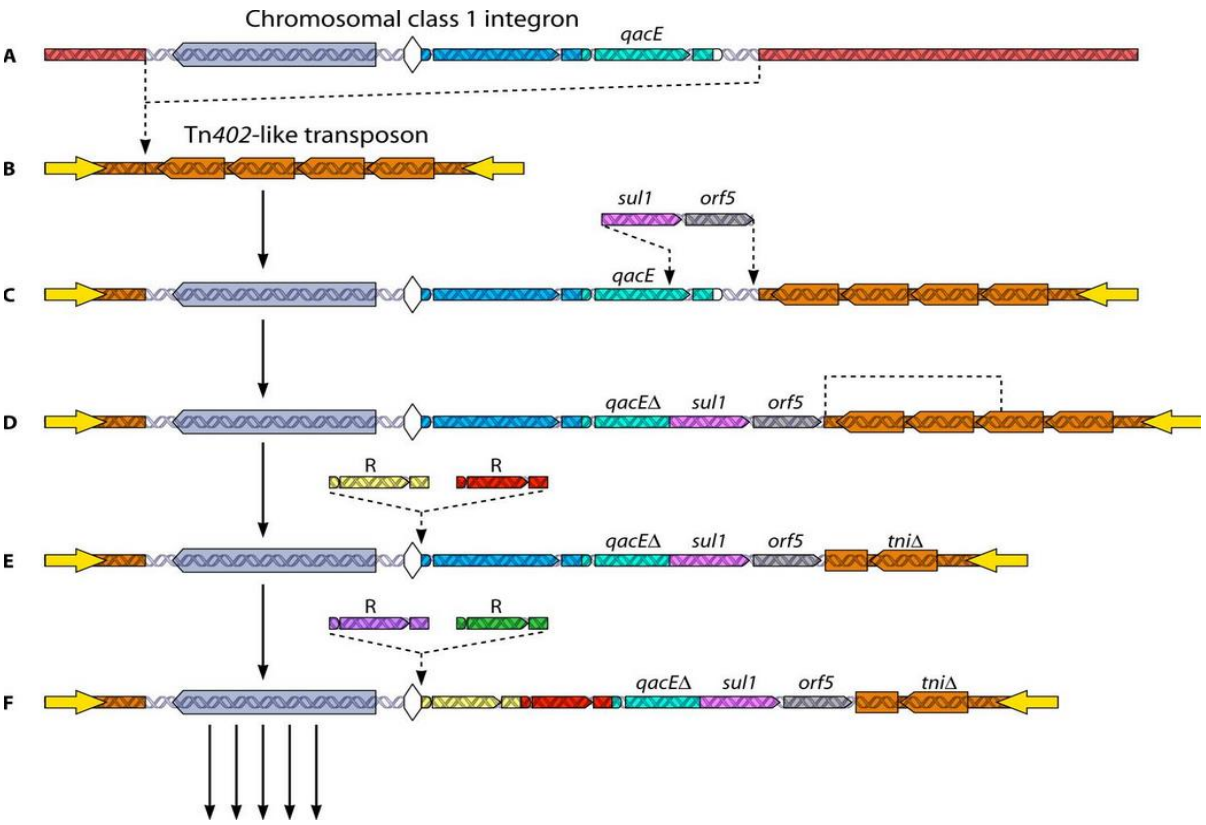


Figure 11 : Modèle de l'origine des IM1. Première étape hypothétique, (A) l'ancêtre commun des IM1 faisait partie d'un pool d'intégrons chromosomiques des *Betaproteobacteria*. (B et C) Cet IM1 aurait été capturé au sein d'un transposon Tn*402* (B) générant un élément hybride transposon/intégron portant *qacE* comme cassette finale, codant la résistance aux désinfectants. Cet évènement serait survenu avant ou concomitamment à l'ère des antibiotiques. (D) *sul1* gène de résistance pour le sulfamides et *orf5* auraient été intégrés, délétant une partie de *qacE*, générant la région 3'CS. (E) délétions, insertions et autres réarrangements impliquant *qacE, sul1* et les séquences adjacentes. (G) des délétions et insertions au sein de *tni* auraient généré l'intégron Tn*402* incapable de transposition, mais ayant acquis diverses résistances bactériennes par la diversité des cassettes du réseau, élargissant le champ des phénotypes de résistance conférés par les intégrons. (F) l'acquisition de nouvelles cassettes aurait continué et l'hybride Tn*402*-intégron aurait disséminé dans d'autres plasmides et transposons, tels que la famille des Tn*21*, ces évènements générant de la diversité et accélérant la pénétration des IM1 chez de nombreux pathogènes et commensaux. Les parties en orange foncé correspondent à l'environnement génétique de l'intégron ; en orange, le transposon Tn*402*-like ; en bleu-gris, le gène de l'intégrase ; en bleu, jaune, rouge, violet et vert, les cassettes de gène ; en turquoise, le gène *qacE* ; en rose, le gène *sul1* ; en gris, le gène *orf5*. D'après (Gillings *et al.*, 2008; Gillings, 2014).

BY-NC-ND

Les intégrons chromosomiques sédentaires peuvent être de très grandes structures, souvent > 100Kb, qui ont été décrites principalement dans la famille des *Vibrionaceae* et dans quelques genres bactériens environnementaux (Mazel *et al.*, 1998; Rowe-Magnus *et al.*, 2001). Leurs cassettes codent souvent des fonctions adaptatives, plus rarement la résistance aux antibiotiques, mais majoritairement ce sont des protéines de fonction inconnue (Rowe-Magnus *et al.*, 2001). Ils partagent des caractéristiques structurelles avec les IM, mais se distinguent de trois façons (Mazel *et al.*, 1998) :

1. Ils sont toujours localisés sur le chromosome alors que les IM sont hébergés par les éléments mobiles tels que les plasmides ou transposons assurant leur mobilité ;
2. La région variable présente souvent un plus grand nombre de cassettes (pouvant aller jusqu'à 200 cassettes) ;
3. Les sites de recombinaison *attC* des cassettes d'un même intégron chomosomique sédentaire sont très conservés, alors qu'ils sont variables à la fois en séquences et en taille pour les cassettes présentes chez les IM.

La localisation chromosomique ou la mobilité ont des conséquences sur l'évolution des bactéries, les IM sont associés au transfert horizontal alors que les intégrons chromosomiques sédentaires deviendraient plutôt des sites de diversité génétique (Boucher *et al.*, 2011; Gillings *et al.*, 2005). Il a été remarqué sur l'étude phylogénique d'intégrases d'intégrons de *Proteobacteria* de diverses origines géographiques que les intégrons marins sont apparentés entre eux et que les intégrons terrestres le sont entre eux, plutôt qu'en fonction de leur hôte, ce qui dénote du transfert horizontal des intégrons entre les espèces (Mazel, 2006).

Le processus de formation des cassettes reste non élucidé à ce jour. D'après le modèle de Leon et Roy, proposé en 2009, les cassettes se seraient formées par recombinaison homologue entre deux copies d'introns, l'une étant intégrée au niveau des terminateurs de transcription d'un gène, chromosomique bactérien par exemple, et l'autre dans un site *attC* (Léon et Roy, 2009).

BY-NC-ND

1.4 Épidémiologie des intégrons

A ce jour, 5 classes d'IM sont définies (1 à 5) en fonction de la séquence de leur intégrase. Les IM1 et IM3 (Arakawa *et al.*, 1995) sont associés au transposon Tn*402* (Collis *et al.*, 2002a; Xu *et al.*, 2007). Par contre, les IM2 sont principalement associés aux transposons dérivés de Tn*7* (Ramírez *et al.*, 2010). Ces trois classes sont celles qui sont les plus impliquées dans la diffusion de l'antibio-résistance. Les IM4 et IM5 sont responsables uniquement de la résistance au triméthoprime chez *Vibrio* spp.

1.4.1 Bactéries hôtes d'IM

1.4.1.1 Bactéries à Gram négatif

Les IM sont très majoritairement décrits chez les bactéries à Gram négatif (BGN). Des IM ont été retrouvés chez quasiment tous les genres de la famille des *Enterobacteriaceae*, les genres les plus impliqués étant *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Morganella* et *Proteus* (Deng *et al.*, 2015; Ferreira *et al.*, 2010; Naas *et al.*, 2000; Sallen *et al.*, 1995; Tsakris *et al.*, 2007) mais aussi chez certains BGN non fermentaires comme *A. baumannii, Aeromonas* et *P. aeruginosa* (Chang *et al.*, 2007; Ploy *et al.*, 2000; Ruiz *et al.*, 2003; Ruiz-Martínez *et al.*, 2011). Ce sont majoritairement des IM1 qui sont décrits et leur fréquence est comprise entre 22 et 59% (Deng *et al.*, 2015). Les IM2 sont aussi retrouvés chez les BGN appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* (Chainier *et al.*, 2017; Gassama Sow *et al.*, 2010, 2008; Lavakhamseh *et al.*, 2016; Mokracka *et al.*, 2012; Odetoyin *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2006; Stange *et al.*, 2016). En plus du domaine clinique, des BGN hébergeant des IM ont été rapportés dans des échantillons d'origine environnementale et animale sur l'ensemble des continents (Stokes et Gillings, 2011).

1.4.1.2 Bactéries à Gram positif

Les IM, principalement des IM1 et rarement des IM2, ont aussi été décrits chez des bactéries à Gram positif (BGP), principalement des bacilles à Gram positif, notamment du genre *Corynebacterium* (Barraud *et al.*, 2016, 2011; Nandi *et al.*, 2004; Nesvera *et al.*, 1998; Tauch

BY-NC-ND

et al., 2002). Des intégrons délétés d'une partie de l'intégrase et du site *attI* ont aussi été décrits chez *Mycobacterium* (Leão *et al.*, 2013; Martin *et al.*, 1990).

1.4.2 Intégrons de classe 1 : la diversité

Structurellement les IM1 sont souvent hébergés par des éléments mobiles comme les plasmides et les transposons de la famille Tn*3* (Tn*21* et Tn*1696*). On les retrouve plus rarement sur le chromosome bactérien (Kaushik *et al.*, 2017). Ils sont associés à des phénotypes de multirésistance pour leur hôte (Gillings *et al.*, 2008; Koczura *et al.*, 2014). Ils portent souvent des cassettes de résistance au triméthoprime (Cambray *et al.*, 2010; Fluit et Schmitz, 2004; Mazel, 2006), ce qui n'est pas étonnant car l'association triméthoprime + sulphaméthoxazole est fréquemment utilisée en clinique (Fluit et Schmitz, 2004). Associés à la résistance au triméthoprime, on retrouve souvent des gènes de résistance aux béta-lactamines (Mazel, 2006), mais aussi aux aminosides (Partridge, 2011).

L'utilisation continue des antibiotiques en clinique chez l'homme, chez l'animal et dans l'agriculture a favorisé l'extraordinaire abondance des IM. Les IM1 sont particulièrement répandus en clinique, leur fréquence est estimée entre 10% à 50% des Enterobactéries commensales des individus sains, y compris des enfants qui n'ont encore jamais été exposés aux antibiotiques (Gillings, 2014). Leur distribution chez l'homme, l'animal et dans l'environnement est détaillée dans le chapitre 1.7.

1.4.3 Intégrons de classe 2 : la stabilité

Les IM2 sont la classe la plus décrite après les IM1. Ils ont été le plus souvent retrouvés dans les transposons de la famille Tn*7* et leur mobilité est liée aux 5 gènes *tns* (*tnsA, tnsB, tnsC, tnsD* et *tnsE*) (Flores *et al.*, 1990). Leur intégrase IntI2 est le plus souvent non fonctionnelle, ce qui peut expliquer que l'on retrouve un réseau de cassette assez stable, le plus souvent composé des cassettes *dfrA1* (résistance au trimethoprime), *sat2* (résistance à la streptothricine) et *aadA1* (résistance aux streptomycine/spectinomycine) (Hansson *et al.*, 2002; Laroche *et al.*, 2009).

Toutefois, des IM2 avec d'autres cassettes ont été décrits (Ahmed *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2010; Barlow et Gobius, 2006; Biskri et Mazel, 2003; Dubois *et al.*, 2007; Dudley *et al.*, 2006;

BY-NC-ND

Gassama Sow *et al.*, 2008; Kadlec et Schwarz, 2008; Laroche *et al.*, 2009; Márquez *et al.*, 2008; Moura *et al.*, 2007; Ramírez *et al.*, 2005a).

Ils sont retrouvés en clinique humaine (Márquez *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2005a, 2005b; Wei *et al.*, 2014), mais aussi chez l'animal (Barlow et Gobius, 2006) et dans l'environnement (Rodríguez-Minguela *et al.*, 2009), et ce sur divers continents tels que Amérique du Sud (Ramírez *et al.*, 2005b, 2005a), Asie (Wei *et al.*, 2014), Afrique (Dubois *et al.*, 2007; Gassama Sow *et al.*, 2010, 2008; Malek *et al.*, 2015; Rizk et El-Mahdy, 2017) et Europe (Chainier *et al.*, 2017; Stange *et al.*, 2016).

1.4.4 Intégrons de classe 3 : la rareté

Les IM3 sont beaucoup moins étudiés que les IM1 et IM2. Ils ont été décrits à la fois dans un contexte clinique, chez des souches de *E. coli, K. pneumoniae* et *P. putida* (Correia *et al.*, 2003; Poirel *et al.*, 2010; Shibata *et al.*, 2003), mais aussi environnemental, notamment dans les effluents d'hôpitaux ou encore boues de station d'épuration (Simo Tchuinte *et al.*, 2016) et plus rarement chez les animaux, au cours d'infection chez le porc et le bœuf (Goldstein *et al.*, 2001) et dans des huîtres (Barkovskii *et al.*, 2010).

1.4.5 Intégrons de classe 4 et 5

Les IM4 et IM5 ont été décrits chez le genre *Vibrio* (Clark *et al.*, 2000; Mazel *et al.*, 1998). Ils ont été respectivement localisés dans un sous-ensemble de l'élément génétique SXT chez *V. cholerae* (Hochhut *et al.*, 2001) et sur le plasmide pRSV1 de *Aliivibrio salmonicida* (Sørum *et al.*, 1992). Le réseau de cassettes présente un seul gène de résistance aux antibiotiques (*dfrA1*) suivi de plusieurs autres gènes codant des protéines de fonction inconnue (AJ277063) (Collis *et al.*, 2002a). L'implication de ces intégrons dans l'antibio-résistance est limitée.

BY-NC-ND

1.4.6 Épidémiologie des IM dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques

1.4.6.1 En microbiologie humaine

La littérature est très riche sur la présence d'IM chez l'homme. Plus de 200 publications rapportent des IM dans des échantillons de selles, mais aussi dans des échantillons très divers, chez des patients comme chez des individus sains, principalement dans le cadre d'étude de la résistance aux antibiotiques. Donner des chiffres précis de prévalence est difficile du fait de la grande variabilité des conditions de réalisation des études mais globalement des taux compris entre 10% et 55% sont en général retrouvés.

Le portage digestif est le plus souvent compris entre 15 et 30% (Chainier *et al.*, 2017; Leverstein-Van Hall *et al.*, 2002; Vasilakopoulou *et al.*, 2009; Vinué *et al.*, 2008). Les IM1 sont retrouvés dans le microbiote humain (Pal *et al.*, 2016), la colonisation survenant rapidement après la naissance (Ravi *et al.*, 2015). Plusieurs paramètres semblent influencer le portage, notamment l'âge et le mode de vie. Il a été montré dans une étude norvégienne, que les taux de portage en IM1 de *E. coli* variaient selon l'âge des sujets : 53 % chez des enfants contre 17 % chez des sujets âgés (Sepp *et al.*, 2009). Des travaux français ont montré que le mode de vie influençait la prévalence d'IM chez des souches de *E. coli* commensaux, 6,4 % chez des Amérindiens de Guyane Française contre 12,2 % chez des cadres français du secteur bancaire contre 18,5 % chez des éleveurs de porcs (Skurnik *et al.*, 2005). De façon générale, un lien avec la médicalisation et/ou l'hospitalisation et l'antibiothérapie influence le taux d'IM. Il faut prendre ces chiffres avec précaution car il a été montré que les taux d'IM évoluent en fonction des conditions expérimentales (Skurnik *et al.*, 2008).

Les humains sont aussi responsables de leur dissémination par migration et voyages internationaux (Bengtsson-Palme *et al.*, 2015; Sun *et al.*, 2016). On peut retrouver des IM1 dans au moins 74 pays et sur tous les continents (Domingues *et al.*, 2015) y compris l'Antarctique (Power *et al.*, 2016).

BY-NC-ND

1.4.6.2 Dans le monde animal

Le IM sont retrouvés de façon très large chez les animaux sauvages ou domestiques, de ferme ou de pisci- et aquaculture, dans des bactéries commensales comme pathogènes (Ahmed *et al.*, 2005; Díaz *et al.*, 2006; Dolejska *et al.*, 2007; Duijkeren *et al.*, 2005; Goldstein *et al.*, 2001; Jacobs et Chenia, 2007; Petersen *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2001; Vo *et al.*, 2007). Les animaux de fermes sont un réservoir plus important que les animaux de compagnie (Cocchi *et al.*, 2007; Shaheen *et al.*, 2010). Dans la flore commensale des animaux d'élevage, jusqu'à 80% des *E. coli* commensaux portent des IM1 (Gillings, 2014), contribuant grandement à la dissémination de l'antibio-résistance chez ces bactéries (Leverstein-van Hall *et al.*, 2003). Ces taux sont faibles voire quasi nuls chez les animaux sauvages (Díaz-Mejía *et al.*, 2008; Skurnik *et al.*, 2006). Des taux plus élevés sont rapportés chez les animaux malades (Kang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2004). Les études précédentes n'avaient recherché et caractérisé les intégrons que chez des BGN, or il a été estimé que les IM1 hébergés par les bactéries dans de la litière de poulet, étaient majoritairement présents chez les BGP qui représentaient plus de 87 % des bactéries présentes (Nandi *et al.*, 2004). Par ailleurs, la présence d'IM touche également la filière des aliments d'origine animale avec des IM1 et IM2 rapportés au sein de *E. coli* ou de *Salmonella* (Antunes *et al.*, 2004; Miko *et al.*, 2005; Ribeiro *et al.*, 2011; Soufi *et al.*, 2011; Sunde, 2005). Sur des échantillons de viande hachée provenant de divers pays, entre 18% et 65% des BGN isolés étaient porteurs d'IM (Antunes *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2004; Khaitsa *et al.*, 2008; Miko *et al.*, 2005; Soufi *et al.*, 2009; Sunde, 2005; White *et al.*, 2001). La présence d'IM dans l'industrie agro-alimentaire est inquiétante car cela expose au risque d'implantation et de dissémination dans la flore digestive commensale humaine (Antunes *et al.*, 2004; Friedman, 2015; Miko *et al.*, 2005; Rolain, 2013; Soufi *et al.*, 2009).

1.4.6.3 Dans l'environnement

Les sols et milieux aquatiques naturels sont une source importante d'IM. En 1999, une prévalence de 3,6 % d'IM1 dans les BGN d'une estuaire d'Ecosse était rapportée (Rosser et Young, 1999). Les IM1 environnementaux présentent des caractéristiques qui semblent pré-existantes à l'ère des antibiotiques. Ils sont présents dans 1 à 5% des bactéries du sol, des eaux douces et des biofilms (Gillings, 2017). Leur prévalence est importante et peut atteindre 30-

BY-NC-ND

40 % dans différents milieux aquatiques (Alves *et al.*, 2014; Henriques *et al.*, 2006; Laroche *et al.*, 2009; Mukherjee et Chakraborty, 2006; Roe *et al.*, 2003; Rosser et Young, 1999). Ils vont pouvoir interagir avec la chaine alimentaire humaine et ainsi échanger des cassettes par le biais de transfert horizontaux. Ils portent le plus souvent la cassette *qac* qui confère un phénotype de résistance aux ammoniums quaternaires (Gillings, 2014).

L'activité humaine a un impact de plus en plus important sur la résistance dans l'environnement. Par exemple la proportion des IM1 cliniques augmente dans les eaux usées proportionnellement au volume de prescription d'antibiotiques, démontrant l'effet direct de la pression de sélection antibiotique (Caucci *et al.*, 2016). Dans les stations d'épuration leur incidence va de 10 à 35 % (Ferreira da Silva *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2007; Schlüter *et al.*, 2007; Stalder *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2009). L'exposition à des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques, ce qui est souvent le cas dans les eaux usées, promeut l'acquisition et la recombinaison de cassettes, et en même temps accroit les transferts horizontaux (Strugeon *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017).

Le microbiote humain et animal est un formidable vecteur d'IM1 du fait de l'utilisation des antibiotiques comme traitement mais aussi comme facteur de croissance chez l'animal. Une énorme quantité d'intégrons contenus dans les fécès est disséminée dans l'environnement chaque jour (Figure 12). Les IM1 ont été décrits dans les sols enrichis par le fumier et les sédiments (Binh *et al.*, 2009; Byrne-Bailey *et al.*, 2011; M. R. Gillings *et al.*, 2008; Stokes *et al.*, 2006). L'activité anthropique favorise la prolifération des intégrons donc des gènes de résistances, par le biais des stations d'épuration et des boues qui agissent comme des réacteurs d'interactions entre espèces bactériennes, EGM et gènes de résistance, mais aussi directement par le rejet d'effluents d'hôpitaux et de tanneries, ainsi que l'utilisation des excrétas d'animaux comme engrais. Le taux de gènes de résistance aux antibiotiques dans les sols ne fait qu'augmenter depuis les années 40 (Knapp *et al.*, 2010). Ainsi, les IM1 ont désormais contaminé l'ensemble des écosystèmes dominés par l'activité humaine, faisant ainsi de ces éléments génétiques des marqueurs de l'impact anthropogénique (Gillings *et al.*, 2015).

BY-NC-ND

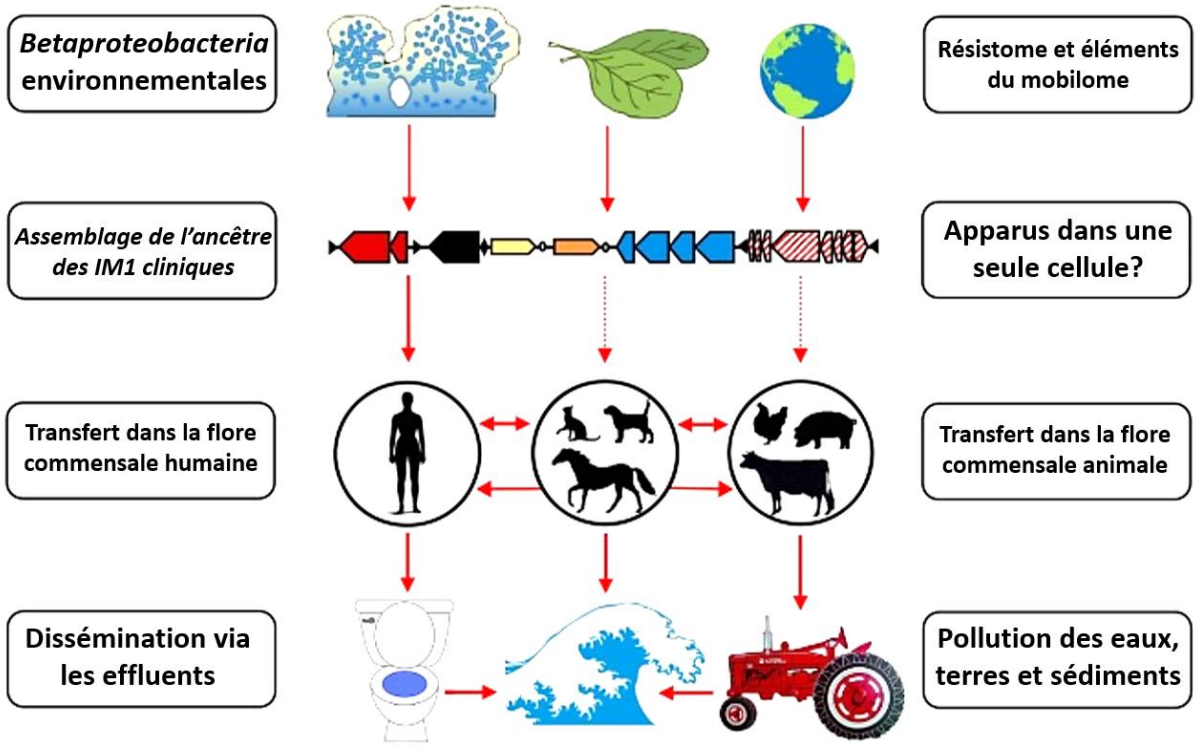


Figure 12 : Origine, expansion et diffusion des IM1 cliniques. L'ancêtre des IM1 clinique a été assemblé à partir d'éléments du mobilome ayant intégré du résistome, probablement issu du biofilm des bactéries associées aux plantes et aux sols. La structure ancestrale a été intégrée dans les flores commensales par ingestion de nourriture ou d'eau. La colonisation initiale la plus probable est le microbiote intestinal humain, bien qu'une voie animale ne puisse être exclue. L'élément nouvellement assemblé a pu intégrer d'autres éléments mobiles comme différents plasmides et transposons, et ainsi disséminer par transfert horizontal entre diverses espèces bactériennes commensales et pathogènes, et se déplacer librement entre des hôtes animaux et humains. La pression de sélection continue, conduite par l'utilisation d'antimicrobiens, a introduit des concentrations élevées et fixes d'intégrons dans le microbiote intestinal humain et animal. Il en résulte une dispersion généralisée des IM1 cliniques via les eaux usées et le fumier, de sorte qu'ils sont devenus aujourd'hui un polluant important des milieux naturels. (Gillings, 2017)

BY-NC-ND

BY-NC-ND

Chapitre 2 : *Acinetobacter baumannii*

1.5 *A. baumannii*, bactérie environnementale et pathogène multi-résistant émergeant

1.5.1 Pathogène émergeant

Le genre bactérien *Acinetobacter* présentait, à la date du 29/09/2017, 55 espèces avec publication valide selon la liste des noms procaryotes en accord avec la nomenclature (www.bacterio.net, 29 septembre 2017). Parmi celles-ci, le complexe *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* a émergé dans les 20 dernières années comme pathogène sévère (Peleg *et al.*, 2008).

Ce sont des bacilles à Gram négatif, non fermentaires, non-exigeants, immobiles, catalase positive, oxydase négative, parmi lesquels *A. baumannii* est l'espèce très majoritairement responsable des infections chez l'homme. Le genre *Acinetobacter* a connu diverses modifications taxonomiques au cours du temps. Ainsi l'espèce *A. baumannii* n'était pas formellement désignée jusqu'en 1986 (Bouvet et Grimont, 1986) rendant les recherches sur les premières infections à *Acinetobacter* dans la littérature scientifique et médicale un peu difficiles. Cependant il semble que l'organisme actuellement appelé *A. baumannii* a commencé à poser problème dans les années 70 (Bergogne-Bérézin et Towner, 1996). Depuis, *A. baumannii* a été classé parmis les 6 pathogènes multi-résistants aux antibiotiques les plus communs et les plus sévères, responsables d'infections associées aux soins, sous l'acronyme « ESKAPE » pour *Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, K. pneumoniae, A. baumannii, P. aeruginosa* et *Enterobacter* spp. (Rice, 2008; Santajit et Indrawattana, 2016). En 2017, l'OMS a classé *A. baumannii* dans le top 3 des "pathogènes prioritaires" critiques pour l'antibio-résistance ("WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, et development of new antibiotics," 2017). En effet, *A. baumannii* fait partie des BGN qui peuvent présenter en routine un phénotype de résistance XDR, défini comme résistance à tous les antibiotiques disponibles à l'exception de quelques-uns connus

BY-NC-ND

pour être moins efficaces ou plus toxiques que les antibiotiques de première ligne (Infectious Diseases Society of America, 2012).

La connaissance scientifique de *A. baumannii* est moins importante que pour d'autres germes opportunistes comme *P. aeruginosa*, comme en témoigne le nombre de résultats obtenus en lançant une recherche dans la base de données Pubmed (29 sept 2017) (Figure 13), *A. baumannii* donne 6 719 résultats contre 59 205 pour *P. aeruginosa*, soit quasiment dix fois plus. Cependant le nombre de citations dans Pubmed lorsque l'on recherche *A. baumannii* augmente régulièrement et rapidement depuis 2000, témoignant de l'intérêt porté par la communauté scientifique et médicale pour cette bactérie, comme le montre le graphique ci-dessous (Kempf et Rolain, 2012, données actualisées le 29 septembre 2017).

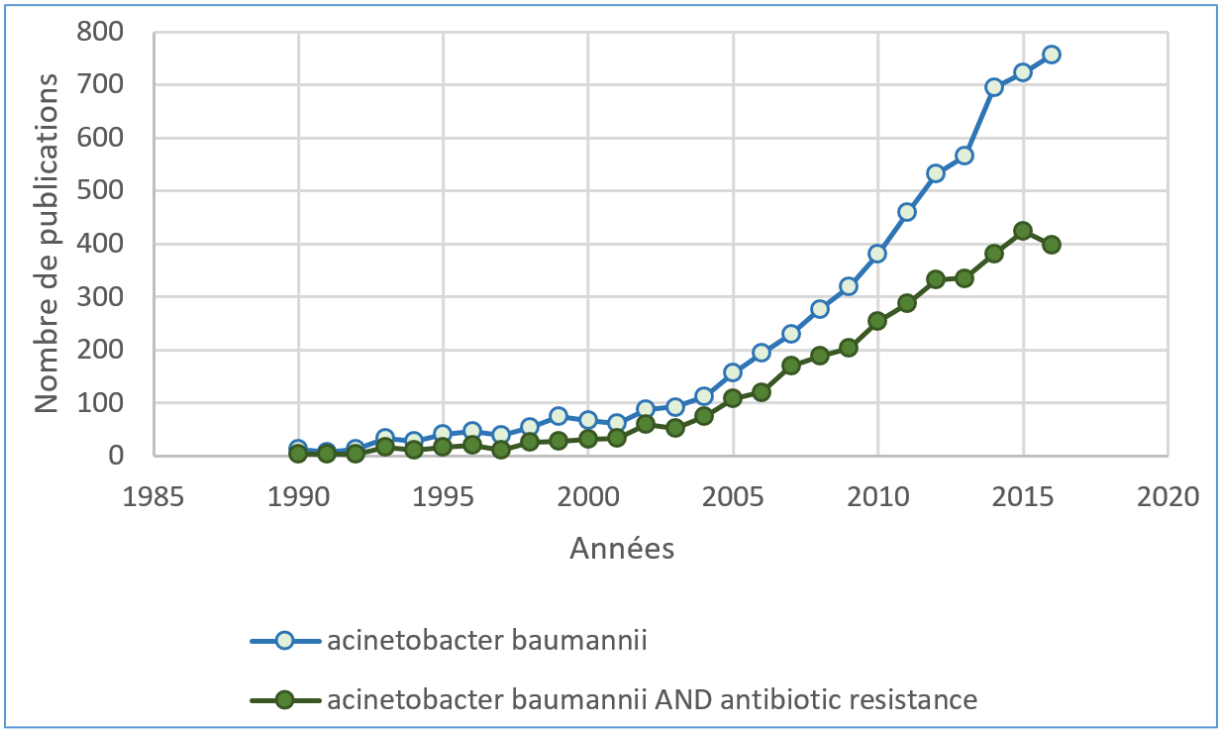


Figure 13 : Nombre de publications trouvées dans Pubmed entre 1990 et 2016 en utilisant « *Acinetobacter baumannii* » et « *Acinetobacter baumannii* and antibiotic resistance ».

En France, en 2012, *A. baumannii* représentait une faible proportion (0,6 % - 25ème position) des microorganismes isolés d'infections nosocomiales, soit une prévalence de 0,02 infections pour 100 patients (30 fois moins que les infections à *S. aureus*) ("Enquête nationale de

BY-NC-ND

prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012“, InVS). Cependant, le pourcentage de résistance de *A. baumannii* aux carbapénèmes était de 9,2% dans l'enquête de prévalence des infections nosocomiales de 2006 contre 14,5% en 2012, soit une augmentation de 57,9% (“Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012“, InVS). D'autre part, les données issues des signalements externes, indiquent un accroissement important du nombre de signalements d'infections à *A. baumannii* résistants à l'imipénème, souvent associés à des épidémies difficiles à maîtriser (Vaux *et al.*, 2012).

1.5.2 Pouvoir pathogène et réservoir

A. baumannii est susceptible de coloniser la peau, le tube digestif et l'oropharynx de l'homme. Cependant, ce sont plutôt des *Acinetobacter* spp. non-*baumannii* qui sont retrouvés en colonisation cutanée, surtout chez les sujets sains (Al Atrouni *et al.*, 2016; Berlau *et al.*, 1999, 1999; Griffith *et al.*, 2006; Patil et Chopade, 2001; Seifert *et al.*, 1997). Dans une étude chez des militaires sains au Texas, 17% étaient colonisés avec des *A. baumannii-A. calcoaceticus* complex, les souches de colonisation étant différentes des souches retrouvées chez les militaires infectés de retour d'Iraq ou d'Afghanistan (Griffith *et al.*, 2006). Les sujets sains semblent donc être peu porteurs des souches pathogènes. *A. baumannii* peut être isolé au cours d'infections communautaires mais il est plus fréquemment responsable d'infections associées aux soins. A l'hôpital, 2 à 10 % des infections à bactéries à Gram négatif sont dues à *A. baumannii* (Joly-Guillou, 2005). *A. baumannii* est un agent pathogène opportuniste puisque malgré un pouvoir pathogène faible, il est responsable d'infections nosocomiales sévères, la plupart du temps chez des patients fragilisés hospitalisés en réanimation (Fournier et Richet, 2006), des immunodéprimés et des grands brûlés. Il est à l'origine de pneumopathies acquises sous ventilation, de bactériémies, d'infections urinaires ou encore d'infections liées aux cathéters (Chopra *et al.*, 2014, 2013; Chung *et al.*, 2011; Freire *et al.*, 2016; Joly-Guillou, 2005; Maragakis *et al.*, 2008). *A. baumannii* est mis en cause dans jusqu'à 20% des infections en service de réanimation dans le monde (Vincent *et al.*, 2009). Depuis les années 70, son importance clinique n'a fait qu'augmenter (Lin et Lan, 2014) en parallèle du développement

BY-NC-ND

des soins de réanimation. En Asie et en Amérique du Sud, *A. baumannii* pourrait être le premier pathogène nosocomial et le 3ème agent responsable de bactériemies et de pneumopathies nosocomiales (Wong *et al.*, 2017). Il est estimé que *A. baumannii* serait responsable à lui seul de 45 900 (41 400 à 83 000) infections par an aux Etats-Unis et approximativement un million (600 000 à 1 400 000) d'infections par an dans le monde (Spellberg et Rex, 2013).

Les réservoirs extra-hospitaliers ne sont pas encore tous identifiés. Des espèces d'intérêt clinique comme *A. calcoaceticus*, *A. lwoffii*, *A. nosocomialis* et *A. pittii* ont pu être isolées à partir de légumes, de viande, de produits laitiers et de la peau humaine (Rafei *et al.*, 2015). Des souches de *A. baumannii* parfois très résistantes ont été isolées d'aliments commercialisés (viande et légumes), d'animaux d'élevage, mais aussi de zones pétrolières, de milieux hydriques et de terres agricoles ce qui suggère de multiples origines de contamination pour l'homme (Al Atrouni *et al.*, 2016; Berlau *et al.*, 1999; Eveillard *et al.*, 2013; Lupo *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013). *A. baumannii* a été beaucoup rapporté chez les vétérans et les soldats lors des conflits en Iraq et en Afghanistan (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2004), ce qui lui a valu le nom d'"Iraqibacter." Les souches de *A. baumannii* multi-résistantes ont disséminées aux hôpitaux civils en partie par transmission croisée à partir des militaires rapatriés des zones de guerre (Peleg *et al.*, 2008). Des infections similaires surviennent lors de catastrophes naturelles telles qu'inondations, tremblements de terre, ou dans les régions proches de conflits militaires (Apisarnthanarak *et al.*, 2013; Dallo et Weitao, 2010; Maegele *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). De plus, Il a été mis en évidence une saisonnalité des infections à *A. baumannii* avec une augmentation de l'incidence quand le climat est chaud et humide (Eber *et al.*, 2011; Fukuta *et al.*, 2012; Perencevich *et al.*, 2008; Retailliau *et al.*, 1979), l'incidence augmente particulièrement dans certaines régions d'Australie, en Océanie et en Asie, dont la Chine, Taiwan et la Thailande (Falagas *et al.*, 2008; Peng *et al.*, 2012). Les animaux semblent aussi pouvoir être un réservoir, deux études récentes conduites dans l'île de La Réunion ont montré que 5 à 10 % des animaux de compagnie (chiens et chats) admis en clinique vétérinaire étaient porteurs de souches de *A. baumannii* (Belmonte *et al.*, 2014; Pailhoriès *et al.*, 2015). De plus, *A. baumannii* est responsable d'infections nosocomiales dans les cliniques vétérinaires (Zordan *et al.*, 2011).

BY-NC-ND

La virulence de *A. baumannii* est principalement due à sa capacité d'échapper à son élimination rapide (clairance) par la réponse immunitaire innée (Wong *et al.*, 2017). Lorsque ces facteurs de virulence sont présents, les bactéries non phagocytées délenchent l'activation par leur lipopolysaccharide (LPS) des récepteurs Toll-like 4 (TLR4) ce qui va entrainer une réponse inflammatoire généralisée qui peut aboutir à un choc septique (Figure 14). De nombreux facteurs de virulence ont été identifiés chez *A. baumannii* (Figure 15), incluant des polysaccharides capsulaires qui jouent un rôle important dans l'échappement aux protéines du complément et à la phagocytose, des protéines de membrane externes notament OmpA, des porines, des vésicules de la membrane externe, des phospholipases, des protéases, des lipopolysaccharides, des protéines de systèmes de sécrétion et des systèmes de chélation du fer (Lee *et al.*, 2017; Weber *et al.*, 2015; Wong *et al.*, 2017).

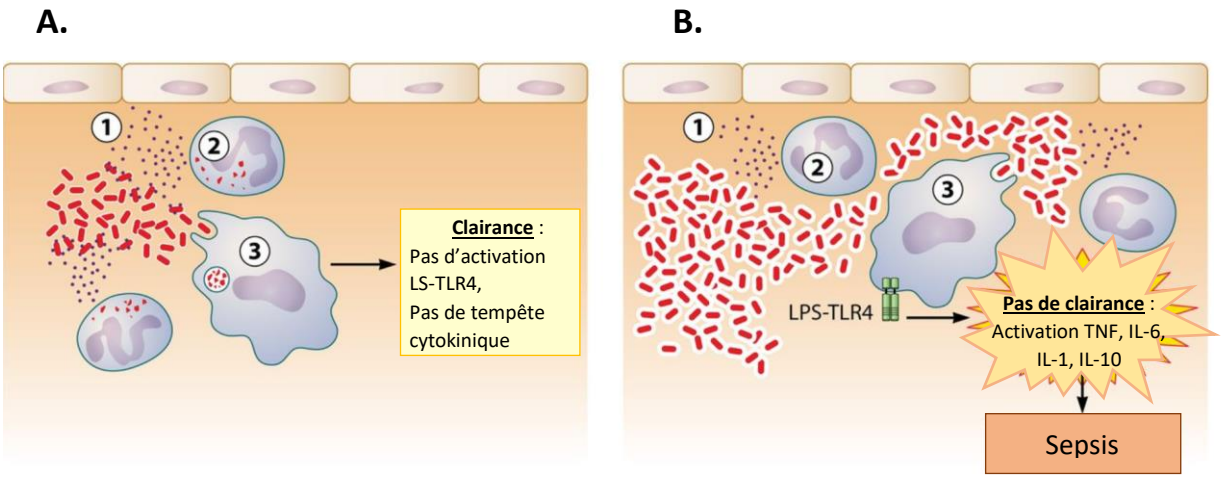


Figure 14 : Devenir de l'hôte au cours de l'infection à *A. baumannii*. A. L'élimination précoce du microbe par les trois effecteurs innés primaires, le complément (1), les polynucléaires neutrophiles (2) et les macrophages (3), prévient une activation prolongée de la voie LPS-TLR4 et une tempête de cytokine subséquente. **B.** Lorsque *A. baumannii* a la capacité d'échapper à la clairance initiale par les effecteurs de l'immunité innée et se répliquer, il déclenche une activation soutenue des TLR4 par le LPS, entraînant la tempête cytokinique déclenchant le sepsis. Un des mécanismes d'échappement est l'expression d'une capsule altérée qui résiste à l'opsinisation et à la phagocytose (indiqué par une enveloppe plus épaisse autour des bactéries). (Wong *et al.*, 2017)

BY-NC-ND

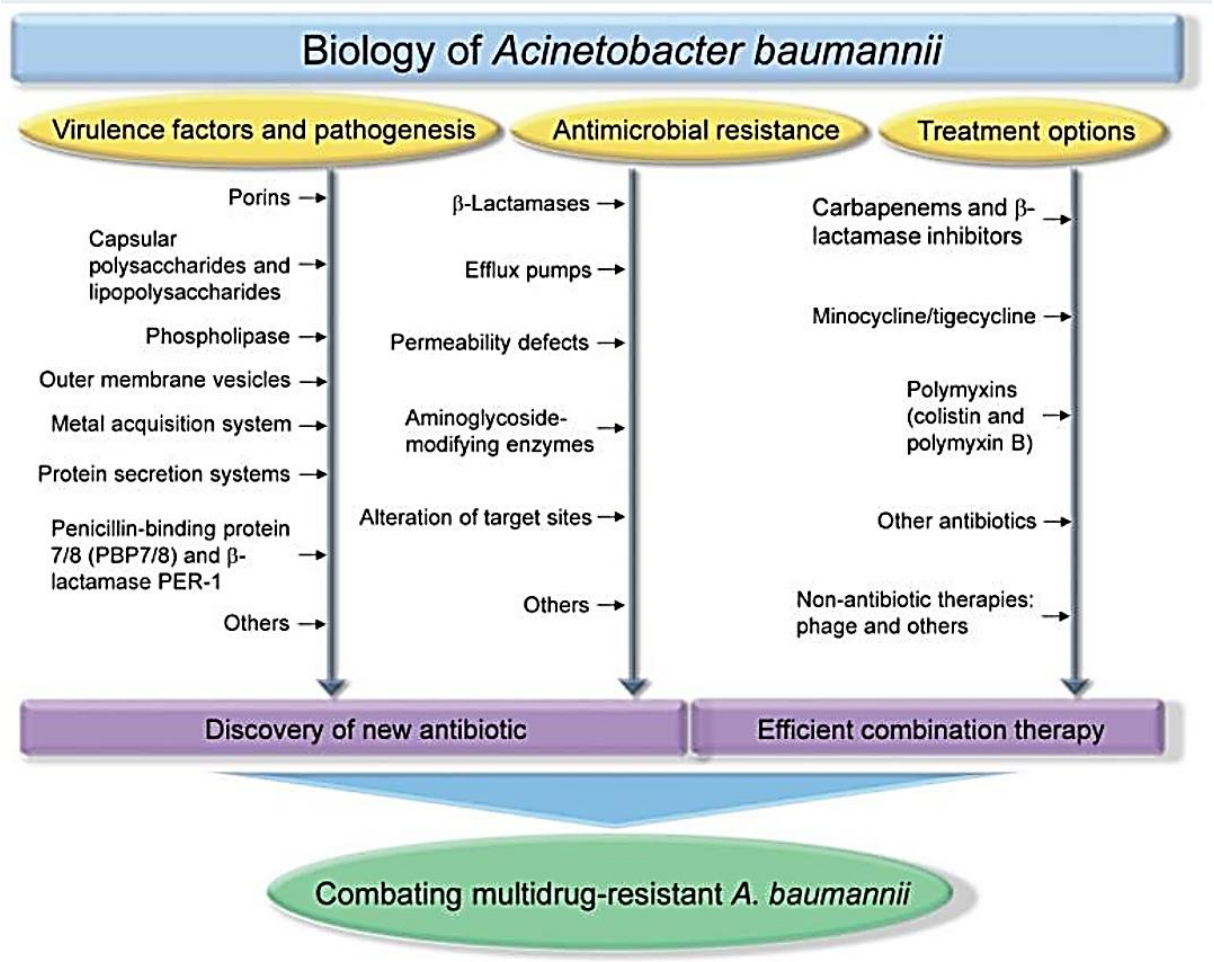


Figure 15 : Biologie de *Acinetobacter baumannii*. La pathogénicité de *A. baumannii* est complexe, il a acquis au fil de temps des facteurs de virulences variés qui lui permettent d'échapper à l'immunité innée de l'hôte. En parallèle *A. baumannii* est passé de germe multi-sensible à pathogène multi-résistant et maintenant pour certains toto-résistants. La multi-résistance rend le traitement probabiliste des infections aléatoire. Les options de traitement deviennent de plus en plus restreintes, les antibiotiques de dernier recours sont toxiques ou sélectionnent rapidement des résistances, peu d'antibiotiques nouveaux sont actuellement dans le pipeline de la recherche. Diverses options de traitement adjuvants pour augmenter l'efficacité des antibiothérapies sont en cours d'étude. (Lee *et al.*, 2017)

BY-NC-ND

1.5.3 Pouvoir épidémiogène :

A. baumannii est caractérisé par un important pouvoir épidémiogène pouvant conduire à des phénomènes épidémiques de grande ampleur. En milieu hospitalier, le principal mode de transmission est le manuportage de la flore transitoire cutanée qui peut contenir *A. baumannii* (McDonald *et al.*, 1999; Spellberg et Bonomo, 2013). L'environnement peut constituer un réservoir important car *A. baumannii* est très résistant à la dessication (Maragakis *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 1999) et a une grande capacité à former du biofilm (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008). Il peut ainsi persister des mois voire des années sur les surfaces (Fournier et Richet, 2006; Houang *et al.*, 1998; Wendt *et al.*, 1997). Le contrôle d'une épidémie à *A. baumannii* peut être difficile et nécessiter des efforts importants : respect strict des précautions standard de prévention du risque infectieux (lavage des mains), des précautions complémentaires de transmission par contact associées à des mesures d'isolement du patient, entretien soigneux des surfaces, dépistage systématique des patients porteurs et éventuellement des patients contacts, mais aussi signalisation du statut des patients lors de leur transfert. Il peut être nécessaire, en particulier en réanimation, de prendre des mesures plus drastiques comme la création de secteurs de « cohorting », l'arrêt des transferts ainsi que des admissions, jusqu'à la fermeture du service afin de juguler un épisode épidémique. Les conséquences de ce type de mesures peuvent être importantes, notamment en terme d'activité des services concernés. Le typage des souches de *A. baumannii*, dans un premier temps par AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism typing) (Dijkshoorn *et al.*, 1996) puis par MLST (Multi Locus Sequence Typing) à permis de montrer que la majorité des isolats responsables d'infections cliniques et/ou d'épidémies appartenaient à deux grands clones (Diancourt *et al.*, 2010), appelés Global Clone 1 (GC1) et 2 (GC2) (Dijkshoorn *et al.*, 1996; Zarrilli *et al.*, 2013). Leur distribution est devenue internationale (Higgins *et al.*, 2010; Mugnier *et al.*, 2010) et très souvent ils sont associés à la multi-résistance aux antibiotiques (Dijkshoorn *et al.*, 1996; Hujer *et al.*, 2006; Nemec *et al.*, 2004).

Deux techniques de MLST sont disponibles pour typer à la fois *A. baumannii* et non-*baumanii*, le MLST d'Oxford, décrit par Bartual *et al.* (Bartual *et al.*, 2005) et le MLST de Pasteur décrit par Diancourt *et al.* (Diancourt *et al.*, 2010). Les deux plateformes sont trouvées sur : https://pubmlst.org/abaumannii/. La technique de MSLT de Pasteur est la plus précise pour identifier les complexes clonaux CC1 et CC2 qui correspondent aux GC1 et GC2. En effet, il a

BY-NC-ND

été rapporté pour le MLST d'Oxford des imprécisions dans la détermination de lignages des GC1 et GC2, en raison de la localisation dans la séquence analysée pour le typage de l'amorce forward utilisée pour amplifier le gène *gpi* (Hamidian *et al.*, 2017).

D'autre outils peuvent être utilisés pour étudier les populations épidémiques de *A. baumannii*. La méthode de référence est l'électrophorèse en champs pulsé ou PFGE (Pulsed Field Gel Eletrophoresis), bien que la méthode puisse être standardisée, il est difficile d'obtenir des résultat reproductibles et d'exportation de cette technique hors des laboratoires de référence (Seifert *et al.*, 2005). Avec le développement des techniques de séquençage haut débit, il est devenu possible de caractériser des populations épidémiques par séquençage de génomes complets ou WGS (Whole Genome Sequencing) (Eyre *et al.*, 2012; Mellmann *et al.*, 2011; Turabelidze *et al.*, 2013). Bien que le coût de cette technique soit en diminution, l'analyse des données en routine reste difficile sans l'aide d'un bio-informaticien. La méthode d'amplification aléatoire d'ADN polymorphe ou RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) est utilisable dans la cadre d'investigation épidémiologiques (Chang *et al.*, 2009; Grundmann *et al.*, 1997). La technique est facile et rapide à mettre en place, mais les résultats obtenus sont très variables en fonction des conditions de réalisation (matériel, réactifs, opérateurs) et ne sont pas comparables d'une analyse à l'autre.

1.6 Acquisition de mécanismes de résistance chez *A. baumannii*

La multi-résistance de *A. baumannii* au cours d'une infection est associée à une mortalité de 26% à 68% (Maragakis *et al.*, 2008). *A. baumannii* est classé parmi les 6 pathogènes multi-résistants mondiaux les plus fréquents à l'hôpital par la Disease Society of America (Talbot *et al.*, 2006). Bien que *A. baumannii* soit capable d'exprimer de nombreux phénotypes de résistance, c'est sa capacité à s'adapter à son environnement en acquérant ou en perdant du matériel génétique et donc des gènes de résistance qui le rend réellement dangereux. Il est habituellement admis que l'acquisition de résistances aux antibiotiques est responsable d'un coût métabolique important qui devient alors un facteur d'anti-virulence (Björkman *et al.*, 1998), mais celui-ci est complexe et dépend de l'espèce bactérienne, du mécanisme de résistance et de la survenue de mutations compensatoires (Baines *et al.*, 2015; Björkman *et al.*, 1998; Hocquet *et al.*, 2007). Cependant il a été montré que l'hyper expression de systèmes d'efflux chez une souche multi-résistante de *A. baumannii* avait un impact minimal ou

BY-NC-ND

diminuait le fitness bactérien en fonction de la localisation pulmonaire ou systémique de la bactérie dans un modèle d'infection chez la souris (Yoon *et al.*, 2016). En revanche, le phénotype multi-résistant de souches environnementales est associé à un coût biologique plus important et est délétère pour la survie des souches (Greene *et al.*, 2016). La relation entre la résistance et son effet sur la virulence chez *A. baumannii* apparaît donc complexe.

En 40 ans, *A. baumannii* est passé du statut de bactérie peu pathogène, très sensible, à bactérie multi-résistante émergeante. Naturellement *A. baumannii* est résistant à de nombreux antibiotiques, aminopénicillines, céphalosporines de 1^{ière} et 2ème génération aztréonam, ertapénème, triméthoprime, fosfomycine et furanes. Cette résistance naturelle est due à deux béta-lactamases, AmpC, (une céphalosporinase non inductible) et OXA-51/69 (une oxacillinase) associées à des porines de la membrane externe qui sont peu nombreuses et de petite taille, lui conférant une faible perméabilité aux antibiotiques (le coefficient de perméabilité aux céphalosporines de *A. baumannii* est 2 à 7 fois plus faible que chez *P. aeruginosa*) (Vila *et al.*, 2007). Ceci se combine avec une expression à bas niveau de système d'efflux actifs (AdeABC et AdeIJK) (Vila *et al.*, 2007).

En plus de ces résistances naturelles, *A. baumannii* a acquis au cours du temps de nombreux déterminants de résistances aux antibiotiques, grâce notamment à des échanges génétiques avec d'autres espèces bactériennes, la rendant de plus en plus difficile à traiter (Towner, 2009). Les cassettes des IM1 décrites chez *A. baumannii* contiennent des gènes de résistances tels que *aacA4* qui code la résistance à l'amikacine, nétilmicine et tobramycine ; *catB8* qui est une acetyltransférase qui code la résistance au chloramplénicol ; *aadA1* qui est responsable de la résistance à la streptomycine et à la spectinomycine ; *aac3* responsable de la résistance à la gentamicine et *bla*$_{OXA-10}$ qui code la résistance aux béta-lactamines à l'exception des carbapénèmes et des céphalosporines à large spectre (Fournier *et al.*, 2006). Les gènes de résistance aux aminosides sont les plus fréquement retrouvés dans les IM1 chez *A. baumannii* (Chen *et al.*, 2013; Çıçek *et al.*, 2013; Gillings *et al.*, 2015; Koczura *et al.*, 2014; Nemec *et al.*, 2004; Seward *et al.*, 1998; Taitt *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014).

A. baumannii est capable d'acquérir de nombreuses bêta-lactamases à spectre élargi portées généralement par des IM1 (Potron *et al.*, 2015; Zarrilli *et al.*, 2013) dont VEB-1 qui est très répandue (Naas *et al.*, 2006). La résistance à l'imipénème est le plus souvent due à la présence

BY-NC-ND

d'une carbapénémase de type oxacillinase (OXA-23, OXA-24/40 et OXA-58), plus rarement à celle d'une métallo-β-lactamase (VIM, IMP et NDM) ou d'une BLSE possédant une activité carbapénèmase (GES variants, PER-7 et KPC). Il est rapporté qu'entre 40 et 50 % des isolats de *A. baumannii* cliniques sont multi-résistants aux Etats-Unis (Lob *et al.*, 2016; Weiner *et al.*, 2016; Zilberberg *et al.*, 2016). Ces taux de résistance sont même plus élevés, entre 77 % et 87 % en Afrique, Asie, Amérique Latine et supérieurs à 93% en Europe (Figure 16) et Moyen-Orient (Lob *et al.*, 2016).

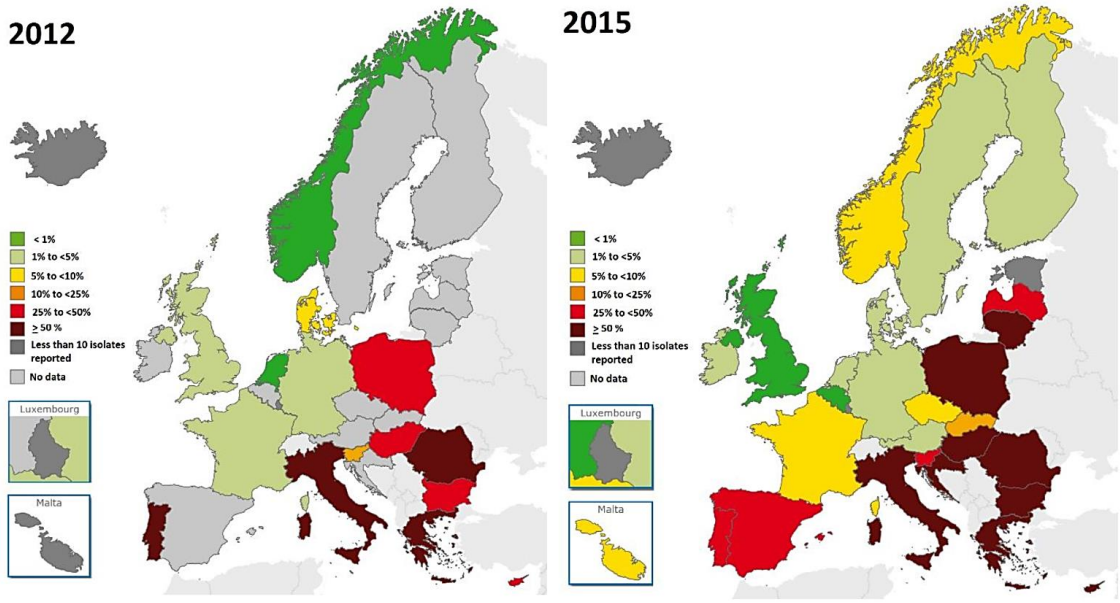


Figure 16 : Proportion des isolats invasifs de *Acinetobacter* spp résistants aux fluoroquinolones, aminosides et carbapénèmes en europe en 2012 (gauche) et 2015 (droite). ("Summary of the latest data on antibiotic resistance in EU," 2016)

En 2002 a été rapportée la première souche XDR de *A. baumannii* (Hsueh *et al.*, 2002), c'est-à-dire résistante à de très nombreux antibiotiques. Ne restaient sensibles que les polymyxines, la tigécycline et parfois certains aminosides (Doi *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2016; Lin et Lan, 2014; Zilberberg *et al.*, 2016). Depuis, certaines souches XDR se sont installées à l'état endémique dans des structures de soins, soulignant l'importance de la politique de bon usage des antibiotiques. Les souches résistantes aux carbapénèmes ont tendance à être XDR. La première souche de *A. baumannii* résistante à la colistine a été rapportée en 1999, isolée à partir d'hémocultures dans un hôpital de République tchèque. Depuis, les souches résistantes à la colistine émergent et sont devenues un réel challenge mondial (Cai *et al.*, 2012; Gales *et al.*, 2006; Perez *et al.*, 2007). La proportion globale mondiale des souches de *A. baumannii*

BY-NC-ND

XDR a augmenté, elle est passée de <4 % en 2000, à >60 % voire même proche des 90 % dans certains établissements de santé (Wong *et al.*, 2017).

1.7 Traitement :

Le traitement des infections à *A. baumannii* est de plus en plus difficile, car *A. baumannii* est intrinsèquement résistant à de multiples antibiotiques et a la capacité d'acquérir facilement et rapidement de nouvelles résistances aux antibiotiques (Higgins *et al.*, 2010; Paton *et al.*, 1993). Certaines infections avec ces souches de *A. baumannii* XDR sont de réelles impasses thérapeutiques car aucun antibiotique disponible ne peut être utilisé pour les traiter (Leite *et al.*, 2016).

L'administration précoce d'une antibiothérapie efficace est le facteur clé pour l'amélioration de la survie des patients, à la fois pour les XDR et les non-XDR (Lee *et al.*, 2017). Le taux de mortalité était de 60 % sans antibiothérapie initiale efficace contre 20 % avec (Lee *et al.*, 2017). Du fait de leur résistance aux antibiotiques de première ligne, les traitements efficaces des souches de *A. baumannii* XDR sont mis en place plus tardivement, induisant un taux de mortalité beaucoup plus élevé, 70 % contre 25 % chez les souches sensibles (Lee *et al.*, 2017). Par contre, quand *A. baumannii* est sensible, les béta-lactamines sont les antibiotiques de première ligne. Une association d'antibiotiques n'a pas vraiment montré un bénéfice pour le traitement des infections à *A. baumannii*, sauf peut-être pour le traitement des souches XDR et particulièrement lorsque les CMI aux carbapénémes sont de 4 à 16 g/ml, où la combinaison carbapénème-polymyxine semble une approche rationnelle (Wong *et al.*, 2017). Les polymyxines disponibles sont la colistine et la polymyxine B, mais leur utilisation est limitée par leur néphrotoxicité et neurotoxicité. Pour les infections pulmonaires isolées, avec des souches hautement résistantes, il est possible d'administrer de la polymyxine par nébulisation. Cela permet de délivrer de hautes concentrations localement, tout en évitant le passage systémique et leur toxicité (Wong *et al.*, 2017).

Des voies de traitement alternatif sont étudiées tels que peptides antimicrobiens, photothérapie, bactériophages, vaccination passive et active, séquestration des ions métalliques, modulation des récepteurs cytokiniques de l'immunité (Wong *et al.*, 2017).

BY-NC-ND

1.8 *A. baumannii* porte des ilôts de resistance complexes de grande taille

Les deux grands clones GC1 et GC2 ont maintenant diffusé à l'échelle internationale (Higgins *et al.*, 2010; Mugnier *et al.*, 2010) et sont souvent associés à la multi-résistance aux antibiotiques (Dijkshoorn *et al.*, 1996; Hujer *et al.*, 2006; Nemec *et al.*, 2004). Ils portent des gènes codant la résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds, situés dans des îlots de résistance génomiques composées de transposons et de structures plasmidiques intégrées (Blackwell *et al.*, 2016). GC1 porte un îlot de résistance désigné AbaR inséré dans le gène chromosomique *comM* codant une ATPase (Fournier *et al.*, 2006; Krizova *et al.*, 2011). Plusieurs AbaRs sont maintenant décrits (Figure 17), partageant une structure squelette commune, un transposon de 16,3 kb (Tn*6019*-Tn*6018*) interrompu par un grand transposon composite (Tn*6020* et des segments de Tn*1696*, Tn*21*, Tn*1721* et Tn*5393*) qui contient une région variable de résistance aux antibiotiques pouvant contenir un IM1 (Krizova *et al.*, 2011; Post *et al.*, 2010; Post et Hall, 2009). La région variable est délimitée par des copies directes orientées de Tn*6018* (Krizova *et al.*, 2011). Dans GC2, d'autres îlots de résistance sont décrits AbGRI1, AbGRI2 ou AbGRI3, de structure différente des îlots AbaR (Blackwell *et al.*, 2017, 2015; Nigro *et al.*, 2013; Nigro et Hall, 2016; Seputiene *et al.*, 2012). Leur structure est présentée dans les Figures 18 à 21.

Dans une publication récente, deux souches de *A. baumannii*, résistantes aux carbapénèmes, ont été isolées à 2 semaines d'intervalle, à partir des lésions de brûlures d'un patient hospitalisé dans un centre de grands brulés de Téhéran. La première était sensible à la colistine tandis que la deuxième était devenue résistante. Leur comparaison a montré que des transferts horizontaux sur l'îlot de résistance AbAR3-like était à l'origine de l'augmentation de la CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) à la colistine (Savari *et al.*, 2017). Ces deux souches appartiennent au même complexe clonal CC-92 (ST75) et au global clone 2. Le mode de dissémination épidémiogène de *A. baumannii* rend l'apparition de résistance à la colistine sur des EGM chromosomiques inquiétante car l'émergence et l'implantation d'un tel clone dans un service de soins peut être l'initiation d'une diffusion à plus grande échelle.

BY-NC-ND

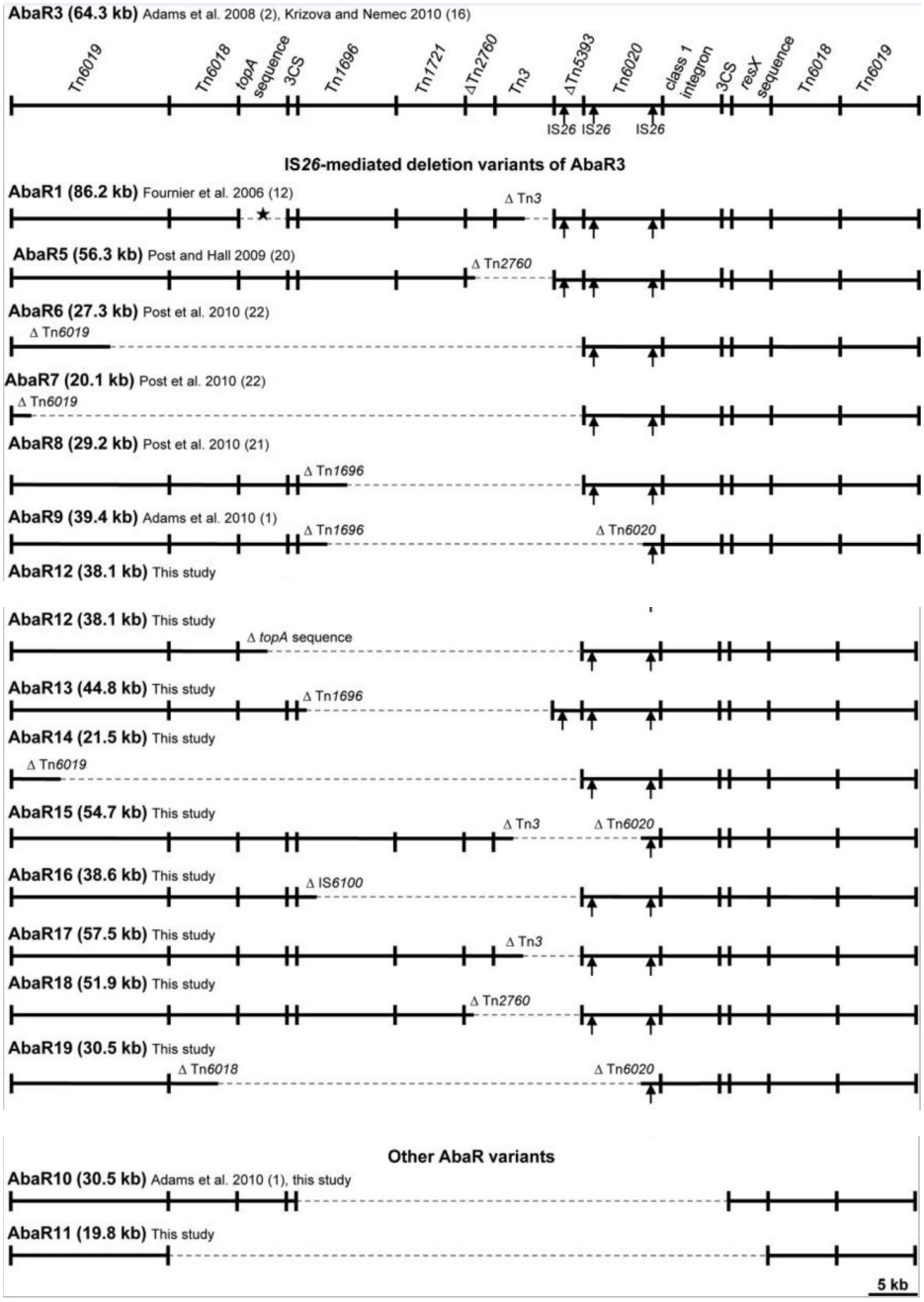


Figure 17 : Organisation des différents variant de AbaR. Représentation schématique des variant AbaR de GC1. Une représentation de AbaR3 est donnée en haut. Les autres AbaRs sont alignés en dessous de AbaR3 par rapport aux régions homologues avec AbaR3. Les traits pleins représentent les régions de AbaR3 présentes et les pointillés les regions absentes dans chacun des ABaR. Les composants de AbaR3 sont délimités par des lignes verticales, une délétion partielle d'un composant est indiquée par l'absence de ligne verticale. Les flèches indiquent les positions des 3 copies d'IS*26* présentes dans AbaR3. La localisation de la séquence spécifique de 29-kb de AbaR1 est indiquée par un astérisque. La taille individuelle des AbaRs est proportionnelle à l'échelle, sauf pour les régions avec des IM1. (Krizova *et al.*, 2011).

BY-NC-ND

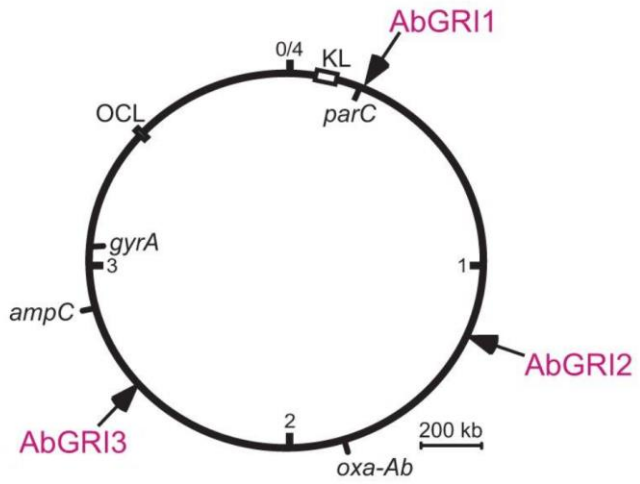


Figure 18 : Représentation schématique de la localisation des AbGRI1, 2 et 3 sur le chromosome de *A. baumannii* du clone GC2. Les nombres représentent les mégabases de chromosome. La position 4/0 correspond à l'origine de réplication. Les flèches indiquent la position des îlots de résistance AbGRI1, AbGRI2 et AbGRI3. Le rectangle indique le locus de la capsule (KL). La position de certains gènes de résistance impliqués dans l'antibio-résistance est indiquée. (Blackwell *et al.*, 2017)

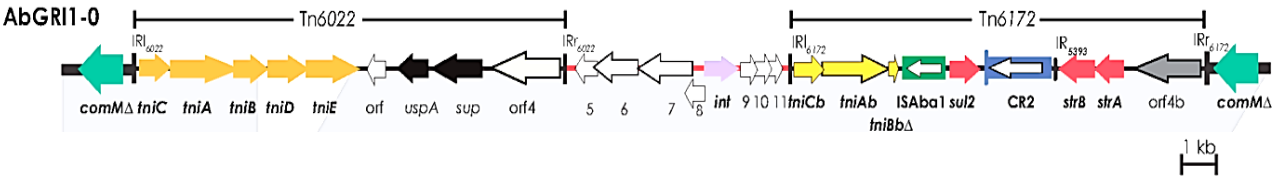


Figure 19 : représentation schématique de AbGRI1. Les lignes rouges ou noires horizontales représentent la trame de l'îlot, ou du chromosome de CG2 respectivement, le gène *comM* est situé de part et d'autre de l'îlot. Les flèches représentent la taille et l'orientation des gènes ou ORFs, avec leur nom indiqué dessous. Les gènes de résistance sont indiqués en rouge. Les fragments de Tn*6022* et Tn*6172* sont représentés en dessous et des barres verticales aux extrémités indiquent les séquences inversées répétées qui les encadrent. IS*Aba1* et CR2 sont indiqués par des rectangles vert et bleu avec une flèche blanche indiquant le sens du gène *tnp*. La figure est à l'échelle indiquée dessous. (d'après Hamidian et Hall, 2017)

BY-NC-ND

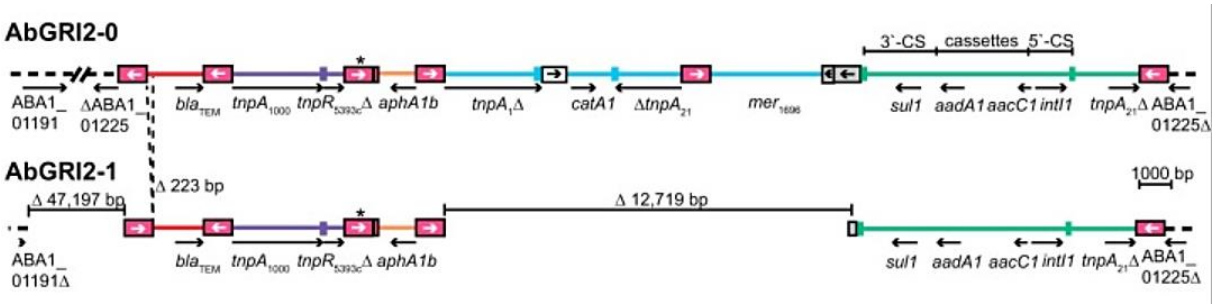


Figure 20 : représentation schématique de la structure des AbGRI2. Le chromosome adjacent est représenté par des lignes pointillées épaisses, avec l'indication du locus d'insertion en dessous. Les lignes colorées pleines indiquent la séquence de l'îlot de résistance, les flèches dessous indiquent la taille et l'orientation des gènes. Les rectangles représentent des IS, et les flèches à l'intérieur l'orientation du gène de la transposase *tnp*. Les rectangles marqués en rose, blanc et gris représentent respectivement IS*26*, IS*1*, et IS*6100*. L'astérisque indique que l'IS*26* présente 3 nucléotides différents de la séquence standard. Les séquences inversées répétées sont représentées par des lignes verticales. Les lignes verticales en pointillés indiquent la petite délétion présente dans AbGRI2-1. Au-dessus du premier schéma, la ligne représente l'IM1. (Blackwell *et al.*, 2015)

BY-NC-ND

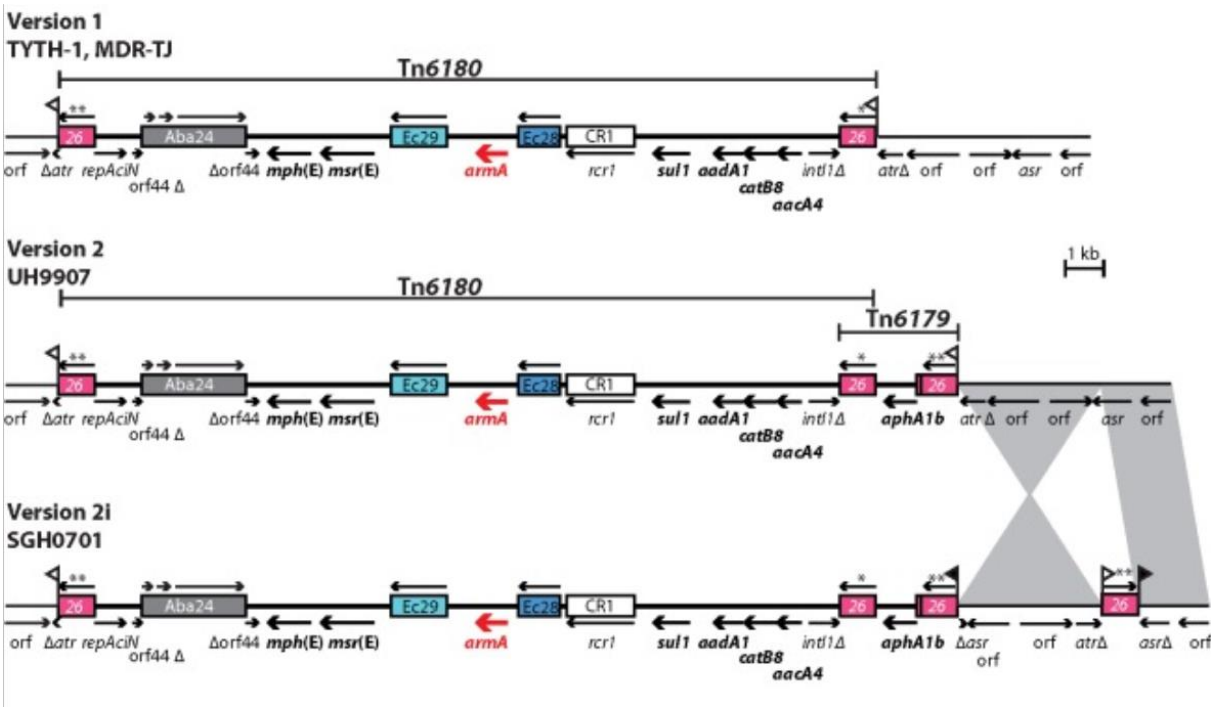


Figure 21 : structure des AbGRI3. Comparaison du variant AbGRI3-2i avec les versions publiées de AbGRI3. Les lignes épaisses représentent la trame de l'îlot de résistance, alors que les lignes fines indiquent la séquence chromosomique. Les flèches en dessous montrent la taille et l'orientation des gènes, les gènes de résistance aux antibiotiques sont indiqués en gras. IS et les CR sont indiqués par des rectangles avec un numéro dedans. Les flèches au-dessous des IS montrent l'orientation du gène *tnp*. Une astérisque indique les IS*26* qui ont une séquence différente du standard IS*26*, en trois position [G(459)A, G(613)A et G(614)A], et deux astérisques indiquent deux différences [G(613)A et G(614)A]. Les drapeaux indiquent les 8 bp TSDs. Différentes zones de gris rejoignent les régions qui ont une identité de séquences entre les deux structures >99.9%. La représentation est à l'échelle indiquée. (Blackwell *et al.*, 2017)

BY-NC-ND

A. baumannii a développé une diversité de mécanismes de résistance impressionnante : enzymes d'inactivation, pompes à efflux, imperméabilité, modification de cibles. Il en est de même pour les supports génétiques (mutations, acquisition de transposons et de plasmides, présence d'intégrons, séquences d'insertion promotrices…). Cette grande diversité de mécanismes est intimement liée à la capacité de *A. baumannii* à intégrer du matériel génétique issu d'espèces génétiquement plus ou moins proches. Zander *et al.* ont identifé l'acquision de résistance aux carbapénèmes associées à des EGM chez *Acinetobacter non-baumannii*, ce qui suggère que la résistance de *A. baumannii* pourrait aussi être liée aux échanges avec des *Acinetobacter* non *baumannii* (Zander *et al.*, 2014a, 2014b).

Ces caractéristiques font de *A. baumannii* un modèle intéressant d'étude des mécanismes de résistance et d'adaptation.

1.9 Epidémiologie des intégrons de résistance chez A. baumannii

La multirésistance de *A. baumannii* a été largement associée dans la littérature avec la présence d'intégrons (Asadollahi *et al.*, 2011; Deylam Salehi *et al.*, 2017; Gonzalez *et al.*, 1998; Ploy *et al.*, 2000; Poonsuk *et al.*, 2012; J. Zhang *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2012). En Chine les IM1 sont détectés dans plus de 50 % des isolats de *A. baumannii* multi-résistants (J. Zhang *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2012). Il a été décrit au Brésil, des souches de *A. baumannii* cliniques, capables de disséminer chez des patients non reliés épidémiologiquement, portant toutes les 5 un IM1 (In86) avec le même réseau bla_{IMP}, *aac(6')-31* et *aadA1*, conférant la résistance aux aminosides (*aac(6')-31*) et aux carbapenèmes (bla_{IMP}) (Mendes *et al.*, 2007). De nombreuses études ont aussi démontré la prévalence des IM1 dans les isolats de *A. baumannii* en Europe, en Asie et aux Etats-Unis (Asadollahi *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2009; Poonsuk *et al.*, 2012; Turton *et al.*, 2005). Les IM1 chez *A. baumannii* peuvent être retrouvés sur des plasmides (Kaase *et al.*, 2014) mais aussi sur le chromosome souvent au niveau d'un îlot de résistance (Liu *et al.*, 2014; Zhu *et al.*, 2014). La plupart des gènes de résistance aux béta-lactamines chez *A. baumannii* ont été retrouvés dans des IM1 (Peleg *et al.*, 2008; Potron *et al.*, 2015).

Bien que les IM1 soient décrits comme les plus prévalents chez les *A. baumanni* cliniques (Liu *et al.*, 2014), des études en Amérique du Sud (Chili, Argentine, Brésil) ont montré une proportion

BY-NC-ND

des IM2 plus importante que celle des IM1 au sein de *A. baumannii* (Fonseca *et al.*, 2011; Gonzalez *et al.*, 1998; Pagano *et al.*, 2013).

Le nombre de gènes de résistance insérés au sein du même plasmide, voire du même intégron semble augmenter au cours du temps, avec l'apparition et la diversification des ilôts de résistance. Cette intégration au sein d'un même EGM pourrait faciliter la persistance dans l'environnement à long terme du fait de l'association physique des intégrons avec d'autres EGM, permettant leur sélection continue (Lee *et al.*, 2009). A ce jour les ilôts de résistance décrits chez *A. baumanni* portent pour la grande majorité des IM1 (voir Figures 17 et 19 à 21)

BY-NC-ND

Chapitre 3 : la réponse SOS

L'étude de mutants de *lexA* et *recA*, apparus suite à l'action d'agents chimiques comme les rayonnements ultraviolets (UV) ou la mitomycine C sur l'ADN, fait évoquer dans les années 70 l'existence d'un système de réparation de l'ADN dépendant des protéines LexA et RecA. L'induction de ce système lorsque l'ADN est endommagé et sa synthèse arrêtée, entraîne des mutations (Prakash, 1974; Radman, 1975). Ce système est appelé « SOS » en référence au message « Save Our Souls » des navires en perdition et symbolise la réponse à l'ADN endommagé en « perdition ».

Ce système permet aux bactéries de répondre aux stress endommageant ou arrêtant la réplication de l'ADN. Elle met en jeu deux régulateurs centraux : les protéines LexA (locus for X-ray sensitivity A) et RecA (Recombinase A). La réponse passe par l'activation d'ADN polymérase à faible fidélité favorisant la survenue de mutation.

3.1. Acteurs et mécanismes de la réponse SOS

3.1.1. La protéine LexA

La protéine LexA comporte 202 acides aminés, fait environ 22 kDa et est composée de deux domaines distincts N-terminal et C-terminal reliés par une région charnière flexible (Figure 22.A) (Luo *et al.*, 2001). Le domaine N-terminal porte un site de liaison spécifique à l'ADN. Le domaine C-terminal comprend un site actif permettant une autoprotéolyse de la protéine, il est aussi responsable de la dimérisation de LexA (A. P. P. Zhang *et al.*, 2010). La dimérisation ou la dissociation des monomères de LexA sont des processus lents qui prennent au moins 10 min (Giese *et al.*, 2008). LexA fixe l'ADN sous forme de dimère au niveau d'un site spécifique appelé « boîte LexA ». Cette boîte est un motif palindromique de 16pb de consensus 5'-CTGT-

BY-NC-ND

N8-ACAG-3' chez *E. coli* et la plupart des *Gammaproteobacteria,* situé dans la région promotrice de gènes du système SOS qui sont régulés par LexA (Erill *et al.*, 2007). Trois hélices α, H1, H2 et H3 sont situées dans la région N-terminale. Les hélices H2 et H3 forment un motif hélice-tour-hélice (HTH) qui assure la liaison à l'ADN sur la boîte LexA (Figure 22.B) (Butala *et al.*, 2009). La région charnière hydrophile Gln70 à Gln74 est importante également pour la formation du contact spécifique avec la boîte LexA. La dimérisation de LexA est essentielle car c'est sous cette forme qu'elle peut jouer sont rôle de répresseur des gènes SOS (Butala *et al.*, 2009).

Le domaine C-terminal, composé de feuillets β, porte les éléments essentiels aux activités de protéase et d'auto-clivage de la protéine. Deux acides aminés, la sérine 119 (Ser119) et la lysine 156 (Lys156) constituent le site actif neutre (Little, 1991; Slilaty et Little, 1987) qui catalyse le clivage du lien existant entre les résidus alanine 84 (Ala84) et glycine 85 (Gly85) (Horii *et al.*, 1981) (Figure 22.C). Ces deux derniers résidus Ala84 et Gly85 se trouvent dans une boucle qui possède deux conformations, « non clivable » éloignée du site actif et « clivable » à proximité du site actif, quand LexA est liée à l'ADN (Giese *et al.*, 2008; Luo *et al.*, 2001) (Figure 22). Une mutation dans ce site actif aboutit à une protéine non clivable et un blocage de la réponse SOS. Seule, LexA a une activité faible d'autoprotéolyse, la co-protéase RecA catalyse le clivage de LexA (voir sous-chapitre suivant).
Il y a environ 1300 molécules de LexA par cellule à l'état basal (Sassanfar et Roberts, 1990) majoritairement liées à l'ADN ; seules 20% resteraient à l'état libre dans la cellule (Butala *et al.*, 2011).

BY-NC-ND

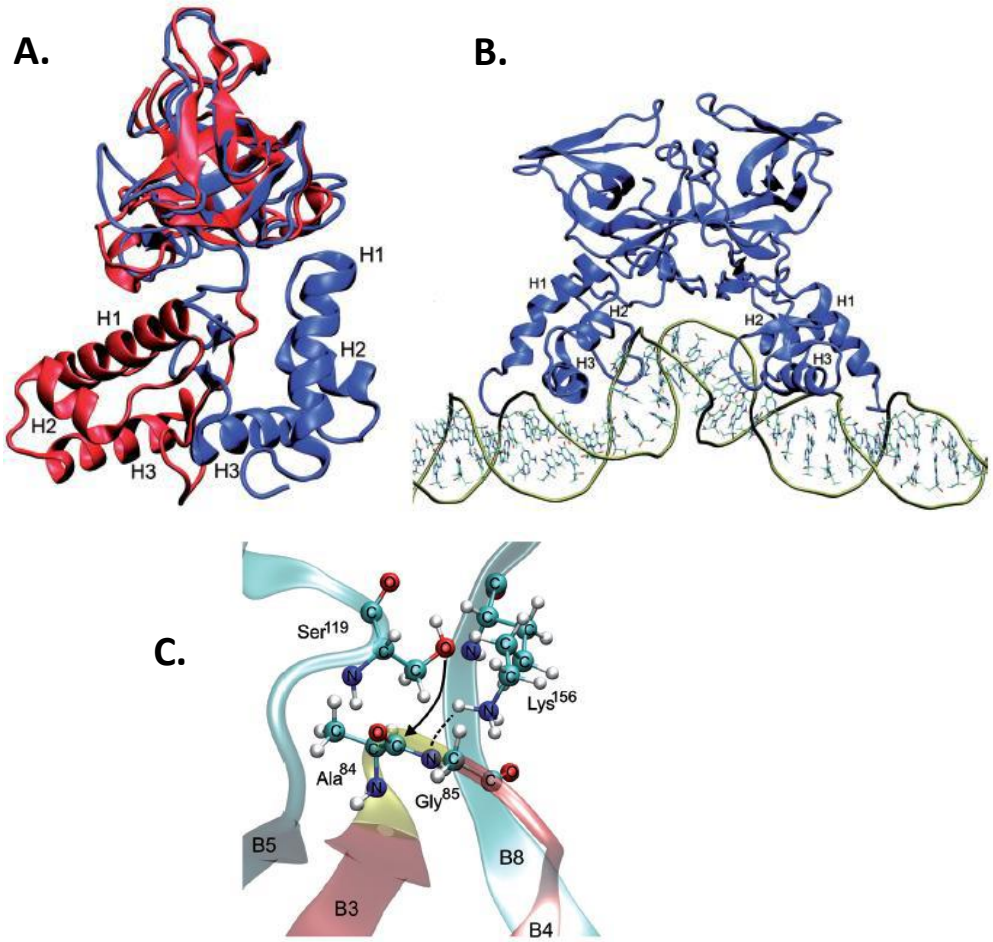


Figure 22 : Modélisation moléculaire de la structure tertiaire de la protéine LexA de *E.coli.*
A. structure du monomère de LexA. En rouge est représenté le monomère sous forme libre et en bleu le monomère sous forme fixé à l'ADN qui génère un changement de conformation. Les structures se superposent au niveau des domaines C-ter. Les 3 hélices α constituant le domaine N-ter sont marquées de H1 à H3. **B.** Dimère de protéines LexA fixé au niveau d'une boîte LexA. La liaison à l'ADN se fait via le domaine N-ter, par un motif hélice-tour-hélice (HTH). **C.** Mécanisme proposé de l'auto-clivage de LexA : la sérine 119 (Ser119) est activée par la lysine 156 (Lys156), qui est une base générale neutre (Little, (1991)). Le groupement hydroxyle de Ser119 est le nucléophile qui attaque le carbone du groupement carbonyle de la liaison peptidique scissile (flèche noire), suivi par le transfert d'un proton au nouveau groupement amine généré (ligne pointillée). Les résidus catalytiques Ser119 et Lys156 sont représentés par leurs modélisations moléculaires (en boules et bâtons) et le site de clivage entre l'alanine 84 (Ala84) et la glycine 85 (Gly85) est représenté par un ruban jaune, les résidus substrats sont représentés par leurs modélisations moléculaires. Les feuillets β B3, B4, B5 et B8 sont indiqués. (D'après Butala *et al.,* 2009)

BY-NC-ND

3.1.2. La protéine RecA

Chez *E. coli,* la recombinase A ou RecA codée par le gène *recA* est une protéine de 352 acides aminés qui fait environ 38 kDa (Story *et al.*, 1992). Le monomère de RecA est organisé en 3 domaines : un grand domaine cœur et deux petits domaines N- et C-terminaux (Figure 23). Dans le domaine cœur se trouve le site de fixation et d'hydrolyse de l'ATP au niveau des résidus 47 à 74 (Cox, 2003), il forme le modèle du motif « pli RecA » retrouvé chez de nombreuses autres protéines telles que les hélicases, les protéines de transport de l'ADN, l'ATPase F1 mitochondriale, ainsi que d'autres protéines de transport (Cox, 2007, 2003). RecA est une ATPase dépendante de l'ADN.

Il y a un taux élevé de RecA par bactérie à l'état basal, soit 7200 molécules (Sassanfar et Roberts, 1990). RecA possède une affinité beaucoup plus forte pour l'ADNsb (simple brin) que pour l'ADNdb (doule brin). La formation des filaments nucléoprotéiques RecA-ADNsb nécessite la fixation d'ATP mais pas son hydrolyse. Le filament RecA-ADNsb est constitué de 6 monomères de RecA pour 1 tour d'hélice (18 pb dans la conformation liée à RecA), il y a 3 sites de liaison pour les brin d'ADN dans chaque monomère (Figure 23). Cette conformation étirée de 50 à 60% de l'ADN est inhabituelle, mais elle facilite les échanges de brins lors de la recombinaison (Patel *et al.*, 2010). L'hydrolyse de l'ATP en ADP + Pi entraine le désassemblage du filament nucléoprotéique.

La protéine RecA participe à plusieurs processus cellulaires (Jiang *et al.*, 2009; Schlacher *et al.*, 2006) :

- Elle a une activité de recombinase en catalysant l'échange de brin d'ADN dans la recombinaison homologue.
- Elle est le senseur central de la réponse SOS en se fixant sur les ADNsb très rapidement pour former le filament nucléo-protéique qui va ensuite stimuler l'auto-protéolyse de LexA.
- Elle participe à la mutagénèse SOS en activant la protéine UmuD, sous-unité de l'ADN polymérase V, par clivage autocatalytique de sa forme inactive et en facilitant la réplication de l'ADN par l'ADN polymérase V, qui est peu fidèle, malgré la présence de lésion.

BY-NC-ND

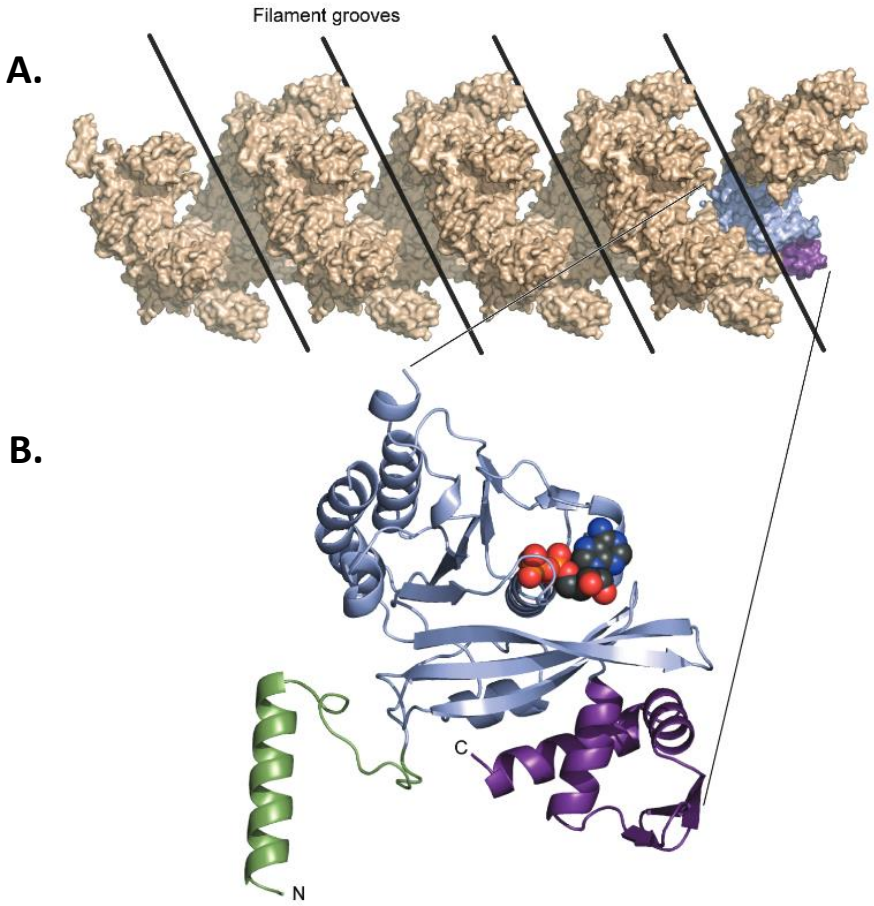


Figure 23 : Structure de la protéine RecA et du filament nucléoprotéique. A. filament nucléoprotéique RecA-ADNsb : 24 sous unités sont représentées, soit 4 tour de filament avec 6 monomères par tour, ce qui correspond à la conformation étirée de l'ADN, d'après la structure déterminée par Story et Steitz en 1992. L'ADN est lié dans le filament (en beige). La rainure hélicoïdale qui permet l'accès à l'intérieur du filament est Indiquée par des traits noirs. Une des sous-unités RecA individuelle est représentée en rose et violet. **B.** Monomère de RecA : en bleu, le domaine cœur est représenté avec la liaison à une molécule d'ADP (structure en boules bleue et rouge) et en vert et violet, les domaines N- et C- terminaux.
(D'après Cox, 2007)

BY-NC-ND

3.2. Mécanismes de régulation par la réponse SOS

Le système SOS est une réponse cellulaire bactérienne de sauvegarde de l'ADN lorsqu'un stress est responsable de dommages de l'ADN. La formation d'ADNsb déclenche l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et la tolérance aux dommages (Lewis *et al.*, 1994; Schlacher et Goodman, 2007). Ces gènes sont sous le contrôle de la protéine LexA et constituent le « régulon SOS ». En effet, à l'état basal, des homodimères de LexA sont fixés sur la boîte LexA (Figure 24.A) et répriment la transcription des gènes de la réponse SOS. La boîte LexA contient deux éléments de fixation symétriques inversés, chacun liant une sous-unité de LexA, ce qui a permis de faire l'hypothèse que LexA fixait sa cible sous forme de dimère (Thliveris *et al.*, 1991). La boîte LexA est localisée à proximité ou dans la région promotrice des différents gènes qu'elle régule, de sorte que LexA interfère physiquement avec l'ARN polymérase, réprimant ainsi la transcription des gènes SOS (Erill *et al.*, 2007). Cependant, les gènes régulateurs comme *lexA* et *recA* gardent un niveau d'expression basal, même réprimés, afin d'assurer leurs rôles de régulateurs/senseurs de la réponse SOS.

Lorsqu'un stress bactérien, exogène ou endogène, conduit à la formation d'ADNsb dans la cellule (Figure 24.B), l'accumulation d'ADNsb entraîne la fixation de RecA, conduisant à la formation de filaments nucléoprotéiques RecA-ADNsb. Au sein de ces derniers, RecA change de conformation et agit comme une coprotéase avec LexA qui catalyse alors son auto-clivage (Giese *et al.*, 2008; Kreuzer, 2013; Little et Mount, 1982; Mo *et al.*, 2014) libérant la région promotrice du gène SOS permettant ainsi à l'ARN polymérase de s'y fixer et de l'exprimer (Erill *et al.*, 2007; Janion, 2008) (Figure 24.B).

Il se met alors en place un processus précis d'activation des gènes SOS. Leur temps d'activation et leur niveau d'expression dépendent de l'affinité des opérateurs pour LexA (Courcelle *et al.*, 2001; Lewis *et al.*, 1994; Ronen *et al.*, 2002). La localisation et le nombre de sites LexA au niveau des promoteurs, ainsi que l'affinité de lexA pour le site de fixation, influencent l'expression des gènes SOS (Butala *et al.*, 2009). Le déclenchement de la réponse entraine l'expression en premier des gènes *uvr,* codant des protéines requises pour l'excision des nucléotides endommagés. Puis les gènes *lexA*, *recA*, *dinD* et *recN* sont s'exprimés. Plus tardivement, si les lésions persistent, les gènes codant des ADN polymérases de basse fidélité

BY-NC-ND

sont exprimés [Pol II (*pol B*), Pol IV (*dinB*) et Pol V (*umuC*, *umuD*)] (Courcelle *et al.*, 2001; Ronen *et al.*, 2002) permettant la réplication de l'ADN lorsque l'ADN polymérase Pol III a échoué.

Des gènes fixant faiblement LexA, comme *lexA*, *recA*, *uvrA*, *uvrB* et *uvrD* seront déréprimés très tôt mais exprimés faiblement, alors que ceux dont la boîte LexA fixe fortement le répresseur, comme les gènes *sfiA* (*sulA*) et *umuDC*, seront exprimés plus tardivement mais fortement, lorsque le taux de répresseur aura suffisamment diminué dans la cellule (Courcelle *et al.*, 2001; Friedman *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 1994; Michel, 2005; Ronen *et al.*, 2002). Cette cinétique permet d'adapter et de synchroniser l'expression des protéines au moment opportun. L'induction de la réponse SOS se poursuit jusqu'à 45 à 60 min après son déclenchement puis s'arrête au fur et à mesure de la réparation des ADNsb, la synthèse de LexA étant continue pendant la durée de la réponse SOS, les stocks de protéine LexA permettent de rétablir la répression des gènes SOS.

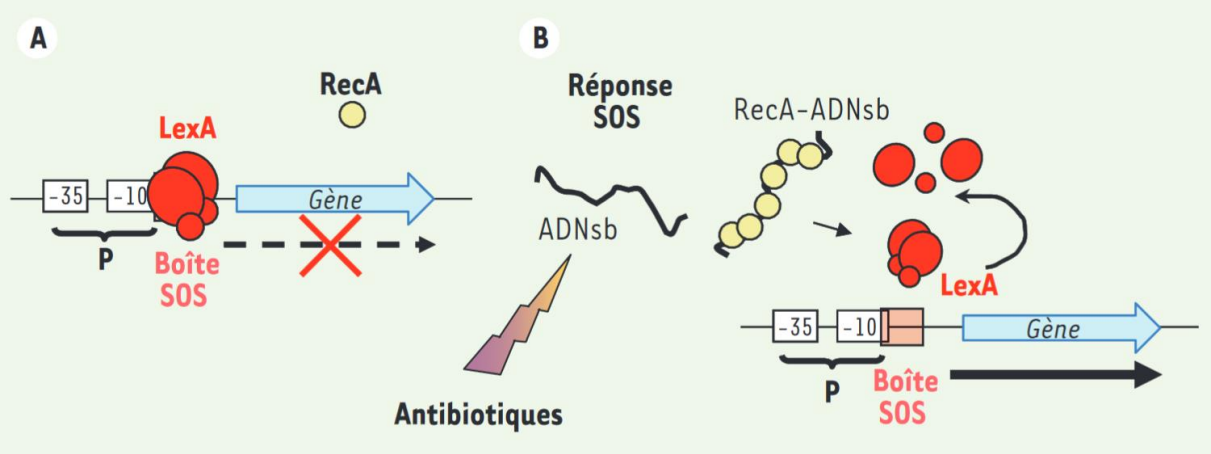


Figure 24 : La réponse SOS. A. En l'absence de stress, un dimère de protéines LexA est fixé au niveau de la « lexA box », boîte SOS située dans la région promotrice des gènes du régulon SOS. La protéine joue un rôle de répresseur et en fonction de l'affinité de liaison de LexA à son site de fixation, le gène est totalement inhibé ou peu exprimé. **B.** Lors d'un stress générant de l'ADN simple brin (ADNsb), la protéine RecA se lie aux régions d'ADNsb pour former le filament nucléoprotéique qui catalyse l'autoprotéolyse de LexA. Le promoteur du gène est libéré, le gène SOS peut être exprimé. (d'après Da Re et Ploy, 2012))

BY-NC-ND

3.3. Le régulon SOS

En absence de stress, la protéine LexA réprime les gènes du « régulon » SOS. Le nombre et le type de gènes du régulon SOS varient d'une espèce à l'autre. Chez *E. coli*, il est constitué d'un peu plus de 40 gènes (Courcelle *et al.*, 2001; Fernández De Henestrosa *et al.*, 2000) (Tableau 3). Chez *P. aeruginosa*, il en a été rapporté seulement 15 (Cirz *et al.*, 2006).

Les protéines codées par les gènes SOS sont impliquées dans trois voies majeures de réparation des lésions de l'ADN : la recombinaison homologue, la réparation de l'ADN par excision de nucléotides et la synthèse translésionnelle (Baharoglu et Mazel, 2014; Erill *et al.*, 2007; Kreuzer, 2013; Storz et Hengge, 2011). La plupart de ces gènes sont réprimés directement par LexA, cependant 19 gènes ne possédent pas de boîte LexA, mais semblent quand même être liés *in vitro* à LexA, probablement par l'intermédiaire d'un facteur additionnel (Wade *et al.*, 2005). A l'inverse, certains gènes, comme *dinJ* et *yigN*, présentent une boîte LexA potentielle mais ne sont pas induits lors de la réponse SOS (Fernández De Henestrosa *et al.*, 2000).

Il est difficile de définir précisément le régulon SOS car il dépend du type et de l'importance du dommage causé. En comparant différentes études d'induction de la réponse SOS (Courcelle *et al.*, 2001; Khil et Camerini-Otero, 2002; Quillardet *et al.*, 2003), seulement 5 gènes régulés par LexA étaient communs : *sfiA*, *recA*, *recN*, *dinD* et *dinB* (Storz et Hengge, 2011). Une autre étude comparant les gènes exprimés suite au stress induit par sept agents différents, a permis d'identifier un réseau de gènes qui a été appelé « module LexA » (Figure 25), comprenant les gènes : *dinI*, *dinF*, *lexA*, *polB*, *recA*, *recN*, *recX*, *ruvAB*, *ssb*, *sfiA*, *umuDC*, *uvrAB* et *ydjM* (Hong *et al.*, 2009). Les auteurs ont également identifié deux autres gènes : *rmuC* et *yebG*, présentant une boîte LexA putative mais dont la liaison avec LexA n'est pas encore démontrée expérimentalement.

BY-NC-ND

Gène	Fonction(s)
cho	Endonucléase de réparation par excision
dinB	ADN polymérase IV
dinD	Fonction inconnue
dinF	Fonction inconnue
dinG	Hélicase
dinI	Stabilisation du filament RecA
lexA	Répresseur de la réponse SOS
polB	ADN polymérase II
ptrA	Protéase III
recA	Recombinaison, active l'autoprotéolyse de LexA et UmuD
recN	Recombinaison/réparation
recX	Déstabilisation du filament RecA
rmuC	Fonction inconnue, les mutants montrent des taux élevés de réarrangements génétiques
ruvAB	Recombinaison ; hélicase, se lie aux jonctions de Holliday
ssb	Se lie à l'ADN-sb, réplication, recombinaison, réparation
sfiA	Inhibition de la division cellulaire
umuDC	ADN polymérase V
uvrAB	Reconnaissance des mésappariements et excision des nucléotides
uvrD	Antirecombination DNA helicase ; déstabilise le filament RecA, impliqué dans la réparation des mésappariements, réparation des mésappariements
ybfE	Fonction inconnue ; se lierait à l'ADN, possible régulateur de transcription
ydjM	Fonction inconnue, protéine de la membrane interne
yebG	Fonction inconnue

Tableau 3 : Quelques gènes du régulon SOS et leur fonction. (D'après Storz et Hengge, 2011)

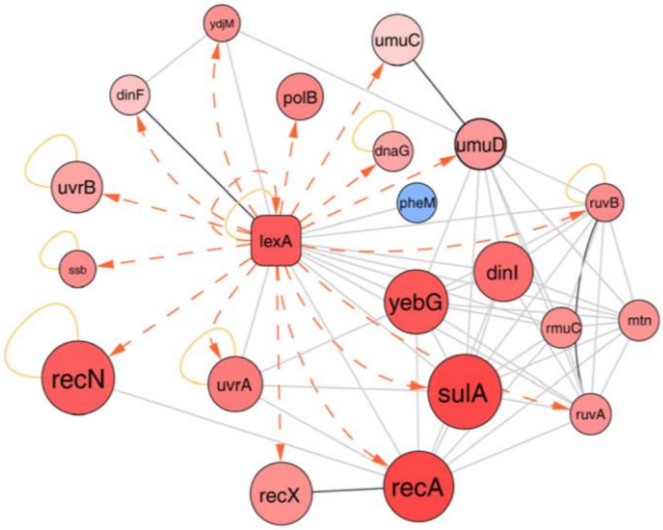


Figure 25 : Le « module LexA ». Vingt et un noeuds (gènes ou protéines) et 77 interactions ont été obtenus. La plupart des interactions coïncident avec les voies de régulations connues, mais certaines restent encore à élucider. (D'après Hong *et al.*, 2009)

BY-NC-ND

3.4. Signaux inducteurs de la réponse SOS

3.4.1. Dommages de l'ADN

De nombreux stress générant des dommages de l'ADN, déclencheurs de la réponse SOS, ont été identifiés (Figure 26) :

- Des altérations directes de l'ADN telles que radiations UV et gamma (Kuzminov, 1999) ou, agents alkylants endogènes issus de processus métaboliques aux propriétés mutagènes et génotoxiques (Drabløs *et al.*, 2004; Mizrahi et Andersen, 1998; Volkert *et al.*, 1989).
- Des dérèglements métaboliques conduisant à l'altération de l'ADN comme le niveau d'AMP cyclique intra cellulaire suite à la déplétion en nutriment chez *E. coli* (Taddei *et al.*, 1995) ou la mutation de gènes impliqués dans des voies de réparation comme les mutants *dam* ou *dnaQ* (O'Reilly et Kreuzer, 2004).
- Des agressions environnementales comme le stress oxydatif (Imlay et Linn, 1987) ou l'exposition aux chromates (polluants) (Ackerley *et al.*, 2006), la pression hydrostatique (Aertsen *et al.*, 2004; Aertsen et Michiels, 2005) ou encore les ultrasons (Vollmer *et al.*, 1998).

L'autoprotéolyse directe de LexA, indépendamment de RecA, a pu être obtenue *in vitro* par un pH basique (Smith *et al.*, 1991), alors que *in vivo*, un bas niveau de pH diminue l'affinité de liaison de LexA sur les boîtes LexA et augmente l'affinité de LexA pour des séquences non spécifiques, ce qui engendre une dérépression des gènes régulés par LexA (Sousa *et al.*, 2006).

3.4.2. Les éléments génétiques mobiles

D'autres mécanismes peuvent générer de l'ADNsb en l'absence de lésion de l'ADN comme les transferts horizontaux génétiques :

- la conjugaison bactérienne, au moment où l'ADNsb plasmidique est transféré, peut déclencher la réponse SOS, comme cela a été mis en évidence chez *V. cholerae* et *E. coli* (Baharoglu *et al.*, 2010);
- la transformation bactérienne où l'ADNsb entrant induit également le système SOS (Baharoglu *et al.*, 2012).

BY-NC-ND

Ces deux mécanismes en activant la réponse SOS, vont aussi permettre l'expression des intégrases d'intégrons chez *E. coli* et *V. cholerae* (Baharoglu *et al.*, 2010, 2012) ou encore augmenter l'expression des gènes nécessaires au transfert de l'élément SXT (Beaber *et al.*, 2004) qui est une ICE d'environ 100Kb dérivée de *V. cholerae* qui code des gènes conférant la résistance au chloramphénicol, au sulfaméthoxazole, au triméthoprime et à la streptomycine (Hochhut *et al.*, 2001).

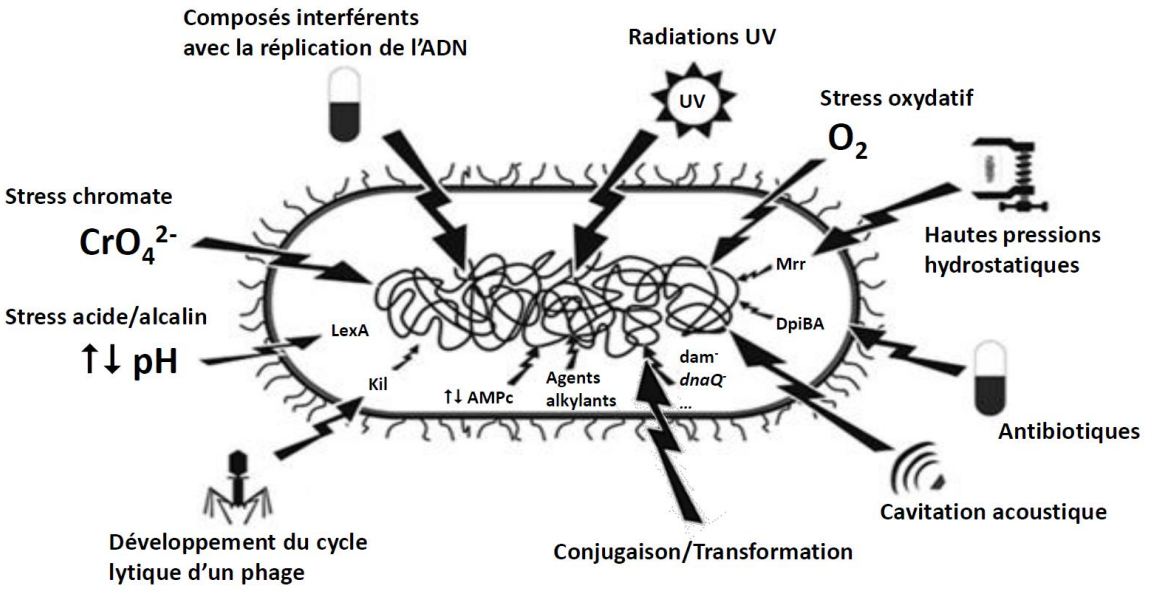


Figure 26 : Signaux et mécanismes inducteurs de la réponse SOS. Listes des principaux inducteurs directs et indirects de la réponse SOS. Pour l'activation indirecte, les molécules intermédiaires impliquées sont indiquées dans leur voie respective. Les mécanismes d'activation endogènes sont désignés par des molécules/mutations nommées sans flèches externes. (D'après Erill *et al.*, 2007).

3.4.3. Les antibiotiques et le rôle de la réponse SOS dans la génération de l'antibio-résistance

Les antibiotiques qui ont une action directe ou indirecte sur la réplication de l'ADN vont en général aussi induire la réponse SOS. C'est le cas du triméthoprime (inhibition de la synthèse des purines et pyrimidines) (Lewin et Amyes, 1991) ou des quinolones (inhibition de l'ADN gyrase et de la topoisomérase IV) (Pohlhaus et Kreuzer, 2005), mais aussi de la mitomycine C qui provoque des liaisons croisées T-T conduisant à des cassures de l'ADN.

BY-NC-ND

Les béta-lactamines peuvent déclencher la réponse SOS en mettant en jeu la voie de transduction DpiBA. Le stress généré au niveau de la paroi par les béta-lactamines active la protéine senseur DpiB, cette dernière va activer le régulateur DpiA par phosphorylation. Celui-ci va se fixer sur les origines de réplication du chromosome et interrompre la réplication en bloquant l'activité de l'ADN polymérase III, déclenchant la réponse SOS (Miller *et al.*, 2004, 2003). Les antibiotiques qui génèrent des dérivés actifs de l'oxygène comme les aminosides, certaines béta-lactamines ou le métronidazole, entrainent un stress oxydatif capable de provoquer des dommages de l'ADN (Kohanski *et al.*, 2010). L'induction peut être espèce dépendante puisque les aminosides, la tétracycline et le chloramphénicol sont capables d'induire la réponse SOS chez *V. cholerae* mais pas chez *E. coli* (Baharoglu et Mazel, 2011).

Enfin, de nombreux antibiotiques sont capables d'induire la réponse SOS à des concentrations sub-inhibitrices (Baharoglu et Mazel, 2014). Ce mécanisme a un rôle important dans l'apparition et la dissémination de la résistance aux antibiotiques (Gullberg *et al.*, 2011; Kohanski *et al.*, 2010). Ces concentrations ne tuent pas les bactéries mais peuvent déclencher la réponse SOS et ainsi favoriser l'acquisition de mutations adaptatives. Deux études sur *Streptococcus uberis* et *P. aeruginosa* ont mis en évidence ce phénomène (Alonso *et al.*, 1999; Varhimo *et al.*, 2008).

D'autres gènes, comme le gène *intI1* (Guerin *et al.*, 2009) sont régulés par LexA mais leur fonction n'est pas dédiée à la réparation de l'ADN lésé. Par exemple, il a été montré que les gènes *qnrB* impliqués dans la résistance aux fluoroquinolones possédaient dans leur région promotrice un site de fixation pour LexA et qu'il existait une régulation par la réponse SOS induisant l'expression du gène *qnrB* en présence de fluoroquinolones (Da Re *et al.*, 2009). Toujours par l'activation de la réponse SOS, LexA contrôle l'excision des ilôts de pathogénicité chez *S. aureus* (SaPIs) et leur empaquetage dans des capsides de phage chromosomique, permettant leur transfert à d'autres cellules (Ubeda *et al.*, 2007). Ces îlots codent la toxine du syndrome de choc toxique (TSST) et portent divers superantigènes.

L'induction de la réponse SOS favorise donc l'émergence de résistance par deux voies : induction de la mutagénèse mais aussi dissémination de la résistance par transfert d'EGM ou de cassettes d'intégrons.

BY-NC-ND

3.5. Universalité de la réponse SOS

La réponse SOS semble être un processus cellulaire largement répandu. Des gènes homologues de *lexA* sont trouvés dans quasiment tous les génomes bactériens séquencés, dans un grand nombre de phylum, ce qui laisse penser que ce processus est ancien et la réponse SOS répandue. D'autre part, des homologues fonctionnels de LexA régulant un groupe de gènes impliqués dans la réparation aux dommages de l'ADN ont été caractérisés dans de nombeuses autres espèces que les *Proteobacteria*, par exemple : *Corynebacterium glutamicum* (Jochmann *et al.*, 2009), *S. aureus* (Maiques *et al.*, 2006), *Bacillus subtilis* (Raymond-Denise et Guillen, 1991), *Actinobacterium, Mycobacterium tuberculosis* (Movahedzadeh *et al.*, 1997), *Thermotogae Thermotoga naepolitana* (Zverlov et Schwarz, 1999), *Alphaproteobacterium Rhodobacter sphaeroides* (Fernández de Henestrosa *et al.*, 1998) ou *Cyanobacterium Anabaena* sp. (Mazón *et al.*, 2004). En fonction de l'espèce bactérienne différentes séquences de boîtes LexA ont été rapportées (Tableau 4).

Espèce bactérienne	**Séquence de la boîte LexA**	**référence**
E. coli	TACTG $(TA)_5$CAGTA	(Walker, 1984)
Xylella fastidiosa	TTAG(N_6)TACTA	(Campoy *et al.*, 2002)
Bacillus subtilis	CGAACRNRYGTTCYC	(Cheo *et al.*, 1991; Winterling *et al.*, 1998)
Deltaproteobacterium Geobacter sulfurreducens	GGTT(N_2)C(N_4)G(N_3)ACC	(Jara *et al.*, 2003)
Corynebacterium glutamicum	TCGAAMA(N_2)TGTTCGA	(Jochmann *et al.*, 2009)

Tableau 4 : Exemples de séquence palindromiques de sites LexA pour différentes espèces bactériennes.

En dépit de cette apparente universalité, des exceptions ont été identifiées.

Dans les *Pseudomonadales* et *Xanthomonadales*, il existe des réponses divergentes aux dommages de l'ADN. Par exemple, *P. putida* possède deux protéines LexA différentes, chacune contrôlant des régulons séparés (Abella *et al.*, 2007), et *Geobacter sulfurreducens*

BY-NC-ND

possède également deux protéines LexA, qui ne lient pas le promoteur de *recA* (Jara *et al.*, 2003). Le nombre de gènes *lexA* présents dans les bactéries est variable, allant de zéro chez les espèces du genre *Acinetobacter* (Hare *et al.*, 2012), *Streptococcus pneumoniae* (Gasc *et al.*, 1980; Prudhomme *et al.*, 2006), *Legionella pneumophila* (Charpentier *et al.*, 2011), les *Bacteroidetes* - groupe des bactéries sulfureuses vertes - la sous classe des *Epsilonproteobacteria Rickettsia prowazekii* (Andersson *et al.*, 1998), *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia pneumoniae* et *Helicobacter pylori* (Dorer *et al.*, 2010) ; jusqu'à deux, par exemple chez *Geobacter sulfurreducens* (Jara *et al.*, 2003) et *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Yang *et al.*, 2005). Les séquences spécifiques des boîtes LexA varient également entre et dans les classes bactériennes (Brooks *et al.*, 2001; Campoy *et al.*, 2005; Durbach *et al.*, 1997; Fernández de Henestrosa *et al.*, 2003; Winterling *et al.*, 1998). Enfin, *Leptospira interrogans* a une protéine LexA qui se lie à une boîte LexA dans le promoteur de *recA* mais pas dans son propre promoteur (Cuñé *et al.*, 2005).

Certaines bactéries présentent des réponses au dommages de l'ADN très différentes de la réponse SOS comme *S. pneumoniae* et *L. pneumophila* où le stress, notamment antibiotique, générant des ADNsb induirait un régulon de la compétence, entrainant la transformation de la bactérie et par conséquent, une diversification génétique pouvant aboutir à la survie bactérienne (Charpentier *et al.*, 2012). Il est aussi décrit des systèmes d'interdépendance comme chez *Bacillus subtilis* où l'activation de la réponses SOS aurait un rôle de répresseur des capacités de compétence (Raymond-Denise et Guillen, 1992).

La réponse SOS bien que très répandue dans le monde bactérien a évolué et s'est adaptée avec l'évolution bactérienne. L'étude des voies alternatives de réponse aux dommages de l'ADN pourrait nous permettre d'identifier de nouveaux mécanismes adaptatifs bactériens.

3.6. Particularité de la réponse aux dommages de l'ADN de *A. baumannii*

Alors que pratiquement toutes les *Gamaproteobacteria* présentent les éléments de la réponse SOS dans leur génome, plusieurs gènes impliqués dans la réplication de l'ADN, la transcription et la division cellulaire ne se retrouvent pas dans les génomes de *Acinetobacter* spp.,

BY-NC-ND

notamment l'ADN polymérase II, le facteur de réponse au stress σ^{38} et les protéines de division cellulaire SulA, FtsE et FtsX (Tableau 5).

Associé au fait que le genre *Acinetobacter* ne possède pas de LexA (décrit plus haut), cela indique une réponse aux dommages de l'ADN inhabituelle chez *A. baumannii*. Des études ont permis de mettre en évidence certaines composantes de cette régulation. Il existe une régulation positive de RecA, associée à la réparation de l'ADN et à la recombinaison bactérienne (Aranda *et al.*, 2011; Rauch *et al.*, 1996). Les souches de *A. baumannii* sont caractérisées par la présence de plusieurs opérons *umuDC* et gènes *umuD* et *umuC* codant l'ADN polymérase V (Norton *et al.*, 2013). Toutes les souches de *A. baumannii* possèdent un allèle différent de *umuD,* le gène *umuDAb* (Hare *et al.*, 2006) qui contient un domaine de type LexA à l'extrémité N-terminale (Hare *et al.*, 2012). Le gène *ddrR* (DNA dammage-inducible protein) est aussi régulé positivement au cours de la réponse aux dommages de l'ADN, il n'a pas d'homologue de séquence identifiable chez *E. coli* et sa fonction est inconnue. La régulation de *ddrR* est dépendante de RecA et semble impliquer la protéine UmuDAb (Aranda *et al.*, 2013). La mutation d'UmuDAb conduit à une diminution de l'expression de *ddrR*, suggérant que cette protéine peut aussi agir comme activateur (Aranda *et al.*, 2013), contrairement à LexA. Ces deux gènes sont exprimés constitutivement à partir d'un opéron *umuDAb-ddrR*.

La réponse SOS joue un rôle significatif dans l'adaptation bactérienne à la pression de sélection antibiotique par l'acquisition de nouvelles mutations ou par mobilisation des EGM. Chez *Acinetobacter*, bien que ce genre soit dépourvu de LexA, la réponse aux dommages de l'ADN a été associée à la sélection de gènes de résistance par mutagénèse (Aranda *et al.*, 2014; Norton *et al.*, 2013). Cependant, la mobilisation d'EGM au cours de la réponse aux dommages de l'ADN n'a pas encore été étudiée chez *A. baumannii* ; or il s'agit d'une bactérie qui est caractérisée par sa grande plasticité génétique et par sa faculté à acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques par le biais de transferts horizontaux. Compte tenu de l'importance croissante de *A. baumannii* en tant que pathogène multi-résistant, il est important de développer une compréhension des réponses au stress induites par les antibiotiques dans ces organismes.

BY-NC-ND

BY-NC-ND

Gène	Protéine	Fonction
Gènes du régulon SOS de *E. coli* non retrouvés chez *A. baumannii*		
lexA	LexA	Répresseur transcriptionnel, premier régulateur de la réponse SOS
rpoS	Facteur σ^{38}	Intervient au cours de la phase stationnaire et de la réponse au stress
sulA (sfiA)	SulA	Inhibiteur de la division cellulaire induit par la réponse SOS
ftsEX	FtsEX	Transporteur de fonction inconnue, induit par la réponse SOS
polB (dinA)	ADN polymérase II	polymérase non fidèle impliquée dans la mutagénèse SOS
dinI	DinI	Stabilisation du filament RecA, inhibe l'activité co-protéase de RecA sur UmuD
dinG (rarB)	Hélicase	ATP dépendante, rôle de réparation et recombinaison
molR	MolR	Régulateur de la synthèse de molybdate (transport)
hokE(ydbY)	Host Killing	Toxicité membranaire
sbmC	Inhibiteur de gyrase	Protection de l'inhibiteur de réplication MccB17
ydjQ	Endonucléase	Réparation des excisions de nucléotides
ybfE, ydjM, yebG, yigN, pcsA		Fonction inconnue
Gènes spécifiques de la réponse aux dommages de l'ADN chez *A. baumannii*		
umuDC	UmuD'$_2$C	Sous-unité de la DNA polymérase V, l'opéron *umuDC* et des gènes *umuD* et *umuC* sont présents en plusieurs copies
umuDAb	UmuDAb	Sous-unité de la DNA polymérase V, 50 % plus longue que la protéine homologue UmuD chez *E. coli*, possède un site de reconnaissance d'autoprotéolyse LexA-like, régule l'expression de *ddrD* en réponse aux dommages de l'ADN
ddrR	DNA dammage-inducible protein	Fonction inconnue, augmentée par l'induction de la réponse SOS chez *A. baylyi* ADP1, spécifique à *Acinetobacter* spp.
recA	RecA	Requise pour la réponse aux dommages de l'ADN chez *Acinetobacter* spp., requise pour la régulation de *ddrR*, augmentée suite à l'induction de la réponse aux dommages de l'ADN chez *A. baylyi* ADP1.

Tableau 5 : Spécificités de *A. baumanni* concernant les gènes de la réponse au dommages de l'ADN. (D'après Hare *et al.*, 2014; Robinson *et al.*, 2010; Wade *et al.*, 2005)

BY-NC-ND

BY-NC-ND

PRESENTATION DU TRAVAIL DE THESE

BY-NC-ND

BY-NC-ND

La résistance aux anti-infectieux est une réelle menace pour la prévention et le traitement d'un nombre croissant d'infections. Si rien n'est fait, il est estimé que les germes multi-résistants tueront 10 millions de personnes par an dans le monde - plus que le cancer - d'ici 2050. La crise touche tous les pays et tout le monde. Il s'agit d'un enjeu majeur de santé publique mondial qui requiert des mesures d'action coordonées nationales et mondiales. Sans anti-infectieux efficaces, le succès des chirurgies, des chimiothérapies dans les cancers, ou encore des transplantations d'organes serait compromis. D'autant plus que l'impact des infections dues à des germes multi-résistants est bien plus important que celui des germes sensibles en terme de morbi-mortalité mais aussi en terme de coût des soins de santé.

Des plans d'action tels que le programme New Drugs 4 Bad Bugs (ND4BB) d'Innovative Medicine Initiative (IMI) en Europe ou encore le Plan d'action national de lutte contre les bactéries résistantes aux antibiotiques aux Etats-Unis sont les représentations de cette volonté de partenariat entre l'industrie, les universités et les organisations de biotechnologie pour lutter contre la résistance aux anti-infectieux et débloquer les freins à la production de nouveaux traitements.

Le travail de notre équipe de recherche s'inscrit dans cette dynamique de lutte contre la résistance aux anti-infectieux. La compréhension des mécanismes d'acquisition et d'échange de gènes de résistance aux anti-infectieux fait partie intégrante de cette lutte. C'est ainsi que pourront être découvertes de nouvelles cibles d'action pour de nouveaux anti-infectieux ou de nouveaux traitements adjuvants à ceux-ci. Les intégrons représentent dans ce contexte un modèle intéressant d'étude de l'acquisition et de la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Les aspects mécanistiques et la régulation des intégrons ont été largement étudiés chez *E. coli*, en particulier les différentes voies de régulations de l'expression de l'intégrase et des cassettes. En revanche, ils sont peu étudiés chez *A. baumannii*. Dans un

BY-NC-ND

travail précédent de notre laboratoire il avait été rapporté, sur une analyse *in silico* de 321 intégrons, que chez *A. baumannii* la distribution des différents variants du promoteur des cassettes Pc montrait une prédominance des Pc forts (Figure 27).

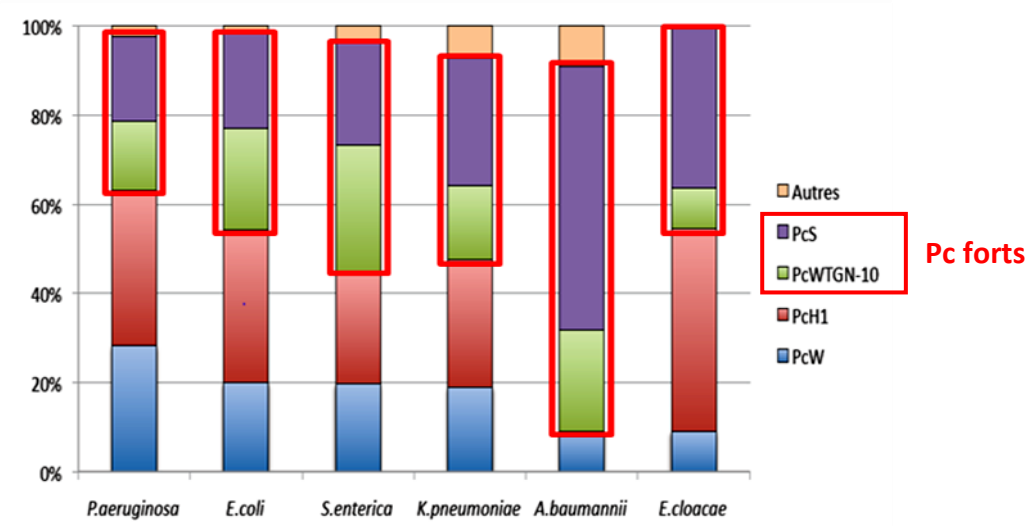


Figure 27 : Distribution des variants de Pc selon l'organisme hôte de l'IM1. Chaque histogramme correspond à un des 6 organismes hôte les plus fréquents : *P. aeruginosa* (n = 127), *E. coli* (n=70), *S. enterica* (n=56), *K. pneumoniae* (n=42), *A. baumannii* (n=24), *E. cloacae* (n=11) (données non publiées de Thomas Jové)

Nous avons précédemment développé les différents aspects de *A. baumannii* qui font de cette espèce un formidable pathogène multi-résistant tant à l'hôpital que dans la communauté. Il était donc logique de se demander si cette espèce bactérienne a un avantage sélectif à n'exprimer des cassettes de résistance que via des Pc forts.

Les travaux présentés dans ce manuscrit avaient pour objectifs :

- d'une part d'objectiver si la prédominance des Pc forts était une caractéristique d'espèce de *A. baumannii* ;
- d'autre part de fournir des éléments d'explications à cette répartition particulière des intégrons chez *A. baumannii*.

BY-NC-ND

Pour répondre à ces objectifs, nous avons construit ce travail de thèse autour de deux axes :

- Le premier axe était un travail épidémiologique, tant *in vivo* que *in vitro*, sur la répartition des Pc chez *A. baumannii* et la caractérisation du contenu en intégrons d'une collection de souches de *A. baumannii* d'origines différentes. En effet, les conclusions issues du travail de Thomas Jové étaient des données *in silico* ne reflétant pas la distribution réelle des Pc. Aucune donnée sur la distribution des Pc dans les IM1 chez des isolats cliniques de *A. baumannii* n'était disponible au commencement de ce travail.
- Le deuxième axe portait sur la régulation des IM1 chez *A. baumannii*. Nous voulions explorer les différentes voies de régulation des promoteurs Pint et Pc chez *A. baumannii* en comparaison avec ce qui était connu chez *E. coli*

BY-NC-ND

BY-NC-ND

Partie 1 : axe épidémiologique : étude des intégrons de classe 1 dans une collection de souches de *A. baumannii*

La multi-résistance de *A. baumannii* a été largement associée dans la littérature à la présence d'IM1. En revanche il n'y avait pas de données épidémiologiques sur la distribution des variants de Pc que ce soit *in vivo* mais aussi *in vitro* chez *A. baumannii*.

Dans ce premier axe, nous souhaitions enrichir les données épidémiologiques en étudiant des isolats cliniques de *A. baumannii*. Nous avions à notre disposition 83 isolats ou ADN de *A. baumannii* provenant :

- de différents prélèvements cliniques de patients hospitalisés dans 10 hôpitaux français (Limoges, Angers, Poitiers, Lens, Bordeaux Pellegrin, Bordeaux Haut-Levêque, Rouen, Toulouse, Valencienne, Val d'Ariège),
- du laboratoire Biomérieux, les ADN étaient extraits de souches d'origine clinique provenant majoritairement d'hôpitaux français
- d'effluents hospitaliers du Cameroun, provenant de 5 hôpitaux différents.

Ces souches avaient au préalable été sélectionnées sur leur contenu en intégrons et toutes portaient au moins un IM1. Nous avons :

- caractérisé entièrement le contenu en IM1 de ces souches : nombre d'IM1 par isolat, détermination du variant de Pc, et du réseau de cassettes ;
- comparé toutes les souches entre elles par *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD) afin de d'étudier leur clonalité ;
- étudié l'environnement génétique des intégrons

BY-NC-ND

Parallèlement, nous avons étudié l'expression de certains variants de Pc chez *A. baumannii* en comparaison à leur expression chez *E. coli*. Pour cela, nous avons construit un plasmide capable de se répliquer chez *E. coli* et chez *A. baumannii* en utilisant le plasmide pAL4000 (Figures 28 et 29).

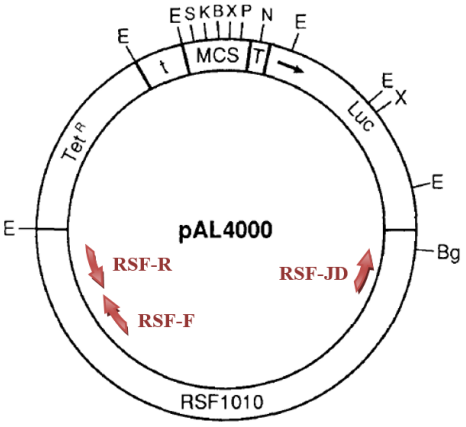


Figure 28 : représentation du vecteur de clonage pAL4000. K, P, E, B, Bg, S et X correspondent aux sites de restriction *Kpn*I, *Pst*I, *Eco*RI, *Bam*HI, *Bgl*II, *Sac*I et *Xba*I. Tet^R correspond au gène de résistance à la tétracycline *tetA*, RSF1010 est un réplicon qui peut se maintenir dans de nombreuses espèces, Luc correspond au gène de la luciférase *luc*, T est le fragment de terminaison de traduction, MCS est le polylinker de pUC19, t est le terminateur transcriptionnel. Les flèches rouges représentent schématiquement la localisation et le sens de fixation des amorces RSF-F, RSF-R et RSF-JD. (D'après Greener *et al.*, 1992)

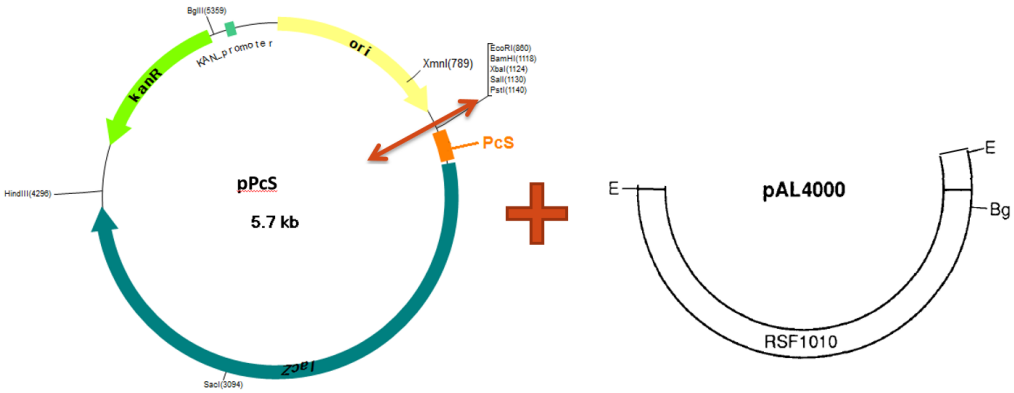


Figure 29 : Représentation schématique de la construction des vecteurs simples de notre étude. La flèche rouge indique l'ouverture par digestion *EcoR*1 du vecteur pPcS, dans lequel était inséré RSF1010.

BY-NC-ND

Au total nous avons déterminé 108 intégrons, pour lesquels nous avons pu caractériser 103 réseaux de cassettes. Parallèlement nous avons mis en évidence une grande variété génétique dans notre collection avec 52 profils d'isolats différents. Cette étude a confirmé que chez les souches de *A. baumannii* portant des IM1 cliniques, les variants forts de Pc étaient prédominants. Les réseaux de gènes de cassette retrouvés dans notre collection étaient peu variés et pour la majeure partie, déjà disponibles dans la GenBank. Le fait intéressant est que nous avons pu déterminer 5 réseaux de gènes de cassette jamais décrits chez *A. baumannii*. Les souches environnementales que nous avons étudiées présentaient des réseaux de cassettes déjà décrits chez des souches hospitalières. Nous avons aussi pu déterminer pour les souches analysées que tous les intégrons avaient une localisation chromosomique.

Concernant l'expression des Pc, nous avons montré qu'il existait une prédominance des promoteur Pc forts et principalement PcS dans les IM1 des isolats de *A. baumannii* cliniques et que chez *A. baumannii* leur expression est environ 2 à 4 fois plus faible que chez *E. coli* quel que soit le variant. Pour expliquer cette particularité, nous avons émis plusieurs hypothèses. La première était en relation avec les résultats sur l'activité plus faible des Pc chez *A. baumannii*, à savoir que la sélection des Pc forts serait favorisée par la pression de selection des antibiotiques en clinique, ceci afin de maintenir un niveau suffisant d'expression des gènes de résistance contenus dans le réseau de cassettes.

D'autres hypothèses pouvaient aussi être soulevées en relation avec la régulation de l'expression de l'intégrase. En effet, une intégrase active représente un coût biologique important pour la bactérie (Harms *et al.*, 2013; Starikova *et al.*, 2012). La régulation de son expression est donc importante. Chez *E. coli*, il a été montré dans notre laboratoire que le promoteur PintI1 des IM1 était réprimé par une interférence transcriptionnelle avec le promoteur fort PcS. Mais nous avons aussi montré que PintI1 était réprimé de façon constitutive par la protéine LexA et que la mise en jeu du système SOS libère le promoteur PintI1 par clivage de la protéine LexA entrainant l'expression de l'intégrase. Or *A. baumannii* est une espèce connue pour ne pas avoir de protéine LexA. Nous souhaitions étudier l'existence d'un système équivalent de répression de l'expression de l'intégrase chez *A. baumannii*.

BY-NC-ND

BY-NC-ND

Title: Antibiotic-resistance class 1 integron gene cassettes are weakly expressed in *Acinetobacter baumannii*

Elodie Couvé-Deacon[a], Thomas Jové[a], Pamela Afouda[a], Olivier Barraud[a], Valentin Tilloy[a], Erwan Scaon[b], Bastien Hervé[b], Christophe Burucoa[c], Marie Kempf[d], Javier Yugueros Marcos[e], Marie-Cécile Ploy#[a] and Fabien Garnier#[a].

Université Limoges, INSERM, CHU Limoges, UMR 1092, Limoges, France[a] ; Université de Limoges, cellule bioinformatique, plateforme biologie intégrative santé chimie environnement, 87000 Limoges, France[b]; CHU de Poitiers, Laboratoire de Bactériologie, Hôpital La Milétrie, Poitiers, France[c]; CRCINA, Inserm, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France[d]; Medical Diagnostic Discovery Department, bioMérieux S.A., Grenoble[e].

Running head : Integron cassette promoter are weak in *A. baumannii*

Address correspondence to Fabien Garnier or Marie-Cécile Ploy: fabien.garnier@unilim.fr or marie-cecile.ploy@unilim.fr
CHU Limoges, Laboratory of Bacteriology-Virology-Hygiene
2 avenue Martin Luther King
87042 Limoges cedex, France
Phone: +33 5 55 05 61 66
Fax: +33 5 55 05 67 22

BY-NC-ND

Abstract: Multidrug-resistant (MDR) *Acinetobacter baumannii* is a WHO priority pathogen. Class 1 integrons have frequently been described in *A. baumannii*. Integrons are able to recruit resistance genes through integrase-driven recombination events that are regulated by the bacterial SOS response and require the repressor LexA. Integron genes are expressed from a common promoter, Pc, of which at least 5 predominant variants, classified from weak to strong, have been described. We characterized the integron content of 83 clinical and environmental *A. baumannii* strains and found a predominance of Pc variants described as strong in *E. coli*. The Pc expression level was 2 to 4 times lower in *A. baumannii* than in *E. coli*, and the diversity of the gene cassette array was low. Predominance of integrons with PcS in *A. baumannii* might have been selected to allow antibiotic resistance expression at a sufficient level, and could be associated with a lower biological cost, the $IntI1_{R32_N39}$ integrase associated with PcS being the less active. Furthermore, as *Acinetobacter* spp. lack the LexA repressor suggesting that the integrase is constitutively expressed, a transcriptional interference between PcS and PintI1 (as shown in *E.coli*) may limit the expression of the integrase and thus counterbalance the lack of LexA-driven integrase repression to prevent the cost of the integrase.

Importance: *Acinetobacter baumannii* has emerged over the past two decades as a cause of both nosocomial and community-acquired infections. Treatment of *Acinetobacter* infections is increasingly difficult, as these bacteria are intrinsically resistant to multiple antimicrobial agents. Class 1 integrons that play a major role in the dissemination of multidrug resistance among Gram-negative bacteria, have frequently been described in *A. baumannii*. They are genetic platforms that allow bacteria to capture and express gene cassettes. Different gene cassette promoter (Pc) variants of different strength have been previously described. This study underlines the predominance of so-called “strong” gene cassette promoter variants, mainly PcS, in *A. baumannii* and reveals a lower expression level than in *E. coli*. The integrons with PcS

BY-NC-ND

might have been selected to limit the integrase cost. This study shows that integrons need to be tightly regulated for an adaptive response designed to favour their maintenance.

Background

The genus *Acinetobacter*, and principally *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex, has emerged over the past two decades as a cause of both nosocomial and community-acquired infections (1). The WHO lists *A. baumannii* among critical antibiotic-resistant "priority pathogens" (http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/). Treatment of *Acinetobacter* infections is increasingly difficult, as these bacteria are intrinsically resistant to multiple antimicrobial agents and have a remarkable ability to adapt rapidly to environmental selection pressure, acquiring new resistance determinants through multiple mechanisms (2, 3). *A. baumannii* isolates resistant to all commonly used antimicrobials cause near-intractable infections (4). Most clinical isolates belong to two main clones, named GC1 and GC2, which are distributed worldwide (5, 6), but other lineages have emerged more recently (7). Clones GC1 and GC2 are often multidrug-resistant (5, 8, 9). They carry genes that encode resistance to antibiotics or heavy metals and are located in genomic resistance islands (10) named AbaR in GC1 and AbGRI1, AbGRI2 and AbGRI3 in GC2, with different chromosomal locations (11). AbaR and AbGRI1 are inserted in the *comM* gene encoding an ATPase (12, 13). AbGRI1, AbGRI2 and AbGRI3 have different structures and contain different resistance genes than AbaR. AbGRI2 and AbGRI3 are bounded by two copies of IS*26* (14, 15). AbaR contains a 16.3-kb backbone transposon (Tn*6019*) interrupted by a large composite transposon that contains a variable region comprising antibiotic resistance genes, including a class 1 integron, bounded by copies of Tn*6018* (16).

Integrons play a major role in the dissemination of multidrug resistance among Gram-negative

BY-NC-ND

bacteria, through their ability to capture and express resistance genes embedded within cassettes (17). A wide variety of gene cassettes encoding resistance to nearly all antibiotic families have been described (18). Integration and excision of gene cassettes are driven by the integron's integrase, through site-specific recombination (Figure 1). We have previously shown that the IntI1 integrase is regulated by the SOS response, which is a regulatory network controlled by the transcriptional repressor LexA (19). Several classes of integron have been described, based on the integrase amino acid sequence. Class 1 integrons predominate in clinical settings. Most clinical class 1 integrons comprise a 3'-conserved region that contains the genes *qacEΔ1* and *sul1* conferring resistance to quaternary ammonium compounds and sulfonamides, respectively (20, 21). Gene cassettes are composed of an open reading frame and a recombination site *att*C. They are usually promoterless and are expressed from a common promoter, Pc, located within the integrase gene sequence. Several Pc promoter variants of different strengths have been identified in class 1 integrons. The five most frequent are the strong variants PcS, PcH2 and PcW_{TGN-10}, and the weak variants PcH1 and PcW (22). A predominance of weak Pc variants has been reported in clinical *Escherichia coli* isolates (23, 24), poultry-meat *E. coli* strains (25) and wastewater *Enterobacteriaceae* (26).

Multidrug resistance in *A. baumannii* has been associated with class 1 integrons (27–32) but no data have been available on the Pc distribution in this species. Furthermore, *Acinetobacter* lacks the LexA repression system, suggesting that IntI1 might be constitutively expressed.

We thus examined the distribution and strength of class 1 integron Pc promoters in class 1 integron-containing *A. baumanni,* based on *in silico* and experimental analysis of clinical and environmental isolates. We characterized the integron content of the isolates and found a predominance of strong Pc variants. Interestingly, the Pc expression level was 2 to 4 times lower in *A. baumannii* than in *E. coli*, and the diversity of the gene cassette array was low.

BY-NC-ND

Materials and methods

Strains

We studied a collection of 83 class 1 integron-containing *A. baumannii* isolates of clinical (n=75) or environmental (n=8) origin (Table 1). We had access either to the strains (from French hospitals and Cameroonian hospital effluents) or to total DNA (bioMerieux DNA collection, 3 hospital strains and 3 hospital effluent strains).

Plasmid construction

To study the strength of Pc variants in *A. baumannii*, we constructed plasmids derived from those used by Jové *et al.* (22), into which we cloned an origin of replication allowing plamid replication in both *A. baumannii* and *E. coli* (Table 1). We used the reporter plasmid pSU38Δtot*lacZ* and three derived plasmids in which the Pc promoter was inserted in transcriptional fusion with the reporter gene *lacZ*. We inserted the replicon RSF1010, obtained by *Eco*R1 restriction of the pAL4000 vector (33), in the *Eco*R1 site of the different plasmids containing Pc variants, namely pPcS, pPcW and pPcW$_{TGN-10}$, to obtain pSU38Δtot*lacZ*RSF1010, pPcSRSF1010, pPcWRSF1010 and pPcW$_{TGN-10}$RSF1010 (Table 1). *A. baumannii* clinical strain CM148 and *E. coli* MG1656 were transformed with the recombinant plasmid.

The primers used in this study are listed in Table S1 (supplementary data)

DNA extraction

DNA was extracted for PCR and Sanger sequencing by using the QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN), following the manufacturer's instructions. DNA for next-generation sequencing (NGS) was extracted by using the SaMag™ Bacterial DNA extraction kit and the SaMag™-12 system (Sacace biothechnologies, Como, Italy).

Amplification methods

PCRs for Pc variant detection, gene cassette characterization and plasmid construction were

BY-NC-ND

122 performed using One Taq® Quick-load (Biolabs) in a final volume of 25 µL, with a 0.9 µM final
123 concentration of each primer, 12.5 µl of One Taq buffer and 1 µL of DNA extract. Amplification
124 took place in the following conditions: 30 s at 95°C for initial denaturation, 30 cycles of 30 s at
125 95°C for denaturation, 30 s at 55°C for annealing, 30 s per amplified 500 bp at 68°C for extention,
126 and a final 7-min extension step at 68°C.
127 *Purification of PCR products*
128 PCR products were analyzed by electrophoresis in 0.8% agarose gel in 0.5 × TBE-containing
129 Midori Green Advance DNA stain® (Nippon Europe Genetics GmbH, Düren, Germany). A UVP
130 gel documentation system was used for DNA band visualisation. Fragments of interest were
131 purified using Wizard® SV Gel and the PCR Clean Up System (Promega, Lyon, France).
132 *Strain typing*
133 The strains were compared by means of random amplified polymorphic DNA (RAPD) using
134 primers VL1 and AP4 (Table S1). PCRs were carried out in 25-µl reaction mixes comprising 12.5
135 µL of One Taq® Quick-load (Biolabs), 0.9 µM RAPD primer, and 2 µL of DNA extract. The
136 RAPD-PCR configuration was as follows: (i) initial denaturation (94 C for 5 min), followed by
137 initial annealing for 1 min at 32°C for VL1 and 40°C for AP4, (ii) 36 cycles of extension (68 C for
138 3 min), denaturation (94 C for 1 min), and annealing (temperature adapted to each primer pair, for
139 1 min), and (iii) a final extension step (68 C for 1 min). The RAPD-PCR reactions were performed
140 in a 2720 thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, United States). Bands were
141 interpreted visually.
142 *AbaR detection*
143 First, the *resX* gene belonging to the AbaR genomic island was sought by amplifying a specific
144 425-bp fragment with ResX-F and ResX-R. Then, to identify the location of the integron within
145 AbaR, the junction between the integron and *resX* was sought by using a forward primer located
146 in the last integron gene cassette and ResX-R. To confirm the AbaR location of the integron, we

BY-NC-ND

147 performed an amplification using this forward primer and Tn6018R, a reverse primer located in
148 Tn*6018*, downstream of the integron (Figure S1) (13).
149 *Sequencing*
150 Sanger sequencing PCRs were done using BigDye™ sequencing buffer (Applied Biosystems,
151 Foster City, California, United States), according to the manufacturer's recommendations. PCR
152 products were purified by gel filtration on Sephadex® G50 Superfine (Sigma-Aldrich). Sanger
153 sequencing was performed on an ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). The sequences thus
154 obtained were read with Chromas Lite software. Gene cassette sequences were compared to
155 available GenBank sequences by using BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/). The Pc variant
156 was identified by comparing the obtained sequences to reference sequences reported by Jové *et al.*
157 (22).
158 NGS was performed with Ion Proton™ technology (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette,
159 France) according to the manufacturer's instructions. Reads were assembled with MIRA
160 (mimicking intelligent read assembly) and SPAdes-3.5.0, using raw reads and reads after removal
161 of human reads. Then, the set of contigs was queried using blastn (version 2.5.0+) for the presence
162 of known 5' and 3' conserved sequences. The extremities of these elements were then used as
163 queries (blastn, version 2.5.0+) against custom databases (sequences were retrieved from the NCBI
164 nucleotide database with the Entrez search engine): *A. baumannii* chromosome, *A. baumannii*
165 plasmid. Blastn results were filtered and compiled with a custom script (blastn2spreadsheet.py).
166 *β-galactosidase assay*
167 β-galactosidase assay was performed with 0.5-ml aliquots of exponential-phase cultures (optical
168 density at 600 nm [OD_{600}] 0.6 to 0.8) as previously described (22). Experiments were done at least
169 five times for each strain. One-way ANOVA followed by *post hoc* Tukey HSD statistics were used
170 to determine the significance of differences in expression levels ($p < 0.01$).
171

BY-NC-ND

Results

In silico Pc variant distribution

Among 3747 class 1 integron sequences we recovered from NCBI on 13 October 2016, 1604 displayed a complete gene cassette array with an available Pc variant sequence. As previously shown by Jové *et al*. (22), the overall distribution was similar for the main Pc variants (PcS, PcH2, PcW_{TGN-10}, PcH1 and PcW) (Figure 2). When sorted according to the bacterial genus, we noted that integrons from *Acinetobacter* mainly harbored Pc known as "strong" in *E. coli*, notably PcS and PcW_{TNG-10}. The rare integrons with other Pc variants were present in non *baumannii* *Acinetobacter*.

In vivo Pc variant distribution

We used a collection of 83 clinical or environmental isolates from various geographic regions. We obtained 52 RAPD patterns, reflecting the genetic diversity of the isolates (Table 2). The diversity of the environmental isolates (8 profiles for 8 isolates) was higher than that of the clinical isolates (45 profiles for 75 isolates). All 83 strains had previously been screened for integrons and were known to carry at least one class 1 integron (personal data). We characterized the entire integron content of each isolate by PCR mapping with primer pair 36854/36855 or 5'CS/3'CS. We detected 108 class 1 integrons based on the sizes of the PCR products, representing between 1 and 3 integrons per isolate. Four isolates contained 3 integrons, 17 harbored 2 integrons, and 59 strains harbored 1 integron (Table 2). Three isolates (see Table 2) yielded no amplification product, suggesting that they harbored variations in the 3'-conserved segment (34–36).

The Pc variant distribution among the 108 class 1 integrons was analysed by PCR and sequencing of the Pc promoter region. Amplification was performed with primers Int4b and DORF11 for the isolates containing 1 integron and with Int4b and a primer located in the first cassette of the network for the isolates with 2 or 3 integrons. We found that 98.2% of the integrons (106 of 108)

BY-NC-ND

197 contained a strong Pc variant, namely PcS (85.2%, n=92), PcW_{TGN-10} (7.4%, n=8), $PcH2_{TGN-10}$
198 (4.6%, n=5) or PcH2 (0.9%, n=1) (Table 3). The proportion of “strong” Pc variants in *A.*
199 *baumannii* was even higher *in vivo* (98.2%) than *in silico* (73.3%). The predominance of these Pc
200 variants was not linked to predominant clones (Table 2).
201 *Evaluation of Pc strength in A. baumannii*
202 The predominance of Pc variants described as "strong" in *E. coli* led us to evaluate their strength
203 in *A. baumannii*. We constructed 4 plasmids able to replicate in both *E.coli* and *A.baumannii*: 3
204 with different Pc variants in transcriptional fusion with the reporter gene *lacZ,* and a control
205 plasmid without the Pc region (Table 1). Surprisingly, we found that the expression levels of all
206 the Pc variants were 2 to 4 times weaker in *A. baumannii* than in *E. coli* ($p<0.01$; Figure 3). This
207 difference in expression levels was not due to difference in growth rates or plasmid copy numbers.
208 Indeed, we found a similar plasmid copy number in the two species (data not shown) with the
209 different plasmid constructs. These so-called “strong” Pc variants are thus weakly expressed in *A.*
210 *baumannii.*
211 *Gene cassette contents*
212 Sequencing of the PCR products obtained with primer pair 36854/36855 or 5’CS/3’CS showed
213 that all the gene cassettes we detected had been already described in Genbank and were composed
214 of 11 different resistance genes and 18 different gene cassette arrays (Table 2). The majority
215 (90.5%) of the gene cassettes coded for aminoglycoside resistance, and at least 1 or 2 of these gene
216 cassettes were found in 15 (83.3%) of the 18 arrays. The arrays often comprised 2 gene cassettes
217 encoding proteins of unknown function (gcuP and gcuQ). We identified 5 arrays that had not
218 previously been described in *A. baumannii* (*aacA4+aadA1*, *aacA4+catB8+orfP+orfQ+aadA1*,
219 *aacA4+orfP+orfQ+aadA1*, *aadA12*, *dfrA1*). The array *aacA4+aadA1* had previously been
220 described in *Pseudomonas aeruginosa* (Genbank accession number FN823039). The *aadA12* gene
221 cassette had previously been found alone in an integron of *E. coli* (Genbank accession number

BY-NC-ND

FJ381668), *Yersinia enterocolitica* (Genbank accession number AY940491), and *Salmonella typhimurium* (Genbank accession number FJ460240). The *dfrA1* gene cassette had previously been found alone in *A. baumannii*, but only in a class 2 integron (Genbank accession number FJ785526). The gene cassette arrays *aacA4+catB8+orfP+orfQ+aadA1* and *aacA4+orfP+orfQ+aadA1* had not previously been described.

The most frequent arrays were *aacC1+orfP+orfQ+aadA1* and *aacC1*. Eight combinations of gene cassettes were identified only once (Table 2).

Genetic environment of the integrons

As multidrug resistance in *A. baumannii* is often linked to chromosomal multiresistance genomic islands frequently containing class 1 integrons, we characterized the genetic environment of the class 1 integrons. We focused on one strain per RAPD profile, except for profile B, for which we selected two isolates as we found two different gene cassette array combinations. A total of 53 isolates and 66 integrons were analyzed. With an amplification strategy targeting the *resX* gene (belonging to the AbaR genomic island) and the junction sequence (see Materials and Methods), we found that 27 integrons were embedded within an AbaR island (Table 2). Regarding the integrons that were not detected with the specific PCR, NGS analysis showed that 26 integrons were also located on the chromosome. For 12 integrons, we were unable to perform NGS, as we had only DNA samples, in insufficient quantities. Overall, we found a chromosomal location for at least 80.0% (n=53/66) of the integrons in our strain selection.

Discussion

Acinetobacter baumannii resistance has been previously linked to class 1 integrons (27–32). However, when we began this study, no data were available on the Pc variant distribution in clinical

BY-NC-ND

246 and environmental strains. Interestingly, using both *in silico* and *in vivo* data, we found a large
247 proportion of so-called strong Pc variants in the class 1 integrons of *A. baumannii*.
248 Specific features of PcS and *A. baumannii* could explain these findings. First, we found that all
249 these Pc variants were weaker in *A. baumannii* than in *E. coli*. Integrons with PcS might have been
250 selected to allow *A. baumanni* to express antibiotic resistance at a sufficient level. A lower
251 expression of different genes has already been reported in *A. baumannii* versus *E. coli*. Expression
252 of the *catA* gene in *E. coli,* under the control of a *lac* promoter, was found to be two-fold higher
253 than in *A. calcoaceticus* (37). Likewise, expression of the *pca* gene cluster in *E. coli* was 10- to
254 30-fold higher than in *A. calcoaceticus* (38). More recently, Girlich *et al.* reported that the
255 transcription level of the bla_{KPC} gene (encoding resistance to beta-lactams) was 10 to 100 times
256 lower in *A. baumannii* than in *E. coli* but, interestingly, the resistance phenotypes did not correlate
257 with the transcription level (39). There is some evidence that inter-species differences in the Pc
258 expression level could be due to differences in the transcriptional machinery. The *A. baumannii*
259 RNA polymerase has a similar structure (40) and 50 to 70% amino acid sequence homology when
260 compared to its *E. coli* counterpart, with good conservation of functional regions (41). Despite
261 this, the two RNA polymerases behave differently *in vitro*, the *A. baumannii* enzyme being less
262 efficient than its *E. coli* counterpart (40). Moreover, the *A. baumannii* and *E. coli* transcriptional
263 σ^{70} factor amino acid sequences are very similar, with good conservation of functional regions (41,
264 42). Nevertheless, alternative σ factors are missing in *A. baumannii*, suggesting different
265 regulation of transcription relative to *E. coli* (41). Furthermore, to our knowledge, there is no -35
266 and -10 sequence consensus of *A. baumannii* but some data suggest variations from the promoter
267 sequence consensus of *E.coli*, notably in the spacer region (43, 44). Such a different promoter
268 consensus could influence both the transcription level and the resistance phenotype, as reported
269 by Girlich *et al.* (39).

BY-NC-ND

Second, the selection of PcS in *A. baumannii* could be associated with a lower biological cost. In *E. coli*, the class 1 integron integrase is regulated via the SOS response, which involves the LexA repressor, via a LexA binding site overlapping the *intI1* promoter PintI1 (19). Morover, the Pc promoter being located within the *intI1* sequence in *E.coli*, different Pc variants actually correlate with amino acid changes in the IntI1 sequence and the integrase variant $IntI1_{R32_N39}$ corresponding to the PcS promoter has the lowest efficiency (22). We recently showed in *E. coli* that the SOS response prevents the expression of costly integrases whose cost is activity dependent. The lowest cost was observed with the integron encoding $IntI1_{R32_N39}$ integrase (associated with PcS) (45). It has been shown in *Acinetobacter baylyi* harboring an integron with a PcS variant, that frameshift mutations rapidly emerge to inactivate the IntI1 protein and to restore host fitness (46, 47).

Third, another mechanism regulating integrase expression in *E. coli* depends on transcriptional interference between PcS and PintI1, PcS preventing *intI1* expression (48). *Acinetobacter* spp. lack the LexA repressor, suggesting that the integrase is constitutively expressed. If this transcriptional interference also occurs in *A. baumannnii,* the observed predominance of PcS may limit the expression of the integrase via this transcriptional interference and thus counterbalance the lack of LexA-driven integrase repression to prevent the cost of the integrase. Altogether, these data obtained in *E. coli* and *Acinetobacter* suggest that integrons need to be tightly regulated for an adaptive response designed to lower their cost and thereby to favour their maintenance.

The predominance of a poorly efficient integrase in *A. baumannii* ($IntI1_{R32_N39}$ associated with PcS) would lead to limited movement of gene cassettes and thus confer higher stability of gene cassettes within the array. This is in line with what we observed in the integron gene cassette arrays of our *A. baumannii* collection. Indeed, we found a redundancy of gene cassette arrays, with 5 arrays representing 75.2% (n=79) of all characterized integrons (n=105). This

BY-NC-ND

redundancy of gene cassette arrays was not due to clonal distribution of our isolates, as we found no identical RAPD profiles for strains with identical arrays (Table 2). All the environmental isolates in our collection had different RAPD profiles, which were also all different from those of the clinical isolates. The environmental and clinical isolates shared the two most frequent gene cassette arrays (*aacC1+orfP+orfQ+aadA1 and aacC1*), which accounted for 54.6% (n=6/11) of the environmental integrons and 60.6% (n=57/94) of the clinical integrons (Table 2). It should be noted that the environmental isolates were obtained from hospital wastewater and can thus be considered to have been influenced by antibiotic selection pressure. Aminoglycoside-modifying enzymes have been linked to class 1 integrons in *A. baumannii* (8, 49, 50). Likewise, most of the gene cassette arrays (94.3%) in our study harbored at least one aminoglycoside resistance gene cassette (*aacC1*, 66.7%, *aadA1*, 50.5% and *aacA4*, 14.3%) (Table 2). The array containing two aminoglycoside resistance genes (*aacC1-orfP-(orfP-Q)orfQ-aadA1*) is frequently found in *A. baumannii* class 1 integrons (8, 16, 51–54).

A. baumannii integrons are often found on the chromosome, usually within resistance islands (14, 49, 55–60). All the integrons in our collection were found on the chromosome too. We found that some integrons were located in an AbaR island. However, a large number of repeated sequences limited the length of the contigs we obtained with Ion Proton™ technology, and the short contigs were too small to analyze the whole resistance island in all integrons.

Conclusion

This study underlines the predominance of so-called strong Pcs in *A. baumannii* and reveals a lower expression level than in *E. coli*. The integrons with PcS might have been selected to limit the integrase cost. The regulation of both the integrase and Pc expression needs to be further investigated in *A. baumannii*, as is already the case for *E. coli* (22, 49).

BY-NC-ND

Funding: this work was funded by Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) and by Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherce (MENESR).

Acknowledgements: We thank Thierry Lambert for the kind gift of *A. baumannii* CM148. We thank Mathilde Camiade for her help with gene cassette array characterization and Nassima Illikoud for her help with plasmid construction.We also thank Romain Philippe and Stephanie Durand for their help with bioinformatics.

Transparency declaration: the authors declare no conflict of interest regarding this work

Reference :

1. Peleg AY, Seifert H, Paterson DL. 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. Clin Microbiol Rev. 21(3):538–82.
2. Paton R, Miles RS, Hood J, Amyes SG, Miles RS, Amyes SG. 1993. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int J Antimicrob Agents. 2(2):81–7.
3. Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. 2010. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 65(2):233–8.
4. Leite GC, Oliveira MS, Perdigão-Neto LV, Rocha CKD, Guimarães T, Rizek C, Levin AS, Costa SF. 2016. Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. PloS One. 11(3):e0151270.
5. Dijkshoorn L, Aucken H, Gerner-Smidt P, Janssen P, Kaufmann ME, Garaizar J, Ursing J, Pitt TL. 1996. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. J Clin Microbiol. 34(6):1519–25.
6. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PloS One. 5(4):e10034.
7. Zarrilli R, Pournaras S, Giannouli M, Tsakris A. 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. Int J Antimicrob Agents.41(1):11–9.

BY-NC-ND

8. Nemec A, Dolzani L, Brisse S, van den Broek P, Dijkshoorn L. 2004. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. J Med Microbiol. 53(Pt 12):1233–40.

9. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, Ecker DJ, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Thomson JM, Rather PN, Craft DW, Fishbain JT, Ewell AJ, Jacobs MR, Paterson DL, Bonomo RA. 2006. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrob Agents Chemother. 50(12):4114–23.

10. Blackwell GA, Hamidian M, Hall RM. 2016. IncM Plasmid R1215 Is the Source of Chromosomally Located Regions Containing Multiple Antibiotic Resistance Genes in the Globally Disseminated *Acinetobacter baumannii* GC1 and GC2 Clones. mSphere. 1(3).

11. Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, Benard MF, Jacobs MR, Bonomo RA, Adams MD. 2014. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. mBio. 5(1):e00963-00913.

12. Fournier P-E, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie J-M. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet. 2(1):e7.

13. Krizova L, Dijkshoorn L, Nemec A. 2011. Diversity and evolution of AbaR genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I. Antimicrob Agents Chemother. 55(7):3201–6.

14. Nigro SJ, Farrugia DN, Paulsen IT, Hall RM. 2013. A novel family of genomic resistance islands, AbGRI2, contributing to aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates belonging to global clone 2. J Antimicrob Chemother. 68(3):554–7.

15. Blackwell GA, Nigro SJ, Hall RM. 2015. Evolution of AbGRI2-0, the Progenitor of the AbGRI2 Resistance Island in Global Clone 2 of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 60(3):1421–9.

16. Post V, White PA, Hall RM. 2010. Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Antimicrob Chemother. 65(6):1162–70.

17. Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. 2015. The Integron: Adaptation On Demand. Microbiol Spectr. 3(2):MDNA3-0019-2014.

18. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol Rev. 33(4):757–84.

19. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S, Gonzalez-Zorn B, Barbé J, Ploy M-C, Mazel D. 2009. The SOS response controls integron recombination. Science. 324(5930):1034.

BY-NC-ND

20. Paulsen IT, Littlejohn TG, Rådström P, Sundström L, Sköld O, Swedberg G, Skurray RA. 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. Antimicrob Agents Chemother. 37(4):761–8.

21. Stokes HW, Hall RM. 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol Microbiol. 3(12):1669–83.

22. Jové T, Da Re S, Denis F, Mazel D, Ploy M-C. 2010. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. PLoS Genet. 6(1):e1000793.

23. Vinué L, Jové T, Torres C, Ploy M-C. 2011. Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical *Escherichia coli* strains and description of a new P2 promoter variant. Int J Antimicrob Agents. 38(6):526–9.

24. Wei Q, Jiang X, Li M, Li G, Hu Q, Lu H, Chen G, Zhou Y, Lu Y. 2013. Diversity of gene cassette promoter variants of class 1 integrons in uropathogenic *Escherichia coli*. Curr Microbiol. 67(5):543–9.

25. Soufi L, Sáenz Y, Vinué L, Abbassi MS, Hammami S, Torres C. 2013. Characterization of Pc promoter variants of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from poultry meat. Foodborne Pathog Dis. 10(12):1075–7.

26. Moura A, Jové T, Ploy M-C, Henriques I, Correia A. 2012. Diversity of gene cassette promoters in class 1 integrons from wastewater environments. Appl Environ Microbiol. 78(15):5413–6.

27. Gonzalez G, Sossa K, Bello H, Dominguez M, Mella S, Zemelman R. 1998. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. FEMS Microbiol Lett. 161(1):125–8.

28. Ploy MC, Denis F, Courvalin P, Lambert T. 2000. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. Antimicrob Agents Chemother. 44(10):2684–8.

29. Asadollahi K, Taherikalani M, Maleki A, Alizadeh E, Valadbaigi H, Soroush S, Maleki H, Asadollahi P, Emaneini M. 2011. Diversity of aminoglycoside modifying enzyme genes among multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes isolated from nosocomial infections in Tehran hospitals and their association with class 1 integrons. Acta Microbiol Immunol Hung. 58(4):359–70.

30. Poonsuk K, Tribuddharat C, Chuanchuen R. 2012. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical isolates. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 43(2):376–84.

31. Zhong Q, Xu W, Wu Y, Xu H. 2012. Clonal spread of carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in a teaching hospital in China. Ann Lab Med. 32(6):413–9.

32. Deylam Salehi M, Ferdosi-Shahandashti E, Yahyapour Y, Khafri S, Pournajaf A, Rajabnia R. 2017. Integron-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Isolated from Intensive Care Unit Patients, Babol, North of Iran. BioMed Res Int. 2017:7157923.

BY-NC-ND

429 33. Greener A, Lehman SM, Helinski DR. 1992. Promoters of the broad host range plasmid
430 RK2: analysis of transcription (initiation) in five species of gram-negative bacteria.
431 Genetics. 130(1):27–36.

432 34. Antunes P, Machado J, Peixe L. 2007. Dissemination of sul3-containing elements linked
433 to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella*
434 isolates. Antimicrob Agents Chemother. 51(4):1545–8.

435 35. Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW, Hall RM. 2001. Family of Class 1 Integrons
436 Related to In4 from Tn1696. Antimicrob Agents Chemother. 45(11):3014–20.

437 36. Hall RM, Brown HJ, Brookes DE, Stokes HW. 1994. Integrons found in different locations
438 have identical 5' ends but variable 3' ends. J Bacteriol. 176(20):6286–94.

439 37. Neidle EL, Shapiro MK, Ornston LN. 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of
440 *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation. J Bacteriol. 169(12):5496–
441 503.

442 38. Doten RC, Ngai KL, Mitchell DJ, Ornston LN. 1987. Cloning and genetic organization of
443 the *pca* gene cluster from *Acinetobacter calcoaceticus*. J Bacteriol. 169(7):3168–74.

444 39. Girlich D, Bonnin RA, Jousset A, Naas T. 2017. Promoter characterization and expression
445 of the *blaKPC-2* gene in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter*
446 *baumannii*. J Antimicrob Chemother. 72(6):1597–601.

447 40. Kleppe RK, Kleppe K. 1976. Preparations and properties of ribonucleic acid polymerase
448 from *Acinetobacter calcoaceticus*. J Bacteriol. 125(2):435–43.

449 41. Robinson A, Brzoska AJ, Turner KM, Withers R, Harry EJ, Lewis PJ, Dixon N.E. Essential
450 Biological Processes of an Emerging Pathogen: DNA Replication, Transcription, and Cell
451 Division in *Acinetobacter* spp. Microbiol Mol Biol Rev. 2010 Jun;74(2):273–97.

452 42. Casella LG, Weiss A, Pérez-Rueda E, Antonio Ibarra J, Shaw LN. Towards the complete
453 proteinaceous regulome of *Acinetobacter baumannii*. Microb Genomics. 2017
454 Mar;3(3):mgen000107.

455 43. Kishan V, Hillen W. 1990. Molecular cloning, nucleotide sequence, and promoter structure
456 of the *Acinetobacter calcoaceticus trpFB* operon. J Bacteriol. 172(10):6151–5.

457 44. Segal H, Elisha BG. 1999. Characterization of the *Acinetobacter* plasmid, pRAY, and the
458 identification of regulatory sequences upstream of an *aadB* gene cassette on this plasmid.
459 Plasmid. 42(1):60–6.

460 45. Lacotte Y, Ploy M-C, Raherison S. 2017. Class 1 integrons are low-cost structures in
461 *Escherichia coli*. ISME J. 11(7):1535–44.

462 46. Harms K, Starikova I, Johnsen PJ. 2013. Costly Class-1 integrons and the domestication
463 of the the functional integrase. Mob Genet Elem. 3(2):e24774.

464 47. Starikova I, Harms K, Haugen P, Lunde TTM, Primicerio R, Samuelsen Ø, Nielsen KM,
465 Johnsen PJ. 2012. A trade-off between the fitness cost of functional integrases and long-
466 term stability of integrons. PLoS Pathog. 8(11):e1003043.

BY-NC-ND

48. Guérin E, Jové T, Tabesse A, Mazel D, Ploy M-C. 2011. High-level gene cassette transcription prevents integrase expression in class 1 integrons. J Bacteriol. 193(20):5675–82.

49. Seward RJ, Lambert T, Towner KJ. 1998. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. J Med Microbiol. 47(5):455–62.

50. Sarhaddi N, Soleimanpour S, Farsiani H, Mosavat A, Dolatabadi S, Salimizand H, Amel Jamehdar S. 2017. Elevated prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* with extensive genetic diversity in the largest burn centre of northeast Iran. J Glob Antimicrob Resist. 8:60–6.

51. Nigro SJ, Post V, Hall RM. 2011. Aminoglycoside resistance in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to global clone 2 from Australian hospitals. J Antimicrob Chemother. 66(7):1504–9.

52. Valenzuela JK, Thomas L, Partridge SR, van der Reijden T, Dijkshoorn L, Iredell J. 2007. Horizontal gene transfer in a polyclonal outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J Clin Microbiol. 45(2):453–60.

53. Liu C-C, Tang CY, Chang K-C, Kuo H-Y, Liou M-L. 2014. A comparative study of class 1 integrons in *Acinetobacter baumannii*. Gene. 544(1):75–82.

54. Koczura R, Przyszlakowska B, Mokracka J, Kaznowski A. 2014. Class 1 integrons and antibiotic resistance of clinical *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in Poznań, Poland. Curr Microbiol. 69(3):258–62.

55. Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. 2003. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. J Clin Microbiol. 41(8):3542–7.

56. Nigro SJ, Hall RM. 2012. Antibiotic resistance islands in A320 (RUH134), the reference strain for *Acinetobacter baumannii* global clone 2. J Antimicrob Chemother. 67(2):335–8.

57. Huang H, Yang Z-L, Wu X-M, Wang Y, Liu Y-J, Luo H, Lv X, Gan Y-R, Song S-D, Gao F. 2012. Complete genome sequence of *Acinetobacter baumannii* MDR-TJ and insights into its mechanism of antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother. 67(12):2825–32.

58. Martinez T, Martinez I, Vazquez GJ, Aquino EE, Robledo IE. 2016. Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. J Med Microbiol. 65(8):784–92.

59. Lee Y, D'Souza R, Yong D, Lee K. 2016. Prediction of Putative Resistance Islands in a Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Global Clone 2 Clinical Isolate. Ann Lab Med. 36(4):320–4.

60. Liu SY, Lin JY, Chu C, Su LH, Lin TY, Chiu CH. 2006. Integron-associated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* isolated from a regional hospital in Taiwan. Int J Antimicrob Agents. 27(1):81–4.

BY-NC-ND

Tables and Figures

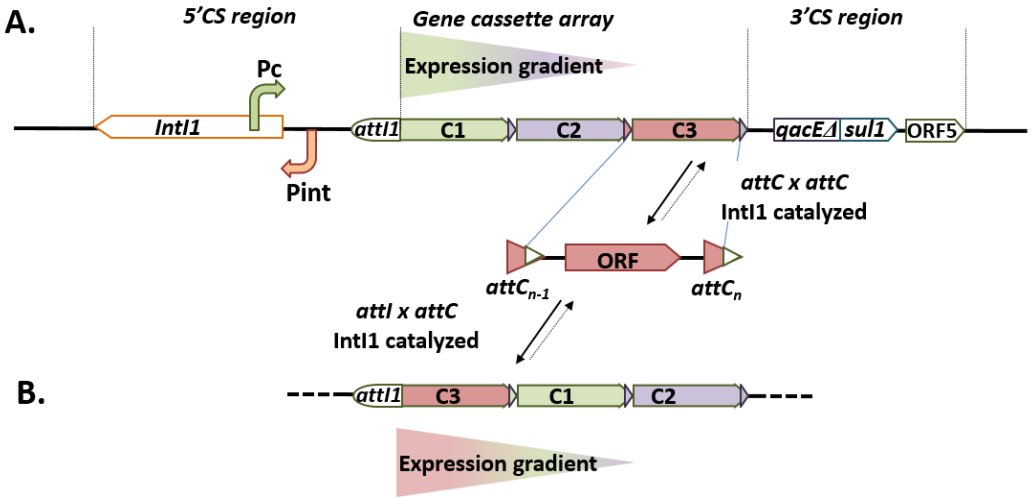


Figure 1: **Organization of class 1 integrons**. **A.** Structure of a class 1 integron, the gene cassette array consists of expressed cassette with a gradient of expression from the Pc, indicated by the fading fill color. Cassettes are an open reading frame (ORF) generally without promoter and flanked by two recombinations site *att*C. Cassettes can be excised throught *attC* × *attC* recombination from any position in the array, catalyzed by the integrase. Pc, cassette promoter; Pint, integrase promoter; *intI1*, class 1 integron integrase gene; *attI1*, *attC*$_n$ and *attC*$_{n-1}$, recombinaison sites; C1, C2 and C3, gene cassettes. The 3'CS region of the majority of clinical class 1 integrons contains *qacΔE1*, *sul1* and an open reading frame *ORF5* of unknown function (20, 21). **B.** The excision intermediate can thus be integrated by the integrase, preferentially at the recombination site *attI*. Exogenous intermediates can also be integrated, owing to the low specificity of the integrase activity, rendering the system prone to horizontal transfer.

BY-NC-ND

Strain or plasmid	Description	Reference or source
Strains		
A. baumannii Collection	75 clinical strains and 8 environmental strains	This study See table 2
MG1656	Derivative of *E. coli* K12 MG1655 with *lacZ* deletion	(19)
CM148	Clinical competent *A. baumannii* strain	Kind gift from Thierry Lambert
Plasmids		
pAL4000	Contains an RSF1010 replicon active in *E. coli* and *Acinetobacter*	Greener et al. 1992
pSU38Δtot*lacZ*	pSU38 derivate carrying *lacZ* coding sequence with no translation initiation region or promoter	(22)
pPcW	pSU38Δtot*lacZ* derivate carrying PcW in transcriptional fusion with *lacZ*	(22)
pPcS	pSU38Δtot*lacZ* derivate carrying PcS in transcriptional fusion with *lacZ*	(22)
$pPcW_{TGN-10}$	pSU38Δtot*lacZ* derivate carrying PcW_{TGN-10} in transcriptional fusion with *lacZ*	(22)
pSU38Δtot*lacZ*RSF1010	Insertion of RSF1010 in *EcoR*1 in pSU38Δtot*lacZ*	This study
pPcWRSF1010	Insertion of RSF1010 in *EcoR*1 in pPcW	This study
pPcSRSF1010	Insertion of RSF1010 in *EcoR*1 in pPcS	This study
$pPcW_{TGN-10}$RSF1010	Insertion of RSF1010 in *EcoR*1 in $pPcW_{TGN-10}$	This study

Table 1: **Bacterial strains and plasmids used in the study**

BY-NC-ND

type of isolates	material	RAPD profile	Pc variant	gene cassette array*	Localization**
clinical	strain	M	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	strain	M	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	Chromosomal
			PcS	*aacC1*	Chromosomal
clinical	strain	M	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	strain	M	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	strain	M	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	total DNA	A05	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	-
clinical	total DNA	A06	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	E	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	E	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	
clinical	total DNA	E	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	
clinical	total DNA	A07	PcS	*aadB+blaOXA-21*	AbaR
clinical	total DNA	F	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	G	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	F	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	
clinical	total DNA	G	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	
clinical	total DNA	H	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	H	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	
clinical	total DNA	A08	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	F	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	
clinical	total DNA	F	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	
clinical	total DNA	I	PcS	*aacA4*	AbaR
clinical	total DNA	I	PcS	*aacA4*	
clinical	total DNA	I	PcS	*aacA4*	
clinical	total DNA	A40	PcS	*aadB*	AbaR
clinical	total DNA	A09	PcS	*aacA4*	-
clinical	total DNA	A10	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	J	PcS	*aadB*	AbaR
clinical	total DNA	K	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	A11	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	J	PcS	*aadB*	
clinical	total DNA	J	PcS	*aadB*	
clinical	total DNA	J	PcS	*aadB*	
clinical	total DNA	J	PcS	*aadB*	
clinical	total DNA	J	PcS	*aadB*	
clinical	total DNA	A12	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	A13	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	A14	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	A15	PcS	*aacA4*	AbaR
clinical	total DNA	A16	PcS	*aacC1+orfP+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	A17	PcS	-	-
clinical	total DNA	A18	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	A19	PcS	-	-
clinical	total DNA	A20	PcWTGN-10	*aacA4*	AbaR
clinical	total DNA	A21	PcH2TGN-10	*aacA4+aadA1*	AbaR
clinical	total DNA	A22	PcH2TGN-10	*aacA4+catB8+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR

BY-NC-ND

clinical	total DNA	K	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	
clinical	total DNA	A23	PcS	-	-
clinical	total DNA	A24	PcS	*aadA1*	-
environmental	strain	A25	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	Chromosomal
			PcH2	*aacA4+catB8+aadA1*	Chromosomal
environmental	strain	A26	PcWTGN-10	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	Chromosomal
environmental	total DNA	A27	PcWTGN-10	*dfrA5*	-
environmental	total DNA	A38	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	-
environmental	strain	A29	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	AbaR
environmental	total DNA	A30	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+aadA1*	-
environmental	strain	A31	PcH2TGN-10	*aacA4+orfP+orfQ+aadA1*	Chromosomal
			PcH2TGN-10	*aacA4+catB8+aadA1*	Chromosomal
			PcS	*aacC1*	Chromosomal
environmental	strain	A32	PcWTGN-10	*dfrA1*	Chromosomal
clinical	strain	B	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	Chromosomal
			PcS	*aacC1*	Chromosomal
clinical	strain	B	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	Chromosomal
			PcS	*dfrA1-orfP*	Chromosomal
			PcS	*aadA12*	Chromosomal
clinical	strain	B	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	strain	C	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	Chromosomal
			PcS	*aacC1*	Chromosomal
clinical	strain	D	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	Chromosomal
			PcS	*aacC1*	Chromosomal
clinical	strain	D	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	strain	D	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	strain	D	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	strain	B	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	strain	C	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	strain	D	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	strain	C	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	
			PcS	*aacC1*	
clinical	strain	A01	PcS	*aacA4*	AbaR
clinical	total DNA	A02	PcS	*aacC1+orfP+orfQ+orfQ+aadA1*	-
clinical	total DNA	A03	PcW + P2	*blaIMP-10+aacA31+aadA1*	-
clinical	total DNA	A04	PcW	*blaIMP-10+aacA31+aadA1*	-
clinical	strain	A33	PcS	*aacC1*	Chromosomal
clinical	strain	A34	PcS	*aacA4*	AbaR
clinical	strain	A35	PcS	*aadA1*	Chromosomal
			PcWTGN-10	*dfrA1+orfP*	Chromosomal
			PcS	*aacC1*	Chromosomal
clinical	strain	A36	PcWTGN-10	*dfrA1+orfP*	Chromosomal
clinical	strain	A37	PcS	*aacC1*	Chromosomal
clinical	strain	A38	PcS	*aacA4*	AbaR

BY-NC-ND

clinical	strain	A39	PcS	*aadA1*	Chromosomal
			PcWTGN-10	*dfrA1+orfP*	AbaR
			PcS	*aacC1*	Chromosomal
clinical	strain	L	PcS	*aacC1*	Chromosomal
clinical	strain	L	PcS	*aacC1*	
clinical	strain	L	PcS	*aacC1*	
clinical	strain	L	PcS	*aacC1*	

Table 2: **Summary of our study results**. *PCR of the gene cassette array were realized using primers 36854/36855 or 5'CS/3'CS, « - » means negative PCR; **Localization was determined by specific PCR (AbaR) or NGS (Chromosomal), « - » means that AbaR specific PCR was negative but we had not enough DNA to perform the NGS analysis.

BY-NC-ND

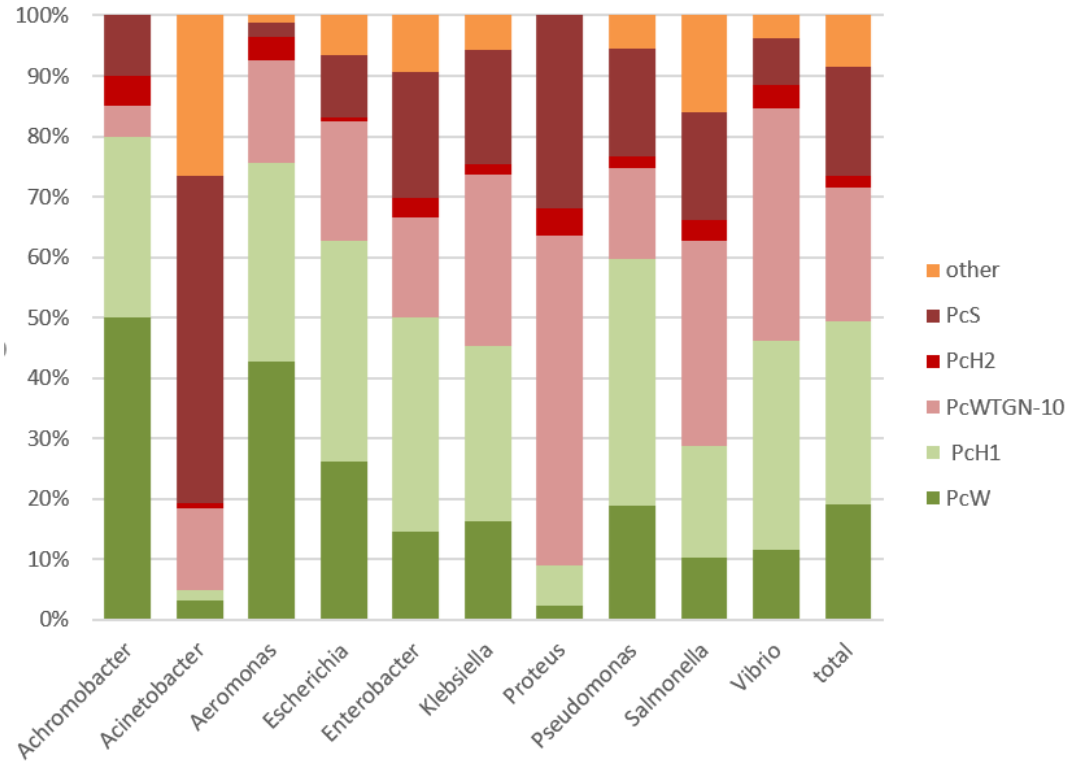


Figure 2: **Distribution of the Pc variants according to the host**. Each bar represents the Pc variant distribution in the different class 1 integrons with a Pc sequence available in the 10 most frequent mobile integron hosts: total of different intégrons sequences (n=1604), *Acinetobacter* (n=124), *Pseudomonas* (n=340), *Escherichia* (n=435), *Klebsiella* (n=263), *Salmonella* (n=174), *Enterobacter* (n=96), *Aeromonas* (n=82), *Achromobacter* (n=20), *Proteus* (n=44) and *Vibrio* (n=26).

Pc variant	**Number**	**Percent**
PcS	92	85.2%
PcW_{TGN-10}	8	7.4%
$PcH2_{TGN-10}$	5	4.6%
PcW	2	1.8%
PcH2	1	0.9%
total	108	100%

Table 3: **Distribution of the Pc variants in the class 1 integrons.**

BY-NC-ND

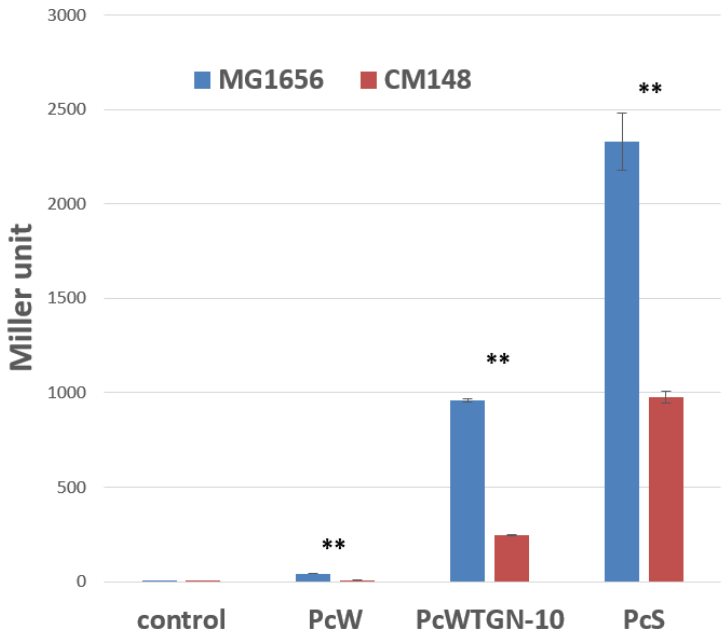


Figure 3: **Expression of the Pc variants.** ß-galactosidase activity was measured in *E. coli* MG1656 (in blue) and *A. baumannii* CM148 (in red). The bars represent the activity of the Pc variant for each construction transformed. The ** indicates statistical significant difference with $p<0.01$. T-: pSU38Δtot*lacZ*RSF1010, PcW: pPcWRSF1010, PcWTGN-10: pPcW$_{TGN-10}$RSF1010 and PcS: pPcSRSF1010.

BY-NC-ND

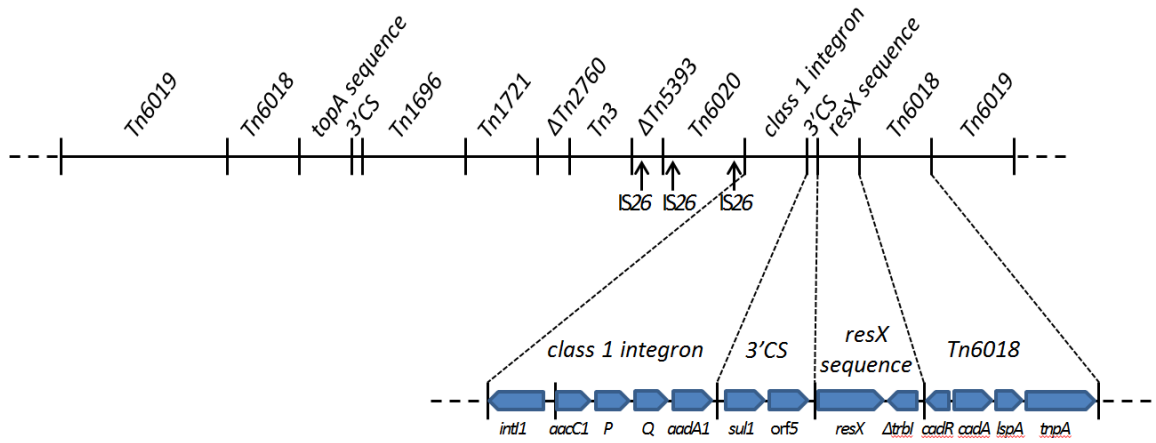
547 **Supplementary material**

n°	Primer name	5'-3' sequence	Target gene or location	References
		RAPD Typing		
1	VL1	GAGGGTGGNGGNTCT		This study
2	AP4	TCACGCTGCA		This study
		Cassettes PCR and sequencing		
3	gcuP-L	TTGAGGGAGATGCGGTTATC	*gcuP*	This study
4	gcuP-R	TGTGAAGAGCGAAACACCTG	*gcuP*	This study
5	gcuQ-L	AACATCGCCATATTCCTTGC	*gcuQ*	This study
6	gcuQ-R	AATAGGCCCGAGCAGTATGA	*gcuQ*	This study
7	aadB-L	GAGGCGATCATCTGGGATTA	*aadB*	This study
8	blaImp1-L	TTGGAGACGCATCACTCTTG	*blaImp*	This study
9	aac(6')-Ib-L	GAGGCAAGGTACCGTAACCA	*aac(6')-Ib*	This study
10	aadA6-R	CAAGGCAACGCTATGTTCTC	*aadA1*	This study
11	aacc1-L	TGGCTCTCTATACAAAGT	*aacC1*	This study
12	36854	GGCATCCAAGCAGCAAGCGCGTTA	*attI*	(61)
13	36855	AAGCAGACTTGACCTGATAGTTTG	*qacEΔ1*	(61)
14	5'CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	*attI*	(62)
15	3'CS	AAGCAGACTTGACCTGA	*qacEΔ1*	(62)
		Cassette promoter PCR and sequencing		
16	Int4b	CGCGGATCCACACCGTGGAAACGGATGAAGG	*intI1*	(22)
17	DORF11	CGCGGATCCATCGTTGCTGCTCCATAACA	attI site	(22)
18	catB8-R	CCAGTTCCACCACTCCATCT	*catb8*	This study
19	aacc1R	ACTTCTTCCCGTATGCCCAA	*aacC1*	This study
20	aac(6')IbR	CATAGAGCATCGCAAGGTCA	*aac(6')Ib*	This study
21		**Junction PCR and sequencing**		
22	aacA4-L	GAGGCAAGGTACCGTAACCA	*aacA4*	This study
23	dfrA5-L	GTTACTCGCTCAGCCTGGAC	*dfrA5*	This study
24	dfrA1-F	GTCGCTACCATTACCAGTTG	*dfrA1*	This study
25	aacc1-R	ACTTCTTCCCGTATGCCCAA	*aacc1*	This study
26	aadA1-L	CACCAAGGTAGTCGGCAAAT	*aadA1*	This study
27	Resx-F	GCTTGCAGATCGACGCGCT	*resX*	(13)
28	Resx-R	CATCAGGGCCTTTGCCCGT	*resX*	(13)
31	CADA-R	CAATCAATGCGACGAATGCGA	Tn*6018*	(13)
	Plasmid construction			
32	dxsA L	GACACCAAGCATACCCACAT	*A. baumannii dxs*	This study
33	dxsA R	GCACCATCACCCACAATACA	*A. baumannii dxs*	This study
34	dxs L LC3	ATGACGTGGCGATTCAAAA	*E. coli dxs*	This study
35	dxs R LC4	AGCCGGTATAGAGCATCTGG	*E. coli dxs*	This study
36	lacZ LC4	AAATATGATGAAAACGGCAACC	*lacZ*	(48)

BY-NC-ND

37	lacZ LC5	CGGATAAACGGAACTGGAAA	*lacZ*	(48)
38	LacZ500-3	CGTCTGGCCTTCCTGTAGCC	*lacZ*	This study
39	RSF-JD	AAATGAGGCGGTCACGCT	RSF1010	This study
40	RSF-F	AAGGAAATCGGGGCAGAG	RSF1010	This study
41	RSF-R	CCAGACATAGCCGCACAA	RSF1010	This study
44	MRV-D2	TTCTGCTGACGCACCGGTG	ori p15A	(61)

548 Table S1: **Primers used in this study**



549

550 **Figure S1**: **AbAR3 genomic island structure from *A. baumannii* global clone 1** defined by

551 Krizova *et al.* and Post and Hall, showing *resX* gene and Tn*6018* transposon position near the

552 class 1 integron (13, 16).

553

554 **Supplementary data references**

555 61. Barraud O, Ploy M-C. 2015. Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements
556 Selected under Antibiotic Pressure. J Bacteriol. 197(13):2171–8.

557 62. Bissonnette L, Roy PH. 1992. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid
558 pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-
559 negative bacteria. J Bacteriol. 174(4):1248–57.

BY-NC-ND

Données complémentaires :

Réseau	**nombre**	**Résistances théoriques conférées**	**réferences**
aacC1	25	Gentamicine, sisomicine, fortimicine	(Ramirez et Tolmasky, 2010)
aacC1+*orfP*+orfQ+*aadA1*	18	Gentamicine, sisomicine, fortimicine, spectinomycine, streptomycine	(Ramirez et Tolmasky, 2010)
aacC1+*orfP*+*orfP*+*orfQ*+*aadA1*	14	Gentamicine, sisomicine, fortimicine, spectinomycine, streptomycine	(Ramirez et Tolmasky, 2010)
aacC1+*orfP*+*orfQ*+*orfQ*+*aadA1*	12	Gentamicine, sisomicine, fortimicine, spectinomycine, streptomycine	(Ramirez et Tolmasky, 2010)
aacA4	10	Amikacine, kanamycine, nétilmicine, isomicine, tobramycine	(Tolmasky, 2000)
aadB	7	Gentamicine, tobramycine, dibekacine, sisomicine, kanamycine	(Ramirez et Tolmasky, 2010)
dfrA1+*orfP*	4	Trimethoprime	(Fling et Richards, 1983; Simonsen *et al.*, 1983)
aadA1	3	Spectinomycine, streptomycine	(Ramirez and Tolmasky, 2010)
aacA4+*catB8*+*aadA1*	2	Amikacine, kanamycine, nétilmicine, isomicine, tobramycine, chloramphénicol, spectinomycine, streptomycine	(Ramirez et Tolmasky, 2010; Schwarz *et al.*, 2004; Tolmasky, 2000)
bla_{IMP-10}+*aacA31*+*aadA1*	2	Aztreonam, ampicilline, amoxicillin-ac. clavulanique, ceftazidime, pipéracilline, pipéracilline-tazobactam, ticarcilline, ticarcilline- ac. clavulanique, céfépime, imipénème, meropeneme, gentamicine, tobramycine, kanamycine, amikacine, neomycine, netilmicine, sisomicine, isepamicine, spectinomycine, streptomycine	(Mendes *et al.*, 2007; Ramirez et Tolmasky, 2010)
aacC1+*orfP*+*orfQ*+*orfP*+*orfQ*+*aadA1*	1	Gentamicine, sisomicine, fortimicine, spectinomycine, streptomycine	(Ramirez et Tolmasky, 2010)
aadB+bla_{OXA-21}	1	Gentamicine, tobramycine, dibekacine, sisomicine, kanamycine, carbapénèmes	(Ramirez et Tolmasky, 2010; Yamamoto *et al.*, 2011)

BY-NC-ND

dfrA5	1	Trimethoprime	(Salimizand *et al.*, 2016)
aacA4+aadA1	1	Amikacine, kanamycine, netilmmicine, isomicine, tobramycine, spectinomycine, streptomycine	(Ramirez et Tolmasky, 2010; Tolmasky, 2000)
aacA4+catB8+orfP+orfQ+aadA1	1	Amikacine, kanamycine, netilmmicine, isomicine, tobramycine, chloramphénicol, spectinomycine, streptomycine	(Ramirez et Tolmasky, 2010; Schwarz *et al.*, 2004; Tolmasky, 2000)
aacA4+orfP+orfQ+aadA1	1	Amikacine, kanamycine, netilmmicine, isomicine, tobramycine, spectinomycine, streptomycine	(Ramirez et Tolmasky, 2010; Tolmasky, 2000)
dfrA1	1	Triméthoprime	(Fling et Richards, 1983; Simonsen *et al.*, 1983)
aadA12	1	Spectinomycine, streptomycine	(Ramirez et Tolmasky, 2010)
Total	105		

Tableau 6 : résistances théoriques conférées par les différents réseaux de cassettes identifiés dans la collection de 83 isolats de *A. baumannii* hébergeant un IM1.

BY-NC-ND

BY-NC-ND

Partie 2 : axe fondamental : étude de la régulation des intégrons de classe 1 chez *A. baumannii*

Dans notre première étude, nous avons montré la prédominance du variant PcS du promoteur des cassettes chez les IM1 détectés chez *A. baumannii.*

Dans la deuxième partie de ce travail, nous avons axé notre étude sur l'analyse de la régulation de l'expression des cassettes et de l'intégrase des IM1 à l'aide d'un système permettant d'étudier les deux expressions chez *A. baumannii* et *E. coli*.

Chez *E. coli*, en culture planctonique, il a été montré que l'intégrase était régulée par différentes voies, par la réponse SOS réprimant l'expression de PintI1 mais aussi par un mécanismes d'interférence transcriptionnelle entre PcS et PintI1.

Nous avons donc construit des plasmides recombinants se répliquant à la fois chez *E. coli* et chez *A. baumannii* comportant des fusions transcriptionnelles permettant d'étudier :

- Pc en fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur *lacZ*
- PintI1 en fusion transcriptionnelle avec le gène rapporteur *uidA*.

Ces constructions ont été faites avec différents variants de Pc, fort ou faible. Afin de pouvoir individualiser la participation de chaque paramètre dans la régulation nous avons aussi construit des vecteurs avec des mutations inactivant le Pc, le Pint, le site de fixation pour lexA et la combinaison Pc et site de fixation pour LexA, cette dernière construction permettant d'individualiser la participation du Pint sans répression.

BY-NC-ND

1.1. Matériel et méthodes

Nous avons utilisé des plasmides déjà construits au laboratoire, utilisés pour les études de la régulation chez *E. coli* (Guérin *et al.*, 2011; Jové *et al.*, 2010) mais dont l'origine de réplication, ori p15A, ne permet pas la réplication chez *Acinetobacter*. Pour cela, une origine active chez *Acinetobacter*, l'oriA du vecteur pWH1266, a été insérée dans les plasmides recombinants.

1.1.1. Souches bactériennes et plasmides

Les souches bactériennes et plasmides que nous avons utilisées sont listés dans le Tableau 7. Les souches étaient cultivées en milieu LB (Lysogeny Broth) supplémenté lorsque nécessaire par de la kanamycine (Km) à la concentration finale de 25 µg/ml ou par de la tétracycline (Te) à 20 µg/ml.

Souche ou plasmide	Description	Référence ou source
A. Souches		
MG1656	dérivé *lacZ*- de la souche *E. coli* K12 MG1655	Espeli O 2001
CM152	Souche clinique de *A. baumannii*, n'hébergeant pas d'IM1 et dont PCR *lexA*, *lacZ, uidA* sont négatives	Aimablement donnée par T. Lambert
B. Plasmides		
pWH1266	Vecteur qui contient une origine, oriA, capable de se répliquer chez *E. coli* et *A. baumannii*	N° ATCC : 077092 Hunger *et al.*, 1990 (Figure 30)
pSU38Δtot*lacZ*_Δtot*uidA*	Plasmide de 7,3 Kb, dérivé du pSU38Δtot*lacZ* dans lequel a été clonée la séquence du gène rapporteur *uidA* en addition au gène *lacZ*, sans promoteur	Guérin *et al.*, 2011
pSU38Δtot*lacZ*_Δtot*uidA*oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pSU38Δtot*lacZ*Δ_tot*uidA*, utilisé comme plasmide contrôle	Cette étude (Figure 32)
pPcSPintI1	*lacZ* est en fusion transcriptionnelle avec PcS, *uidA est* en fusion transcriptionnelle avec Pint1 dans pSU38Δtot*lacZ*Δtot*uidA*	Guérin *et al.*, 2011 (Figure 31)
pPcWPintI1	*lacZ* est en fusion transcriptionnelle avec PcW, *uidA* est en fusion transcriptionnelle avec Pint1 dans pSU38Δtot*lacZ*Δtot*uidA*	Guérin *et al.*, 2011
pPcW$_{TGN-10}$PintI1	Création de PcW$_{TGN-10}$ par mutation de PcS dans pPcSPintI1	Jové *et al.*, 2010
pPcSPintIoriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcSPintI1	Cette étude (Figure 32)

BY-NC-ND

Souche ou plasmide	Description	Référence ou source
pPcWPintI1oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcWPintI1	Cette étude
pPcW$_{TGN-10}$PintI1oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcW$_{TGN-10}$PintI1	Cette étude
pPcS*PintI1	pPcSPintI1 muté pour inactiver PcS	Guérin *et al.*, 2011
pPcW*PintI1	pPcWPintI1 muté pour inactiver PcW	Guérin *et al.*, 2011
pPcW$_{TGN-10}$*PintI1	pPcW$_{TGN-10}$PintI1 muté pour inactiver PcW$_{TGN-10}$	Guérin *et al.*, 2011
pPcS*PintI1oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcS*PintI1	Cette étude
pPcW*PintI1oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcW*PintI1	Cette étude
pPcW$_{TGN-10}$*PintI1oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcW$_{TGN-10}$*PintI1	Cette étude
pPcSPintI1*	pPcSPintI1 muté pour inactiver PintI1	Guérin *et al.*, 2011
pPcWPintI1*	pPcWPintI1 muté pour inactiver PintI1	Guérin *et al.*, 2011
pPcW$_{TGN-10}$PintI1*	pPcW$_{TGN-10}$PintI1 muté pour inactiver PintI1	Cette étude
pPcSPintI1*oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcSPintI1*	Cette étude
pPcWPintI1*oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcWPintI1*	Cette étude
pPcW$_{TGN-10}$PintI1*oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcW$_{TGN-10}$PintI1*	Cette étude
pPcSPintI1lexA*	pPcSPintI1 muté pour inactiver le site de fixation pour LexA	Guérin *et al.*, 2011
pPcWPintI1lexA*	pPcWPintI1 muté pour inactiver le site de fixation pour LexA	Guérin *et al.*, 2011
pPcW$_{TGN-10}$PintI1LexA*	pPcW$_{TGN-10}$PintI1 muté pour inactiver le site de fixation pour LexA	Guérin *et al.*, 2011
pPcSPintI1lexA* oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcSPintI1lexA*	Cette étude
pPcWPintI1lexA*oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcWPintI1lexA*	Cette étude
pPcW$_{TGN-10}$PintI1LexA*oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcW$_{TGN-10}$PintI1LexA*	Cette étude
pPcS*PintI1lexA*	pPcSPintI1 muté pour inactiver PcS et le site de fixation pour LexA	Guérin *et al.*, 2011
pPcW*PintI1lexA*	pPcWPintI1 muté pour inactiver PcW et le site de fixation pour LexA	Guérin *et al.*, 2011
pPcW$_{TGN-10}$*PintI1LexA*	pPcW$_{TGN-10}$PintI1 muté pour inactiver PcW$_{TGN-10}$ et le site de fixation pour LexA	Guérin *et al.*, 2011
pPcS*PintI1lexA*oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcS*PintI1lexA*	Cette étude
pPcW*PintI1lexA*oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcW*PintI1lexA*	Cette étude
pPcW$_{TGN-10}$*PintI1LexA*oriA	Insertion de l'oriA de pWH1266 en *Kpn*1 dans pPcW$_{TGN-10}$*PintI1LexA*	Cette étude

Tableau 7 : souches et plasmides utilisés dans ce travail.

BY-NC-ND

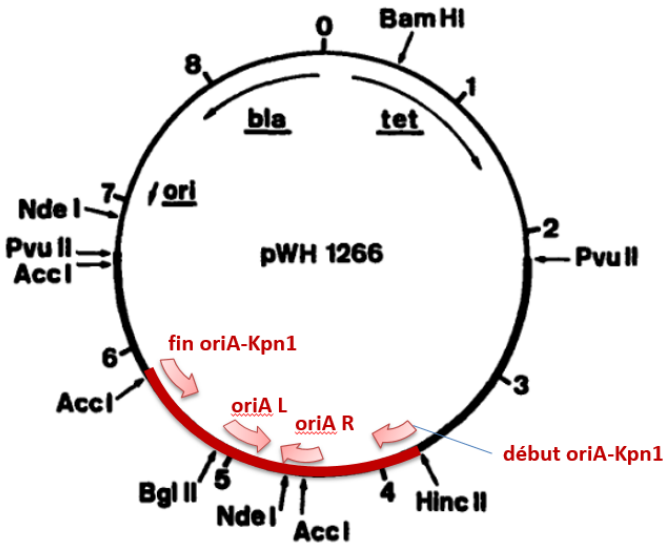


Figure 30 : Plasmide pWH1266. Les sites de restriction enzymatique sont indiqués par des flèches à côte du nom de l'enzyme. Il est le résultat de la fusion de deux plasmides : pWH1277 (en trait gras), plasmide cryptique de *Acinetobacter calcoaceticus* et pBR322 de *E. coli* (en trait fin). L'origine de réplication oriA est représentée par un trait épais rouge foncé compris entre les sites *Acc*1 et *Hinc*II. Les flèches roses représentent schématiquement la localisation et le sens de fixation des amorces fin oriA-*Kpn*1, début oriA-*Kpn*1, oriA L et oriA R. (d'après Hunger *et al.* 1989)

1.1.2. Les PCR

Toutes les amorces qui ont été utilisées au cours des différentes PCR sont regroupées dans le Tableau 8.

Les PCR et leur vérification par électrophorèse sur gel d'agarose ont été réalisées suivant les conditions présentées dans le chapitre 1 des résultats. Pour les PCR réalisées directement sur colonies bacteriennes, une dénaturation initiale à 95°C de 5 min a été réalisée. Lorsque les amplifications étaient spécifiques, si nécessaire, les 20 µl ou 45 µL de produits de PCR restant ont été purifiés. La qualité des amplifiats purifiés a été vérifiée sur gel et leur dosage réalisé à l'aide du Nanodrop.

BY-NC-ND

	Double construction			
1	*dxs*A L	GACACCAAGCATACCCACAT	*A. baumannii dxs*	Cette étude
2	*dxs*A R	GCACCATCACCCACAATACA	*A. baumannii dxs*	Cette étude
3	*dxs* L LC3	ATGACGTGGCGATTCAAAA	*E. coli dxs*	Cette étude
4	*dxs* R LC4	AGCCGGTATAGAGCATCTGG	*E. coli dxs*	Cette étude
5	*lacZ* LC4	AAATATGATGAAAACGGCAACC	*lacZ*	Guérin *et al.*, 2011
6	*lacZ* LC5	CGGATAAACGGAACTGGAAA	*lacZ*	Guérin *et al.*, 2011
7	*uidA* L1	GACGCTCACACCGATACCA	*uidA*	Guérin *et al.*, 2011
8	*uidA* R2	TCGGCTGATGCAGTTTCTC	*uidA*	Guérin *et al.*, 2011
9	oriAL	CCAATGTCTGTAACTCAATCTGC	pWH1266 oriA	Cette étude
10	oriAR	GTCGGTCGCTTTCGCATC	pWH1266 oriA	Cette étude
11	début oriA – *Kpn*1	CGGGGTACCGATCGTAGAAATATCTATG ATTATCTTG	Extrémité 5' de oriA	Cette étude
12	fin oriA – *Kpn*1	CGGGGTACCGGATTTTAACATTTTGCGTT GTTCCAAAAG	Extrémité 3' de oriA	Cette étude
13	MRV-D2	TTCTGCTGACGCACCGGTG	ori p15A	Barraud ***et*** Ploy, 2015

Tableau 8 : Amorces utilisées dans ce travail.

1.1.3. Digestions

Les digestions ont été réalisées à partir de 50 à 500 ng d'ADN plasmidique, selon les conditions préconisées pour les enzymes de restriction NEB (BioLabs)

Lorsqu'une déphosphorylation était nécessaire, celle-ci était réalisée après incubation du mélange réactionnel de digestion, par adjonction de 10 U de Phosphatase Alkaline (CIP) (BioLabs) et le nouveau mélange réactionnel était incubé au bain-marie à 37°C pendant 1 heure.

1.1.4. Purification des digestions enzymatiques et des produits de PCR

Des digestions étaient purifiées directement lorsque la digestion était complète ou après séparation par migration sur gel d'agarose puis découpage de la bande d'intérêt si nécessaire, à l'aide du kit Wizard® SV Gel et PCR Clean Up System (Promega, Lyon, France).

BY-NC-ND

1.1.5. Clonages

1.1.5.1. Préparation des inserts et des vecteurs pour le clonage

L'origine de réplication oriA (1343 pb) du vecteur pWH1266 a été amplifiée avec les amorces 11 et 12, comportant des sites de restriction *Kpn*I. Le fragment amplifié a été purifié puis digéré par *Kpn*I. Les vecteurs étaient ouverts par digestion par *Kpn*I (figure …), site de restriction se trouvant dans le terminateur du gène *uidA*.

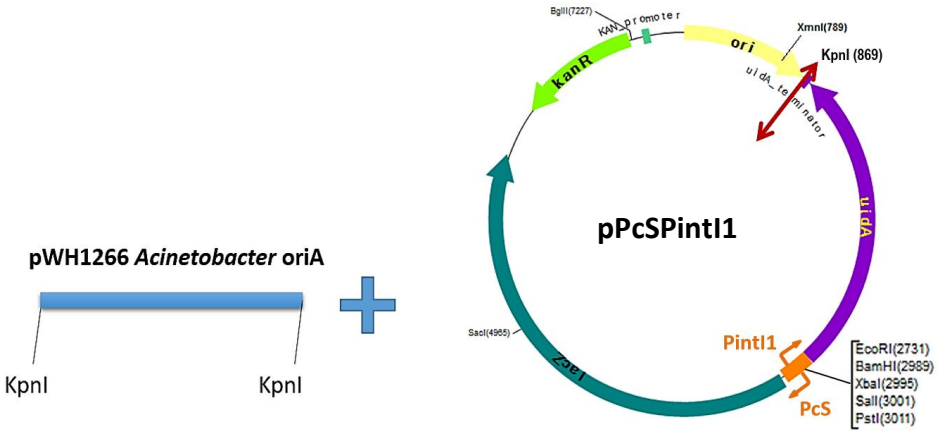


Figure 31 : Représentation schématique de la construction des vecteurs doubles de notre étude. La flèche rouge indique l'ouverture par digestion *Kpn*1 du vecteur pPcSPintI1, dans lequel était insérée oriA.

1.1.5.2. Ligatures plasmide-insert

Les fragments digérés et purifiés étaient mis en contact en présence de l'ADN ligase du bactériophage T4 (BioLabs) avec un rapport insert/plasmide de 1 pour 4 selon le protocole : T4 DNA ligase : 40 U, tampon ligase (10X) : 1 µl, plasmide digéré purifié : 5 ng, insert digéré déphosphorylé purifié : 20 ng, eau qsp 10 µl. Le mélange réactionnel était incubé une nuit à 4°C. la ligature était ensuite dialysée pendant 20 mn au moyen d'un filtre Millipore "V" Series Membranes (0,025 µm) selon la technique « drop dialysis », puis la transformation était réalisée.

BY-NC-ND

1.1.5.3. Transformation par électroporation

Pour les différentes constructions une transformation était réalisée dans un premier temps dans *E. coli* MG1656. Le plasmide recombinant alors obtenu était ensuite introduit dans *A. baumannii* CM152.

La totalité du mélange de ligature dialysé, soit 10 µl de plasmide, était ajouté à 35 µl de bactéries *E. coli* MG1656 ou *A. baumannii* CM152 compétentes. Une électroporation était ensuite réalisée au moyen d'un Electroporateur Electro Cell Manipulator® 630, BTX (VWR). Huit cents microlitres de LB réchauffé à température ambiante étaient ensuite ajoutés. L'ensemble était mis à 37°C sous agitation pendant 1 h.

1.1.5.4. Sélection des transformants

La totalité du mélange de transformation était étalée sur milieu gélosé LB additionné de l'antibiotique adéquat au plasmide transformé (200 µl par gélose). Les géloses étaient ensuite incubées pendant une nuit à 37°C.

1.1.5.5. PCR de contrôle des constructions.

Les constructions plasmidiques obtenues ont été vérifiées par PCR (les tailles attendues sont données entre parenthèse) :

- Présence de *uidA* à l'aide de *uidA*-L1 et *uidA*-R2 (151 pb)
- Présence de *lacZ* à l'aide de *lacZ*-LC4 et *lacZ*-LC5 (169 pb)
- Insertion de l'oriA à l'aide de oriA-R et oriA-L (223 pb)
- Vérification de la région promotrice à l'aide de Int4b et DORF11 (264 pb)
- Vérification des jonctions insert plasmide à l'aide de oriA-L et uidA-L1 (1200 pb), oriA-R et uidA-L1 (1240pb), oriA-L et MRV-D2 (960 pb) et oriA-R MRV-D2 : 840 pb

Les produits de PCR ont ensuite été séquencés.

BY-NC-ND

1.1.6. Extractions plasmidiques

Les plasmides utilisés étaient extraits à l'aide du kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) ou QIAprep® Spin Midiprep (Qiagen) puis conservés à -20°C.

1.1.7. Séquençage

Dans un premier temps, une PCR de séquence, à l'aide d'amorces forward, était réalisée dans un volume final de 10 µl comprenant les amorces à une concentration finale de 0,4µM, 2,5 µl de mélange Big Dye® version 1.1 (Applied Biosystems), qui contient l'ensemble des réactifs nécessaires à la réaction (polymérase, dNTP, ddNTP), 2,5 µl de tampon BigDye et 250 ng d'ADN plasmidique. Les conditions d'amplification étaient : 50 cycles de 10 s à 96°C, 5 s à 50°C, 4 mn à 60°C, puis 5 mn à 60°C. Les produits de la réaction de séquençage ont ensuite été purifiés au moyen du kit NucleoSEQ® (Macherey-Nagel), puis analysés dans un appareil d'électrophorèse capillaire ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems). Les séquences ont été analysées par le logiciel Chromas® puis comparées aux séquences de la base de données BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

1.1.8. Tests d'activité enzymatique de la β-galactosidase

Cinq millilitres de bouillon LB étaient inoculés et incubés une nuit à 37°C sous agitation. Les cultures d'une nuit étaient diluées au 1/100ème dans 10 ml de bouillon BHI et mises à incuber à 37°C sous agitation jusqu'à une densité optique à une longueur d'onde de 600 nm (DO600) de 0,6-0,8 (culture bactérienne en phase exponentielle). Le dosage était ensuite réalisé sur 0,5 ml de la culture bactérienne en phase exponentielle, comme décrit par Jové *et al.* (Jové *et al.*, 2010). Le substrat synthétique, l'ortho-nitro-phényl-galactoside (ONPG) incolore, de structure analogue au lactose était utilisé. En présence de la β-galactosidase, l'ONPG est clivé en formant du galactose et de l'ortho-nitro-phénol (ONP) de couleur jaune, la mesure de la réaction était faite par densité optique à une longueur d'onde de 420 nm (DO420). Le calcul de l'activité enzymatique reflète la force d'expression du promoteur étudié. L'essai était réalisé au minimum 5 fois pour chaque échantillon.

BY-NC-ND

1.1.9. Courbes de croissance

Nous avons vérifié la courbe de croissance de nos différentes constructions doubles dans les souches MG1656 et CM152. A partir de 5 millilitres de bouillon LB inoculés et incubés une nuit à 37°C sous agitation, nous avons réalisé des dilutions au 1/100ème dans 20 ml de bouillon BHI et mises à incuber à 37°C sous agitation. Des mesures à DO600 ont été réalisées, initialement puis à partir d'1h d'incubation, environ toutes les 15 min, jusqu'à 250 min.

1.1.10. Détermination du nombre de copies de plasmide

Nous avons déterminé par PCR en temps réel le nombre de copies de plasmide par bactérie par quantification directement à partir d'une suspension de bactérie. Pour chaque échantillon, nous avons quantifié le gène cible *lacZ* et le gène de ménage *dxs*. La PCR en temps réel était réalisée sur un appareil Mx3005P (Stratagene) dans un volume final de 25µL, en utilisant le PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix (Quanta Biosciences) et les amorces adaptées (pour *lacZ* : *lacZ* -LC4/*lacZ* -LC5 à une concentration finale de 0,4 µM, pour *dxsA* : *dxsA*-L et *dxsA*-R à une concentration finale de 0,6 µM et pour *dxs* : *dxs*-LC3 et *dxs*-LC4 à 0,5µM). Le mélange était soumis à 10 mn de dénaturation à 95°C, suivis de 40 cycles : 30 s à 95°C et 1 mn à 60°C. Le logiciel Data Analysis effectuait automatiquement le calcul des concentrations du gène cible *lacZ* et du gène de référence *dxs*. Nous avons déduit le nombre de copies de plasmide du rapport gène cible/gène de référence.

1.1.11. Quantification des transcrits

Une quantification des transcrits de *lacZ* et *uidA* normalisée par rapport aux transcrits des gènes de ménage *dxs* présent en une copie chez *E. coli* et *A. baumannii* a été réalisée par PCR en temps réel pour confirmer les résultats obtenus lors de la détermination de l'activité enzymatique de la béta-galactosidase. L'ARN total était préparé en utilisant le kit NucleoSpin® RNA (Macherey-Nagel) dans des conditions minimisant la dégradation d'ARN. L'ADN contaminant était éliminé de l'échantillon en réalisant un traitement par TURBO DNA-free™ (Ambion). Les cDNA étaient synthétisés en utilisant le PrimeScript RT Reagent Kit (Perfect Real

BY-NC-ND

Time) (TaKaRa) avec 500 ng d'ARN total traité par la DNase. La PCR en temps réel des cDNA était réalisée sur un appareil Mx3005P (Stratagene) dans un volume final de 20 µl, en utilisant le PerfeCTa® SYBR® Green SuperMix (Quanta Biosciences) et les oligonucleotides adaptés à la quantification réalisée. Nous avons utilisé pour la quantification des transcrits *lacZ* : *lacZ* -LC4 et *lacZ* -LC5, pour *uidA* : *uidA*-L1 et *uidA*-R2, pour dsx chez *E. coli* : *dxs*-L-LC3 et *dxs*-R-LC4 et pour *dxs* chez *A. baumannii* : *dxs*A-L et *dxs*A-R. Les amorces étaient utilisées à la concentration finale de 0,2 µM et les conditions d'amplification étaient les suivantes : 10 mn de dénaturation à 95°C, suivies de 40 cycles de : 30 s à 95°C, 1 mn à 60°C.

Cette méthode nécessitait l'établissement d'une droite standard à chaque manipulation. Cette droite-étalon nous servait à quantifier les concentrations des échantillons testés à partir d'échantillons standards, passés en même temps que les échantillons testés. Pour ce faire nous avons d'abord cloné à l'aide du pGEM®-T Easy (Promega) le gène *dxs,* de *A. baumannii* CM152, dans un vecteur de gamme que nous utilisions au laboratoire comportant déjà *lacZ* et *uidA*. Le plasmide construit était introduit par électroporation dans des *E. coli* DH5α compétentes selon le protocole décrit précédemment. Après dosage de l'ADN plasmidique extrait des clones recombinants, nous avons préparé des solutions à 10^9 copies/5µl, qui ont servi pour faire la gamme de plasmide en dilutions successives de 10^8 à 10^2.

1.2. Résultats

1.2.1. Modèle d'étude de l'activité des promoteurs Pc et PintI1 chez *A. baumannii*

Nous avons construit un modèle de comparaison de l'expression des promoteurs des cassettes Pc et de l'intégrase PintI1 chez *A. baumannii* et *E. coli*. Pour cela, nous avons utilisé des plasmides dérivés de pSU38Δtot*lacZ*Δ_tot*uidA*, construits par Guérin *et al.* (Guérin *et al.*, 2011), pour étudier la force des promoteurs Pc et PintI1 chez *E. coli.* Nous avons appelé ces constructions « doubles » car elles comportaient une région de 263 pb qui hébergeait les deux promoteurs Pc et PintI1 dans la même conformation que dans un IM1, en fusion transcriptionnelle avec les gènes rapporteurs *lacZ* et *uidA* respectivement. M. le Pr Thierry Lambert nous a donné une souche de *A. baumannii* clinique naturellement compétente : CM152. Nous n'avons pas utilisé la même origine de réplication que celle utilisée dans le

BY-NC-ND

travail de l'axe 1 (séquence de 9kb à partir du réplicon RSF1010) car nous n'avons jamais réussi à obtenir de plasmide recombinant. Nous avons alors émis l'hyphothèse que celui-ci était trop grand pour être manipulé facilement ou pour se maintenir dans la bactérie hôte. Nous avons donc recherché une origine de réplication plus courte, nous avons alors trouvé le vecteur pWH1266, possédant une origine de réplication oriA pour *A. baumannii* et *E. coli* de plus petite taille, environ 1300 pb. Afin que nos vecteurs d'étude puissent se maintenir chez *A. baumannii* et chez *E. coli*, l'origine de réplication oriA du vecteur pWH1266 (Hunger *et al.*, 1990) à été insérée dans le pSU38Δtot*lacZ*_Δtot*uidA* et ses dérivés contenant les variants de Pc : PcS, PcW_{TGN-10} et PcW. Nous avons obtenu les plasmides recombinants suivant : pPWPintI1oriA, $pPcW_{TGN-10}$PintI1oriA, pPcSPintI1oriA. Le plasmide pSU38Δtot*lacZ*Δ_tot*uidA*oriA sans Pc ni PintI1 nous a servi de témoin négatif (figure ...).

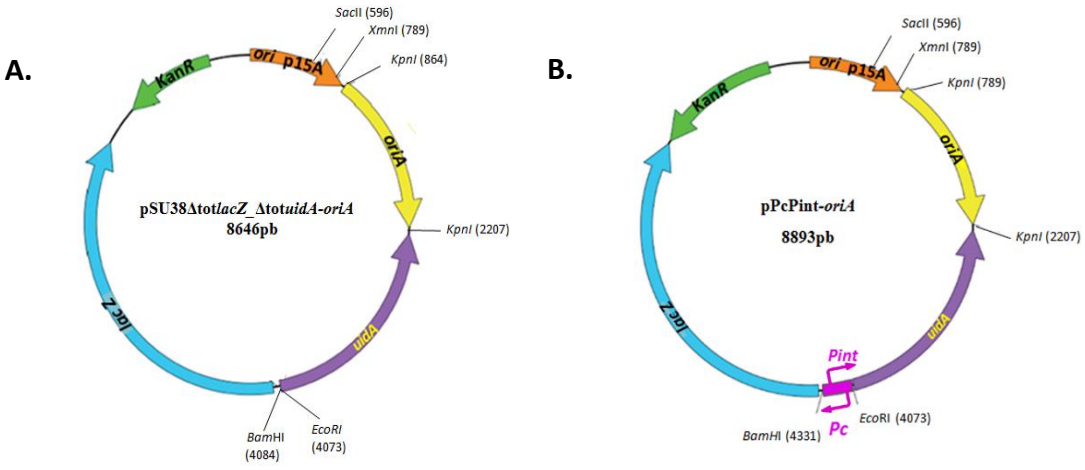


Figure 32 : Représentation schématique des constructions plasmidiques doubles réalisées. Les constructions ont été réalisées par clonage de oriA dans le terminateur du gène *uidA*, elles présentaient deux origines de réplication, *ori* p15A qui se réplique chez E. coli et oriA qui se réplique chez *A. baumannii* et *E. coli*. **A.** témoin négatif : plasmide pSU38Δtot*lacZ*_Δtot*uidA*oriA, la région hébergeant Pc et PintI1 était absente. **B.** plasmide pPcPintI1oriA : Pc-Pint, région promotrice avec Pc en fusion transcriptionnelle avec *lacZ* et PintI1 en fusion transcriptionnelle avec *uidA* ; KanR, gène de résistance à la kanamycine ; les principaux sites de restriction sont indiqués par un trait le reliant au nom de l'enzyme.

BY-NC-ND

1.2.2. Analyse par essais beta-galactosidase de la force des variants de Pc en présence de Pint.

Les souches de *E. coli* MG1656 et *A. baumannii* CM152 ont été transformées avec les différents plasmides recombinants. Des essais béta-galactosidase ont été réalisés pour évaluer la force des variants du promoteur Pc. Nous avons mis en évidence des expressions de promoteurs Pc 5 à 13 fois plus faibles (p<0,01) chez *A. baumamnnii* que chez *E. coli*, quel que soit le variant. Nous retrouvions aussi les mêmes différences de force relative entre les variants de Pc que chez *E. coli* (Figure 33).

Ces résultats étaient similaires à ceux trouvés dans la partie 1 sur la force des différents variants de Pc dans des vecteurs simples ne contenant que le promoteur Pc en fusion transcriptionnelle avec *lacZ*. Il semble donc que l'expression à partir de PintI1 n'a pas d'influence sur le promoteur Pc.

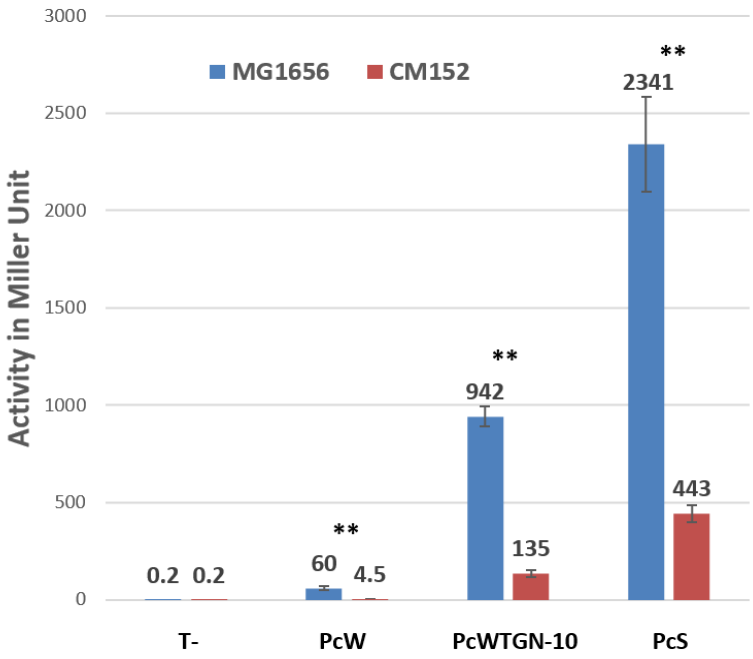


Figure 33 : Expression des variants de Pc en fonction de l'hôte. Les activités de bêta-galactosidase ont été mesurées chez *E. coli* MG1656 (en bleu) et *A. baumannii* CM152 (en rouge). Les barres représentent les activités des variants de Pc pour chaque construction transformée. ** indique les différences statistiquement significatives avec p<0.01. T- : pSU38Δtot*lacZ*Δ_tot*uidA*oriA, PcW : pPcWPintI1oriA, PcWTGN-10 : pPcW$_{TGN-10}$PintI1oriA, et PcS : pPcSPintI1oriA. Les barres d'erreurs indiquent les écarts types d'au moins cinq essais indépendants pour chaque plasmide.

BY-NC-ND

Nous avons donc ensuite étudié le niveau d'expression de Pc dans des constructions pour lesquelles PintI1 (pPcPintI1*oriA), le site de fixation de LexA (pPcPintI1lexA*oriA) et/ou Pc (pPc*PintI1oriA, pPc*PintI1LexA*) étaient mutés. Les résultats sont représentés Figure 34.

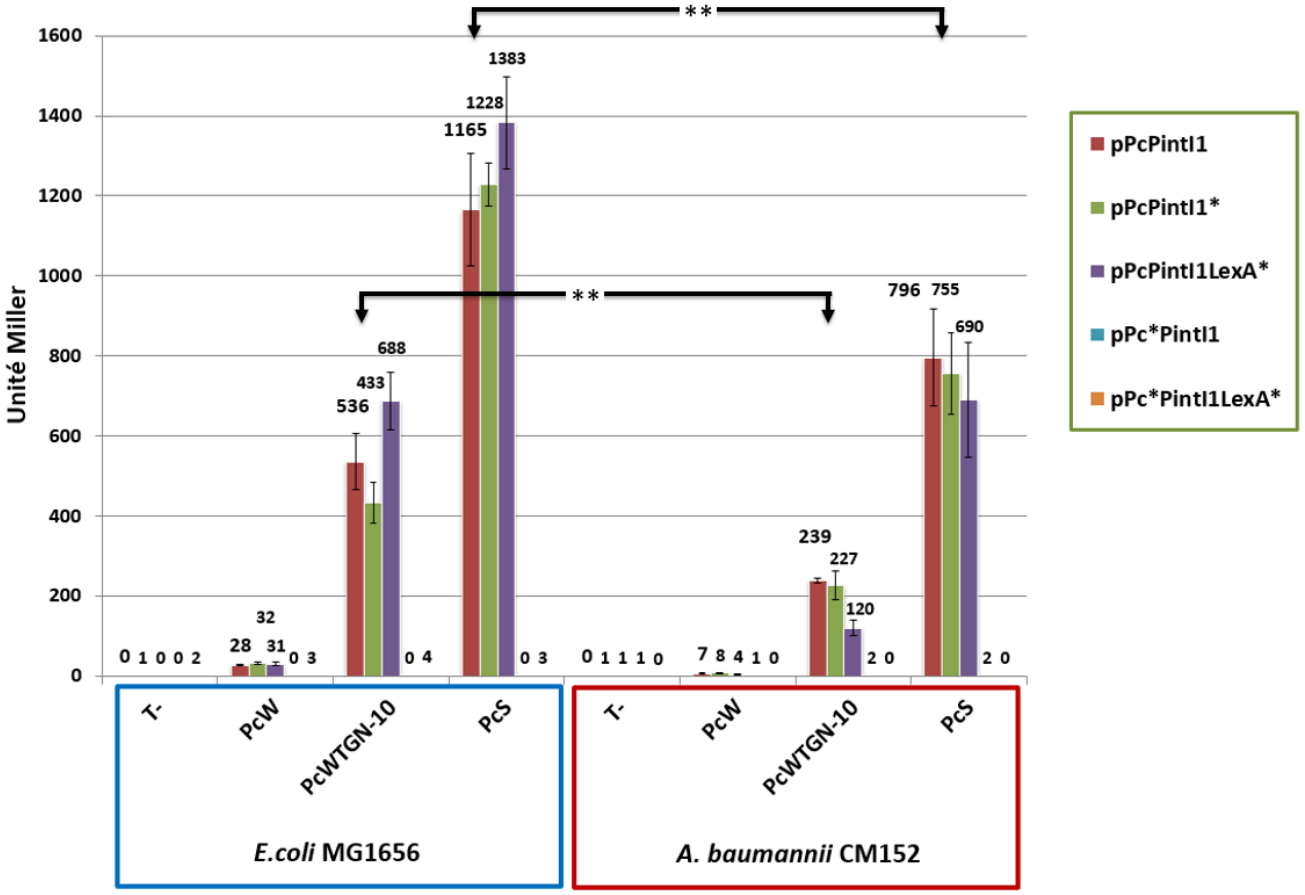


Figure 34 : Expression des variants de Pc en unité Miller en fonction de l'hôte et des panels mutés des constructions plasmidiques. Les barres représentent l'activité de Pc de chaque construction dans *E. coli* MG1656 (à gauche) et *A. baumannii* CM152 (à droite). ** indique les différences statistiquement significatives avec p<0.01. T- : pSU38Δtot*lacZ*Δ_tot*uidA*oriA, PcW : constructions doubles oriA et panels mutés avec le variant PcW, PcWTGN-10 : constructions doubles oriA et panels mutés avec le variant PcW_{TGN-10}, et PcS : constructions doubles oriA et panels mutés avec le variant PcS, pPcPintI1 (barres rouges) : constructions double sans mutation, pPcPintI1* (barres vertes) : panel avec le promoteur PintI1 muté, pPcPintI1LexA* (barres violettes) : panel avec le site de fixation pour LexA muté, pPc*PintI1 (barres bleues) : panel avec le promoteur Pc muté, pPc*PintI1LexA* (barres oranges) : panel avec Pc et le site de fixation pour LexA mutés. Les barres d'erreurs indiquent les écarts type d'au moins cinq essais indépendants pour chaque plasmide.

BY-NC-ND

Les résultats obtenus au cours des essais β-galactosidase, pour l'expression du Pc, montraient pour les panels dans lequel le Pc est muté (pPc*PintI1 et pPc*PintI1LexA*) une activité similaire à celle du témoin négatif. Pour les autres panels (pPcPintI1, pPcPintI1* et pPcPintILexA*), les activités pour chaque variants de Pc étaient similaires (différence statistique non significative) d'un panel à l'autre dans le même hôte.

Il est à noter que quelles que pour les panels pPcPintI1, pPcPintI1* et pPcPintILexA*, les différences de niveau d'expression des variants de Pc étaient toujours statistiquement significatives entre *E. coli* et *A. baumannii*. Quand PintI1 était muté, que ce soit chez *E. coli* ou *A. baumannii*, le niveau d'expression à partir des variants de Pc comparé aux constructions sans PintI1 muté n'était pas significativement modifié, confirmant que le niveau d'expression à partir de Pc est totalement indépendant de l'expression de PintI1. Chez *E. coli*, quand on augmentait l'expression à partir de PintI1 en mutant la boîte LexA, on n'observait pas de différence du niveau d'expression à partir de Pc, quel que soit le variant. Ceci est concordant avec les travaux de Guérin *et al.* (Guérin *et al.*, 2011). Chez *A. baumannii*, la mutation de la boîte de fixation de LexA ne devrait pas avoir d'influence sur PintI1, car il n'y a pas de LexA chez *Acinetobacter*. On s'attendait donc à ce que les niveaux d'expression de Pc soient similaires dans les construction pPcPintI1 et pPcPintI1LexA*, et, c'est ce que l'on observe sur la Figure 34.

BY-NC-ND

1.2.3. Analyse par quantification de transcrits de la force des variants de Pc et de Pint.

Afin de quantifier aussi l'activité à partir de PintI1, nous avons analysé concomittament le niveau d'expression de Pc et de PintI1 par PCR en temps réél en quantifiant les transcrits de *lacZ* et *uidA* chez *A. baumannii* et *E. coli*.

Les résultats sont présentés dans la Figure 35.

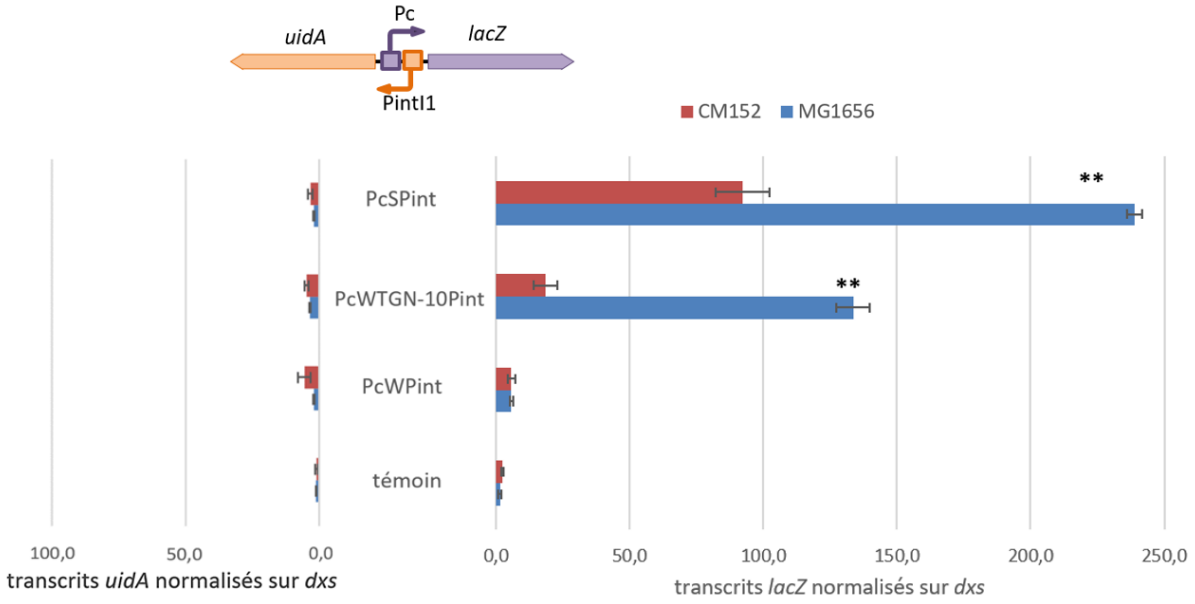


Figure 35 : Activité de transcription des promoteur Pc et PintI1. Les barres représentent les l'activités de Pc en transcrits de *uidA* (à gauche) et l'activité de PintI1 en transcrit de de *lacZ* (à droite) normalisés par rapport aux transcrits du gène *dxs*, pour chaque construction double dans *E. coli* MG1656 (en bleu) et *A. baumannii* CM152 (en rouge). ** indique les différences statistiquement significatives avec p<0.01. Témoin : pSU38Δtot*lacZ*Δ_tot*uidA*oriA, PcWPint : pPcWPintI1oriA, PcWTGN-10Pint : pPcW$_{TGN-10}$PintI1oriA, et PcSPint : pPcSPintI1oriA. Les barres d'erreurs indiquent les écarts types d'au moins trois quantifications indépendantes pour chaque plasmide, chaque quantification correspondant à la moyenne d'une mesure réalisée en triplicat.

Les résultats de l'expression des variants de Pc exprimés en quantités de transcrits de *lacZ* montraient des résultats similaires à ceux obtenus avec les essais bêta-galactosidase. Nous retrouvions une activité qui était significativement 2,6 à 7,2 fois plus faible chez *A. baumannii*

BY-NC-ND

que chez *E. coli* pour les constructions avec les variants PcS et PcW_{TGN-10}. Nous n'avons pas obtenu de différence significative pour le variant PcW entre *E. coli* et *A. baumannii* alors que nous avions observé une différence significative sur les résultats des essais bêta-galactosidase (Figure 33). Néanmoins, les activités étant faibles, la quantité de transcrits d'ARNm n'était peut-être pas suffisant pour observer la différence constatée en phénotypique avec les essais bêta-galactosidase.

En essais bêta-galactosidase (Figure 34), nous avions vu que le niveau d'expression à partir de Pc était totalement indépendant de l'expression de PintI1. Les résultats de transcrits de uidA sous l'influence de PintI1 montraient que, en fait, l'expression du PintI1 était très faible chez *A. baumannii*, très légèrement supérieure à celle du plasmide témoin mais pas statistiquement différentes quelle que soit la construction utilisée avec les différents variants de Pc. Ces résultats vont dans le sens d'une très faible expression de PintI1 chez *A. baumannii*. Ceci était étonnant car comme le genre *Acinetobacter* n'a pas protéine LexA, il pourrait être attendu une expression constitutive de l'intégrase. Il est possible que cette expression soit réprimée par un autre mécanisme que celui impliqué dans la réponse SOS ou que l'activité du promoteur Pc soit prédominante et empêche l'expression de *intI1*.

Nous avons ensuite muté le promoteur PintI1 et on remarque que l'activité de PintI1 était bien totalement abolie (Figure 36). Il y aurait donc bien une très faible expression de PintI1 dans la construction native pPcPintI1 mais qui n'avait aucun effet sur le niveau d'expression de Pc, quel que soit le variant. Il reste à démontrer que cette faible expression de PintI1 est suffisante pour produire la quantité nécessaire d'intégrase pour l'obtention d'évènements de recombinaison.

Il est cependant à noter que les mesures avec les constructions où PintI1 est muté n'ont été réalisées que dans une seule expérience et non pas en triplicat comme les autres mesures de transcrits.

BY-NC-ND

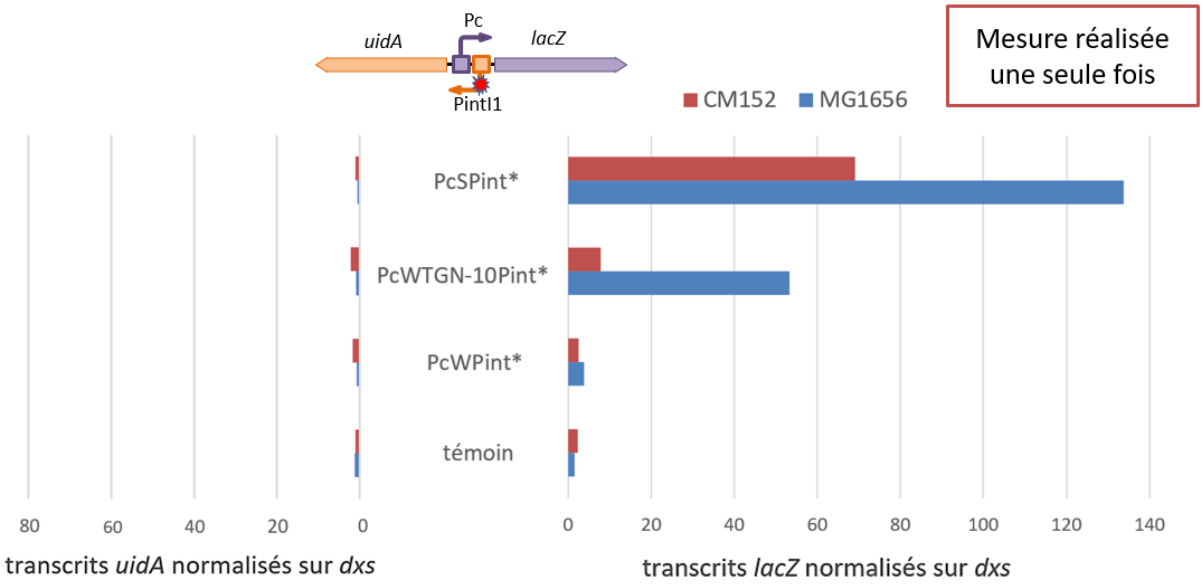


Figure 36 : Activité de transcription des promoteurs Pc et PintI1 dans les constructions comportant une mutation du Pint. Les barres représentent l'activité de Pc en transcrits de *uidA* (à gauche) et l'activité de Pint en transcrit de de *lacZ* (à droite) normalisés par les transcrits du gène *dxs*, pour chaque construction double dans *E. coli* MG1656 (en bleu) et *A. baumannii* CM152 (en rouge). Témoin : pSU38Δtot*lacZ*_Δtot*uidA*oriA, PcWPint* : pPcWPintI1*oriA, PcWTGN-10Pint* : pPcW$_{TGN-10}$PintI1*oriA, et PcSPint* : pPcSPintI1*oriA.

BY-NC-ND

Afin de mieux analyser ces résultats, nous avons représenté côte à côte et à une même échelle, les résultats des transcrits de *uidA* présentés dans les figures 35 et 36 (Figure 37). Bien que les différences ne soient pas significatives, cette représentation permet de mieux visualiser la diminution du niveau d'expression à partir du PintI1 chez *A. baumannii* lorsque celui-ci est muté.

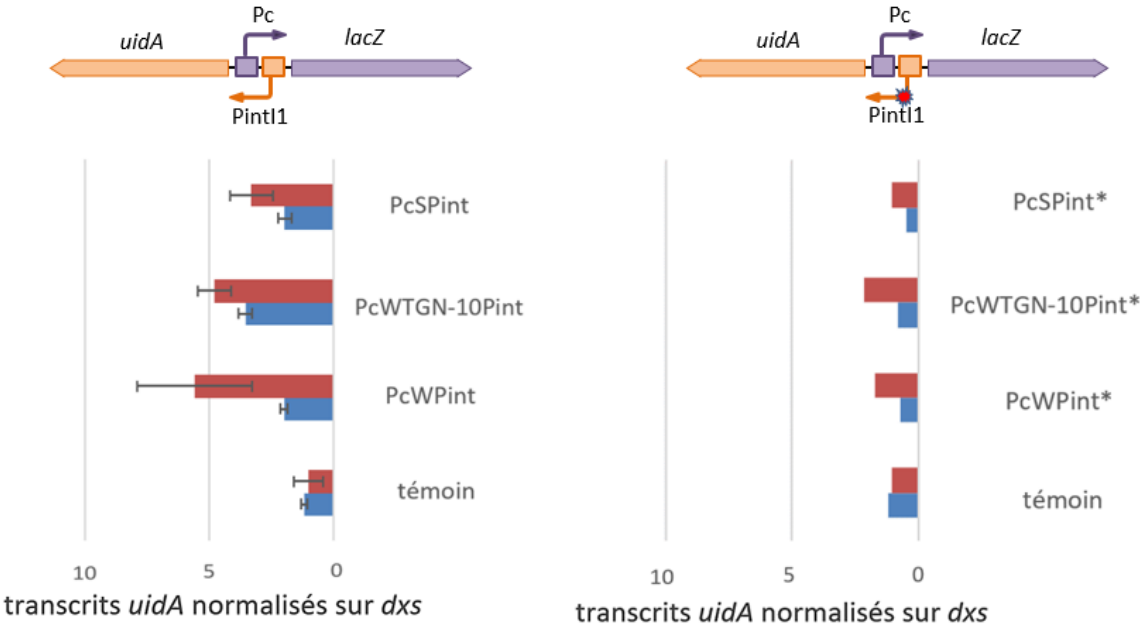


Figure 37 : Représentation des activités de transcription des promoteurs Pint présentés dans les figures 35 et 36. Les barres représentent l'activité de PintI1 en transcrits de *uidA* dans les constructions sans mutation (à gauche) et dans les constructions avec PintI1 muté (à droite), normalisée par les transcrits du gène *dxs*, pour chaque construction double dans *E. coli* MG1656 (en bleu) et *A. baumannii* CM152 (en rouge). Témoin : pSU38Δtot*lacZ*_Δtot*uidA*oriA, PcWPint : pPcWPintI1oriA, PcWTGN-10Pint : pPcW$_{TGN-10}$PintI1oriA, et PcSPint : pPcSPintI1oriA, PcWPint* : pPcWPintI1*oriA, PcWTGN-10Pint* : pPcW$_{TGN-10}$PintI1*oriA, et PcSPint* : pPcSPintI1*oriA. Les barres d'erreurs indiquent les écarts types d'au moins trois quantifications indépendantes pour chaque plasmide, chaque quantification correspondant à la moyenne d'une mesure réalisée en triplicat.

BY-NC-ND

1.2.4. Effet du nombre de copies de plasmides et des courbes de croissance

Nous nous sommes assurés que cette différence d'activité des promoteurs de Pc entre *A. baumannii* et *E. coli* n'était pas liée à un nombre de copies de plasmide différents entre les deux espèces, d'autant plus que nos constructions comportaient deux origines de réplications. Dans un premier temps, une quantification du nombre de copies de plasmide a été réalisée chez MG1656 avec les constructions plasmiques pPcPint et pPcPintoriA. Les résultats obtenus montraient qu'il n'y avait pas de différence significative du nombre de copies de plasmide chez *E. coli* MG1656, n=19,2 copies/bactérie et n=17,4 copies/bactérie respectivement.

Ensuite, nous avons comparé le nombre de copies de plasmide pPcPintoriA entre *E. coli* MG1656 et *A. baumannii* CM152. Les résultats obtenus révèlèrent qu'il n'y avait pas de différence significative du nombre de copies de plasmide entre *A. baumannii* (n=15,3 copies/bactérie) et *E. coli* (n=16,4 copies/bactérie).

BY-NC-ND

Les essais bêta-galactosidase étant réalisés au cours de la phase exponentielle bactérienne, nous nous sommes aussi assurés que la différence d'activité des promoteurs n'était pas due à une différence de courbe de croissance. Nous avons donc déterminé la courbe de croissance dans le temps, mesurée à DO600, de nos différentes souches hébergeants les plasmides recombinants. Nous avons obtenu les courbes présentées dans la Figure 38, ce qui nous a permis de conclure qu'il n'y avait pas de différence de courbes de croissance entre les différentes souches que nous avons utilisées pour ce travail.

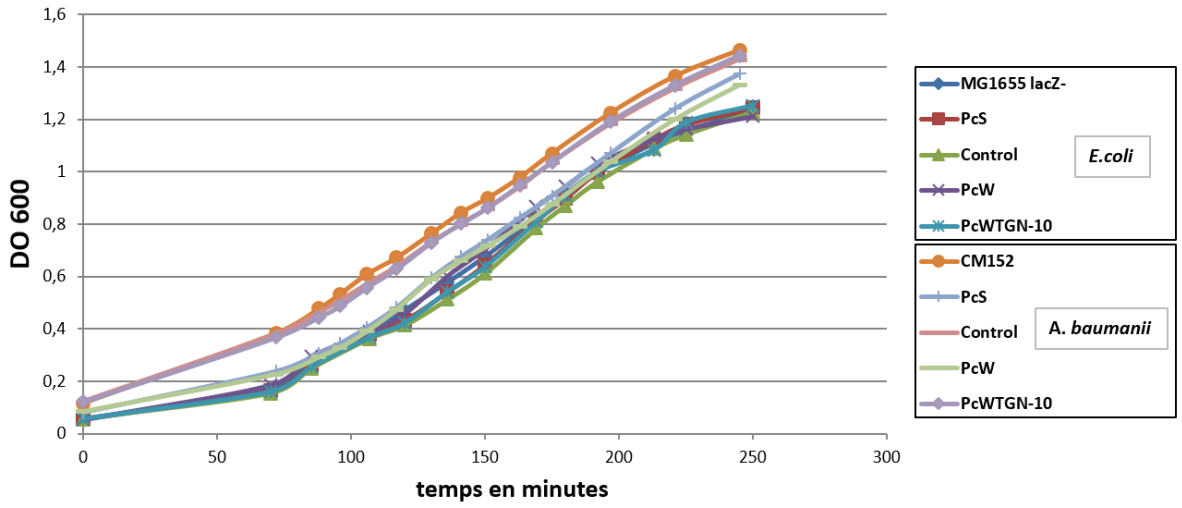


Figure 38 : Courbes de croissance des souches de *E. coli* MG1656 et de *A. baumannii* CM152, naturelles et contenant les différents plasmides recombinants. Control : pSU38Δtot*lacZ*_Δtot*uidA*oriA, PcW : pPcWPintI1oriA, PcWTGN-10 : pPcW$_{TGN-10}$PintI1oriA et PcS : pPcSPintI1oriA, CM152 et MG1656 : souches sans construction plasmidique.

BY-NC-ND

1.3. Discussion

Les résultats concernant Pc, que ce soit en essais ß-galactosidase ou en quantification de transcrits ont confirmé une expression du promoteur Pc significativement plus faible chez *A. baumannii* et ce quel que soit le variant. De plus, la double construction nous a permis de montrer que PintI1 n'avait aucune interférence sur l'expression de Pc.

Concernant l'expression du promoteur PintI1, en considérant qu'il soit aussi exprimé plus faiblement chez *A. baumannii*, en l'absence de répression par la protéine LexA, on pouvait s'attendre à mettre en évidence une expression constitutive à un niveau significativement plus élevé que celui de la construction témoin. Nos résultats montraient une expression faible de PintI1 chez *A. baumannii*. Nous n'avons pas observé de phénomème d'interférence transcriptionnelle entre PcS et PintI1 chez *A. baumannii* comme observée préalablement chez *E. coli*. Deux hypothèses pourraient être soulevées, soit l'interférence entre PcS et PintI1 n'existe pas chez *A. baumannii* du fait d'une régulation de la transcription différente ou bien d'une activité trop faible de PcS ; soit elle est présente, mais masquée par une autre voie de régulation. Tout ceci suggère l'existence d'une régulation de l'expression de l'intégrase, ne passant pas par LexA et différente de l'interférence transcriptionnelle entre PcS et PintI1 chez *A. baumannii*. Néanmoins, Starikova *et al*. ont rapporté que chez *A. baylii* en présence d'une intégrase fonctionnelle pour la recombinaison, il existait une inactivation de celle-ci au cours du temps (Starikova *et al.*, 2012). On pourrait donc faire l'hypothèse que l'interruption de la séquence de l'intégrase, absence d'un codon start ou existence d'un codon stop la rendant non fonctionnelle, pourrait être sélectionné chez *A. baumannnii* en l'absence d'autre régulation de l'expression de l'intégrase. Sur les séquences d'intégrases disponibles dans nos données *in silico* (*A. baumannii* n=93, *E. coli* n=218), nous avons identifié chez *A. baumannii*, 37,6 % (n=35) d'intégrases tronquées et 1,4 % (n=2) d'intégrases sans codon start ; et chez *E. coli*. 33,9 % (n=74) d'intégrases tronquées et 2,2 % (n=3) d'intégrases sans codon start. Ces données *in silico* ne mettent pas en évidence une proportion plus importante d'intégrase non fonctionnelle chez *A. baumannii* et orienteraient vers l'existence d'autres voies de régulation de l'expression de l'intégrase.

Par analogie avec les voies de régulation de l'intégrase connues chez *E. coli*, il serait intéressant d'étudier l'intéraction de la réponse aux dommage de l'ADN spécifique de *A. baumannii* sur

BY-NC-ND

l'expression du promoteur de l'intégrase des IM1 chez *A. baumannii*. Cette réponse est sous la régulation des protéines RecA et UmuDAb (Aranda et al., 2011, 2013, Hare et al., 2012a, 2012b; Norton et al., 2013; Witkowski et al., 2016). Il a aussi été montré que l'expression de l'intégrase de IM1 est régulée dans le biofilm chez *E. coli* par la réponse stringente via la protéase Lon (Strugeon *et al.*, 2016). *A. baumannii* est caractérisé par ses capacités de formation de biofilm (Rodríguez-Baño *et al.*, 2008) et de persistance dans l'environnement (Fournier et Richet, 2006; Houang *et al.*, 1998; Wendt *et al.*, 1997). Cependant bien que la protéine Lon soit présente chez *A. baumannii* (GenBank: AJ224767.1) nous n'avons pas trouvé de publications se rapportant au mécanisme de la réponse stringente chez *A. baumannii*.

BY-NC-ND

DISCUSSION

BY-NC-ND

BY-NC-ND

Nous avons débuté notre travail sur le constat que chez *A. baumannii* - pathogène dont la multi-résistance est fortement associée aux IM1- la distribution des variants de Pc montrait *in vitro* une prédominance de Pc dits forts. Ces données pouvaient faire craindre une expression plus importante des gènes de résistance contenus dans les IM1 chez *A. baumannii*. Notre objectif était d'étudier, *in vitro* et *in vivo*, cette prédominance de Pc forts et d'en déterminer les raisons.

Diversité génétique de souches cliniques et environnementales de *A. baumannii*

La résistance chez *A. baumannii* a été globalement associée à la présence d'IM1 (Asadollahi *et al.*, 2011; Deylam Salehi *et al.*, 2017; Gonzalez *et al.*, 1998; Ploy *et al.*, 2000; Poonsuk *et al.*, 2012; J. Zhang *et al.*, 2010; Zhong *et al.*, 2012).

Notre collection de souches de *A. baumannii* hébergeant des IM1 était caractérisée par une **grande variété génétique**, 52 profils RAPD différents parmi les 83 souches étudiées. Les isolats provenaient de différents hôpitaux Français et d'effluents d'hôpitaux Camerounais. Comme cela a déjà été rapporté dans la littérature et de façon assez intéressante, nous avons trouvé une diversité génétique plus importante dans les isolats environnementaux que dans les isolats cliniques (Hamouda *et al.*, 2011; Rafei *et al.*, 2015). D'autre part, aucun profil RAPD n'était commun entre les souches cliniques provenant des différentes villes. Ces deux constats confirment la grande plasticité génétique de *A. baumannii* déjà décrite (Gao *et al.*, 2017; Higgins *et al.*, 2010; Paton *et al.*, 1993), et peuvent être le reflet d'une adaptation génétique locale spécifique (Garcia-Garcera *et al.*, 2017; Vallenet *et al.*, 2008). Il a été montré que cette plasticité était principalement due à des transferts horizontaux de gènes (Adams *et al.*, 2008; Antunes *et al.*, 2014).

Il a été rapporté dans la littérature que les souches cliniques de *A. baumannii* se sont adaptées et ont largement diffusé en raison de la pression antibiotique en constante augmentation, les souches hospitalières ayant ainsi acquis des facteurs de virulence spécifiques par rapport aux souches environnementales (Antunes *et al.*, 2014; Bardbari *et al.*, 2017). Dans notre collection, nous n'avons pas noté de différence sur la distribution des variants de Pc, ni dans les déterminants du réseau de cassettes entre les souches environnementales et les souches

BY-NC-ND

cliniques. Néanmoins, nos souches environnementales, provenant d'effluents hospitaliers, étaient fortement influencées par l'activité clinique et la pression de sélection des antibiotiques. En outre, nos souches ont été sélectionnées en amont sur la présence d'un IM1, fortement associée chez *A. baumannii* à la multi-résistance. Nos souches étaient donc plutôt à considérer comme des **souches issues d'environnements cliniques**. Pour réellement comparer des souches cliniques à des souches environnementales non cliniques de *A. baumannii*, il faudrait construire une autre collection biologique avec des souches non touchées par l'activité clinique. Ces souches pourraient provenir de sols (Houang *et al.*, 2001; Rafei *et al.*, 2015; Vangnai et Petchkroh, 2007), particulièrement s'ils sont contaminés par des hydrocarbures (Bordenave *et al.*, 2007; Sarma *et al.*, 2004), de l'eau (Rafei *et al.*, 2015), des légumes (Berlau *et al.*, 1999; Houang *et al.*, 2001), de la viande animale ou du poisson (Houang *et al.*, 2001), du lait (Rafei *et al.*, 2015) et du fromage (Rafei *et al.*, 2015) ou encore d'environnements influencés par l'élevage animal comme les eaux d'aquacultures (Huys *et al.*, 2007) ou des sols agricoles enrichis de fumiers ou de lisier de porcs (Byrne-Bailey *et al.*, 2011; Vangnai et Petchkroh, 2007). D'autre part, les antibiotiques sont fréquemments utilisés dans l'élevage animal, la pression de sélection antibiotique est aussi à prendre en compte pour des souches isolées dans ce contexte.

Le réservoir de *A. baumannii* n'est pas très bien connu, un portage chez les animaux d'élevage ou domestiques est rapporté et des échanges peuvent avoir lieu avec l'homme (Ewers *et al.*, 2017; Zordan *et al.*, 2011). Il pourrait donc aussi être intéressant de comparer le contenu en intégron de souches de *A. baumannii* humaines à celui de souches animales. En effet des souches multi-résistantes ou encore XDR sont de plus en plus isolées chez les animaux (Al Bayssari *et al.*, 2015; Eveillard *et al.*, 2013; Ewers *et al.*, 2017; Guerra *et al.*, 2014; Hamouda *et al.*, 2011; Zordan *et al.*, 2011), notamment dans les cliniques vétérinaires (Belmonte *et al.*, 2014; Ewers *et al.*, 2017; Zordan *et al.*, 2011). De plus, dans des prélèvements de chevaux, de chiens et de chats, Il a été rapporté des souches de *A. baumanni* multi-résistantes hébergeant des IM1 identiques à ceux de souches isolées chez l'homme (Abbott *et al.*, 2005; Endimiani *et al.*, 2011).

BY-NC-ND

Parmi les 105 réseaux de cassettes d'IM1 que nous avons entièrement caractérisés dans notre collection, nous n'avons identifié, de façon étonnante, que 18 réseaux différents, comprenant 13 cassettes différentes en multiples combinaisons. De plus, Il y avait une **redondance des réseaux** puisque 5 réseaux représentaient 75,2% (n = 79) de l'ensemble des réseaux caractérisés (n = 105).

Les gènes codant les enzymes modificatrices d'aminosides étaient prédominants (87,8%) et 90,5% des différentes combinaisons de réseaux de cassette codaient ces résistances et les gènes *aacC1* (43,8%), *aadA1* (34,4%) et *aacA4* (8,8%) étaient les plus fréquents parmi les gènes de résistance caractérisés. Cette tendance pour les IM1 de *A. baumannii* est déjà rapportée dans la littérature. En effet, jusqu'à 95 % des isolats Européens présentant un IM1 hébergent un de ces gènes avec par ordre décroissant les gènes *aphA1, aacC1, aadA1, aphA6, aadB, aacC2* et *aacA4* (Nemec *et al.*, 2004). De plus, les réseaux de cassettes sur le modèle aacC*1-orfP-*(*orfP*)*-orfQ-aadA1* sont souvent présents dans les IM1 de *A. baumannii* (Mak *et al.*, 2009; Nemec *et al.*, 2004; Nigro *et al.*, 2011; Post *et al.*, 2010).

Bien que n'étant pas aussi fréquemment associée aux IM1 que la résistance aux aminosides, la résistance aux bétalactamines et aux carbapénèmes est souvent acquise par le biais des IM1 chez *A. baumannii* (Potron *et al.*, 2015; Zarrilli *et al.*, 2013) et les souches ayant acquis ces résistances sont souvent responsables d'épidémies hospitalières ou d'infections associées aux soins.

Dans notre collection, nous n'avons retrouvé que deux gènes de cassette de résistance aux bêta-lactamines, bla_{IMP10} (résistance aux carbapénèmes, retrouvé dans 2 réseaux) et bla_{OXA-21} (retrouvé dans 1 réseau). Le gène bla_{OXA-21} a été décrit pour la première fois dans un intégron chez *A. baumannii* dans un réseau identique à celui que nous avons caractérisé, *aadB-blaOXA-21* (Vila *et al.*, 1997). La cassette bla_{OXA-21} a été décrite une deuxième fois chez *A. baumannii* dans le réseau *bla(IMP-19)-aac(6')-31-bla(OXA-21)-aadA1* (Yamamoto *et al.*, 2011). Le réseau portant bla_{IMP-10} a déjà été décrit, associé à un PcS, dans un IM1 appelé In86, chez des patients brésiliens hospitalisés (Mendes *et al.*, 2007). Le phénotype lié à In86 pourrait conférer une résistance à toutes les bêta-lactamines ainsi qu'aux aminoglycosides disponibles (Mendes *et al.*, 2007). Dans notre collection, les deux réseaux avec bla_{IMP10} étaient associés à PcW et à PcW+P2. Or, la séquence de l'association PcW+P2 dans un IM1 de *A. baumannii* n'a été décrit qu'une seule fois, et seulement dans la GenBank (accession number : KM972597), par contre

BY-NC-ND

aucune séquence de PcW n'a été retrouvée chez *A. baumannii* dans la GenBank. Cependant, une faible expression de la résistance liée au PcW pourrait aussi potentiellement associée à un avantage puisqu'au PcW correspond un variant de l'intégrase ayant une activité de recombinaison plus importante (Jové *et al.*, 2010) chez *E. coli* donc une meilleure capacité d'adaptation du réseau de cassettes au stress environnemental.

Dans la littérature, les intégrons de *A. baumannii* sont généralement décrits sur le chromosome, intégrés dans des îlots de résistance (Huang *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2016; Martinez *et al.*, 2016; Poirel *et al.*, 2003; Seward, 1999). Néanmoins, certaines études ont montré que des IM1 pouvaient aussi être retrouvés sur des plasmides chez *Acinetobacter* (Cambray *et al.*, 2010; Kaase *et al.*, 2014; Koczura *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2009). Dans notre étude, nous avons étudié l'environement génétique de 53 intégrons. Nous avons pu identifier que 27 intégrons était sur AbaR, mais que pour les souches pour lesquelles les PCR AbaR étaient négatives, l'analyse NGS nous a permis de déterminer qu'ils étaient chromosomiques, mais nous n'avons pas pu préciser si l'intégron était dans un autre ilôt de résistance. Il faut souligner que l'analyse NGS avait des limites, la technologie Ion Proton™ technology (Thermo Fisher Scientific, Villebon sur Yvette, France) que nous avons utilisée génère des reads courts (200-250 pb). En raison d'un nombre important de séquences répétées ainsi que de séquences d'insertion sur le génome de *A. baumannii*, l'assemblage de reads courts a été difficile, ce qui ne nous a permis d'obtenir que des contigs courts en utilisant à la fois MIRA (version 4.9.5_2) et SPAdes (version 3.5.0). L'assemblage de ces contigs ne permettait pas de caractériser entièrement les intégrons par NGS et par conséquent de trouver exactement l'élément génétique porteur de l'intégron.

Pour contourner ce problème, nous avons décidé de construire deux bases de données distinctes pour *A. baumannii*, plasmidique et chromosomique à partir des séquences retrouvées dans les différentes bases de données accessibles avec toutes les limites que cela peut comporter. Nous avons considéré que les intégrons avaient une localisation chromosomique lorsque ses deux extrémités étaient retrouvées dans la base de donnée chromosomique ou, lorsqu'une des extrémités de celui-ci était reconnue à la fois dans la base de données plasmidique et dans la base de données chromosomique et l'autre, seulement dans la base de données chromosomique.

BY-NC-ND

D'autres technologies de séquençage haut débit pourraient aussi permettre d'obtenir des reads plus longs, telles que la plateforme PacBio RS qui permet de générer des reads jusqu'a 10kb (Quail *et al.*, 2012), ou la méthodologie du séquençage haut débit de 3ième génération, par exemple la technologie d'Oxford nanopore, méthode MinION, qui a l'avantage de permettre la lecture de séquences jusqu'a 200Kb de long (dans les conditions optimales) pourraient être utilisées. Ces méthodologies devraient nous permettre de dépasser les difficultés de construction des contigs dues aux IS et aux séquences répétées. Il est à noter que de meilleurs résultats sont aussi souvent rapportés avec la technologie MiSeq (Illumina) (Loman *et al.*, 2012). Enfin, la détermination de la lignée clonale pourrait aussi donner des informations intéressantes notamment sur l'environnement génétique des intégrons et sur les ilôts de résistance attendus. Cette détermination peut être réalisée par MSLT qui est la technique de référence. Deux techniques de MLST sont actuellement disponibles pour typer à la fois *A. baumannii* et non-*baumanii*, le MLST d'Oxford décrit par Bartual *et al.* (Bartual *et al.*, 2005) et le MLST de Pasteur décrit par Diancourt *et al.* (Diancourt *et al.*, 2010). Les deux plateformes sont trouvées sur : https://pubmlst.org/abaumannii/. Cependant des erreurs sont rapportées avec la technique d'Oxford liées à des recombinaisons entre les gènes *gyrB* et *gpi* (Hamouda *et al.*, 2010) ou au recouvrement de la séquence analysée par les amorces utilisées pour le séquençage de *gpi* générant des imprécisions dans le typage (Hamidian *et al.*, 2017).

Les Pc dits forts prédominent chez *A. baumannii*

Notre étude épidémiologique qui a permis la caractérisation de 108 IM1 dans notre collection de souches de *A. baumannii* a confirmé les données in silico avec une prédominance **de Pc dits forts (98,2 %) et principalement de PcS (85.2 %)**. Nous n'avons pas retrouvé d'autre étude portant sur la distribution *in vivo* des variants de Pc chez *A. baumannii*. Il serait intéressant d'élargir l'étude à d'autres pays afin de confirmer nos données françaises. Nous avons montré que la **force des variants de Pc était environ 4 fois plus faible**, chez *A. baumannii* que chez *E. coli,* quel que soit le variant de Pc. Cela signifie que les Pc dits forts ont en fait une activité faible chez *A. baumannii*. Cette constatation permet de faire une première hypothèse pour expliquer la prédominance des Pc forts chez *A. baumannii* : il y aurait une **sélection des Pc forts chez *A. baumannii* pour maintenir un niveau d'expression des**

BY-NC-ND

cassettes suffisant afin de permettre à la souche de pouvoir répondre à la pression de sélection antibiotique de l'environnement clinique. Afin d'apporter des arguments pour soutenir cette hypothèse, il faudrait étudier la distribution des variants de Pc dans une collection de souches de *A. baumannii* non soumises à une pression de sélection antibiotique comme proposé précédemment.

Une expression plus faible des promoteurs chez *A. baumannii* par rapport à *E. coli* a déjà été rapportée. L'expression de gènes *catA* sous le contrôle d'un promoteur lac dans *E. coli* a été rapportée deux fois plus élevée que son expression dans des cultures *de A. calcoaceticus* (Neidle *et al.*, 1987). Il a également été rapporté que *E. coli* exprimait le produit du groupe de gènes *pca* à un niveau de 10 à 30 fois plus élevé que les cultures de *A. calcoaceticus* (Doten *et al.*, 1987). Plus récemment, Girlich *et al.* ont rapporté un niveau de transcription de *blaKPC* (résistance aux bêta-lactamines) 10 à 100 fois plus faible chez *A. baumannii* que chez *E. coli* (Girlich *et al.*, 2017). Cette équipe a aussi rapporté que l'utilisation de différents promoteurs chez *E. coli*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa* influençait le niveau de transcription et le phénotype de résistance (Girlich *et al.*, 2017).

Ces différences de niveau d'expression de Pc pourraient être expliquées par des différences dans la machinerie cellulaire transcriptionnelle entre les deux espèces bactériennes.

L'ARN polymérase de *A. baumannii* comparée à celle de *E. coli* présente une structure enzymatique similaire (Kleppe et Kleppe, 1976) et, 50 à 70 % d'homologie de séquence en acides aminés entre les différentes sous-unités avec une grande conservation des régions fonctionnelles (Robinson *et al.*, 2010). Malgré cela, il a été rapporté qu'elles se comportaient différemment *in vitro* selon le substrat, l'ARN polymérase de *A. calcoaceticus* était moins efficace que celle de *E. coli*. En effet, l'ARN polymérase de *A. calcoaceticus* atteignait son maximum d'activité à 20 µg/ml lorque le substrat était son propre ADN et à 50 µg/ml lorsque le substrat était de l'ADN de thymus de veau, avec un niveau d'incorporation des bases environ 10 fois plus faible, alors que l'enzyme de *E. coli* atteignait son maximum d'activité à 60 µg/ml lorsque le substrat était de l'ADN de *A. calcoaceticus* et n'atteignait pas sa limite sur l'expérimentation avec de l'ADN de thymus de veau (Kleppe et Kleppe, 1976).

BY-NC-ND

Le début du processus de transcription implique des facteurs σ, qui se lient au promoteur et à l'ARN polymérase. Les séquences en acides aminés de *A. baumannii* et de *E. coli* du facteur σ^{70} sont très similaires et la région fonctionnelle reconnaissant les éléments -10 et -35 est conservée (Casella *et al.*, 2017; Robinson *et al.*, 2010). Néanmoins, d'autres facteurs σ accessoires sont manquants ou différents chez *A. baumannii* (Robinson *et al.*, 2010).

Le dernier composant de la transcription est le promoteur et, à notre connaissance, il n'y a pas de séquence consensus décrite des régions du promoteur de *A. baumannii*. Un consensus des éléments -35 et -10 spécifique de *A. baumannii* pourrait exister comme chez *P. aeruginosa* (Potvin *et al.*, 2008). Des publications suggèrent que l'espacement entre les deux hexamères du promoteur chez *A. baumannii* serait plus grand que chez *E. coli* (Kishan et Hillen, 1990; Segal et Elisha, 1999). Afin de rechercher l'existence d'un consensus spécifique de promoteurs chez *A. baumannii*, il pourrait être réalisé une compilation des séquences promotrices de gènes de ménages de *A. baumannii* à partir des données disponibles dans la Genbank. De plus, il serait intéressant de rechercher par 5' race le +1 de transcription du gène *intI1* à la fois chez *E. coli* et chez *A. baumannii*. En effet, une variation de ce +1 pourrait aussi expliquer une telle différence d'expression des promoteurs entre ces deux espèces.

Si la machinerie cellulaire de transcription présente des différences, il peut en être de même sur les phénomènes de régulation post-transcriptionnelle. Récemment, Girlich *et al.* ont démontré que l'utilisation de différents promoteurs chez *E. coli*, *A. baumannii* et *P. aeruginosa* influençait le niveau de transcription ainsi que le phénotype de résistance (Girlich *et al.*, 2017). Ils ont également rapporté un niveau de transcription de *blaKPC* (résistance aux bêta-lactamines) 10 à 100 fois plus faible chez *A. baumannii* que chez *E. coli*, alors que le phénotype de résistance en concentration minimale d'inhibition (CMI) était bien corrélé au niveau de transcription chez *E. coli*, mais pas chez *A. baumannii* chez qui les CMI étaient plus élevées (Girlich *et al.*, 2017).

Au total, chez *A. baumannnii,* des évènements de **régulation post-transcriptionnelle ou traductionnelle**, associés aux mécanismes naturels de résistance liés à la faible densité de porines membranaires et aux mécanismes d'efflux, pourraient permettre à la bactérie d'avoir une résistance aux antibiotiques à haut niveau malgré une transcription faible.

BY-NC-ND

L'étude de la corrélation entre l'expression de la résistance et la force du variant du promoteur Pc chez *A. baumannii* pourrait être réalisée chez des souches cliniques avec un IMI1 et plusieurs cassettes codant des résistances à différents antibiotiques, mais aussi avec la souche CM152 contenant, dans un plasmide ou sur le chromosome, un intégron synthétique à plusieurs cassettes avec différents variants du promoteur Pc. Il serait aussi intéressant de comparer l'expression de gènes non contenus dans un intégron chez *A. baumannii* et *E. coli*. Pour cela nous pourrions utiliser directement nos constructions doubles et quantifier par PCR en temps réel l'expression des transcrits du gène de résistance à la kanamycine *aph(3')-II*, qui était le moyen de sélection de nos plasmides expérimentaux, chez les deux espèces.

Dans le but de montrer l'avantage sélectif des promoteurs forts il serait intéressant d'étudier l'évolution des Pc chez *A. baumannii.* Au cours de sa thèse, Yohann Lacotte a mis au point dans notre laboratoire un système de culture continue en chemostat pour étudier l'évolution des bactéries. Nous pourrions utiliser cette technique avec une souche de *A. baumannii* transformée avec le vecteur comportant un intégron synthétique avec un PcW. Les chémostats seraient inoculés avec cette souche d'intérêt et les paramètres à l'intérieur des bioréacteurs (température, débit de bouillon, concentration en nutriments, concentration en antibiotique) seraient contrôlés pendant la durée nécessaire à l'obtention de 200 générations bactériennes. Des prélèvements réguliers pourraient alors être réalisés afin d'étudier au cours du temps l'évolution du variant Pc et de la CMI des antibiotiques pour lesquels les cassettes codent une résistance. Le fitness des souches de *A. baumannii* évoluées pourrait être évalué par comparaison à la souche ancestrale dans le cadre d'expériences de compétition.

Lacotte *et al.* ont aussi montré que certaines cassettes avaient un coût biologique plus important que d'autres. Ainsi la cassette *aadA1*, une des cassettes les plus répandues dans les IM1, avait un coût biologique très faible alors que la cassette *aacA4* (ou *aac(6')-Ib*) avait un coût biologique important (Lacotte *et al.*, 2017). Dans notre étude, *aadA1* était la cassette la plus fréquente et représentait 34,4% des cassettes de résistance, tandis que *aacA4* était la 3ème cassette la plus fréquente avec 8,8 %. Son coût biologique pourrait être compensé par une position éloignée du Pc dans le réseau, or dans notre collection elle était en première position dans les 5 réseaux dans lesquels elle était présente. Cette tendance à être en première position, a aussi été retrouvée dans 50 % (168/336) des réseaux dans lesquels elle

BY-NC-ND

était présente dans la base de donnée Integrall (http://integrall.bio.ua.pt/). Le positionnement dans le réseau de cassettes serait donc plus complexe que simplement en fonction de son coût biologique. En effet, il a été montré que certaines cassettes n'ont pas de région d'initiation de la traduction (TIR) (Hanau-Berçot *et al.*, 2002). Un grand nombre d'IM1 possède, à l'extrémité 3' de leur site *attI*, un cadre ouvert de lecture, baptisé *orf11*, précédé d'une TIR efficace (GGAG-N8-ATG) et terminé par un codon STOP apporté par la première cassette. Les cassettes, sans région TIR auront donc besoin d'être placées en première position du réseau de cassettes afin que leur traduction soit initiée via de *orf11* (Hanau-Berçot *et al.*, 2002). Ceci expliquerait pourquoi les cassettes *aacA4*, ne possédant pas de région TIR efficace, sont retrouvées en début de réseau en dépit de leur coût biologique.

L'intégrase a-t-elle un coût biologique chez *A. baumannii* ? Lien avec la prédominance de PcS ?

Dans une publication récente de notre laboratoire, le coût biologique des intégrons a été étudié chez *E. coli*. Il a été mis en évidence qu'en l'absence de pression de sélection, plus le variant de Pc était fort, plus le coût biologique était important (Lacotte *et al.*, 2017). Mais **en présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotique la présence d'un PcS présentait un avantage sélectif** (Lacotte *et al.*, 2017). La séquence de Pc étant située dans le gène de l'intégrase, il a été montré que différents variants d'intégrase correspondent aux différents variants de Pc, l'intégrase la plus active correspondant au variant faible PcW et l'intégrase la moins active au variant fort PcS (Jové *et al.*, 2010). Lorsque la répression par LexA est levée, le variant de l'intégrase le plus actif, associé à PcW avait un coût biologique plus important que les variants moins actifs associés à PcS (Lacotte *et al.*, 2017). Ceci signifierait que chez *A. baumanni*, qui n'a pas de régulation par LexA, les intégrons avec PcS pourraient être sélectionnés car ils sont associés à une intégrase moins coûteuse et permettraient d'avoir un avantage sélectif en présence de pression de sélection antibiotique, même sub-inhibitrice, sous laquelle les PcS sont avantageux en termes de fitness. Cela reste à démontrer. De plus, selon nos résultats, la transcription des Pc est plus faible chez *A. baumannii* que chez *E. coli*. Les intégrons avec PcS pourraient avoir un coût biologique moins élevé chez *A. baumanni* que chez *E. coli*.

BY-NC-ND

Un deuxième argument pourrait être en faveur de la sélection des PcS. L'étude de Lacotte *et al.* concluait que chez *E. coli*, les intégrons sont peu coûteux du fait de la régulation de l'intégrase par la protéine LexA (Lacotte *et al.*, 2017). En l'absence de régulation de l'intégrase par LexA chez *A. baumannii*, on pouvait initialement supposer que la sélection des intégrons avec PcS pourrait représenter un moyen de **réprimer l'expression d'une intégrase coûteuse** comme cela a été montré chez *E. coli* où seul le PcS est associé à une répression quasi complète de l'expression de l'intégrase (Guérin *et al.*, 2011). Cependant, nos résultats de transcrits *uidA* (sous l'influence de PintI1) montrent que quel que soit le variant de Pc, le niveau de l'expression de PintI1 est très faible. Il est donc imporant de concevoir des expériences nous permettant de voir si le très faible niveau d'expression de PintI1 permet de produire de l'intégrase et d'analyser l'efficacité de recombinaison des différents variants de l'intégrase chez *A. baumannii*.

Il a été démontré que l'acquisition d'un intégron et l'expression de l'intégrase de celui-ci représentait un déficit de croissance (coût biologique) de 7 à 11 % chez *A. baylyi* (Starikova *et al.*, 2012) et que ce **coût biologique était lié à l'activité de recombinaison aspécifique de la protéine IntI1 et à l'instabilité génomique** qu'elle produirait via des sites de recombinaison secondaires (Harms *et al.*, 2013). Harms *et al.* ont de plus montré qu'il existait chez le genre *Acinetobacter* un lien entre la richesse en sites de recombinaison secondaires (motif « GTTRRRY » reconnu par la protéine IntI au sein des sites *attI* et *attC*) et l'instabilité génomique (Harms *et al.*, 2013) tandis que *A. baumannii* était l'espèce la plus riche en sites de recombinaison aspécifiques dans le génome (Harms *et al.*, 2013). En parallèle de ces expériences de compétition, des expériences d'évolution sur quelques jours ont montré que très rapidement le gène *intI1* était inactivé chez *A. baylyi* par différentes mutations (Starikova *et al.*, 2012). Ceci illustre bien la **nécessité d'une régulation de l'intégrase** active pour que les bactéries restent compétitives. D'autre part, si la présence d'une intégrase active représente un coût biologique, il a été montré, par le bais d'un modèle mathématique, que celui-ci est compensé par le dynamisme et la plasticité qu'elle procure à la bactérie dans un environnement soumis à des concentration fluctuantes d'antibiotiques (Engelstädter *et al.*, 2016). Ceci pourrait être une explication pour la prévalence aussi importante rapportée dans la littérature des IM1 chez *A. baumannii* en condition clinique où la pression de sélection antibiotique est importante.

BY-NC-ND

En comparaison avec ce qui est connu chez *E. coli*, la régulation de l'expression de l'intégrase chez *A. baumannii* ne passe pas par la réponse SOS médiée par LexA. Le très faible niveau d'expression de l'intégrase chez *A. baumannii* pourrait aussi évoquer un autre mécanisme de répression que la réponse SOS LexA-dépendante. Chez *A. baumannii* de nombreux gènes sont induits par les dommages à l'ADN, tels que *umuD/C* codant l'ADN polymérase V à basse fidélité qui est impliquée dans la mutagénèse, notamment celle induite par la dessication (Norton *et al.*, 2013). A la différence de *E. coli* ou un seul opéron *umuD/C* est retrouvé, *chez A. baumannii*, divers opérons *umuD/C* sont présents (Hare *et al.*, 2012; Norton *et al.*, 2013) et différents stress responsables de dommages de l'ADN (rayonnements UV, ciprofloxacine et méthylmethane sulfonate) induisent l'expression distincte des différents allèles *umuD* et *umuC*, suggèrant que chez *A. baumannii*, différents variants de l'ADN pol V auraient différentes capacités trans-lesionnelles (Norton *et al.*, 2013). Parmi ces gènes, un allèle additionnel de *umuD*, appelé ***umuDAb***, est systématiquement retrouvé dans les souches de *A. baumannii*. Au cours de la réponse aux dommages de l'ADN, UmuDAb a un rôle de régulation en exprimant ou en réprimant certains des gènes induits par les dommages (Aranda *et al.*, 2013; Hare *et al.*, 2014). Le mécanisme de la régulation par UmuDAb n'est pas bien connu, mais il a été montré que RecA induisait l'expression des gènes de l'ADN pol V, donc UmuDAb, ainsi que son propre gène *recA* (Norton *et al.*, 2013). Il a aussi été rapporté que UmuDAb présentait un site de clivage similaire à celui de LexA (hélice - tour - hélice) et ainsi qu'il était capable de s'auto-cliver sous la dépendance de RecA (Hare *et al.*, 2012). D'autre part il a été identifié une séquence palindromique (AACTTGAA(N_{11})TTCAAGTT) de fixation pour UmuDAb dans la région promotrice des gènes *umuDAb - ddrR* mais aussi de l'opéron *umuD/C* (Aranda *et al.*, 2014) lui permettant d'effectuer sur ceux-ci une répression dont le mécanisme est similaire à celui de la répression LexA (Witkowski *et al.*, 2016). Néanmoins cette séquence palindromique n'a pas été retrouvée dans la séquence des intégrons répertoriés dans Integrall (http://integrall.bio.ua.pt/).

Bien que UmuDAb soit responsable de la régulation de certains des gènes induits par les dommages à l'ADN (Aranda *et al.*, 2013; Hare *et al.*, 2012), les similarités restent limitées entre UmuDAb et LexA (Hare *et al.*, 2012) ce qui porte à croire qu'il ne s'agit pas d'un substitut direct pour toutes les fonctions de LexA et ouvre la porte à d'autres voies de régulation. D'autant plus que de nombreux autres gènes du régulon SOS de *A. baumannii* sont sous la dépendance de UmuDAb et/ou RecA sans présenter cette séquence de fixation dans leur région

BY-NC-ND

promotrice. L'étude de cette voie de régulation serait donc à poursuivre chez ***A. baumannii*.** Pour cela, il serait intéressant de **construire la souche CM152 délétée pour le gène *umuDAb***. Cette dernière pourrait être transformée avec les plasmides recombinants correspondant aux panels construits pendant ce travail et les transformants comparés à nos souches expérimentales. Dans un deuxième temps, on pourrait determiner l'activité des promoteurs Pc et Pint en présence de différents stress induisants la réponse aux dommages de l'ADN chez *A. baumannii*, tels que les rayonnements UV, le méthylmethane sulfonate ou des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques. En effet il a été montré qu'en présence de ces stress, différents gènes étaient induits par la réponse aux dommages de l'ADN chez *A. baumannii* (Norton *et al.*, 2013).

L'intégrase étant responsable de la mobilité des cassettes au sein du réseau, une absence ou une faible expression chez *A. baumannii* devrait être associée à une stabilité du réseau des cassettes. C'est ce que nous avons observé dans les réseaux de notre collection de *A. baumannii* où nous avons trouvé une **redondance assez importante puisque 5 réseaux représentaient 75,2%** (n = 79) de l'ensemble des réseaux caractérisés (n = 105).

BY-NC-ND

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

BY-NC-ND

BY-NC-ND

Dans ce travail de thèse, nous avons montré que les IM1 chez *A. baumannii* avaient des caractéristiques spécifiques aussi bien au niveau de la diversité des réseaux de cassettes qui est assez faible, que de la répartition des variants de Pc en faveur de PcS, mais aussi d'un niveau d'expression de l'intégrase qui semble très faible.

Ce travail sur les intégrons de classe 1 chez *A. baumannii* pourrait être poursuivi selon 4 axes de recherche.

Le premier axe serait l'étude de l'adaptation des IM1 de *A. baumannii* sous pression antibiotique en utilisant le modèle intégron. Cela pourrait se faire par la technique de culture continue en chemostat et permettrait d'étudier l'évolution de PcW d'un intégron synthétique ainsi que l'adaptation au stress des IM1 sous l'influence de la pression de sélection antibiotique sub-inhibitrice, et ce au cours du temps.

Le deuxième axe serait de déterminer si l'intégrase est suffisamment exprimée chez *A. baumanni* pour catalyser des évènements de recombinaison et si les différents variants d'intégrase ont des activités différentes.

Le troisième axe serait de déterminer les voies de régulation de l'intégrase chez *A. baumannii*. La première voie à étudier semble être la réponse aux dommages de l'ADN spécifique de *A. baumannii*. Il faudrait intégrer dans notre modèle d'étude une souche délétée pour *umuDAb* transformée avec nos différents plasmides expérimentaux. L'étude des activités des promoteurs Pc et Pint se ferait en présence de différents stress qui induisent la réponse aux dommages de l'ADN chez *A. baumannii*.

Le quatrième axe serait l'étude de la diversité des IM1 chez *Acinetobacter* sp selon le concept « One Health ». La résistance aux antibiotiques concerne tous les écosystèmes. Il est désormais indispensable d'étudier l'impact de l'activité anthropique sur la dissémination de la résistance dans l'environnement (boues d'épandage, eaux usées, effluents hospitaliers …).

BY-NC-ND

Nous savons que *A. baumanni* a une grande capacité d'adaptation à son environnement local, l'étude de souches non cliniques permettrait d'étudier leur phénotype de résistance, de les typer, de screener les IM et de les caractériser, afin de mieux comprendre leurs différences si elles existent. Notre unité a déjà une expérience dans le domaine environnemental, notamment sur les effluents hospitaliers et a établi différentes collaborations nationales et internationales sur le sujet.

Retombées attendues :

Notre travail permet de mieux comprendre les déterminants de la résistance chez *A. baumannii*, mais aussi d'appréhender les conséquences de l'activité hospitalière sur l'écologie environnementale de cette espèce et la dissémination de la résistance dans l'environnement. Enfin le travail sur la régulation des IM1 alimentera la connaissance de leurs mécanismes de régulation et donc les voies potentielles de lutte contre l'antibio-résistance.

« What's great about bacteria is you have a surprise every day waiting for you because they're so fast, they grow overnight. »
Bonnie Bassler

BY-NC-ND

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abbott, Y., O'Mahony, R., Leonard, N., Quinn, P.J., van der Reijden, T., Dijkshoorn, L., Fanning, S., 2005. Characterization of a 2.6 kbp variable region within a class 1 integron found in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated from a horse. J. Antimicrob. Chemother. 55, 367–370.

Abella, M., Campoy, S., Erill, I., Rojo, F., Barbé, J., 2007. Cohabitation of two different *lexA* regulons in *Pseudomonas putida*. J. Bacteriol. 189, 8855–8862.

Ackerley, D.F., Barak, Y., Lynch, S.V., Curtin, J., Matin, A., 2006. Effect of chromate stress on *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 188, 3371–3381.

Adams, M.D., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K.M., Lavender, H., Jamison, J.J., MacDonald, I.J., Martin, K.M., Russo, T., Campagnari, A.A., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Gill, S.R., 2008. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Bacteriol. 190, 8053–8064.

Aertsen, A., Michiels, C.W., 2005. Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 58, 1381–1391.

Aertsen, A., Van Houdt, R., Vanoirbeek, K., Michiels, C.W., 2004. An SOS response induced by high pressure in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 186, 6133–6141.

Ahmed, A.M., Nakano, H., Shimamoto, T., 2005. Molecular characterization of integrons in non-typhoid *Salmonella* serovars isolated in Japan: description of an unusual class 2 integron. J. Antimicrob. Chemother. 55, 371–374.

Al Atrouni, A., Joly-Guillou, M.-L., Hamze, M., Kempf, M., 2016. Reservoirs of Non-baumannii Acinetobacter Species. Front. Microbiol. 7, 49.

Al Bayssari, C., Dabboussi, F., Hamze, M., Rolain, J.-M., 2015. Emergence of carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in livestock animals in Lebanon. J. Antimicrob. Chemother. 70, 950–951.

Alonso, A., Campanario, E., Martínez, J.L., 1999. Emergence of multidrug-resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa*. Microbiol. Read. Engl. 145 (Pt 10), 2857–2862.

Alves, M.S., Pereira, A., Araújo, S.M., Castro, B.B., Correia, A.C.M., Henriques, I., 2014. Seawater is a reservoir of multi-resistant *Escherichia coli*, including strains hosting plasmid-mediated quinolones resistance and extended-spectrum beta-lactamases genes. Front. Microbiol. 5, 426.

Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Näslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., Kurland, C.G., 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. Nature 396, 133–140.

Antunes, L.C.S., Visca, P., Towner, K.J., 2014. *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. Pathog. Dis. 71, 292–301.

Antunes, P., Machado, J., Peixe, L., 2007. Dissemination of sul3-containing elements linked to class 1 integrons with an unusual 3' conserved sequence region among *Salmonella* isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 1545–1548.

Antunes, P., Machado, J., Sousa, J.C., Peixe, L., 2004. Dissemination amongst humans and food products of animal origin of a *Salmonella typhimurium* clone expressing an integron-borne OXA-30 beta-lactamase. J. Antimicrob. Chemother. 54, 429–434.

BY-NC-ND

Apisarnthanarak, A., Khawcharoenporn, T., Mundy, L.M., 2013. Patterns of nosocomial infections, multidrug-resistant microorganisms, and mold detection after extensive black-water flooding: a survey from central Thailand. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 34, 861–863.

Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., Ohta, M., 1995. A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 1612–1615.

Aranda, J., Bardina, C., Beceiro, A., Rumbo, S., Cabral, M.P., Barbé, J., Bou, G., 2011. *Acinetobacter baumannii* RecA protein in repair of DNA damage, antimicrobial resistance, general stress response, and virulence. J. Bacteriol. 193, 3740–3747.

Aranda, J., López, M., Leiva, E., Magán, A., Adler, B., Bou, G., Barbé, J., 2014. Role of *Acinetobacter baumannii* UmuD homologs in antibiotic resistance acquired through DNA damage-induced mutagenesis. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 1771–1773.

Aranda, J., Poza, M., Shingu-Vázquez, M., Cortés, P., Boyce, J.D., Adler, B., Barbé, J., Bou, G., 2013. Identification of a DNA-damage-inducible regulon in *Acinetobacter baumannii*. J. Bacteriol. 195, 5577–5582.

Argos, P., Landy, A., Abremski, K., Egan, J.B., Haggard-Ljungquist, E., Hoess, R.H., Kahn, M.L., Kalionis, B., Narayana, S.V., Pierson, L.S., 1986. The integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. EMBO J. 5, 433–440.

Asadollahi, K., Taherikalani, M., Maleki, A., Alizadeh, E., Valadbaigi, H., Soroush, S., Maleki, H., Asadollahi, P., Emaneini, M., 2011. Diversity of aminoglycoside modifying enzyme genes among multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes isolated from nosocomial infections in Tehran hospitals and their association with class 1 integrons. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 58, 359–370.

Baharoglu, Z., Bikard, D., Mazel, D., 2010. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. PLoS Genet. 6, e1001165.

Baharoglu, Z., Krin, E., Mazel, D., 2012. Connecting environment and genome plasticity in the characterization of transformation-induced SOS regulation and carbon catabolite control of the *Vibrio cholerae* integron integrase. J. Bacteriol. 194, 1659–1667.

Baharoglu, Z., Mazel, D., 2014. SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. FEMS Microbiol. Rev. 38, 1126–1145.

Baharoglu, Z., Mazel, D., 2011. *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 2438–2441.

Bailey, J.K., Pinyon, J.L., Anantham, S., Hall, R.M., 2010. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. J. Med. Microbiol. 59, 1331–1339.

Baines, S.L., Holt, K.E., Schultz, M.B., Seemann, T., Howden, B.O., Jensen, S.O., van Hal, S.J., Coombs, G.W., Firth, N., Powell, D.R., Stinear, T.P., Howden, B.P., 2015. Convergent adaptation in the dominant global hospital clone ST239 of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. mBio 6, e00080.

Bardbari, A.M., Arabestani, M.R., Karami, M., Keramat, F., Alikhani, M.Y., Bagheri, K.P., 2017. Correlation between ability of biofilm formation with their responsible genes and MDR patterns in clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates. Microb. Pathog. 108, 122–128.

BY-NC-ND

Barkovskii, A.L., Green, C., Hurley, D., 2010. The occurrence, spatial and temporal distribution, and environmental routes of tetracycline resistance and integrase genes in Crassostrea virginica beds. Mar. Pollut. Bull. 60, 2215–2224.

Barlow, R.S., Gobius, K.S., 2006. Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. J. Antimicrob. Chemother. 58, 1133–1138.

Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M.A.D., Wisplinghoff, H., Rodríguez-Valera, F., 2005. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 43, 4382–4390.

Barraud, O., Badell, E., Denis, F., Guiso, N., Ploy, M.-C., 2011. Antimicrobial drug resistance in *Corynebacterium diphtheriae mitis*. Emerg. Infect. Dis. 17, 2078–2080.

Barraud, O., Isnard, C., Lienhard, R., Guérin, F., Couvé-Deacon, E., Martin, C., Cattoir, V., Ploy, M.C., 2016. Sulphonamide resistance associated with integron derivative Tn6326 in *Actinotignum schaalii*. J. Antimicrob. Chemother. 71, 2670–2671.

Barraud, O., Ploy, M.-C., 2015. Diversity of Class 1 Integron Gene Cassette Rearrangements Selected under Antibiotic Pressure. J. Bacteriol. 197, 2171–2178.

Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M.A.D., Wisplinghoff, H., Rodríguez-Valera, F., 2005. Development of a multilocus sequence typing scheme for characterization of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 43, 4382–4390.

Beaber, J.W., Hochhut, B., Waldor, M.K., 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature 427, 72–74.

Belmonte, O., Pailhoriès, H., Kempf, M., Gaultier, M.P., Lemarié, C., Ramont, C., Joly-Guillou, M.L., Eveillard, M., 2014. High prevalence of closely-related *Acinetobacter baumannii* in pets according to a multicentre study in veterinary clinics, Reunion Island. Vet. Microbiol. 170, 446–450.

Bengtsson-Palme, J., Angelin, M., Huss, M., Kjellqvist, S., Kristiansson, E., Palmgren, H., Larsson, D.G.J., Johansson, A., 2015. The Human Gut Microbiome as a Transporter of Antibiotic Resistance Genes between Continents. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 6551–6560.

Bennett, P.M., 1999. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. J. Antimicrob. Chemother. 43, 1–4.

Bergogne-Bérézin, E., Towner, K.J., 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 9, 148–165.

Berlau, J., Aucken, H.M., Houang, E., Pitt, T.L., 1999. Isolation of *Acinetobacter* spp. including *A. baumannii* from vegetables: implications for hospital-acquired infections. J. Hosp. Infect. 42, 201–204.

Binh, C.T.T., Heuer, H., Kaupenjohann, M., Smalla, K., 2009. Diverse *aadA* gene cassettes on class 1 integrons introduced into soil via spread manure. Res. Microbiol. 160, 427–433. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.06.005

Bischoff, K.M., White, D.G., Hume, M.E., Poole, T.L., Nisbet, D.J., 2005. The chloramphenicol resistance gene cmlA is disseminated on transferable plasmids that confer multiple-drug resistance in swine *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 243, 285–291.

Biskri, L., Mazel, D., 2003. Erythromycin esterase gene *ere(A)* is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3326–3331.

Bissonnette, L., Roy, P.H., 1992. Characterization of In0 of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 174, 1248–1257.

BY-NC-ND

Björkman, J., Hughes, D., Andersson, D.I., 1998. Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95, 3949–3953.

Blackwell, G.A., Hamidian, M., Hall, R.M., 2016. IncM Plasmid R1215 Is the Source of Chromosomally Located Regions Containing Multiple Antibiotic Resistance Genes in the Globally Disseminated *Acinetobacter baumannii* GC1 and GC2 Clones. mSphere 1.

Blackwell, G.A., Holt, K.E., Bentley, S.D., Hsu, L.Y., Hall, R.M., 2017. Variants of AbGRI3 carrying the *armA* gene in extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* from Singapore. J. Antimicrob. Chemother. 72, 1031–1039.

Blackwell, G.A., Nigro, S.J., Hall, R.M., 2015. Evolution of AbGRI2-0, the Progenitor of the AbGRI2 Resistance Island in Global Clone 2 of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 60, 1421–1429.

Bordenave, S., Goñi-Urriza, M.S., Caumette, P., Duran, R., 2007. Effects of heavy fuel oil on the bacterial community structure of a pristine microbial mat. Appl. Environ. Microbiol. 73, 6089–6097.

Boucher, Y., Cordero, O.X., Takemura, A., Hunt, D.E., Schliep, K., Bapteste, E., Lopez, P., Tarr, C.L., Polz, M.F., 2011. Local mobile gene pools rapidly cross species boundaries to create endemicity within global *Vibrio cholerae* populations. mBio 2.

Bouvet, P.J.M., Grimont, P.A.D., 1986. Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 36, 228–240.

Bouvier, M., Demarre, G., Mazel, D., 2005. Integron cassette insertion: a recombination process involving a folded single strand substrate. EMBO J. 24, 4356–4367.

Bouvier, M., Ducos-Galand, M., Loot, C., Bikard, D., Mazel, D., 2009. Structural features of single-stranded integron cassette attC sites and their role in strand selection. PLoS Genet. 5, e1000632.

Brooks, P.C., Movahedzadeh, F., Davis, E.O., 2001. Identification of some DNA damage-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis*: apparent lack of correlation with LexA binding. J. Bacteriol. 183, 4459–4467.

Burr, T., Mitchell, J., Kolb, A., Minchin, S., Busby, S., 2000. DNA sequence elements located immediately upstream of the -10 hexamer in *Escherichia coli* promoters: a systematic study. Nucleic Acids Res. 28, 1864–1870.

Butala, M., Klose, D., Hodnik, V., Rems, A., Podlesek, Z., Klare, J.P., Anderluh, G., Busby, S.J.W., Steinhoff, H.-J., Zgur-Bertok, D., 2011. Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. Nucleic Acids Res. 39, 6546–6557.

Butala, M., Zgur-Bertok, D., Busby, S.J.W., 2009. The bacterial LexA transcriptional repressor. Cell. Mol. Life Sci. CMLS 66, 82–93.

Byrne-Bailey, K.G., Gaze, W.H., Zhang, L., Kay, P., Boxall, A., Hawkey, P.M., Wellington, E.M.H., 2011. Integron prevalence and diversity in manured soil. Appl. Environ. Microbiol. 77, 684–687.

Cai, Y., Yang, J., Kan, Q., Nie, X., Wang, R., Liang, B., Bai, N., 2012. Mutant prevention concentration of colistin alone and in combination with levofloxacin or tobramycin against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents 40, 477–478.

Cambray, G., Guerout, A.-M., Mazel, D., 2010. Integrons. Annu. Rev. Genet. 44, 141–166.

BY-NC-ND

Campoy, S., Mazón, G., Fernández de Henestrosa, A.R., Llagostera, M., Monteiro, P.B., Barbé, J., 2002. A new regulatory DNA motif of the gamma subclass *Proteobacteria*: identification of the LexA protein binding site of the plant pathogen *Xylella fastidiosa*. Microbiol. Read. Engl. 148, 3583–3597.

Campoy, S., Salvador, N., Cortés, P., Erill, I., Barbé, J., 2005. Expression of canonical SOS genes is not under LexA repression in *Bdellovibrio bacteriovorus*. J. Bacteriol. 187, 5367–5375.

Casella, L.G., Weiss, A., Pérez-Rueda, E., Antonio Ibarra, J., Shaw, L.N., 2017. Towards the complete proteinaceous regulome of *Acinetobacter baumannii*. Microb. Genomics 3, mgen000107.

Caucci, S., Karkman, A., Cacace, D., Rybicki, M., Timpel, P., Voolaid, V., Gurke, R., Virta, M., Berendonk, T.U., 2016. Seasonality of antibiotic prescriptions for outpatients and resistance genes in sewers and wastewater treatment plant outflow. FEMS Microbiol. Ecol. 92, fiw060.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2004. *Acinetobacter baumannii* infections among patients at military medical facilities treating injured U.S. service members, 2002-2004. MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep. 53, 1063–1066.

Chainier, D., Barraud, O., Masson, G., Couve-Deacon, E., François, B., Couquet, C.-Y., Ploy, M.-C., 2017. Integron Digestive Carriage in Human and Cattle: A “One Health” Cultivation-Independent Approach. Front. Microbiol. 8, 1891.

Chang, H.-L., Tang, C.-H., Hsu, Y.-M., Wan, L., Chang, Y.-F., Lin, C.-T., Tseng, Y.-R., Lin, Y.-J., Sheu, J.J.-C., Lin, C.-W., Chang, Y.-C., Ho, M.-W., Lin, C.-D., Ho, C.-M., Lai, C.-H., 2009. Nosocomial outbreak of infection with multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in a medical center in Taiwan. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 30, 34–38.

Chang, Y.-C., Shih, D.Y.-C., Wang, J.-Y., Yang, S.-S., 2007. Molecular characterization of class 1 integrons and antimicrobial resistance in *Aeromonas* strains from foodborne outbreak-suspect samples and environmental sources in Taiwan. Diagn. Microbiol. Infect. 59,191-197.

Charpentier, X., Kay, E., Schneider, D., Shuman, H.A., 2011. Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in *Legionella pneumophila*. J. Bacteriol. 193, 1114–1121.

Charpentier, X., Polard, P., Claverys, J.-P., 2012. Induction of competence for genetic transformation by antibiotics: convergent evolution of stress responses in distant bacterial species lacking SOS? Curr. Opin. Microbiol. 15, 570–576.

Chen, S., Zhao, S., White, D.G., Schroeder, C.M., Lu, R., Yang, H., McDermott, P.F., Ayers, S., Meng, J., 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. Appl. Environ. Microbiol. 70, 1–7.

Chen, X., Li, G.X., Zhang, H., Yuan, M., Hou, X.P., Yu, H.L., Li, J., 2013. Characterization of class 1 integron gene cassettes among clinical bacteria isolated from one large hospital in northern China. Biomed. Environ. Sci. BES 26, 1003–1007.

Cheo, D.L., Bayles, K.W., Yasbin, R.E., 1991. Cloning and characterization of DNA damage-inducible promoter regions from *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 173, 1696–1703.

Chopra, T., Marchaim, D., Awali, R.A., Krishna, A., Johnson, P., Tansek, R., Chaudary, K., Lephart, P., Slim, J., Hothi, J., Ahmed, H., Pogue, J.M., Zhao, J.J., Kaye, K.S., 2013. Epidemiology of bloodstream infections caused by *Acinetobacter baumannii* and impact of drug resistance to both carbapenems and ampicillin-sulbactam on clinical outcomes. Antimicrob. Agents Chemother. 57, 6270–6275.

BY-NC-ND

Chopra, T., Marchaim, D., Johnson, P.C., Awali, R.A., Doshi, H., Chalana, I., Davis, N., Zhao, J.J., Pogue, J.M., Parmar, S., Kaye, K.S., 2014. Risk factors and outcomes for patients with bloodstream infection due to *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 4630–4635.

Chung, D.R., Song, J.-H., Kim, S.H., Thamlikitkul, V., Huang, S.-G., Wang, H., So, T.M.-K., Yasin, R.M.D., Hsueh, P.-R., Carlos, C.C., Hsu, L.Y., Buntaran, L., Lalitha, M.K., Kim, M.J., Choi, J.Y., Kim, S.I., Ko, K.S., Kang, C.-I., Peck, K.R., Asian Network for Surveillance of Resistant Pathogens Study Group, 2011. High prevalence of multidrug-resistant nonfermenters in hospital-acquired pneumonia in Asia. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 184, 1409–1417.

Cirz, R.T., O'Neill, B.M., Hammond, J.A., Head, S.R., Romesberg, F.E., 2006. Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS response and its role in the global response to the antibiotic ciprofloxacin. J. Bacteriol. 188, 7101–7110.

Çıçek, A.Ç., Düzgün, A.Ö., Saral, A., Kayman, T., Çızmecı, Z., Balcı, P.Ö., Dal, T., Fırat, M., Tosun, İ., Alıtntop, Y.A., Çalışkan, A., Yazıcı, Y., Sandallı, C., 2013. Detection of class 1 integron in *Acinetobacter baumannii* isolates collected from nine hospitals in Turkey. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 3, 743–747.

Clark, C.A., Purins, L., Kaewrakon, P., Focareta, T., Manning, P.A., 2000. The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. Microbiol. Read. Engl. 146 (Pt 10), 2605–2612.

Cocchi, S., Grasselli, E., Gutacker, M., Benagli, C., Convert, M., Piffaretti, J.-C., 2007. Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 50, 126–132.

Collis, C.M., Grammaticopoulos, G., Briton, J., Stokes, H.W., Hall, R.M., 1993. Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. Mol. Microbiol. 9, 41–52.

Collis, C.M., Hall, R.M., 2004. Comparison of the structure-activity relationships of the integron-associated recombination sites *attI3* and *attI1* reveals common features. Microbiol. Read. Engl. 150, 1591–1601.

Collis, C.M., Hall, R.M., 1995. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob. Agents Chemother. 39, 155–162.

Collis, C.M., Hall, R.M., 1992. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. Mol. Microbiol. 6, 2875–2885.

Collis, C.M., Kim, M.-J., Partridge, S.R., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2002a. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. J. Bacteriol. 184, 3017–3026.

Collis, C.M., Kim, M.-J., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2002b. Integron-encoded IntI integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site. Mol. Microbiol. 46, 1415–1427.

Collis, C.M., Recchia, G.D., Kim, M.J., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2001. Efficiency of recombination reactions catalyzed by class 1 integron integrase IntI1. J. Bacteriol. 183, 2535–2542.

Colomb-Cotinat, M., Lacoste, J., Brun-Buisson, C., Jarlier, V., Coignard, B., Vaux, S., 2016. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. Antimicrob. Resist. Infect. Control 5, 56.

Correia, M., Boavida, F., Grosso, F., Salgado, M.J., Lito, L.M., Cristino, J.M., Mendo, S., Duarte, A., 2003. Molecular characterization of a new class 3 integron in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 2838–2843.

BY-NC-ND

Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P.O., Hanawalt, P.C., 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. Genetics 158, 41–64.

Cox, M.M., 2007. Regulation of bacterial RecA protein function. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 42, 41–63.

Cox, M.M., 2003. The bacterial RecA protein as a motor protein. Annu. Rev. Microbiol. 57, 551–577.

Cuñé, J., Cullen, P., Mazon, G., Campoy, S., Adler, B., Barbe, J., 2005. The *Leptospira interrogans* lexA gene is not autoregulated. J. Bacteriol. 187, 5841–5845.

Da Re, S., Garnier, F., Guérin, E., Campoy, S., Denis, F., Ploy, M.-C., 2009. The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. EMBO Rep. 10, 929–933.

Da Re, S., Ploy, M.-C., 2012. [Resistance acquisition via the bacterial SOS response: the inducive role of antibiotics]. Med. Sci. MS 28, 179–184.

Dallo, S.F., Weitao, T., 2010. Insights into *Acinetobacter* war-wound infections, biofilms, and control. Adv. Skin Wound Care 23, 169–174. https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000363527.08501.a3

Darmon, E., Leach, D.R.F., 2014. Bacterial genome instability. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 78, 1–39.

Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., Yu, G., 2015. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 14, 45.

Deylam Salehi, M., Ferdosi-Shahandashti, E., Yahyapour, Y., Khafri, S., Pournajaf, A., Rajabnia, R., 2017. Integron-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii* Isolated from Intensive Care Unit Patients, Babol, North of Iran. BioMed Res. Int. 2017, 7157923.

Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., Brisse, S., 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. PloS One 5, e10034.

Díaz, M.A., Cooper, R.K., Cloeckaert, A., Siebeling, R.J., 2006. Plasmid-mediated high-level gentamicin resistance among enteric bacteria isolated from pet turtles in Louisiana. Appl. Environ. Microbiol. 72, 306–312.

Díaz-Mejía, J.J., Amábile-Cuevas, C.F., Rosas, I., Souza, V., 2008. An analysis of the evolutionary relationships of integron integrases, with emphasis on the prevalence of class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from clinical and environmental origins. Microbiol. Read. Engl. 154, 94–102.

Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M.E., Garaizar, J., Ursing, J., Pitt, T.L., 1996. Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. J. Clin. Microbiol. 34, 1519–1525.

Doi, Y., Murray, G.L., Peleg, A.Y., 2015. *Acinetobacter baumannii*: evolution of antimicrobial resistance-treatment options. Semin. Respir. Crit. Care Med. 36, 85–98.

Dolejska, M., Cizek, A., Literak, I., 2007. High prevalence of antimicrobial-resistant genes and integrons in *Escherichia coli* isolates from Black-headed Gulls in the Czech Republic. J. Appl. Microbiol. 103, 11–19.

Domingues, S., da Silva, G.J., Nielsen, K.M., 2015. Global dissemination patterns of common gene cassette arrays in class 1 integrons. Microbiol. Read. Engl. 161, 1313–1337.

Dorer, M.S., Fero, J., Salama, N.R., 2010. DNA damage triggers genetic exchange in *Helicobacter pylori*. PLoS Pathog. 6, e1001026.

BY-NC-ND

Doten, R.C., Ngai, K.L., Mitchell, D.J., Ornston, L.N., 1987. Cloning and genetic organization of the pca gene cluster from *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Bacteriol. 169, 3168–3174.

Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbø, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Peña-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., Krokan, H.E., 2004. Alkylation damage in DNA and RNA--repair mechanisms and medical significance. DNA Repair 3, 1389–1407.

Dubois, V., Parizano, M.-P., Arpin, C., Coulange, L., Bezian, M.-C., Quentin, C., 2007. High genetic stability of integrons in clinical isolates of *Shigella* spp. of worldwide origin. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 1333–1340.

Dudley, E.G., Abe, C., Ghigo, J.-M., Latour-Lambert, P., Hormazabal, J.C., Nataro, J.P., 2006. An IncI1 plasmid contributes to the adherence of the atypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain C1096 to cultured cells and abiotic surfaces. Infect. Immun. 74, 2102–2114.

Duijkeren, E.V., Box, A.T.A., Schellen, P., Houwers, D.J., Fluit, A.C., 2005. Class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* isolated from clinical infections of horses and dogs in the Netherlands. Microb. Drug Resist. Larchmt. N 11, 383–386.

Durbach, S.I., Andersen, S.J., Mizrahi, V., 1997. SOS induction in *mycobacteria*: analysis of the DNA-binding activity of a LexA-like repressor and its role in DNA damage induction of the recA gene from *Mycobacterium smegmatis*. Mol. Microbiol. 26, 643–653.

Eber, M.R., Shardell, M., Schweizer, M.L., Laxminarayan, R., Perencevich, E.N., 2011. Seasonal and temperature-associated increases in gram-negative bacterial bloodstream infections among hospitalized patients. PloS One 6, e25298.

ECDC/EMEA Joint Technical Report: The bacterial challenge: time to react [WWW Document], 2009. . Eur. Cent. Dis. Prev. Control. URL http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/ecdcemea-joint-technical-report-bacterial-challenge-time-react (accessed 10.17.17).

Endimiani, A., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Bertschy, I., Rossano, A., Koch, C., Gerber, V., Francey, T., Bonomo, R.A., Perreten, V., 2011. *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. J. Antimicrob. Chemother. 66, 2248–2254.

Engelstädter, J., Harms, K., Johnsen, P.J., 2016. The evolutionary dynamics of integrons in changing environments. ISME J. 10, 1296–1307.

Enquête nationale de prévalence des infections nosocomiales et des traitements anti-infectieux en établissements de santé, France, mai-juin 2012 / 2013 / Maladies infectieuses / Rapports et synthèses / Publications et outils / Accueil [WWW Document], 2013. URL http://invs.santepubliquefrance.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-infectieuses/2013/Enquete-nationale-de-prevalence-des-infections-nosocomiales-et-des-traitements-anti-infectieux-en-etablissements-de-sante-France-mai-juin-2012 (accessed 11.8.17).

Erill, I., Campoy, S., Barbé, J., 2007. Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. FEMS Microbiol. Rev. 31, 637–656.

Escudero, J.A., Loot, C., Nivina, A., Mazel, D., 2015. The Integron: Adaptation On Demand. Microbiol. Spectr. 3, MDNA3-0019-2014.

Eveillard, M., Kempf, M., Belmonte, O., Pailhoriès, H., Joly-Guillou, M.-L., 2013. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis. 17, e802-805.

BY-NC-ND

Ewers, C., Klotz, P., Leidner, U., Stamm, I., Prenger-Berninghoff, E., Göttig, S., Semmler, T., Scheufen, S., 2017. OXA-23 and ISAba1-OXA-66 class D β-lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates from companion animals. Int. J. Antimicrob. Agents 49, 37–44.

Eyre, D.W., Golubchik, T., Gordon, N.C., Bowden, R., Piazza, P., Batty, E.M., Ip, C.L.C., Wilson, D.J., Didelot, X., O'Connor, L., Lay, R., Buck, D., Kearns, A.M., Shaw, A., Paul, J., Wilcox, M.H., Donnelly, P.J., Peto, T.E.A., Walker, A.S., Crook, D.W., 2012. A pilot study of rapid benchtop sequencing of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium difficile* for outbreak detection and surveillance. BMJ Open 2. https://doi.org/10.1136/bmjopen-2012-001124

Falagas, M.E., Karveli, E.A., Siempos, I.I., Vardakas, K.Z., 2008. *Acinetobacter* infections: a growing threat for critically ill patients. Epidemiol. Infect. 136, 1009–1019.

Fernández de Henestrosa, A.R., Cuñé, J., Mazón, G., Dubbels, B.L., Bazylinski, D.A., Barbé, J., 2003. Characterization of a new LexA binding motif in the marine magnetotactic bacterium strain MC-1. J. Bacteriol. 185, 4471–4482.

Fernández De Henestrosa, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H., Woodgate, R., 2000. Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 35, 1560–1572.

Fernández de Henestrosa, A.R., Rivera, E., Tapias, A., Barbé, J., 1998. Identification of the *Rhodobacter sphaeroides* SOS box. Mol. Microbiol. 28, 991–1003.

Ferreira da Silva, M., Vaz-Moreira, I., Gonzalez-Pajuelo, M., Nunes, O.C., Manaia, C.M., 2007. Antimicrobial resistance patterns in *Enterobacteriaceae* isolated from an urban wastewater treatment plant. FEMS Microbiol. Ecol. 60, 166–176.

Ferreira, S., Paradela, A., Velez, J., Ramalheira, E., Walsh, T.R., Mendo, S., 2010. Carriage of *qnrA1* and *qnrB2*, blaCTX-M15, and complex class 1 integron in a clinical multiresistant *Citrobacter freundii* isolate. Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 67, 188–190.

Fling, M.E., Richards, C., 1983. The nucleotide sequence of the trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase gene harbored by Tn*7*. Nucleic Acids Res. 11, 5147–5158.

Flores, C., Qadri, M.I., Lichtenstein, C., 1990. DNA sequence analysis of five genes; *tnsA, B, C, D* and *E*, required for Tn*7* transposition. Nucleic Acids Res. 18, 901–911.

Fluit, A.C., Schmitz, F.-J., 2004. Resistance integrons and super-integrons. Clin. Microbiol. Infect. 10, 272–288.

Fonseca, É.L., Freitas, F. dos S., Scheidegger, É.M.D., Jacinto, T., Vicente, A.C.P., 2011. Class 2 integrons in multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in different Brazilian geographic regions. Int. J. Antimicrob. Agents 38, 95–96.

Fournier, P.E., Richet, H., 2006. The epidemiology and control of *Acinetobacter baumannii* in health care facilities. Clin. Infect. Dis. 42, 692–699.

Fournier, P.-E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., Claverie, J.-M., 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. PLoS Genet. 2, e7.

Francia, M.V., de la Cruz, F., García Lobo, J.M., 1993. Secondary-sites for integration mediated by the Tn*21* integrase. Mol. Microbiol. 10, 823–828.

Francia, M.V., Zabala, J.C., de la Cruz, F., García Lobo, J.M., 1999. The IntI1 integron integrase preferentially binds single-stranded DNA of the *attC* site. J. Bacteriol. 181, 6844–6849.

Freire, M.P., de Oliveira Garcia, D., Garcia, C.P., Campagnari Bueno, M.F., Camargo, C.H., Kono Magri, A.S.G., Francisco, G.R., Reghini, R., Vieira, M.F., Ibrahim, K.Y., Rossi, F., Hajjar, L., Levin, A.S., Hoff, P.M., Pierrotti, L.C., Abdala, E., 2016. Bloodstream infection caused

BY-NC-ND

by extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* in cancer patients: high mortality associated with delayed treatment rather than with the degree of neutropenia. Clin. Microbiol. Infect. 22, 352–358.
Friedman, M., 2015. Antibiotic-resistant bacteria: prevalence in food and inactivation by food-compatible compounds and plant extracts. J. Agric. Food Chem. 63, 3805–3822.
Friedman, N., Vardi, S., Ronen, M., Alon, U., Stavans, J., 2005. Precise Temporal Modulation in the Response of the SOS DNA Repair Network in Individual Bacteria. PLoS Biol. 3.
Fukuta, Y., Clarke, L.G., Shields, R.K., Wagener, M.M., Pasculle, A.W., Doi, Y., 2012. Lack of seasonality in the occurrence of multidrug-resistant *Acinectobacter baumannii* complex. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 33, 1051–1052.
Gales, A.C., Jones, R.N., Sader, H.S., 2006. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). Clin. Microbiol. Infect. 12, 315–321.
Gao, L., Lyu, Y., Li, Y., 2017. Trends in Drug Resistance of *Acinetobacter baumannii* over a 10-year Period: Nationwide Data from the China Surveillance of Antimicrobial Resistance Program. Chin. Med. J. (Engl.) 130, 659–664.
Garcia-Garcera, M., Touchon, M., Brisse, S., Rochaa, E.P., 2017. Metagenomic assessment of the interplay between the environment and the genetic diversification of Acinetobacter. Environ. Microbiol. doi: 10.1111/1462-2920.13949.
Gasc, A.M., Sicard, N., Claverys, J.P., Sicard, A.M., 1980. Lack of SOS repair in *Streptococcus pneumoniae*. Mutat. Res. 70, 157–165.
Gassama Sow, A., Aïdara-Kane, A., Barraud, O., Gatet, M., Denis, F., Ploy, M.C., 2010. High prevalence of trimethoprim-resistance cassettes in class 1 and 2 integrons in Senegalese *Shigella* spp isolates. J. Infect. Dev. Ctries. 4, 207–212.
Gassama Sow, A., Diallo, M.H., Gatet, M., Denis, F., Aïdara-Kane, A., Ploy, M.-C., 2008. Description of an unusual class 2 integron in *Shigella sonnei* isolates in Senegal (sub-Saharan Africa). J. Antimicrob. Chemother. 62, 843–844.
Giese, K.C., Michalowski, C.B., Little, J.W., 2008. RecA-dependent cleavage of LexA dimers. J. Mol. Biol. 377, 148–161.
Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S., Holley, M., Stokes, H.W., 2008. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. J. Bacteriol. 190, 5095–5100.
Gillings, M.R., 2017. Class 1 integrons as invasive species. Curr. Opin. Microbiol. 38, 10–15.
Gillings, M.R., 2014. Integrons: past, present, and future. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 78, 257–277.
Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M., Zhu, Y.-G., 2015. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. ISME J. 9, 1269–1279.
Gillings, M.R., Holley, M.P., Stokes, H.W., Holmes, A.J., 2005. Integrons in *Xanthomonas*: a source of species genome diversity. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102, 4419–4424.
Gillings, M.R., Krishnan, S., Worden, P.J., Hardwick, S.A., 2008. Recovery of diverse genes for class 1 integron-integrases from environmental DNA samples. FEMS Microbiol. Lett. 287, 56–62.
Girlich, D., Bonnin, R.A., Jousset, A., Naas, T., 2017. Promoter characterization and expression of the blaKPC-2 gene in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 72, 1597–1601.

BY-NC-ND

Goldstein, C., Lee, M.D., Sanchez, S., Hudson, C., Phillips, B., Register, B., Grady, M., Liebert, C., Summers, A.O., White, D.G., Maurer, J.J., 2001. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 723–726.

Gonzalez, G., Sossa, K., Bello, H., Dominguez, M., Mella, S., Zemelman, R., 1998. Presence of integrons in isolates of different biotypes of *Acinetobacter baumannii* from Chilean hospitals. FEMS Microbiol. Lett. 161, 125–128.

Gopaul, D.N., Duyne, G.D., 1999. Structure and mechanism in site-specific recombination. Curr. Opin. Struct. Biol. 9, 14–20.

Grainge, I., Jayaram, M., 1999. The integrase family of recombinase: organization and function of the active site. Mol. Microbiol. 33, 449–456.

Gravel, A., Fournier, B., Roy, P.H., 1998. DNA complexes obtained with the integron integrase IntI1 at the *attI1* site. Nucleic Acids Res. 26, 4347–4355.

Greene, C., Vadlamudi, G., Newton, D., Foxman, B., Xi, C., 2016. The influence of biofilm formation and multidrug resistance on environmental survival of clinical and environmental isolates of *Acinetobacter baumannii*. Am. J. Infect. Control 44, e65-71.

Greener, A., Lehman, S.M., Helinski, D.R., 1992. Promoters of the broad host range plasmid RK2: analysis of transcription (initiation) in five species of gram-negative bacteria. Genetics 130, 27–36.

Griffith, M.E., Ceremuga, J.M., Ellis, M.W., Guymon, C.H., Hospenthal, D.R., Murray, C.K., 2006. *Acinetobacter* skin colonization of US Army Soldiers. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 27, 659–661.

Grundmann, H.J., Towner, K.J., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Maher, M., Seifert, H., Vaneechoutte, M., 1997. Multicenter study using standardized protocols and reagents for evaluation of reproducibility of PCR-based fingerprinting of *Acinetobacter* spp. J. Clin. Microbiol. 35, 3071–3077.

Guérin, E., Cambray, G., Da Re, S., Mazel, D., Ploy, M.-C., 2010. The SOS response controls antibiotic resistance by regulating the integrase of integrons. Med. Sci. MS 26, 28–30.

Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.-C., Mazel, D., 2009. The SOS response controls integron recombination. Science 324, 1034.

Guérin, E., Jové, T., Tabesse, A., Mazel, D., Ploy, M.-C., 2011. High-level gene cassette transcription prevents integrase expression in class 1 integrons. J. Bacteriol. 193, 5675–5682.

Guerra, B., Fischer, J., Helmuth, R., 2014. An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. Vet. Microbiol. 171, 290–297.

Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., Andersson, D.I., 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. PLoS Pathog. 7, e1002158.

Hall, R.M., Brookes, D.E., Stokes, H.W., 1991. Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. Mol. Microbiol. 5, 1941–1959.

Hall, R.M., Brown, H.J., Brookes, D.E., Stokes, H.W., 1994. Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. J. Bacteriol. 176, 6286–6294.

Hall, R.M., Collis, C.M., 1995. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. Mol. Microbiol. 15, 593–600.

BY-NC-ND

Hall, R.M., Collis, C.M., Kim, M.J., Partridge, S.R., Recchia, G.D., Stokes, H.W., 1999. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. Ann. N. Y. Acad. Sci. 870, 68–80.

Hamidian, M., Hall, R.M., 2017. Origin of the AbGRI1 antibiotic resistance island found in the *comM* gene of *Acinetobacter baumannii* GC2 isolates. J. Antimicrob. Chemother. 72, 2944–2947.

Hamidian, M., Nigro, S.J., Hall, R.M., 2017. Problems with the Oxford Multilocus Sequence Typing Scheme for *Acinetobacter baumannii*: Do Sequence Type 92 (ST92) and ST109 Exist? J. Clin. Microbiol. 55, 2287–2289.

Hamouda, A., Evans, B.A., Towner, K.J., Amyes, S.G.B., 2010. Characterization of epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates from four continents by use of multilocus sequence typing, pulsed-field gel electrophoresis, and sequence-based typing of *bla(OXA-51-like)* genes. J. Clin. Microbiol. 48, 2476–2483.

Hamouda, A., Findlay, J., Al Hassan, L., Amyes, S.G.B., 2011. Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. Int. J. Antimicrob. Agents 38, 314–318.

Hanau-Berçot, B., Podglajen, I., Casin, I., Collatz, E., 2002. An intrinsic control element for translational initiation in class 1 integrons. Mol. Microbiol. 44, 119–130.

Hansson, K., Sundström, L., Pelletier, A., Roy, P.H., 2002. IntI2 integron integrase in Tn*7*. J. Bacteriol. 184, 1712–1721.

Hare, J.M., Adhikari, S., Lambert, K.V., Hare, A.E., Grice, A.N., 2012. The *Acinetobacter* regulatory UmuDAb protein cleaves in response to DNA damage with chimeric LexA/UmuD characteristics. FEMS Microbiol. Lett. 334, 57–65.

Hare, J.M., Ferrell, J.C., Witkowski, T.A., Grice, A.N., 2014. Prophage induction and differential RecA and UmuDAb transcriptome regulation in the DNA damage responses of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter baylyi*. PloS One 9, e93861.

Hare, J.M., Perkins, S.N., Gregg-Jolly, L.A., 2006. A constitutively expressed, truncated *umuDC* operon regulates the recA-dependent DNA damage induction of a gene in *Acinetobacter baylyi* strain ADP1. Appl. Environ. Microbiol. 72, 4036–4043.

Harms, K., Starikova, I., Johnsen, P.J., 2013. Costly Class-1 integrons and the domestication of the the functional integrase. Mob. Genet. Elem. 3, e24774.

Henriques, I.S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M.J., Correia, A., 2006. Occurrence and diversity of integrons and beta-lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters. Res. Microbiol. 157, 938–947.

Higgins, P.G., Dammhayn, C., Hackel, M., Seifert, H., 2010. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 65, 233–238.

Hochhut, B., Lotfi, Y., Mazel, D., Faruque, S.M., Woodgate, R., Waldor, M.K., 2001. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 2991–3000.

Hocquet, D., Berthelot, P., Roussel-Delvallez, M., Favre, R., Jeannot, K., Bajolet, O., Marty, N., Grattard, F., Mariani-Kurkdjian, P., Bingen, E., Husson, M.-O., Couetdic, G., Plésiat, P., 2007. *Pseudomonas aeruginosa* may accumulate drug resistance mechanisms without losing its ability to cause bloodstream infections. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 3531–3536.

Hong, J., Ahn, J.-M., Kim, B.C., Gu, M.B., 2009. Construction of a functional network for common DNA damage responses in *Escherichia coli*. Genomics 93, 514–524.

Horii, T., Ogawa, T., Nakatani, T., Hase, T., Matsubara, H., Ogawa, H., 1981. Regulation of SOS functions: purification of *E. coli* LexA protein and determination of its specific site cleaved by the RecA protein. Cell 27, 515–522.

BY-NC-ND

Houang, E.T., Chu, Y.W., Leung, C.M., Chu, K.Y., Berlau, J., Ng, K.C., Cheng, A.F., 2001. Epidemiology and infection control implications of *Acinetobacter* spp. in Hong Kong. J. Clin. Microbiol. 39, 228–234.

Houang, E.T., Sormunen, R.T., Lai, L., Chan, C.Y., Leong, A.S., 1998. Effect of desiccation on the ultrastructural appearances of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter lwoffii*. J. Clin. Pathol. 51, 786–788.

Hsueh, P.-R., Teng, L.-J., Chen, C.-Y., Chen, W.-H., Yu, C.-J., Ho, S.-W., Luh, K.-T., 2002. Pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* causing nosocomial infections in a university hospital, Taiwan. Emerg. Infect. Dis. 8, 827–832.

Huang, H., Yang, Z.-L., Wu, X.-M., Wang, Y., Liu, Y.-J., Luo, H., Lv, X., Gan, Y.-R., Song, S.-D., Gao, F., 2012. Complete genome sequence of *Acinetobacter baumannii* MDR-TJ and insights into its mechanism of antibiotic resistance. J. Antimicrob. Chemother. 67, 2825–2832.

Hujer, K.M., Hujer, A.M., Hulten, E.A., Bajaksouzian, S., Adams, J.M., Donskey, C.J., Ecker, D.J., Massire, C., Eshoo, M.W., Sampath, R., Thomson, J.M., Rather, P.N., Craft, D.W., Fishbain, J.T., Ewell, A.J., Jacobs, M.R., Paterson, D.L., Bonomo, R.A., 2006. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrob. Agents Chemother. 50, 4114–4123.

Hunger, M., Schmucker, R., Kishan, V., Hillen, W., 1990. Analysis and nucleotide sequence of an origin of DNA replication in Acinetobacter calcoaceticus and its use for *Escherichia coli* shuttle plasmids. Gene 87, 45–51.

Huys, G., Bartie, K., Cnockaert, M., Hoang Oanh, D.T., Phuong, N.T., Somsiri, T., Chinabut, S., Yusoff, F.M., Shariff, M., Giacomini, M., Teale, A., Swings, J., 2007. Biodiversity of chloramphenicol-resistant mesophilic heterotrophs from Southeast Asian aquaculture environments. Res. Microbiol. 158, 228–235.

Imlay, J.A., Linn, S., 1987. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. J. Bacteriol. 169, 2967–2976.

Infectious Diseases Society of America, 2012. White paper: recommendations on the conduct of superiority and organism-specific clinical trials of antibacterial agents for the treatment of infections caused by drug-resistant bacterial pathogens. Clin. Infect. Dis. 55, 1031–1046.

Jacobs, L., Chenia, H.Y., 2007. Characterization of integrons and tetracycline resistance determinants in *Aeromonas* spp. isolated from South African aquaculture systems. Int. J. Food Microbiol. 114, 295–306.

Jacquier, H., Zaoui, C., Sanson-le Pors, M.-J., Mazel, D., Berçot, B., 2009. Translation regulation of integrons gene cassette expression by the *attC* sites. Mol. Microbiol. 72, 1475–1486.

Janion, C., 2008. Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. Int. J. Biol. Sci. 4, 338–344.

Jara, M., Núñez, C., Campoy, S., Fernández de Henestrosa, A.R., Lovley, D.R., Barbé, J., 2003. *Geobacter sulfurreducens* has two autoregulated *lexA* genes whose products do not bind the *recA* promoter: differing responses of *lexA* and *recA* to DNA damage. J. Bacteriol. 185, 2493–2502.

Jiang, Q., Karata, K., Woodgate, R., Cox, M.M., Goodman, M.F., 2009. The active form of DNA polymerase V is UmuD'(2)C-RecA-ATP. Nature 460, 359–363.

Jochmann, N., Kurze, A.-K., Czaja, L.F., Brinkrolf, K., Brune, I., Hüser, A.T., Hansmeier, N., Pühler, A., Borovok, I., Tauch, A., 2009. Genetic makeup of the *Corynebacterium*

BY-NC-ND

glutamicum LexA regulon deduced from comparative transcriptomics and in vitro DNA band shift assays. Microbiol. Read. Engl. 155, 1459–1477.

Johansson, C., Kamali-Moghaddam, M., Sundström, L., 2004. Integron integrase binds to bulged hairpin DNA. Nucleic Acids Res. 32, 4033–4043.

Joly-Guillou, M.-L., 2005. Clinical impact and pathogenicity of *Acinetobacter*. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 11, 868–873.

Jové, T., Da Re, S., Denis, F., Mazel, D., Ploy, M.-C., 2010. Inverse correlation between promoter strength and excision activity in class 1 integrons. PLoS Genet. 6, e1000793.

Jové, T., Da Re, S., Tabesse, A., Gassama-Sow, A., Ploy, M.-C., 2017. Gene Expression in Class 2 Integrons Is SOS-Independent and Involves Two Pc Promoters. Front. Microbiol. 8,

Kaase, M., Szabados, F., Pfennigwerth, N., Anders, A., Geis, G., Pranada, A.B., Rößler, S., Lang, U., Gatermann, S.G., 2014. Description of the metallo-β-lactamase GIM-1 in *Acinetobacter pittii*. J. Antimicrob. Chemother. 69, 81–84.

Kadlec, K., Schwarz, S., 2008. Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. J. Antimicrob. Chemother. 62, 469–473.

Kang, S.G., Lee, D.Y., Shin, S.J., Ahn, J.M., Yoo, H.S., 2005. Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class 1 integron carriage among *Escherichia coli* isolates. J. Vet. Sci. 6, 201–205.

Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R.K., Virdi, J.S., Gulati, P., 2017. Integrons in enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. Int. J. Antimicrob. Agents.

Kempf, M., Rolain, J.-M., 2012. Emergence of resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii* in Europe: clinical impact and therapeutic options. Int. J. Antimicrob. Agents 39, 105–114.

Khaitsa, M.L., Oloya, J., Doetkott, D., Kegode, R., 2008. Antimicrobial resistance and association with class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from turkey meat products. J. Food Prot. 71, 1679–1684.

Khil, P.P., Camerini-Otero, R.D., 2002. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 44, 89–105.

Kishan, V., Hillen, W., 1990. Molecular cloning, nucleotide sequence, and promoter structure of the *Acinetobacter calcoaceticus trpFB* operon. J. Bacteriol. 172, 6151–6155.

Kleppe, R.K., Kleppe, K., 1976. Preparations and properties of ribonucleic acid polymerase from *Acinetobacter calcoaceticus*. J. Bacteriol. 125, 435–443.

Knapp, C.W., Dolfing, J., Ehlert, P.A.I., Graham, D.W., 2010. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. Environ. Sci. Technol. 44, 580–587.

Koczura, R., Przyszlakowska, B., Mokracka, J., Kaznowski, A., 2014. Class 1 integrons and antibiotic resistance of clinical *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex in Poznań, Poland. Curr. Microbiol. 69, 258–262.

Kohanski, M.A., DePristo, M.A., Collins, J.J., 2010. Sublethal antibiotic treatment leads to multidrug resistance via radical-induced mutagenesis. Mol. Cell 37, 311–320.

Kreuzer, K.N., 2013. DNA damage responses in prokaryotes: regulating gene expression, modulating growth patterns, and manipulating replication forks. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5, a012674.

BY-NC-ND

Krizova, L., Dijkshoorn, L., Nemec, A., 2011. Diversity and evolution of AbaR genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 3201–3206.

Kuzminov, A., 1999. Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR 63, 751–813.

Lacotte, Y., Ploy, M.-C., Raherison, S., 2017. Class 1 integrons are low-cost structures in *Escherichia coli*. ISME J. 11, 1535–1544.

Laroche, E., Pawlak, B., Berthe, T., Skurnik, D., Petit, F., 2009. Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). FEMS Microbiol. Ecol. 68, 118–130.

Lavakhamseh, H., Mohajeri, P., Rouhi, S., Shakib, P., Ramazanzadeh, R., Rasani, A., Mansouri, M., 2016. Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strains Isolated from Patients Are Associated with Class 1 and 2 Integrons. Chemotherapy 61, 72–76.

Leão, S.C., Matsumoto, C.K., Carneiro, A., Ramos, R.T., Nogueira, C.L., Lima, J.D., Lima, K.V., Lopes, M.L., Schneider, H., Azevedo, V.A., da Costa da Silva, A., 2013. The detection and sequencing of a broad-host-range conjugative IncP-1β plasmid in an epidemic strain of *Mycobacterium abscessus* subsp. bolletii. PloS One 8, e60746.

Lee, C.-R., Lee, J.H., Park, M., Park, K.S., Bae, I.K., Kim, Y.B., Cha, C.-J., Jeong, B.C., Lee, S.H., 2017. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. Front. Cell. Infect. Microbiol. 7, 55.

Lee, M.-F., Peng, C.-F., Hsu, H.-J., Toh, H.-S., 2011. Use of inverse PCR for analysis of class 1 integrons carrying an unusual 3' conserved segment structure. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 943–945.

Lee, Y., D'Souza, R., Yong, D., Lee, K., 2016. Prediction of Putative Resistance Islands in a Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Global Clone 2 Clinical Isolate. Ann. Lab. Med. 36, 320–324.

Lee, Y.-T., Huang, L.-Y., Chen, T.-L., Siu, L.-K., Fung, C.-P., Cho, W.-L., Yu, K.-W., Liu, C.-Y., 2009. Gene cassette arrays, antibiotic susceptibilities, and clinical characteristics of *Acinetobacter baumannii* bacteremic strains harboring class 1 integrons. J. Microbiol. Immunol. Infect. Wei Mian Yu Gan Ran Za Zhi 42, 210–219.

Leite, G.C., Oliveira, M.S., Perdigão-Neto, L.V., Rocha, C.K.D., Guimarães, T., Rizek, C., Levin, A.S., Costa, S.F., 2016. Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. PloS One 11, e0151270.

Léon, G., Roy, P.H., 2009. Potential role of group IIC-*attC* introns in integron cassette formation. J. Bacteriol. 191, 6040–6051.

Leverstein-van Hall, M.A., M Blok, H.E., T Donders, A.R., Paauw, A., Fluit, A.C., Verhoef, J., 2003. Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. J. Infect. Dis. 187, 251–259.

Leverstein-Van Hall, M.A., Paauw, A., Box, A.T.A., Blok, H.E.M., Verhoef, J., Fluit, A.C., 2002. Presence of integron-associated resistance in the community is widespread and contributes to multidrug resistance in the hospital. J. Clin. Microbiol. 40, 3038–3040.

Lévesque, C., Brassard, S., Lapointe, J., Roy, P.H., 1994. Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. Gene 142, 49–54.

BY-NC-ND

Lewin, C.S., Amyes, S.G., 1991. The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim. J. Med. Microbiol. 34, 329–332.

Lewis, L.K., Harlow, G.R., Gregg-Jolly, L.A., Mount, D.W., 1994. Identification of high affinity binding sites for LexA which define new DNA damage-inducible genes in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 241, 507–523.

Lin, L., Ling, B.-D., Li, X.-Z., 2009. Distribution of the multidrug efflux pump genes, *adeABC*, *adeDE* and *adeIJK*, and class 1 integron genes in multiple-antimicrobial-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii-Acinetobacter calcoaceticus* complex. Int. J. Antimicrob. Agents 33, 27–32.

Lin, M.-F., Lan, C.-Y., 2014. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. World J. Clin. Cases 2, 787–814.

Little, J.W., 1991. Mechanism of specific LexA cleavage: autodigestion and the role of RecA coprotease. Biochimie 73, 411–421.

Little, J.W., Mount, D.W., 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. Cell 29, 11–22.

Liu, C.-C., Tang, C.Y., Chang, K.-C., Kuo, H.-Y., Liou, M.-L., 2014. A comparative study of class 1 integrons in *Acinetobacter baumannii*. Gene 544, 75–82.

Lob, S.H., Hoban, D.J., Sahm, D.F., Badal, R.E., 2016. Regional differences and trends in antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents 47, 317–323.

Loman, N.J., Misra, R.V., Dallman, T.J., Constantinidou, C., Gharbia, S.E., Wain, J., Pallen, M.J., 2012. Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. Nat. Biotechnol. 30, 434–439.

Loot, C., Ducos-Galand, M., Escudero, J.A., Bouvier, M., Mazel, D., 2012. Replicative resolution of integron cassette insertion. Nucleic Acids Res. 40, 8361–8370.

Loot, C., Parissi, V., Escudero, J.A., Amarir-Bouhram, J., Bikard, D., Mazel, D., 2014. The integron integrase efficiently prevents the melting effect of *Escherichia coli* single-stranded DNA-binding protein on folded *attC* sites. J. Bacteriol. 196, 762–771.

Luo, Y., Pfuetzner, R.A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E.A., Cherney, M., Kim, B., Little, J.W., Strynadka, N.C., 2001. Crystal structure of LexA: a conformational switch for regulation of self-cleavage. Cell 106, 585–594.

Lupo, A., Vogt, D., Seiffert, S.N., Endimiani, A., Perreten, V., 2014. Antibiotic resistance and phylogenetic characterization of *Acinetobacter baumannii* strains isolated from commercial raw meat in Switzerland. J. Food Prot. 77, 1976–1981.

Maegele, M., Gregor, S., Steinhausen, E., Bouillon, B., Heiss, M.M., Perbix, W., Wappler, F., Rixen, D., Geisen, J., Berger-Schreck, B., Schwarz, R., 2005. The long-distance tertiary air transfer and care of tsunami victims: injury pattern and microbiological and psychological aspects. Crit. Care Med. 33, 1136–1140.

Maiques, E., Ubeda, C., Campoy, S., Salvador, N., Lasa, I., Novick, R.P., Barbé, J., Penadés, J.R., 2006. beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*. J. Bacteriol. 188, 2726–2729.

Mak, J.K., Kim, M.-J., Pham, J., Tapsall, J., White, P.A., 2009. Antibiotic resistance determinants in nosocomial strains of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 63, 47–54.

Malek, M.M., Amer, F.A., Allam, A.A., El-Sokkary, R.H., Gheith, T., Arafa, M.A., 2015. Occurrence of classes I and II integrons in Enterobacteriaceae collected from Zagazig University Hospitals, Egypt. Front. Microbiol. 6, 601.

BY-NC-ND

Maragakis, L.L., Tucker, M.G., Miller, R.G., Carroll, K.C., Perl, T.M., 2008. Incidence and prevalence of multidrug-resistant acinetobacter using targeted active surveillance cultures. JAMA 299, 2513–2514.

Márquez, C., Labbate, M., Ingold, A.J., Roy Chowdhury, P., Ramírez, M.S., Centrón, D., Borthagaray, G., Stokes, H.W., 2008. Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. Antimicrob. Agents Chemother. 52, 4153–4154.

Martin, C., Timm, J., Rauzier, J., Gomez-Lus, R., Davies, J., Gicquel, B., 1990. Transposition of an antibiotic resistance element in *mycobacteria*. Nature 345, 739–743.

Martinez, T., Martinez, I., Vazquez, G.J., Aquino, E.E., Robledo, I.E., 2016. Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. J. Med. Microbiol. 65, 784–792.

Mazel, D., 2006. Integrons: agents of bacterial evolution. Nat. Rev. Microbiol. 4, 608–620.

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., Davies, J., 1998. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. Science 280, 605–608.

Mazón, G., Lucena, J.M., Campoy, S., Fernández de Henestrosa, A.R., Candau, P., Barbé, J., 2004. LexA-binding sequences in Gram-positive and *cyanobacteria* are closely related. Mol. Genet. Genomics MGG 271, 40–49.

McDonald, L.C., Banerjee, S.N., Jarvis, W.R., 1999. Seasonal variation of *Acinetobacter* infections: 1987-1996. Nosocomial Infections Surveillance System. Clin. Infect. Dis. 29, 1133–1137.

Mellmann, A., Harmsen, D., Cummings, C.A., Zentz, E.B., Leopold, S.R., Rico, A., Prior, K., Szczepanowski, R., Ji, Y., Zhang, W., McLaughlin, S.F., Henkhaus, J.K., Leopold, B., Bielaszewska, M., Prager, R., Brzoska, P.M., Moore, R.L., Guenther, S., Rothberg, J.M., Karch, H., 2011. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. PloS One 6, e22751.

Mendes, R.E., Castanheira, M., Toleman, M.A., Sader, H.S., Jones, R.N., Walsh, T.R., 2007. Characterization of an integron carrying bla_{IMP-1} and a new aminoglycoside resistance gene, *aac(6')-31*, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 2611–2614.

Messier, N., Roy, P.H., 2001. Integron integrases possess a unique additional domain necessary for activity. J. Bacteriol. 183, 6699–6706.

Michel, B., 2005. After 30 years of study, the bacterial SOS response still surprises us. PLoS Biol. 3, e255.

Miko, A., Pries, K., Schroeter, A., Helmuth, R., 2005. Molecular mechanisms of resistance in multidrug-resistant serovars of *Salmonella enterica* isolated from foods in Germany. J. Antimicrob. Chemother. 56, 1025–1033.

Miller, C., Ingmer, H., Thomsen, L.E., Skarstad, K., Cohen, S.N., 2003. DpiA binding to the replication origin of *Escherichia coli* plasmids and chromosomes destabilizes plasmid inheritance and induces the bacterial SOS response. J. Bacteriol. 185, 6025–6031.

Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., Cohen, S.N., 2004. SOS response induction by beta-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. Science 305, 1629–1631.

Mizrahi, V., Andersen, S.J., 1998. DNA repair in *Mycobacterium tuberculosis*. What have we learnt from the genome sequence? Mol. Microbiol. 29, 1331–1339.

BY-NC-ND

Mo, C.Y., Birdwell, L.D., Kohli, R.M., 2014. Specificity determinants for autoproteolysis of LexA, a key regulator of bacterial SOS mutagenesis. Biochemistry (Mosc.) 53, 3158–3168.

Mokracka, J., Koczura, R., Kaznowski, A., 2012. Multiresistant *Enterobacteriaceae* with class 1 and class 2 integrons in a municipal wastewater treatment plant. Water Res. 46, 3353–3363.

Moura, A., Henriques, I., Ribeiro, R., Correia, A., 2007. Prevalence and characterization of integrons from bacteria isolated from a slaughterhouse wastewater treatment plant. J. Antimicrob. Chemother. 60, 1243–1250.

Movahedzadeh, F., Colston, M.J., Davis, E.O., 1997. Determination of DNA sequences required for regulated *Mycobacterium tuberculosis* RecA expression in response to DNA-damaging agents suggests that two modes of regulation exist. J. Bacteriol. 179, 3509–3518.

Mugnier, P.D., Poirel, L., Naas, T., Nordmann, P., 2010. Worldwide dissemination of the *blaOXA-23* carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. Emerg. Infect. Dis. 16, 35–40.

Mukherjee, S., Chakraborty, R., 2006. Incidence of class 1 integrons in multiple antibiotic-resistant Gram-negative copiotrophic bacteria from the River Torsa in India. Res. Microbiol. 157, 220–226.

Naas, T., Benaoudia, F., Massuard, S., Nordmann, P., 2000. Integron-located VEB-1 extended-spectrum beta-lactamase gene in a *Proteus mirabilis* clinical isolate from Vietnam. J. Antimicrob. Chemother. 46, 703–711.

Naas, T., Poirel, L., Nordmann, P., 2006. Pyrosequencing for rapid identification of carbapenem-hydrolysing OXA-type beta-lactamases in *Acinetobacter baumannii*. Clin. Microbiol. Infect. 12, 1236–1240.

Nandi, S., Maurer, J.J., Hofacre, C., Summers, A.O., 2004. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 101, 7118–7122.

Neidle, E.L., Shapiro, M.K., Ornston, L.N., 1987. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation. J. Bacteriol. 169, 5496–5503.

Nemec, A., Dolzani, L., Brisse, S., van den Broek, P., Dijkshoorn, L., 2004. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. J. Med. Microbiol. 53, 1233–1240.

Nesvera, J., Hochmannová, J., Pátek, M., 1998. An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. FEMS Microbiol. Lett. 169, 391–395.

Nigro, S.J., Farrugia, D.N., Paulsen, I.T., Hall, R.M., 2013. A novel family of genomic resistance islands, AbGRI2, contributing to aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates belonging to global clone 2. J. Antimicrob. Chemother. 68, 554–557.

Nigro, S.J., Hall, R.M., 2016. Loss and gain of aminoglycoside resistance in global clone 2 *Acinetobacter baumannii* in Australia via modification of genomic resistance islands and acquisition of plasmids. J. Antimicrob. Chemother. 71, 2432–2440. https://doi.org/10.1093/jac/dkw176

Nigro, S.J., Post, V., Hall, R.M., 2011. Aminoglycoside resistance in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to global clone 2 from Australian hospitals. J. Antimicrob. Chemother. 66, 1504–1509.

BY-NC-ND

Nivina, A., Escudero, J.A., Vit, C., Mazel, D., Loot, C., 2016. Efficiency of integron cassette insertion in correct orientation is ensured by the interplay of the three unpaired features of *attC* recombination sites. Nucleic Acids Res. 44, 7792–7803.

Norton, M.D., Spilkia, A.J., Godoy, V.G., 2013. Antibiotic resistance acquired through a DNA damage-inducible response in *Acinetobacter baumannii*. J. Bacteriol. 195, 1335–1345.

Nunes-Düby, S.E., Kwon, H.J., Tirumalai, R.S., Ellenberger, T., Landy, A., 1998. Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. Nucleic Acids Res. 26, 391–406.

Odetoyin, B.W., Labar, A.S., Lamikanra, A., Aboderin, A.O., Okeke, I.N., 2017. Classes 1 and 2 integrons in faecal *Escherichia coli* strains isolated from mother-child pairs in Nigeria. PloS One 12, e0183383.

O'Reilly, E.K., Kreuzer, K.N., 2004. Isolation of SOS constitutive mutants of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 186, 7149–7160.

Pagano, M., Martins, A.F., Machado, A.B.M.P., Barin, J., Barth, A.L., 2013. Carbapenem-susceptible *Acinetobacter baumannii* carrying the ISAba1 upstream *blaOXA-51-like* gene in Porto Alegre, southern Brazil. Epidemiol. Infect. 141, 330–333.

Pailhoriès, H., Belmonte, O., Kempf, M., Lemarié, C., Cuziat, J., Quinqueneau, C., Ramont, C., Joly-Guillou, M.-L., Eveillard, M., 2015. Diversity of *Acinetobacter baumannii* strains isolated in humans, companion animals, and the environment in Reunion Island: an exploratory study. Int. J. Infect. Dis. 37, 64–69.

Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., Larsson, D.G.J., 2016. The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes. Microbiome 4, 54.

Pan, J.-C., Ye, R., Meng, D.-M., Zhang, W., Wang, H.-Q., Liu, K.-Z., 2006. Molecular characteristics of class 1 and class 2 integrons and their relationships to antibiotic resistance in clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri*. J. Antimicrob. Chemother. 58, 288–296.

Papagiannitsis, C.C., Tzouvelekis, L.S., Miriagou, V., 2009. Relative strengths of the class 1 integron promoter hybrid 2 and the combinations of strong and hybrid 1 with an active p2 promoter. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 277–280.

Partridge, S.R., 2011. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 35, 820–855. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00277.x

Partridge, S.R., Recchia, G.D., Scaramuzzi, C., Collis, C.M., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2000. Definition of the *attI1* site of class 1 integrons. Microbiol. Read. Engl. 146 (Pt 11), 2855–2864. https://doi.org/10.1099/00221287-146-11-2855

Partridge, S.R., Recchia, G.D., Stokes, H.W., Hall, R.M., 2001. Family of Class 1 Integrons Related to In4 from Tn*1696*. Antimicrob. Agents Chemother. 45, 3014–3020.

Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., Iredell, J.R., 2009. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. FEMS Microbiol. Rev. 33, 757–784.

Patel, M., Jiang, Q., Woodgate, R., Cox, M.M., Goodman, M.F., 2010. A new model for SOS-induced mutagenesis: how RecA protein activates DNA polymerase V. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 45, 171–184.

Patil, J.R., Chopade, B.A., 2001. Distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species on the skin of healthy humans. Natl. Med. J. India 14, 204–208.

Paton, R., Miles, R.S., Hood, J., Amyes, S.G., Miles, R.S., Amyes, S.G., 1993. ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents 2, 81–87.

BY-NC-ND

Paulsen, I.T., Littlejohn, T.G., Rådström, P., Sundström, L., Sköld, O., Swedberg, G., Skurray, R.A., 1993. The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. Antimicrob. Agents Chemother. 37, 761–768.

Peleg, A.Y., Seifert, H., Paterson, D.L., 2008. *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 21, 538–582.

Peng, C., Zong, Z., Fan, H., 2012. *Acinetobacter baumannii* isolates associated with community-acquired pneumonia in West China. Clin. Microbiol. Infect. 18, E491-493.

Perencevich, E.N., McGregor, J.C., Shardell, M., Furuno, J.P., Harris, A.D., Morris, J.G., Fisman, D.N., Johnson, J.A., 2008. Summer Peaks in the Incidences of Gram-Negative Bacterial Infection Among Hospitalized Patients. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 29, 1124–1131.

Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., Rather, P.N., Bonomo, R.A., 2007. Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 3471–3484.

Petersen, A., Guardabassi, L., Dalsgaard, A., Olsen, J.E., 2000. Class I integrons containing a dhfrI trimethoprim resistance gene cassette in aquatic Acinetobacter spp. FEMS Microbiol. Lett. 182, 73–76.

Petrova, M., Gorlenko, Z., Mindlin, S., 2011. Tn5045, a novel integron-containing antibiotic and chromate resistance transposon isolated from a permafrost bacterium. Res. Microbiol. 162, 337–345. https://doi.org/10.1016/j.resmic.2011.01.003

Ploy, M.C., Denis, F., Courvalin, P., Lambert, T., 2000. Molecular characterization of integrons in *Acinetobacter baumannii*: description of a hybrid class 2 integron. Antimicrob. Agents Chemother. 44, 2684–2688.

Pohlhaus, J.R., Kreuzer, K.N., 2005. Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block *Escherichia coli* replication forks, causing double-stranded breaks in vivo. Mol. Microbiol. 56, 1416–1429.

Poirel, L., Carattoli, A., Bernabeu, S., Bruderer, T., Frei, R., Nordmann, P., 2010. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. J. Antimicrob. Chemother. 65, 1594–1598.

Poirel, L., Menuteau, O., Agoli, N., Cattoen, C., Nordmann, P., 2003. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. J. Clin. Microbiol. 41, 3542–3547.

Poonsuk, K., Tribuddharat, C., Chuanchuen, R., 2012. Class 1 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical isolates. Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health 43, 376–384.

Post, V., Hall, R.M., 2009. AbaR5, a large multiple-antibiotic resistance region found in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 53, 2667–2671.

Post, V., White, P.A., Hall, R.M., 2010. Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 65, 1162–1170.

Potron, A., Poirel, L., Nordmann, P., 2015. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. Int. J. Antimicrob. Agents 45, 568–585.

Potvin, E., Sanschagrin, F., Levesque, R.C., 2008. Sigma factors in *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Rev. 32, 38–55.

BY-NC-ND

Power, M.L., Samuel, A., Smith, J.J., Stark, J.S., Gillings, M.R., Gordon, D.M., 2016. *Escherichia coli* out in the cold: Dissemination of human-derived bacteria into the Antarctic microbiome. Environ. Pollut. Barking Essex 1987 215, 58–65.

Prakash, L., 1974. Lack of chemically induced mutation in repair-deficient mutants of yeast. Genetics 78, 1101–1118.

Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., Claverys, J.-P., 2006. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. Science 313, 89–92.

Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P., Gu, Y., 2012. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC Genomics 13, 341.

Quillardet, P., Rouffaud, M.-A., Bouige, P., 2003. DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in *Escherichia coli*. Res. Microbiol. 154, 559–572.

Radman, M., 1975. SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. Basic Life Sci. 5A, 355–367.

Rafei, R., Hamze, M., Pailhoriès, H., Eveillard, M., Marsollier, L., Joly-Guillou, M.-L., Dabboussi, F., Kempf, M., 2015. Extrahuman epidemiology of *Acinetobacter baumannii* in Lebanon. Appl. Environ. Microbiol. 81, 2359–2367.

Ramírez, M.S., Piñeiro, S., Argentinian Integron Study Group, Centrón, D., 2010. Novel insights about class 2 integrons from experimental and genomic epidemiology. Antimicrob. Agents Chemother. 54, 699–706.

Ramírez, M.S., Quiroga, C., Centrón, D., 2005a. Novel rearrangement of a class 2 integron in two non-epidemiologically related isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 5179–5181.

Ramírez, M.S., Vargas, L.J., Cagnoni, V., Tokumoto, M., Centrón, D., 2005b. Class 2 integron with a novel cassette array in a *Burkholderia cenocepacia* isolate. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 4418–4420.

Ramirez, M.S., Tolmasky, M.E., 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother. 13, 151–171.

Rauch, P.J., Palmen, R., Burds, A.A., Gregg-Jolly, L.A., van der Zee, J.R., Hellingwerf, K.J., 1996. The expression of the *Acinetobacter calcoaceticus recA* gene increases in response to DNA damage independently of RecA and of development of competence for natural transformation. Microbiol. Read. Engl. 142 (Pt 4), 1025–1032.

Ravi, A., Avershina, E., Foley, S.L., Ludvigsen, J., Storrø, O., Øien, T., Johnsen, R., McCartney, A.L., L'Abée-Lund, T.M., Rudi, K., 2015. The commensal infant gut meta-mobilome as a potential reservoir for persistent multidrug resistance integrons. Sci. Rep. 5, 15317.

Raymond-Denise, A., Guillen, N., 1992. Expression of the *Bacillus subtilis dinR* and *recA* genes after DNA damage and during competence. J. Bacteriol. 174, 3171–3176.

Raymond-Denise, A., Guillen, N., 1991. Identification of *dinR*, a DNA damage-inducible regulator gene of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 173, 7084–7091.

Recchia, G.D., Hall, R.M., 1995. Plasmid evolution by acquisition of mobile gene cassettes: plasmid pIE723 contains the *aadB* gene cassette precisely inserted at a secondary site in the incQ plasmid RSF1010. Mol. Microbiol. 15, 179–187.

Recchia, G.D., Stokes, H.W., Hall, R.M., 1994. Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. Nucleic Acids Res. 22, 2071–2078.

BY-NC-ND

Retailliau, H.F., Hightower, A.W., Dixon, R.E., Allen, J.R., 1979. *Acinetobacter calcoaceticus*: a nosocomial pathogen with an unusual seasonal pattern. J. Infect. Dis. 139, 371–375.

Ribeiro, V.B., Lincopan, N., Landgraf, M., Franco, B.D.G.M., Destro, M.T., 2011. Characterization of class 1 integrons and antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates from foodstuff and related sources. Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol. 42, 685–692.

Rice, L.B., 2008. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. J. Infect. Dis. 197, 1079–1081.

Rizk, D.E., El-Mahdy, A.M., 2017. Emergence of class 1 to 3 integrons among members of *Enterobacteriaceae* in Egypt. Microb. Pathog.

Robinson, A., Brzoska, A.J., Turner, K.M., Withers, R., Harry, E.J., Lewis, P.J., Dixon, N.E., 2010. Essential Biological Processes of an Emerging Pathogen: DNA Replication, Transcription, and Cell Division in Acinetobacter spp. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 74, 273–297.

Rodríguez-Baño, J., Martí, S., Soto, S., Fernández-Cuenca, F., Cisneros, J.M., Pachón, J., Pascual, A., Martínez-Martínez, L., McQueary, C., Actis, L.A., Vila, J., Spanish Group for the Study of Nosocomial Infections (GEIH), 2008. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*: associated features and clinical implications. Clin. Microbiol. Infect. 14, 276–278.

Rodríguez-Minguela, C.M., Apajalahti, J.H.A., Chai, B., Cole, J.R., Tiedje, J.M., 2009. Worldwide prevalence of class 2 integrases outside the clinical setting is associated with human impact. Appl. Environ. Microbiol. 75, 5100–5110.

Roe, M.T., Vega, E., Pillai, S.D., 2003. Antimicrobial resistance markers of class 1 and class 2 integron-bearing *Escherichia coli* from irrigation water and sediments. Emerg. Infect. Dis. 9, 822–826.

Rolain, J.-M., 2013. Food and human gut as reservoirs of transferable antibiotic resistance encoding genes. Front. Microbiol. 4, 173.

Ronen, M., Rosenberg, R., Shraiman, B.I., Alon, U., 2002. Assigning numbers to the arrows: parameterizing a gene regulation network by using accurate expression kinetics. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99, 10555–10560.

Rosser, S.J., Young, H.K., 1999. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. J. Antimicrob. Chemother. 44, 11–18.

Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.-M., Mazel, D., 2002. Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. Mol. Microbiol. 43, 1657–1669.

Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., Mazel, D., 2001. The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98, 652–657.

Ruiz, J., Navia, M.M., Casals, C., Sierra, J.M., Jiménez De Anta, M.T., Vila, J., 2003. Integron-mediated antibiotic multiresistance in *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Spain. Clin. Microbiol. Infect. 9, 907–911.

Ruiz-Martínez, L., López-Jiménez, L., Fusté, E., Vinuesa, T., Martínez, J.P., Viñas, M., 2011. Class 1 integrons in environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Int. J. Antimicrob. Agents 38, 398–402.

Sáenz, Y., Vinué, L., Ruiz, E., Somalo, S., Martínez, S., Rojo-Bezares, B., Zarazaga, M., Torres, C., 2010. Class 1 integrons lacking *qacEDelta1* and *sul1* genes in *Escherichia coli* isolates of food, animal and human origins. Vet. Microbiol. 144, 493–497.

BY-NC-ND

Salimizand, H., Menbari, S., Ramazanzadeh, R., Khonsha, M., Saleh Vahedi, M., 2016. DNA fingerprinting and antimicrobial susceptibility pattern of clinical and environmental *Acinetobacter baumannii* isolates: a multicentre study. J. Chemother. Florence Italy 28, 277–283.

Sallen, B., Rajoharison, A., Desvarenne, S., Mabilat, C., 1995. Molecular epidemiology of integron-associated antibiotic resistance genes in clinical isolates of *enterobacteriaceae*. Microb. Drug Resist. Larchmt. N 1, 195–202.

Santajit, S., Indrawattana, N., 2016. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. BioMed Res. Int. 2016, 2475067.

Sarma, P.M., Bhattacharya, D., Krishnan, S., Lal, B., 2004. Assessment of intra-species diversity among strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from sites contaminated with petroleum hydrocarbons. Can. J. Microbiol. 50, 405–414.

Sassanfar, M., Roberts, J.W., 1990. Nature of the SOS-inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. J. Mol. Biol. 212, 79–96.

Savari, M., Ekrami, A., Shoja, S., Bahador, A., 2017. Acquisition of Tn*6018*-3' CS regions increases colistin MICs against *Acinetobacter baumannii* isolates harboring new variants of AbaRs. Folia Microbiol. (Praha). 62, 373-379.

Schlacher, K., Goodman, M.F., 2007. Lessons from 50 years of SOS DNA-damage-induced mutagenesis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 8, 587–594.

Schlacher, K., Pham, P., Cox, M.M., Goodman, M.F., 2006. Roles of DNA polymerase V and RecA protein in SOS damage-induced mutation. Chem. Rev. 106, 406–419.

Schlüter, A., Szczepanowski, R., Pühler, A., Top, E.M., 2007. Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. FEMS Microbiol. Rev. 31, 449–477.

Schmidt, A.S., Bruun, M.S., Dalsgaard, I., Larsen, J.L., 2001. Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. Appl. Environ. Microbiol. 67, 5675–5682.

Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., Cloeckaert, A., 2004. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. FEMS Microbiol. Rev. 28, 519–542.

Scott, P., Deye, G., Srinivasan, A., Murray, C., Moran, K., Hulten, E., Fishbain, J., Craft, D., Riddell, S., Lindler, L., Mancuso, J., Milstrey, E., Bautista, C.T., Patel, J., Ewell, A., Hamilton, T., Gaddy, C., Tenney, M., Christopher, G., Petersen, K., Endy, T., Petruccelli, B., 2007. An outbreak of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex infection in the US military health care system associated with military operations in Iraq. Clin. Infect. Dis. 44, 1577–1584.

Segal, H., Elisha, B.G., 1999. Characterization of the *Acinetobacter* plasmid, pRAY, and the identification of regulatory sequences upstream of an *aadB* gene cassette on this plasmid. Plasmid 42, 60–66.

Seifert, H., Dijkshoorn, L., Gerner-Smidt, P., Pelzer, N., Tjernberg, I., Vaneechoutte, M., 1997. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. J. Clin. Microbiol. 35, 2819–2825.

Seifert, H., Dolzani, L., Bressan, R., van der Reijden, T., van Strijen, B., Stefanik, D., Heersma, H., Dijkshoorn, L., 2005. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii*. J. Clin. Microbiol. 43, 4328–4335.

BY-NC-ND

Sepp, E., Stsepetova, J., Lõivukene, K., Truusalu, K., Kõljalg, S., Naaber, P., Mikelsaar, M., 2009. The occurrence of antimicrobial resistance and class 1 integrons among commensal *Escherichia coli* isolates from infants and elderly persons. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 8, 34.

Seputiene, V., Povilonis, J., Suziedeliene, E., 2012. Novel variants of AbaR resistance islands with a common backbone in *Acinetobacter baumannii* isolates of European clone II. Antimicrob. Agents Chemother. 56, 1969–1973.

Seward, R.J., 1999. Detection of integrons in worldwide nosocomial isolates of *Acinetobacter* spp. Clin. Microbiol. Infect. 5, 308–318.

Seward, R.J., Lambert, T., Towner, K.J., 1998. Molecular epidemiology of aminoglycoside resistance in *Acinetobacter* spp. J. Med. Microbiol. 47, 455–462.

Shaheen, B.W., Oyarzabal, O.A., Boothe, D.M., 2010. The role of class 1 and 2 integrons in mediating antimicrobial resistance among canine and feline clinical *E. coli* isolates from the US. Vet. Microbiol. 144, 363–370.

Shibata, N., Doi, Y., Yamane, K., Yagi, T., Kurokawa, H., Shibayama, K., Kato, H., Kai, K., Arakawa, Y., 2003. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J. Clin. Microbiol. 41, 5407–5413.

Simo Tchuinte, P.L., Stalder, T., Venditti, S., Ngandjio, A., Dagot, C., Ploy, M.-C., Barraud, O., 2016. Characterisation of class 3 integrons with oxacillinase gene cassettes in hospital sewage and sludge samples from France and Luxembourg. Int. J. Antimicrob. Agents 48, 431–434.

Simonsen, C.C., Chen, E.Y., Levinson, A.D., 1983. Identification of the type I trimethoprim-resistant dihydrofolate reductase specified by the *Escherichia coli* R-plasmid R483: comparison with procaryotic and eucaryotic dihydrofolate reductases. J. Bacteriol. 155, 1001–1008.

Skurnik, D., Bonnet, D., Bernède-Bauduin, C., Michel, R., Guette, C., Becker, J.-M., Balaire, C., Chau, F., Mohler, J., Jarlier, V., Boutin, J.-P., Moreau, B., Guillemot, D., Denamur, E., Andremont, A., Ruimy, R., 2008. Characteristics of human intestinal *Escherichia coli* with changing environments. Environ. Microbiol. 10, 2132–2137.

Skurnik, D., Le Menac'h, A., Zurakowski, D., Mazel, D., Courvalin, P., Denamur, E., Andremont, A., Ruimy, R., 2005. Integron-associated antibiotic resistance and phylogenetic grouping of *Escherichia coli* isolates from healthy subjects free of recent antibiotic exposure. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 3062–3065.

Skurnik, D., Ruimy, R., Andremont, A., Amorin, C., Rouquet, P., Picard, B., Denamur, E., 2006. Effect of human vicinity on antimicrobial resistance and integrons in animal faecal *Escherichia coli*. J. Antimicrob. Chemother. 57, 1215–1219.

Slilaty, S.N., Little, J.W., 1987. Lysine-156 and serine-119 are required for LexA repressor cleavage: a possible mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84, 3987–3991.

Smith, M.H., Cavenagh, M.M., Little, J.W., 1991. Mutant LexA proteins with an increased rate of in vivo cleavage. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88, 7356–7360.

Sørum, H., Roberts, M.C., Crosa, J.H., 1992. Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen *Vibrio salmonicida*. Antimicrob. Agents Chemother. 36, 611–615.

Soufi, L., Abbassi, M.S., Sáenz, Y., Vinué, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., Ben Hassen, A., Hammami, S., Torres, C., 2009. Prevalence and diversity of

BY-NC-ND

integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. Foodborne Pathog. Dis. 6, 1067–1073.

Soufi, L., Sáenz, Y., Vinué, L., Abbassi, M.S., Ruiz, E., Zarazaga, M., Ben Hassen, A., Hammami, S., Torres, C., 2011. *Escherichia coli* of poultry food origin as reservoir of sulphonamide resistance genes and integrons. Int. J. Food Microbiol. 144, 497–502.

Sousa, F.J.R., Lima, L.M.T.R., Pacheco, A.B.F., Oliveira, C.L.P., Torriani, I., Almeida, D.F., Foguel, D., Silva, J.L., Mohana-Borges, R., 2006. Tetramerization of the LexA repressor in solution: implications for gene regulation of the E.coli SOS system at acidic pH. J. Mol. Biol. 359, 1059–1074.

Spellberg, B., Bonomo, R.A., 2013. "Airborne assault": a new dimension in *Acinetobacter baumannii* transmission. Crit. Care Med. 41, 2042–2044.

Spellberg, B., Rex, J.H., 2013. The value of single-pathogen antibacterial agents. Nat. Rev. Drug Discov. 12, 963.

Stalder, T., Barraud, O., Casellas, M., Dagot, C., Ploy, M.-C., 2012. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. Front. Microbiol. 3, 119.

Stange, C., Sidhu, J.P.S., Tiehm, A., Toze, S., 2016. Antibiotic resistance and virulence genes in coliform water isolates. Int. J. Hyg. Environ. Health 219, 823–831.

Starikova, I., Harms, K., Haugen, P., Lunde, T.T.M., Primicerio, R., Samuelsen, Ø., Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., 2012. A trade-off between the fitness cost of functional integrases and long-term stability of integrons. PLoS Pathog. 8, e1003043.

Stokes, H.W., Gillings, M.R., 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. FEMS Microbiol. Rev. 35, 790–819.

Stokes, H.W., Hall, R.M., 1989. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. Mol. Microbiol. 3, 1669–1683.

Stokes, H.W., Nesbø, C.L., Holley, M., Bahl, M.I., Gillings, M.R., Boucher, Y., 2006. Class 1 integrons potentially predating the association with tn402-like transposition genes are present in a sediment microbial community. J. Bacteriol. 188, 5722–5730.

Stokes, H.W., O'Gorman, D.B., Recchia, G.D., Parsekhian, M., Hall, R.M., 1997. Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. Mol. Microbiol. 26, 731–745.

Story, R.M., Weber, I.T., Steitz, T.A., 1992. The structure of the E. coli RecA protein monomer and polymer. Nature 355, 318–325.

Storz, G., Hengge, R., 2011. Bacterial Stress Responses, Second Edition. American Society of Microbiology.

Strugeon, E., Tilloy, V., Ploy, M.-C., Da Re, S., 2016. The Stringent Response Promotes Antibiotic Resistance Dissemination by Regulating Integron Integrase Expression in Biofilms. mBio 7.

Summary of the latest data on antibiotic resistance in EU: 2016 [WWW Document], 2016. . Eur. Cent. Dis. Prev. Control. URL http://ecdc.europa.eu/en/publications-data/summary-latest-data-antibiotic-resistance-eu-2016 (accessed 10.17.17).

Sun, M., Ye, M., Schwab, A.P., Li, X., Wan, J., Wei, Z., Wu, J., Friman, V.-P., Liu, K., Tian, D., Liu, M., Li, H., Hu, F., Jiang, X., 2016. Human migration activities drive the fluctuation of ARGs: Case study of landfills in Nanjing, eastern China. J. Hazard. Mater. 315, 93–101.

Sunde, M., 2005. Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. J. Antimicrob. Chemother. 56, 1019–1024.

BY-NC-ND

Sunde, M., Solheim, H., Slettemeås, J.S., 2008. Genetic linkage between class 1 integrons with the *dfrA12-orfF-aadA2* cassette array and *sul3* in *Escherichia coli*. Vet. Microbiol. 130, 422–425.

Taddei, F., Matic, I., Radman, M., 1995. cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92, 11736–11740.

Taitt, C.R., Leski, T.A., Stockelman, M.G., Craft, D.W., Zurawski, D.V., Kirkup, B.C., Vora, G.J., 2014. Antimicrobial resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* isolates taken from military treatment facilities. Antimicrob. Agents Chemother. 58, 767–781.

Talbot, G.H., Bradley, J., Edwards, J.E., Gilbert, D., Scheld, M., Bartlett, J.G., Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America, 2006. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. Clin. Infect. Dis. 42, 657–668.

Tauch, A., Götker, S., Pühler, A., Kalinowski, J., Thierbach, G., 2002. The 27.8-kb R-plasmid pTET3 from Corynebacterium glutamicum encodes the aminoglycoside adenyltransferase gene cassette *aadA9* and the regulated tetracycline efflux system Tet 33 flanked by active copies of the widespread insertion sequence IS6100. Plasmid 48, 117–129.

Thliveris, A.T., Little, J.W., Mount, D.W., 1991. Repression of the *E coli* recA gene requires at least two LexA protein monomers. Biochimie 73, 449–456.

Toleman, M.A., Vinodh, H., Sekar, U., Kamat, V., Walsh, T.R., 2007. blaVIM-2-harboring integrons isolated in India, Russia, and the United States arise from an ancestral class 1 integron predating the formation of the 3' conserved sequence. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 2636–2638.

Tolmasky, M.E., 2000. Bacterial resistance to aminoglycosides and beta-lactams: the Tn1331 transposon paradigm. Front. Biosci. J. Virtual Libr. 5, D20-29.

Towner, K.J., 2009. Acinetobacter: an old friend, but a new enemy. J. Hosp. Infect. 73, 355–363.

Tsakris, A., Ikonomidis, A., Spanakis, N., Poulou, A., Pournaras, S., 2007. Characterization of In3Mor, a new integron carrying VIM-1 metallo-beta-lactamase and *sat1* gene, from Morganella morganii. J. Antimicrob. Chemother. 59, 739–741.

Turabelidze, G., Lawrence, S.J., Gao, H., Sodergren, E., Weinstock, G.M., Abubucker, S., Wylie, T., Mitreva, M., Shaikh, N., Gautom, R., Tarr, P.I., 2013. Precise dissection of an *Escherichia coli* O157:H7 outbreak by single nucleotide polymorphism analysis. J. Clin. Microbiol. 51, 3950–3954.

Turton, J.F., Kaufmann, M.E., Glover, J., Coelho, J.M., Warner, M., Pike, R., Pitt, T.L., 2005. Detection and typing of integrons in epidemic strains of *Acinetobacter baumannii* found in the United Kingdom. J. Clin. Microbiol. 43, 3074–3082.

Ubeda, C., Maiques, E., Tormo, M.A., Campoy, S., Lasa, I., Barbé, J., Novick, R.P., Penadés, J.R., 2007. SaPI operon I is required for SaPI packaging and is controlled by LexA. Mol. Microbiol. 65, 41–50.

Vallenet, D., Nordmann, P., Barbe, V., Poirel, L., Mangenot, S., Bataille, E., Dossat, C., Gas, S., Kreimeyer, A., Lenoble, P., Oztas, S., Poulain, J., Segurens, B., Robert, C., Abergel, C., Claverie, J.-M., Raoult, D., Médigue, C., Weissenbach, J., Cruveiller, S., 2008. Comparative analysis of Acinetobacters: three genomes for three lifestyles. PloS One 3, e1805.

Vangnai, A.S., Petchkroh, W., 2007. Biodegradation of 4-chloroaniline by bacteria enriched from soil. FEMS Microbiol. Lett. 268, 209–216.

BY-NC-ND

Varhimo, E., Savijoki, K., Jefremoff, H., Jalava, J., Sukura, A., Varmanen, P., 2008. Ciprofloxacin induces mutagenesis to antibiotic resistance independent of UmuC in *Streptococcus uberis*. Environ. Microbiol. 10, 2179–2183.

Vasilakopoulou, A., Psichogiou, M., Tzouvelekis, L., Tassios, P.T., Kosmidis, C., Petrikkos, G., Roma, E.S., Charvalos, E., Passiotou, M., Avlami, A., Daikos, G.L., 2009. Prevalence and characterization of class 1 integrons in *Escherichia coli* of poultry and human origin. Foodborne Pathog. Dis. 6, 1211–1218.

Vaux, S., Nguyen, E., Alleaume, S., Blanckaert, K., Galas, M., Poujol, I., Venier, A.-G., Bernet, C., Carbonne, A., Simon, L., Sénéchal, H., Courvalin, P., Jeannot, K., Thiolet, J.-M., Coignard, B., 2012. Signalement des infections nosocomiales à *Acinetobacter baumannii* résistant à l'imipénème, France, août 2001-mai 2011. Bull. Epidemiol. Hebd.

Vila, J., Martí, S., Sánchez-Céspedes, J., 2007. Porins, efflux pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. J. Antimicrob. Chemother. 59, 1210–1215.

Vila, J., Navia, M., Ruiz, J., Casals, C., 1997. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 41, 2757–2759.

Vincent, J.-L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C.D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., Reinhart, K., EPIC II Group of Investigators, 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. JAMA 302, 2323–2329.

Vinué, L., Jové, T., Torres, C., Ploy, M.-C., 2011. Diversity of class 1 integron gene cassette Pc promoter variants in clinical *Escherichia coli* strains and description of a new P2 promoter variant. Int. J. Antimicrob. Agents 38, 526–529.

Vinué, L., Sáenz, Y., Somalo, S., Escudero, E., Moreno, M.A., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2008. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. J. Antimicrob. Chemother. 62, 934–937.

Vo, A.T.T., van Duijkeren, E., Fluit, A.C., Gaastra, W., 2007. Characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from horses. Vet. Microbiol. 124, 248–255.

Volkert, M.R., Gately, F.H., Hajec, L.I., 1989. Expression of DNA damage-inducible genes of *Escherichia coli* upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents. Mutat. Res. 217, 109–115.

Vollmer, A.C., Kwakye, S., Halpern, M., Everbach, E.C., 1998. Bacterial stress responses to 1-megahertz pulsed ultrasound in the presence of microbubbles. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3927–3931.

Wade, J.T., Reppas, N.B., Church, G.M., Struhl, K., 2005. Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the *Escherichia coli* genome and identifies unconventional target sites. Genes Dev. 19, 2619–2630.

Walker, G.C., 1984. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. Microbiol. Rev. 48, 60–93.

Wang, Y., Hao, P., Lu, B., Yu, H., Huang, W., Hou, H., Dai, K., 2010. Causes of infection after earthquake, China, 2008. Emerg. Infect. Dis. 16, 974–975.

Weber, B.S., Harding, C.M., Feldman, M.F., 2015. Pathogenic *Acinetobacter*: from the Cell Surface to Infinity and Beyond. J. Bacteriol. 198, 880–887.

BY-NC-ND

Wei, Q., Hu, Q., Li, S., Lu, H., Chen, G., Shen, B., Zhang, P., Zhou, Y., 2014. A novel functional class 2 integron in clinical *Proteus mirabilis* isolates. J. Antimicrob. Chemother. 69, 973–976.

Weiner, L.M., Webb, A.K., Limbago, B., Dudeck, M.A., Patel, J., Kallen, A.J., Edwards, J.R., Sievert, D.M., 2016. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 37, 1288–1301.

Wendt, C., Dietze, B., Dietz, E., Rüden, H., 1997. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. J. Clin. Microbiol. 35, 1394–1397.

White, D.G., Zhao, S., Sudler, R., Ayers, S., Friedman, S., Chen, S., McDermott, P.F., McDermott, S., Wagner, D.D., Meng, J., 2001. The isolation of antibiotic-resistant *Salmonella* from retail ground meats. N. Engl. J. Med. 345, 1147–1154.

WHO | Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014 [WWW Document], 2014. . WHO. URL http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/ (accessed 11.3.17).

WHO | Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [WWW Document], 2017. . WHO. URL http://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/ (accessed 11.8.17).

Winterling, K.W., Chafin, D., Hayes, J.J., Sun, J., Levine, A.S., Yasbin, R.E., Woodgate, R., 1998. The *Bacillus subtilis* DinR binding site: redefinition of the consensus sequence. J. Bacteriol. 180, 2201–2211.

Witkowski, T.A., Grice, A.N., Stinnett, D.B., Wells, W.K., Peterson, M.A., Hare, J.M., 2016. UmuDAb: An Error-Prone Polymerase Accessory Homolog Whose N-Terminal Domain Is Required for Repression of DNA Damage Inducible Gene Expression in *Acinetobacter baylyi*. PloS One 11, e0152013.

Wong, D., Nielsen, T.B., Bonomo, R.A., Pantapalangkoor, P., Luna, B., Spellberg, B., 2017. Clinical and Pathophysiological Overview of *Acinetobacter* Infections: a Century of Challenges. Clin. Microbiol. Rev. 30, 409–447.

Xu, H., Davies, J., Miao, V., 2007. Molecular characterization of class 3 integrons from *Delftia* spp. J. Bacteriol. 189, 6276–6283.

Yamamoto, M., Nagao, M., Matsumura, Y., Matsushima, A., Ito, Y., Takakura, S., Ichiyama, S., 2011. Interspecies dissemination of a novel class 1 integron carrying bla_{IMP-19} among *Acinetobacter* species in Japan. J. Antimicrob. Chemother. 66, 2480–2483.

Yang, H., Chen, S., White, D.G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R., Meng, J., 2004. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. J. Clin. Microbiol. 42, 3483–3489.

Yang, M.-K., Su, S.-R., Sung, V.-L., 2005. Identification and characterization of a second *lexA* gene of *Xanthomonas axonopodis Pathovar citri*. Appl. Environ. Microbiol. 71, 3589–3598.

Yoon, E.-J., Balloy, V., Fiette, L., Chignard, M., Courvalin, P., Grillot-Courvalin, C., 2016. Contribution of the Ade Resistance-Nodulation-Cell Division-Type Efflux Pumps to Fitness and Pathogenesis of *Acinetobacter baumannii*. mBio 7.

Zander, E., Fernández-González, A., Schleicher, X., Dammhayn, C., Kamolvit, W., Seifert, H., Higgins, P.G., 2014a. Worldwide dissemination of acquired carbapenem-hydrolysing

BY-NC-ND

class D β-lactamases in *Acinetobacter* spp. other than *Acinetobacter baumannii*. Int. J. Antimicrob. Agents 43, 375–377.

Zander, E., Seifert, H., Higgins, P.G., 2014b. Insertion sequence IS18 mediates overexpression of blaOXA-257 in a carbapenem-resistant *Acinetobacter bereziniae* isolate. J. Antimicrob. Chemother. 69, 270–271.

Zarrilli, R., Pournaras, S., Giannouli, M., Tsakris, A., 2013. Global evolution of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal lineages. Int. J. Antimicrob. Agents 41, 11–19.

Zhang, A.P.P., Pigli, Y.Z., Rice, P.A., 2010. Structure of the LexA-DNA complex and implications for SOS box measurement. Nature 466, 883–886.

Zhang, B., Liu, Z., Lin, Z., Zhang, X., Fu, W., 2012. Microbiologic characteristics of pathogenic bacteria from hospitalized trauma patients who survived Wenchuan earthquake. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 31, 2529–2535.

Zhang, J., Zhu, W., Chu, Y., Tian, S., Chen, B., 2010. Molecular epidemiological study of multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. Zhonghua Nei Ke Za Zhi 49, 657–661.

Zhang, W.-J., Lu, Z., Schwarz, S., Zhang, R.-M., Wang, X.-M., Si, W., Yu, S., Chen, L., Liu, S., 2013. Complete sequence of the *bla(NDM-1)*-carrying plasmid pNDM-AB from *Acinetobacter baumannii* of food animal origin. J. Antimicrob. Chemother. 68, 1681–1682.

Zhang, X.-X., Zhang, T., Zhang, M., Fang, H.H.P., Cheng, S.-P., 2009. Characterization and quantification of class 1 integrons and associated gene cassettes in sewage treatment plants. Appl. Microbiol. Biotechnol. 82, 1169–1177.

Zhang, Y., Gu, A.Z., He, M., Li, D., Chen, J., 2017. Subinhibitory Concentrations of Disinfectants Promote the Horizontal Transfer of Multidrug Resistance Genes within and across Genera. Environ. Sci. Technol. 51, 570–580.

Zhong, Q., Xu, W., Wu, Y., Xu, H., 2012. Clonal spread of carbapenem non-susceptible *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit in a teaching hospital in China. Ann. Lab. Med. 32, 413–419.

Zhu, Y., Yi, Y., Liu, F., Lv, N., Yang, X., Li, J., Hu, Y., Zhu, B., 2014. Distribution and molecular profiling of class 1 integrons in MDR *Acinetobacter baumannii* isolates and whole genome-based analysis of antibiotic resistance mechanisms in a representative strain. Microbiol. Res. 169, 811–816.

Zilberberg, M.D., Nathanson, B.H., Sulham, K., Fan, W., Shorr, A.F., 2016. Multidrug resistance, inappropriate empiric therapy, and hospital mortality in *Acinetobacter baumannii* pneumonia and sepsis. Crit. Care Lond. Engl. 20, 221.

Zordan, S., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., van der Reijden, T., van den Broek, P., Baljer, G., Dijkshoorn, L., 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. Emerg. Infect. Dis. 17, 1751–1754.

Zverlov, V.V., Schwarz, W.H., 1999. Organization of the chromosomal region containing the genes *lexA* and *topA* in Thermotoga neapolitana. Primary structure of LexA reveals phylogenetic relevance. Syst. Appl. Microbiol. 22, 174–178.

BY-NC-ND

BY-NC-ND

ANNEXES

Annexe 1 : séquence de pPcSPintI1oriA

Légende :

- En écriture noire : pPcSPintI1, à l'intérieur duquel est indiqué en écriture grasse le promoteur PcS, les séquences -10 et -35 sont identifiées en écriture orange grasse
- En écriture verte : oriA de pW1266
- Surligné en rose : site de restriction Kpn1

>pPcSPintI1oriA
gtgcctagaaatattttatctgattaataagatgatcttcttgagatcgttttggtctgcgc
gtaatctcttgctctgaaaacgaaaaaaccgccttgcagggcggtttttcgaaggttctctg
agctaccaactctttgaaccgaggtaactggcttggaggagcgcagtcaccaaaacttgtcc
tttcagtttagccttaaccggcgcatgacttcaagactaactcctctaaatcaattaccagt
ggctgctgccagtggtgcttttgcatgtctttccgggttggactcaagacgatagttaccgg
ataaggcgcagcggtcggactgaacgggggttcgtgcatacagtccagcttggagcgaact
gcctacccggaactgagtgtcaggcgtggaatgagacaaacgcggccataacagcggaatga
caccggtaaaccgaaaggcaggaacaggagagcgcacgagggagccgccaggggaaacgcct
ggtatctttatagtcctgtcgggtttcgccaccactgatttgagcgtcagatttcgtgatgc
ttgtcaggggggcggagcctatggaaaaacggctttgccgcggccctctcacttccctgtta
agtatcttcctggcatcttccaggaaatctccgccccgttcgtaagccatttccgctcgccg
cagtcgaacgaccgagcgtagcgagtcagtgagcgaggaagcggaatatatcctgtatcaca
tattctgctgacgcaccggtgcagccttttttctcctgccacatgaagcacttcactgacac
cctcatcagtgccaacatagtaagccagtatatacactccgctagTGATATCGAATTGgtac
cGATCGTAGAAATATCTATGATTATCTTGAAGAACGCAACCCTATAGCAGCTATTGAAATTG
ATGATTTAATTGAAGAAAAGACAGATTTAGTTGTTGATAATCGACTGATGGGGCGCACAGGC
AGACAGAAAGATACTAGGGAGTTAGTGATACATCCGCATTATGTGGTTGTATATGACATCAC
TGATATAATACGGATACTCAGAGTGCTACACACATCGCAGGAGTGGTCATGACTTACTCATG
TACTTTGGATTATTTAGTGTTATAAAATCCTGATTTATAAATTTTTTTTGTTAAAAAAGATA
AAAGCCCCTTGCAATTGCTTGGGGCTTTACCGTAATTTATGGGGTACAGATCTTCGATACTG
ACATATCGGCAATCGAAAGCATTAAGGTTTGACGACCGCTAATGATTTCACCACAGGGGCTT
AATGTACCTGTCTTAAATTCTAAGGTTTTAACTCGCTTTGTCAAGCATAGACCCCAAAAATT
TAGCCAATGTCTGTAACTCAATCTGTCCATGTGTGGGTGATGAGGTACAGTGACGCTAGCAC
ACATCGGAAAAACGCTATTACTAGGGGAACTGAACAGAGTAGCGGACGCAATGAGTAGTCAT
TTAATTGGCGGTTATGAGCGTGTTCAGGCGGTGCTATCAATCGTAATCATAACAGTGGCAGC
TTGATACAGTGATGTCATCCCTGATGCGAAAGCGACCGACCGACGGTACATCGAATGGGAAT
ACTTTAGGGTGATTTTTAAGAATCGCTCTAGGGTGAGTATTTCCCATTCAGCTCTGCTCCCT
CCCTCTGGTACTTTAATCAAAAGCACTACTAAACATATGTTTTTAAATAAAAAATATTGATA
TAGAGATAATATTAGTAAGAATAATTAAACAATTGAATATAGATAAATCATTGTTAAATAAA
GATTAATTATTAAAATGAATGTATACTTATATATAAATCAATGATTTAAAATATTTGATAAA

BY-NC-ND

GAAAACTTTTCAAAAAAAATATAATTGAGATTGTGTCATTTCGGTCAATTCTTAATATGTTC
CACGCAAGTTTTAGCTATGGTGCTAAACAGAAATTTGCTGAAAAAGAACTTTTCACTGAACT
GGTTAAAATGTAAGCAGCCTGAGAGCCGCCAAAAATTTTAAAAACAAACCGCCTTAATCATC
TTCAAAAAATACCTCTAAAACCTCACCATTTGCGTTTTAAGACCCATATTTCATCCTGCCCT
TATGTTCCCATGCTGATAGCTATAAAGTGTCTGTAATCGCTTCCTATGACGTTCTAGGCTGT
TGATAACTTTTGGAACAACGCAAAATGTTAAAATCCgGTACCAAGCTTAAAAAAAAGCCCGC
TCATTAGGCGGGCTCGAATTAtcattgtttgcctccctgctgcggttttcaccgaagttca
tgccagtccagcgtttttgcagcagaaaagccgccgacttcggtttgcggtcgcgagtgaag
atccctttcttgttaccgccaacgcgcaatatgccttgcgaggtcgcaaaatcggcgaaatt
ccatacctgttcaccgacgacggcgctgacgcgatcaaagacgcggtgatacatatccagcc
atgcacactgatactcttcactccacatgtcggtgtacattgagtgcagcccggctaacgta
tccacgccgtattcggtgatgataatcggctgatgcagtttctcctgccaggccagaagttc
tttttccagtaccttctctgccgtttccaaatcgccgctttggacataccatccgtaataac
ggttcaggcacagcacatcaaagagatcgctgatggtatcggtgtgagcgtcgcagaacatt
acattgacgcaggtgatcggacgcgtcgggtcgagtttacgcgttgcttccgccagtggcgc
gaaatattcccgtgcaccttgcggacgggtatccggttcgttggcaatactccacatcacca
cgcttgggtggtttttgtcacgcgctatcagctctttaatcgcctgtaagtgcgcttgctga
gtttccccgttgactgcctcttcgctgtacagttctttcggcttgttgcccgcttcgaaacc
aatgcctaaagagaggttaaagccgacagcagcagtttcatcaatcaccacgatgccatgtt
catctgcccagtcgagcatctcttcagcgtaagggtaatgcgaggtacggtaggagttggcc
ccaatccagtccattaatgcgtggtcgtgcaccatcagcacgttatcgaatcctttgccacg
caagtccgcatcttcatgacgaccaaagccagtaaagtagaacggtttgtggttaatcagga
actgttcgcccttcactgccactgaccggatgccgacgcgaagcgggtagatatcacactct
gtctggcttttggctgtgacgcacagttcatagagataaccttcacccggttgccagaggtg
cggattcaccacttgcaaagtcccgctagtgccttgtccagttgcaaccacctgttgatccg
catcacgcagttcaacgctgacatcaccattggccaccacctgccagtcaacagacgcgtgg
ttacagtcttgcgcgacatgcgtcaccacggtgatatcgtccacccaggtgttcggcgtggt
gtagagcattacgctgcgatggatGccggcatagttaaagaaatcatggaagtaagactgct
ttttcttgccgttttcgtcggtaatcaccattcccggcgggatagtctgccagttcagttcg
ttgttcacacaaacggtgatacgtacacttttcccggcaataacatacggcgtgacatcggc
ttcaaatggcgtatagccgccctgatgctccatcacttcctgattattgacccacactttgc
cgtaatgagtgaccgcatcgaaacgcagcacgatacgctggcctgcccaacctttcggtata
aagacttcgcgctgataccagacgttgcccgcataattacgaatatctgcatcggcgaactg
atcgttaaaactgcctggcacagcaattgcccggctttcttgtaacgcgctttcccaccaac
gctgatcaattccacagttttcgcgatccagactgaatgcccacaggccgtcgagttttttg
atttcacgggttggggtttctacaggacgtaaAGGGTCCAggGAATTcacaccgtggaaacg
gatgaaggcacgaacccag**TTGACA**taagcctgttcggt**tcgTAAACT**gtaatgcaagtagc
gtatgcgctcacgcaactggtccagaaccttgaccgaacgcagcggtggtaacggcgcagtg
gcggttttcatggcTTGTTAtgactgtttttttgTACAGTCTAtgcctcgggcatccaagCA
GCAAgcgcgttacgccgtgggtcgatgtttgatgttatGGAGcagcaacgATGGATCCTCTA
GAGTCGACCTGCAGGCATGccaattcccgcgCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTG
GGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGC
GTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAA
TGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCT
TCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCA
TCTACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCG
ACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCG

BY-NC-ND

AATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTCGGTT
ACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAA
AACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGTTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATAT
GTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCA
GCGATTTCCATGTTGCCACTCGCTTTAATGATGATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAA
GTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGA
AACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTT
ATGCCGATCGCGTCACACTACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATC
CCGAATCTCTATCGTGCGGTGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGA
AGCCTGCGATGTCGGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCA
AGCCGTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAGGTCATG
GATGAGCAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACTTTAACGCCGTGCG
CTGTTCGCATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATG
TGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATGAT
CCGCGCTGGCTACCGGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCA
CCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACGCGC
TGTATCGCTGGATCAAATCTGTCGATCCTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAGGCGGCGGAGCC
GACACCACGGCCACCGATATTATTTGCCCGATGTACGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTT
CCCGGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGAGACGCGCCCGC
TGATCCTTTGCGAATACGCCCACGCGATGGGTAACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGG
CAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGTC
GCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATA
CGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCCA
GCGCTGACGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCGGGCAAACCAT
CGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGG
CGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCACAAGGTAAA
CAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGT
ACGCGTAGTGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGC
AGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGCGTCCCACGCCATCCCGCAT
CTGACCACCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCG
CCAGTCAGGCTTTCTTTCACAGATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACTGCTGACGCCGCTGC
GCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATT
GACCCTAACGCCTGGGTCGAACGCTGGAAGGCGGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTT
GTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGC
AGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGTCAA
ATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCT
GAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAA
ACTATCCCGACCGCCTTACTGCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATG
TATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTA
TGGCCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAAC
TGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGAC
GGTTTCCATATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGATTTCCA
GCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAAtaataaccgggca
ggccatgtctgcccgtatttcgcgtaaggaaatccattatgtactatttaaacacaaacttt
tggaAGCTTgtccggcggtgcttttgccgttacgcaccaccccgtcagtagctgaacaggag
ggacaggggtgggcgaagaactccagcatgagatccccgcgctggaggatcatccagccgg
cgtcccggaaaacgattccgaagcccaacctttcatagaaggcggcggtggaatcgaaatct

BY-NC-ND

cgtgatggcaggttgggcgtcgcttggtcggtcatttcgaaccccagagtcccgctcagaag
aactcgtcaagaaggcgatagaaggcgatgcgctgcgaatcgggagcggcgataccgtaaag
cacgaggaagcggtcagcccattcgccgccaagctcttcagcaatatcacgggtagccaacg
ctatgtcctgatagcggtccgccacacccagccggccacagtcgatgaatccagaaaagcgg
ccattttccaccatgatattcggcaagcaggcatcgccatgggtcacgacgagatcctcgcc
gtcgggcatccgcgccttgagcctggcgaacagttcggctggcgcgagcccctgatgctctt
cgtccagatcatcctgatcgacaagaccggcttccatccgagtacgtgctcgctcgatgcga
tgtttcgcttggtggtcgaatgggcaggtagccggatcaagcgtatgcagccgccgcattgc
atcagccatgatggatactttctcggcaggagcaaggtgagatgacaggagatcctgccccg
gcacttcgcccaatagcagccagtcccttcccgcttcagtgacaacgtcgagcacagctgcg
caaggaacgcccgtcgtggccagccacgatagccgcgctgcctcgtcttggagttcattcag
ggcaccggacaggtcggtcttgacaaaaagaaccgggcgcccctgcgctgacagccggaaca
cggcggcatcagagcagccgattgtctgttgtgcccagtcatagccgaatagcctctccacc
caagcggccggagaacctgcgtgcaatccatcttgttcaatcatgcgaaacgatcctcatcc
tgtctcttgatcagatcttgatcccctgcgccatcagatccttggcggcaagaaagccatcc
agtttactttgcagggcttcccaaccttaccagagggcgccccagctggcaattccggttcg
cttgctgtccataaaaccgcccagtctagctatcgccatgtaagcccactgcaagctacctg
ctttctctttgcgcttgcgttttcccttgtccagatagcccagtagctgacattcatccggg
gtcagcaccgtttctgcggactggctttctacgtgttccgcttcctttagcagcccttgcgc
cctgagtgcttgcggcagcgtgaagct

BY-NC-ND

Annexe 2 : Communications scientifiques sur le travail de thèse

- **Communications orales :**
  - **Nationale :** Diversité des séquences promotrices : le modèle intégron. **E. Couve-Deacon**, conférence invitée, « Section des Anti-Microbiens-Société Française de Microbiologie 2013 : Génomique et Résistance Nosocomiale », institut Pasteur, Paris, Décembre 2013

  - **Locale :** Etude des promoteurs des intégrons de classe 1 chez *Acinetobacter baumannii.* **E. Couvé-Deacon**, F. Garnier, MC Ploy. « Journée Scientifique GEIST 2014 », Limoges, septembre 2014

- **Communications affichées :**
  - **Internationale :** Strength and diversity of the gene cassettes promoter Pc of class 1 integrons in *Acinetobacter baumannii.* **E. Couvé-Deacon,** T. Jové, O. Barraud, C. Burucoa, M.C. Ploy, F. Garnier, « 23rd ECCMID », Berlin, avril 2013

  - **Nationale :** Etude des promoteurs des cassettes des intégrons chez *Acinetobacter baumannii.* **E. Couvé-Deacon,** T. Jové, O. Barraud, C. Burucoa, M.C. Ploy, F. Garnier, « 9ème Congrès National de la Société Française de Microbiologie », Lille, Février 2013

BY-NC-ND

Annexe 3 : publications

Au cours de mon activité professionnelle hospitalière et de recherche clinique, j'ai eu l'occasion de publier les articles qui sont listés ci-dessous :

- PVL-producing Methicillin-Susceptible Staphylococcus aureus outbreak in a French rugby team. **E. Couvé-Deacon**, A. Tristan, N. Pestourie, C. Faure, V. Doffoel-Hantz, F. Garnier, F. Laurent, G. Lina and M.C. Ploy. Emerging Infectious Disease

- Sulphonamide resistance associated with integon derivative Tn6326 in Actinotignum schaalii. O. Barraud, C. Isnard, R. Lienhard, F. Guerin, **E. Couvé-Deacon**, C. Martin, V. Cattoir, M.C. Ploy. En cours de révision dans Journal of Antimicrobial Chemotherapy.

- Urine contamination in non-toilet-trained and uncircumcised boys. Q. Ballouhey, L. Fourcade, **E. Couve-Deacon**, J. Cros, V. Lescure, C. Bahans, D. Chainier, F. Garnier, V. Guigonis. Urology (2016), http://dx.doi.org/doi: 10.1016/j.urology.2016.05.056.

- Factors associated with poor outcomes among adults hospitalized for influenza in France: A three-year prospective multicenter study. Loubet P, Samih-Lenzi N, Galtier F, Vanhems P, Loulergue P, Duval X, Jouneau S, Postil D, Rogez S, Valette M, Merle C, Régis C, Costa Y, Lesieur Z, Tattevin P, Lina B, Carrat F, Launay O; **FLUVAC Study Group**. J Clin Virol. 2016 Jun;79:68-73.

- Predominance of healthcare-associated cases among episodes of community-onset bacteraemia due to extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. J.R. Zahar, P. Lesprit, S. Ruckly, A. Eden, H. Hikombo, L. Bernard, S. Harbarth, J.F. Timsit, C. Brun-Buisson for the **BacterCom study Group**. Int J Antimicrob Agents. 2017 Jan;49(1):67-73

- Clinical characteristics and outcome of respiratory syncytial virus infection among adults hospitalized with influenza-like illness in France. Loubet P, Lenzi N, Valette M, Foulongne V, Krivine A, Houhou N, Lagathu G, Rogez S, Alain S, Duval X, Galtier F, Postil D, Tattevin P, Vanhems P, Carrat F, Lina B, Launay O; **FLUVAC Study Group**. Clin Microbiol Infect. 2017 Apr;23(4):253-259.

- Neonatal Outbreak of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clone Geraldine: A Bundle of Measures to Halt Transmission. **Couvé-Deacon E**, Mons F, Garnier F, Leduc P, Ponthier L, Domelier M, Tristan A, Ploy MC, Pestourie N. Infect Control Hosp Epidemiol. 2017 Jun;38(6):749-751.

- *Staphylococcus Aureus* Carriage in French Athletes at Risk of CA-MRSA Infection: a Prospective, Cross-sectional Study. **Couvé-Deacon E**, Postil D, Barraud O, Duchiron C, Chainier D, Labrunie A, Pestourie N, Preux PM, François B, Ploy MC. Sports Med Open. 2017 Aug 16;3(1):28.

- Comparative Analysis of Bacterial Community Composition and Structure in Clinically Symptomatic and Asymptomatic Central Venous Catheters. Stressmann FA, **Couve-Deacon E**, Chainier D, Chauhan A, Wessel A, Durand-Fontanier S, Escande MC, Kriegel I, Francois B, Ploy MC, Beloin C, Ghigo JM. mSphere. 2017 Sep 27;2(5). pii: e00146-17. doi: 10.1128/mSphere.00146-17. eCollection 2017 Sep-Oct.

- Integron Digestive Carriage in Human and Cattle: A "One Health" Cultivation-Independent Approach. Chainier D, Barraud O, Masson G, **Couve-Deacon E**, François B, Couquet CY, Ploy MC. Front Microbiol. 2017 Sep 27;8:1891.

BY-NC-ND

BY-NC-ND

EPIDEMIOLOGIE ET REGULATION DES INTEGRONS DE CLASSE 1 CHEZ *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Acinetobacter baumannii est un pathogène opportuniste qui prend une importance clinique croissante du fait de l'acquisition de multi-résistance. Nous avons étudié chez *A. baumannii* les caractéristiques et la régulation des intégrons de classe 1 (IM1) qui sont des systèmes génétiques favorisant l'acquisition, l'expression et la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques. Nous avons montré qu'il existe une prédominance des promoteurs des cassettes Pc fort *in vivo* dans une collection d'isolats cliniques et d'environnement hospitalier et *in silico* dans les IM1 chez *A. baumannii*. Nous avons aussi montré que l'expression des Pc chez *A. baumannii* est 4 fois plus faible que chez *E. coli*, quel que soit le variant de Pc. Deux explications sont possibles pour la sélection des Pc forts chez *A. baumannii* : (i) la nécessité d'avoir un niveau d'expression suffisant en clinique pour survivre à la pression de sélection antibiotique et (ii) la nécessité d'une régulation de l'expression de l'intégrase, représentant un coût biologique important. En effet, *A. baumannii* ne possède pas le système de répression par LexA existant chez *E. coli*. Nos résultats ouvrent le champ de l'étude de la régulation des IM1 chez *A. baumannii* et ainsi l'identification de nouvelles voies d'action pour lutter contre l'antibio-résistance

Mots-clés : *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, intégron, IM1, promoteur des cassettes, promoteur de l'intégrase, PcS, antibiorésistance, épidémiologie, régulation

EPIDEMIOLOGY AND REGULATION OF CLASS 1 INTEGRONS IN *ACINETOBACTER BAUMANNII*

Acinetobacter baumannii is an opportunistic pathogen of increasing clinical importance due to the acquisition of multi-resistance. We studied in *A. baumannii* the characteristics and regulation of class 1 integrons (IM1), which are genetic systems that favor the acquisition, expression and dissemination of antibiotic resistance genes. We have shown that there is a predominance of strong Pc cassette promoters, *in vivo,* in a collection of clinical and hospital environment isolates, and *in silico,* from *A. baumannii* IM1 published in NCBI. We have also shown that the expression of Pc in *A. baumannii* is 4-fold lower than in *E. coli*, regardless of the Pc variant. Explanations that can be raised for the selection of strong Pc in *A. baumannii* are: (i) the need for a sufficient level of antibiotic resistance expression to survive the selection pressure in clinical environment; and (ii) the need for regulation of the integrase expression, which is of significant biological cost. Indeed *A. baumannii* does not have the LexA repression system existing in *E. coli*. Our results open the field of the study of IM1 regulation in *A. baumannii* and thus the identification of new pathways to fight antibiotic resistance.

Keywords : *Acinetobacter baumannii*, *E. coli*, integron, IM1, cassette promoter, integrase promoter, PcS, antibiotic resistance, epidemiology, regulation

BY-NC-ND