



HAL
open science

Rôle des éléments intégratifs conjugatifs de la famille d'ICE SXT/R391 dans la dissémination des gènes d'antibiorésistance en milieu aquatique

Véronica Roman

► **To cite this version:**

Véronica Roman. Rôle des éléments intégratifs conjugatifs de la famille d'ICE SXT/R391 dans la dissémination des gènes d'antibiorésistance en milieu aquatique. Génétique. Université de Lorraine, 2021. Français. NNT : 2021LORR0276 . tel-03684712

HAL Id: tel-03684712

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03684712>

Submitted on 1 Jun 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



BioSE



École Doctorale :
Biologie Santé Environnement

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Véronica ROMAN**

Rôle des éléments intégratifs conjugatifs de la famille d'ICE SXT/R391 dans la dissémination de gènes d'antibiorésistance en milieu aquatique

17 Novembre 2021

Président du jury : M. Benoit Doublet

Membres du jury :

Directeurs de thèse :	M. Christophe MERLIN	MCU, HDR, LCPME UMR7564 CNRS-UL, Nancy, directeur de thèse.
	M. Xavier BELLANGER	MCU, HDR, LCPME UMR7564 CNRS-UL, Nancy, co-directeur de thèse.
Rapporteurs :	Mme Zeynep BAHAROGLU	Chargée de Recherche, HDR, Institut Pasteur, Paris.
	M. Benoit DOUBLET	Directeur de Recherche, INRAE, Tours.
Examineurs :	Mme Sophie PAYOT-LACROIX	Directrice de Recherche, INRA, Nancy.
	M. Pascal SIMONET	Directeur de Recherche Emerite, Ampère UMR CNRS 5005, Lyon.
Invitée :	Mme Sandrine BARON	Chef de projet Scientifique, Anses, Ploufragan.

LCPME-Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour les Matériaux et l'Environnement, UMR 7564 CNRS-Université de Lorraine, 9 avenue du Forêt de Haye, 54500 Vandoeuvre-les-Nancy, France.

Remerciements

Nous y sommes ! Je me lance aujourd'hui avec beaucoup d'émotion dans un exercice aussi périlleux que l'epicPCR : remercier en essayant de n'oublier personne. Pourtant, il me sera impossible de vous mentionner tous, mais sachez que vous n'êtes sans doute pas là par hasard à lire ces quelques lignes. Si vous ne trouvez pas votre nom ne soyez pas déçus, je voudrais vous dire MERCI.

Je voudrais d'abord remercier les personnes les plus dévouées à la recherche que je connaisse : Christophe et Xavier, mes directeurs de thèse. Vous êtes passionnés et passionnants, avec un fort penchant pour les gâteaux. Merci pour la confiance que vous m'avez accordée et d'avoir partagé votre savoir. Je repars avec plein de souvenirs (et des photos dossiers) de sorties terrain et de congrès.

Mille mercis à l'ensemble des membres, anciens ou actuels, de l'équipe MIC : Amélie, Alice, Charlène, Cédric, Christophe, David, Élixa, Evelyne, Frédéric, Frédérique, Guillaume, Hélène, Isabelle, Laurence, Manon, Marjorie, Marie, Marion, Nico, Ratish et Sylvie. Merci à ma Dream-Team Anaïs, Julie, Lorine et Magali. Merci à Laura, ma copine d'études-erasmus-thèse-galère, we did it. Merci Hélène, non seulement pour ton soutien technique, mais aussi pour toutes ces heures de papotage au labo. Je ne pouvais pas clore cette partie sans te remercier comme il se doit Julie, merci pour ton soutien sans faille, je ne pouvais rêver mieux que de travailler avec ma meilleure amie. Il y a quatre ans, vous m'avez vue arriver au LCPME en tant que stagiaire. J'ai depuis obtenu mon master, je suis devenue maman, je suis mariée et je serai bientôt Docteur. Rien que ça... alors un grand MERCI pour tous ces moments partagés, souvent autour de gâteaux ou d'une pizza, et surtout, merci pour les potins.

Enfin, je voudrais remercier les copains, et les copinautes de portage pour leur soutien. Il y a un proverbe africain qui dit qu'il faut tout un village pour élever un enfant et grâce à vous, j'ai trouvé le mien. Merci à ma famille, et surtout merci à toi Lise. Merci Noumi et Moscou. Merci Benjamin de m'émerveiller chaque jour, je veux te rendre fier. Pour terminer, merci Florian de m'avoir encouragée et épaulée dans cette aventure, merci pour ta patience, ton amour, et pour tous les efforts consentis pour que je réalise cette thèse dans les meilleures conditions possibles.

LISTE D'ABBREVIATIONS ET ACCRONYMES

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNg	ADN génomique
ADNr	ADN ribosomique
ADS	“Anaerobic Digestion Sludge” (Boues anaérobies)
AM	Amont
AMP	Ampicilline
ARG	“Antibiotic Resistance Genes” (Gènes d'antibiorésistance)
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
AS	“Activated sludge” (Boues activées)
ASM	Art-sur-Meurthe
AV	Aval
AZM	Azithromycine
BF	Biofilm
BP	“Blocking Primers”
BS	Bassin piscicole
CAM	Chloramphénicol
CDC	“Centers for disease control and prevention”
CDCP	Centre de Contrôle de Prévention des Maladies
CHL	Chloramphénicol
CIP	Ciprofloxacine
CIP ^R	Souche résistante à la ciprofloxacine
CIP ^S	Souche sensible à la ciprofloxacine
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CST	Colistine
CTX	Céfotaxime
Cu	Cuivre
DAM	Damelevières
DDD	“Defined Daily Dose”
ddPCR	Droplet Digital PCR
DHF	Dihydrofolate
DW	Downstream WWTP (aval STEP)
EGM	Éléments Génétiques Mobiles
EpicPCR	Emulsion Paired Isolation and Concatenation PCR
ERY	Erythromycine
FAD	Acide fusidique
FEP	Céfépime
FS	Fèces de poisson
GEN	Gentamicine
ICE	Éléments Intégratifs Conjugatifs

IDSA	Société Américaine de Maladies Infectieuses
IN	Contenu intestinal
IPM	Imipenème
IS	Séquences d'insertion
KAN	Kanamycine
LB	Lysogeny Broth (Milieu de culture)
LOQ	"Limit of Quantification" (Limite de Quantification)
MF	Filtre Mécanique
MSM	Mont-sur-Meurthe
NAL	Acide nalidixique
NAN	Nancy
NCBI	National Center for Biology Information
NEO	Néomycine
NXN	Norfloxacin
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORF	"Open Reading Frame" (Phase Ouverte de Lecture)
OTU	Unité Taxonomique Opérationnelle
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDR	Pan Drug Resistant
PWWTP	Pharmaceutical Wastewater Treatment Plant
PY	Peptone-Protein Yeast (Milieu de culture)
(^R)	Resistance
RAM	Rifampicine
RDF	Recombination Directionality Factor (Facteur de direction de recombinaison)
RIF	Rifampicine
SC	Contenu Stomacal
SNP	Saint-Nicolas-de-Port
SPC	Spectinomycine
STEP	Station d'épuration
STR	Streptomycine
SUL	Sulfamethoxazole
SXT	Sulfamethoxazole et triméthoprime
TCN	Tétracycline
THF	Tétrahydrofolate
THG	Transfert Horizontal de Gènes
T _m	"Melting Temperature" (Température de fusion)
TMP	Triméthoprime
TOB	Tobramycine
UP	Upstream WWTP (amont STEP)
UV	Ultra-Violet
VAN	Vancomycine
WW	WWTP = Waste Water Treatment Plant (STEP)
XDR	Extensively Drug Resistant

TABLE DES MATIERES

LISTE D'ABBREVIATIONS ET ACCRONYMES	3
TABLE DES MATIÈRES	5
LISTE DES FIGURES	9
INTRODUCTION	22
1. DE LA DECOUVERTE DES PREMIERS ANTIMICROBIENS A L'EMERGENCE DE L'ANTIBIORESISTANCE	22
1.1. L'AGE D'OR DE LA DECOUVERTE ET DU DEVELOPPEMENT D'ANTIBIOTIQUES.....	22
1.2. LA CONSOMMATION D'ANTIBIOTIQUES AUJOURD'HUI.....	23
1.3. L'EMERGENCE ET LA DISSEMINATION DE RESISTANCES : LES CAUSES ET LES CONSEQUENCES.....	24
2. LA DISSEMINATION DE GENES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES	34
2.1. LES ELEMENTS GENETIQUES MOBILES : LES VECTEURS DE L'ANTIBIORESISTANCE	34
2.2. ABONDANCE DES ELEMENTS GENETIQUES MOBILES	38
2.3. LES ICE ET LE CAS PARTICULIER DE LA FAMILLE SXT/R391	40
3. ETAT DE L'ART SUR LE SUIVI DE LA DISSEMINATION D'UN EGM DANS UN SYSTEME ENVIRONNEMENTAL, ET IDENTIFICATION DU SPECTRE D'HOTES DES ELEMENTS TRANSFERES	47
4. OBJECTIFS DE TRAVAIL	57
MATÉRIELS ET MÉTHODES	60
1. SOUCHES BACTERIENNES ET CONDITIONS DE CULTURE	60
2. DETERMINATION DE CMI EN MILIEU LIQUIDE	64
3. EXTRACTION DE PLASMIDES ET PURIFICATION DE PRODUITS DE PCR	64
4. EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN GENOMIQUE	65
4.1. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE A PARTIR D'UNE CULTURE PURE.....	65
4.2. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE DE COMMUNAUTES BACTERIENNES.....	65
4.2.1. Le kit « DNeasy PowerWater » (Qiagen).....	65
4.2.2. Le kit « DNeasy PowerSoil » (Qiagen)	65
4.2.3. Méthode adaptée de Porteous et al.....	65
5. ÉVALUATION DE LA CONCENTRATION ET DE LA PURETE DES ADN EXTRAITS :	66
6. ÉLECTROPHORESE DE L'ADN	67
7. CONJUGAISON BACTERIENNE	67
7.1. CONJUGAISON BACTERIENNE SUR FILTRE.....	67
7.2. CONJUGAISON BACTERIENNE SUR BOITE	68

8. ELECTROTRANSFORMATION.....	68
9. CONSTRUCTION DE SOUCHES BACTERIENNES.....	69
9.1. E. COLI MG1655 Δ LACZY::SXT ^{MO10} -TAGPB10 DONNEUSE POUR LES TRANSFERTS EN MICROCOSMES	69
9.2. P. MIRABILIS BB2000 ::MINI-TN7 ::SXT ^{MO10} -TAGPB10 DONNEUSE POUR LES MICROCOSMES 70	
9.3. BIOSENSEURS LUMINESCENTS	70
10. BIOESSAIS LUMINESCENTS POUR LE CRIBLAGE D'ANTIBIOTIQUES.....	73
11. MESURE DE L'ACTIVITE DE BIOSENSEURS LUMINESCENTS	73
12. CYTOMETRIE EN FLUX	74
13. AMORCES ET SONDES	75
13.1. AMORCES ET SONDES UTILISEES DANS CE TRAVAIL	75
13.2. ÉLABORATION D'UN NOUVEAU JEU D'AMORCES CIBLANT LES ICE SXT/R391	78
13.2.1. Choix d'une séquence spécifique	78
13.2.2. Contrôles in silico et in vitro de la qualité des amorces traB	78
14. DETECTION ET QUANTIFICATION DE SOUCHES/ICE MARQUES	79
14.1. AMPLIFICATION D'ADN PAR QPCR.....	79
14.2. AMPLIFICATION D'ADN PAR DDPCR.....	79
15. ANALYSE DU SPECTRE D'HOTES DES ICE SXT/R391 PAR EPICPCR	80
15.1. DENOMBREMENT DES CELLULES ET FORMATION DES BILLES DE POLYACRYLAMIDE	80
15.2. PCR FUSION, BLOCKING PRIMERS ET NICHEE	81
15.3. ANALYSE DES SEQUENCES	82
16. TRANSFERT DE SXT^{MO10} EN MICROCOSMES DE SEDIMENTS DE RIVIERE	83
<u>PARTIE 1 : ÉTUDE DES ÉLÉMENTS SXT/R391 EN MILIEU AQUATIQUE</u>	<u>85</u>
1. ÉLABORATION D'UN NOUVEAU JEU D'AMORCES CIBLANT SPECIFIQUEMENT LES ICE SXT/R391	86
1.1. CHOIX D'UNE SEQUENCE SPECIFIQUE.....	86
1.2. CONTROLES IN SILICO ET IN VITRO DE LA QUALITE DES AMORCES	89
2. ABONDANCE DES ELEMENTS SXT/R391	94
2.1. PREVALENCE DES ELEMENTS SXT/R391 DANS DES COLLECTIONS DE BACTERIES ENVIRONNEMENTALES.....	94
2.2. IDENTIFICATION D'ENVIRONNEMENTS RICHES EN ICE SXT/R391	97
2.2.1. Choix d'une méthode d'extraction de l'ADN total	97
2.2.2. Occurrence des éléments SXT/R391 dans des environnements aquatiques	99
3. IDENTIFICATION DES HOTES ENVIRONNEMENTAUX DES ICE SXT/R391 PAR EPICPCR	105
3.1. OPTIMISATION DU PROTOCOLE D'EPICPCR	107

3.2. CONTROLE DE LA METHODE PAR CLONAGE/SEQUENÇAGE	113
3.3. IDENTIFICATION DES HOTES DES ICE SXT/R391 DANS L'ORNE ET LA MEURTHE.....	114

PARTIE 2 : ETUDE DE LA RÉGULATION ET DU TRANSFERT DE L'ICE SXT^{MO10} 125

1. ÉTUDE DE L'INDUCTION ET DE LA MOBILITE DE SXT^{MO10} CHEZ E. COLI	127
1.1. METHODE DE CRIBLAGE POUR L'IDENTIFICATION DE MOLECULES INDUCTRICES DE LA MOBILITE DES ICE SXT ^{MO10}	127
1.2. INDUCTION DES PROMOTEURS DE L'ICE SXT ^{MO10}	131
1.2.1. Criblage à grande échelle des effets de 48 antibiotiques sur les promoteurs de SXT ^{MO10}	131
1.2.2. Caractérisation d'inductions de luminescence aspécifiques.....	135
1.2.3. Identification de nouveaux antibiotiques inducteurs des régulons SetR/SetCD	139
1.3. DE L'INDUCTION DE PROMOTEURS A L'INDUCTION DU TRANSFERT DE SXT ^{MO10}	140
1.3.1. Effet des antibiotiques inducteurs du régulon SetR/SetCD sur la dissémination de SXT ^{MO10}	140
1.3.2. Induction du promoteur P _{s086} chez E. coli sensible à la ciprofloxacine (Cip ^S).....	143
1.3.3. Induction du transfert de l'ICE SXT ^{MO10} chez E. coli par la ciprofloxacine.....	144
1.3.3.1. Effet de l'exposition à la ciprofloxacine : identification d'une sous-population de donneuses Cip ^R	146
1.3.3.2. Inductibilité du promoteur P _{s086} chez E. coli Cip ^R	149
1.3.3.3. Comparaison de l'Induction de la dissémination de SXT ^{MO10} par la ciprofloxacine chez E. coli Cip ^R et E. coli Cip ^S	150
2. EFFET DE L'HOTE SUR L'INDUCTION ET LA MOBILITE DE L'ICE SXT^{MO10} IN VITRO	152
2.1. INDUCTION DE LA MOBILITE DES ICE SXT/391 CHEZ DIVERSES PROTEOBACTERIES	152
2.1.1. Induction de P _{s086} dans différentes protéobactéries : criblage préliminaire	152
2.1.2. Adaptation méthodologique pour le criblage de biosenseurs à bas niveau de luminescence	156
2.1.3. Effet de l'hôte donneur sur la fréquence de transfert de SXT ^{MO10}	159
2.2. INDUCTION DU PROMOTEUR P _{s086} CHEZ P. MIRABILIS BB2000	163
2.2.1. 2.2.2.1 Caractérisation des profils d'induction de luminescence	163
2.2.2. Effet du milieu de culture sur l'induction de P _{s086} et la mobilité de SXT ^{MO10}	165
2.2.2.1. Effet du milieu de culture sur l'induction de luminescence	165
2.2.2.2. Inductibilité du promoteur P _{s086} chez P. mirabilis BB2000	167
3. TRANSFERT DE SXT^{MO10} DANS L'ENVIRONNEMENT	170
3.1. ÉTIQUETAGE ET CONTROLE DE L'INTEGRITE FONCTIONNELLE DE L'ICE SXT ^{MO10}	172
3.2. CONSTRUCTION ET ETIQUETAGE DES BACTERIES DONNEUSES	176
3.3. TRANSFERT DE SXT ^{MO10} VERS DES COMMUNAUTES ENVIRONNEMENTALES	178

3.3.1. Optimisation préliminaire aux expérimentations en microcosmes utilisant E. coli comme donneuse	178
3.3.2. Transfert de SXT ^{MO10} en microcosme a partir d'une donneuse E. coli	181
3.3.3. Transfert de SXT ^{MO10} en microcosme a partir d'une donneuse P. mirabilis BB2000 184	

DISCUSSION..... 190

1. PREVALENCE DE SXT/R391 EN MILIEU AQUATIQUE	191
1.1. PREVALENCE DE SXT/R391 DANS ISOLATS ENVIRONNEMENTAUX	191
1.2. ABONDANCE DES ICE SXT/R391 DANS L'ENVIRONNEMENT	193
1.3. SPECTRE D'HOTES DE SXT/R391 DANS L'ENVIRONNEMENT	193
1.4. RELATION ENTRE LA SALINITE DE L'ENVIRONNEMENT ET LE SPECTRE D'HOTES DE SXT/R391 195	
1.5. HOTES PREFERENTIELS DES ELEMENTS SXT/R391	195
1.6. LES LIMITES DE LA METHODE D'EPICPCR	196
2. DISSEMINATION DE SXT^{MO10} DANS L'ENVIRONNEMENT	197
2.1. EFFET DE LA BACTERIE HOTE SUR LA REGULATION ET LA DISSEMINATION DE SXT ^{MO10}	198
2.2. CAUSES PLAUSIBLES DE L'ABSENCE DE TRANSFERT DE SXT ^{MO10} DANS L'ENVIRONNEMENT 200	
2.3. EFFET INDUCTEUR DE LA CIPROFLOXACINE SUR LA REGULATION ET LA DISSEMINATION DE SXT ^{MO10} CHEZ E. COLI	202
2.4. INDUCTION DE SXT ^{MO10} AU-DELA DE LA CMI DANS UN CONTEXTE ENVIRONNEMENTAL.....	204
2.5. TRANSFERT DANS DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES	205

REFERENCES 207

ANNEXES..... 218

RÉSUMÉ VULGARISÉ / LAY SUMMARY 219

RÉSUMÉ / ABSTRACT 220

LISTE DES FIGURES

- FIGURE 1 : MODE D’ACTION DES AGENTS MAJEURS CHIMIOOTHERAPEUTIQUES ANTIMICROBIENS. THF, TETRAHYDROFOLATE ; DHF, DIHYDROFOLATE ; ARNm, ARN MESSAGER ; ARNT, ARN DE TRANSFERT. D’APRES (BROCK ET AL., 2018). 23
- FIGURE 2 : CONSOMMATION GLOBALE D’ANTIBIOTIQUES DANS DIVERS PAYS CLASSES EN FONCTION DE LEURS REVENUS. (A) CONSOMMATION EN DOSES QUOTIDIENNES (DDDs) POUR 1000 HABITANTS PAR JOUR ENTRE LES ANNEES 2000 ET 2015. (B) CONSOMMATION TOTALE EN DDDs POUR 1 MILLIARD D’HABITANTS SUR L’ANNEE 2000 ET 2015. D’APRES KLEIN ET AL, 2018..... 24
- FIGURE 3 : FRISE CHRONOLOGIQUE PRESENTANT LES DATES DE MISES SUR LE MARCHE DE CERTAINS ANTIBIOTIQUES, ET LA DECOUVERTE DES RESISTANCES ASSOCIEES. PDR = « PAN-DRUG-RESISTANT » POUR LES BACTERIES RESISTANTES A TOUTES LES CLASSES D’ANTIBIOTIQUES ; R = RESISTANTES ; XDR = « EXTENSIVELY DRUG-RESISTANT » POUR LES BACTERIES EXTREMEMENT RESISTANTES AUX ANTIBIOTIQUES. D’APRES VENTOLA, 2015. 25
- FIGURE 4 : MECANISMES DE RESISTANCE AUX ANTIMICROBIENS. D’APRES C. MERLIN, LCPME. 26
- FIGURE 5 : TRANSFERT HORIZONTAL DE GENES ENTRE DES BACTERIES : (A) PAR TRANSFORMATION, (B) PAR TRANSDUCTION OU (C) PAR CONJUGAISON BACTERIENNE. LA TRANSFORMATION BACTERIENNE CONCERNE L’INTEGRATION D’UN FRAGMENT D’ADN EXTRACELLULAIRE DANS LE CHROMOSOME OU DANS UN PLASMIDE DE LA CELLULE RECEVEUSE. LORS DE LA TRANSDUCTION, DE L’ADN BACTERIEN EST ENCAPSIDE ACCIDENTELLEMENT ET POURRA S’INTEGRER DANS LE CHROMOSOME D’UNE BACTERIE HOTE LORS D’UNE NOUVELLE INFECTION. LORS DE LA CONJUGAISON, DES PLASMIDES (EN NOIR) OU DES ICE (NON REPRESENTES) UTILISENT UN ASSEMBLAGE PROTEIQUE APPELE PILUS, POUR SE TRANSFERER VERS UNE BACTERIE RECEVEUSE OU ILS POURRONT SE REPLIQUER DE MANIERE AUTONOME (PLASMIDE) OU S’INTEGRER DANS LE CHROMOSOME HOTE (ICE). LES ICE ET LES PLASMIDES DES BACTERIES GRAM POSITIVES (NON PRESENTEES), N’UTILISENT PAS DE PILI. D’AUTRES ELEMENTS MOBILES COMME LES TRANSPOSONS CONTRIBUENT AU TRANSFERT DE GENES LORSQU’ILS S’INTEGRENT DANS LES PLASMIDES OU ICE. D’APRES FURUYA ET LOWY (2006). 29
- FIGURE 6 : EXEMPLES DE VOIES DE DISSEMINATION ET D’ENRICHISSEMENT DE BACTERIES RESISTANTES ET/OU GENES D’ANTIBIORESISTANCE (ARG). (1) DISSEMINATION DE BACTERIES RESISTANTES, ET/OU DISSEMINATION D’ARG VIA THG, EN MILIEU HOSPITALIER SUITE A UN CONTACT ENTRE LES PATIENTS/VISITEURS/PERSONNELS OU UNE SURFACE CONTAMINEE. (2) LES BACTERIES RESISTANTES RESULTANT D’UN TRAITEMENT AUX ANTIBIOTIQUES, ET/OU LES GENES D’ANTIBIORESISTANCE, PEUVENT SE TRANSFERER DANS LES MEMES CONDITIONS DECRITES EN (1), ENTRE L’HOMME ET L’ANIMAL. (3) CONTAMINATION ALIMENTAIRE (VIANDE, PRODUITS LAITIERS, ŒUFS, POISSONS ET FRUITS DE MER, FRUITS ET LEGUMES). (4) TOURISME ET IMPORT DE NOURRITURE. (5) ACHEMINEMENT DE BACTERIES RESISTANTES ET/OU GENES D’ANTIBIORESISTANCE DANS LES EAUX DE RIVIERES, LACS ET EAUX SOUTERRAINES VIA LES EFFLUENTS DE STATION

D'ÉPURATION (ET CE MALGRÉ UN TRAITEMENT QUI ÉLIMINE 99% DES BACTÉRIES). (6)
 ÉPANDAGE DES BOUES DE STATION D'ÉPURATION QUI PERMETTENT AUX BACTÉRIES DE
 SE MULTIPLIER DANS LES SOLS, PLANTES, EAUX SOUTERRAINES OU DANS LES
 RIVIÈRES/LACS APRÈS LA PLUIE, OU DISSEMINER DES ARG VIA LE THG. D'APRÈS LA
 CONFÉDÉRATION SUISSE DANS « COMMUNICATION IN SCIENCE », 2019. 31

FIGURE 7 : SCHEMA DU CYCLE DE VIE D'UN ÉLÉMENT INTÉGRATIF ET CONJUGATIF (ICE). L'ICE
 EST INTÉGRÉ DANS LE CHROMOSOME DE LA BACTÉRIE HÔTE, DITE DONNEUSE, ET
 FLANQUÉ DES SÉQUENCES SPÉCIFIQUES ATT^R (À DROITE) ET ATT^L (À GAUCHE). LORS DE
 L'EXCISION, LA RECOMBINAISON DES SÉQUENCES ATT^R ET ATT^L VA CONDUIRE À LA
 CIRCULARISATION DE L'ICE, EN GÉNÉRANT DE NOUVEAUX SITES ATT^I (SUR L'ICE) ET
 ATT^B (SUR LE CHROMOSOME DE LA BACTÉRIE HÔTE). LE TRANSFERT DE L'ICE PEUT SE
 FAIRE VERS UNE BACTÉRIE DITE REÇEVEUSE PAR CONJUGAISON BACTÉRIENNE LORS DE
 LAQUELLE LA REPLICATION EN CERCLE ROULANT PERMET DE COPIER L'ICE PENDANT SON
 TRANSFERT (SIMPLE BRIN). LE DEUXIÈME BRIN EST SYNTHÉTISÉ GRÂCE À L'ADN
 POLYMERASE UNE FOIS L'ICE TRANSFÉRÉ, ET UNE NOUVELLE RECOMBINAISON
 SPÉCIFIQUE DE SITE ENTRE DES SITES ATT^P ET ATT^B PERMET L'INTÉGRATION DE
 L'ÉLÉMENT À LA FOIS DANS LA BACTÉRIE DONNEUSE ET DANS LA BACTÉRIE REÇEVEUSE.
 D'APRÈS WOZNIAK ET WALDOR, 2010. 37

FIGURE 8 : ABONDANCE RELATIVE DES ÉLÉMENTS GÉNÉTIQUES MOBILES PAR COPIES DE
 GÈNES D'ARNR 16S, DANS DES ÉCHANTILLONS DE BOUES ACTIVÉES (AS, ACTIVATED
 SLUDGE) ET DES DIGESTATS ANAÉROBES DE BOUES (ADS, ANAEROBIC DIGESTION
 SLUDGE). LA CATÉGORIE AUTRES (« OTHERS ») INDIQUE LES EGM QUI N'ONT ÉTÉ
 DÉFINIS NI COMME ÉTANT DES PLASMIDES NI COMME DES INTÉGRONS DANS CETTE ÉTUDE.
 LES PRÉLEVEMENTS D'AS1/ADS1 ET D'AS2/ADS2 ONT ÉTÉ EFFECTUÉS EN JANVIER ET
 NOVEMBRE 2015, RESPECTIVEMENT. D'APRÈS YOO ET AL, 2020. 39

FIGURE 9 : ACTIVATION DU TRANSFERT DE L'ÉLÉMENT SXT PAR LA RÉPONSE SOS. LORS DE
 L'INDUCTION DE LA RÉPONSE SOS, LA PROTÉINE RECA ACTIVÉE ($RECA^*$) EST CAPABLE
 D'INDUIRE L'AUTOCLIVAGE DE LA PROTÉINE SET^R , CE QUI PERMET DE LEVER LA
 RÉPRESSION DE SET^R EXERCÉE SUR LE PROMOTEUR P_L (APPELÉ ÉGALEMENT P_{S086}) EN
 AMONT DES GÈNES $S086$, SET^D ET SET^C . L'EXPRESSION DE CES GÈNES EST À L'ORIGINE
 DE L'INITIATION DE L'EXPRESSION D'AUTRES GÈNES IMPLIQUÉS DANS LE TRANSFERT
 CONJUGATIF DE L'ÉLÉMENT. LES FLECHES NOIRES ET FINES INDIQUENT L'ACTIVATION DE
 LA TRANSCRIPTION, CELLES AVEC UNE EXTREMITÉ EN T INDIQUENT UNE RÉPRESSION,
 CELLES NOIRES ET ÉPAISSÉS INDIQUENT UNE TRADUCTION ET LES GRISÉS FINES
 INDIQUENT UN CHANGEMENT DE L'ACTIVITÉ DE LA PROTÉINE. D'APRÈS BEABER ET AL,
 2004. 45

FIGURE 10 : INDUCTION DE LA RÉPONSE SOS LORS DE L'EXPOSITION À DES ANTIBIOTIQUES
 EN CONCENTRATIONS SUB-INHIBITRICES CHEZ *E. COLI* MG1655 ET *V. CHOLERA*
N16961 HAP^{R+}. LES CONCENTRATIONS SUIVANTES (CMI/100) ONT ÉTÉ UTILISÉES
 RESPECTIVEMENT POUR *E. COLI* / *V. CHOLERA* (EN $\mu\text{G}/\text{ML}^{-1}$) : CIPROFLOXACINE (CIP) À
 0,05/0,005 ; AMPICILLINE (AMP) ET RIFAMPICINE (RIF) À 0,05/0,01 ; TRIMETHOPRIME
 (TMP) À 0,05/0,005 ; TETRACYCLINE (TCN) À 0,15/0,015 ; CHLORAMPHENICOL (CAM)
 À 0,15/0,005 ; SPECTINOMYCINE (SPC), KANAMYCINE (KAN) ET STREPTOMYCINE (STR)
 À 0,2/0,05 ; GENTAMICINE (GEN), TOBRAMYCINE (TOB) ET NEOMYCINE (NEO) À

0,1/0,01. DES FUSIONS TRANSCRIPTIONNELLES $P_{REC N} ::GFP$ ONT ETE INSEREES CHEZ E. COLI MG1655 ET V. CHOLERAЕ N16961 HAP ^{R+} , AINSI QUE DANS LES SOUCHES LEXA _{IND} CHEZ QUI LA REPOSE SOS NE PEUT ETE ACTIVEE (REPRESSEUR LEXA INCLIVABLE). LA FLUORESCENCE A ETE MESUREE GRACE A UN CYTOMETRE, ET LE POURCENTAGE DE CELLULES FLUORESCENTES EST REPRESENTE SUR L'AXE DES ORDONNEES (Y). D'APRES BAHAROGLU ET MAZEL, 2011.....	46
FIGURE 11 : FREQUENCES DE TRANSFERT DU PLASMIDE RP4, PRESENT CHEZ E. COLI K12, VERS DES BACTERIES ENVIRONNEMENTALES (MICROCOSMES DE RIVIERE) EXPOSEES A DIVERSES CONCENTRATIONS DE CUIVRE (CU) ALLANT DE 0,05 µG/ML A 200 µG/ML. D'APRES WANG ET AL, 2014.....	49
FIGURE 12 : UTILISATION D'UN GENE RAPPORTEUR POUR LE SUIVI DU TRANSFERT D'UN EGM. LA BACTERIE DONNEUSE CONTIENT UN PLASMIDE CONJUGATIF MARQUE PAR LE GENE GFP. LA GFP EST UNE PROTEINE QUI EMET UNE FLUORESCENCE VERTE EST DONT L'EXPRESSION EST DEPENDANTE DU PROMOTEUR P_{LACZ} PLACE EN AMONT. LA BACTERIE DONNEUSE EXPRIME LE REPRESSEUR LACI A PARTIR D'UN GENE INTEGRE DANS LE CHROMOSOME, CE QUI REPRIME L'EXPRESSION DU GENE CODANT LA GFP DANS LE PLASMIDE. CEPENDANT, LORSQUE LE PLASMIDE EST TRANSFERE PAR CONJUGAISON, LE GENE N'EST PLUS REPRIME ET LES TRANSCONJUGANTS EMETTENT UNE FLUORESCENCE VERTE. D'APRES SØRENSEN ET AL, 2005.	50
FIGURE 13 : DETECTION DU TRANSFERT HORIZONTAL SANS CULTURE BACTERIENNE. LES BACTERIES EMETTANT UNE FLUORESCENCE VERTE PEUVENT ETE DETECTEES, DENOMBREES PAR CYTOMETRIE EN FLUX ET (A) ISOLEES PAR UN TRIEUR DE CELLULES. (B) L'ADN DE CES BACTERIES PEUT ETE EXTRAIT, ET (C) L'ADNR 16S AMPLIFIE POUR SEQUENCER ET DETERMINER LA NATURE DES BACTERIES AYANT ACQUIS L'EGM. D'APRES SØRENSEN ET AL, 2005.	50
FIGURE 14 : DIAGRAMME DE VENN REPRESENTANT DIFFERENTS ENSEMBLES DE TRANSCONJUGANTS (A ET C) DU PLASMIDE PKJK5 TRANSFERE VIA 3 BACTERIES DONNEUSES (E. COLI, P. PUTIDA ET KLUYVERA SP.), ET (B ET D) DES PLASMIDES PKJK5, RP4 ET PIPO2TET TRANSFERES VIA P. PUTIDA. LA PREVALENCE ET L'ABONDANCE DES OTU SONT REPRESENTEES RESPECTIVEMENT DANS LES DIAGRAMMES A/B ET C/D. LES OTU ONT ETE DEFINIES A 97% DE SIMILARITE, ET LE NOMBRE D'ECHANTILLONS A ETE NORMALISE A 30000. D'APRES KLÜMPER ET AL, 2015.....	52
FIGURE 15 : SUIVI DE LA QUANTIFICATION DE PB10 (A) ET DH5α (B) PAR QPCR DANS DES MICROCOSMES. D'APRES MERLIN ET AL, 2011.....	53
FIGURE 16 : RESUME DES ETAPES D'UNE AMPLIFICATION PAR EPICPCR. (A) DES CELLULES SONT EXTRAITES, ISOLEES DANS UNE EMULSION D'HUILE ET CAPTUREES INDIVIDUELLEMENT DANS DES BILLES DE POLYACRYLAMIDE. LES CELLULES PEUVENT ENSUITE ETE LYSEES POUR RECUPERER LEUR ADN GENOMIQUE (ADNG). (B) LES BILLES DE POLYACRYLAMIDE PERMETTENT D'ISOLER LES ADNG LES UNS DES AUTRES, MAIS SON SUFFISAMMENT PERMEABLES POUR LAISSER PASSER LES REACTIFS D'UNE REACTION PCR. (C) LA PCR FUSION AMPLIFIE D'ABORD UN FRAGMENT SPECIFIQUE DU GENE D'INTERET, ET UNE DES AMORCES SERT A AMPLIFIER UN FRAGMENT DU GENE CODANT L'ARNR 16S. IL EN RESULTE UN PRODUIT DE FUSION GENE D'INTERET – ADNR 16S. (D) LA PCR FUSION N'A LIEU QUE DANS LES BILLES DE POLYACRYLAMIDE QUI	

POSSEDENT UN ADN _G AVEC LE GENE D'INTERET. (E) LES PRODUITS DE FUSION SONT ENSUITE PREPARES POUR L'ETAPE DE SEQUENÇAGE, ET PERMETTENT DE DEFINIR LES BACTERIES HOTES DE CES ELEMENTS. D'APRES SPENCER ET AL, 2015.....	56
FIGURE 17 : PLAN DE PLAQUE POUR 2 REPETITIONS POUR LA MESURE DE L'ACTIVITE DE 2 BIOSENSEURS LUMINESCENTS EN PARALLELE (ROSE VS BLEU). LES NUMEROS 1 A 22 CORRESPONDENT A DES CONCENTRATIONS DECROISSANTES D'ANTIBIOTIQUE (1 LE PLUS CONCENTRE ; 22 LE MOINS CONCENTRE).	74
FIGURE 18 : RECHERCHE DE SEQUENCES CONSERVEES POUR L'ELABORATION D'UN JEU D'AMORCES CIBLANT SPECIFIQUEMENT LES ELEMENTS SXT/R391. (A) RECHERCHE DES SEQUENCES SIMILAIRES A CELLE DE LA SEQUENCE DE REFERENCE SXT ^{MO10} (« QUERY ») PAR BLAST _N , ET MISE EN EVIDENCE DE DEUX REGIONS CONSERVEES COMPRISES ENTRE 50000-70000 PB ET 73000-80000 PB, DONT (B) CELLE COMPRISE ENTRE 50000 ET 70000 PB CORRESPOND AUX GENES TRA IMPLIQUES DANS LE TRANSFERT DE L'ELEMENT. LE TABLEAU (C) LISTE LE COUPLE D'AMORCES (TRAB _{SXT-1} /TRAB _{SXT-2}) ET LA SOND (TRAB _{SXT-P}) ELABOREES PERMETTANT D'AMPLIFIER UN FRAGMENT DE 81 PB DANS LE GENE TRAB DES ELEMENTS SXT/R391.	88
FIGURE 19 : QUALITE ELECTROPHORETICQUE DES AMPLICONS TRAB AMPLIFIES GRACE A LA TECHNOLOGIE SYBR (A) ET TAQMAN (B). LES PISTES A A H CORRESPONDENT A DES AMPLICONS OBTENUS A PARTIR D'ADN ENVIRONNEMENTAUX EXTRAITS DE L'EAU DE LA MEURTHE, EN AMONT (C-D-E-F) OU EN AVAL (A-B-G-H) DE LA STATION D'EPURATION SITUEE A MAXEVILLE. DEUX MARQUEURS DE TAILLE (MT) A 50 PB ET 100 PB ONT ETE UTILISES. LES CONTROLES POSITIFS ONT ETE OBTENUS AVEC L'ADN PLASMIDIQUE DE PBELX2 (C+). C- EST LE BLANC DE PCR (SANS ADN).	91
FIGURE 20 : PROFILS ELECTROPHORETICQUES SUR GEL D'AGAROSE DES AMPLIFIATS (TRAB) OBTENUS AVEC L'ADN POLYMERASE PHUSION A PARTIR DE L'ADN TOTAL EXTRAIT D'EAU DE LA MEURTHE. MARQUEUR DE TAILLE « 50 BP DNA LADDER », QUATRE ECHANTILLONS ENVIRONNEMENTAUX (AV : AVAL ; AM : AMONT, DE LA STATION D'EPURATION) ET UN BLANC DE PCR (C _{ADN-}) SANS ADN.	92
FIGURE 21 : ALIGNEMENT DE 34 FRAGMENTS DE TRAB (A) ET MISE EN EVIDENCE DE 5 MOTIFS DIFFERENTS (B), RESULTANT DE 6 VARIATIONS LE LONG DU FRAGMENT DE 81 PB. LA COULEUR DES FRAGMENTS ALIGNES (A) CORRESPOND AUX TYPES DE VARIANTS EN (B). LES FRAGMENTS DE 81 PB ONT ETE AMPLIFIES GRACE AUX AMORCES TRAB _{SXT1} ET TRAB _{SXT2} LISTEES DANS LE TABLEAU 7.	93
FIGURE 22 : ABONDANCE RELATIVE DES ICE SXT/R391 DANS DES ECHANTILLONS D'EAU, DE BIOFILMS ET DE POISSONS DANS LES STRUCTURES PISCICOLES DE L'URAFPA ET DE L'ANSES. BS : EAU DU BASSIN PISCICOLE ; MF, EAU DU FILTRE MECANIQUE ; UV : EAU RECUPEREE APRES LE TRAITEMENT UV ; BF : BIOFILM ; SC, CONTENU STOMACAL ; IN ; CONTENU INTESTINAL ; FS, FECES DE POISSON. LES BARRES D'ERREUR INDIQUENT LES ERREURS STANDARD A LA MOYENNE (N=3, SAUF POUR BS, MF, UV ET BF OU N=1, DANS CES CAS LES BARRES D'ERREUR INDIQUENT LES ERREURS STANDARD DES TRIPLICATAS OBTENUS PAR QPCR). LES ASTERISQUES INDIQUENT LES VALEURS PROCHES DE LA LIMITE DE QUANTIFICATION EN QPCR.	100
FIGURE 23 : ABONDANCE RELATIVE DES ICE SXT/R391 DANS DES ECHANTILLONS D'EAU PRELEVES DANS DEUX EFFLUENTS DE STEP, ET LES RIVIERES ADJACENTES (L'ORNE ET	

LA MEURTHE). UP : EAU PRELEVEE EN AMONT DE LA STEP, WW : EFFLUENT DE LA STEP, DW : EN AVAL DE LA STEP. LES BARRES D'ERREUR INDIQUENT LES ERREURS STANDARD A LA MOYENNE (N=3). L'ASTERISQUE INDIQUE UNE VALEUR PROCHE DE LA LIMITE DE QUANTIFICATION EN QPCR. 102

FIGURE 24 : ABONDANCE RELATIVE DES ICE DE LA FAMILLE SXT/R391 ET DES INTEGRONS DE CLASSE 1 ET MESURE DE LA CONDUCTIVITE DANS DES ECHANTILLONS D'EAU DE RIVIERE PRELEVES LE LONG DE LA MEURTHE. MSM, MONT-SUR-MEURTHE ; DAM, DAMELEVIERES ; SNP, SAINT-NICOLAS-DE-PORT ; ASM, ART-SUR-MEURTHE ; NAN, NANCY. L'ENSEMBLE DES SITES DE PRELEVEMENT SONT SITUES EN AMONT DE LA STATION D'EPURATION DE NANCY. LES BARRES D'ERREUR INDIQUENT L'ERREUR STANDARD A LA MOYENNE (N=3)..... 104

FIGURE 25 : PCR FUSION, PCR NICHEE ET ROLE DES « BLOCKING PRIMERS ». (A) LA PCR FUSION PERMET DE LIER DEUX AMPLICONS LORS D'UNE SEULE REACTION DE PCR GRACE AUX AMORCES F1/R1 QUI CIBLENT LE GENE D'INTERET ET LES AMORCES R1-F2' QUI CIBLENT L'ADNR 16S. L'AMORCE R1-F2' SERT A AMPLIFIER LE FRAGMENT DU GENE D'INTERET ET AJOUTE UNE SEQUENCE QUI VA SERVIR D'AMORCE POUR AMPLIFIER L'ADNR 16S AVEC R2. LES AMORCES F1 ET R2 SONT AJOUTEES EN EXCES PAR RAPPORT A R1-F2', DE MANIERE A FAVORISER L'AMPLIFICATION DU GRAND FRAGMENT DE FUSION. (B) LORS DE LA PCR NICHEE, LE PRODUIT DE FUSION EST AMPLIFIE AVEC LES ADAPTATEURS ILLUMINA (EN GRIS FONCE), TANDIS QUE LES FRAGMENTS CORRESPONDANT AU GENE D'INTERET OU A L'ADNR 16S ENCORE NON-FUSIONNES SONT EMPECHES DE S'AMPLIFIER GRACE AUX AMORCES « BLOCKING PRIMERS ». LES « BLOCKING PRIMERS » SONT AJOUTES EN EXCES ET S'HYBRIDENT A LA SEQUENCE DE L'ADNR 16S MAIS NE PEUVENT PAS INITIER D'E POLYMERISATION DE NUCLEOTIDES DU FAIT DE LA PRESENCE DE L'EXTREMITÉ « C3-CARBON-SPACER ». D'APRES (SPENCER ET AL., 2015). 106

FIGURE 26 : SEQUENCE THEORIQUE DU PRODUIT DE FUSION DE 341 PB « TRAB-16S » APRES LA PCR NICHEE REALISEE SUR LA SOUCHE E. COLI MG1656::SXT^{MO10} (CM1272). LES FRAGMENTS CODANT L'ARNR 16S ET TRAB, ISSUS RESPECTIVEMENT D'E. COLI (GENBANK: J01859.1) ET V. CHOLERAЕ (GENBANK: AY055428.1), FONT 288 PB ET 53 PB. LES AMORCES 806R (R3), TRAB_{SXT-3}_COMP-INV (F3) ET TRAB_{SXT-1}_519R (F2-R1') SONT DECRITES DANS LE TABLEAU 7. LA REGION SURLIGNEE EN JAUNE CORRESPOND A LA SEQUENCE CIBLE DES AMORCES BP-FORWARD ET BP-REVERSE. 109

FIGURE 27 : ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES AMPLICONS OBTENUS LORS DE LA PCR NICHEE REALISEE SUR LA SOUCHE E. COLI MG1656::SXT^{MO10} (CM1272). LES DIFFERENTES CONDITIONS TESTEES SONT INDIQUEES SUR LE TABLEAU AU-DESSUS DU GEL. LA TAILLE ATTENDUE DU PRODUIT DE FUSION « TRAB-16S » EST DE 341 PB.... 110

FIGURE 28 : ANALYSE ELECTROPHORETIQUE DES AMPLICONS OBTENUS LORS DE LA PCR NICHEE REALISEE SUR LA SOUCHE E. COLI MG1656::SXT^{MO10} (CM1272), AVEC UN GRADIENT DE CONCENTRATION CROISSANT EN « BLOCKING PRIMERS ». LE PRODUIT DE FUSION « TRAB-16S » FAIT 341 PB. LES CONCENTRATIONS FINALES DE « BLOCKING PRIMERS » SONT DE 0,3 µM ; 1,0 µM ; 2,0 µM ET 3,2 µM (CONCENTRATION UTILISEE PAR LE PROTOCOLE INITIAL DE SPENCER ET AL (SPENCER ET AL., 2015)). MARQUEUR DE TAILLE (MT) DE 100 PB. LE BLANC DE PCR « C-», A ETE REALISE SANS ADN MATRICE ET SANS « BLOCKING PRIMERS ». 110

- FIGURE 29 : ANALYSE ELECTROPHORETICQUE DES AMPLICONS OBTENUS LORS DE LA PCR NICHEE REALISEE SUR LA SOUCHE E. COLI MG1656::SXT^{MO10} (CM1272) AVEC DIFFERENTES CONCENTRATIONS FINALES DE BP-FORWARD (BP-F), BP-REVERSE (BP-R) OU DES DEUX BLOCKING PRIMERS (0,3 μ M OU 3,2 μ M). MARQUEURS DE TAILLE (MT) : 50 BP ET 100 BP. LE BLANC DE PCR A ETE REALISE SANS ADN MATRICE ET SANS « BLOCKING PRIMERS »..... 111
- FIGURE 30 : EFFICACITE RELATIVE DE LA PCR NICHEE LORS D'EPICPCR REALISEES EN DEUX OU TROIS ETAPES EN UTILISANT DIFFERENTES CONCENTRATIONS EN « BLOCKING PRIMERS » (BP). LES EPICPCR ONT ETE REALISEES A PARTIR DE CELLULES EXTRAITES DE L'EAU DE LA MEURTHE. LES PUIXS A ET C CORRESPONDENT A UNE EPICPCR EN DEUX ETAPES, OU L'ADN DE LA PCR FUSION A ETE UTILISE TEL QUEL POUR LA PCR NICHEE (A) ET DILUE AU 1/10E POUR (C) POUR DIMINUER LA PRESENCE D'EVENTUELS INHIBITEURS. LES PUIXS B CORRESPONDENT AUX PRODUITS DE L'EPICPCR REALISEE EN 3 ETAPES. LA PRODUIT D'INTERET (FRAGMENT DU GENE TRAB + FRAGMENT DU GENE CODANT L'ARNR 16S) MESURE ENVIRON 350 PB. LA FLECHE INDIQUANT « EPICPCR » CORRESPOND AU RESULTAT OBTENU EN UTILISANT LE PROTOCOLE D'HULTMAN ET AL (2018), ET CELLE INDIQUANT « EPICPCR 2.0 » CORRESPOND AUX CONDITIONS CHOISIES POUR CE TRAVAIL..... 112
- FIGURE 31 : ANALYSE DES AMPLICONS OBTENUS PAR EPICPCR SUR L'EAU DE LA MEURTHE AYANT ETE CLONES ET SEQUENCES PAR LA METHODE SANGER. LE FRAGMENT CORRESPONDANT A L'ADNR 16S A ETE COMPARE AUX BASES DE DONNEES PAR BLASTN. LE GRAPHIQUE REPRESENT LE POURCENTAGE DE SEQUENCES IDENTIQUES. 114
- FIGURE 32 : PLAN D'EXPERIENCE POUR LA VALIDATION DES OTU OBTENUES DE REPLICAS TECHNIQUES OU BIOLOGIQUES. LES REPLICAS REALISES A PARTIR D'UN MEME LOT DE BILLES SONT DES REPLICAS TECHNIQUES, LES REPLICAS REALISES A PARTIR DE DIFFERENTS LOTS DE BILLES SONT CONSIDERES COMME DES REPLICAS BIOLOGIQUES. D'APRES ROMAN ET AL., (2021B). 117
- FIGURE 33 : LE DIAGRAMME DE VENN REPRESENT LA REPARTITION DES OTU POUVANT ETRE OBTENUES PAR LES DIFFERENTES METHODES DE VALIDATION DES DONNEES D'EPICPCR REALISEES SUR L'EAU DE LA MEURTHE. D'APRES (VERONICA L. ROMAN ET AL., 2021B). 117
- FIGURE 34 : EFFICACITE DE L'EXPERIENCE D'EPICPCR EXPRIMEE EN PROBABILITE CUMULEE DE DETECTER ET VALIDER UNE OTU FAISANT PARTIE DES HOTES DES ELEMENTS SXT/R391 (DANS L'EAU DE LA RIVIERE MEURTHE). LA PROBABILITE CUMULEE EST DETERMINEE EN FONCTION DE LA METHODE DE VALIDATION DES OTUS EN DUPLICATAS OU TRIPLICATAS TECHNIQUES (LE PLAN D'EXPERIENCE EST PRESENTE DANS LA FIGURE 32). CHAQUE COULEUR/BANDE REPRESENT UN OTU UNIQUE. 118
- FIGURE 35 : SPECTRE D'HOTES DES ELEMENTS SXT/R391 DANS LES EAUX DE L'ORNE IDENTIFIES PAR EPICPCR. UP : ECHANTILLON D'EAU DE LA RIVIERE PRELEVEE EN AMONT DE DE LA STEP, WW : ECHANTILLON D'EAU PRELEVE DANS L'EFFLUENT DE LA STEP, DW : ECHANTILLON D'EAU PRELEVE EN AVAL DE LA STEP. L'ARBRE PHYLOGENETIQUE A ETE CONSTRUIT EN UTILISANT L'OTU LE PLUS ABONDANT DE CHAQUE FAMILLE. CINQ

NIVEAUX DE CONFIANCE ONT ETE DEFINIS (N=1 A N=5) POUR CARACTERISER LA PRESENCE DES ELEMENTS SXT/R391 DANS LES FAMILLES PRESENTES SUR CET ARBRE. LES FAMILLES PRESENTANT UN CERCLE VIDE ONT DEJA ETE DECRITES DANS LA LITTERATURE COMMENT ETANT DES HOTES DES ELEMENTS SXT/R391, CELLES PRESENTANT UN CERCLE PLEIN ONT OBTENU LE MEILLEUR NIVEAU DE CONFIANCE DANS CE TRAVAIL (N≥3). LES RECTANGLES NOIRS REPRESENTENT L'ABONDANCE RELATIVE DU GENE CODANT L'ARNr 16S POUR CHACUNE DES FAMILLES DEFINIES EN UP, WW ET DW (LOG10 (SOMME DU NOMBRE DE SEQUENCES D'OTU D'UNE MEME FAMILLE / SOMME DES SEQUENCES D'UN ECHANTILLON) × 100 000). LES ASTERISQUES (*) REPRESENTENT LES FAMILLES NON IDENTIFIEES. 120

FIGURE 36 : SPECTRE D'HOTES DES ELEMENTS SXT/R391 DANS LES EAUX DE LA MEURTHE IDENTIFIES PAR EPICPCR. UP : ECHANTILLON D'EAU DE LA RIVIERE PRELEVEE EN AMONT DE DE LA STEP, WW : ECHANTILLON D'EAU PRELEVE DANS L'EFFLUENT DE LA STEP, DW : ECHANTILLON D'EAU PRELEVE EN AVAL DE LA STEP. L'ARBRE PHYLOGENETIQUE A ETE CONSTRUIT EN UTILISANT L'OTU LE PLUS ABONDANT DE CHAQUE FAMILLE. CINQ NIVEAUX DE CONFIANCE ONT ETE DEFINIS (N=1 A N=5) POUR CARACTERISER LA PRESENCE DES ELEMENTS SXT/R391 DANS LES FAMILLES PRESENTES SUR CET ARBRE. LES FAMILLES PRESENTANT UN CERCLE VIDE ONT DEJA ETE DECRITES DANS LA LITTERATURE COMMENT ETANT DES HOTES DES ELEMENTS SXT/R391, CELLES PRESENTANT UN CERCLE PLEIN ONT OBTENU LE MEILLEUR NIVEAU DE CONFIANCE DANS CE TRAVAIL (N≥3). LES RECTANGLES NOIRS REPRESENTENT L'ABONDANCE RELATIVE DU GENE CODANT L'ARNr 16S POUR CHACUNE DES FAMILLES DEFINIES EN UP, WW ET DW (LOG10 (SOMME DU NOMBRE DE SEQUENCES D'OTU D'UNE MEME FAMILLE / SOMME DES SEQUENCES D'UN ECHANTILLON) × 100 000). LES ASTERISQUES (*) REPRESENTENT LES FAMILLES NON IDENTIFIEES. 121

FIGURE 37 : PROMOTEURS IMPLIQUES DANS LES FONCTIONS DE MOBILITE DES ELEMENTS SXT^{MO10}. LES GENES SONT REPRESENTES PAR LES FLECHES EPAISSES COLOREES EN BLEU LORSQU'ILS SONT IMPLIQUES DANS LES FONCTIONS DE CONJUGAISON, OU EN ORANGE LORSQU'ILS SONT IMPLIQUES DANS LES FONCTIONS D'INTEGRATION OU D'EXCISION DE SXT^{MO10}. LES FLECHES EPAISSES COUPEES PAR DES LIGNES EN POINTILLEES REPRESENTENT DES OPERONS DELIMITES PAR LE PREMIER ET LE DERNIER GENE. LES FLECHES FINES AU-DESSUS DES GENES REPRESENTENT LES PROMOTEURS POTENTIELS (EN NOIR) OU CONFIRMES PAR D'AUTRES ETUDES (EN MARRON) (BEABER AND WALDOR, 2004; DZIEWIT ET AL., 2007; GARRISS, POULIN-LAPRADE AND BURRUS, 2013; POULIN-LAPRADE, CARRARO AND BURRUS, 2015). LES OPERONS IMPLIQUES DANS LA MOBILITE DE L'ELEMENT SXT^{MO10} SONT MARQUES PAR DES FLECHES FINES ET VERTES EN DESSOUS DES GENES, COMME ANNOTES DANS L'ETUDE DE POULIN-LAPRADE ET AL., (POULIN-LAPRADE, CARRARO AND BURRUS, 2015). D'APRES GUILLOTEAU ET AL, 2021. 128

FIGURE 38 : METHODE D'IDENTIFICATION DE MOLECULES INDUCTRICES DE PROMOTEURS DE L'ELEMENT SXT^{MO10}. (A) EXPOSITION DE BIOSENSEURS LUMINESCENTS A DES GRADIENTS DE CONCENTRATION D'ANTIBIOTIQUES. (B) ANTIBIOGRAMME ET LUMINOGRAMME OBTENUS GRACE A UNE CAMERA CCD HAUTE SENSIBILITE. (C) PROFIL

D'INDUCTION APRES TRAITEMENT DES DONNEES (FACTEUR D'INDUCTION EN FONCTION DE LA DISTANCE AU DISQUE DE DEPOT EN PIXELS). D'APRES GUILLOTEAU ET AL., 2021. 130

FIGURE 39 : PROFILS D'INDUCTION DE 46 BIOSENSEURS DERIVES E. COLI MG1656 ET E. COLI MG1656 ::SXT^{MO10} EXPOSES A 48 ANTIBIOTIQUES. LES PROMOTEURS DU REGULON SETCD APPARAISSENT EN CARACTERES GRAS SUR LA FIGURE. LES PROMOTEURS DU REGULON SETR SONT P_{S086} ET P_{SETR}. D'APRES GUILLOTEAU ET AL, 2021..... 134

FIGURE 40 : PROFILS D'INDUCTION DES BIOSENSEURS D'E. COLI PORTANT DES PROMOTEURS DE SXT^{MO10} DANS MG1656 (●) ET MG1656::SXT^{MO10} (●), OU DES PROMOTEURS CONSTITUTIFS DANS MG1656 (○) ET MG1656::SXT^{MO10} (●), EXPOSES A DIVERS ANTIBIOTIQUES. LA LIGNE CONTINUE VERTE REPRESENTE LA MEDIANE, ET LES POINTILLES ROUGES REPRESENTENT LA LIGNE DE BASE D'EXPRESSION DES PROMOTEURS CONSTITUTIFS (A) CAS DE FIGURE SANS INDUCTION, COMME AVEC L'AMOXICILLINE ; (B) INDUCTION NON SPECIFIQUE DE L'ENSEMBLE DES PROMOTEURS PAR LA TEICOPLANINE ; (C) INDUCTION DEPENDANTE DE LA FORCE DU PROMOTEUR CONSTITUTIF, COMME AVEC LA RIFAMPICINE ; (D) INDUCTION DES REGULONS SETR ET SETCD PAR DES QUINOLONES COMME LA CIPROFLOXACINE ; (E ET F) INDUCTION DES REGULONS SETR ET SETCD PAR DES MOLECULES AUTRES QUE DES QUINOLONES, COMME L'IMIPENEME ET L'AZITHROMYCINE. LES POINTS NUMEROTES CORRESPONDENT AUX BIOSENSEURS REALISES AVEC LES PROMOTEURS APPARTENANT AUX REGULONS SETR ET SETCD (1: P_{XIS} ; 2: P_{S003} ; 3: P_{MOBI} ; 4: P_{TRAI} ; 5: P_{TRAD} (NON-FONCTIONNEL) ; 6: P_{TRAL-2} ; 7: P_{TRAV} ; P_{DSBC-1} ; 9: P_{S063} (NON-FONCTIONNEL); 10: P_{S089} ; 11: P_{TRAF} ; 12: P_{S086} ; 13: P_{SETR}). CHAQUE VALEUR DE LUMINESCENCE EST UNE MOYENNE D'UN TRIPLICATA D'EXPERIENCES REALISE PAR BIOSENSEUR. 137

FIGURE 41 : INTERFERENCE DES FLUX D'ELECTRONS (NAD(P)H) ENTRE L'EMISSION DE LUMINESCENCE ET LA RESPIRATION. (A) ÉMISSION DE BIOLUMINESCENCE DES BIOSENSEURS E. COLI MG1656 COMPOSES DE PROMOTEURS CONSTITUTIFS AVEC DIFFERENTS NIVEAUX DE TRANSCRIPTION (NOTES ENTRE PARENTHESES), EXPOSES A DES CONCENTRATIONS CROISSANTES D'AZIDE DE SODIUM. CHAQUE VALEUR A ETE OBTENUE EN DUPLICATA ET LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT L'ERREUR STANDARD A LA MOYENNE. (B) SCHEMA REPRESENTANT LE PARTAGE DU FLUX D'ELECTRONS ENTRE LA LUCIFERASE ET LA CHAINE RESPIRATOIRE, (C) REDISTRIBUTION DU FLUX D'ELECTRONS EN CAS D'INHIBITION DE LA RESPIRATION PAR DES ANTIBIOTIQUES. D'APRES (GUILLOTEAU ET AL., 2021). 138

FIGURE 42 : INDUCTION DU TRANSFERT DE SXT^{MO10} PAR (A) L'AZYTHROMYCINE, (B) L'IMIPENEME ET (C) LA CIPROFLOXACINE. LES FREQUENCES DE TRANSFERT SONT REPRESENTEES EN TRANSCONJUGANTS PAR BACTERIES DONNEUSES. LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT L'ECART-TYPE (N=3). LES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI) ONT ETE DETERMINEES A 20 µG/ML POUR L'AZITHROMYCINE, 0,5 µG/ML POUR L'IMIPENEME ET 40 µG/ML POUR LA CIPROFLOXACINE. 142

FIGURE 43 : DETERMINATION DES CONDITIONS D'INDUCTION OPTIMALES DU PROMOTEUR P_{S086} PAR LA CIPROFLOXACINE CHEZ E. COLI MG1656::SXT^{MO10}. 144

FIGURE 44 : EFFET D'UN TRAITEMENT A LA CIPROFLOXACINE SUR LE TRANSFERT DE SXT^{MO10}. LES FREQUENCES DE CONJUGAISON SONT EXPRIMEES EN NOMBRE DE

TRANSCONJUGANTS PAR RECEVEUSE (A) OU SOUS FORME DE FACTEUR D'INDUCTION PAR RAPPORT A LA CONDITION NON INDUITE (B).	146
FIGURE 45 : IMAGES DE MICROSCOPIE (G40 × 2) DE SOUCHES D'E. COLI MG1656::SXT ^{MO10} -TAGPB10 SENSIBLES (CM1272) ET RESISTANCES (CM1366) A LA CIPROFLOXACINE, ET EXPOSEES A DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE CET ANTIBIOTIQUE.	148
FIGURE 46 : DISTRIBUTION DE LA FLUORESCENCE DANS DES CULTURES D'E. COLI MG1656::SXT ^{MO10} -TAGPB10 CIP ^R ET CIP ^S MARQUEES AUX SYBR GREEN. MESURE CYTOMETRIQUE DU NOMBRE D'EVENEMENTS EN FONCTION DE L'INTENSITE DE FLUORESCENCE D'UNE SOUCHE D'E. COLI MG1656::SXT ^{MO10} -TAGPB10 SENSIBLE (EN ROUGE) ET RESISTANTE (EN NOIR) A LA CIPROFLOXACINE. CES DONNEES ONT ETE OBTENUES, (A) AVANT LE TRAITEMENT, (B) APRES 3 H D'EXPOSITION A 5 NG/ML DE CIPROFLOXACINE ET (C) 2 H APRES L'EXPOSITION A L'ANTIBIOTIQUE.	148
FIGURE 47 : EFFET DU TRAITEMENT A LA CIPROFLOXACINE SUR L'INDUCTION DU PROMOTEUR P _{s086} DANS UNE SOUCHE SENSIBLE (CIP ^S) ET UNE SOUCHE RESISTANTE (CIP ^R) A LA CIPROFLOXACINE. LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT L'ECART-TYPE. CES RESULTATS ISSUS DU RAPPORT DE STAGE D'A. SEGHIER (M1 AU LCPME).	150
FIGURE 48 : EFFET D'UN TRAITEMENT A LA CIPROFLOXACINE SUR LE TRANSFERT DE L'ELEMENT SXT ^{MO10} CHEZ DEUX SOUCHES D'E. COLI, CM1272 (CIP ^S EN ROUGE) ET CM1366 (CIP ^R EN BLEU). LES FREQUENCES DE TRANSFERT SONT EXPRIMEES EN NOMBRE DE TRANSCONJUGANTS PAR BACTERIES RECEVEUSES. RESULTATS EXTRAITS DU RAPPORT DE STAGE D'A. SEGHIER (MASTER 1 AU LCPME).	151
FIGURE 49 : LUMINOGRAMMES DE 8 SOUCHES BACTERIENNES D'ESPECES DIFFERENTES EXPOSEES AU MEME JEU DE 16 ANTIBIOTIQUES. AZM (AZITHROMYCINE), FEP (CEFEPIME), CTX (CEFOTAXIME), CHL (CHLOREMPHENICOL), CIP (CIPROFLOXACINE), CST (COLISTINE), ERY (ERYTHROMYCINE), FAD (ACIDE FUSIDIQUE), IPM (IMPENEME), NAL (ACIDE NALIDIXIQUE), NXN (NORFLOXACINE), RAM (RIFAMPICINE), SUL (SULFAMIDE), TET (TETRACYCLINE), TMP (TRIMETHOPRIME), VAN (VANCOMYCINE).	154
FIGURE 50 : BRUIT DE FOND (EN CPS) EN FONCTION DE LA NATURE DE LA SOUCHE BACTERIENNE. LA LUMINESCENCE A ETE MESUREE PENDANT 30 SECONDES (TEMPS D'EXPOSITION PHOTO) APRES 7 H D'INCUBATION A 30°C.	155
FIGURE 51 : INDUCTION DU PROMOTEUR P _{s086} EN MILIEU LB PAR 16 ANTIBIOTIQUES CHEZ DEUX INDIVIDUS D'UNE MEME ESPECE PORTANT DEUX ELEMENTS SXT DIFFERENTS. LES CIBLES DES ANTIBIOTIQUES SONT LES SUIVANTES : L'ADN (CIP, NAL, NXN, SUL, TMP), L'ARN POLYMERASE (RAM), LA MEMBRANE (CST), LA PAROI (CTX, FEP, IPM, VAN) ET LE RIBOSOME (AZM, CHL, ERY, FAD, TET). AZM (AZITHROMYCINE), FEP (CEFEPIME), CTX (CEFOTAXIME), CHL (CHLOREMPHENICOL), CIP (CIPROFLOXACINE), CST (COLISTINE), ERY (ERYTHROMYCINE), FAD (ACIDE FUSIDIQUE), IPM (IMPENEME), NAL (ACIDE NALIDIXIQUE), NXN (NORFLOXACINE), RAM (RIFAMPICINE), SUL (SULFAMIDE), TET (TETRACYCLINE), TMP (TRIMETHOPRIME), VAN (VANCOMYCINE). LES EXPERIENCES ONT ETE REALISEES EN TRIPLICATAS ET LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT L'ECART-TYPE.	156
FIGURE 52 : INTENSITE DE LUMINESCENCE EN FONCTION DE LA NATURE DE LA SOUCHE BACTERIENNE, DE LA QUANTITE DE BACTERIES MISES EN JEU (0,3 ML A 3,0 ML), DU TEMPS	

D'INCUBATION (1H A 9H) ET DU TEMPS D'EXPOSITION (1 S A 60 S). POUR CHACUNE DES SOUCHES CM1732 (P. MIRABILIS HI4320::SXT^{END}(PSEVA236::P_{s086})), CM1734 (P. MIRABILIS BB2000::SXT^{MO10}(PSEVA236::P_{s086})), CM996 (E. COLI MG1656::SXT^{MO10} (PSEVA236::P_{s086})), CM1740 (V. CHOLERAEE N16961 HAPR^{WT}::SXT^{MO10}(PSEVA236::P_{s086})) ET CM1744 (V. VULNIFICUS CM1445::SXT^{MO10}(PSEVA236::P_{s086})) LA LUMINESCENCE A ETE MESUREE A 1 S, 10 S ET 60 S (TEMPS D'EXPOSITION) PENDANT 9 H D'INCUBATION. SEULS LES RESULTATS SUPERIEURS A LA LOQ (DEPENDANTE DU TEMPS D'EXPOSITION ET DE LA QUANTITE DE BACTERIES MISES EN JEU) SONT REPRESENTES SUR LES GRAPHIQUES. 158

FIGURE 53 : FREQUENCES DE TRANSFERT EN TRANSCONJUGANTS (Tc) PAR BACTERIES RECEVEUSES (R), EN FONCTION DE LA SOUCHE DONNEUSE DE L'ELEMENT SXT^{MO10}. EC : E. COLI MG1656::SXT^{MO10}-TAGPB10 (CM1272); VP : V. PARAHAEMOLYTICUS ::SXT^{MO10} (CM1599); Vv : V. VULNIFICUS ::SXT^{MO10} (CM1597); Vc : V. CHOLERAEE::SXT^{MO10} HAPR^{WT} (CM1595); AH : A. HYDROPHILA ATCC7966::SXT^{MO10} (CM1482); Pm : P. MIRABILIS BB2000 ::SXT^{MO10} (CM1702). LES EXPERIENCES DE CONJUGAISON ONT ETE REALISEES DANS LE MILIEU DE CULTURE LB. (*) POUR Vc ET AH QUI PRESENTENT UN NOMBRE DE Tc INFERIEUR A 30 UFC A LA PLUS FORTE CONCENTRATION, LA FREQUENCE DE TRANSFERT EN Tc/R A ETE CONSIDEREE COMME ETANT INFERIEURE A $1,0 \times 10^{-9}$. LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT L'ECART STANDARD A LA MOYENNE, OU N=3 SAUF POUR Vv OU N=2. 161

FIGURE 54 : LUMINOGRAMME ET PROFILS D'INDUCTION OBTENUS POUR L'EXPRESSION DU PROMOTEUR P_{s086} CHEZ P. MIRABILIS BB2000::SXT^{MO10}(PSEVA236 ::P_{s086}), CM1734, APRES 7H D'EXPOSITION A 16 ANTIBIOTIQUES SUR MILIEU DE CULTURE LB. (A) LUMINOGRAMME VISUALISE GRACE A L'INTERFACE DU LOGICIEL D'ACQUISITION INDIIGO OU LES COULEURS LES PLUS CHAUDES INDIQUENT UNE AUGMENTATION DE L'EXPRESSION DU PROMOTEUR TESTE. (B) PROFILS D'INDUCTION EN FONCTION DE LA DISTANCE AU DEPOT (EXTRAITS A PARTIR DU LUMINOGRAMME). AZM (AZITHROMYCINE), FEP (CEFEPIME), CTX (CEFOTAXIME), CHL (CHLOREMPHENICOL), CIP (CIPROFLOXACINE), CST (COLISTINE), ERY (ERYTHROMYCINE), FAD (ACIDE FUSIDIQUE), IPM (IMIPENEME), NAL (ACIDE NALIDIXIQUE), NXN (NORFLOXACINE), RAM (RIFAMPICINE), SUL (SULFAMIDE), TET (TETRACYCLINE), TMP (TRIMETHOPRIME), VAN (VANCOMYCINE). 164

FIGURE 55 : ANTIBIOGRAMMES ET LUMINOGRAMMES DE P. MIRABILIS BB2000::SXT^{MO10} (PSEVA236 ::P_{s086}) (CM1734) OBTENUS APRES 7 H D'EXPOSITION A 16 ANTIBIOTIQUES COMME PRECEDEMMENT (FIGURE 54), AINSI QUE LES PROFILS D'INDUCTION DE LA CEFOTAXIME (CTX) CULTIVES (A) SUR MILIEU DE CULTURE LB, ET (B) SUR MILIEU DE CULTURE PY. LES LUMINOGRAMMES SONT VISUALISES GRACE A L'INTERFACE DU LOGICIEL D'ACQUISITION INDIIGO OU LES COULEURS LES PLUS CHAUDES INDIQUENT UNE AUGMENTATION DE L'EXPRESSION DU PROMOTEUR TESTE. 166

FIGURE 56 : INDUCTION DE LUMINESCENCE CHEZ P. MIRABILIS BB2000::SXT^{MO10} (PSEVA236 ::P_{s086}) SUR LES MILIEUX DE CULTURE PY (EN BLEU), ET LB (EN GRIS). AZM (AZITHROMYCINE), FEP (CEFEPIME), CTX (CEFOTAXIME), CHL (CHLOREMPHENICOL), CIP (CIPROFLOXACINE), CST (COLISTINE), ERY (ERYTHROMYCINE), FAD (ACIDE

FUSIDIQUE), IPM (IMIPENEME), NAL (ACIDE NALIDIXIQUE), NXN (NORFLOXACINE), RAM (RIFAMPICINE), SUL (SULFAMIDE), TET (TETRACYCLINE), TMP (TRIMETHOPRIME), VAN (VANCOMYCINE). LES EXPERIENCES ONT ETE REALISEES EN TRIPLICATAS ET LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT L'ECART STANDARD A LA MOYENNE. 167

FIGURE 57 : PROFILS D'INDUCTION DES BIOSENSEURS PORTANT LE PROMOTEUR P_{s086} DE SXT^{MO10} DANS P. MIRABILIS BB2000 (○) ET P. MIRABILIS BB2000::SXT^{MO10} (●), AINSI QUE DES PROMOTEURS CONSTITUTIFS DANS P. MIRABILIS BB2000 (○) ET P. MIRABILIS BB2000::SXT^{MO10} (●), EXPOSES A DIVERS ANTIBIOTIQUES SUR LES MILIEUX DE CULTURE LB ET PY. LA LIGNE CONTINUE VERTE REPRESENT LA MEDIANE, ET LES POINTILLES ROUGES REPRESENTENT LA LIGNE DE BASE D'EXPRESSION DES PROMOTEURS CONSTITUTIFS DANS (i) LE CAS DE FIGURE SANS INDUCTION COMME LE CHLORAMPHENICOL (CHL) ET LA CEFOTOXIME (CTX); (ii) UNE INDUCTION DEPENDANTE DE LA FORCE DU PROMOTEUR CONSTITUTIF, COMME AVEC L'AZYTROMYCINE (AZM) OU LA CIPROFLOXAICNE (CIP) OU (iii) UNE INDUCTION NON SPECIFIQUE DE L'ENSEMBLE DES PROMOTEURS PAR LA COLISTINE (CST). LES ASTERISQUES CORRESPONDENT AUX ANTIBIOTIQUES QUI ONT LE MEME PROFIL D'INDUCTION. CHAQUE VALEUR DE LUMINESCENCE EST UNE MOYENNE D'UN TRIPLICATA EXPERIMENTAL ET LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT L'ERREUR NORMALE A LA MOYENNE. AZM (AZITHROMYCINE), FEP (CEFEPIME), CTX (CEFOTAXIME), CHL (CHLOREMPHENICOL), CIP (CIPROFLOXACINE), CST (COLISTINE), ERY (ERYTHROMYCINE), FAD (ACIDE FUSIDIQUE), IPM (IMIPENEME), NAL (ACIDE NALIDIXIQUE), NXN (NORFLOXACINE), RAM (RIFAMPICINE), SUL (SULFAMIDE), TET (TETRACYCLINE), TMP (TRIMETHOPRIME), VAN (VANCOMYCINE). 169

FIGURE 58 : EFFET DU MILIEU DE CULTURE SUR LES FREQUENCES DE TRANSFERT DE SXT^{MO10} CHEZ P. MIRABILIS BB2000::SXT^{MO10} (CM1702). LES FREQUENCES DE TRANSFERT SONT CALCULEES EN TRANSCONJUGANTS (Tc) PAR BACTERIES RECEVEUSES (R). LES EXPERIENCES DE CONJUGAISON ONT ETE REALISEES DANS LES MILIEUX DE CULTURE LB ET PY. LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT LES ECARTS A LA MOYENNE, OU N=3. 170

FIGURE 59 : METHODE ADAPTEE DE BONOT ET MERLIN (2010, LCPME) POUR LE SUIVI DU TRANSFERT DE L'ELEMENT SXT/R391 DANS L'ENVIRONNEMENT. 172

FIGURE 60 : CONSTRUCTION DE L'ICE SXT^{MO10}-TAGPB10. (A) ORGANISATION GENETIQUE DU PLASMIDE PB10 D'APRES SCHLÜTER (2003). LE SEGMENT BORDE PAR DES FLECHES EST AMPLIFIE PAR PCR POUR SERVIR DE MARQUEUR MOLECULAIRE (« TAGPB10 »). (B) ORGANISATION GENETIQUE DE L'ICE SXT^{MO10} (SCHLÜTER ET AL., 2003; POULIN-LAPRADE, CARRARO AND BURRUS, 2015) ET DETAIL DE LA REGION MODIFIEE PAR L'INSERTION DU TAGPB10. (C) STRUCTURE GENETIQUE DE LA REGION MODIFIEE APRES LA DOUBLE RECOMBINAISON HOMOLOGUE AYANT PERMIS D'INTEGRER LE SEGMENT TAGPB10 DANS SXT^{MO10}. LES DEUX COUPLES D'AMORCES, SXT-1 / TN OUT-1 (EN JAUNE) ET PB10-3 / SXT-2 (EN VERT), DESTINES AUX PCR DE CONTROLE SPECIFIQUES DES FRAGMENTS DE JONCTIONS ENTRE LE SEGMENT TAGPB10 DANS SXT^{MO10} SONT EGALEMENT REPRESENTES. LE SEGMENT D'ADN INDIQUE PAR UN ASTERISQUE CORRESPOND AU SEGMENT SPECIFIQUEMENT DETECTE PAR qPCR GRACE AU COUPLE D'AMORCES 162/163 (D'APRES MERLIN ET BONOT, 2010). 174

FIGURE 61 : VERIFICATION DU TRANSFERT DES ICE SXT^{MO10}, MARQUE OU NON, EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE CIPROFLOXACINE. RESULTATS DES CONJUGAISONS ENTRE LES SOUCHES DONNEUSES E. COLI MG1656::SXT^{MO10} (ANNOTEE SXT^{MO10}) ET E. COLI MG1656::SXT^{MO10}-TAGPB10 (SXT^{MO10}-TAG), RESISTANTES AU CHLORAMPHENICOL (CHL^R), ET LA SOUCHE RECEVEUSE DERIVEE DE E. COLI MG1655 RESISTANTE A L'ACIDE NALIDIXIQUE (NAL^R) EN ABSENCE DE CIPROFLOXACINE (CIP⁻). LA FREQUENCE DE TRANSFERT EST LE RAPPORT ENTRE LE NOMBRE DE TRANSCONJUGANTS (CLONES CHL^R NAL^R) ET LE NOMBRE DE RECEVEUSES. LA MEME EXPERIENCE A ETE REALISEE EN INCUBANT PREALABLEMENT LES DONNEUSES AVEC 5 NG/ML DE CIPROFLOXACINE (CIP⁺).

..... 176

FIGURE 62 : ÉVALUATION DE LA QUANTITE DE SOUCHE DONNEUSE E. COLI MG1655ΔLACZY::SXT^{MO10}-TAGPB10 QU'IL FAUT INOCULER A T0 POUR PERMETTRE LE SUIVI DU TRANSFERT DE SXT^{MO10} EN MICROCOSME. LE NOMBRE DE COPIE DE CHROMOSOMES ET D'ELEMENTS SXT^{MO10} ONT ETE RESPECTIVEMENT DENOMBRES PAR LES QPCR CIBLANT LA DELETION ΔLACZY ET L'ETIQUETTE « TAG-PB10 ». LES ASTERISQUES REPRESENTENT LES VALEURS SOUS LA LIMITE DE DETECTION. L'ECART-TYPE EST REPRESENTÉ PAR LES BARRES D'ERREUR (N=2). 179

FIGURE 63 : ÉVALUATION DE LA QUANTITE D'E. COLI MG1655ΔLACZY::SXT-TAGPB10 NECESSAIRE POUR LE SUIVI DU TRANSFERT DE SXT EN MICROCOSME D'EAU ET SEDIMENTS DE RIVIERE, ET ETUDE SON EVOLUTION AU COURS DU TEMPS (J0, J3, J10). 1X CORRESPOND A 2 × 10⁸ UFC D'E. COLI MG1655ΔLACZY::SXT-TAGPB10 AJOUTES A J0 POUR 100 ML DE MICROCOSMES, 10X A 2 × 10⁹ UFC ET 100X A 2 × 10¹⁰ UFC. LE NOMBRE DE CHROMOSOMES ET D'ELEMENTS SXT ONT ETE RESPECTIVEMENT DENOMBRES PAR LES QPCR CIBLANT LA DELETION ΔLACZY ET L'ETIQUETTE « TAG-PB10 ». L'ECART-TYPE EST REPRESENTÉ PAR LES BARRES D'ERREUR (N=3). LES ASTERISQUES REPRESENTENT LES VALEURS SOUS LA LIMITE DE DETECTION. 181

FIGURE 64 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE LA BACTERIE DONNEUSE MG1655ΔLACZY ET DE SON ICE SXT^{MO10}-TAGPB10 EN MICROCOSMES DE SEDIMENTS/EAU DE RIVIERE EN ABSENCE DE TRAITEMENT A LA CIPROFLOXACINE (SERIE 1). LE NOMBRE DE COPIES DE SXT^{MO10} OU DE BACTERIE DONNEUSE SONT NORMALISEES PAR LE NOMBRE DE COPIES D'ADNR 16S. DEUX CAS DE FIGURE ONT ETE OBSERVES : ABSENCE DE TRANSFERT EVIDENT (A) ET TRANSFERT DE L'ICE SXT^{MO10} (B). LES CHIFFRES REPORTES SUR LES GRAPHIQUES CORRESPONDENT AU RAPPORT ENTRE LE NOMBRE DE COPIES DE LA BACTERIE DONNEUSE ET LE NOMBRE DE COPIES DE SXT^{MO10}-TAGPB10. CHAQUE POINT EST LA MOYENNE DE 3 VALEURS (6 POUR LE CAS DE FIGURE B) OBTENUES PAR QPCR. L'ECART-TYPE EST REPRESENTÉ PAR LES BARRES D'ERREUR. ND : NON DETECTE. 183

FIGURE 65 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE LA BACTERIE DONNEUSE MG1655ΔLACZY ET DE SON ICE SXT^{MO10}-TAGPB10 EN MICROCOSMES DE SEDIMENTS/EAU DE RIVIERE TRAITES A LA CIPROFLOXACINE (SERIE 1). LE NOMBRE DE COPIES DE SXT^{MO10} OU DE BACTERIE DONNEUSE SONT NORMALISEES PAR LE NOMBRE DE COPIES D'ADNR 16S. DEUX CONDITIONS D'INDUCTION DU TRANSFERT DE L'ICE ONT ETE TESTEES : AVEC 4 NG/ML OU 40 NG/ML DE CIPROFLOXACINE. LES CHIFFRES REPORTES SUR LES GRAPHIQUES CORRESPONDENT AU RAPPORT ENTRE LE NOMBRE DE

COPIES DE LA BACTERIE DONNEUSE ET LE NOMBRE DE COPIES DE SXT ^{MO10} -TAGPB10. CHAQUE POINT EST LA MOYENNE DE 3 VALEURS OBTENUES PAR QPCR. L'ECART-TYPE EST REPRESENTE PAR LES BARRES D'ERREUR.....	184
FIGURE 66 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE LA BACTERIE DONNEUSE E. COLI MG1655ΔLACZY ET DE SON ICE SXT ^{MO10} -TAGPB10 EN MICROCOSMES DE SEDIMENTS/EAU DE RIVIERE (SERIE 2). DEUX CONDITIONS ONT ETE TESTEES : AVEC OU SANS 5 NG/ML DE CIPROFLOXACINE. LA COURBE EN POINTILLES JAUNES CORRESPOND A L'ÉVOLUTION DU RAPPORT ENTRE LE NOMBRE DE COPIES DE LA BACTERIE DONNEUSE ET LE NOMBRE DE COPIES DE SXT ^{MO10} -TAGPB10.....	187
FIGURE 67 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION DE LA BACTERIE DONNEUSE P. MIRABILIS BB2000 ET DE SON ICE SXT ^{MO10} -TAGPB10 EN MICROCOSMES DE SEDIMENTS/EAU DE RIVIERE DE L'ORNE. DEUX CONDITIONS ONT ETE TESTEES EN TRIPLICATA : AVEC OU SANS 5 NG/ML DE CIPROFLOXACINE (CIP). LA COURBE EN POINTILLES JAUNES CORRESPOND A L'ÉVOLUTION DU RAPPORT ENTRE LE NOMBRE DE COPIES DE LA BACTERIE DONNEUSE ET LE NOMBRE DE COPIES DE SXT ^{MO10} -TAGPB10. LES ASTERISQUES (*) CORRESPONDENT AUX VALEURS NON QUANTIFIEES EN DDPCR.	189
FIGURE 68 : PRINCIPALES ETAPES DE L'INVASION D'UNE BACTERIE DANS UN NOUVEL ENVIRONNEMENT. LA BACTERIE VERTE A POIS REPRESENTE LA BACTERIE ENVAHISSEUSE INTRODUITE DANS UNE NOUVELLE COMMUNAUTE COMPOSEE DE PLUSIEURS TAXONS BACTERIENS. L'ÉTAT DE CETTE COMMUNAUTE EST REPRESENTE A CHAQUE ÉTAPE DE L'INVASION, LORS DESQUELLES LA BACTERIE ENVAHISSEUSE SERA EXPOSEE A DE NOUVELLES CONTRAINTES POUR SURVIVRE. APRES SON INTRODUCTION DANS LA COMMUNAUTE (A) LA BACTERIE DOIT S'ADAPTER AUX CONTRAINTES ABIOTIQUES (PH, TEMPERATURE, SALINITE) POUR POUVOIR S'ÉTABLIR (B) MAIS LA COMMUNAUTE QUI CONTINUE D'EXERCER UNE RESISTANCE BIOTIQUE A SON ENCONTRE. SI L'ENVAHISSEUSE PASSE OUTRE CETTE RESISTANCE BIOTIQUE, ELLE POURRA ALORS SE MULTIPLIER EN DISPOSANT DES RESSOURCES (C) AVEC DES CONSEQUENCES SUR LA STRUCTURE ET LE FONCTIONNEMENT DES COMMUNAUTES (D). D'APRES MALLON ET AL., (2015).....	202

INTRODUCTION

1. DE LA DECOUVERTE DES PREMIERS ANTIMICROBIENS A L'EMERGENCE DE L'ANTIBIORESISTANCE

1.1. L'AGE D'OR DE LA DECOUVERTE ET DU DEVELOPPEMENT D'ANTIBIOTIQUES

En 1928, le microbiologiste écossais Alexander Flemming découvre ce qui va être le premier antibiotique naturel qui va révolutionner la médecine moderne, la pénicilline. La communauté scientifique porte peu d'intérêt à son travail et la production de l'antibiotique à grande échelle est rendue impossible par le manque de connaissances concernant l'extraction et la purification du produit actif. Ce n'est qu'en 1941, après l'entrée des États-Unis dans la Seconde Guerre mondiale, que la recherche s'accélère grâce à un gain d'intérêt de la part de nombreuses firmes pharmaceutiques américaines pour produire cet antimicrobien afin de traiter les soldats blessés au front (Ligon, 2004). Dès lors, la production de pénicilline a été exponentielle, et si, en 1941, le stock ne permettait de soigner qu'une seule personne, en 1943 les États-Unis possédaient les ressources nécessaires pour approvisionner toutes les forces alliées. Les années 1950 marquent le début de « l'âge d'or » de la recherche, du développement et de la production d'antimicrobiens, période à laquelle ont été découvertes la majorité des classes d'antibiotiques utilisées aujourd'hui (Davies, 2006). C'est notamment le cas de la streptomycine qui a été utilisée contre le bacille de Koch, l'agent infectieux à l'origine de la tuberculose, et qui est encore à ce jour responsable de 1,4 millions de morts par an dans le monde (World Health Organization, 2020). De nos jours, il existe plusieurs familles d'antimicrobiens, avec des activités bactéricides ou bactériostatiques, dont les principales sont : (i) les bêta-lactamines, dont fait partie la pénicilline, et (ii) glycopeptides, capables d'inhiber la synthèse de la paroi bactérienne, (iii) les aminosides et (iv) macrolides capables d'inhiber la synthèse de protéines et (v) les quinolones, capables inhiber la réplication de l'ADN (Alanis, 2005; Peterson and Kaur, 2018). Quelques exemples d'antibiotiques et leur mode d'action sont présentés dans la Figure 1 (Brock *et al.*, 2018).

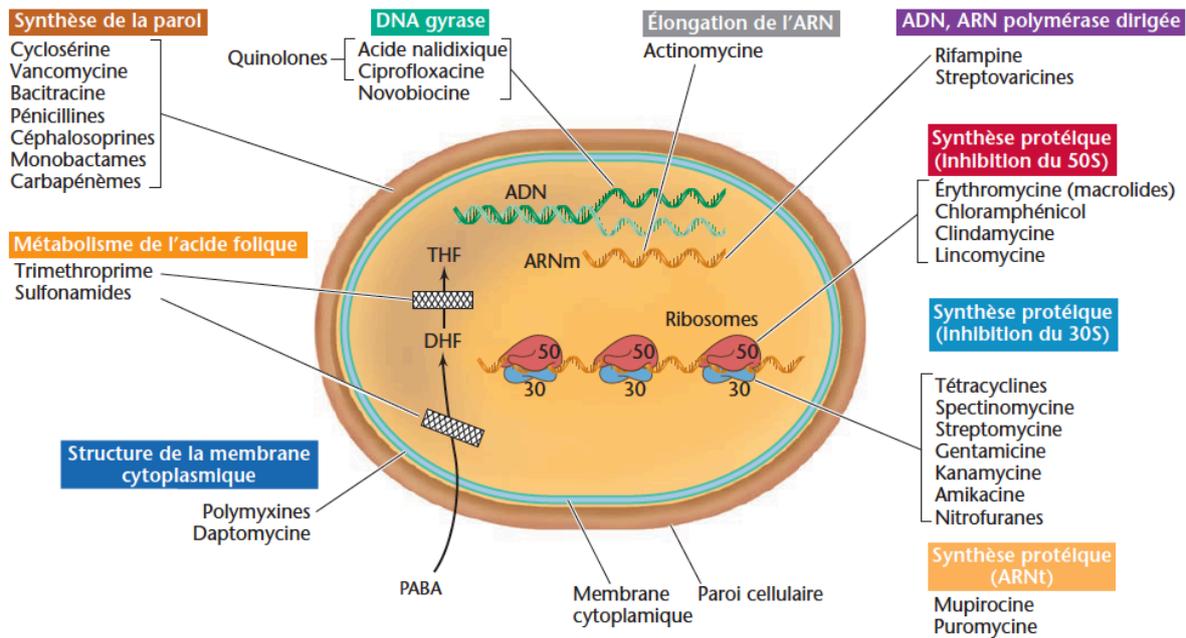


Figure 1 : Mode d'action des agents majeurs chimiothérapeutiques antimicrobiens. THF, tétrahydrofolate ; DHF, Dihydrofolate ; ARNm, ARN messenger ; ARNt, ARN de transfert. D'après (Brock et al., 2018).

1.2. LA CONSOMMATION D'ANTIBIOTIQUES AUJOURD'HUI

Grâce à leur large spectre d'action, les pénicillines restent aujourd'hui la famille d'antibiotiques la plus consommée en Europe (Versporten *et al.*, 2011) et dans le monde (Klein *et al.*, 2018). L'étude réalisée par Klein *et al.* (2018) a permis de suivre l'évolution de la consommation en antibiotiques entre les années 2000 et 2015, grâce aux données des ventes récoltées dans 76 pays. En 15 ans, la consommation d'antibiotiques exprimée en DDD (Defined Daily Dose), une unité de mesure standard pour la consommation de médicaments qui correspond à la dose quotidienne définie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), est passée de 21,1 milliards à 34,8 milliards de DDDs, soit une augmentation de 65% (Figure 2). Cette étude a également permis de mettre en avant des corrélations entre les habitudes de consommation et les revenus du pays. Ainsi, si pendant ces 15 années la consommation d'antibiotiques est restée globalement constante dans les pays avec des revenus élevés, c'est dans les pays à revenus moyens et faibles que la consommation d'antimicrobiens a explosé (Klein *et al.*, 2018).

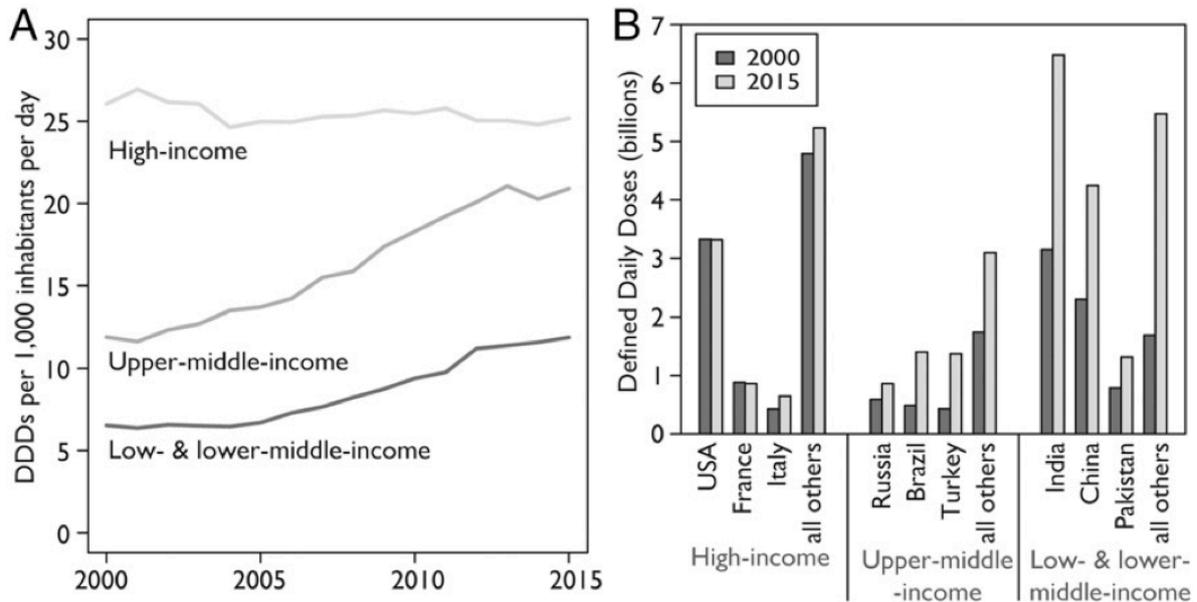


Figure 2 : Consommation globale d'antibiotiques dans divers pays classés en fonction de leurs revenus. (A) Consommation en doses quotidiennes (DDD) pour 1000 habitants par jour entre les années 2000 et 2015. (B) Consommation totale en DDDs pour 1 milliard d'habitants sur l'année 2000 et 2015. D'après Klein et al, 2018.

1.3. L'EMERGENCE ET LA DISSEMINATION DE RESISTANCES : LES CAUSES ET LES CONSEQUENCES

Le pouvoir actif des antibiotiques a été rapidement menacé par l'émergence concomitante de bactéries résistantes. Par exemple, la première souche de *Staphylococcus aureus* résistante à la pénicilline a été isolée seulement un an après l'exploitation de cet antibiotique à des fins thérapeutiques (CDC, 2020). D'autres antibiotiques ont également vu leur mise sur le marché s'accompagner de l'émergence de résistances associées, comme l'indiquent les données présentes sur la Figure 3 (Ventola, 2015).

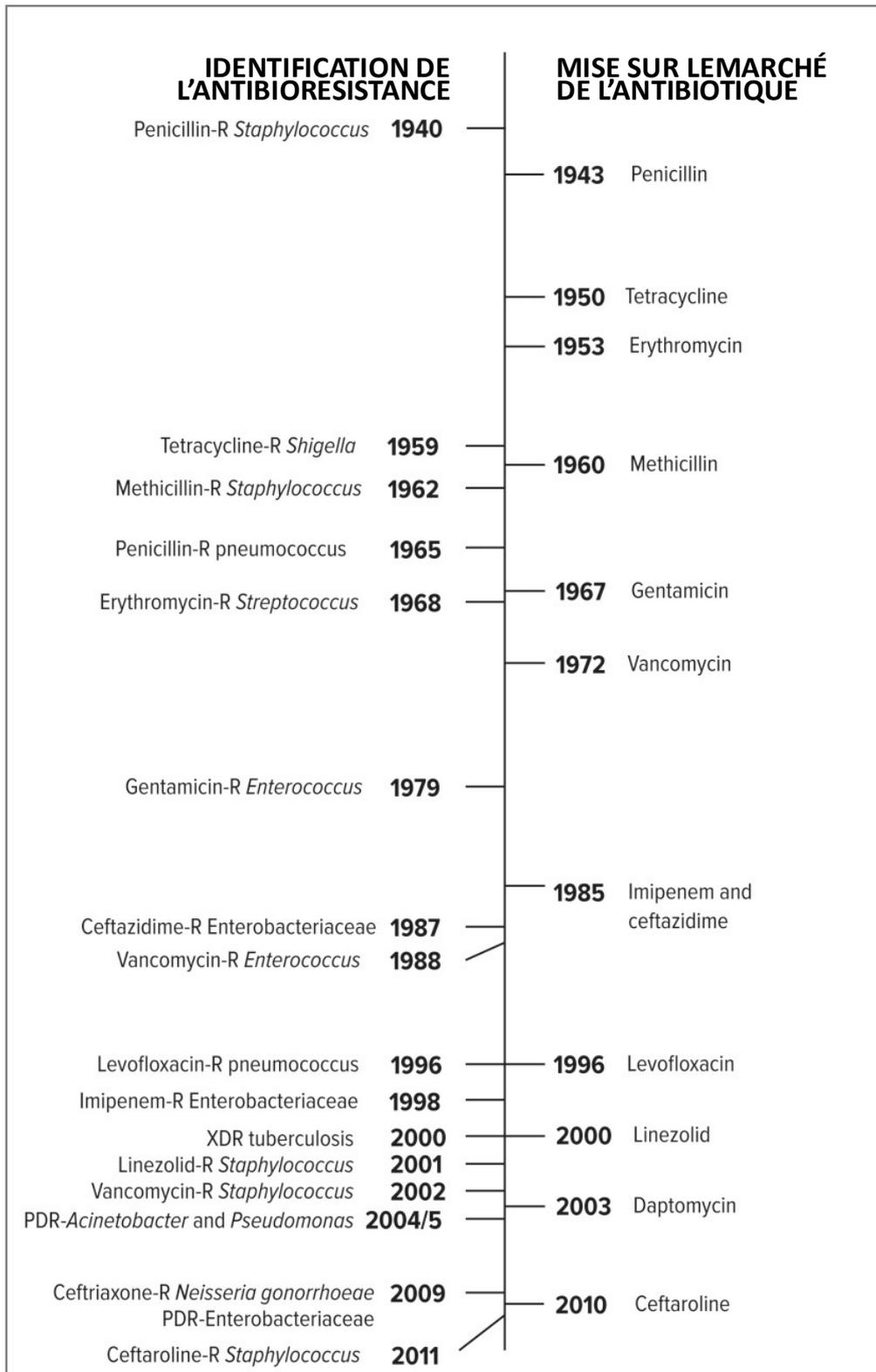


Figure 3 : Frise chronologique présentant les dates de mises sur le marché de certains antibiotiques, et la découverte des résistances associées. PDR = « pan-drug-resistant » pour les bactéries résistantes à toutes les classes d'antibiotiques ; R = résistantes ; XDR = « extensively drug-resistant » pour les bactéries extrêmement résistantes aux antibiotiques. D'après Ventola, 2015.

Il existe des microorganismes capables de produire des molécules aux activités antimicrobiennes, qui ont naturellement développé des résistances à ces dernières. Ainsi, ces bactéries possèdent un ou plusieurs mécanismes de défense présentés sur la Figure 4 et le Tableau 1. On y trouve la modification ou la dégradation de la molécule active, l'exportation des dites molécules grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes à efflux, la séquestration d'antibiotique grâce à des protéines qui vont s'y lier de manière à les empêcher d'atteindre la cible, la modification de la cible ou finalement, l'existence d'alternative métabolique permettant à la bactérie de contourner les inhibitions de l'antimicrobien (Peterson and Kaur, 2018).

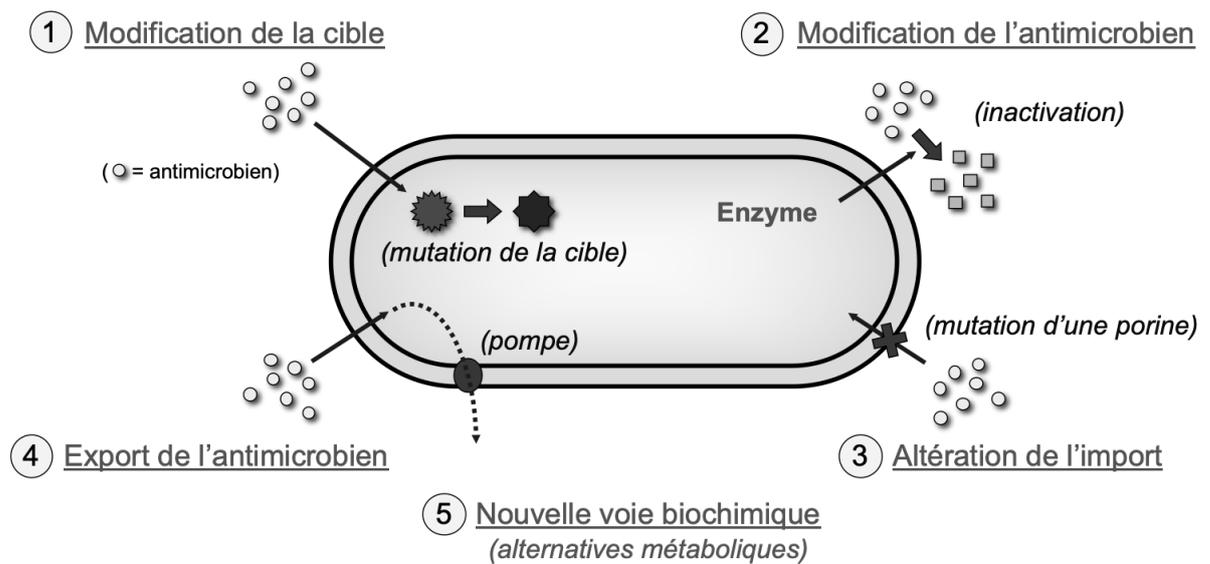


Figure 4 : Mécanismes de résistance aux antimicrobiens. D'après C. Merlin, LCPME.

Tableau 1 : Mécanismes de résistances des bactéries, aux antimicrobiens qu'elles produisent. D'après Peterson et al, 2018.

Mechanism of antibiotic resistance	Selected examples	Gene location	Reference
Antibiotic modification/degradation	Aminoglycoside modifying enzymes (AME); AAC; APH; ANT Streptomycin-6-phosphotransferase β-lactamases Class A,B,C	Chromosome <i>S. griseus</i> (<i>smk</i>)	Shinkawa et al., 1985; Mak et al., 2014
Antibiotic efflux	ABC transporter DrrAB (Dox) OtrC (oxytetracycline) MFS transporter OtrB (oxytetracycline) Mfs1 (natamycin)	Chromosome <i>Streptomyces</i> species Chromosome <i>S. peuceitius</i> (<i>drrAB</i>) <i>S. rimosus</i> (<i>otrC</i>) Chromosome <i>S. rimosus</i> (<i>otrB</i>) <i>S. chattanoogensis</i> (<i>mfs1</i>)	Ogawara, 2016b Yu et al., 2012; Li et al., 2014 Ohnuki et al., 1985; Reynes et al., 1988; Wang et al., 2017
Antibiotic sequestration by special proteins	Sequestration TImA, BlmA, ZbmA (bleomycin)	Chromosome <i>S. hindustanus</i> (<i>tImA</i>); <i>S. verticillus</i> (<i>blmA</i>); <i>S. flavoviridis</i> (<i>zbmA</i>)	Gatignol et al., 1988; Sugiyama et al., 1994; Rudolf et al., 2015
Antibiotic target modification	Low affinity penicillin-binding proteins (PBP) Class A Class B Peptidoglycan remodeling (Glycopeptides) VanH _{st} , DdlM, VanX _{st} VanH _{aov} , DdIN, VanX _{aov} 23S rRNA methylation (MLS) Cfr, PikR1, PikR2 16S rRNA methylation (Aminoglycosides) PCT, Sgm methylase DNA gyrase subunit B (novobiocin)	Chromosome <i>Streptomyces</i> species Chromosome <i>S. toyocaensis</i> (<i>vanH_{st}</i> , <i>ddlM</i> , <i>vanX_{st}</i>); <i>A. orientalis</i> (<i>vanH_{aov}</i> , <i>ddlN</i> , <i>vanX_{aov}</i>) Chromosome <i>S. caelestis</i> (<i>cfr</i>) <i>S. venezuelae</i> (<i>pikR1</i> , <i>pikR2</i>) Chromosome <i>S. pactum</i> (<i>pct</i>) <i>M. zionensis</i> (<i>sgm</i>)	Ogawara, 2015, 2016a Marshall et al., 1998; Binda et al., 2014 Calcutt and Cundliffe, 1990; Almutairi et al., 2015 Ballesta and Cundliffe, 1991; Kojic et al., 1992 Schmutz et al., 2003
Antibiotic target bypass	DNA gyrase subunit B (novobiocin)	Chromosome <i>S. sphaeroides</i> (<i>gyrB_f</i>)	Doyle et al., 1991; Mak et al., 2014; Prija and Prasad, 2017
Antibiotic target protection	Antibiotic removal DrrC (Dox) OtrA (oxytetracycline)	Chromosome <i>S. peuceitius</i> (<i>drrC</i>) <i>S. rimosus</i> (<i>otrA</i>)	

AAC, N-acetyl transferases; APH, O-phosphotransferases; ANT, O-adenylyltransferases; ABC, ATP-binding cassette superfamily; MFS, major facilitator superfamily; Dox, doxorubicin; MLS, macrolides, lincosamides, and streptogramins; PCT, pactamycin methylase; Sgm, sisomicin-gentamicin resistance methylase.

Les bactéries disposent ainsi de grandes capacités d'adaptation qui leur permettent d'acquérir des mécanismes de résistance plus ou moins rapidement, soit par mutation, soit grâce au transfert horizontal de gènes (THG) codant des fonctions de résistance. Généralement, on distingue trois grands mécanismes de THG présentés sur la Figure 5, le transfert d'ADN d'une bactérie à une autre par conjugaison, et l'intégration d'ADN extracellulaire par transformation ou par transduction si le mécanisme comprend l'intervention d'un phage (Furuya and Lowy, 2006). Le développement ou l'acquisition de résistances peuvent concerner n'importe quel membre du microbiote, mais devient problématique lorsqu'il s'agit de bactéries pathogènes ou opportunistes dans la mesure où cela a pour effet de diminuer l'efficacité du traitement d'un nombre croissant d'infections, et/ou augmentent la durée d'hospitalisation et les coûts liés au traitement. Par ailleurs, la recherche de nouvelles molécules antibactériennes est limitée, notamment en raison du manque d'intérêt économique des firmes pharmaceutiques. En effet, un traitement antibiotique a une durée d'utilisation relativement courte contrairement à d'autres molécules (Plackett, 2020). En 2016, un rapport sur la résistance aux antibiotiques a estimé qu'il y avait près de 700 000 morts / an liées à la résistance aux antibiotiques dans le monde. Des projections estiment qu'en 2050, ce chiffre atteindra près de 10 millions de morts en absence de nouvelles mesures pour limiter l'émergence et la propagation de résistances (O'Neill, 2016).

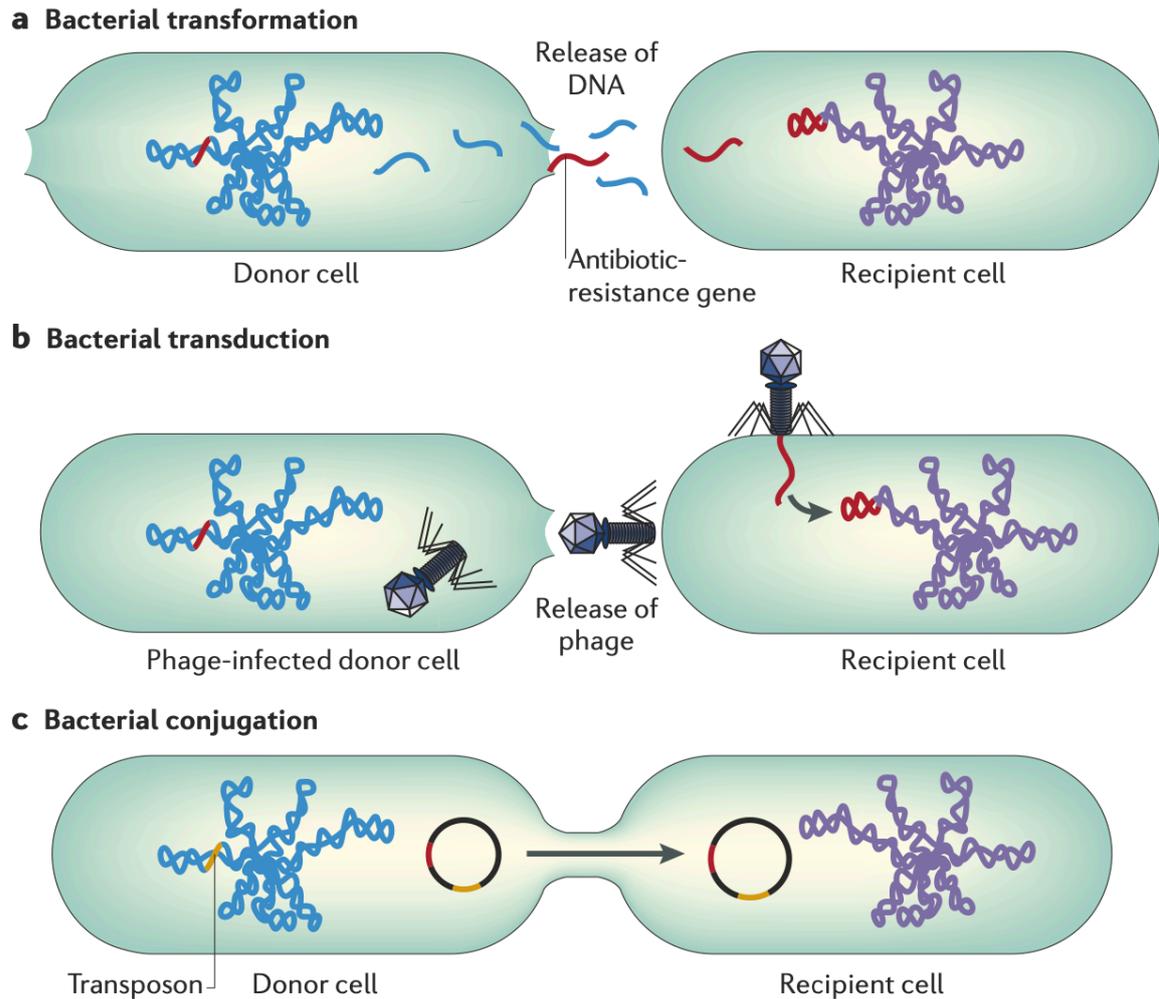


Figure 5 : Transfert horizontal de gènes entre des bactéries : (a) par transformation, (b) par transduction ou (c) par conjugaison bactérienne. La transformation bactérienne concerne l'intégration d'un fragment d'ADN extracellulaire dans le chromosome ou dans un plasmide de la cellule receveuse. Lors de la transduction, de l'ADN bactérien est encapsidé accidentellement et pourra s'intégrer dans le chromosome d'une bactérie hôte lors d'une nouvelle infection. Lors de la conjugaison, des plasmides (en noir) ou des ICE (non représentés) utilisent un assemblage protéique appelé pilus, pour se transférer vers une bactérie receveuse où ils pourront se répliquer de manière autonome (plasmide) ou s'intégrer dans le chromosome hôte (ICE). Les ICE et les plasmides des bactéries Gram positives (non présentées), n'utilisent pas de pili. D'autres éléments mobiles comme les transposons contribuent au transfert de gènes lorsqu'ils s'intègrent dans les plasmides ou ICE. D'après Furuya et Lowy (2006).

La consommation d'antibiotiques est en constante augmentation dans le monde et cela n'est pas sans risques (Klein *et al.*, 2018). De nombreuses études ont mis en avant une corrélation positive entre la consommation d'antibiotiques et l'émergence de bactéries résistantes (Baquero *et al.*, 2002; Goossens, 2009). On peut donc se poser la question de la place de l'antibiothérapie ou des autres usages des antibiotiques dans l'émergence et la dissémination de l'antibiorésistance. Par exemple, l'utilisation d'un antibiotique à des fins thérapeutiques en médecine humaine ou vétérinaire va avoir un effet bactéricide ou bactériostatique sur les bactéries sensibles, mais peut également permettre de sélectionner et favoriser la multiplication de bactéries résistantes. En antibiothérapie humaine, ces bactéries résistantes rejoindront le compartiment environnemental *via* les effluents de station d'épuration qui terminent leur course dans les rivières, mais aussi *via* les épandages agricoles utilisant des boues issues du traitement d'eaux usées ou d'effluents d'animaux d'élevage (antibiothérapie animale), comme le montre la Figure 6 (Confédération Suisse, 2019). Chacun de ces nouveaux environnements envahis par des bactéries résistantes peut alors potentiellement être un lieu d'échange de gènes. A cette émergence et cette dissémination s'ajoute la réexposition des populations à ces antibiorésistances. Par exemple, l'eau de rivière contaminée peut être utilisée pour l'irrigation de cultures créant ainsi une boucle d'enrichissement en bactéries résistantes et/ou gènes de résistances par la consommation de nourriture contaminée, ce qui a pour conséquence d'augmenter les chances de rencontrer une bactérie pathogène qui pourrait avoir acquis ces résistances.

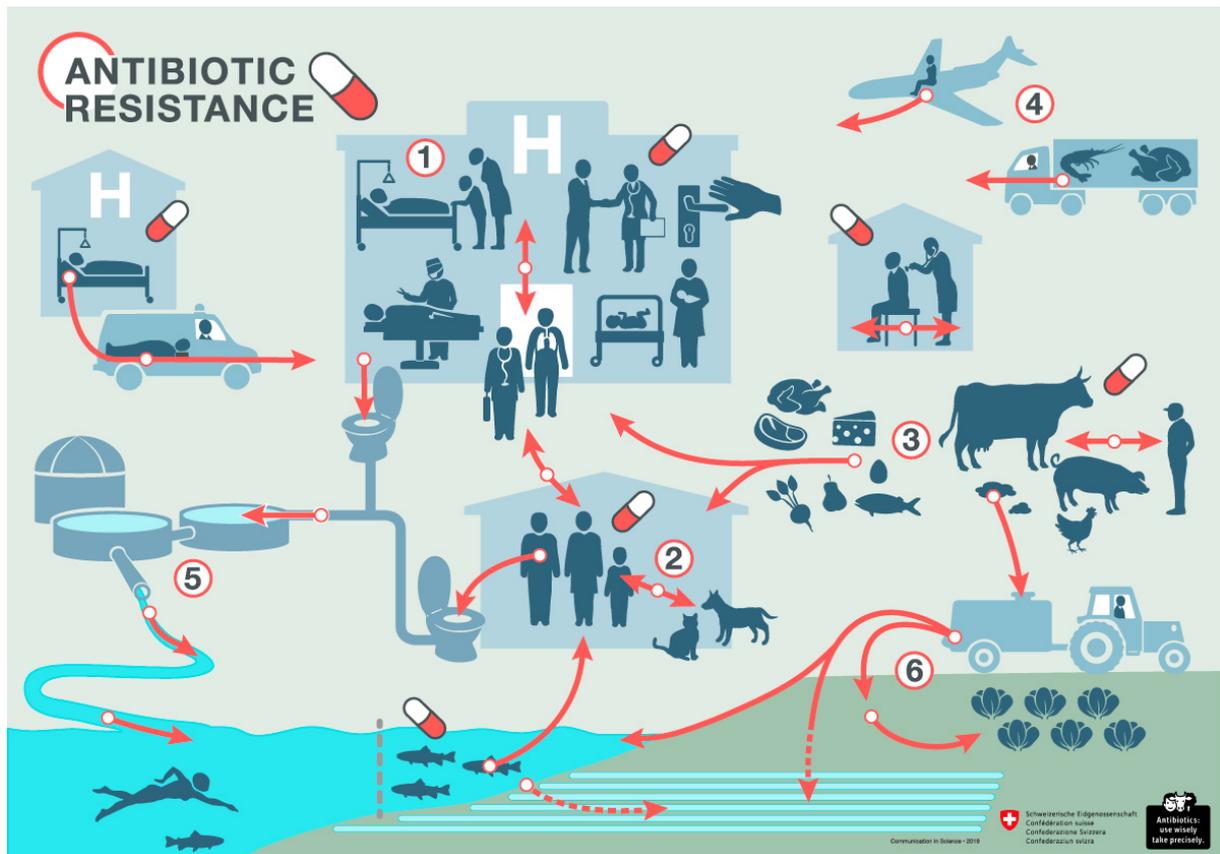


Figure 6 : Exemples de voies de dissémination et d'enrichissement de bactéries résistantes et/ou gènes d'antibiorésistance (ARG). (1) Dissémination de bactéries résistantes, et/ou dissémination d'ARG via THG, en milieu hospitalier à la suite d'un contact entre les patients/visiteurs/personnels ou une surface contaminée. (2) Les bactéries résistantes résultant d'un traitement aux antibiotiques, et/ou les gènes d'antibiorésistance, peuvent se transférer dans les mêmes conditions décrites en (1), entre l'Homme et l'animal. (3) Contamination alimentaire (viande, produits laitiers, œufs, poissons et fruits de mer, fruits et légumes). (4) Tourisme et import de nourriture. (5) Acheminement de bactéries résistantes et/ou gènes d'antibiorésistance dans les eaux de rivières, lacs et eaux souterraines via les effluents de station d'épuration (et ce malgré un traitement qui élimine 99% des bactéries). (6) Épandage des boues de station d'épuration qui permettent aux bactéries de se multiplier dans les sols, plantes, eaux souterraines ou dans les rivières/lacs après la pluie, ou disséminer des ARG via le THG. D'après la confédération Suisse dans « Communication in Science », 2019.

Il est donc possible d'imaginer l'effet dévastateur de la mauvaise utilisation d'antibiotiques dans la dissémination de l'antibiorésistance. Certains antibiotiques étaient utilisés en tant que promoteurs de croissance dans les filières porcines et

avicoles, avant d'être interdits en 2006 dans l'Union Européenne (Dupraz, 2004). Une telle utilisation perdure néanmoins dans une grande majorité de pays. La consommation d'antibiotiques sans prescription dans des pays où ils sont disponibles en libre accès (Ventola, 2015) couplé au manque de connaissances/formation de certains personnels de santé, participent à la surconsommation d'antibiotiques. Dans les pays développés, les antimicrobiens sont utilisés en milieu hospitalier dans un grand nombre d'opérations chirurgicales de manière à réduire le risque d'infection, mais ces pratiques tendent à augmenter le nombre d'infections nosocomiales résistantes (Chokshi *et al.*, 2019). En outre, il s'avère que, dans les nations en développement, certains antibiotiques sont produits sous-dosés, utilisés périmés, ou avec leur qualité dégradée en raison des conditions de transport et de stockage, ce qui diminue leur efficacité (Chokshi *et al.*, 2019). Dans ces conditions, on peut se poser la question du rôle des antibiotiques à des concentrations non-létales, dites sub-inhibitrices, sur le transfert de gènes de résistance. Des études menées *in vitro* (Beaber, Hochhut and Waldor, 2004; Seier-Petersen *et al.*, 2014) ont démontré que les antibiotiques utilisés à des concentrations en dessous des concentrations minimales inhibitrices (CMI), comme celles qui sont retrouvées dans l'environnement, induisaient le transfert d'éléments génétiques mobiles vecteurs de résistances. Se pose alors la question de savoir quels sont les vecteurs de gènes de résistance disséminés par le transfert horizontal de gènes, et, étant donné que de nombreuses études ont mis en avant le rôle important joué par l'environnement dans ces disséminations (Martinez, 2008; Bengtsson-Palme *et al.*, 2014), on pourrait également se demander quelle est l'effet des antibiotiques sur ces transferts.

En résumé, la résistance aux antibiotiques est un problème de santé publique majeur et mondial, mis en avant par de nombreuses organisations comme La Société Américaine de Maladies Infectieuses (IDSA), Le Centre de Contrôle de Prévention des Maladies (CDCP), l'OMS ou le Forum Économique Mondial. Si le développement de résistances est un mécanisme d'adaptation naturel des bactéries, l'utilisation massive d'antibiotiques permet d'accentuer ce phénomène en favorisant la sélection et la multiplication de ces bactéries résistantes. En réponse, l'OMS a mis en place des directives à l'attention de la population, des professionnels de santé ou agricoles et des responsables politiques. Globalement, ces directives consistent à informer sur le bon usage des antibiotiques (prescription par un professionnel de santé qualifié,

respect des doses et durées du traitement) mais aussi quelques consignes d'hygiène afin de prévenir des infections, améliorer la sensibilisation et la compréhension de l'antibiorésistance, ou encore rappeler l'importance d'avoir son carnet de vaccination à jour. Pour les responsables politiques, il s'agit de les accompagner pour qu'ils veillent à une meilleure surveillance des infections et réglementent l'usage d'antibiotiques. Le secteur agricole, quant à lui, ne doit pas utiliser les antibiotiques en tant que promoteurs de croissance, et doit utiliser ceux-ci sous contrôle vétérinaire. Enfin, le secteur de la santé doit s'engager à développer la recherche et développement de nouvelles molécules antibactériennes, vaccins, ou autres outils d'étude de l'émergence ou de la dissémination de résistances (World Health Organization, 2020a). En 2017, l'OMS a publié une liste de 12 agents pathogènes prioritaires (World Health Organization, 2017a) afin de promouvoir le financement de travaux de recherche les visant et le développement de nouveaux antimicrobiens, aussi bien dans le domaine public que privé. Par ailleurs, l'OMS a mis en place l'index AWaRE (2019), un outil permettant de limiter la propagation de l'antibiorésistance, et de réduire les coûts des soins. Il s'agit d'une liste d'antibiotiques utilisés pour le traitement de 21 pathologies les plus courantes et les plus graves, classés en 3 groupes « Access », « Watch » et « Reserve », selon qu'ils puissent être utilisés en première ou seconde intention, à utiliser de façon contrôlée pour des pathologies spécifiques, ou qu'ils soient les antibiotiques de dernier recours (World Health Organization, 2019).

2. LA DISSEMINATION DE GENES DE RESISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES

2.1. LES ELEMENTS GENETIQUES MOBILES : LES VECTEURS DE L'ANTIBIORESISTANCE

Chez les bactéries, deux processus interviennent dans la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques. Il y a le transfert vertical, qui concerne la transmission de gènes parentaux à la descendance, et le THG, qui permet le transfert de matériel génétique entre deux cellules non-apparentées. Le THG est possible grâce à trois mécanismes principaux : la conjugaison, la transformation ou la transduction (Frost *et al.*, 2005), comme mentionné précédemment, et permet notamment à des fragments d'ADN qui codent leur propre mobilité, appelés éléments génétiques mobiles (EGM), de bénéficier d'une mobilité intra- et inter-cellulaire (Frost *et al.*, 2005). Il existe plusieurs familles d'EGM à l'origine de la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques, parmi lesquels on y trouve les plasmides, les séquences d'insertion/transposons, les intégrons et les éléments intégratifs conjugatifs (ICE).

Concernant les plasmides, il s'agit fréquemment d'un ADN double brin circulaire capable de réplication autonome. Ils peuvent être retrouvés en une ou plusieurs copies dans la cellule, et coexister avec d'autres plasmides s'ils ne possèdent pas la même origine de réplication et/ou le même système de partition. Ces éléments peuvent porter de 2-3 gènes à plus de 400 gènes et, pris dans leur entièreté, les plasmides ont été montrés comme capables de conférer des résistances à quasiment toutes les classes d'antibiotiques (Bennett, 2008; Carattoli, 2013). Ils sont dits conjugatifs lorsqu'ils codent la machinerie nécessaire à leur transfert par conjugaison bactérienne, tandis que d'autres sont dit mobilisables lorsqu'ils peuvent se transférer grâce aux fonctions de transfert apportées en *trans* par un autre EGM conjugatif. Dans la littérature, plusieurs plasmides vecteurs de gènes de résistance ont été isolés à partir de diverses souches cliniques, comme pIP811 isolé de *Listeria monocytogenes* et conférant les résistances au chloramphénicol, l'érythromycine, la streptomycine et la tétracycline (Poyartsalmeron, 1990), ou encore pOXA-48 qui confère la résistance aux bêta-lactames chez *Klebsiella pneumoniae* (Brañas *et al.*, 2015).

Parmi les EGM les plus étudiés, il y a également les séquences d'insertion (« Insertion Sequences », IS). Il s'agit de petits segments d'ADN qui codent généralement uniquement la fonction nécessaire pour leur transposition, ce qui leur permet de se déplacer au sein d'un génome (Chandler and Siguier, 2013). Dans certains cas, un fragment d'ADN indépendant devient transposable lorsqu'il est encadré par deux IS qui se transposent ensemble, et une telle structure est appelée « transposon composite » (Chandler and Siguier, 2013). Ces éléments permettent alors de capturer et déplacer de gènes de résistance, comme Tn5 isolé chez *Pseudomonas sp.* ou *Acinetobacter sp.*, ou Tn903 isolé chez *Salmonella typhimurium*, tous deux conférant la résistance à la kanamycine, ou encore Tn1 conférant la résistance à l'ampicilline et trouvé dans des nombreux plasmides (Babakhani and Oloomi, 2018). D'autres exemples sont présentés dans le Tableau 2 qui regroupe quelques associations entre des IS, des transposons et des résistances aux antibiotiques (Babakhani and Oloomi, 2018). Il existe également des transposons dits « non-composites » dont les extrémités possèdent des séquences répétées (reconnues par la transposase) à la place des IS dans la structure des transposons composites. La plupart de transposons non-composites appartiennent à la famille Tn3 qui confère la résistance à l'ampicilline à la fois chez les bactéries à coloration de Gram négatif et positif.

Tableau 2 : Exemples de séquences d'insertion (IS), transposons composites et antibiorésistances associées chez les bactéries Gram négatif. D'après Babakhani et Oloomi, 2018.

IS ^a	Tn ^b	Determinant	Resistance(s) ^c
IS1	Tn9	<i>catA1</i>	Chloramphenicol
IS10	Tn10	<i>tet(B)</i>	Tetracycline
IS26 ^d	Tn4352	<i>aphA1</i>	Kanamycin
		<i>aphA1</i>	Kanamycin
		<i>tet(C)</i>	Tetracycline
		<i>tet(D)</i>	Tetracycline
	Tn6020	<i>catA2</i>	Chloramphenicol
		<i>bla_{SHV}</i>	β -Lactams
IS256 ^e	Tn2003	<i>cfr</i>	Phenicols/lincosamides/oxazolidinones/ pleuromutilins/streptogramin A
		<i>cfr</i>	Phenicols/lincosamides/oxazolidinones/ pleuromutilins/streptogramin A
IS50	Tn5	<i>aph(3')-IIa-ble-aph(6)-Ic</i>	Kanamycin, bleomycin, streptomycin
IS903	Tn903	<i>aphA1</i>	Kanamycin
IS1999	Tn1999	<i>bla_{OXA-48}-like</i>	Carbapenems
IS <i>Apl1</i>	Tn6330	<i>mcr-1</i>	Colistin
ISEc69		<i>mcr-2</i>	Colistin
ISAs2		<i>bla_{FOX-5}</i>	BLBLI
IS <i>Aba14</i>		Tn <i>aphA6</i>	<i>aphA6</i>
IS <i>Aba1</i>	Tn2006	<i>bla_{OXA-23}</i>	Carbapenems
		<i>bla_{OXA-237}</i>	Carbapenems
IS <i>Aba125</i>	Tn125	<i>bla_{NDM}</i>	Carbapenems

^aSee ISfinder (<https://www-is.biotoul.fr/>) for details of IS.

^bSee the Tn registry (<http://transposon.lstmed.ac.uk/>) for further details, except for Tn*aphA6* (334).

^cSHV enzymes can be broad-spectrum or extended-spectrum β -lactamases; BLBLI, β -lactam- β -lactamase inhibitor combinations.

^dRegions flanked by two copies of IS26 and originally defined as composite transposons are listed, but recent findings suggest mobilization by a single copy of IS26 (see the text).

^eIS256 is normally associated with Gram-positive bacteria (see Table 2); *cfr* is found in the same IS256-flanked transposon in *Staphylococcus lentus* (INSDC accession number [KF029594](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/KF029594)).

Les intégrons ne sont pas des EGM à proprement parler mais des éléments génétiques capables de procurer une certaine flexibilité au génome en capturant des segments d'ADN contenant un gène ou une ORF (phase ouverte de lecture) appelés « cassettes ». Ils se composent notamment d'un gène *int*, codant une intégrase à tyrosine leur permettant l'insertion et l'excision des cassettes par recombinaison spécifique de site, d'un site de recombinaison *attI* où la recombinaison prend place, et d'un promoteur en amont de *attI* de façon à permettre l'expression des cassettes en aval. Les cassettes sont des petits fragments d'ADN capables de s'exciser et se retrouver sous forme circulaire pour s'insérer dans un autre intégron ou changer de

position dans le même intégron (Bennett, 2008). Parmi ces éléments, les intégrons de classe 1 sont les plus isolés de souches cliniques, mais aussi de bactéries de l'environnement (Gaze *et al.*, 2011), et permettent de conférer des résistances à divers antibiotiques (Peterson and Kaur, 2018).

Les ICE, anciennement appelés transposons conjugatifs, sont des segments d'ADN mesurant entre 10 et 700 kb (Burrus and Matthew K Waldor, 2004; Bellanger, Payot, *et al.*, 2014). Ils sont capables de s'exciser du génome de leur bactérie hôte, se retrouver sous forme circulaire et se transférer par conjugaison bactérienne. S'agissant d'un évènement réplcatif, l'ICE pourra s'intégrer à nouveau dans chromosome de la souche donneuse d'origine et dans celui de la souche dite receveuse (Wozniak and Waldor, 2010), Figure 7. Il existe plusieurs familles d'ICE, comme celle d'ICEBs1, présent chez quasiment toutes les souches de *Bacillus subtilis* (Carraro and Burrus, 2014), celle d'ICESt1/ICESt3, initialement isolé chez *Streptococcus thermophilus* (Carraro and Burrus, 2014), ou encore la famille des ICE SXT/R391. L'élément le plus connu de cette dernière famille est certainement l'ICE SXT^{MO10}, isolé d'une souche clinique de *Vibrio cholerae* O139 résistante au sulfaméthoxazole et triméthoprimé (SXT) qui est l'agent pathogène responsable d'épidémies de choléra (Burrus *et al.*, 2006).

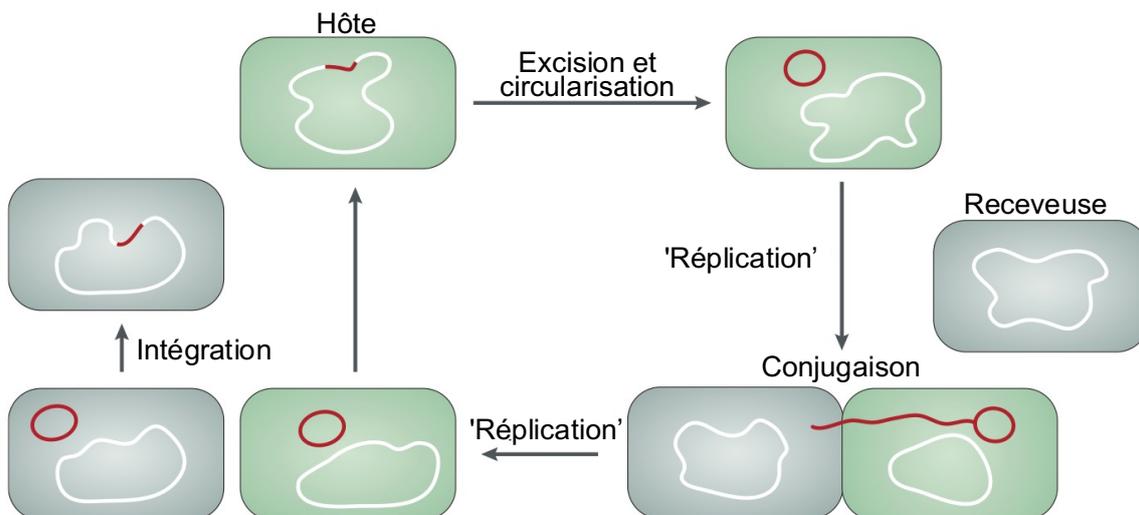


Figure 7 : Schéma du cycle de vie d'un élément intégratif et conjugatif (ICE). L'ICE est intégré dans le chromosome de la bactérie hôte, dite donneuse, et flanqué des séquences spécifiques attR (à droite) et attL (à gauche). Lors de l'excision, la recombinaison des séquences attR et attL va conduire à la circularisation de l'ICE, en

généralant de nouveaux sites attI (sur l'ICE) et attB (sur le chromosome de la bactérie hôte). Le transfert de l'ICE peut se faire vers une bactérie dite receveuse par conjugaison bactérienne lors de laquelle la réplication en cercle roulant permet de copier l'ICE pendant son transfert (simple brin). Le deuxième brin est synthétisé grâce à l'ADN polymérase une fois l'ICE transféré, et une nouvelle recombinaison spécifique de site entre des sites attP et attB permet l'intégration de l'élément à la fois dans la bactérie donneuse et dans la bactérie receveuse. D'après Wozniak et Waldor, 2010.

2.2. ABONDANCE DES ELEMENTS GENETIQUES MOBILES

Il existe très peu d'études qui traitent de l'abondance relative des différents types d'éléments génétiques mobiles dans l'environnement, et, pour la majorité d'entre elles, il s'agit d'analyses métagénomiques de boues de station d'épuration. Par exemple en 2020, Yoo *et al.* ont quantifié les plasmides et intégrons dans les boues activées et boues de bassins anaérobies (Yoo *et al.*, 2020). La Figure 8 représente l'occurrence de ces éléments dans ces échantillons, où les plasmides sont majoritairement présents avec au minimum $1,52 \times 10^{-2}$ copies de plasmide / gène d'ARNr 16S (échantillon de boues anaérobies : ADS pour « Anaerobic Digestion Sludge »). Dans une autre étude (Tao *et al.*, 2016), les intégrons, IS et plasmides ont été quantifiés dans des boues de station d'épuration d'industries pharmaceutiques (PWWTP, « Pharmaceutical Wastewater Treatment Plant »), et les plasmides apparaissent à nouveau comme les éléments les plus abondants (Tableau 3). Enfin, une dernière étude a permis de comparer l'abondance de plusieurs éléments à la fois en incluant des ICE (Guo *et al.*, 2017). Dans ce dernier exemple, les plasmides, ICE (transposons conjuguatifs), IS et intégrons ont été quantifiés, et les ICE sont apparus comme les éléments les plus abondants. A cet égard, Guglielmini *et al.* (Guglielmini *et al.*, 2011) ont recherché des protéines présentes exclusivement dans les ICE (relaxase, système de transport de type IV (T4SS), protéine de couplage de type IV (T4CP) dans 1207 génomes séquencés, issus de la base de données Genbank Refseq (<ftp://ftp.ncbi.nih.gov/genomes/Bacteria/>), et les analyses ont permis de montrer que les ICE sont les éléments les plus abondants chez les procaryotes. Les ICE étant très représentés, cela pourrait suggérer qu'il s'agit d'une voie de dissémination de l'antibiorésistance qui a probablement été minimisée par le passé, sans doute en raison d'une plus grande difficulté d'isolement et d'identification des ICE

par rapport aux plasmides. Toutefois, cette différence va probablement disparaître avec l'avènement des approches modernes de séquençage.

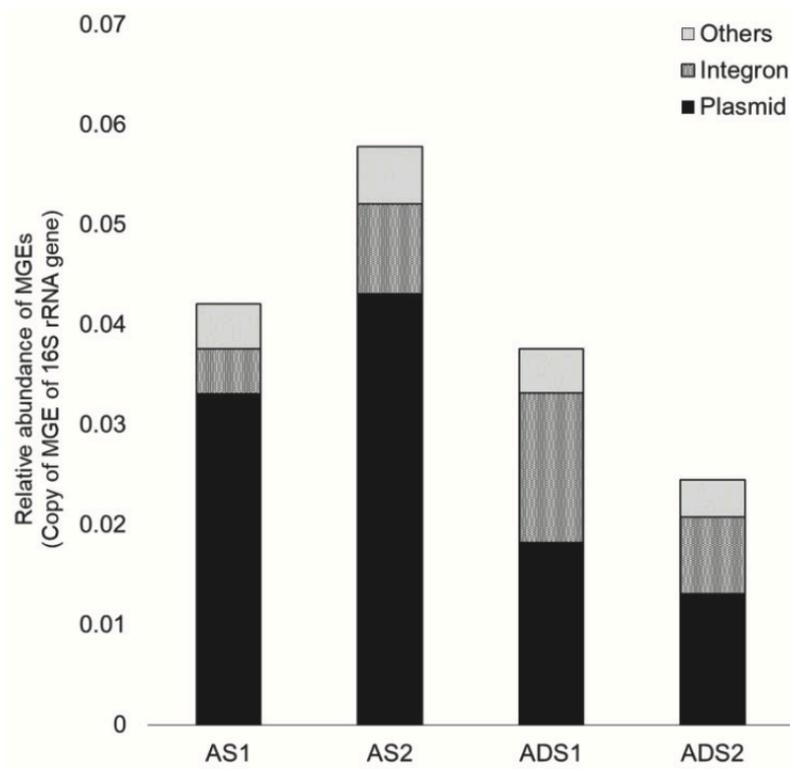


Figure 8 : Abondance relative des éléments génétiques mobiles par copies de gènes d'ARNr 16S, dans des échantillons de boues activées (AS, Activated Sludge) et des digestats anaérobies de boues (ADS, Anaerobic Digestion Sludge). La catégorie autres (« others ») indique les EGM qui n'ont été définis ni comme étant des plasmides ni comme des intégrons dans cette étude. Les prélèvements d'AS1/ADS1 et d'AS2/ADS2 ont été effectués en Janvier et Novembre 2015, respectivement. D'après Yoo et al, 2020.

Tableau 3 : Abondance relative de divers éléments génétiques mobiles par copies de gènes d'ARNr 16S, dans des échantillons de boues d'une station d'épuration d'industries pharmaceutiques. D'après Tao et al, 2016.

Samples	Insertion sequences		Integrans		Plasmids		Total MGEs ^a	
	Abundance (ppm) ^b	Diversity ^c	Abundance (ppm)	Diversity	Abundance (ppm)	Diversity	Abundance (ppm)	Diversity
A-A1	270	92	2	-	1349	391	1621	483
A-A2	130	86	13	-	585	243	728	329
A-A3	65	147	18	-	761	347	845	494
A-O1	1918	136	43	-	3973	334	5933	470
A-O2	133	132	41	-	1825	290	1999	422
B-A1	548	171	47	-	1706	475	2301	646
B-A2	327	192	84	-	4885	564	5296	756
B-O1	138	154	155	-	6054	448	6347	602

2.3. LES ICE ET LE CAS PARTICULIER DE LA FAMILLE SXT/R391

Structurellement, les ICE sont composés de 3 modules regroupant chacun un ensemble de gènes avec des fonctions bien définies. Le module d'intégration/excision contient un gène qui code une intégrase, généralement nommé *int*, ou une transposase à DDE (Burrus and Matthew K Waldor, 2004; Wozniak and Waldor, 2010). L'intégrase permet l'insertion de l'élément qui la code grâce à la recombinaison entre les sites *attI* et *attB*, respectivement localisés sur le module d'intégration/excision de l'ICE et le chromosome de l'hôte. Dans la mesure où les ICE ne sont, à priori, pas dotés d'un système de réplication autonome, leur intégration dans le chromosome de la bactérie hôte leur permettent d'assurer leur transfert vertical (Wozniak and Waldor, 2010). Il existe 2 familles d'intégrases, les recombinases à sérine et les recombinases à tyrosine. Parmi elles, les recombinases à tyrosine regroupent les intégrases les plus connues, dont la plus étudiée est certainement celle du phage λ , qui a un mécanisme d'intégration par recombinaison spécifique de sites similaire à celui de la famille des ICE SXT/R391 (Wozniak and Waldor, 2010). Les intégrases déterminent également le ou les site(s) d'insertion dans le chromosome de la bactérie hôte, avec plus ou moins de spécificité, et deux intégrases d'une même famille peuvent avoir différents sites d'insertion. Par exemple, les ICE SXT/R391 et Tn916 possèdent des recombinases à tyrosine, mais si la majorité des éléments SXT/R391 vont s'intégrer très spécifiquement à l'extrémité 5' du gène *prfC*, Tn916 peut lui s'intégrer dans plusieurs séquences cibles riches en A+T (Wozniak and Waldor, 2010). L'intégrase joue également un rôle dans l'excision de l'élément, qui a le plus souvent besoin d'un facteur de direction de recombinaison (« recombination directionality factor », RDF).

En outre, les ICE possèdent également un module de dissémination qui comprend (i) un gène codant une relaxase, capable de se lier de manière covalente à l'ADN au niveau de l'origine de transfert et d'initier une réplication en cercle roulant, (ii) des gènes codant des protéines de transfert pour véhiculer l'ADN d'une cellule à une autre, et, parfois, (iii) un système d'exclusion afin d'empêcher d'autres éléments similaires de s'intégrer dans la cellule hôte (Wozniak and Waldor, 2010). Enfin, il y a le module de régulation qui permet de contrôler l'expression des gènes de l'ICE impliqués dans sa mobilité. Il apparaît que, dans certains cas de figure, des facteurs de stress comme une exposition aux ultra-violets, à des antibiotiques, à l'éthanol, ou encore la présence de composés organochlorés, active le transfert de certains ICE (Beaber, Hochhut and Waldor, 2004; Gaillard *et al.*, 2010; Seier-Petersen *et al.*, 2014). C'est notamment le cas des éléments SXT/R391 activés par les inducteurs de la réponse SOS (Beaber, Hochhut and Waldor, 2004).

Les éléments SXT et R391 ont respectivement été isolés pour la première fois à partir de souches cliniques de *Vibrio cholerae* O139 (M. K. Waldor, Tschäpe and Mekalanos, 1996) et *Providencia rettgeri* (Coetzee, Datta and Hedges, 1972), avant d'être rassemblés dans une même famille appelée SXT/R391 en raison de leurs similitudes génétiques et structurales (B. Hochhut *et al.*, 2001). Connus pour être vecteurs de résistance aux antibiotiques, notamment chez les *V. cholerae* O1-O139, agents pathogènes responsables du choléra et à l'origine de 20 000 à 140 000 morts par an (Ali *et al.*, 2015), ils ont également été isolés dans plus d'une vingtaine d'espèces différentes appartenant principalement aux γ -protéobactéries et dont certaines sont listées dans le Tableau 4 (Bioteau, Durand and Burrus, 2018). Aujourd'hui, la famille SXT/R391 se compose d'une centaine d'éléments de 79-108 kb (Wozniak *et al.*, 2009), qui partagent un ensemble de 43 gènes conservés impliqués dans l'insertion/excision, réplication et transfert conjugatif (Bioteau, Durand and Burrus, 2018). Les ICE de cette famille possèdent également 5 sites d'insertion d'ADN variable (fonctions auxiliaires), appelés « hot spots » (HS1-5), mais certains ICE possèdent 4 régions variables supplémentaires (VRI-IV pour « variable resistance islands ») (Wozniak *et al.*, 2009). La dissémination des éléments SXT/R391 est régulée par le gène *setR* qui code une protéine homologue au répresseur CI du phage λ . Cette protéine se lie naturellement au promoteur P_L (ou P_{s086}) qui se trouve en amont des gènes régulateurs *setC* et *setD*, et empêche la transcription de ces derniers qui

sont impliqués dans l'activation des gènes d'excision et de transfert des éléments (Beaber and Waldor, 2004). L'induction de la réponse SOS à la suite d'un stress génotoxique permet de lever la répression exercée par SetR. En absence de stress génotoxique, la protéine LexA se fixe sur le promoteur des gènes du régulon SOS, et réprime ainsi l'expression de protéines principalement impliquées dans la réparation de l'ADN. Lorsque l'ADN est endommagé, la protéine RecA se lie à l'ADN simple brin et la formation de ce complexe nucléo-protéique (RecA*) va activer l'autoprotéolyse de LexA. Il en résulte une levée de répression d'un nombre variable de gènes en fonction des espèces bactériennes (Cirz *et al.*, 2006). En outre, la protéine RecA* activée, va également entraîner le clivage autres protéines comme SetR et permettre ainsi l'expression des gènes *setCD* (Figure 9) essentiels à l'activation de l'expression de gènes impliqués dans le transfert conjugatif de l'élément (Beaber, Hochhut and Waldor, 2004). L'étude publiée par Beaber *et al* (2004) a permis de démontrer que l'induction de la réponse SOS augmentait la fréquence de transfert de l'élément SXT^{MO10}. Ainsi, l'utilisation de concentrations sub-inhibitrices de mitomycine C, un antibiotique mutagène pontant et alkylant de l'ADN, a permis d'augmenter d'un facteur 300 la fréquence de transfert de l'élément dans des tests réalisés *in vitro* entre souches d'*E. coli* (Beaber, Hochhut and Waldor, 2004).

Tableau 4 : ICE de la famille SXT/R391 utilisés dans l'étude de Bioteau et al, 2018.

(1/2)

Espèces	Souche	Origine	Ann.	ICE	T ^a	Taille (pb) ^b	G ^c	Gènes de résistance ^d	Réf. ^e	N° d'accension GenBank
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	MIDG3553	Pneumonic lung of a pig, UK	2012	ICEAp2	1R	92,660	+	<i>sul2, floR, strAB, dfrA1</i>	9	MF187965
<i>Alteromonas macleodii</i>	D7	Adaman Sea, Thailand	2000	ICEAmaD7	1S	117,055	+	<i>merTPCA, acrAB-tolC, zitB, zntA, copA</i>		CP014323
<i>Alteromonas mediterranea</i>	MED64	Aegean Sea, Lebanon	2000	ICEAmaMED64	1S	80,715	+	–		CP004848
<i>Escherichia coli</i>	HVH 177	Human blood, Denmark	2003	ICEEcoHVH177	1S	89,125	+	–		AZJM01000017
<i>Idiomarinaceae bacterium</i>	HL-53	Unknown	ND	ICE/baHL53	1S	71,962	+	–		LN899469
<i>Methylophaga frapperi</i>	JAM7	Seawater treatment plant, Montreal Biodome, Canada	ND	ICEMfrJAM7	1S	109,780	+	–		CP003380
<i>Photobacterium damsela</i>	PC554.2	Senegalese sole, Galicia, Spain	2003	ICEPdaSpa1	1S	102,985	+	<i>tetA</i>	10	AJ870986
<i>Proteus mirabilis</i>	TJ1809	Stool, Tianjin, China	2013	ICEPmiCHN1809	1R	76,218	+	–	36	KX243413
	09MAS2407	Stool, Maansham, China	2009	ICEPmiCHN2407	1R	97,078	+	<i>tetA, merTPCA, czcD</i>	36	KX243405
	09MAS2410	Stool, Maansham, China	2009	ICEPmiCHN2410	1R	93,537	+	<i>merTPCA, czcD</i>	36	KX243406
	09MAS2416	Stool, Maansham, China	2009	ICEPmiCHN2416	1R	92,556	+	<i>merTPCA, czcD</i>	36	KX243407
	TJ3237	Stool, Tianjin, China	2013	ICEPmiCHN3237	1S	87,215	+	–	36	KX243414
	TJ3300	Stool, Tianjin, China	2013	ICEPmiCHN3300	1R	108,335	+	<i>sul2, floR, strAB, dfrG</i>	36	KX243415
	TJ3335	Stool, Tianjin, China	2013	ICEPmiCHN3335	1S	89,996	+	<i>sul2, floR, strAB, tetA</i>	36	KX243416
	MD20140901	Stool, Beijing, China	2014	ICEPmiCHN901	1S	89,493	+	<i>sul2, floR, strAB, dfrG</i>	36	KX243408
	MD20140902	Stool, Beijing, China	2014	ICEPmiCHN902	1S	89,096	+	<i>sul2, floR, strAB, dfrG</i>	36	KX243409
	MD20140903	Stool, Beijing, China	2014	ICEPmiCHN903	1S	89,644	+	<i>sul2, floR, strAB, dfrG</i>	36	KX243410
	MD20140904	Stool, Beijing, China	2014	ICEPmiCHN904	1S	94,942	+	<i>sul2, floR, strAB, tetA, czcD</i>	36	KX243411
	MD20140905	Stool, Beijing, China	2014	ICEPmiCHN905	1S	94,956	+	<i>sul2, floR, strAB, tetA, czcD</i>	36	KX243412
	PM13C04	Chicken fecal sample, Hubei, China	2013	ICEPmiChn1	1S	92,752	+	<i>sul2, floR, strAB, tetA, czcD</i>	32	KT962845
	PM14C28	Chicken fecal sample, Heibei, China	2014	ICEPmiJpn1	1S	91,091	+	<i>bla_{CMY-2}</i>	30	KT894734
	HI4320	Human urine, MA, USA	1986	ICEPmiUSA1	1S	79,733	+	–	10	AM942759
	Unnamed	India	1977	R997	1S	85,368	+	<i>bla_{HMS-17}, czcD</i>	61	KY433363.1
<i>Proteus vulgaris</i>	08MAS2213	Food, Maansham, China	2008	ICEPvuCHN2213	1S	94,340	+	<i>sul2, floR, strAB</i>	36	KX243403
<i>Providencia alcalifaciens</i>	P-18	Bangladesh	1999	ICEPalBan1	1R	96,586	+	<i>sul2, floR, strAB, dfrA1</i>	10	GQ463139
<i>Providencia rettgeri</i>	107	Pretoria, South Africa	1967	R391	1R	88,532	+	<i>aph, merTPCA</i>	62	AY090559
<i>Providencia stuartii</i>	ATCC 33672	ATCC, unknown	ND	ICEPst33672	1R	75,588	+	<i>merTPCA</i>		CP008920
<i>Shewanella decolorationis</i>	S12	Wastewater treatment plant, Guangdong, China	2012	ICESdeCHNS12	1S	70,735	+	–		AXZL01000060
<i>Shewanella sp.</i>	W3-18-1	Pacific Ocean	2000	ICESpuPO1	1S	108,623	+	<i>acrAB-tolC, zitB, zntA, copA, czcA, czcD</i>	10	CP000503
<i>Vibrio alginolyticus</i>	A056	Whiteleg shrimp, Guangdong, China	2003	ICEValA056-1	1S	89,004	+	<i>sul2, strAB, acrAB-tolC</i>	20	KR231688
	E0601	Seawater, Guangdong, China	2006	ICEValA056-2	2R	103,826	+	–	20	KR231689
	HN396	Seawater, Guangxi, China	2008	ICEValHN396	1R	106,165	+	–	20	KT072768
	HN396	Seawater, Guangxi, China	2008	ICEValHN396	2R	86,687	+	–	20	KT072770
	HN437	Seawater, Hainan, China	2008	ICEValHN437	2*	94,920	+	<i>ugd</i>	20	KT072771
	HN492	Seawater, Hainan, China	2008	ICEValHN492	1R	106,164	+	–	20	KT072769
	ZJ-T	Orange-spotted grouper, Guangdong, China	2005	ICEValZJT1	1S	>88,684		<i>sul2, strAB, acrAB-tolC, qnrVCS</i>		CP016224
				ICEValZJT2	2R	>100,515				CP016224
<i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor	2055/98	Bangladesh	1998	ICEVchBan5	1R	102,131	+	<i>sul2, floR, strAB, dfrA1</i>	10	GQ463140

Tableau 4 : Suite.

Espèces	Souche	Origine	Ann.	ICE	T ^a	Taille (pb) ^b	G ^c	Gènes de résistance ^d	Réf. ^e	N° d'accension GenBank
	MJ-1236	Matlab, Bangladesh	1994	ICEVchBan9	1R	106,124	+	<i>sul2, floR, strAB, tetA, dfrA1, zitB</i>	10	CP001485
	ICDC-2605	Patient, Guizhou, China	1998	ICEVchCHN2605	1S	98,458	+	<i>sul2, floR, strAB, dfrG</i>	37	KT151661
	ICDC-4210	Patient, Jiangxi, China	1999	ICEVchCHN4210	1S	110,349	+	<i>sul2, floR, strAB, tetA, dfrG</i>	37	KT151662
	ICDC-956	Environment, Liaoning, China	2001	ICEVchCHN956	1S	109,322	+	<i>sul2, floR, strAB, tetA, dfrG</i>	37	KT151655
	wujiang-2	Patient, China	ND	ICEVchCHNwuji	1R	96,168	+	<i>sul2, strAB, tetA, dfrA1</i>		KT151664
	CO943	Sevagram, India	1994	ICEVchInd5	1R	97,847	+	<i>sul2, strAB, tetA, dfrA1</i>	10	GQ463142
	2010EL-1786	Patient, Artibonite, Haiti	2010	ICEVchHai1	1R	97,847	+	<i>sul2, floR, strAB, dfrA1</i>		CP003069
	2012HC-25	Stool, Haiti	2012	ICEVch2012HC25	3R	>108,600	+	–		JSTY01000047 JSTY01000048
<i>V. cholerae</i> O139	AS207 MO10	Clinical, Kolkata, India Clinical, Chennai, India	1997 1992	ICEVchInd4 SXT	1S 1S	95,491 99,452	+	<i>sul2, floR, strAB</i> <i>sul2, floR, strAB, dfr18</i>	10 8	GQ463141 DS990138
<i>V. cholerae</i> non-O1/O139	HC-36A1 2012Env-25	Stool, Haiti Water, Haiti	2010 2012	ICEVchHai2 ICEVch2012Env25	1S 3R	82,795 >108,600	+	– –	63	AXDR01000007 JSTE01000047 JSTE01000048 GQ463143
	1-010118-075	Sewage, San Luis Potosi, Mexico	2001	ICEVchMex1	1R	82,839	+	–	10	GQ463143
<i>V. cholerae</i> O37 <i>V. cholerae</i> O77	MZO-3 8-76	Clinical, Bangladesh Diarrhea, India	2001 1976	ICEVchBan8 ICEVch8-76-1 ICEVch8-76-2	3R 1S 3R	105,790 >102,800 >122,200	+	<i>acrAB-tolC</i> ND ND	10	JQ345361 JIDN01000032 JIDN01000021 JIDN01000012 JIDN01000016
<i>V. cholerae</i>	YB8E08	Oyster Pond, MA, USA	2009	ICEVchYB8E08	3R	>104,300	+	ND		LBGN01000012 LBGN01000009 NMTB01000014 MIOZ01000052 MIZG01000083
	OYP6E07 3272-78 3223-74	Oyster Pond, MA, USA Water, MD, USA Storm drain, Guam	2009 1977 1974	ICEVchYP6E07 ICEVch3272-78 ICEVch3223-74	3* 3R 3R	93,439 104,112 104,112	+	<i>acrAB-tolC</i> <i>acrAB-tolC</i> <i>acrAB-tolC</i>		
<i>Vibrio fluvialis</i>	H-08942	Infant diarrhea, Kolkata, India	2002	ICEVflInd1	1S	102,862	+	<i>sul2, floR, strAB, dfr18</i>	10	KM213605
<i>Vibrio mytili</i>	CAIM528	Seawater, Spain	1985	ICEVmyCAIM528	2R	>63,900	–			JXOK01000005
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	CHN25	Shrimps, Shanghai, China	2011	ICEVpaCHN25	1R	88,331	+	<i>sul2, strAB, tetA, dfrG</i>		CP010883
	S163	Seafood, Malaysia	2007	ICEVpaS163	2R	>75,600	+	–		AWHQ01000004 AWHQ01000048 AWHM01000024 AWHM01000222 CP007004 CP028481
	S167	Environment, China	2007	ICEVpaS167	2R	>82,000	+	–		
	UCM-V493 S107-1	Sediment, Spain Oyster, Ladysmith Harbor, BC, Canada	2002 2005	ICEVpaUCM493 ICEVpaCan1	1S 1R	111,578 81,255	+	<i>bla_{HMS-1}</i> +		
<i>Vibrio vulnificus</i>	SC9729	Seawater, South Korea	2011	ICEVvuSC9729	4S	>85,200	+	<i>cbiO</i>		JZEQ01000086 JZEQ01000106 LBNN01000013 LBNN01000014 PDGD01000031 PDGD01000050
	CladeA-yb158	Tilapia fish, Israel	2005	ICEVvuCladeA158	4R	>87,800		<i>araJ</i>		
	CG100	Oyster, Taiwan	1993	ICEVvuCG100	4S	>105,300		<i>araJ</i>		

^aLe type des ICE SXT/R391 correspond au type de l'intégrase (1 pour int_{prfC} et 2-4 pour int_{trnA-Ser}), et le groupe d'exclusion (S ou R). Un astérisque (*) représente un groupe d'exclusion non déterminé.

^bPour les ICE déterminés à partir de données de séquençage de génome complet (WGS), la taille de l'ICE est une estimation de la taille minimum.

^cICE inclus dans l'analyse « Get_Homologs » de Bioteau *et al*, 2018 (REF). Les autres ICE ont été exclus en raison d'une mauvaise qualité de séquençage ou de données manquantes.

^dND : Non déterminé; « - » pas de gène de résistance.

^eRéférences pour les ICE déjà décrits dans la littérature (dans l'étude de Bioteau *et al*, 2018).

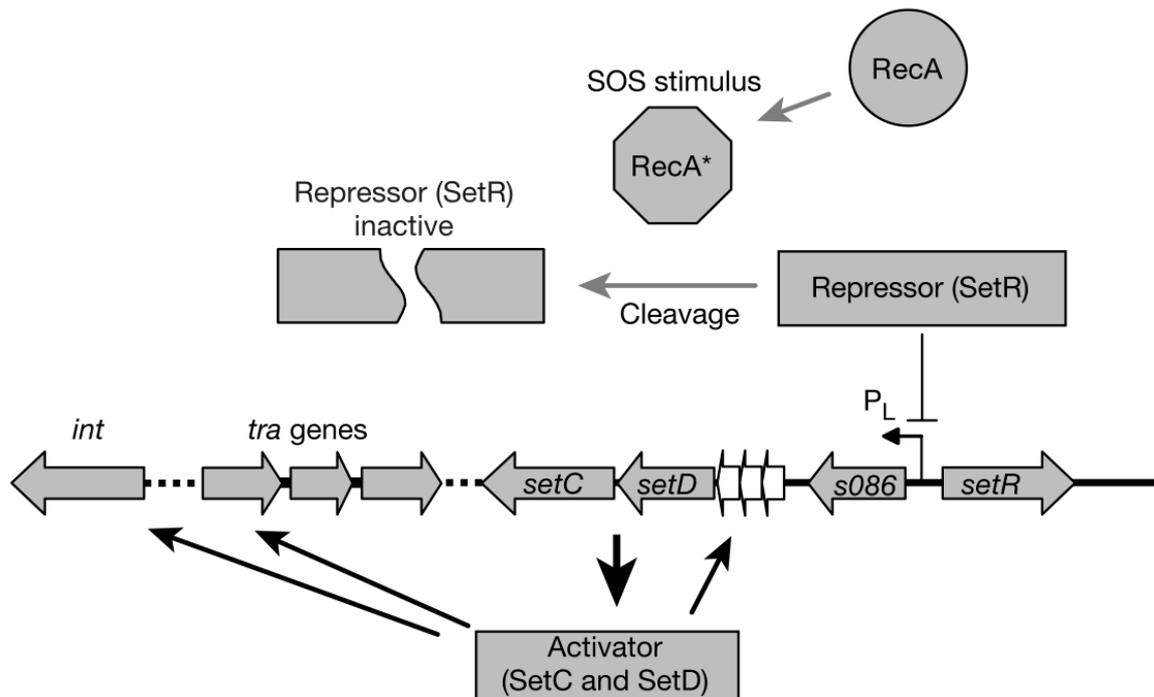


Figure 9 : Activation du transfert de l'élément SXT par la réponse SOS. Lors de l'induction de la réponse SOS, la protéine RecA activée (RecA*) est capable d'induire l'autoclivage de la protéine SetR, ce qui permet de lever la répression de SetR exercée sur le promoteur P_L (appelé également P_{s086}) en amont des gènes s086, setD et setC. L'expression de ces gènes est à l'origine de l'initiation de l'expression d'autres gènes impliqués dans le transfert conjugatif de l'élément. Les flèches noires et fines indiquent l'activation de la transcription, celles avec une extrémité en T indiquent une répression, celles noires et épaisses indiquent une traduction et les grises fines indiquent un changement de l'activité de la protéine. D'après Beaber et al, 2004.

A ce jour, l'essentiel de nos connaissances sur la régulation de SXT/R391 repose sur des observations faites sur le modèle *E. coli* et de son système SOS. Il en résulte que le comportement de l'élément dans d'autres espèces, où le système de régulation de la réponse SOS diffère par rapport au modèle canonique du régulon SOS d'*E. coli*, reste à définir, comme le montre l'étude de Baharoglu et Mazel (Baharoglu and Mazel, 2011). Dans leur travail, les niveaux d'induction du promoteur *recN* chez *E. coli* et *V. cholerae*, deux souches dont l'expression de la protéine RecN augmente lors de la réponse SOS, ont été mesurés lors de l'exposition à divers antibiotiques (Figure 10). Pour ce faire, le gène rapporteur codant la GFP a été utilisé pour réaliser des fusions transcriptionnelles (P_{recN} -*gfp*) qui ont été insérées chez *E. coli* et *V. cholerae*. Si la

ciprofloxacine augmente autant l'expression du promoteur P_{recN} chez *E. coli* que chez *V. cholerae* (80% de cellules fluorescentes), le triméthoprime active environ 2,5 fois plus l'expression de P_{recN} chez *E. coli* (80%) que chez *V. cholerae* (30%), et les autres antibiotiques testés en dehors de l'ampicilline, induisent le P_{recN} uniquement chez *V. cholerae*. Ces données permettent de se rendre compte que la régulation de la réponse SOS diffère entre ces deux genres bactériens. Dans ces conditions, on peut se poser la question de l'effet hôte sur la régulation du transfert des EGM régulés par la réponse SOS, et de l'effet des antibiotiques sur leur dissémination, d'autant plus que des concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques peuvent aisément être trouvées dans l'environnement. En outre, on peut également se poser la question du rôle d'autres molécules qu'on peut retrouver dans l'environnement, comme des polluants d'origine agricole ou piscicole qui finissent leur course dans les rivières, sur la dissémination de ces éléments.

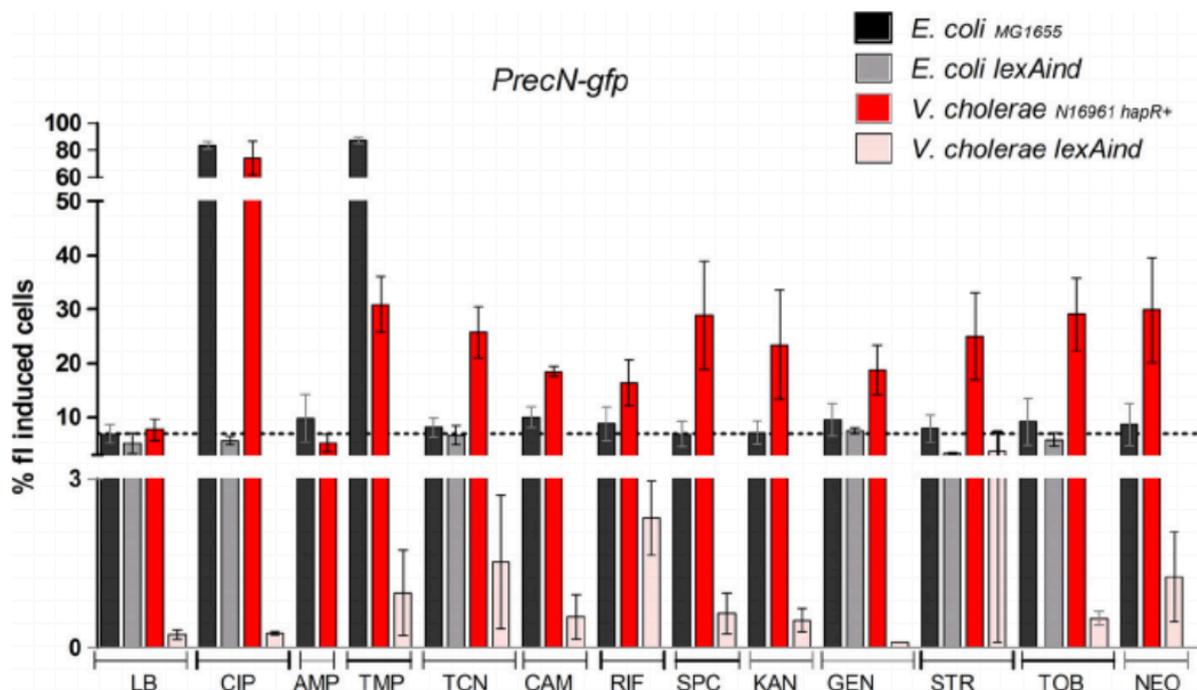


Figure 10 : Induction de la réponse SOS lors de l'exposition à des antibiotiques en concentrations sub-inhibitrices chez *E. coli* MG1655 et *V. cholerae* N16961 *hapR*⁺. Les concentrations suivantes (CMI/100) ont été utilisées respectivement pour *E. coli* / *V. cholerae* (en $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) : ciprofloxacine (CIP) à 0,05/0,005 ; ampicilline (AMP) et rifampicine (RIF) à 0,05/0,01 ; triméthoprime (TMP) à 0,05/0,005 ; tétracycline (TCN) à 0,15/0,015 ; chloramphénicol (CAM) à 0,15/0,005 ; spectinomycine (SPC), kanamycine (KAN) et streptomycine (STR) à 0,2/0,05 ; gentamicine (GEN),

*tobramycine (TOB) et néomycine (NEO) à 0,1/0,01. Des fusions transcriptionnelles $P_{recN}::gfp$ ont été insérées chez *E. coli* MG1655 et *V. cholerae* N16961 hap^{R+}, ainsi que dans les souches *lexAind* chez qui la réponse SOS ne peut être activée (répresseur LexA inclivable). La fluorescence a été mesurée grâce à un cytomètre, et le pourcentage de cellules fluorescentes est représenté sur l'axe des ordonnées (y). D'après Baharoglu et Mazel, 2011.*

D'une manière générale, le transfert des éléments SXT/R391 a été essentiellement, si ce n'est uniquement, étudié *in vitro* et principalement chez *E. coli*. Il en résulte une absence de connaissances concernant le transfert de ces éléments dans des conditions environnementales, que ce soit en termes de fréquence de dissémination ou en termes de régulation de l'élément. Par ailleurs, l'essentiel des ICE SXT/R391 a été isolé à partir d'isolats cliniques et en se basant principalement sur leur détection grâce au gène de l'intégrase à tyrosine *int_{SXT}* dont les premiers allèles ont été identifiés chez R391 et SXT^{MO10}. Il est probable que ce genre de démarche ait mené à des biais de détermination du spectre d'hôte de ces éléments avec en particulier une méconnaissance des hôtes environnementaux. En effet, le gène *int_{SXT}* n'est plus considéré comme faisant partie des gènes communs à l'ensemble des éléments SXT/R391 (Bioteau et al, 2018), ce qui a postérieurement, a certainement restreint la détection de nouveaux éléments ou l'identification de nouveaux hôtes. Finalement, si le transfert des éléments SXT/R391 dans l'environnement reste à évaluer, c'est en raison de la difficulté de mettre au point et en œuvre une méthode qui permette de suivre leur dissémination.

3. ETAT DE L'ART SUR LE SUIVI DE LA DISSEMINATION D'UN EGM DANS UN SYSTEME ENVIRONNEMENTAL, ET IDENTIFICATION DU SPECTRE D'HOTES DES ELEMENTS TRANSFERES

Il existe plusieurs techniques qui permettent de suivre le transfert d'un élément mobile dans des conditions environnementales. Parmi elles, la plus connue est certainement celle basée sur l'isolement par culture des bactéries qui ayant acquises les résistances conférées par l'EGM. Le principe est simple, il s'agit d'introduire une bactérie dite donneuse portant un EGM lui conférant un phénotype particulier tel qu'une ou plusieurs résistances aux antibiotiques, dans un échantillon

environnemental. Cette donneuse doit pouvoir se distinguer des transconjugants (*ie*, bactéries de l'environnement qui ont reçu l'EGM), grâce à un autre phénotype tel une résistance qui n'est pas portée par l'EGM. Si le transfert a lieu entre la bactérie donneuse et des bactéries receveuses de l'environnement, alors les transconjugants vont posséder le même profil de résistance que l'élément mobile, ce qui permettra de les isoler sur milieu sélectif, si tant est qu'ils soient cultivables. Ainsi, les bactéries isolées ayant le même profil de résistance/phénotype que la bactérie donneuse seront considérées comme des donneuses, et les bactéries ayant le même profil de résistance que l'EGM seront considérées comme des transconjugants. Par exemple, l'équipe de Wang et al (Wang *et al.*, 2020) a étudié l'effet de 4 éléments traces métalliques sur la fréquence de transfert du plasmide RP4 de type IncP α , à large spectre, et vecteur des résistances à l'ampicilline, la kanamycine et la tétracycline. Le transfert a été réalisé dans de l'eau de rivière en utilisant *E. coli* K12 en tant que donneur. La bactérie donneuse et les receveuses de l'environnement ont été exposées à différentes concentrations d'éléments traces métalliques en microcosmes, et les transconjugants ont été isolés grâce aux résistances apportées par le plasmide. Il en résulte que les fréquences de transfert, exprimées en transconjugants par receveuse, augmentent d'un facteur 16 en présence de cuivre à 5 $\mu\text{g/L}$ (Figure 11). Le spectre d'hôtes du plasmide RP4 a également pu être étudié grâce à l'analyse des séquences de l'ADNr 16S des transconjugants, à savoir des isolats d'*Acinetobacter* spp., *Alcaligenes* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., et *Microbacterium* spp. Si ce genre d'investigation permet de mettre en évidence certains phénomènes, comme ici l'effet des métaux, cette méthode ne suffit pas réellement à quantifier ni à confirmer le transfert de l'EGM dans l'environnement. En effet, cette méthode ignore la part de transconjugants non-cultivables. Par ailleurs, le nombre de transconjugants observés est également faussé par les bactéries environnementales qui partagent naturellement le même profil de résistance aux antibiotiques que ceux apportés par l'EGM. Dans ces conditions, une approche basée sur la biologie moléculaire permet de prendre en considération les bactéries non-cultivables, et quantifier spécifiquement à la fois les bactéries donneuses et l'élément d'intérêt.

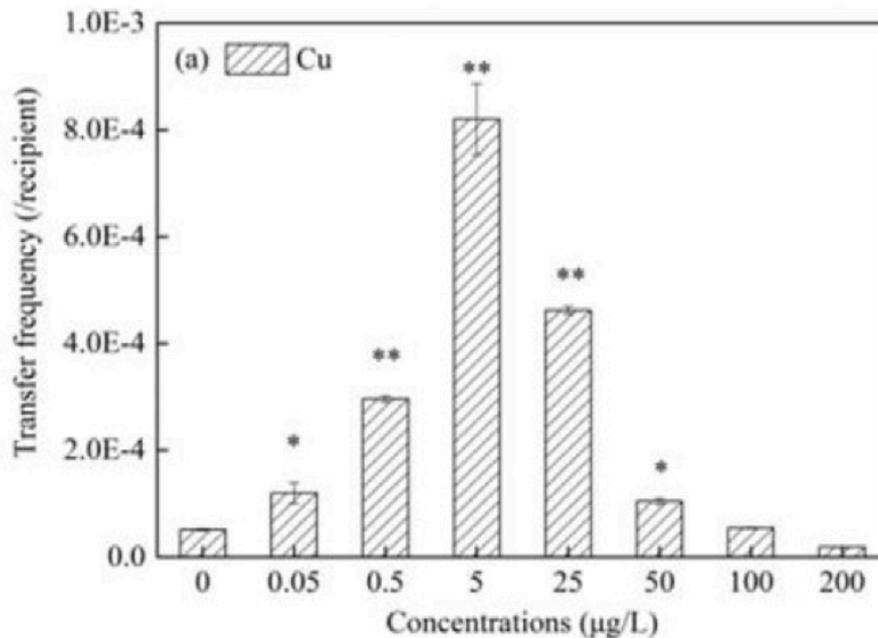


Figure 11 : Fréquences de transfert du plasmide RP4, présent chez *E. coli* K12, vers des bactéries environnementales (microcosmes de rivière) exposées à diverses concentrations de cuivre (Cu) allant de 0,05 µg/mL à 200 µg/mL. D'après Wang et al, 2014.

Une méthode qui permet de s'affranchir de la problématique de la culture des bactéries, et qui permet également d'observer le transfert *in situ*, consiste à utiliser un gène rapporteur (Sørensen et al., 2005). Les bactéries donneuses (ou receveuses) et l'EGM sont marquées distinctement avec un gène qui code une protéine qui émet de la fluorescence, respectivement *rfp* (ou *dsRed*), et *gfp*, par exemple. Dans un plasmide conjugatif, le gène codant la GFP est placé en amont d'un promoteur P_{lacZ} modifié (Figure 12), de manière à être réprimé dans les bactéries donneuses qui codent le répresseur LacI dans leur chromosome, et à s'exprimer une fois transférés lorsque que la répression est levée. Dans ces conditions, les bactéries donneuses et les transconjugants peuvent être détectés par microscopie à épifluorescence, et l'utilisation de ces marqueurs permet de les dénombrer, et même de les isoler grâce à un cytomètre avec trieur de cellules. L'ADN de ces transconjugants peut alors être extrait et analysé pour identifier les bactéries portant le plasmide d'intérêt (Figure 13).

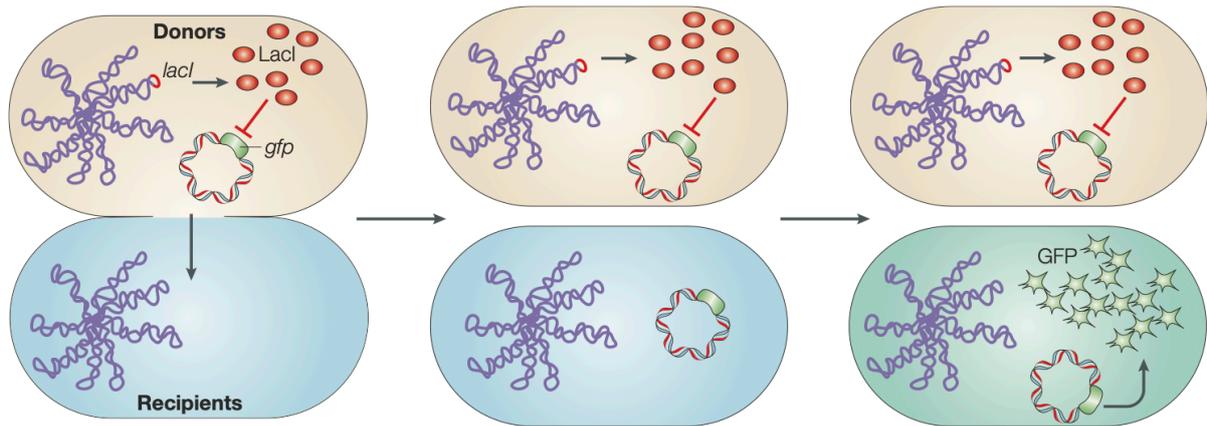


Figure 12 : Utilisation d'un gène rapporteur pour le suivi du transfert d'un EGM. La bactérie donneuse contient un plasmide conjugatif marqué par le gène *gfp*. La GFP est une protéine qui émet une fluorescence verte est dont l'expression est dépendante du promoteur P_{lacZ} placé en amont. La bactérie donneuse exprime le répresseur *LacI* à partir d'un gène intégré dans le chromosome, ce qui réprime l'expression du gène codant la GFP dans le plasmide. Cependant, lorsque le plasmide est transféré par conjugaison, le gène n'est plus réprimé et les transconjugants émettent une fluorescence verte. D'après Sørensen et al, 2005.

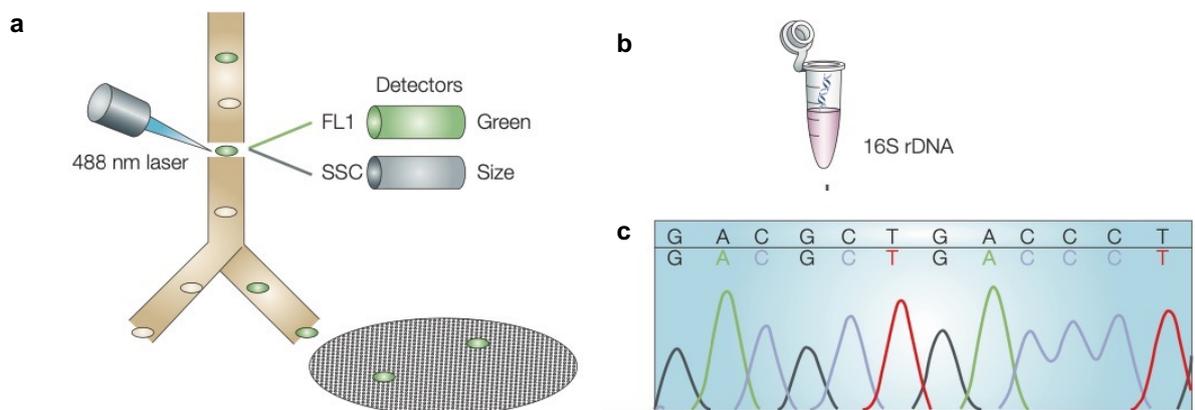


Figure 13 : Détection du transfert horizontal sans culture bactérienne. Les bactéries émettant une fluorescence verte peuvent être détectées, dénombrées par cytométrie en flux et (a) isolées par un trieur de cellules. (b) L'ADN de ces bactéries peut être extrait, et (c) l'ADNr 16S amplifié pour séquencer et déterminer la nature des bactéries ayant acquis l'EGM. D'après Sørensen et al, 2005.

En se basant sur l'utilisation d'un gène rapporteur, des transferts dans des conditions proches de l'environnement ont également pu être observés dans une étude menée par Klümper *et al* (Klümper *et al.*, 2015). Des bactéries extraites du sol ont été exposées indépendamment à trois plasmides IncP différents que ces auteurs ont modifiés pour exprimer le gène de la *gfp* sous le contrôle du promoteur P_{lacZ} et qui étaient portés par des souches donneuses modifiées pour émettre une fluorescence de couleur rouge et exprimer le répresseur LacI. Lorsque le plasmide est transféré par conjugaison sur filtre vers des bactéries du sol, il en résulte des cellules (ou petites colonies) vertes, qui peuvent être détectées et quantifiées par microscopie puis isolées grâce à un cytomètre. L'analyse de l'ADNr 16S des transconjugants a permis de grouper les séquences obtenues en unités taxonomiques opérationnelles (OTU), et créer un Diagramme de Venn (Figure 14). Grâce aux données obtenues, il est possible d'observer que lorsque *Pseudomonas putida* est utilisée en tant que donneuse des plasmides RP4, pKJK5 et pIPO2tet, ce dernier plasmide se transfère vers plus d'espèces bactériennes que les deux autres (109 OTU contre 86 et 58 pour RP4 et pKJK5, respectivement – Figure 14.b), et parmi les 281 OTU détectées en tout, 74 étaient communes aux 3 plasmides et représentaient 83,1% des séquences obtenues (Figure 14.d). Il en résulte que 83,1% des séquences représentent un ensemble de bactéries permissives au transfert de ces éléments, et participent également à leur dissémination, tout comme celles appartenant aux OTU les plus rares. Dans cet exemple, la méthode repose tout de même l'isolement de bactéries environnementales qui vont être utilisées en tant que receveuses pour le transfert. Globalement, cette méthode permet de démontrer le transfert et d'identifier des bactéries qui ont acquis l'EGM, mais elle repose sur l'expression d'un gène codant une protéine fluorescente dans des hôtes dont nous ignorons s'ils peuvent réellement exprimer efficacement ou non de telles protéines. Une telle restriction apparente de la gamme d'hôtes receveurs vers qui peut être transmis un plasmide marqué par le gène *gfp* a notamment été mis en évidence par notre équipe (Bellanger, Guilloteau, Bonot, *et al.*, 2014).

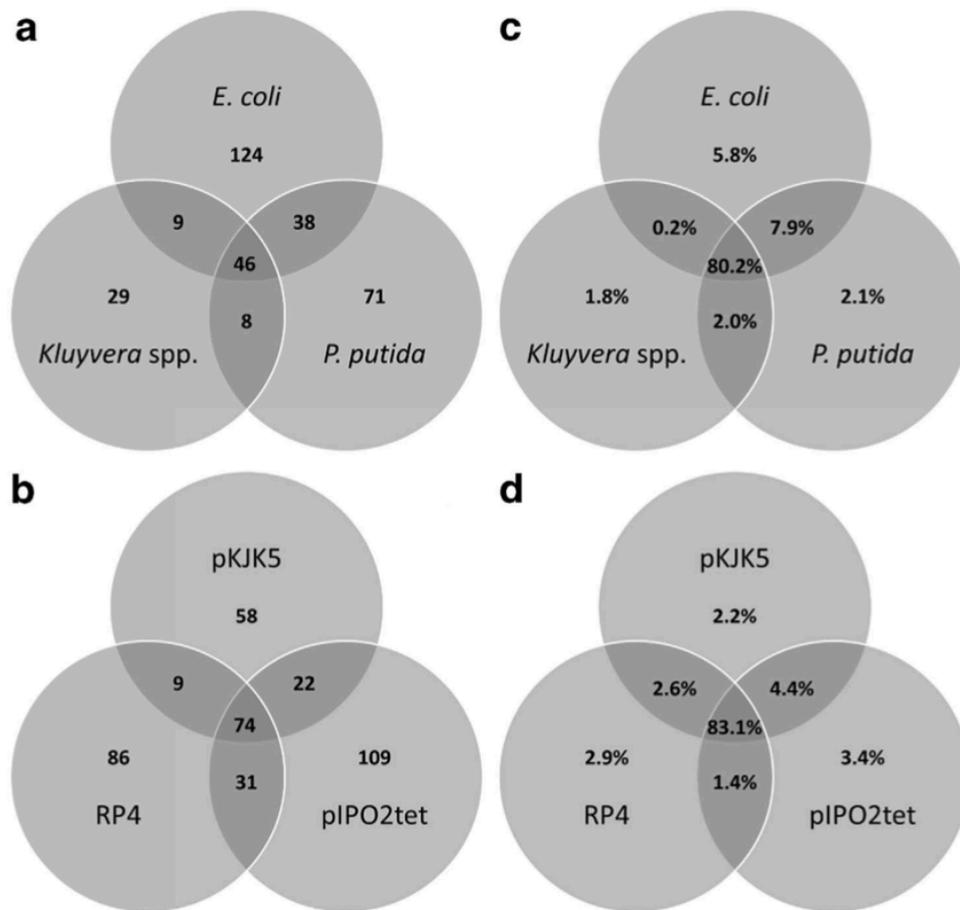


Figure 14 : Diagramme de Venn représentant différents ensembles de transconjugants (a et c) du plasmide pKJK5 transféré via 3 bactéries donneuses (*E. coli*, *P. putida* et *Kluyvera sp.*), et (b et d) des plasmides pKJK5, RP4 et pIPO2tet transférés via *P. putida*. La prévalence et l'abondance des OTU sont représentées respectivement dans les diagrammes a/b et c/d. Les OTU ont été définies à 97% de similarité, et le nombre d'échantillons a été normalisé à 30000. D'après Klümper et al, 2015.

Il y a une dizaine d'années, le LCPME a développé une approche basée sur la qPCR pour suivre l'invasion d'éléments conjugatifs dans des communautés microbiennes. La méthode a été développée initialement pour étudier la dissémination du plasmide pB10 dans des communautés naturelles (de boue de station d'épuration, de lisier, de sédiments) maintenues en microcosmes (Merlin *et al.*, 2011). L'approche repose sur l'utilisation de séquences uniques et propres à l'élément et au chromosome de la souche donneuse afin de permettre leur quantification spécifique par qPCR. Des prélèvements sont effectués de manière régulière dans le microcosme après

introduction de la donneuse, puis celle-ci et le plasmide pB10 sont quantifiés par qPCR. Dans l'exemple de la Figure 15 AS2, le nombre de copies de pB10 se stabilise au cours du temps alors que la donneuse DH5 α disparaît progressivement, indiquant donc que le plasmide pB10 persiste dans la communauté autochtone et donc qu'il y a eu transfert. Ainsi, considérant le transfert conjugatif comme un mode de réplication intercellulaire, un transfert conjugatif pourra être considéré comme avéré quand le rapport plasmide / donneuse augmente. Cela nécessite une souche donneuse qui survive suffisamment longtemps dans l'environnement pour transférer l'élément, mais qui disparaisse assez rapidement pour laisser place à d'autres transferts et permettre de les mettre en évidence. Dans ces conditions, lorsque le rapport copies de pB10 / copies de DH5 α n'augmente pas et/ou que la donneuse ne disparaît que très lentement, ou trop vite pour transférer l'élément (Figure 15, AS1), il est parfois difficile de dire si le transfert a eu lieu ou pas.

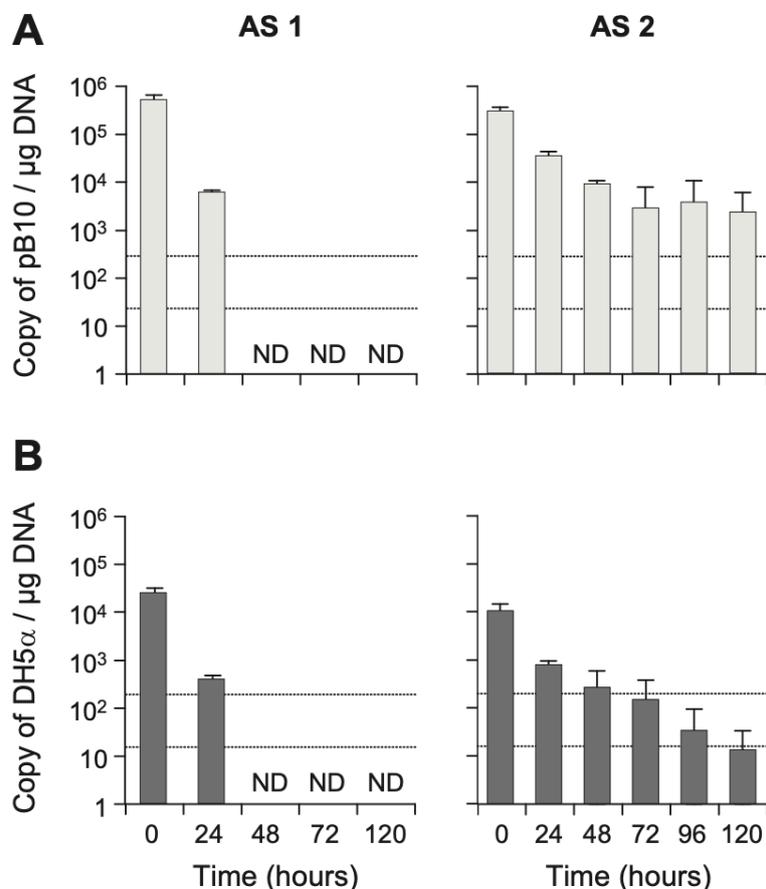


Figure 15 : Suivi de la quantification de pB10 (A) et DH5 α (B) par qPCR dans des microcosmes. D'après Merlin et al, 2011.

Si ces méthodes permettent d'identifier des conditions permissives au transfert d'un élément conjugatif, elles sont toutefois accompagnées de quelques limitations. Ainsi, isoler des bactéries sur milieu sélectif en fonction de leur profil de résistance, dépendant des résistances apportées par l'EGM, n'est pas seulement une méthode qui va se limiter aux 1% de bactéries environnementales cultivables, mais elle isole également les bactéries environnementales qui partagent naturellement les mêmes résistances que celles portées par l'élément mobile. Si on utilise cette méthode en toute connaissance de cause, il faut ensuite extraire l'ADN de ces transconjugants potentiels puis déterminer si l'élément est présent, et obtenir des informations quant à la nature de l'hôte. Dans le même ordre d'idée, l'approche de Sørensen *et al.* (Sørensen *et al.*, 2005) utilisée par Klümper *et al.* (Klümper *et al.*, 2015) va être limitée aux potentielles receveuses qui vont pouvoir être extraites, mais globalement, la méthode du suivi du transfert se basant sur un gène rapporteur présente aussi des limites. L'étude réalisée par Bellanger *et al.* (Bellanger, Guilloteau, Bonot, *et al.*, 2014) a permis de mettre en évidence que toutes les bactéries n'étaient pas capables d'exprimer correctement le gène codant la GFP, et que cette méthode se limitait donc à une certaine gamme d'hôtes bactériens. Dans certains cas de figure, l'expression du gène et la fluorescence en résultant étaient tellement faibles que cette dernière ne pouvait être distinguée du bruit de fond provoqué par un échantillon environnemental. En choisissant une seule donneuse, le spectre de bactéries receveuses est également limité dans les études de Wang *et al.*, et Merlin *et al.*, (Merlin *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2020) mais cela sous-entend que la dissémination est probablement plus fréquente que ce qui est observé. Par ailleurs, l'étude de Klümper *et al.* (Klümper *et al.*, 2015), qui lie le transfert environnemental à la métagénomique, semble la plus aboutie pour déterminer la nature des transconjugants, si on passe outre le fait qu'on puisse rater une part non-négligeable mais aussi non-quantifiable des signaux de fluorescence. A cet égard, il existe une autre méthode, l'epicPCR, qui permet de dépasser la limitation liée à la culture de bactéries environnementales et de s'affranchir des problèmes d'expression de gènes utilisés pour le traçage de l'élément afin de certifier la présence d'un EGM dans des transconjugants tout en les identifiant taxonomiquement. Outre le fait de démontrer la présence de l'élément dans des cellules autres que les bactéries donneuses, et donc de démontrer définitivement le transfert, l'approche permet de révéler des individus bactériens potentiellement impliqués dans la chaîne de transmission de l'élément.

Développée par Spencer et al (Spencer et al., 2016), l'epicPCR est basée sur une PCR fusion réalisée simultanément dans plusieurs dizaines de milliers de cellules isolées dans des billes de polyacrylamide, elles-mêmes isolées les unes des autres dans une émulsion. Il s'agit d'une étape importante qui permet de lier le fragment d'un gène d'intérêt à un fragment du gène codant l'ARNr 16S de la bactérie hôte, et dont la conception des amorces présente l'avantage de ne permettre l'obtention d'un amplifiât uniquement dans les cellules qui portent le gène d'intérêt. Pour cette raison, il est impératif de pouvoir réaliser les PCR fusion sur des cellules physiquement séparées les unes des autres. Le séquençage des produits de PCR fusion, et donc du gène codant l'ARNr 16S correspondant, permet d'obtenir des centaines de milliers de séquences par échantillon, qui servent à former des OTU. La nature de ces OTU est ensuite révélée en comparant ces séquences à des bases de données, afin de les placer sur un arbre phylogénétique réalisé à partir du séquençage de l'ADN génomique total extrait des populations bactériennes déjà utilisées pour créer les billes d'acrylamide. En pratique, il s'agit d'extraire les cellules à partir d'un échantillon de sol ou de concentrer les cellules présentes dans un échantillon d'eau, puis créer une émulsion pour isoler les bactéries et les capturer dans des billes de polyacrylamide (Figure 16 a). Une première PCR fusion a lieu pour lier le gène d'intérêt au gène codant l'ARNr 16S, puis les billes de polyacrylamide sont extraites pour récupérer le produit de fusion (Figure 16, b à d) et réaliser une PCR nichée sur les amplifiâts de la PCR fusion (étape non-représentée). Des amorces appelées « blocking primers » sont ajoutées lors de cette réaction de PCR nichée afin d'empêcher l'amplification ou l'hybridation de fragments du gène d'intérêt à d'autres du gène codant l'ARNr 16S qui pourraient être libres. La PCR nichée permet également d'amplifier les produits de la PCR fusion afin qu'ils soient suffisamment concentrés pour réaliser un séquençage métagénomique de type « metabarcoding ». Des centaines de milliers de séquences sont ensuite assemblées, contrôlées et filtrées informatiquement pour ne garder que la partie correspondant au gène codant l'ARNr 16S qui va servir à la formation des OTU pour leur assignation taxonomique, et éventuellement la réalisation d'un arbre phylogénétique des bactéries ayant acquis l'élément.

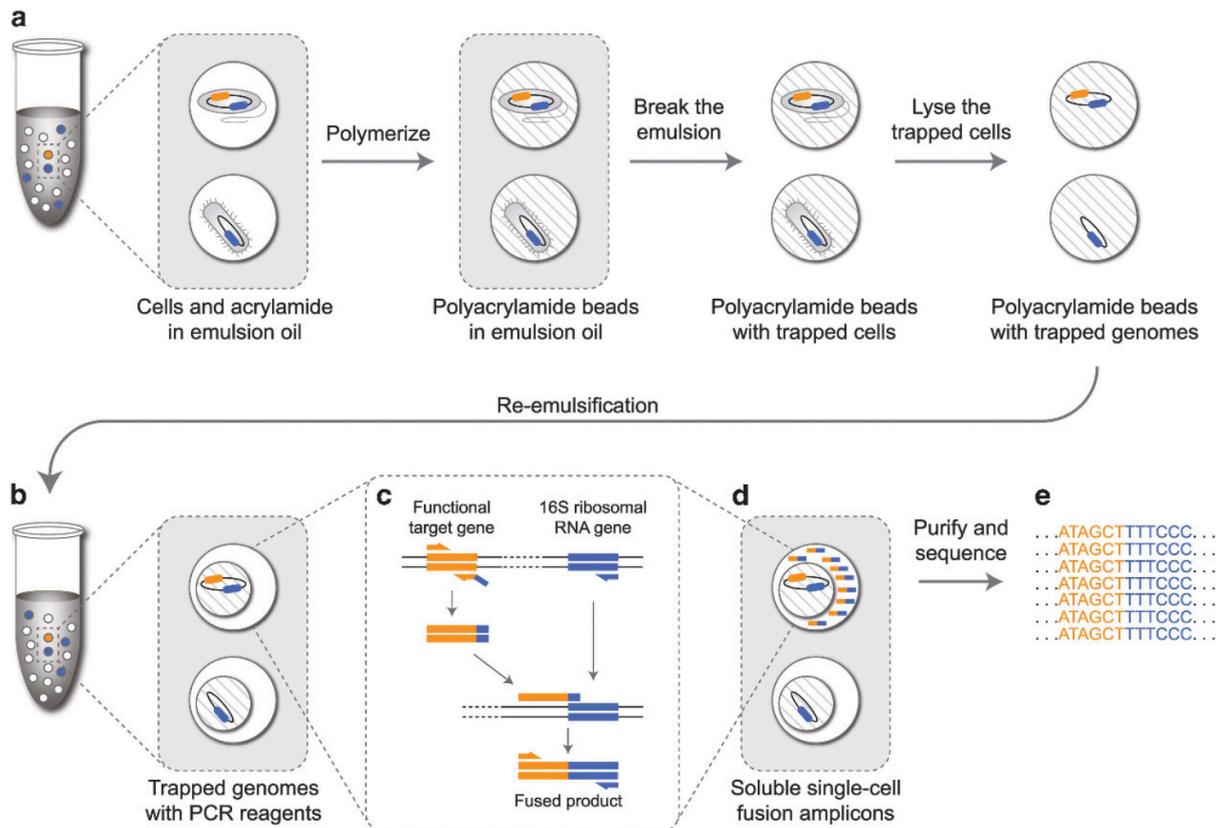


Figure 15 : Résumé des étapes d'une amplification par epicPCR. (a) Des cellules sont extraites, isolées dans une émulsion d'huile et capturées individuellement dans des billes de polyacrylamide. Les cellules peuvent ensuite être lysées pour récupérer leur ADN génomique (ADNg). (b) Les billes de polyacrylamide permettent d'isoler les ADNg les uns des autres, mais sont suffisamment perméables pour laisser passer les réactifs d'une réaction PCR. (c) La PCR fusion amplifie d'abord un fragment spécifique du gène d'intérêt, et une des amorces sert à amplifier un fragment du gène codant l'ARNr 16S. Il en résulte un produit de fusion gène d'intérêt – ADNr 16S. (d) La PCR fusion n'a lieu que dans les billes de polyacrylamide qui possèdent un ADNg avec le gène d'intérêt. (e) Les produits de fusion sont ensuite préparés pour l'étape de séquençage, et permettent de définir les bactéries hôtes de ces éléments. D'après Spencer *et al*, 2015.

L'epicPCR a déjà été mise en œuvre à au moins à deux reprises pour identifier les bactéries sulfatoréductrices dans l'eau d'un lac (Spencer *et al.*, 2016), et l'identification de gènes d'antibiorésistance dans les effluents de station d'épuration (Hultman *et al.*, 2018). Il s'agit d'une méthode envisageable pour assigner taxonomiquement n'importe

quel marqueur si tant est qu'il soit suffisamment abondant dans la communauté étudiée. Cette limite est d'autant plus importante qu'elle est elle-même limitée par le nombre de bactéries analysables lors d'une expérience d'epicPCR. Cette approche, sans à priori apparaît comme une technique de choix pour identifier la fraction cachée des bactéries vectrices d'un EGM qui resteraient difficilement cultivables par des techniques de culture traditionnelles.

4. OBJECTIFS DE TRAVAIL

Le concept "One Health" défini par l'OMS vise un effort collectif pour garantir la santé humaine, animale, et plus globalement de l'environnement qui nous entoure. Dans ce contexte, l'émergence et la dissémination de l'antibiorésistance est un problème de santé publique majeur, pris au sérieux depuis de nombreuses années par la communauté internationale qui cherche à préserver l'efficacité des antibiotiques que nous possédons, en éliminant les mésusages, ou en améliorant la gestion de leur utilisation. Il s'agit aussi de connaître les voies de dissémination de bactéries résistantes et de leurs gènes de résistance, afin d'essayer de les endiguer. Pour autant, notre connaissance du transfert d'EGM vecteurs de gènes d'antibiorésistance dans l'environnement est relativement limitée.

Ce travail s'intègre dans le projet Aquaresist financé par l'Anses, qui a pour objectif de comprendre la dissémination des éléments de la famille d'ICE SXT/R391 en milieu aquatique, où nous avons abordé successivement plusieurs questions afin de combler des lacunes relatives au transfert de l'EGM en conditions environnementales : Quels sont les environnements riches en éléments SXT/R391 qui reflètent des conditions environnementales permissives à leur transfert ou maintien ? Quels sont les hôtes naturels de SXT/R391 qui pourraient constituer la courroie de transmission de ces éléments dans l'environnement ? Existe-t-il des molécules qui induisent le transfert des éléments SXT/R391 ? Peut-on démontrer leur efficacité sur le transfert de SXT/R391 dans des dispositifs expérimentaux ?

Les données de la littérature révèlent que les éléments SXT/R391 ont uniquement été isolés à partir de souches cultivées, majoritairement d'origine clinique, et en ciblant le gène *int* codant l'intégrase, alors qu'aujourd'hui il n'est plus considéré comme faisant partie du génome de base des éléments SXT/R391 (Balado, Lemos

and Osorio, 2013; Lei *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2020; Shinde, Raval and Haldar, 2020). Non seulement les méthodes utilisées sous-estiment l'abondance de ces éléments dans les environnements étudiés, mais elles limitent aussi l'étendue des connaissances que l'on peut obtenir sur le spectre d'hôtes aux seules bactéries cultivables. Afin d'identifier les hôtes naturels des ICE SXT/R391 dans divers environnements aquatiques, plusieurs banques de bactéries regroupant 1962 cellules ont été criblées dans ce travail en ciblant le gène *traB*, faisant partie du génome de base des éléments SXT/R391. En parallèle, une analyse à plus grande échelle du spectre d'hôte a été rendue possible grâce à l'epicPCR. Grâce aux données de métagénomique obtenues par epicPCR, il a été possible de définir des critères pour le choix raisonné d'une bactérie à utiliser en tant que donneuse dans des expériences de transfert en microcosmes.

Dans ce travail, nous avons également évalué l'effet de certaines molécules sur l'induction du transfert de l'élément. Dans ce contexte, des biosenseurs ont été construits en utilisant P_{s086} défini comme étant le promoteur central de la régulation de SXT, et les gènes de bioluminescence *luxCDABE* en tant que rapporteurs. Ces biosenseurs ont été introduits dans plusieurs hôtes bactériens et exposés à diverses molécules sur un milieu solide de façon à permettre la diffusion de la molécule testée et la génération de gradients de concentrations à la manière d'un antibiogramme. Le principe est simple, si une molécule induit la réponse SOS, alors SetR va lever la répression exercée sur le promoteur P_{s086} , ce qui va permettre l'expression des gènes *luxCDABE* et donc l'émission de luminescence. En pratique, l'expression de luminescence peut être observée et mesurée grâce à une caméra CCD à haute sensibilité, ce qui permet de calculer les facteurs d'induction de chacune de ces molécules sur l'activité du promoteur P_{s086} . Cependant, cette méthode ne permet de définir ni la concentration d'intérêt, ni de déterminer si l'élément peut être réellement transféré dans ces conditions. Des expériences complémentaires ont donc été réalisées *in vitro* afin de déterminer la concentration permettant d'obtenir l'induction maximale de l'élément et son maximum de transfert. La dissémination de l'ICE SXT^{MO10} a été suivie grâce à la méthode développée par Merlin *et al* (Merlin *et al.*, 2011) et déjà présentée dans la partie §3 (Figure 15). Nous avons évalué l'effet de la nature de la bactérie hôte sur la dissémination de SXT^{MO10} *in vitro*, puis nous avons

étudié l'effet de la nature de la bactérie hôte et d'un antibiotique inducteur sur la dissémination de SXT^{MO10} dans une matrice environnementale.

MATERIELS ET METHODES

1. SOUCHES BACTERIENNES ET CONDITIONS DE CULTURE

Les souches et plasmides utilisés au cours de ce travail, ainsi que leurs caractéristiques sont décrites dans le Tableau 5. Les cultures d'*Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Aeromonas hydrophila* ont été réalisées en aérobie en milieu de culture LB ou « Lysogeny Broth » (LB-Miller, Difco™), ou parfois PY ou « Peptone Yeast extract » pour *P. mirabilis* quand c'était indiqué. Le milieu SOC « Super Optimal avec répression Catabolique » a également été utilisé lors d'électroporations. De l'agar a été ajouté à 15 g/L pour les cultures sur milieu solide. Les milieux ont tous été préalablement stérilisés par autoclavage pendant 15 min à 120°C. Le milieu LB se compose de : 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 10 g/L de NaCl dissous dans de l'eau distillée (Sambrook et al., 1989). Le milieu PY se compose de : 10 g/L de tryptone, 5 g/L d'extrait de levure et 0,1 g/L de NaCl dissous dans de l'eau distillée. Et enfin, le milieu SOC est composé de 2% de bacto tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl₂ et 0,036603 g/L de glucose.

Tableau 5 : Souches et plasmides

Nom	Caractéristiques / Génotype	Référence
<i>Escherichia coli</i>		
CM53	MG1655 ; dérivée de F ⁻ λ ⁻ d' <i>E. coli</i> K12	(Blattner <i>et al.</i> , 1997)
CM56	EDCM367 = MG1655Δ <i>lacZY</i>	(Merlin <i>et al.</i> , 2002)
CM305	MM293/pRK2013 [Gen ^S]	P. Billard (LIEC, Nancy)
CM307	MM293 : F ⁻ , <i>glnX44</i> (AS), λ ⁻ , <i>endA1</i> , <i>thiE1</i> , <i>hsdR19</i> CC118 λpir (pTNS1) [Gen ^S , Amp ^R]	(Choi <i>et al.</i> , 2005)
CM644	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{dsbC-3}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM408	MG1656 = MG1655Δ <i>lacZ</i>	(Espéli, Moulin and Bocard, 2001)
CM413	β2150 ; <i>dapA</i> ::(<i>erm-pir</i>), <i>thrB1004</i> , <i>pro</i> , <i>thi</i> , <i>strA</i> , <i>hsdS</i> , <i>lacZ</i> ΔM15 (F ['] <i>lacZ</i> ΔM15, <i>laclq</i> , <i>traD36</i> , <i>proA</i> ⁺ , <i>proB</i> ⁺). [Ery ^R , Str ^R]	(Demarre <i>et al.</i> , 2005)
CM415	MFD <i>pir</i> [Ery ^R , DAP ⁻]	(Ferrières <i>et al.</i> , 2010)
CM447	GGB1984 [Kan ^R] Possède pSEVA236	C. Beloin, Institut Pasteur
CM527	MG1656::SXT ^{MO10} [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM537	MG1656(pSEVA236::P _{traF}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)

CM541	MG1656(pSEVA236::P _{s085}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM630	MG1656(pSEVA236::P _{setR}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM632	MG1656(pSEVA236::P _{s089}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM636	MG1656::SXT ^{MO10} pSEVA236::P _{s075}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM640	MG1656(pSEVA236::P _{dsbC-2}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM644	MG1656(pSEVA236::P _{dsbC-3}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM654	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{s0685}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM656	MG1656(pSEVA236::P _{traF}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM660	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{dsbC-1}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM662	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{dsbC-2}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM671	MG1656(pSEVA236::P _{s075}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM673	MG1656(pSEVA236::P _{s063}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM677	MG1656(pSEVA236::P _{dsbC-1}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM678	MG1656(pSEVA236::P _{traI}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM681	MG1656(pSEVA236::P _{tnp}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM682	MG1656(pSEVA236::P _{traD}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM686	MG1656(pSEVA236::P _{s044}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM690	MG1656(pSEVA236::P _{mosA}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM692	MG1656(pSEVA236::P _{s003}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM696	MG1656(pSEVA236::P _{xis}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM700	MG1656(pSEVA236::P _{mobI}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM714	MG1656(pSEVA236::P _{traN}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM716	MG1656(pSEVA236::P _{int}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM718	MG1656(pSEVA236::P _{tnpB}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM720	MG1656(pSEVA236::P _{s002}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM722	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{setR}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM724	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{traF}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM726	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{mobI}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM728	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{int}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM730	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{s003}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM734	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{mosA}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM736	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{s044}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM739	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{xis}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM741	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{traD}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM747	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{traI}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM749	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{s063}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM763	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{traN}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM863	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{tnpB}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM994	MG1656(pSEVA236::P _{s086}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM996	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{s086}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1055	EC101 (pG+host9) [Ery ^R], 30°C	(Maguin <i>et al.</i> , 1992)
CM1105	MG1656(pSEVA236::PJ102) (force 0,86) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1107	MG1656(pSEVA236::PJ105)	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)

	(force 0,24) [Kan ^R]	
CM1109	MG1656(pSEVA236::PJ107) (force 0,36) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1111	MG1656(pSEVA236::PJ115) (force 0,15) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1113	MG1656(pSEVA236::PJ117) (force 0,06) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1115	MG1656(pSEVA236::PJ118) (force 0,56) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1117	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ102) (force 0,86) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1118	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ117) (force 0,06) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1119	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ105) (force 0,24) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1121	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ107) (force 0,36) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1122	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ118) (force 0,56) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1123	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ115) (force 0,15) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1272	MG1656::SXT ^{MO10} -tagpB10 [Chl ^R , Tet ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1278	CM56 (pG+host9) ; 30°C	LCPME (UL/CNRS)
CM1280	MG1656(pSEVA236::P _{trav}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1282	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{trav}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1284	MG1656(pSEVA236::P _{traL-2}) [Kan ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1286	MG1656::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{traL-2}) [Kan ^R , Chl ^R]	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
CM1295	MG1655ΔlacZY::SXT ^{MO10} -tagpB10 [Tet ^R , Chl ^R]	Ce travail
CM1366	MG1656::SXT ^{MO10} -tagpB10 (dérivée Cip ^R de CM1272) [Tet ^R , Chl ^R , Cip ^R]	Ce travail
CM1441	MG1656::SXT ^{MO10} -tagpB10 (pSEVA236 ::P _{s086}) [Tet ^R , Chl ^R , Cip ^R , Kan ^R]	Ce travail
CM1448	CM415(pSEVA236) [DAP ⁻ , Ery ^R , Kan ^R]	Ce travail
CM1449	CM415(pSEVA236::p _{s086}) [DAP ⁻ , Ery ^R , Kan ^R]	Ce travail
CM1465	CM413::SXT ^{MO10} -tagpB10 [DAP ⁻ , Chl ^R , Tet ^R]	Ce travail
CM1466	CM413::SXT ^{MO10} [DAP ⁻ , Chl ^R]	Ce travail
CM2051	CC118 λpir (pTn7-M)	(Zobel <i>et al.</i> , 2015)
TOP10	Chimio compétentes. F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1 nupG</i>	Thermofisher
<i>Aeromonas hydrophila</i>		
CM1452	ATCC7966	(Seshadri <i>et al.</i> , 2006)
CM1482	ATCC7966::SXT ^{MO10} [Chl ^R , Tet ^R]	Ce travail
CM1738	ATCC7966::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{s086}) [Chl ^R , Tet ^R , Kan ^R]	Ce travail
<i>Proteus mirabilis</i>		
CM1447	H14320	(Pearson <i>et al.</i> , 2008)
CM1450	BB2000	(Sullivan <i>et al.</i> , 2013)
CM1701	H14320::SXT (peut-être hybride entre le SXT ^{endogène} et SXT ^{MO10}) [Chl ^R]	Ce travail
CM1702	BB2000::SXT ^{MO10} [Chl ^R]	Ce travail

CM1732	H14320 :: SXT(pSEVA236::P _{s086})	Ce travail
CM1734	BB2000::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{s086}) [Chl ^R , Kan ^R]	Ce travail
CM1861	BB2000::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ23102) [Chl ^R , Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM1863	BB2000::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ23105) [Chl ^R , Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM1865	BB2000::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ23107) [Chl ^R , Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM1867	BB2000::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ23115) [Chl ^R , Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM1869	BB2000::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ23117) [Chl ^R , Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM1870	BB2000::SXT ^{MO10} (pSEVA236::PJ23118) [Chl ^R , Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM1917	BB2000 (pSEVA236::PJ23102) [Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM1920	BB2000 (pSEVA236::PJ23105) [Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM1922	BB2000 (pSEVA236::PJ23107) [Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM1924	BB2000 (pSEVA236::PJ23115) [Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM1926	BB2000 (pSEVA236::PJ23117) [Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM1928	BB2000 (pSEVA236::PJ23118) [Kan ^R]	LCPME (UL/CNRS)
CM2055	BB2000::mini-Tn7 [Gen ^R]	Ce travail
CM2057	BB2000::mini-Tn7::SXT ^{MO10} -tagpB10 [Gen ^R , Tet ^R , Chl ^R]	Ce travail
<i>Vibrio cholerae</i>		
CM1443	N16961-hapR ⁺ (<i>hapR</i> corrigé par rapport au type sauvage défectueux)	D. Mazel, Institut Pasteur
CM1444	N16961-hapR ^{WT} type sauvage (<i>hapR</i> défectueux)	D. Mazel, Institut Pasteur
CM1479	N16961-hapR ⁺ ::SXT ^{MO10} [Chl ^R]	Ce travail
CM1595	N16961-hapR ^{WT} ::SXT ^{MO10} [Chl ^R]	Ce travail
CM1736	N16961-hapR ⁺ ::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{s086}) [Chl ^R , Kan ^R]	Ce travail
CM1740	N16961-hapRWT::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{s086}) [Chl ^R , Kan ^R]	Ce travail
<i>Vibrio vulnificus</i>		
CM1445	type sauvage	D. Mazel, Institut Pasteur
CM1597	CM1445::SXT ^{MO10} [Chl ^R]	Ce travail
CM1744	CM1455::SXT ^{MO10} (pSEVA236::P _{s086}) [Chl ^R , Kan ^R]	Ce travail
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		
CM1446	Type sauvage	D. Mazel, Institut Pasteur
CM1599	CM1446::SXT ^{MO10} [Chl ^R]	Ce travail
Plasmides		
pBELX1	Plasmide dérivé du vecteur pEX-A contenant les fragments ciblés pour la détection par qPCR du plasmide pB10, de la bactérie DH5α des plasmides IncPa,β et du gène de l'ARNr 16S, AmpR	(Bellanger, Guilloteau, Breuil, <i>et al.</i> , 2014)
pBELX2	Plasmide dérivé du vecteur pUC57 contenant notamment les fragments ciblés pour la détection par qPCR des ICE SXT/R391, de la délétion <i>lacZY</i> créée chez EDCM367 et du gène de l'ARNr 16S, AmpR	(Veronica L. Roman <i>et al.</i> , 2021a)
pG ⁺ host9	Plasmide thermosensible. Marqueur de résistance à l'érythromycine.	(Maguin <i>et al.</i> , 1992)

pNORM1	Plasmide dérivé du vecteur pEX-A2 contenant notamment les fragments ciblés pour la détection par qPCR des intégrons ce classe 1 et du gène de l'ARNr 16S, Amp ^R	(Rocha <i>et al.</i> , 2020)
pRK2013	Plasmide « helper » pour la mobilisation. [Gm ^S]	P. Billard (LIEC, Nancy)
pSEVA23 6	Plasmide rapporteur portant les gènes <i>luxCDABE</i> sans promoteur et situés en aval d'un site multiple de clonage, Kan ^R	(Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013)
pTN7-M	Plasmide suicide vecteur du mini-Tn7. [Km ^R , Gm ^R]	(Zobel <i>et al.</i> , 2015)
pTNS1	Plasmide permettant l'expression de la transposase du transposon Tn7	(Choi <i>et al.</i> , 2005)

2. DETERMINATION DE CMI EN MILIEU LIQUIDE

Cinquante mL de LB ou PY ont été inoculés avec une colonie de la souche d'intérêt prélevée sur boîte sélective puis placés à 37°C sous agitation pendant 16 h. La culture a ensuite été utilisée pour ensemercer un tube à essai (5 µL par tube) contenant 5 mL de LB ou PY et différentes concentrations d'antibiotique préparés fraîchement le jour même. Le tout a été incubé à 30°C sans agitation pendant 24 h et les résultats ont été lus visuellement par apparition ou non d'une turbidité. Les mesures ont été réalisées en triplicata.

3. EXTRACTION DE PLASMIDES ET PURIFICATION DE PRODUITS DE PCR

Les extractions de plasmides ont été réalisées grâce au kit « Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System » de Promega en suivant les recommandations du fabricant. Les étapes d'élution sont réalisées avec un volume d'eau DNA-RNA free (qualité PCR, Qiagen) à la place du tampon fourni dans les kits. Les purifications de produits PCR ont été réalisées grâce au kit « Monarch PCR & DNA Clean up » de New England Biolabs en suivant les recommandations du fabricant.

4. EXTRACTION ET PURIFICATION D'ADN GENOMIQUE

4.1. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE A PARTIR D'UNE CULTURE PURE

Les extractions ont été réalisées en utilisant le kit « Wizard genomic purification » (Promega), en suivant les recommandations du fabricant.

4.2. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE DE COMMUNAUTES BACTERIENNES

Dans ce travail, l'ADN génomique de divers échantillons (eau, sédiments de rivière, biofilms, poissons) a été extrait par diverses méthodes afin de comparer les rendements et étudier la présence d'inhibiteurs de PCR :

4.2.1. LE KIT « DNEASY POWERWATER » (QIAGEN)

Cinquante mg de biofilm ou de sédiments, ou 100 mg de poisson, conservés à -80°C ont été dispersés dans 100 mL d'eau apyrogène (AquaBraun) par une agitation vigoureuse de 1 min au vortex, suivie d'une agitation modérée de 15 min au bain marie (25°C, 160 rpm). Le tout a été filtré sur une membrane « Nucleopore Track-Etch » de porosité 0,2 µm (Whatman) et les filtres ont été conservés à -20°C jusqu'à extraction des ADN. Pour les échantillons d'eau, 100 mL ont été directement filtrés sur la membrane « Nucleopore Track-Etch ». Les extractions d'ADN total ont été réalisées grâce au kit « DNeasy PowerWater » (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur, à la différence près que les ADN ont été élués dans 100 µL d'eau qualité PCR exempt de contaminant ADN (RNAse Free, QIAGEN) à la place de la solution d'éluion PW6 proposée dans le kit.

4.2.2. LE KIT « DNEASY POWERSOIL » (QIAGEN)

Les extractions d'ADN total ont été réalisées à partir de 250 mg d'échantillon grâce au kit « DNeasy PowerSoil » (Qiagen) et en suivant les recommandations du fournisseur, à la différence près que les ADN sont élués dans 100 µL d'eau qualité PCR exempt de contaminant ADN (RNAse Free, QIAGEN).

4.2.3. METHODE ADAPTEE DE PORTEOUS ET AL

Le protocole adapté de Porteous *et al.* (Porteous, Seidler and Watrud, 1997) par Bonot *et al.*, (Bonot *et al.*, 2010) est le suivant : 500 mg de l'échantillon sont mélangés

avec 925 μL de tampon de lyse SDS (chlorure de sodium (NaCl) 0,25 M, acide éthylènediaminetétracétique disodique (Na_2EDTA) 0,1 M, sodium dodécyl sulfate (SDS) 4%) et 75 μL de guanidine isothiocyanate 4 M. Les échantillons sont homogénéisés à l'aide d'un vortex pendant 1 min, soniqués à 180 W pendant 2 min dans un bain à ultrasons (Transsonic Digital) et incubés pendant 90 minutes à 68°C. L'extrait est ensuite centrifugé à 13000 $\times g$ pendant 15 min à 4°C et 600 μL de surnageant sont récupérés. L'échantillon est précipité par ajout de 75 μL d'acétate de potassium 5 M et 250 μL de polyéthylène glycol 8000 50% au surnageant. Le mélange est homogénéisé par retournements et précipité par incubation pendant 1 h à -20°C. Le précipité est culoté par centrifugation à 13000 $\times g$ pendant 15 min à 4°C. Le culot est suspendu dans 900 μL de CTAB $\times 2$ (hexadecyltrimethylammonium bromide 2%, NaCl 1,4 M, Na_2EDTA 0,1 M), soniqué 1 min à 180 W et incubé 15 min à 68°C. Un volume de 900 μL de chloroforme est ajouté, et l'échantillon est mélangé par retournements. La phase aqueuse est séparée par centrifugation à 13000 $\times g$ pendant 10 min à température ambiante. L'ADN est précipité pendant 25 minutes à -20°C après ajout de 1 mL d'isopropanol. L'ADN est concentré par centrifugation à 13000 $\times g$ pendant 15 min à 4°C. Le culot d'ADN est dissous dans 450 μL d'acétate d'ammonium 2,5 M et précipité par ajout de 1 mL d'éthanol 95% et incubation 25 min à -20°C. L'ADN est culoté par centrifugation à 13000 $\times g$ pendant 15 min à 4°C puis resuspendu dans 450 μL de tampon TAE $\times 1$ (Tris acétate 0,04 M (pH 8,0), Na_2EDTA 0,001 M). Les impuretés résiduelles sont éliminées par filtration sur colonne de microconcentration Microcon-100 (Amicon, Beverly, Massachusetts, USA) par deux lavages successifs avec 450 μL de tampon TAE $\times 1$ et un lavage avec 450 μL de tampon TE $\times 1$ (Tris HCl 0,01 M (pH 8,0), Na_2EDTA 0,001 M). La colonne est inversée et l'ADN est élué avec 100 μL de tampon TE $\times 1$ par centrifugation à 500 $\times g$ pendant 5 minutes à température ambiante.

5. ÉVALUATION DE LA CONCENTRATION ET DE LA PURETE DES ADN EXTRAITS

La concentration et la pureté des ADN ont été déterminées par spectrophotométrie UV. La concentration d'ADN est estimée par mesure à 260 nm où une unité d'absorbance en UV correspond à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ d'ADN double brin. La présence d'éventuelles contaminations co-extraites avec l'ADN, a été évaluée par des mesures

à 230 nm qui permettent d'estimer la présence de produits de dégradation des protéines (peptides), hydrates de carbone, substances humiques, molécules aromatiques (ex : phénol souvent utilisé en technique classique d'extraction) de sels et la persistance d'éthanol. Le rapport $A_{260\text{nm}} / A_{230\text{nm}}$ doit être environ égal à 2 pour relater un bon niveau de pureté. Plus ce rapport est bas, plus la présence de contaminants, notamment les substances humiques, est avérée en des concentrations élevées dans les échantillons. L'absorbance à 280 nm permet d'estimer une contamination en protéines. Le rapport $A_{260\text{nm}} / A_{230\text{nm}}$ doit être compris entre 1,8 et 2. Un rapport inférieur à 1,8 est le signe d'une contamination par les protéines. Un rapport supérieur à 2 est le signe d'une contamination par des ARN.

6. ÉLECTROPHORESE DE L'ADN

Lorsque cela s'est avéré nécessaire, les produits d'amplification obtenus par PCR ont été analysés par une électrophorèse en gel d'agarose 1 à 2% (selon la taille des fragments à visualiser) en tampon TAE $\times 1$ (40 mM Tris- Acétate, 1 mM EDTA). Pour chaque électrophorèse, les marqueurs de poids moléculaire 2-log DNA ladder (0,1-10 kb) ou 50 pb DNA ladder (BioLabs) ont été utilisés comme standard pour estimer la taille des fragments séparés. Après électrophorèse, les ADN ont été colorés par trempage dans un bain de bromure d'éthidium (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pendant 15 min, puis visualisés sous rayonnement UV (à 365 nm) et photographiés grâce à un Gel DocTM XR+ System (Bio-Rad).

7. CONJUGAISON BACTERIENNE

7.1. CONJUGAISON BACTERIENNE SUR FILTRE

Les bactéries donneuses et receveuses ont été cultivées séparément pendant 16 h \pm 2 h à 30°C et sans agitation, dans 5 mL de milieu LB (ou PY). Vingt mL de LB (PY), avec ou sans antibiotique inducteur, ont étéensemencés au $1/10^{\text{ème}}$ avec ces cultures, puis incubés 3 h à 30°C. Douze mL des cultures de bactéries donneuses ont été lavés par centrifugation (5 min à 3000 $\times g$) pour éliminer l'antibiotique puis les culots cellulaires ont été repris en milieu. La DO_{600} des suspensions cellulaires a alors été mesurée et les suspensions ont été diluées avant mélange afin d'obtenir la même densité bactérienne de souches donatrices et réceptrices ($\text{DO}_{600} \approx 1$). Le mélange a

été filtré sur membrane de nitrate de cellulose de 0,45 µm de porosité (Sartorius Stedim Biotech). Les filtres ont été déposés sur LB (PY) gélosé (préchauffé à 30°C) puis incubés 2 h à 30°C à l'issue de quoi les bactéries du filtre ont été dispersées dans 10 mL de LB (PY) par une agitation de 30 s au vortex. La suspension bactérienne a été diluée en cascade et 100 µL des dilutions 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} et 10^{-8} ont été étalés sur du milieu LB supplémenté en antibiotiques pour la sélection des donneuses et les receveuses. Enfin 100 µL des dilutions 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} ont été étalés sur du LB (PY obligatoire pour *P. mirabilis*) contenant les deux antibiotiques afin de sélectionner les transconjugants. Les boîtes ont été placées à 37°C pendant 24 h à l'issue de quoi les UFC ont été dénombrées.

7.2. CONJUGAISON BACTERIENNE SUR BOITE

Les bactéries donneuses et receveuses, ont été respectivement cultivées dans 2 mL du milieu LB ou PY (supplémenté en DAP à 0,3 mM quand nécessaire), pendant 16h à 37°C sous agitation (160 rpm). Cinquante µL de chaque culture ont été mélangés sur milieu LB ou PY (supplémenté en DAP à 0,3 mM quand nécessaire). Des contrôles ont été réalisés avec la culture donneuse ou la culture receveuse seules. Les boîtes ont été incubées pendant 24 h à 37°C, puis les cellules ont été remises en suspension dans 1 mL de MgSO₄ 10 mM, diluées en série dans le même tampon et étalées sur milieu sélectif LB ou PY, supplémentés avec les antibiotiques adéquats.

8. ELECTROTRANSFORMATION

Afin de préparer des bactéries électrocompétentes, une culture bactérienne a été réalisée à 37°C sous agitation (160 rpm) dans du milieu LB, supplémenté avec du DAP à 0,3 mM quand nécessaire, jusqu'à DO₆₀₀ = 0,5. La culture a ensuite été refroidie sur glace pendant 10 min, puis toutes les étapes ont été réalisées à 4°C et/ou avec des solutions préalablement refroidies à 4°C. Cent mL de culture ont été centrifugés à 4°C pendant 15 min à 3214 × g. Le culot cellulaire a été repris dans 1 volume d'eau ultra pure stérile, et centrifugé à nouveau pendant 15 min à 3214 × g. Le lavage du culot cellulaire a été répété une fois encore et celui-ci a été repris dans 10 mL de glycérol 10 % stérile. La suspension a été centrifugée une dernière fois pendant 15 min à 3214 × g. Le surnageant a été éliminé, et les cellules concentrées dans un volume final de 300 µL de glycérol 10% stérile.

Cent ng de plasmide et 40 μ L de suspension de cellules électrocompétentes ont été mélangés délicatement et déposés dans une cuvette d'électroporation de 0,2 cm de large maintenue à 4°C. L'électrotransformation a été réalisée à l'aide d'un « Gene Pulser » (Biorad) avec les paramètres suivants : 25 μ F, 200 Ω et 2,5 kV. Après électroporation, les cellules ont été reprises dans 1 mL de milieu SOC et incubées à 37°C pendant 1h sous agitation. Des dilutions en cascades ont ensuite été réalisées avec du MgSO₄ 10 mM et étalées (100 μ L par dilution) sur milieu LB, supplémenté en antibiotiques et/ou en DAP à 0,3 mM quand nécessaire. Les milieux ont été incubés à 37°C.

9. CONSTRUCTION DE SOUCHES BACTERIENNES

9.1. *E. COLI* MG1655 Δ LACZY::SXT^{MO10}-TAGPB10 DONNEUSE POUR LES TRANSFERTS EN MICROCOSMES

Dans un premier temps, le plasmide pG+host9 (Ery^R) a été extrait de la souche CM1055 grâce au kit « Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System » de Promega (§2), puis introduit par électroporation dans *E. coli* MG1655 Δ lacZY (ou CM56). Dix mL de CM56(pG+host9) et *E. coli* MG1656::SXT^{MO10}-tagpB10 (CM1272, Tet^R) ont été cultivés séparément en milieu LB pendant 8 h \pm 2 h à 30°C sous agitation (160 rpm), puis 10 μ L de chaque culture ont été déposés sur LB et incubés 16 h \pm 2 h à 30°C. Le lendemain, des transconjugants ont été isolés par stries sur LB supplémenté en d'erythromycine (150 μ g/mL) et tétracycline (20 μ g/mL), après 16 h \pm 2 h d'incubation à 30°C. Après purification, les clones CM56::SXT^{MO10}-tagpB10 (pG+host9) ont été cultivés sur milieu sélectif LB supplémentés en tétracycline et à 37°C pour les curer du plasmide plasmide pG+host9 (incapables de se répliquer à 37°C). Une PCR sur colonies a été réalisée afin de confirmer la présence du « tagpB10 » dans la souche dérivée de CM56. Pour cela, une colonie a été resuspendue dans 200 μ L d'eau qualité PCR et le tout a été porté à ébullition pendant 10 minutes. L'amplification du fragment Δ lacZY grâce aux amorces EDCM367-F et EDCM367-R (Tableau 7) a permis de confirmer la présence du marquage dans la souche dérivée de CM56, et donc la construction de *E. coli* MG1655 Δ lacZY::SXT^{MO10}-tagpB10 (CM1295).

9.2. P. MIRABILIS BB2000 ::MINI-TN7 ::SXT^{MO10}-TAGPB10 DONNEUSE POUR LES MICROCOSMES

La souche de *P. mirabilis* BB2000 (CM1450) a d'abord été marquée à l'aide d'un mini transposon Tn7 grâce à un croisement tétraparental entre : *E. coli* CC118 λ pir (pTn7-M) (ou CM2051) donneuse de mini-Tn7 (Gm^R), *P. mirabilis* BB2000 (Gm^S), la souche auxiliaire CM305 permettant la mobilisation en *trans* du plasmide pTn7-M et la souche auxiliaire CM307 pour apporter en *trans* les fonctions de transposition du mini-Tn7. Pour cela, quelques colonies de chaque souche ont été récupérés directement d'une culture en milieu solide et remis en suspension dans 100 μ L de MgSO₄ 10mM. Le mélange des 4 souches a été centrifugé pendant 1 minute à 10 000 \times g, et le culot a été étalé sur LB solide pendant 48 h à 37°C. Deux jours plus tard, les clones obtenus ont été striés sur LB gentamicine. L'ADNg des clones formant des colonies mobiles sur milieu de culture LB, signe qu'il s'agit de *P. mirabilis*, ont été extraits et l'insertion du mini-Tn7 dans le gène *glmS* de *P. mirabilis* BB2000 a été confirmée par PCR grâce aux amorces glmS-BB2000-F et fbpC-BB2000-R.

9.3. BIOSENSEURS LUMINESCENTS

L'ensemble des promoteurs utilisés dans cette étude sont listés dans le Tableau 6. Les promoteurs P_{xis} , P_{int} , P_{s002} , P_{s003} , P_{mobI} , P_{tnp} , P_{tnpB} , P_{traL} , P_{traD} , P_{s044} , P_{mosA} , P_{dsbC-3} , P_{dsbC-2} , P_{dsbC-1} , P_{trsF} , P_{traN} , P_{s063} , P_{s089} , P_{s075} , P_{traF} , P_{s085} , P_{setR} ont été synthétisés et clonés dans le plasmide pSEVA236 par Eurofins. Les promoteurs P_{traL-2} , P_{traV} and P_{s086} ont quant à eux été amplifiés directement à partir de la souche d'*Escherichia coli* MG1656::SXT^{MO10} avec la Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) en suivant les recommandations du fournisseur, et en utilisant respectivement les jeux d'amorces PtraL-SXT-up/PtraL-SXT-down, PtraV-SXT-up/PtraV-SXT-down et PS086EcoRIF/PS086PstIR (Tableau 7). Les amplicons ont été purifiés, digérés, puis insérés dans le plasmide pSEVA236 préalablement digéré par les mêmes enzymes de restriction et déphosphorylé. Les plasmides obtenus ont été transformés dans *E. coli* Top10 (Invitrogen), des cellules chimiocompétentes, puis sélectionnés sur LB supplémenté de kanamycine. Les promoteurs P_{J23102} , P_{J23105} , P_{J23107} , P_{J23115} , P_{J23117} , P_{J23118} ont été obtenus par hybridation d'amorces complémentaires contenant les séquences d'intérêt et flaquées avec les sites de restriction *EcoRI* and *XbaI* (Tableau 7 - J117F-EX/J117R-EX pour P_{J23117} , J115F-EX/J115R-EX P_{J23115} , J105F-EX/J105R-EX pour P_{J23105} , J107F-EX/J107R-EX pour

P_{J23107} , J118F-EX/J118R-EX pour P_{J23118} , J102F-EX/J102R-EX pour P_{J23102}). Une fois hybridées, les séquences des promoteurs de 35 pb ont été également intégrées dans le plasmide pSEVA236 comme précédemment. L'ensemble des fusions transcriptionnelles ont été introduites dans *E. coli* MG1656 and MG1656::SXT^{MO10} (Guilloteau *et al.*, 2021).

Pour les constructions de biosenseurs luminescents non *E. coli*, des cellules electrocompétentes d'*E. coli* MFDpir ont été préparées, et transformées comme indiqué dans le §8 « Electrotransformation » avec les plasmides pSEVA236 et les promoteurs utilisés dans cette étude, listés dans le Tableau 6 (Guilloteau *et al.*, 2021). Des conjugaisons bactériennes sur boîte ont été réalisées pour introduire les plasmides recombinants dérivés de pSEVA236 chez *A. hydrophila* ATCC7966 ::SXT^{MO10} (CM1482), *P. mirabilis* H13420 ::SXT^{end} (CM1701), *P. mirabilis* BB2000 (CM1450), *P. mirabilis* BB2000 ::SXT^{MO10} (CM1702), *V. cholerae* N16961-hapR⁺ ::SXT^{MO10} (CM1479), *V. cholerae* N1696-hapR^{WT} ::SXT^{MO10} (CM1595) et *V. vulnificus* CM1445 ::SXT^{MO10} (CM1597). Les clones obtenus ont été sélectionnés sur milieu LB ou PY supplémenté avec des antibiotiques, et vérifiés par détection de bioluminescence à la caméra CCD (Nighshade, Berthold). Les souches sont listées dans le Tableau 5.

Tableau 6 : Promoteurs utilisés dans cette étude.

Promoter identification			Sequence comparison		Cloning mode	
Designation	BPROM prediction	Mapped promoters (reference)	BPROM / Mapping match	BPROM / Mapping overlap	Sequence synthesis	PCR cloning
<i>SXT promoters</i>						
P _{xis}	+	(17)	(-)	+	+	
P _{int}	+		NA	NA	+	
P _{s002}	+		NA	NA	+	
P _{s003}	+	(17)	(-)	+	+	
P _{mobI}	+	(17)	(-)	+	+	
P _{tnp}	+		NA	NA	+	
P _{tnpB}	(-)		NA	NA	+	
P _{traI}	+	(17)	(-)	+	+	
P _{traD}	+	(17)	(-)	(-)	+	
P _{s044}	(-)	(22)	(-)	NA	+	
P _{s045}	+	(22)	+	+	(-)	
P _{traL-1}	+		NA	NA	(-)	
P _{traL-2}	(-)	(17)	(-)	+	(-)	+
P _{traV}	ND	(17)	NA	+	NA	+
P _{mosA}	+		NA	NA	+	
P _{dsbC-3}	+		NA	NA	+	
P _{dsbC-2}	+		NA	NA	+	
P _{dsbC-1}	+	(17)	(-)	+	+	
P _{trsF}	+		NA	NA	+	
P _{traN}	+		NA	NA	+	
P _{s063}	+	(17)	(-)	(-)	+	
P _{s089}	+	(17, 21)	(-)	+	+	
P _{s075}	+		NA	NA	+	
P _{traF}	+	(17)	(-)	+	+	
P _{s085}	+		NA	NA	+	
P _{s086}	+	(15)	+	+	(-)	+
P _{setR}	+	(15)	+	+	+	
<i>Constitutive promoters</i>						
P _{J102} (force 0.86)		(A)	NA	NA		+
P _{J105} (force 0.24)		(A)	NA	NA		+
P _{J107} (force 0.36)		(A)	NA	NA		+
P _{J115} (force 0.15)		(A)	NA	NA		+
P _{J117} (force 0.06)		(A)	NA	NA		+
P _{J118} (force 0.56)		(A)	NA	NA		+

(15) (Beaber and Waldor, 2004) ; (17) (Poulin-Laprade, Carraro and Burrus, 2015) ; (21) (Garriss, Poulin-Laprade and Burrus, 2013) ; (22) (Dziewit *et al.*, 2007). D'après Guilloteau et al, 2021. NA: not applicable; ND: not done; +: successful; (-): failed; (A) Anderson promoter collection, <http://parts.igem.org/Promoters/Catalog/Anderson>.

10. BIOESSAIS LUMINESCENTS POUR LE CRIBLAGE D'ANTIBIOTIQUES

Des cultures de biosenseurs ont été réalisées la veille dans un volume de 2 mL de milieu de culture LB ou PY, et incubées à 37°C pendant 16 h sous agitation. Un volume de 0,5 mL cette culture est mélangé à 5,5 mL de milieu LB ou PY puis ajoutés à 12 mL de Top Agar fluidifié (LB ou PY). Ce mélange a été coulé sur une boîte carrée de 12 x 12 cm contenant 45 mL de milieu LB ou PY gélifié puis laissé sur paillasse jusqu'à solidification du milieu. La boîte a été ensuite incubée à 30°C pendant 7 h après avoir reçu une sélection de 16 disques de cellulose chargés en antibiotiques (ciprofloxacine, acide nalixidique, norfloxacine, sulfonamide, triméthoprim, azithromycine, chloramphénicol, érythromycine, acide fusidique, tétracycline, céfépime, céfotaxime, imipémène, vancomycine, colistine, rifampicine). Après ces 7 h, une série de clichés a été réalisée à des temps d'exposition de 1 s, 10 s et 60 s à l'aide d'une caméra CCD (Nighshade, Berthold). Lorsqu'un antibiotique active un promoteur, un halo de luminescence est visible au-delà de la zone toxique de l'antibiotique. Les données de luminescence encodées dans chaque pixel de l'image sont extraites et traitées à l'aide d'un logiciel développé spécifiquement dans ce but par un collaborateur, Cédric PRADALIER (GeorgiaTech Lorraine).

11. MESURE DE L'ACTIVITE DE BIOSENSEURS LUMINESCENTS

L'influence de la ciprofloxacine sur l'expression du promoteur P_{s086} a été évaluée à l'aide de la souche CM996 (*E. coli* MG1656::SXT^{MO10} (pSEVA236::P_{s086})) possédant une fusion transcriptionnelle entre ce promoteur et les gènes de luminescence *luxCDABE*. La veille, la souche CM996 a été cultivée dans 3 mL de LB à 30°C sans agitation pendant 16 h avant d'être diluée au 1/10ème dans 15 mL de LB préchauffé à 30°C. Une solution mère de ciprofloxacine fraîchement préparée a été utilisée pour réaliser une gamme de dilutions en eau ultra-pure qui a été ensuite déposée en microplaque noire à fond transparent (Perkin Elmer) selon le plan de plaque présenté en Figure 17 (5 µL par puits). Cent quatre-vingt-quinze µL de culture diluée ont alors été déposés dans chaque puits et l'ensemble a été incubé à 30°C. La DO₆₀₀ et la luminescence ont été mesurées à l'aide d'un lecteur de microplaque « Victor3 1420 multilabel Counter » (Perkin Elmer) après 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h et 24 h d'incubation et où chaque mesure a été précédée d'une agitation à double orbitale de 10 s. Les

données obtenues ont été collectées sous forme d'un tableau au format Excel. Dans un premier temps, une série de mesures réalisées sur des échantillons sans cellule (milieu seul) a permis de corriger l'ensemble des valeurs obtenues en retranchant la valeur d'un blanc de DO₆₀₀ ou de luminescence. Ensuite, les données de luminescence ont été normalisées à la biomasse en divisant les luminescences corrigées par les DO₆₀₀ corrigées correspondantes. Enfin, un facteur d'induction a été déterminé grâce au rapport entre la luminescence normalisée des bactéries traitées par un antibiotique et celle des bactéries non traitées. Les mesures ont été réalisées 3 fois en duplicata technique (6 séries de mesure au total).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Culture sans ab	LB
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		
C	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
D	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
F	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	Culture sans ab	LB
H	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22		

Figure 17 : Plan de plaque pour 2 répétitions pour la mesure de l'activité de 2 biosenseurs luminescents en parallèle (rose vs bleu). Les numéros 1 à 22 correspondent à des concentrations décroissantes d'antibiotique (1 le plus concentré ; 22 le moins concentré).

12. CYTOMETRIE EN FLUX

L'intensité de la fluorescence des bactéries marquées avec du SYBR Green I Nucleic Acid Gel Stain (S756γ, Invitrogen, France) à la concentration finale de $\times 1$ pendant 15 minutes à l'obscurité, a été mesurée grâce au cytomètre en flux BD AccuriTM C6 (BD Biosciences, USA) équipé avec deux laser (un bleu à 488 nm et un vert à 552 nm). La mesure de la lumière diffractée en face du rayon laser permet d'évaluer la taille des cellules (paramètre FSC), et la lumière mesurée de côté permet d'évaluer la granularité. Les données ont été analysées grâce au logiciel BD AccuriTM C6 (BD Biosciences).

13. AMORCES ET SONDES

13.1. AMORCES ET SONDES UTILISEES DANS CE TRAVAIL

Tableau 7 : Amorces et sondes

NOM	SEQUENCE	CIBLE	REFERENCE
338F	CCTACGGGAGGCAGCAG	gène d'ARNr 16S	(Muyzer, de Waal and Uitterlinden, 1993)
518R	ATTACCGCGGCTGCTGG		
806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT	EpicPCR (R3)	(Tremblay <i>et al.</i> , 2015)
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT	EpicPCR (R2)	(Lane, 1991)
BB2000-1	TCTCTCGCGGGTTTCTTTTA	Quantification donneuse <i>P.</i> <i>mirabilis</i>	Ce travail
BB2000-2	CTAGCTGAAATCATGCAAGGTA		
BB2000-P	(FAM)5'-TCGAACCTGTGACCTACGGC- 3'(BHQ1)	BB2000 (186 pb)	
BB2000-tag- down	GGGGTGGAAATGGAGTTTTT	Quantification "tag mini-Tn7"	Ce travail
BB2000-tag- probe	GCTACACCCAGTTCCCATCT		
BB2000- MTn7-up	CTGTTGTTTGTCCGGTGAACG		
BP-Reverse	TTTTTTTTTTGWATTACCGCGGCKGCT G/3SpC3/	U519R-block10 epiPCR	(Spencer <i>et al.</i> , 2016)
BP-Forward	TTTTTTTTTTCAGCMGCCGCGGTAATW C/3SpC3/	U519F-block10 epicPCR	
EDCM367-F	GACAGGTTTCCCGACTGG	Quantification de la cible	Ce travail
EDCM367-R	CGACTTCATTCACCTGACGA		
EDCM367-P	(FAM)5'-CCGCTTGAACGGGCTCACT- 3'(TAMRA)	Δ lacZY (83 pb)	
glmS-BB2000- F	ATCAGGATCCAGCCTTTACAACGCAAC TGG	PCR pour confirmer	Ce travail
fbpC-BB2000- R	ATCAGGATCCGGGAAGGTGTGAGAT GTTG	l'insertion du mini-Tn7 dans le gène <i>glmS</i> de <i>P.</i> <i>mirabilis</i>	
J117F-EX	aattcTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGG GATTGTGCTAGct	J23117 (0.06)	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)

J117R-EX	ctagaGCTAGCACAATCCCTAGGACTGA GCTAGCTGTCAA _g		
J115F-EX	aattcTTTATAGCTAGCTCAGCCCTTGGT ACAATGCTAGC _t		
J115R-EX	ctagaGCTAGCATTGTACCAAGGGCTGA GCTAGCTATAAA _g	J23115 (0.15)	
J105F-EX	aattcTTTACGGCTAGCTCAGTCCTAGGT ACTATGCTAGC _t		
J105R-EX	ctagaGCTAGCATAGTACCTAGGACTGA GCTAGCCGTAAA _g	J23105 (0.24)	
J107F-EX	aattcTTTACGGCTAGCTCAGCCCTAGG TATTATGCTAGC _t		
J107R-EX	ctagaGCTAGCATAATACCTAGGGCTGA GCTAGCCGTAAA _g	J23107 (0.36)	
J118F-EX	aattcTTGACGGCTAGCTCAGTCCTAGG TATTGTGCTAGC _t		
J118R-EX	ctagaGCTAGCACAATACCTAGGACTGA GCTAGCCGTCAA _g	J23118 (0.56)	
J102F-EX	aattcTTGACAGCTAGCTCAGTCCTAGG TACTGTGCTAGC _t		
J102R-EX	ctagaGCTAGCACAGTACCTAGGACTGA GCTAGCTGTCAA _g	J23102 (0.86)	
intl1LC5	GATCGGTCGAATGCGTGT	<i>intl1</i> (integrons	(Barraud <i>et al.</i> ,
intl1LC1	GCCTTGATGTTACCCGAGAG	de classe 1)	2010)
intSXT-1	TGAAAAACAATTTTGCCCTTG	qPCR	
intSXT-2	ATCAGTTAGCTGGCTCGATG	abondance de	
intSXT-p	(FAM) 5'-CWGRTCRGCTTTTACTACG- 3' (TAMRA)	SXT; cible = gène int ; produit de 114 pb	Ce travail
Illum_785R_1	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCT TCCGATCTGACTACHVGGGTATCTAAT CC		
Illum_785R_2	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCT TCCGATCTaGACTACHVGGGTATCTAA TCC	EpicPCR (R3) avec adaptateur Illumina TruSeq	(Hultman <i>et al.</i> , 2018)
Illum_785R_3	TGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTTC CGATCTtctGACTACHVGGGTATCTAAT CC		

Illum_785R_4	GTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCT TCCGATCTctgagtgGACTACHVGGGTAT CTAATCC		
PtraL-SXT-up	aaaaggatccATTTTGGGTGGCATATCGA G	Fragment de 350 pb du promoteur P _{traL}	
PtraL-SXT-down	aaaaaagcttACAGAATGGGAGCCATCTC A		
PtraV-SXT-up	aaaaggatccAGGTAGACGCTGCAAGGAA A	Fragment de 279 pb du promoteur P _{traV}	(Guilloteau <i>et al.</i> , 2021)
PtraV-SXT-down	aaaaaagcttGAGCCGACTGCCAATAAAA G		
PS086EcoRIF	cgcgaattcACCCAGTAAGCTGCAAGG	Fragment de	
PS086PstIR	cgctgcagAAGTCAATGGCACGGCGGA	234 pb du promoteur P _{s086}	
SXT-3_comp-inv-Illumina	ATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCT CTTCCGATCTMGCTCTRAATCGGTTRG GTA	EpicPCR (F3) avec adaptateur Illumina TruSeq	Ce travail
Tag-pB10_SXT-up	CATGAAAATCGTACCGGTACCCGCT GGCGTCTGCCGACCAAAGCGCTATC AACTGGTCTGTGGTGGTG	Marquage de SXT ^{MO10} par un fragment de pB10 (cible	
Tag-pB10_SXT-down	ACCCAGGAGCAGCTCAGCCGGTGGC GCCCGGCTTTCCGGTAACGCCCTGGT GAGTGCCTTCAAATCATC	qPCR+déterminant TetR) ; produit de PCR de 3519 pb	Ce travail
traB _{SXT} -1	CTGCATTRCTGAGGATTCAA	<i>Quantification</i>	
traB _{SXT} -2	CGGCGATCAAGAAACTCT	<i>de la cible "traB"</i>	Ce travail
traB _{SXT} -p	TACCYAACCGATTYAGAGCK	<i>(81 pb)</i>	
traB _{SXT} -1_519R	GWATTACCGCGGCKGCTGCTGCATTR CTGAGGATTCAA	EpicPCR (F2'- R1)	Ce travail
traB _{SXT} -3_comp-inv	MGCTCTRAATCGGTTRGGTA	EpicPCR (F3)	Ce travail
Tn1-in	CAATACCGAAGAAAGCATGCG	<i>Quantification</i>	
Tn out-1	AGATATGGGTATAGAACAGCCGTCC	<i>de la cible</i>	
Sonde Tn1	(FAM)5'- TCTGATTGGTGCGCTGGTGGTCTGG- 3'(TAMRA)	<i>"tagpB10"</i> (135 pb)	Ce travail

13.2. ÉLABORATION D'UN NOUVEAU JEU D'AMORCES CIBLANT LES ICE SXT/R391

13.2.1. CHOIX D'UNE SEQUENCE SPECIFIQUE

En Septembre 2017, l'ICE SXT_{MO10} de *V. cholerae* O139 MO10 (GenBank: AY055428.1) (Beaber, Hochhut and Waldor, 2002) a été utilisé comme référence pour la recherche d'autres ICE de la famille SXT/R391 dans des bases de données nucléotidiques, grâce au programme BLASTn (Altschul, 1997). Les gènes *prfC*, *int_{prfC}* et/ou *setR*, qui correspondent respectivement à un site *attB* de l'ICE, au gène de l'intégrase et au répresseur de la transcription des gènes impliqués dans l'excision et le transfert de l'élément, appelé SetR, ont servi à confirmer que ces ICE appartenaient bien à la famille SXT/R391. Au total, 87 séquences correspondant à une région d'environ 270 pb du gène *traB* de ces différents ICE SXT/R391, ont été alignées grâce au logiciel ClustalW, et un couple d'amorces/sonde consensus a été élaboré grâce au logiciel BioEdit pour cibler un fragment de *traB* de 81 pb.

13.2.2. CONTROLES IN SILICO ET IN VITRO DE LA QUALITE DES AMORCES TRAB

Le fragment de 81 pb du gène *traB* de l'ICE SXT_{MO10} a été utilisé pour la recherche de séquences similaires dans des bases de données NCBI, en utilisant le programme BLASTn avec les paramètres « query cover » et « percent identity » définis à > 99% et > 90% respectivement. 205/206 séquences étaient annotées en tant que des ICE, et seulement une était un plasmide IncF (observation complète discutée dans la partie résultat).

La spécificité des amorces servant à amplifier les éléments SXT/R391 a été contrôlée par des qPCR réalisées à partir d'ADN génomique de MG1656::SXT_{MO10}::tagpB10 (Chl^R, Tet^R) (CM1272) et d'ADN génomique total extrait d'eau de La Meurthe. Les amplifications ont été réalisées en triplicata en utilisant le thermocycleur « StepOnePlus Real-Time PCR system » (Applied Biosystems) avec le couple d'amorces ciblant le fragment *traB* (Tableau 7), et du kit « Taqman Universal Mix No UNG » (Applied Biosystem) ou du kit « SYBR Green Master Mix no UNG » (Applied Biosystems). La qualité des amplicons a été contrôlée en amplifiant le fragment *traB* par PCR, à partir de l'ADN génomique de La Meurthe, et en utilisant le programme suivant : 30 s à 98°C, 35 × [10 s à 98°C + 30 s à 60°C + 15 s à 72°C], 10

min à 72°C. Les amplicons ont été clonés en utilisant le kit “Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit” (Invitrogen), puis 100 clones ont été séquencés et analysés (Genewiz).

14. DETECTION ET QUANTIFICATION DE SOUCHES/ICE MARQUES

14.1. AMPLIFICATION D’ADN PAR QPCR

Les éléments SXT/R391, les souches donneuses *E. coli* MG1655 Δ lacZY et *P. mirabilis* BB2000::mini-Tn7, leurs ICE SXT^{MO10}-tagpB10 respectifs, ainsi que les intégrons de classe 1 ont été détectés et quantifiés par qPCR, à l’aide d’amorces et sondes spécifiques (Tableau 7) en utilisant le thermocycleur « StepOnePlus Real-Time PCR system » (Applied Biosystems) et le kit « Taqman Universal Mix No UNG » (Applied Biosystem). L’ADN de *P. mirabilis* BB2000::mini-Tn7 a servi à établir le standard nécessaire à sa propre quantification. Le plasmide pBELX1 a servi de standard à la quantification de SXT_{MO10}-tagpB10, le plasmide pNORM1 à celle des intégrons de classe 1, et le plasmide pBELX2 à celle d’*E. coli* MG1655 Δ lacZY et du gène *traB*. Le cycle utilisé a été le suivant : 2 min à 50°C, 10 min à 95°C, 45 × [15 s à 95°C + 1 min à 60°C]. Pour les abondances relatives, les données d’abondances absolues ont été normalisées par au nombre de copies de gène codant l’ARNr 16S eubactérien. Pour ce faire, le gène de l’ARNr 16S a été également dénombré par qPCR à l’aide d’amorces universelles (Tableau 7) et du kit « SYBR Green Master Mix no UNG » (Applied Biosystems). Le cycle utilisé a été le suivant : 10 min à 95°C, 45 × [15 s à 95°C + 1 min à 60°C]. Sauf exception, les qPCR ont été réalisées en triplicata.

14.2. AMPLIFICATION D’ADN PAR DDPCR

Les souches *E. coli* MG1655 Δ lacZY et *P. mirabilis* BB2000::mini-Tn7, et leurs ICE SXT_{MO10}-tagpB10, ont été amplifiés par Digital Droplet PCR avec les mêmes amorces/sondes que précédemment (Tableau 7), et en utilisant le thermocycleur Verity (Applied Biosystems). Le mélange réactionnel de 22 μ L comprenait du tampon « ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) » (Biorad) à la concentration $\times 1$, 909 nM de chaque amorce, 227 nM de sonde et 5 μ L d’extrait d’ADN non dilué (sauf dans le cas de la quantification de l’ADNr 16S). Vingt μ L de ce mélange et 70 μ L d’huile (Droplet Generation Oil for Probes, Biorad) ont été déposés sur une plaque « DG8 droplet generator cartridge » (DG8TM Cartridges for QX200TM/QX100TM Droplet, Biorad) et

une émulsion a été créée après grâce au QX200 Droplet Digital PCR System (Biorad). Quarante μL d'émulsion ont été déposés sur une plaque de 96 puits spéciale ddPCR (ddPCR™ 96-Well Plates, Biorad), et les ADN amplifiés d'après le programme suivant : 10 min à 95°C, 40 \times [30 s à 94°C + 1 min à 60 °C], 10 min à 98°C, 4°C ∞ . La lecture des plaques a été faite avec l'appareil QX200 Droplet Reader (Biorad), en utilisant le logiciel QuantaSoft.

15. ANALYSE DU SPECTRE D'HOTES DES ICE SXT/R391 PAR EPICPCR

L'epicPCR, (Emulsion, Paired Isolation and Concatenation PCR), est une méthode de biologie moléculaire basée sur la fusion entre le fragment d'un gène d'intérêt et le fragment d'un marqueur phylogénétique. Des dizaines de milliers de réactions ont lieu simultanément dans des bactéries prisonnières de billes de polyacrylamide isolées les unes des autres par une émulsion, empêchant ainsi la formation de produits de fusion chimères. L'analyse des séquences obtenues après séquençage permet ensuite d'identifier les taxons portant le gène d'intérêt dans la population étudiée. La formation des billes de polyacrylamide ainsi que les réactions d'epicPCR ont été réalisées en suivant le protocole décrit par Hultman *et al.* (Hultman *et al.*, 2018) avec les modifications proposées par Roman *et al.* (Veronica L. Roman *et al.*, 2021b).

15.1. DENOMBREMENT DES CELLULES ET FORMATION DES BILLES DE POLYACRYLAMIDE

Deux cents mL d'eau de rivière ont été centrifugés 1 min à 12 000 $\times g$, puis le culot cellulaire a été repris dans environ 100 μL d'eau qualité PCR. Les cellules ont été marquées avec du SYBR Green I (Invitrogen) puis filtrées sur une membrane en polycarbonate (Whatman Nucleo- pore, 0,2 μM) et dénombrées grâce à un microscope à épifluorescence. Ensuite, 1-2 $\times 10^7$ cellules ont été centrifugées pendant 1 min à 12 000 $\times g$, et reprises dans 130 μL d'eau qualité PCR. Pour la polymérisation, 100 μL de 30% BIS/acrylamide (Sigma), 25 μL d'APS 10% (Sigma) ont été ajoutées aux cellules, avant de les vortexer et d'y ajouter 600 μL de solution STT (4.5% Span 80, Sigma ; 0.4% Tween 80, Sigma; 0.05% Triton X-100, EMD Millipore, Billerica, MA, USA; v/v in Mineral oil (light, suitable for cell culture, Sigma). Le mélange a été vortexé à nouveau pendant 30 s à 3000 rpm avant d'y ajouter 25 μL de TEMED (Sigma), 30 s

à 3000 rpm, et laisser la polymérisation avoir lieu pendant 1h à température ambiante. Après quoi, (a) 800 μ L de diethylether saturé en eau (Sigma) a été ajouté aux billes polymérisées, et l'ensemble a été mélangé délicatement en inversant le tube. Le précipité qui se forme en surface est enlevé. Ensuite, (b) 1 mL d'eau qualité PCR a été ajouté pour laver les billes en inversant le tube et en tapotant avec le doigt, puis l'ensemble a été centrifugé 30 s à 12 000 $\times g$. A ce moment, il a été possible d'observer en surface une couche d'huile, puis un mélange d'eau/huile et les billes dans le fond du tube. Les billes ont été gardées et les étapes (a) et (b) ont été répétées jusqu'à enlever complètement l'huile et obtenir les billes dans une solution translucide (une dizaine de répétitions). Une dernière centrifugation pendant 30 s à 12 000 g a permis d'enlever l'eau et récupérer les billes dans du tampon TK $\times 1$ (20 mM Tris-HCl à pH 7.5, Teknova, Hollister, CA, USA ; 60 mM KCl, $\geq 99.0\%$, VWR), et de les filtrer à travers un tamis composé de mailles carrées de 35 μ L de côté (BD Falcon, 35 μ m Cell Strainer). Enfin, les billes de polyacrylamide ont été marquées avec du SYBR Green I (Invitrogen), puis observées au microscope à épifluorescence pour déterminer l'occurrence de billes vides, ou contenant une ou plusieurs bactéries. D'après la loi de Poisson, quand un échantillon contient 90% de billes vides, la probabilité d'avoir 2 cellules dans la même bille est $P = 4,3 \times 10^{-3}$. Quand l'abondance de la séquence/fragment cible dans la population est prise en compte (f), la probabilité d'avoir 2 cellules dans la même bille avec l'une d'elles portant la cible d'intérêt est de $P = 2f (4,5 \times 10^{-3})$. En supposant avoir une valeur de f inférieure à 10^{-2} , et en utilisant des billes de polyacrylamide contenant au moins 85% de billes avec une cellule unique, la probabilité d'avoir deux cellules dans la même bille, avec l'une d'elles portant la séquence cible peut être considérée comme négligeable.

15.2. PCR FUSION, BLOCKING PRIMERS ET NICHEE

La PCR fusion a été réalisée en utilisant un thermocycleur « Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler » avec les amorces ciblant les gènes *traB* et l'ARNr 16S (Tableau 7). Le mix comprend 900 μ L d'huile ABIL (ABIL EM 90, Evonik), 4 billes stériles en verre de 2mm (Andwin Scientific, Schaumburg, IL, USA), $\times 1$ de HF/GC buffer (Thermo Scientific), 1 mM de $MgCl_2$; 0,25 mM de dNTPs, 1 μ M d'amorce F1, 1 μ M d'amorce F2 ; 0,1 μ M d'amorce R1-F2' ; 0,16 unités de Phusion DNA polymérase (Thermo Scientific) et 46,5 μ L de billes de polyacrylamide. L'ensemble a été vortexé 1 min à

3000 rpm et aliquoté par 60 μ L. Le programme d'amplification était le suivant : 30 s à 98°C, 32 \times [10 s à 98°C, 30 s à 51°C, 30 s à 72°C], 10 min à 72°C, et 4°C ∞ . L'émulsion a été récupérée puis (c) 1 mL de diethylether (Fisher Scientific) saturé en eau ont été ajoutés, l'ensemble a été vortexé, centrifugé 1 min à 13 000 g, puis l'huile a été enlevée avant (d) d'y ajouter 50 μ L d'eau qualité PCR. Les étapes (c) et (d) ont été répétées une fois, puis 1 mL d'ethylacetate saturé en eau (Merck) ont été ajoutés, vortexés, centrifugés 1 min à 13 000 g et la phase supérieure contenant l'ethylacetate a été enlevée. L'étape (c) a été répétée deux fois, puis le tube a été laissé ouvert pendant 3 min pour que le diethylether puisse s'évaporer. Environ 100-150 μ L d'amplicons de la PCR fusion ont pu être récupérés, avant d'être purifiés avec le kit « Monarch PCR & DNA CleanUp » (NEB) en suivant les recommandations du fournisseur. Les amplicons élués dans 30 μ L d'eau qualité PCR (Promega) ont été gardés à -20°C. Le mélange réactionnel de 25 μ L de la PCR blocking primers comprend 12,25 μ L d'eau qualité PCR, $\times 1$ de HF/GC buffer, ; 0,25 mM de dNTPs, 3,2 μ M de BlockF, 3,2 μ M de block R, 0,02 unités de Phusion DNA polymérase (NEB) et 2 μ L de produit de fusion (réalisé en 4 réplicatas). Le programme d'amplification est le suivant : 30 s à 98°C, 30 \times [10 s à 98°C, 30 s à 55°C, 30 s à 72°C], 5 min à 72°C, et 4°C ∞ . Les mélanges réactionnels des 4 tubes ont été rassemblés puis purifiés avec le kit « Monarch PCR & DNA CleanUp » (NEB) en suivant les recommandations du fournisseur, et en éluant dans 8 μ L. La PCR nichée a utilisé le même programme d'amplification et le même mélange réactionnel que la PCR blocking primers à la différence près que les concentrations des amorces blocking primers étaient de 0,32 μ M, et qu'y ont été ajoutées les amorces de la PCR nichée, et les adaptateurs Illumina (Tableau 7). Les produits de la PCR nichée ont été purifiés en utilisant le kit « Monarch PCR & DNA Cleanup kit » (NEB), puis séquencés par la plateforme Illumina MiSeq 2 \times 250 (Genewiz).

15.3. ANALYSE DES SEQUENCES

L'analyse des séquences des amplicons de la PCR nichée de l'epicPCR a été réalisée presque entièrement comme décrit par Hultman *et al* (Hultman *et al.*, 2018). Les séquences ont été rassemblées avec le programme PEAR (Zhang *et al.*, 2014) avec les paramètres de base, et la qualité des séquences a été vérifiée avec le programme FastQC (Simon Andrews, 2010). Les amorces et les séquences

inférieures à 250 pb ont été enlevées, avant de séparer les séquences avec le programme cutadapt (Martin, 2011), en deux fractions comprenant d'une part l'ADNr 16S et d'autre part les fragments *traB* de SXT/R391. Des séquences uniques ont été identifiées dans la fraction contenant les séquences ADNr 16S, en utilisant la commande USEARCH -fastx_uniques (Edgar, 2010). Les OTUs ont été déterminés et les séquences y ont été distribuées en utilisant la commande USEARCH -cluster_otus avec le paramètre -minsize 2. L'identification des taxons de chaque OTU a été réalisé en utilisant la commande USEARCH -sintax à partir de la base de données ltp_16s_v123 et le paramètre « classifier cutoff = 60 ». Les OTUs ont été analysés si au moins 10 séquences y avaient été attribuées. Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R.

16. TRANSFERT DE SXT^{MO10} EN MICROCOSMES DE SEDIMENTS DE RIVIERE

Environ 20 L d'un mélange de sédiments de surface et d'eau de rivière ont été prélevés dans l'Orne à Joeuf (49°14'21.2"N 6°00'44.8"E), ou dans la Meurthe à Nancy (48°41'30.738"N 6°12'2.107"E). Les sédiments ont été maintenus à température ambiante (environ 20°C) pendant 1 h jusqu'à l'arrivée au laboratoire, puis décantés pendant 1 h à température ambiante. Cinq litres (50 % eau - 50 % sédiments) ont été récupérés puis homogénéisés dans un ballon de 10 L avant d'être repartis dans des flacons de 500 mL (à raison de 100 mL par flacon). Ces microcosmes ont ensuite été additionnés de 0 ng/mL, 4 ng/mL, ou 40 ng/mL de ciprofloxacine avant d'être inoculés avec l'ICE SXT_{MO10}-tagpB10 apporté par différentes bactéries donneuses à raison de 2×10^8 UFC final, ou de son équivalent en ADN génomique total préalablement extrait (contrôle « transformation naturelle »). En parallèle, des contrôles non-inoculés, avec ou sans ciprofloxacine, ont également été réalisés. Les microcosmes ont été maintenus 10 jours à 30°C et des prélèvements ont été effectués à J0 (avant et après inoculation), J1, J2, J3, J7 et J10. Pour garantir l'homogénéité de l'échantillonnage, les microcosmes ont été agités avant chaque prélèvement avant de collecter 2 mL d'un mélange eau-sédiment. Les échantillons ont ensuite été centrifugés 2 min à $9200 \times g$) et les culots ont été conservés à - 80°C avant extraction des ADN totaux.

17. ANALYSES STATISTIQUES

Dans ce travail, les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel R. Le test de Student (Student, 1908) a été utilisé pour mesurer les différences entre les moyennes de deux groupes ou d'un groupe par rapport à une valeur standard. L'analyse de la variance a été réalisée grâce au test ANOVA pour comparer la moyenne de divers groupes (Girden, 1992). Le test de corrélation de Spearman a servi à évaluer l'association entre deux variables (Spearman, 1904). La dépendance, a été étudiée grâce au test McNemar (McNemar, 1947).

PARTIE 1 : ÉTUDE DES ÉLÉMENTS SXT/R391 EN MILIEU AQUATIQUE

Connus pour être des vecteurs de résistance aux antibiotiques, notamment chez *Vibrio cholerae*, les ICE de la famille SXT/R391 ont été identifiés chez des γ -protéobactéries appartenant principalement aux genres *Vibrio*, mais aussi, dans une moindre mesure, aux genres *Proteus*, *Shewanella*, *Marinomonas* ou encore *Actinobacillus* (Pembroke and Piterina, 2006; Badhai and Das, 2016; Lei *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2018). Majoritairement trouvés chez des isolats cliniques d'origine humaine et animale, et plus rarement chez des bactéries isolées de l'environnement, les ICE SXT/R391 ont généralement été identifiés grâce à leurs profils de résistance et un typage moléculaire reposant principalement sur la détection par PCR du gène *int_{prfC}* qui code l'intégrase à tyrosine de la plupart de ces éléments (Balado, Lemos and Osorio, 2013; Lei *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2020; Shinde, Raval and Haldar, 2020). On sait depuis que le gène *int_{prfC}* n'est plus considéré comme faisant partie des gènes communs à tous les membres de cette famille puisqu'il n'est présent que chez environ 70% des éléments décrits jusqu'à présent (Bioteau, Durand and Burrus, 2018). De ce fait, notre connaissance du spectre d'hôtes des ICE SXT/R391 et de leur abondance dans l'environnement est quelque peu biaisée par des approches qui ne prennent pas en compte la part de bactéries non-cultivables, notamment d'origine environnementale, et qui réduisent le champ des hôtes potentiels aux seuls porteurs du gène *int_{prfC}* « canonique ».

Dans le cadre de ce travail, nous avons envisagé deux stratégies pour étudier la prévalence des ICE SXT/R391 et le spectre d'hôtes de cette famille : l'identification de bactéries hébergeant SXT/R391 à partir de collections de souches isolées d'environnements aquatiques, et l'epicPCR (Emulsion, Paired Isolation and Concatenation PCR) pour une approche sans a priori. Pour rappel, l'epicPCR consiste à amplifier, séquencer et analyser uniquement le marqueur phylogénétique (ADNr 16S) des bactéries portant les éléments SXT/R391. Que ce soit par epicPCR ou par détection PCR sur isolats, il fallait être en mesure d'identifier les ICE SXT/R391 de manière spécifique, ce qui a conduit à la recherche d'un nouveau jeu d'amorces spécifiques ciblant un gène réellement partagé par tous les membres de cette famille d'élément. Les objectifs de cette première partie du travail étaient multiples : (i)

élaborer un nouveau jeu d'amorces pour (ii) rechercher SXT/R391 dans des collections de souches isolées d'eaux de rivières, d'eaux usées et de poissons, ainsi que (iii) quantifier ces éléments dans différents environnements aquatiques pour y choisir un environnement propice à (iv) l'identification d'hôtes de SXT/R391 par epicPCR.

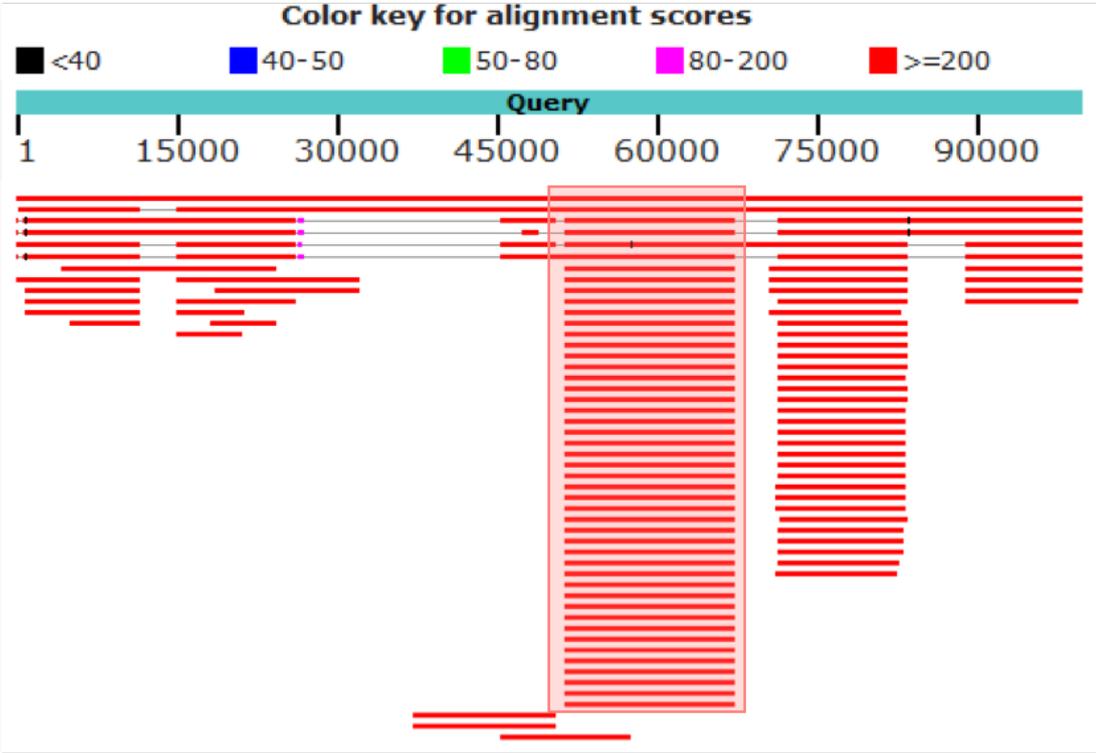
1. ÉLABORATION D'UN NOUVEAU JEU D'AMORCES CIBLANT SPECIFIQUEMENT LES ICE SXT/R391

1.1. CHOIX D'UNE SEQUENCE SPECIFIQUE

Afin de détecter les ICE SXT/R391 dans des souches isolées et les quantifier dans divers environnements, il était nécessaire de construire un nouveau jeu d'amorces spécifiques qui soit en mesure d'inclure les ICE SXT/R391 pourvus ou non du gène *int_{prfC}* canonique. L'élaboration de telles amorces devait répondre à deux contraintes liées à la taille du fragment amplifié, ce dernier devait être à la fois de petite taille pour utiliser les amorces en qPCR et epicPCR, mais aussi, suffisamment grand pour pouvoir concevoir une sonde Taqman afin d'augmenter la spécificité de la réaction de qPCR. Pour cela, la séquence de l'ICE SXT^{MO10} (numéro d'accension AY055428.1) de 99483 pb a été utilisée comme référence pour la recherche de séquences étroitement apparentées dans la base de données standard du NCBI à l'aide du logiciel d'alignement BLASTn. Les alignements de séquences ont permis de mettre en évidence deux régions conservées, l'une correspondant au gène *int_{prfC}* et l'autre ciblant les gènes *tra*, impliqués dans le transfert de l'élément (Figure 18). L'appartenance de plusieurs dizaines de ces séquences à des éléments de la famille SXT/R391 a été validée par leur intégration dans un chromosome, la présence de *setR*, un gène régulateur conservé de SXT/R391, ainsi que la présence fréquente à proximité du gène *prfC* qui correspond au site d'insertion le plus connu de cette famille d'éléments. Néanmoins, l'étude publiée par Bioteau *et al* (2018) a révélé que certains éléments de la famille SXT/R391, comme l'ICE *VchBan8* de *V. cholerae* O37, portaient un gène *int* différent et qu'ils étaient capables de s'intégrer à l'extrémité 3' du gène codant un *tRNA_{Ser}*, au lieu de l'extrémité 5' du gène *prfC*. Par conséquent, les gènes impliqués dans l'intégration/excision de l'élément ne sont plus considérés comme faisant partie des gènes complètement conservés de la famille SXT/R391. En raison

de cette exclusion, la suite de l'étude des éléments SXT/R391 a été effectuée en ciblant uniquement les gènes *tra*, et plus particulièrement le gène *traB* qui est un gène très conservé. Au total, 87 séquences correspondant à une région d'environ 270 pb du gène *traB* d'éléments vérifiés comme étant de type SXT/R391 comme indiqué ci-dessus ont été alignées grâce au logiciel BioEdit, ce qui a permis la mise en évidence d'une séquence consensus utilisée pour construire un jeu d'amorces/sonde ciblant un fragment de 81 pb.

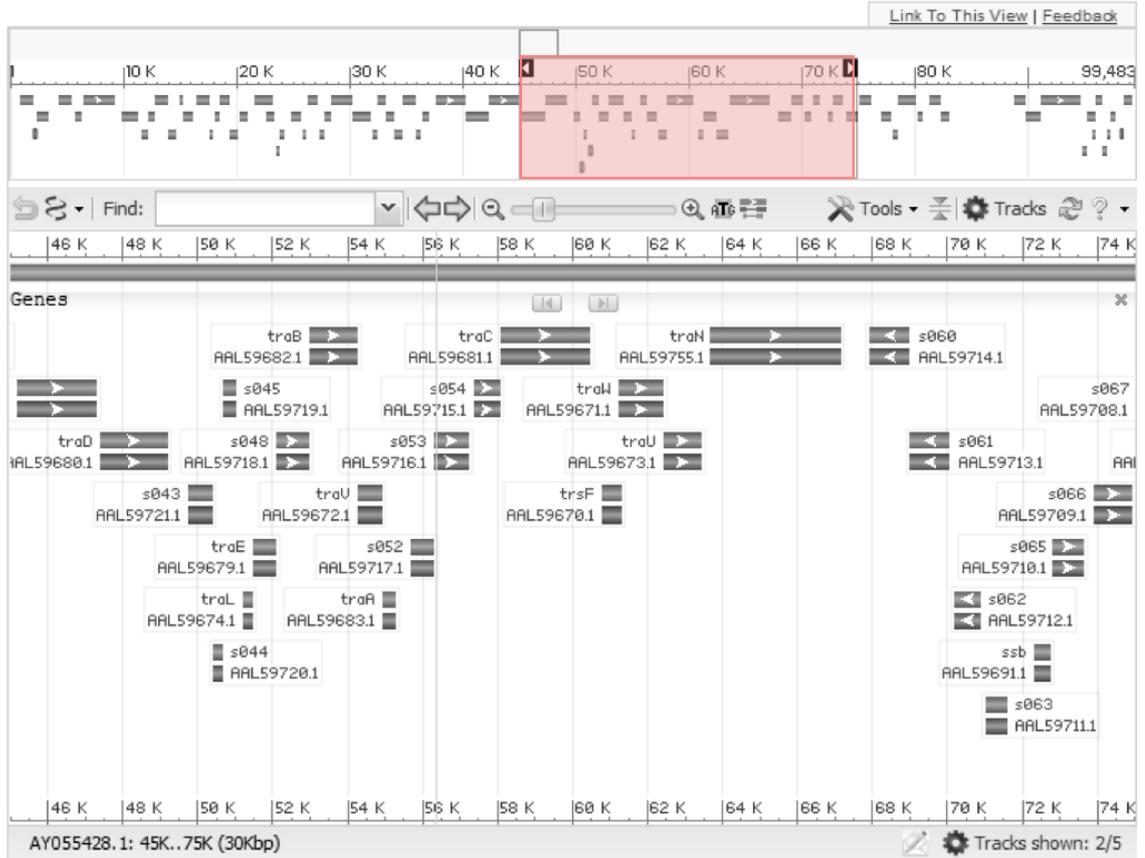
a.



b. Vibrio cholerae STX transposon-like element and pilus assembly region, complete sequence

GenBank: AY055428.1

[GenBank](#) [FASTA](#)



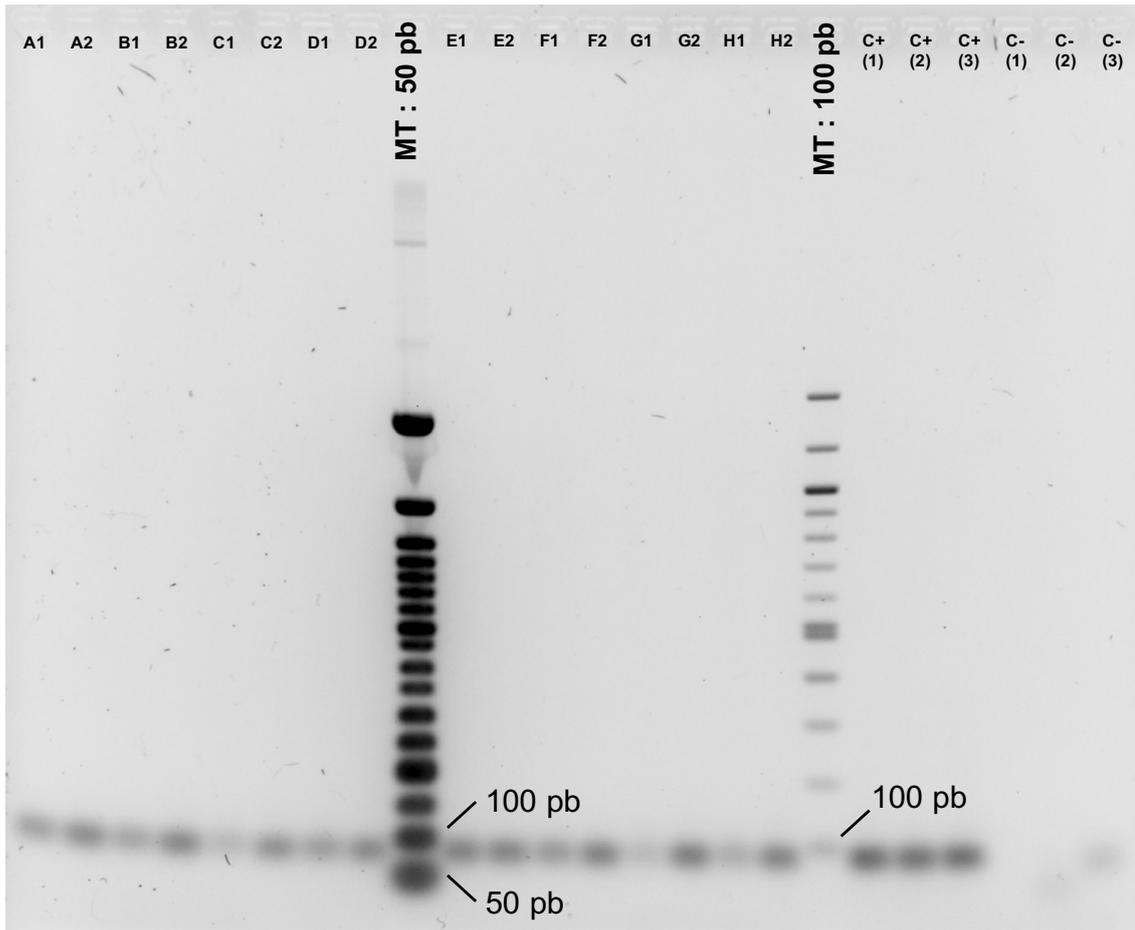
c. Amorces/ Sonde	Séquence 5'-3'
traB _{SXT-1}	CTGCATTRCTGAGGATTCAA
traB _{SXT-2}	CGGCGATCAAGAAACACTCT
traB _{SXT-p}	TACCYAACCGATTYAGAGCK

Figure 18 : Recherche de séquences conservées pour l'élaboration d'un jeu d'amorces ciblant spécifiquement les éléments SXT/R391. (a) Recherche des séquences similaires à celle de la séquence de référence SXT^{MO10} (« query ») par BLASTn, et mise en évidence de deux régions conservées comprises entre 50000-70000 pb et 73000-80000 pb, dont (b) celle comprise entre 50000 et 70000 pb correspond aux gènes tra impliqués dans le transfert de l'élément. Le tableau (c) liste le couple d'amorces (traB_{SXT-1}/traB_{SXT-2}) et la sonde (traB_{SXT-p}) élaborées permettant d'amplifier un fragment de 81 pb dans le gène traB des éléments SXT/R391.

1.2. CONTROLES IN SILICO ET IN VITRO DE LA QUALITE DES AMORCES

Dans un premier temps, la spécificité du jeu d'amorces ($\text{traB}_{\text{SXT-1}}$ et $\text{traB}_{\text{SXT-2}}$) / sonde ($\text{traB}_{\text{SXT-p}}$) ciblant le gène *traB* des éléments SXT/R391 a été vérifiée *in silico*, en comparant la séquence de 81 pb qu'ils amplifieraient à partir de SXT^{MO10} aux séquences similaires présentes dans les bases de données. Les paramètres de BLASTn utilisés (« query cover » > 99% ; « percent identity » > 90 %) ont permis d'identifier 206 séquences dont 205 fragments d'ICE annotés comme tels ou fragments de chromosomes, et un unique fragment de plasmide IncF, déjà identifiés comme ayant un module *tra* apparentés aux ICE SXT/R391. D'autres plasmides IncF peuvent être identifiés mais pas avec les paramètres utilisés car ils ont des « query cover » et « percent identity » $\leq 83\%$ et, compte tenu de la parenté entre les modules de conjugaison des ICE SXT/R391 et les plasmides IncF, il est probable que nous ayons ici mis en évidence un échange allélique entre le plasmide et un ICE. Les données ainsi obtenues ont permis de confirmer que les amorces/sonde d'intérêt permettaient de cibler quasi-uniquement les ICE de la famille SXT/R391. Ensuite, la spécificité des amorces a été testée *in vitro* par l'amplification du fragment du gène d'intérêt, en PCR quantitative et en utilisant les technologies Taqman et SYBR. Pour ces tests, le plasmide synthétique pBELX2 contenant le fragment de 81 pb du gène *traB* de SXT^{MO10} a été utilisé comme contrôle positif, et la spécificité des amorces a été éprouvée en utilisant de l'ADN de communautés microbiennes extraites de l'eau de rivière de la Meurthe. Les amplicons obtenus ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 19, a-b), ce qui a permis de confirmer l'amplification d'un fragment unique de la taille attendue (81 pb), que ce soit en technologie Taqman, ou SYBR. Par ailleurs, les courbes de fusion obtenues en qPCR SYBR indiquent bien une même température de fusion (T_m) de 60°C pour les amplicons, que ce soit en utilisant l'ADN génomique de la souche *E. coli* MG1656:: SXT^{MO10} -tagpB10 (CM1272), ou de l'ADN de communautés microbiennes environnementales, confortant ainsi l'idée d'un fragment amplifié unique et peu polymorphe comme observé par électrophorèse. La souche CM1272 est une souche d'*E. coli* portant un ICE SXT^{MO10} marqué par un remplacement allélique (tagpB10) permettant le suivi de son transfert conjugatif sans affecter son comportement, comme cela sera développé dans la partie § 3.1.

a.



b.

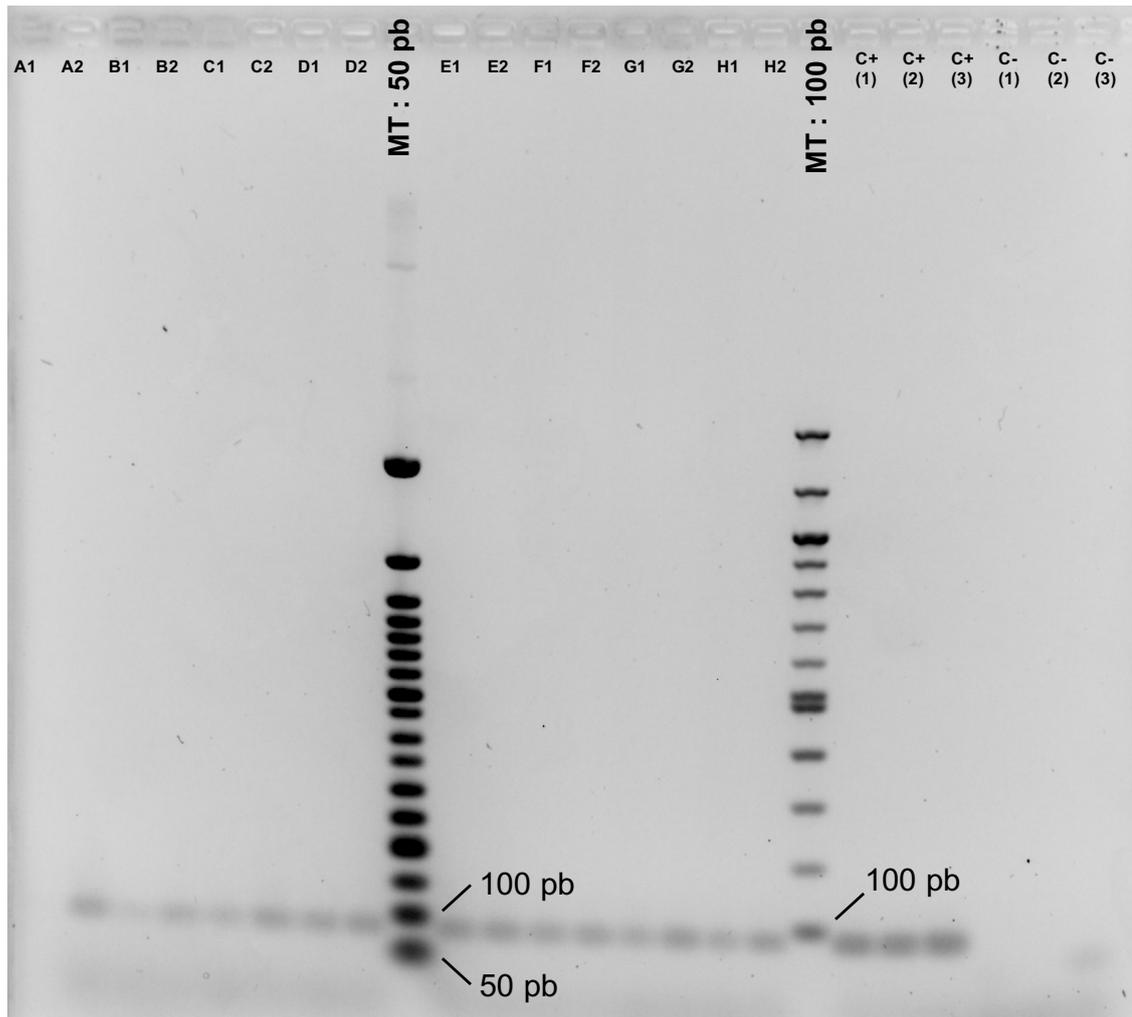


Figure 19 : Qualité électrophorétique des amplicons *traB* amplifiés grâce à la technologie SYBR (a) et Taqman (b). Les pistes A à H correspondent à des amplicons obtenus à partir d'ADN environnementaux extraits de l'eau de la Meurthe, en amont (C-D-E-F) ou en aval (A-B-G-H) de la station d'épuration située à Maxéville. Deux marqueurs de taille (MT) à 50 pb et 100 pb ont été utilisés. Les contrôles positifs ont été obtenus avec l'ADN plasmidique de pBELX2 (C+). C- est le blanc de PCR (sans ADN).

La nature des fragments amplifiés de *traB* a été étudiée en séquençant une série d'amplicons obtenus à partir d'ADN environnementaux. Pour cela, le fragment de *traB* a été amplifié à l'aide de l'ADN polymérase Phusion, à partir de l'ADN total provenant d'un échantillon d'eau de la Meurthe, avant d'être cloné puis séquencé. Dans un premier temps, l'analyse des produits d'amplifications par électrophorèse a mis en relief l'existence de plusieurs fragments secondaires, autres que celui de 81 pb

(Figure 20), contrairement aux amplifications obtenues précédemment par qPCR en technologie Taqman/SYBR (Figure 19). Bien que leurs stœchiométries montrent des concentrations largement minoritaires par rapport au produit attendu, une tentative d'optimisation a été entreprise en jouant sur la modification du temps d'élongation. Néanmoins, la diminution du temps d'élongation n'ayant pas eu d'effet sur une réduction du nombre de produits secondaires, le clonage a été poursuivi dans ces conditions. Ainsi, le fragment de 81 pb a été extrait sur gel, avant d'être cloné dans le vecteur pCR™4Blunt-TOPO® puis introduit dans des *E. coli* TOP10 chimiocompétentes. Parmi les 100 clones envoyés à séquencer, 78 avaient une séquence exploitable et 34 portaient la séquence d'intérêt. L'analyse des 44 clones sans fragment *traB* a révélé qu'ils contenaient majoritairement de dimères d'amorces, et aucun de ces fragments n'aurait permis une hybridation de la sonde TaqMan et donc une détection en qPCR. L'alignement de séquences des fragments *traB* de 81 pb a permis de mettre en évidence 5 motifs/allèles différents résultant de variations nucléotidiques en 6 positions le long du fragment de 81 pb (Figure 21). Ces 5 groupes de séquences ont été comparées par BLASTn aux bases de données, et les résultats obtenus ont permis de montrer que 3 d'entre elles (dont celle qui est majoritairement représentée dans l'analyse menée) n'existaient pas dans les bases de données étudiées et représentent donc de nouveaux variants de *traB*.

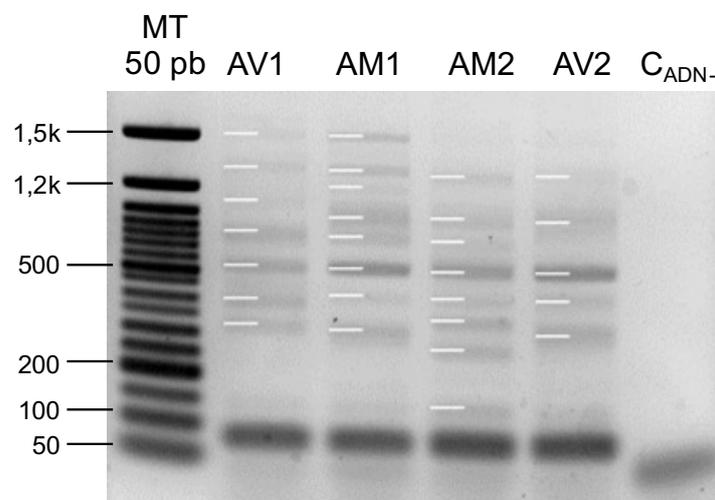


Figure 20 : Profils électrophorétiques sur gel d'agarose des amplifiats (*traB*) obtenus avec l'ADN polymérase Phusion à partir de l'ADN total extrait d'eau de la Meurthe. Marqueur de taille « 50 bp DNA ladder », quatre échantillons environnementaux (AV : aval ; AM : amont, de la station d'épuration) et un blanc de PCR (C_{ADN-}) sans ADN.

a.

Position des nucléotides variants sur le fragment du gene *traB* (de 1 à 81 pb)

	8 ^{ème}		30 ^{ème}		47 ^{ème}	51/53/56 ^{ème}		
C_2_SP6_2	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_30_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_26_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_29_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_13_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_12_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_40_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_37_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_36_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_50_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_49_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_48_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_47_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_46_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_43_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_42_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_38_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_36_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_32_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_18_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_20_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_16_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_4_SP6_5	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_13_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_10_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTG----- -
C_23_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTCAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_27_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_31_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_34_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
C_41_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_22_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_30_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTCAGA	GCGGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_33_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	ACTGATATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
D_44_SP6	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA	AAGGAAGCCA	TTTTACCCAA	CCGATTTAGA	GCGGACATCA	AAGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
Amorces	CTGCATTGCT	GAGGATTCAA		TACCYAA	CCGATTYAGA	GCK	AGAGTGTTF	CTTGATCGCC G
		TraB_{SXT-1}			traB_{SXT-p}			TraB_{SXT-2}

b.

Seq. type ^a	Position des nucléotides variants sur le fragment du gene <i>traB</i> (de 1 à 81 pb)						Occurrence de la séquence	Séquence de référence identique (numéro d'accension)
	8 ^{ème}	30 ^{ème}	47 ^{ème}	51 ^{ème}	53 ^{ème}	56 ^{ème}		
1	G	A	T	G	G	C	17	Absent des bases de données
2	G	A	T	G	G	T	11	ICEVchCHN4210 (KT151662.1)
3	A	A	T	G	G	C	3	ICE SXT _{M010} (AY055428.1)
4	G	A	C	G	G	T	2	Absent des bases de données
5	G	G	T	A	T	T	1	Absent des bases de données

a: La séquence de référence pour l'ICE SXT^{M010} (AY055428.1) (correspondant ici au motif n°3)

est : ctgcattactgaggattcaaaaggaagccattttaccacaaccgatttagagcggacatcaaaagagtgtttcttgatcgccg.

(Les nucléotides qui varient sont marqués en gras).

Figure 21 : Alignement de 34 fragments de *traB* (a) et mise en évidence de 5 motifs différents (b), résultant de 6 variations le long du fragment de 81 pb. La couleur des fragments alignés (a) correspond aux types de variants en (b). Les fragments de 81 pb ont été amplifiés grâce aux amorces *traB_{SXT1}* et *traB_{SXT2}* listées dans le Tableau 7.

Enfin, afin d'optimiser les conditions d'utilisation des amorces en qPCR sous chimie Taqman, des gradients de température ont été effectués en utilisant de l'ADN environnemental en tant que matrice. L'analyse des résultats a permis de paramétrer la température d'hybridation des amorces à 60°C, de façon à obtenir la meilleure efficacité de réaction.

En résumé, l'analyse des résultats obtenus par qPCR et clonage/séquençage, a permis de démontrer la spécificité des amorces élaborées pour cibler le gène *traB* des ICE SXT/R391, dans la limite des données disponibles à ce jour dans la littérature et les bases de données nucléotidiques. En raison des produits secondaires obtenus avec la PCR Phusion, et afin de garantir un maximum de spécificité, la qPCR Taqman sera utilisée pour identifier ou quantifier les éléments SXT/R391 dans la suite de ce travail. Ainsi, les amorces et sonde Taqman ont pu être utilisées pour la détection d'éléments SXT/R391 dans des banques de souches de bactéries hydriques connues pour être des hôtes de ces éléments, comme *Vibrio cholerae*.

2. ABONDANCE DES ELEMENTS SXT/R391

2.1. PREVALENCE DES ELEMENTS SXT/R391 DANS DES COLLECTIONS DE BACTERIES ENVIRONNEMENTALES

En raison de leur découverte chez *V. cholerae* O139 (SXT^{MO10}), les ICE de la famille SXT/R391 sont souvent associés à des espèces appartenant au genre *Vibrio*, mais surtout à *V. cholerae*. Ainsi, les données de la littérature pourraient laisser penser que *V. cholerae* est l'hôte majoritaire des éléments SXT/R391, et ce dans divers environnements (Bianca Hochhut *et al.*, 2001; Burrus *et al.*, 2006).

Afin d'étudier la prévalence de ces éléments chez des souches de *V. cholerae* isolées sans à priori, les amorces ciblant le gène *traB* ont été mises à disposition de collaborateurs à l'Anses (Ploufragan), dans le cadre du projet AquaResist. Les ICE SXT/R391 ont été recherchés dans deux collections de souches de *V. cholerae* non-O1 / non-O139, isolées à partir d'échantillons d'eaux douces/saumâtres de rivière, d'eaux usées brutes/traitées et d'eaux marines (Tableau 8, Banques n°2 et n°3). L'analyse par qPCR de 168 souches de *V. cholerae* a permis d'en détecter 14 portant le gène *traB*, soit 8% (14/168) de la collection totale de bactéries, toutes isolées à partir d'eaux saumâtre et marine. D'autres analyses par qPCR effectuées sur 13 des 14

souches (en raison de l'impossibilité de re-cultiver la 14^{ème}), en utilisant les amorces ciblant le gène *int_{prfC}* déjà publiées dans la littérature (*int_{SXT-1}*, *int_{SXT-2}*, *int_{SXT-p}*, Tableau 8), ont montré que 8 souches sur 13 possédaient le gène *int_{prfC}*. Ces données permettent non seulement de justifier une nouvelle fois le choix des amorces ciblant le gène *traB*, mais également de mettre en avant que 5/13 souches (38%) auraient un autre site d'insertion que le gène *prfC*.

Plus largement, les ICE de la famille SXT/R391 ont été décrits dans la littérature comme ayant été détectés chez quelques autres γ -protéobactéries hydriques n'appartenant pas au genre *Vibrio*, comme *Proteus ssp.*, *Shewanella ssp.*, *Marinomonas ssp.* ou encore *Actinobacillus ssp.*, et dont certaines d'entre elles, comme certains *Vibrio*, sont des pathogènes de poissons. Pour cette raison, deux autres collections de souches isolées d'eau de rivière, de poissons et d'effluents de station d'épuration ont été analysées comme précédemment par qPCR en ciblant le gène *traB* (Tableau 8, Banques n°1,3 et 5). Les résultats obtenus ont indiqué que, sur 1794 souches testées, couvrant 42 genres différents et dont 1435 appartiennent au groupe des γ -proteobacteries (hors *Vibrio*) et 443 à celui des *Aeromonas ssp.*, aucune ne portait d'élément SXT/R391.

Dans cette étude, il apparaît que les ICE SXT/R391 sont uniquement détectés chez quelques *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 environnementales, ce qui tend à confirmer l'idée de *V. cholerae* comme étant l'hôte majoritaire des éléments SXT/R391 dans l'environnement, en accord avec les données parues dans la littérature. Il reste cependant difficile de tirer une conclusion solide sur la base des 1962 bactéries criblées, d'autant plus que la proportion de bactéries cultivables dans l'environnement est faible, ce qui limite le champ des investigations pour la détection des hôtes potentiels. Cette réflexion nous a ainsi conforté dans le choix d'une approche moléculaire pour une identification plus exhaustive des hôte environnementaux des éléments SXT/R391.

Tableau 8 : Caractéristiques des collections de souches isolées de différents environnements aquatiques testées pour la présence ou non d'éléments SXT/R391.

Banque de souches #1

Origine de l'échantillon	Site de prélèvement	Date	Espèce bactérienne	Nombre de souches	Détection de SXT/R391
Poissons malades de bassins de pisciculture	Différentes piscicultures en Bretagne (France)	Inconnue	<i>Aeromonas salmonicida</i>	96	Aucun
Total				96	0

Banque de souches #2

Origine de l'échantillon	Site de prélèvement	Date	Espèce bactérienne	Nombre de souches	Détection de SXT/R391
Eau de rivière	Après la STEP de Dinan - La Rance (France)	1999-2000	<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139	26	2
Eau saumâtre	Estuaire de la Rance (France)		<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139	72	4
Eau de mer	The English Channel, face à l'estuaire de la Rance (France)		<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139	26	6
Total				124	12

Banque de souches #3

Origine de l'échantillon	Site de prélèvement	Date	Espèce bactérienne	Nombre de souches	Détection de SXT/R391
Eau de rivière	Le Queffleuth (France)	2017-2018	<i>Aeromonas spp.</i>	347	Aucun
Eau de rivière - Amont pisciculture	Le Queffleuth (France)		<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139	10	Aucun
Eau de rivière - Aval pisciculture	Le Queffleuth (France)		<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139	12	Aucun
Effluent de station d'épuration	3 STEP du Queffleuth (France)		<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139	11	Aucun
Eau traitée	3 STEP du Queffleuth (France)		<i>Vibrio cholerae</i> non-O1/non-O139	11	Aucun
Eau de rivière	Le Queffleuth (France)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	253	Aucun
Effluent de station d'épuration	3 STEP du Queffleuth (France)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	220	Aucun
Biofilm bassin de pisciculture	2 bassins de pisciculture en Bretagne (France)		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	Aucun
Total				885	0

Banque de souches #4

Origine de l'échantillon	Site de prélèvement	Date	Espèce bactérienne	Nombre de souches	Détection de SXT/R391
63 poissons (brochet, gardon, sandre, brème)	Lac de Gerlédan (France)	2014	Diverses	689	0
Total				689	0

2.2. IDENTIFICATION D'ENVIRONNEMENTS RICHES EN ICE SXT/R391

Au prime abord, l'epicPCR semble être une méthode de choix en matière d'identification des hôtes des ICE de la famille SXT/R391, et permettrait de compléter les observations faites par des approches culturales, en s'intéressant notamment à la fraction non cultivable des communautés microbiennes, afin d'obtenir une vue d'ensemble des hôtes environnementaux de l'élément. Mais il s'agit d'une méthode fastidieuse qui nécessite d'abord d'identifier des environnements suffisamment riches en éléments d'intérêt pour une identification d'hôte optimale (seuil de détection estimé à environ 10^2 séquences cibles sur 3×10^6 bactéries engagées par réaction d'epicPCR, soit une abondance relative d'environ 10^{-5} ICE/gène d'ARNr 16S). A cet égard, il convient donc de déterminer l'abondance de SXT/R391 dans différents environnements au préalable. Dans cette partie de nos investigations, nous avons dressé un bilan de l'abondance des éléments SXT/R391 par qPCR dans différentes matrices environnementales (eau, biofilm, sédiment). Avec des matrices aussi variées, dont certaines pour lesquelles nous n'avons que peu de recul, il s'est avéré nécessaire de tester plusieurs méthodes d'extraction de l'ADN total, pour s'affranchir au maximum de l'effet des inhibiteurs de PCR co-extraits. La méthode retenue a ensuite été appliquée sur différents échantillons environnementaux pour en déterminer l'abondance en ICE SXT/R391 et identifier des environnements préférentiels relativement riches.

2.2.1. CHOIX D'UNE METHODE D'EXTRACTION DE L'ADN TOTAL

L'extraction et la purification de l'ADN sont des étapes clés dans la détection et la quantification d'une séquence d'intérêt par PCR quantitative. Or, en fonction de leur provenance, les échantillons environnementaux peuvent contenir des substances telles que des acides humiques, des polysaccharides, de l'urée, des composés phénoliques ou encore des éléments traces métalliques, qui peuvent être co-extraits avec l'ADN total et qui vont exercer des effets inhibiteurs sur les réactions de PCR. La méthode décrite par Porteous *et al.* (Porteous, Seidler and Watrud, 1997) et modifiée par Bonot *et al.* (Bonot *et al.*, 2010) est une méthode d'extraction d'ADN environnemental robuste maîtrisée au laboratoire, mais qui se révèle être fastidieuse en comparaison avec la rapidité d'exécution d'autres méthodes d'extraction comme celles des kits Power Water ou Power Soil (Qiagen). Afin de pouvoir comparer les analyses des ADN totaux quelle que soit la nature de l'échantillon, il était nécessaire

d'utiliser une même et seule méthode d'extraction. Ainsi, les ADN totaux de trois types de matrices (des eaux provenant d'effluents de station d'épuration (STEP) et de l'Orne, des sédiments de surface de la Meurthe, des biofilms de bassins de pisciculture) ont été extraits par trois méthodes différentes, celle décrite par Bonot *et al* (2010) et celles proposées par les kits Power Water et Power Soil (Qiagen). Toutes méthodes confondues, les rendements d'extractions varient entre 0,174-1,399 µg d'ADN par mL d'eau de rivière extrait ; 0,16-0,49 µg d'ADN par mg de sédiment extrait et 0,27-2,89 µg d'ADN par mg de biofilm extrait. En général, c'est la méthode de Bonot *et al.*, qui permet d'obtenir un meilleur rendement, mais l'analyse de la pureté des ADN par spectrométrie a indiqué que cette méthode favorise la présence d'inhibiteurs avec un rapport d'absorbance $A_{260}/A_{280} > 1,8$, indiquant la présence de protéines et/ou de phénol, et que les ADN extraits avec les kits présentent des solvants co-purifiés, sels ou contaminants organiques ($A_{260}/A_{280} < 1,8$). Le gène de l'ARNr 16S a ensuite été quantifié par qPCR et normalisé à la masse ou au volume de matrice extraite. Enfin, afin de contrôler que la méthode d'extraction n'a pas d'influence sur le nombre d'éléments SXT/R391 dans un échantillon donné, le gène *traB* spécifique de ces éléments a également été quantifié par qPCR et les résultats ont été normalisés en copies de SXT/R391 par ADNr 16S. L'ensemble des résultats ont été regroupés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Quantification des gènes codant l'ARNr 16S et *traB* dans différents échantillons en fonction de la méthode d'extraction de l'ADN total.

Matrice	Méthode d'extraction	Site de prélèvement	A_{260}/A_{280}	Copies d'ADNr 16S par mL ou mg extrait	Copies de <i>traB</i> par ADNr 16S
Eau	Power Water	Richemont	1,74 ± 0,08	3,34E+06 ± 8,60E+05	4,33E-05 ± 4,19E-06
		Joeuf	1,72 ± 0,07	3,31E+06 ± 4,86E+05	2,43E-05 ± 1,55E-06
		Effluent STEP	1,82 ± 0,04	5,48E+06 ± 4,56E+05	4,83E-05 ± 6,69E-06
		Beth	1,74 ± 0,05	3,32E+06 ± 8,78E+05	4,54E-05 ± 2,93E-06
	Bonot <i>et al</i>	Richemont	1,91 ± 0,09	1,78E+06 ± 3,06E+05	7,48E-05 ± 6,73E-06
		Joeuf	1,97 ± 0,13	1,91E+06 ± 1,10E+06	5,55E-05 ± 2,37E-05
		Effluent STEP	2,02 ± 0,02	7,96E+05 ± 2,45E+05	1,11E-04 ± 1,42E-05
	Beth	1,94 ± 0,10	1,82E+06 ± 1,15E+06	9,00E-05 ± 2,01E-05	
Biofilm	Power Water	Ecotron Sandre	1,79 ± 0,06	4,63E+08 ± 4,91E+08	< LQ
	Bonot <i>et al</i>	Ecotron Sandre	1,84 ± 0,01	4,60E+06 ± 2,28E+06	< LQ
Sédiment	Power Water	Nancy	1,71 ± 0,22	1,16E+07 ± 2,28E+06	4,739E-05 ± 3,86E-06
	Power Soil	Nancy	1,62 ± 0,16	8,79E+06 ± 1,50E+05	5,284E-05 ± 5,96E-06
	Bonot <i>et al</i>	Nancy	1,97 ± 0,06	7,25E+06 ± 2,63E+06	5,113E-05 ± 1,45E-05

LQ : Limite de quantification. Les valeurs représentent la moyenne et l'écart-type.

Hormis les extractions d'ADN à partir de biofilms, les rendements d'extraction et la qualité des ADN obtenus étaient similaires quelles que soient les méthodes d'extraction utilisées et, tous les ADN extraits étaient utilisables en qPCR de manière satisfaisante. A cet égard, la quantification des gènes d'intérêt (ARNr 16S et *traB*) semble clairement indiquer l'absence d'un effet de la méthode d'extraction sur la qualité et la nature des ADN totaux extraits à partir d'échantillons d'eau et de sédiments. Le cas des biofilms semble toutefois faire exception à l'ensemble, où 100 fois plus d'ADNr 16S ont été quantifiés à partir de l'ADN total extrait avec le kit Power Water par rapport à l'extrait par la méthode de Bonot *et al* (2010). On notera d'ailleurs que l'absence de *traB*, et donc de SXT, suggère une communauté microbienne radicalement différente de celles des autres matrices, du moins vis-à-vis de la prévalence de SXT/R391 et ses hôtes. Quoiqu'il en soit, en l'absence de différence flagrante entre les méthodes d'extraction, le kit Power Water a été retenu pour poursuivre ce travail de quantification de SXT/R391 dans l'environnement, en raison de sa facilité de mise en œuvre comparé à la méthode de Bonot *et al* (2010).

2.2.2. OCCURRENCE DES ELEMENTS SXT/R391 DANS DES ENVIRONNEMENTS AQUATIQUES

Les hôtes connus des ICE SXT/R391 sont des bactéries hydriques ou entériques, présentes notamment chez l'Homme ou le poisson, et pouvant aisément rejoindre l'environnement *via* les effluents de stations d'épuration ou de piscicultures. Dans ce contexte, les éléments SXT/R391 ont d'abord été quantifiés dans deux piscicultures, l'une en circuit fermé et sous abris (pisciculture de l'URAFPA) pour l'élevage d'esturgeons, de perches et de sandres, et l'autre en circuit ouvert à ciel ouvert (pisciculture de l'Anses) pour l'élevage de truites arc-en-ciel. Des prélèvements d'eau et de biofilm ont été effectués dans chaque bassin d'élevage, et le contenu stomacal, le contenu intestinal et les fèces de 3 truites arc-en-ciel ont été prélevés dans le cas du second dispositif piscicole. Les ADN totaux ont été extraits et les ICE SXT/R391 ont été quantifiés par qPCR en ciblant le gène *traB*. Les données quantitatives ont finalement été normalisées au nombre de copies de gènes d'ARNr 16S eubactérien, également quantifiés par qPCR (Figure 22). Les ICE SXT/R391 ont été détectés et quantifiés dans l'ensemble des échantillons analysés à des concentrations allant de 10^{-6} copies de SXT/R391 par ADNr 16S dans les biofilms de bassin, jusqu'à 10^{-3} copies/ADNr 16S dans les fèces de poisson. Dans le système

piscicole re-circulé (circuit fermé), aucune variation significative de la proportion d'éléments par ADNr 16S n'a été observée, ni après le filtre mécanique, ni après le traitement UV, ce qui démontrerait que ces étapes n'ont pas d'effet visible sur l'abondance relative de ces éléments dans ce dispositif piscicole. Par ailleurs et en ce qui concerne cette structure piscicole, il est possible d'observer qu'il y a 10 fois plus de copies de SXT/R391 par ADNr 16S dans les échantillons d'eau provenant du bassin des perches par rapport aux bassins hébergeant d'autres espèces. Ceci pourrait suggérer que ce poisson est plus apte à héberger les hôtes bactériens des éléments SXT/R391. Dans le système piscicole ouvert pour l'élevage de truites arc-en-ciel, il y a 10 à 100 fois plus d'ICE SXT/R391 dans les prélèvements de poisson que dans les échantillons d'eau. Les poissons pourraient donc être considérés comme des réservoirs et des vecteurs naturels favorisant la dissémination des ICE de la famille SXT/R391.

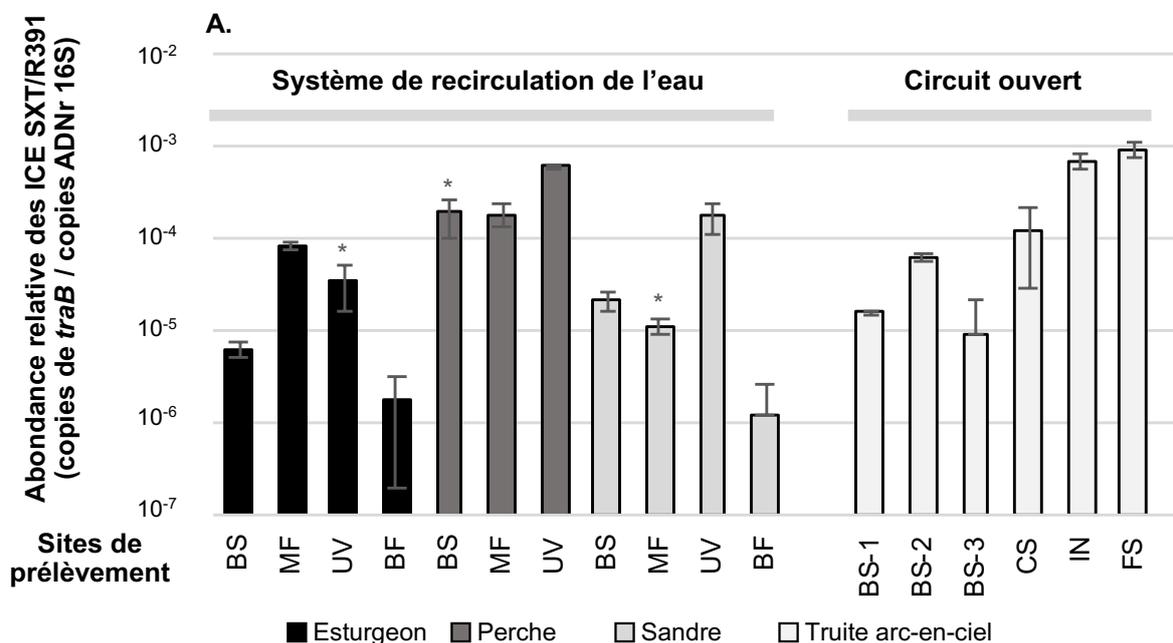


Figure 22 : Abondance relative des ICE SXT/R391 dans des échantillons d'eau, de biofilms et de poissons dans les structures piscicoles de l'URAFPA et de l'Anses. BS : eau du bassin piscicole ; MF, eau du filtre mécanique ; UV : eau récupérée après le traitement UV ; BF : biofilm ; CS, contenu stomacal ; IN ; contenu intestinal ; FS, fèces de poisson. Les barres d'erreur indiquent les erreurs standard à la moyenne (n=3, sauf pour BS, MF, UV et BF où n=1, dans ces cas les barres d'erreur indiquent

les erreurs standard des triplicatas obtenus par qPCR). Les astérisques indiquent les valeurs proches de la limite de quantification en qPCR.

L'abondance relative des ICE SXT/R391 a également été étudiée dans les effluents de deux stations d'épuration (STEP de Moyeuve-Grande et Maxéville), ainsi que dans les rivières adjacentes (l'Orne et la Meurthe), en amont et en aval des points de rejets (Figure 23). La comparaison des deux campagnes de prélèvements effectuées sur l'Orne (Campagne 1 et Campagne 2), a permis de constater des variations d'un à deux ordres de grandeur dans l'abondance relative des éléments SXT/R391 en rivière d'une campagne de prélèvement à l'autre. Ces données ont permis de mettre en évidence un « effet date » que tend à confirmer un test ANOVA ($P = 0.12$). Pour certaines campagnes, la charge en ICE SXT/R391 en rivière est telle que les abondances relatives sont comparables à celles dans les effluents des stations d'épuration se déversant dans l'Orne (Campagne 2) et la Meurthe. D'après les résultats obtenus, aucune augmentation de l'abondance relative en ICE SXT/R391 n'a été observée en aval des rejets de la STEP, probablement en raison de la forte dilution des effluents une fois rejetés dans la rivière. Même s'il existe, l'apport en éléments SXT/R391 par les stations d'épuration est sans doute minime comparé à ceux déjà présents en amont. On notera cependant que si l'apport d'effluents est quantitativement sans effet, il n'en demeure pas moins une nouvelle source d'hôtes vecteurs d'éléments SXT/R391 qui viennent enrichir les communautés microbiennes déjà présentes.

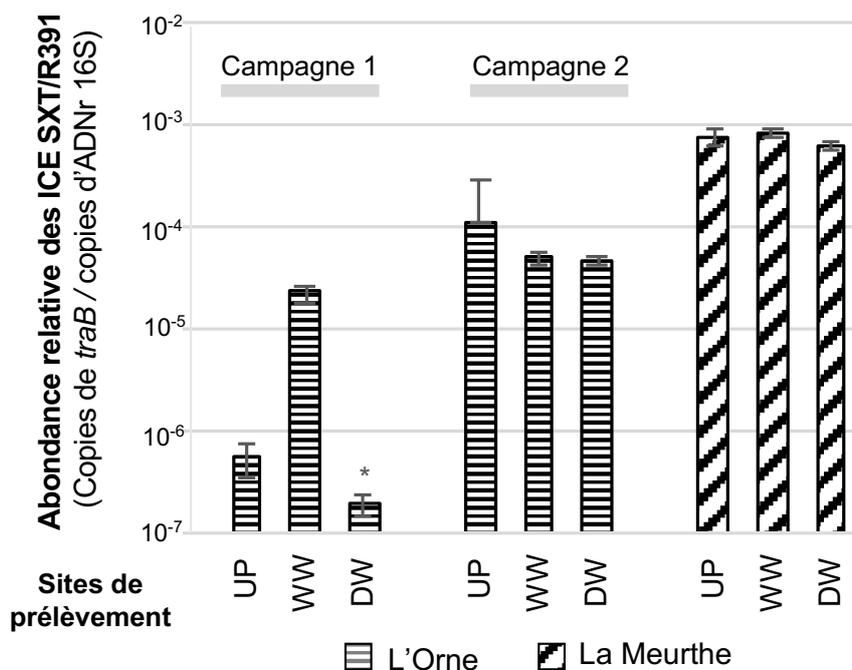


Figure 23 : Abondance relative des ICE SXT/R391 dans des échantillons d'eau prélevés dans deux effluents de STEP, et les rivières adjacentes (l'Orne et la Meurthe). UP : Eau prélevée en amont de la STEP, WW : effluent de la STEP, DW : en aval de la STEP. Les barres d'erreur indiquent les erreurs standard à la moyenne (n=3). L'astérisque indique une valeur proche de la limite de quantification en qPCR.

En raison des concentrations en ICE SXT/R391 plus élevées dans les eaux de la Meurthe, l'abondance relative de ces éléments a été plus particulièrement étudiée dans cet environnement afin d'y identifier de possibles sources ou réservoirs. La Meurthe est une rivière qui présente un gradient de salinité de l'eau lié à des activités d'extraction de sel gemme. En effet, aux alentours de Nancy, la Meurthe traverse plusieurs sites d'extraction de sel auxquels s'ajoutent les rejets de soudières de Novacarb et Solvay qui génèrent ce gradient de salinité. Certaines bactéries hôtes connues des ICE SXT/R391 étant halophiles ou halotolérantes, nous avons fait l'hypothèse que les variations dans la concentration en sel pourraient être à l'origine de modifications dans la composition des communautés microbiennes et éventuellement influencer l'abondance en ICE SXT/R391. L'abondance des éléments SXT/R391 et la conductivité de l'eau ont donc été étudiées sur cinq sites de prélèvement choisis le long d'une portion de 30 km de la Meurthe, passant notamment par les villes de Saint-Nicolas-de-Port et Art-sur-Meurthe, où sont situées les salines.

En outre, l'abondance relative des intégrons de classe 1, souvent utilisés comme indicateurs globaux de l'abondance en gènes d'antibiorésistance, a également été déterminée dans ces échantillons d'eau afin de comparer la proportion de ces deux familles d'éléments génétiques vecteurs d'antibiorésistance. Les abondances relatives des ICE SXT/R391, ainsi que celles des intégrons de classe 1, sont représentées dans la Figure 24. Comme attendu, il est possible d'observer une augmentation de la conductivité dans les eaux de rivière à partir de Saint-Nicolas-de-Port (SNP) et jusqu'à Nancy (NAN). Si l'abondance relative des intégrons de classe 1 est 13 à 140 fois supérieure à celle des ICE SXT/R391, elle est aussi constante sur le continuum alors que celle des ICE SXT/R391 reste constante de Mont-sur-Meurthe (MSM) à Saint-Nicolas-de-Port (SNP) mais augmente d'environ un ordre de grandeur à partir d'Art-sur-Meurthe (ASM), et reste à cette valeur à Nancy (NAN). Des analyses statistiques de ces données ont permis de mettre en avant que (i) l'abondance relative des ICE SXT/R391 évolue indépendamment de celle des intégrons de classe 1 (test de corrélation de Spearman : $P=0.78$), que (ii) l'abondance relative des intégrons de classe 1 n'est pas corrélée avec la conductivité de l'eau (test de corrélation de Spearman : $P=0.78$), alors que (iii) c'est le cas pour l'abondance des ICE SXT/R391 (test de corrélation de Spearman: $P=0.02$). La salinité semble donc un paramètre important influençant l'abondance relative des ICE SXT/R391, très probablement à travers la persistance de certains hôtes préférentiels.

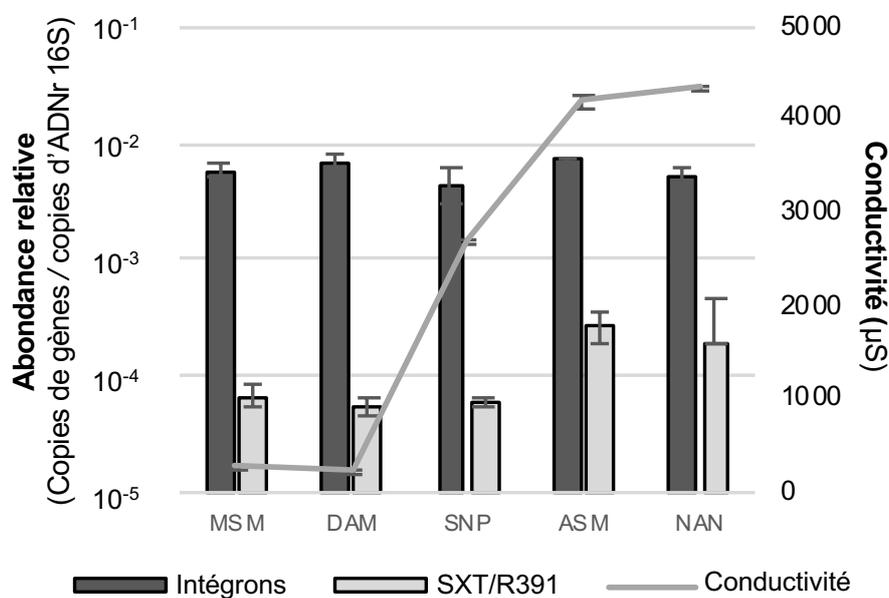


Figure 24 : Abondance relative des ICE de la famille SXT/R391 et des intégrons de classe 1 et mesure de la conductivité dans des échantillons d'eau de rivière prélevés le long de la Meurthe. MSM, Mont-sur-Meurthe ; DAM, Damelevières ; SNP, Saint-Nicolas-de-Port ; ASM, Art-sur-Meurthe ; NAN, Nancy. L'ensemble des sites de prélèvement sont situés en amont de la station d'épuration de Nancy. Les barres d'erreur indiquent l'erreur standard à la moyenne (n=3).

En résumé, les ICE de la famille SXT/R391 ont été détectés dans l'ensemble des échantillons analysés, et pourraient être qualifiés d'éléments relativement d'ubiquitaires. D'abord, ils ont été quantifiés en abondance dans deux structures piscicoles avec jusqu'à 10^{-4} copies/ADNr 16S dans les échantillons d'eau et 10^{-3} copies/ADNr 16S dans les différents prélèvements de truite arc-en-ciel. Étant donné qu'il y a en moyenne 4,2 copies d'ADNr 16S par génome bactérien (Větrovský and Baldrian, 2013), cela signifie qu'environ 1 bactérie de la flore microbienne du poisson sur 250 posséderait un élément de la famille SXT/R391. Avec une telle abondance, le poisson pourrait être considéré comme un vecteur hébergeant et favorisant la dissémination des éléments et de leurs hôtes. Par ailleurs, les données obtenues ont permis d'observer que ces éléments ont tendance à être plus abondants dans la Meurthe que dans l'Orne ($4,4 \times 10^{-5}$ à $7,3 \times 10^{-4}$ contre $1,9 \times 10^{-7}$ à $8,7 \times 10^{-5}$ copies/ADNr 16S respectivement), et que leur abondance est corrélée positivement à la salinité de l'eau. Cette augmentation de l'abondance pourrait donc être due à des changements dans les communautés microbiennes liés à l'augmentation de la concentration en sel qui favoriserait les hôtes bactériens préférant, ou supportant, ces conditions ; c'est notamment le cas de *V. cholerae* qui s'avère être l'hôte des éléments SXT/R391 le plus connu et étudié. Pour autant, les conditions climatiques de la région ne sont pas favorables à la croissance de *V. cholerae* (température de croissance optimale comprise entre 20°C et 45°C, (Martinez, Megli and Taylor, 2010)) et les eaux de la Meurthe, bien que salées, ne sont pas considérées comme véritablement saumâtres. Même si on ne peut pas exclure l'existence de quelques réservoirs très localisés de *Vibrio spp.* porteurs de SXT/R391, il était ici plus probable que les éléments puissent être hébergés par des hôtes environnementaux dont l'identité restait à définir. De fait, il est apparu légitime de caractériser les hôtes environnementaux des ICE SXT/R391 par epicPCR, à la fois dans la Meurthe qui est

un écosystème riche en éléments d'intérêt, et dans l'Orne, où l'abondance de SXT/R391 apparaît comme modérée. En outre, cette étude devrait permettre (i) de déterminer si les effluents de station d'épuration contiennent les mêmes hôtes de SXT/R391 que le milieu récepteur, et (ii) de justifier le choix d'une bactérie donneuse à utiliser pour évaluer le transfert conjugatif des éléments SXT/R391 en microcosmes d'eau et sédiments de rivière.

3. IDENTIFICATION DES HOTES ENVIRONNEMENTAUX DES ICE SXT/R391 PAR EPICPCR

L'epicPCR (Emulsion, Paired Isolation and Concatenation PCR) est une méthode de biologie moléculaire basée sur la fusion entre le fragment d'un gène d'intérêt et le fragment d'un marqueur phylogénétique comme le gène codant l'ARNr 16S. Des dizaines de milliers de réactions ont lieu simultanément dans des bactéries prisonnières de billes de polyacrylamide isolées les unes des autres par une émulsion, empêchant ainsi la formation de produits de fusion chimères et ne correspondant donc pas à l'existence du couple gène d'intérêt/marqueur phylogénétique réel. L'analyse des séquences obtenues après séquençage permet ensuite d'identifier les taxons portant le gène d'intérêt dans la population étudiée.

Dans le protocole initialement publié par Spencer et al., l'epicPCR est réalisée en deux étapes (Spencer *et al.*, 2016). Après la formation des billes de polyacrylamide, la première étape consiste en une PCR fusion dans laquelle le fragment du gène d'intérêt va être lié au fragment du gène codant l'ARNr 16S au sein d'une même bactérie. La réussite de cette étape repose non seulement sur la présence au plus d'une bactérie par bille, mais également sur la spécificité des amorces vis-à-vis du gène d'intérêt ciblé. S'en suit une PCR nichée qui consiste à amplifier un fragment interne aux produits de PCR fusion, et lors de laquelle sont ajoutées des amorces appelées « blocking primers » destinées à empêcher les produits d'amplification encore non-fusionnés (fragments du gène d'intérêt ou du gène codant l'ARNr 16S), de le faire aléatoirement une fois hors des billes de polyacrylamide (Figure 25). Ce sont finalement les amplicons résultant de la PCR nichée qui sont séquencés. En utilisant cette technique, il est important de noter que le produit de la PCR fusion ne peut être observé sur gel d'agarose car en trop faible concentration, c'est pourquoi il faut

attendre la PCR nichée pour vérifier le bon déroulement de toutes les étapes et que la taille des produits finaux correspond bien à celle des produits attendus.

Dans cette étude, l'epicPCR a été utilisée pour identifier les taxons susceptibles de porter des ICE SXT/R391. La mise en place de cette méthode a entraîné des modifications qui ont abouti à des améliorations du protocole initial, tant au niveau du rendement d'amplification après l'étape de PCR nichée, qu'au niveau de la validation des données de séquençage.

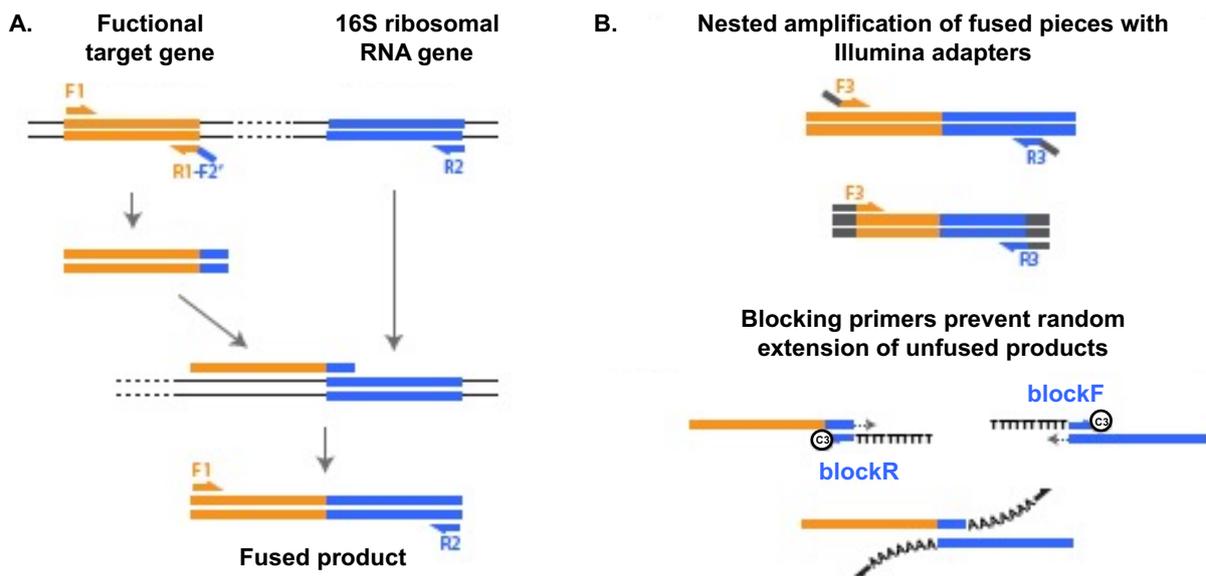


Figure 25 : PCR fusion, PCR nichée et rôle des « blocking primers ». (A) La PCR fusion permet de lier deux amplicons lors d'une seule réaction de PCR grâce aux amorces F1/R1 qui ciblent le gène d'intérêt et les amorces R1-F2' qui ciblent l'ADNr 16S. L'amorce R1-F2' sert à amplifier le fragment du gène d'intérêt et ajoute une séquence qui va servir d'amorce pour amplifier l'ADNr 16S avec R2. Les amorces F1 et R2 sont ajoutées en excès par rapport à R1-F2', de manière à favoriser l'amplification du grand fragment de fusion. (B) Lors de la PCR nichée, le produit de fusion est amplifié avec les adaptateurs illumina (en gris foncé), tandis que les fragments correspondant au gène d'intérêt ou à l'ADNr 16S encore non-fusionnés sont empêchés de s'amplifier grâce aux amorces « blocking primers ». Les « blocking primers » sont ajoutés en excès et s'hybrident à la séquence de l'ADNr 16S mais ne peuvent pas initier d'e polymérisation de nucléotides du fait de la présence de l'extrémité « C3-carbon-spacer ». D'après (Spencer et al., 2015).

3.1. OPTIMISATION DU PROTOCOLE D'EPICPCR

Lorsqu'il s'agit d'échantillons environnementaux, l'extraction/isolement des cellules bactériennes est une étape importante à prendre en considération, et ce avant même la réalisation des billes de polyacrylamide destinées à les contenir individuellement. En effet, si les cellules restent liées à d'autres particules ou sont agrégées entre elles, cela pourrait conduire à la présence de plus d'une bactérie par bille de polyacrylamide, et donc être à l'origine de la formation de produits de fusion chimères. Dans ce contexte, des tentatives de sonication ont été réalisées sur des échantillons de sédiments et d'eau de rivière, en variant à la fois la durée et l'intensité du traitement, afin d'optimiser la qualité des préparations de cellules destinées à être emprisonnées dans les billes d'acrylamide (Cf Matériels et Méthodes). Si les conditions de sonication testées ont bien réduit la taille des particules de sédiment et des agrégats, ces petites structures agrégées se sont néanmoins retrouvées plus nombreuses en raison de la fragmentation de gros agrégats. Ainsi, nous avons pu isoler davantage de cellules mais la qualité des extractions (proportion de cellules isolées) était moins bonne, rendant impossible leur utilisation pour la réalisation de billes de polyacrylamide de qualité suffisante. De plus, dans ces conditions, le marquage des cellules au SYBR Green I ne permettait pas de faire clairement la distinction entre cellules et particules de sédiments, rendant impossible le dénombrement. Dans le but de s'affranchir des particules de sédiment, nous avons tenté d'extraire les cellules en utilisant un gradient de densité Histodenz. Si la méthode a été efficace pour extraire des cellules bien isolées, le rendement obtenu n'a pas permis d'atteindre la concentration cellulaire minimale nécessaire à la réalisation de billes de polyacrylamide (10^7 cellules / 30 μ L de tampon). Finalement, la méthode la plus efficace, qui s'est avérée être la plus simple, a été de vortexer vigoureusement l'échantillon pendant 30-40 s à vitesse maximale avant la formation des billes de polyacrylamide. En revanche, cette méthode ne s'est avérée possible qu'à partir d'échantillons d'eau, ce qui a de ce fait éliminé la possibilité d'utiliser l'epicPCR sur des sédiments, des biofilms ou encore des fèces de poisson dans ce travail.

Avant d'utiliser les billes de polyacrylamide lors de la PCR fusion, une étape de contrôle a été ajoutée au protocole initial afin de s'assurer qu'elles contenaient très majoritairement des cellules isolées. Cette étape consiste à marquer ces dernières avec du SYBR Green, puis les observer au microscope à épifluorescence et

déterminer la proportion de billes portant une, deux ou plusieurs cellules. D'après la loi de Poisson, quand un échantillon contient 90% de billes vides, la probabilité d'avoir 2 cellules dans la même bille est $P = 4,3 \times 10^{-3}$. Quand l'abondance de la séquence/fragment cible dans la population (f) est prise en compte, la probabilité d'avoir 2 cellules dans la même bille avec l'une d'elles portant la cible d'intérêt est de $P = 2f(4,5 \times 10^{-3})$. En supposant avoir une valeur f maximale de 10^{-3} / ADNr 16S et en utilisant des billes de polyacrylamide contenant au moins 85% de billes avec une cellule unique, la probabilité P d'avoir deux cellules dans la même bille, avec l'une d'elles portant la séquence cible peut être considérée comme négligeable, car inférieure à 10^{-6} . Dans cette étude, les billes (non vides) utilisées avaient une seule cellule dans au moins 87% des cas.

Dans un premier temps, l'epicPCR a été réalisée sur des billes de polyacrylamide préparées à partir d'une culture pure de la souche *E. coli* MG1656::SXT^{MO10} (CM1272) en suivant le protocole publié par Hultman *et al.* avec deux modifications mineures (Hultman *et al.*, 2018). D'abord, la température d'hybridation a été abaissée à 51°C lors de la PCR fusion (Tableau 7), pour être en accord avec le T_m des amorces ciblant *traB* dessinées. Ensuite, l'ADN polymérase haute-fidélité Phusion « Hot Start » a été remplacée par l'ADN polymérase Phusion classique. Étant donné qu'il s'agit, dans ce second cas, de la même polymérase sans le ligand qui permet d'inhiber le début de la réaction à température ambiante et que les réactions sont préparées sur glace, l'utilisation de la « Hot Start » n'est pas justifiée. Le produit de fusion théorique « *traB*-ADNr16S » de 341 pb obtenu à l'issue de la PCR nichée, et les amorces utilisées sont représentées sur la Figure 26. Les produits de la PCR nichée ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose mais aucun produit de fusion « *traB*-ADNr16S » de 341 pb n'a été observé, sauf en absence de « blocking primers » (BP) lors de la PCR nichée (Figure 27, puits 1/2 vs 4/5). Cependant, sans BP nous avons également constaté l'amplification de produits secondaires (Figure 26, puits 2). Ainsi, afin de favoriser l'amplification d'un produit unique, les PCR fusion et nichée (avec ou sans BP) ont été réalisées en utilisant le tampon HF qui permet à l'ADN polymérase de présenter un taux d'erreur deux fois inférieur à celui obtenu en tampon GC utilisé dans le protocole d'Hultman *et al.* (Hultman *et al.*, 2018). Ces modifications ont abouti à l'obtention d'un seul produit de fusion à la taille attendue (Figure 27, puits 10/11). Cependant, l'ajout de BP diminue le rendement d'obtention

du produit de fusion (Figure 27 puits 7/8 vs 10/11). Dans ces conditions, nous avons supposé que le faible rendement de la PCR nichée était la conséquence de la forte concentration en BP (3,2 μ M). Afin de vérifier cette hypothèse, des tests ont été effectués en utilisant les BP à 0,3 μ M ; 1,0 μ M ; 2.0 μ M et 3,2 μ M. Si le produit d'intérêt est bien obtenu en l'absence des BP, l'ajout de ces derniers afin d'éviter la formation de chimères entraîne une forte diminution du rendement de la réaction de PCR nichée, jusqu'à la disparition du produit d'intérêt au-delà de 1,0 μ M (Figure 28). Les 2 BP, BP-forward et BP-reverse, ont donc été testées individuellement à 0,3 μ M et 3,2 μ M (Figure 29). Si un produit unique de 340 pb est obtenu sans BP ou avec l'amorce BP-reverse, ce n'est pas le cas lorsque l'amorce BP-forward est utilisée, avec l'apparition d'un produit supplémentaire (250-300 pb) dès que sa concentration atteint 0,3 μ M. Ce produit de 250-300 pb pourrait correspondre au fragment provenant de l'ADNr16S (Figure 26). A 3,2 μ M de BP-forward, il n'y a plus que le produit compris entre 250-300 pb qui est amplifié de manière visible. L'hypothèse la plus probable serait que l'amorce BP-forward rentre en compétition avec l'amorce traB_{SXT-3_comp-inv} (F3), et empêche l'amplification du fragment *traB*. Ainsi, le seul fragment amplifié est celui correspondant au gène codant l'ADNr 16S d'environ 290 pb (Figure 26).

R3
GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTCGTCCA
 GGGGGCCGCCTTCGCCACCGGTATTCCTCCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACACCTGGAATTC
 TACCCCTCTACGAGACTCAAGCTTGCCAGTATCAGATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATT
 TCACATCTGACTTAACAAACCGCCTGCGTGCGCTTACGCCAGTAATTCCGATTAACGCTTGCACC
 CTCCGTATTACCGCGGCTGCTGCTGCATTACTGAGGATTCAAAAGGAAGCCATTTTTACCCAACCGAT
TTAGAGCG **F2'-R1'**
F3

Figure 26 : Séquence théorique du produit de fusion de 341 pb « *traB*-16S » après la PCR nichée réalisée sur la souche *E. coli* MG1656::SXT^{MO10} (CM1272). Les fragments codant l'ARNr 16S et *traB*, issus respectivement d'*E. coli* (GenBank: J01859.1) et *V. cholerae* (GenBank: AY055428.1), font 288 pb et 53 pb. Les amorces 806R (R3), traB_{SXT-3_comp-inv} (F3) et traB_{SXT-1_519R} (F2-R1') sont décrites dans le Tableau 7. La région surlignée en jaune correspond à la séquence cible des amorces BP-forward et BP-reverse.

Buffer HF								+	+	+		+	+	+
Buffer GC	+	+	+	+	+	+								
Template	+	+		+	+			+	+			+	+	
BPs				+	+	+						+	+	+

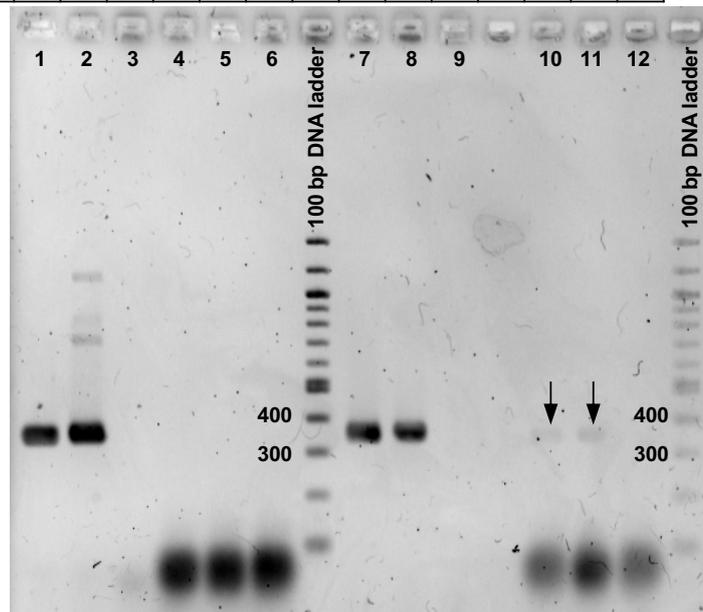


Figure 27 : Analyse électrophorétique des amplicons obtenus lors de la PCR nichée réalisée sur la souche *E. coli* MG1656::*SXT*^{MO10} (CM1272). Les différentes conditions testées sont indiquées sur le tableau au-dessus du gel. La taille attendue du produit de fusion « *traB-16S* » est de 341 pb.

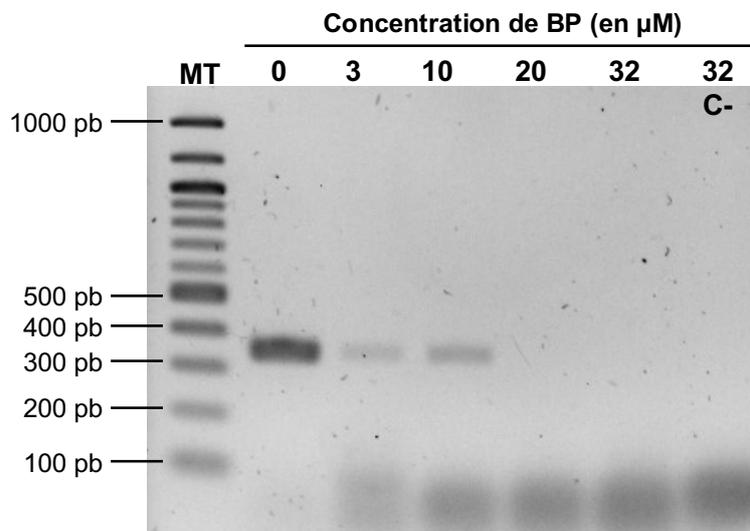


Figure 28 : Analyse électrophorétique des amplicons obtenus lors de la PCR nichée réalisée sur la souche *E. coli* MG1656::*SXT*^{MO10} (CM1272), avec un gradient de concentration croissant en « blocking primers » (ou BP). Le produit de fusion « *traB-16S* » fait 341 pb. Les concentrations finales de « blocking primers » sont de 0,3 μ M ;

1,0 μM ; 2,0 μM et 3,2 μM (concentration utilisée par le protocole initial de Spencer et al (Spencer et al., 2015)). Marqueur de taille (MT) de 100 pb. Le blanc de PCR « C-», a été réalisé sans ADN matrice et sans « blocking primers ».

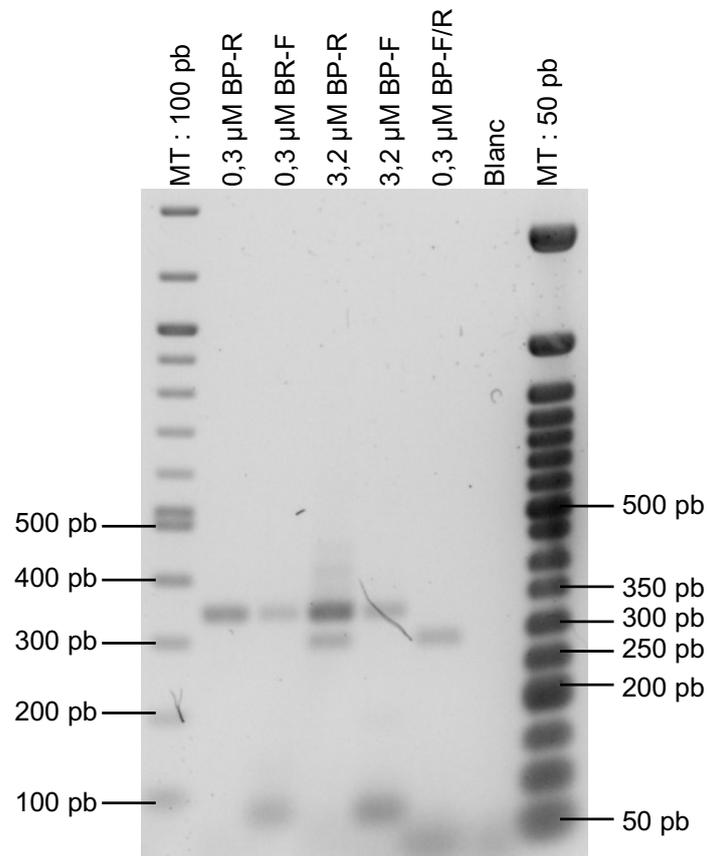


Figure 29 : Analyse électrophorétique des amplicons obtenus lors de la PCR nichée réalisée sur la souche *E. coli* MG1656::SXT^{MO10} (CM1272) avec différentes concentrations finales de BP-forward (BP-F), BP-reverse (BP-R) ou des deux blocking primers (BP) à 0,3 μM ou 3,2 μM . Marqueurs de taille (MT) : 50 bp et 100 bp. Le blanc de PCR a été réalisé sans ADN matrice et sans « blocking primers ».

Afin d'augmenter le rendement du produit de la PCR nichée, deux protocoles d'epicPCR ont été testés sur des billes de polyacrylamide réalisées avec des cellules extraites de l'eau de la Meurthe. Le premier protocole est composé de deux étapes et correspond à celui détaillé par Spencer et al (2016), avec d'abord une PCR fusion suivie par une PCR nichée. Le deuxième protocole se voit ajouter une étape supplémentaire après la PCR fusion et avant la PCR nichée, ayant pour objectif d'utiliser les BP seuls et à des concentrations élevées (3,2 μM) pour empêcher l'amplification des produits non fusionnés et limiter leur effet sur l'amplification du

produit d'intérêt lors de la PCR nichée à l'étape suivante. Dans tous les cas, les BP ont été maintenus lors de la PCR nichée et ont été testés à trois concentrations : 3,2 μM , 0,32 μM et 0,032 μM . Les résultats obtenus sont présentés dans la Figure 30.

Encore une fois, le protocole en deux étapes comme décrit par Spencer *et al* (2016) n'a pas permis l'obtention d'un produit à la taille attendue (Figure 30, flèche epicPCR). Cependant, que ce soit avec le protocole à deux ou trois étapes, l'utilisation des BP à plus basse concentration (0,32 μM ou à 0,032 μM) a permis l'obtention du produit d'intérêt avec une augmentation visible du rendement, mais avec l'apparition de produits secondaires lors de l'utilisation de BP à 0,032 μM . En prenant en considération l'ensemble des données obtenues lors des essais en vue d'augmenter le rendement de la PCR nichée, il a été décidé d'utiliser le nouveau protocole en 3 étapes (« epicPCR 2.0 » sur la Figure 30) composé d'une PCR fusion, suivie d'une PCR nommée « blocking PCR » avec uniquement des BP à 3,2 μM , pour finir avec une PCR nichée avec les BP à 0,32 μM .

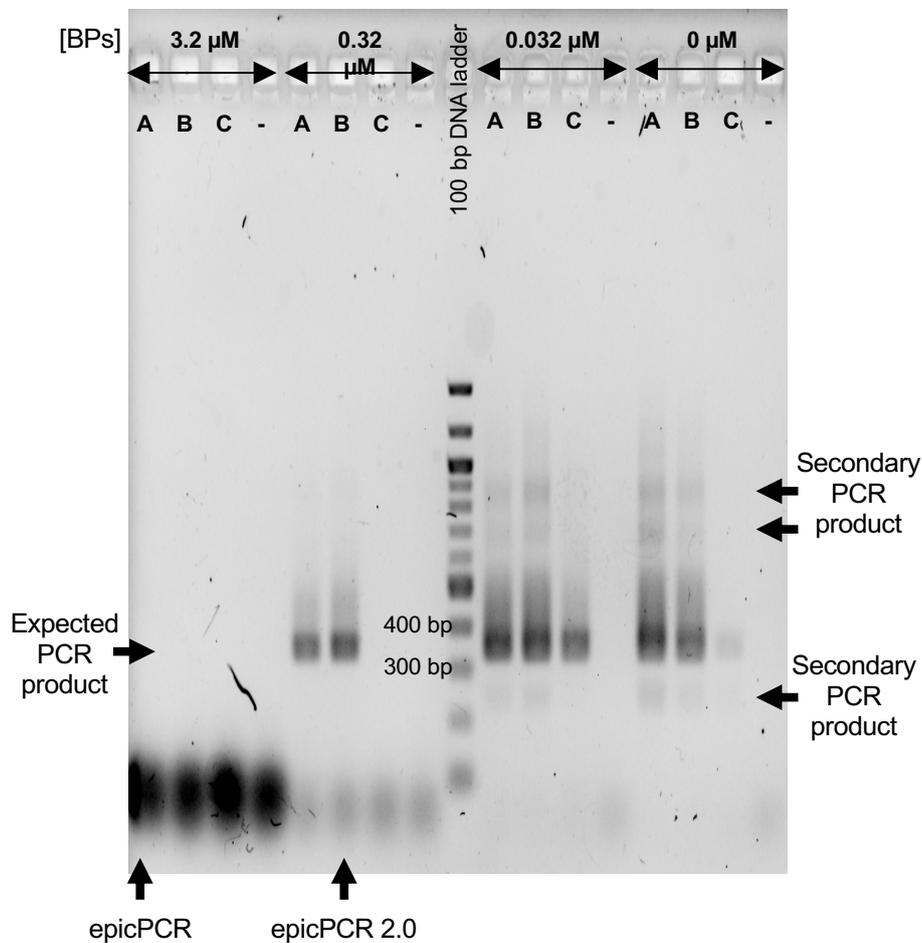
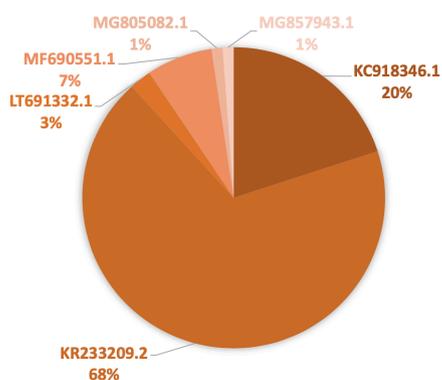


Figure 30 : Efficacité relative de la PCR nichée lors d'epicPCR réalisées en deux ou trois étapes en utilisant différentes concentrations en « blocking primers » (BP). Les

epicPCR ont été réalisées à partir de cellules extraites de l'eau de la Meurthe. Les puits A et C correspondent à une *epicPCR* en deux étapes, où l'ADN de la PCR fusion a été utilisé tel quel pour la PCR nichée (A) et dilué au 1/10e pour (C) pour diminuer la présence d'éventuels inhibiteurs. Les puits B correspondent aux produits de l'*epicPCR* réalisée en 3 étapes. Le produit d'intérêt (fragment du gène *traB* + fragment du gène codant l'ARNr 16S) mesure environ 350 pb. La flèche indiquant « *epicPCR* » correspond au résultat obtenu en utilisant le protocole d'Hultman et al (2018), et celle indiquant « *epicPCR 2.0* » correspond aux conditions choisies pour ce travail.

3.2. CONTROLE DE LA METHODE PAR CLONAGE/SEQUENÇAGE

Afin de contrôler la spécificité des amorces en *epicPCR*, une réaction a été réalisée sur un échantillon d'eau de rivière prélevé dans la Meurthe au niveau de Nancy. Les fragments obtenus lors de la PCR nichée ont été clonés, et les plasmides recombinants de 96 clones ont été séquencés par méthode Sanger mais la mauvaise qualité d'une partie du séquençage n'a pas permis l'analyse des séquences de 11 de ces 96 clones. Toutefois, l'ensemble des 85 séquences restantes (soit 88,5%) mesuraient 341 pb, comme le fragment théorique présenté dans la Figure 26, et les séquences correspondant aux amorces qui servent à amplifier le fragment *traB* étaient présentes, ce qui a permis de confirmer leur appartenance à des éléments de la famille SXT/R391. L'analyse des fragments correspondant à l'ADNr 16S au sein des amplicons séquencés a permis l'identification de deux nouveaux hôtes des éléments SXT/R391, l'un appartenant au genre *Aeromonas*, et l'autre au genre *Nitriicola* (Figure 31). Bien qu'aucun de ces genres n'ait été décrit dans la littérature comme étant un hôte connu des éléments SXT/R391, il s'avère qu'ils appartiennent tous les deux à la classe des γ -protéobactéries, comme c'est le cas pour tous les autres hôtes connus. Les espèces décrites appartenant au genre *Nitriicola* ont toutes été isolées dans l'eau et les sédiments d'un lac salé, un biotope particulier qui pourrait être proche de ceux retrouvés dans la Meurthe en raison de sa salinité. Enfin, en ce qui concerne les bactéries du genre *Aeromonas*, elles sont fréquemment décrites dans le microbiote du poisson que nous avons déjà identifié comme riche en éléments SXT/R391 (Sugita et al., 1995; Beaz-Hidalgo et al., 2009), ce qui pourrait justifier ce résultat.



KC918346.1: Uncultured *Aeromonas* sp. clone 7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

KR233209.2: *Nitricola* sp. R4-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

LT691332.1: Uncultured *Nitricola* sp. partial 16S rRNA gene, isolate 441T_16748

MF690551.1: Uncultured bacterium clone OTU2575 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

MG805082.1: Uncultured *Aeromonadaceae* bacterium clone 1b_73000 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

MG857943.1: Uncultured bacterium clone OTU88_L_2_D_2033906 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Figure 31 : Analyse des amplicons obtenus par epicPCR sur l'eau de la Meurthe ayant été clonés et séquencés par la méthode Sanger. Le fragment correspondant à l'ADNr 16S a été comparé aux bases de données par BLASTn. Le graphique représente le pourcentage de séquences identiques.

3.3. IDENTIFICATION DES HOTES DES ICE SXT/R391 DANS L'ORNE ET LA MEURTHE

Détectés dans de nombreux environnements aquatiques, les éléments SXT/R391 ont été quantifiés en abondance dans la Meurthe, ou de façon plus modérée dans l'Orne (Figure 23). Notre étude a été poussée plus en avant par la recherche du spectre d'hôtes de ces éléments par epicPCR, non seulement dans les eaux de ces deux écosystèmes, mais aussi dans les effluents de stations d'épuration débouchant dans ces rivières. Cette étude a été menée afin (i) de définir l'hôte préférentiel des ICE SXT/R391 dans ces environnements et (ii) d'étudier le devenir des bactéries hôtes d'origine anthropique une fois dans l'environnement, bien que nous n'ayons pas mis en évidence d'augmentation de l'abondance des éléments dans la rivière en aval des stations d'épuration (Figures 23-24).

Dans un premier temps, des billes de polyacrylamide ont été réalisées à partir de bactéries extraites de l'eau de la Meurthe. Puis, l'epicPCR a été réalisée en triplicata, et les données de séquençage obtenues par méthode Illumina 2 × 250 pb ont été analysées telles que décrites par Spencer *et al.*, (Spencer *et al.*, 2016). Dans cette méthode de validation, une OTU (« Operational Taxonomic Unit » ou Unité Taxonomique Opérationnelle, qui dans notre cas correspond au fragment d'ADNr 16S d'une bactérie portant un élément SXT/R391), est validé si elle est présente dans chacun de ces triplicatas. Cette méthode initiale de validation basée sur l'obtention

d'OTU dans les 3 répliques d'un triplicata technique, ci-après dénommée validation « réplikat technique 3/3 », a été créée pour supposément empêcher la validation d'OTU qui résulteraient de produits d'amplification chimères. Cela suppose donc que, dans un même lot de billes de polyacrylamide, il n'y aurait pas plusieurs billes de polyacrylamide comportant deux mêmes cellules et pouvant toutes conduire à l'obtention d'une même OTU chimère dans chacune des 3 répliques. Si par la spécificité des amorces utilisées, l'epicPCR est une méthode qui permet d'amplifier des séquences cibles sensiblement rares dans la complexité de métagénomés environnementaux, la méthode présente des limites lorsque les cibles d'intérêt sont trop peu abondants. C'est notamment le cas des ICE SXT/R391 dans quelques-uns des échantillons de la Meurthe présentés précédemment. Sachant (i) qu'il y a environ 3×10^6 bactéries mises en jeu dans une réaction d'epicPCR et (ii) que l'abondance relative des éléments SXT/R391 peut être aussi faible que 10^{-6} - 10^{-7} copies d'éléments par ADNr 16S, alors très peu de bactéries portant les éléments d'intérêt seront probablement mises en jeu dans une réaction d'epicPCR. Par voie de conséquence, il est probable que très peu de séquences différentes puissent parfois être obtenues pour une assignation taxonomique. Dans ces conditions, l'analyse des données telle que décrite par Spencer *et al.*, (Spencer *et al.*, 2016) pourrait être trop contraignante, et les résultats obtenus ne seraient pas représentatifs de l'échantillon. Cette étape, qui correspond à la validation des OTU, a donc été adaptée pour pouvoir être utilisée avec des séquences cibles peu abondantes. Afin d'éviter l'obtention erronée de la même OTU issue de produits chimères dans plusieurs réplicats issus d'un même lot de billes (réplicats techniques), l'epicPCR a été réalisée sur 3 lots indépendants de billes de polyacrylamide, appelés « réplicats biologiques ». Ainsi, la détection d'OTU à partir de ces réplicats biologiques devrait être au moins aussi robuste qu'à partir de réplicats techniques.

Afin d'étudier l'impact de ces différentes modalités, des epicPCR 2.0 ont donc été réalisées en triplicatas techniques et biologiques (Figure 32) sur des billes comprenant des bactéries issues de l'eau de la Meurthe. Si 128 OTU ont pu être détectées tous réplicats confondus, seules 67 ont été finalement validées comme OTU d'hôtes d'ICE SXT/R391 car présentes dans 2/3 ou 3/3 réplicats (Figure 33). D'abord, la comparaison des données obtenues de duplicata ou de triplicata a permis de mettre en évidence que la validation des OTU issues de triplicata techniques n'est pas indépendante de leur validation au sein des potentiels duplicatas techniques que l'on

peut constituer avec ces mêmes 3 réplicats (Test McNemar, $P = 2 \times 10^{-6}$). Cela veut dire que la détection d'une OTU dans un réplicat technique influence sa détection dans un autre réplicat obtenu avec le même lot de billes de polyacrylamide. Aucune relation de dépendance (Test McNemar, $P = 0,27$) n'a été observée lorsque les OTU sont validées à partir de duplicata ou triplicata biologiques. Par ailleurs, un nombre plus important d'OTU ont été validées avec l'utilisation des réplicats techniques qu'avec celle des réplicats biologiques. Cette différence est certainement liée à la faible abondance des éléments d'intérêt. En effet, en cas d'échantillonnage non-représentatifs de la population bactérienne, avec certains échantillons pouvant être plus abondants en hôtes de SXT/R391 que la population dont ils sont issus, il est plus probable de trouver la même OTU en utilisant un même lot de billes de polyacrylamide (= *via* réplicats techniques), qu'à partir de 3 lots différents (= *via* réplicats biologiques). La Figure 34 représente la probabilité cumulative de la détection et validation des OTU en fonction de la méthode de validation (présentée sur la Figure 32). Ainsi, si le nombre d'OTU validées à partir de triplicata techniques et duplicata biologiques est similaire (Test Student, $P = 0,68$), le niveau de confiance de leur validation par des duplicata biologiques est meilleure (cf tests de McNemar ci-dessus), même si cette seconde approche peut conduire à une possible éviction des OTU les plus rares. La prise en compte de toutes ces comparaisons a permis de mettre en place des niveaux de confiance dégressifs en fonction de la méthode de validation des OTU utilisée. Ainsi le meilleur niveau de confiance est accordé aux OTU validées par leur présence dans 3/3 réplicats biologiques (Niveau de confiance 5, $N=5$), puis dans 2/2 ou 2/3 réplicats biologiques ($N=4$), 3/3 réplicats techniques ($N=3$), 2/3 ou 2/2 réplicats techniques ($N=2$) ou dans un unique réplicat ($N=1$).

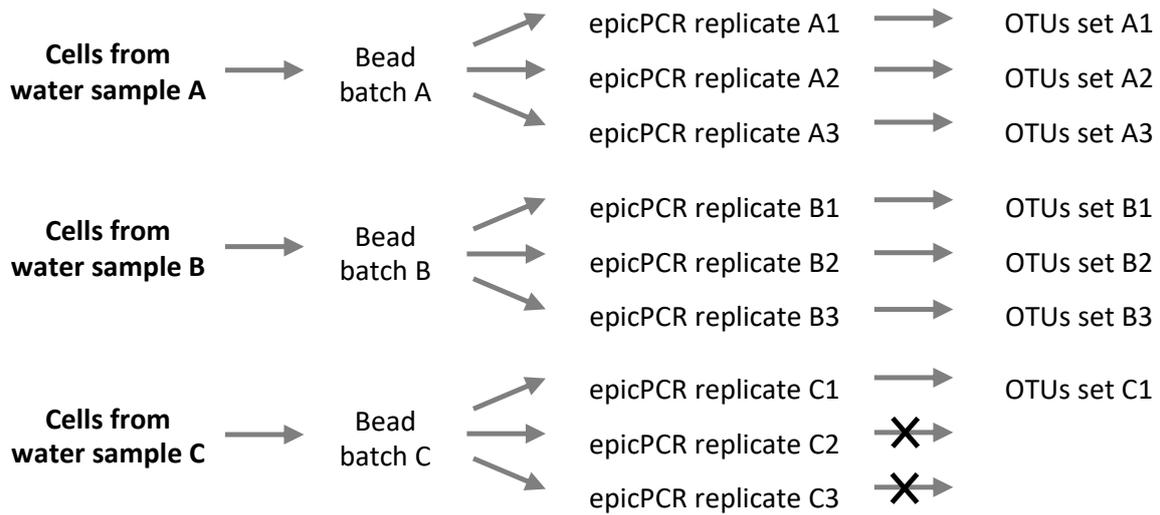


Figure 6 : Plan d'expérience pour la validation des OTU obtenues de répliques techniques ou biologiques. Les répliques réalisés à partir d'un même lot de billes sont des répliques techniques, les répliques réalisés à partir de différents lots de billes sont considérés comme des répliques biologiques. D'après Roman et al., (2021b).

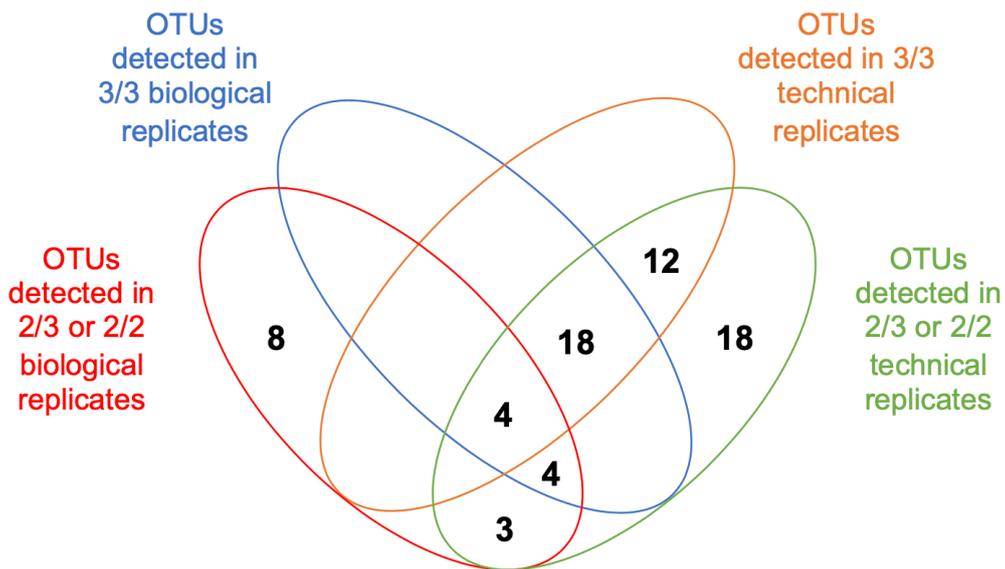


Figure 7 : Le diagramme de Venn représente la répartition des OTU pouvant être obtenues par les différentes méthodes de validation des données d'epicPCR réalisées sur l'eau de la Meurthe. D'après (Véronica L. Roman et al., 2021b).

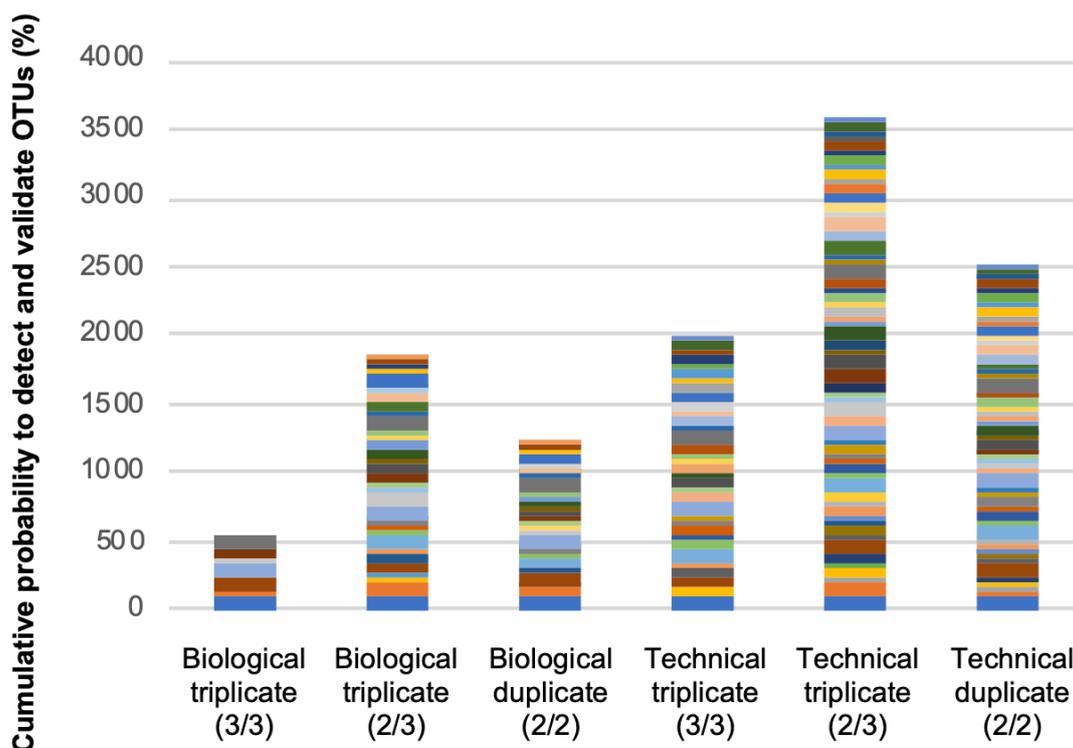


Figure 34 : Efficacité de l'expérience d'epicPCR exprimée en probabilité cumulée de détecter et valider une OTU faisant partie des hôtes des éléments SXT/R391 (dans l'eau de la rivière Meurthe). La probabilité cumulée est déterminée en fonction de la méthode de validation des OTUs en duplicatas ou triplicatas techniques (Le plan d'expérience est présenté dans la Figure 32). Chaque couleur/bande représente un OTU unique.

L'extraction de l'ADN total des échantillons issus de l'Orne et de la Meurthe puis une approche de « métabarcoding » sur les gènes d'ARNr 16S a permis la réalisation de deux arbres phylogénétiques (Figures 35-36) sur lesquels ont ensuite été positionnées les familles de bactéries portant des ICE SXT/R391 identifiées par epicPCR 2.0 avec le niveau de confiance correspondant à ces identifications. Globalement, si les éléments SXT/R391 ont été détectés dans différents phyla, c'est chez les protéobactéries qu'ils sont majoritairement retrouvés, plus particulièrement chez les γ -protéobactéries, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Pembroke and Piterina, 2006; Bioteau, Durand and Burrus, 2018; Li *et al.*, 2018; Sato *et al.*, 2020). On retrouve donc des hôtes appartenant aux *Enterobacteriaceae* avec différents niveaux de confiance dans les différents échantillons analysés (3-4 dans les effluents de STEP, et 1-3 dans l'eau), mais aussi des *Aeromonadaceae* avec le meilleur niveau de confiance, et ce malgré l'absence de détection des éléments

d'intérêt dans des isolats environnementaux d'*Aeromonas* ssp. (Cf. §2.1). L'espèce hôte majoritaire de cette famille présente dans nos échantillons est *Tolomonas auensis*, une bactérie initialement identifiée comme productrice de toluène et isolée à partir d'un lac d'eau douce (Fischer-Romero, Tindall and Juttner, 1996). Bien qu'abondamment décrit dans la littérature comme hôtes environnementaux de SXT/R391, les faibles représentations des *Vibrionaceae* dans les populations étudiées n'ont pas permis de les retrouver par métagénomique sur ADNr 16S et donc de les placer dans les arbres phylogénétiques. Malgré cette faible abondance, ils ont bien été détectés par epicPCR parmi les hôtes de SXT/R391 présents dans l'eau de l'Orne (Tableau 10) avec un faible niveau de confiance. Cela illustre la différence de puissance et de profondeurs d'analyse des approches de métabarcoding sur ADNr 16S et d'epicPCR. Cela suggère aussi très fortement que, dans les conditions d'epicPCR que nous avons mises en œuvre, une OTU identifiée avec un faible niveau de confiance pourrait ne pas correspondre à un résultat incertain, mais plutôt à la mise en évidence d'un hôte rare, identifié à la limite de détection de la méthode. En dehors des γ -proteobactéries, les meilleurs niveaux de confiance ont été obtenus chez des β -protéobactéries comme les *Comamonadaceae* et des ε -protéobactéries telles les *Campylobacteraceae*, ce qui n'a jamais été décrit dans la littérature parmi les hôtes connus de SXT/R391.

séquences d'OTU d'une même famille / somme des séquences d'un échantillon) × 100 000). Les astérisques (*) représentent les familles non identifiées.

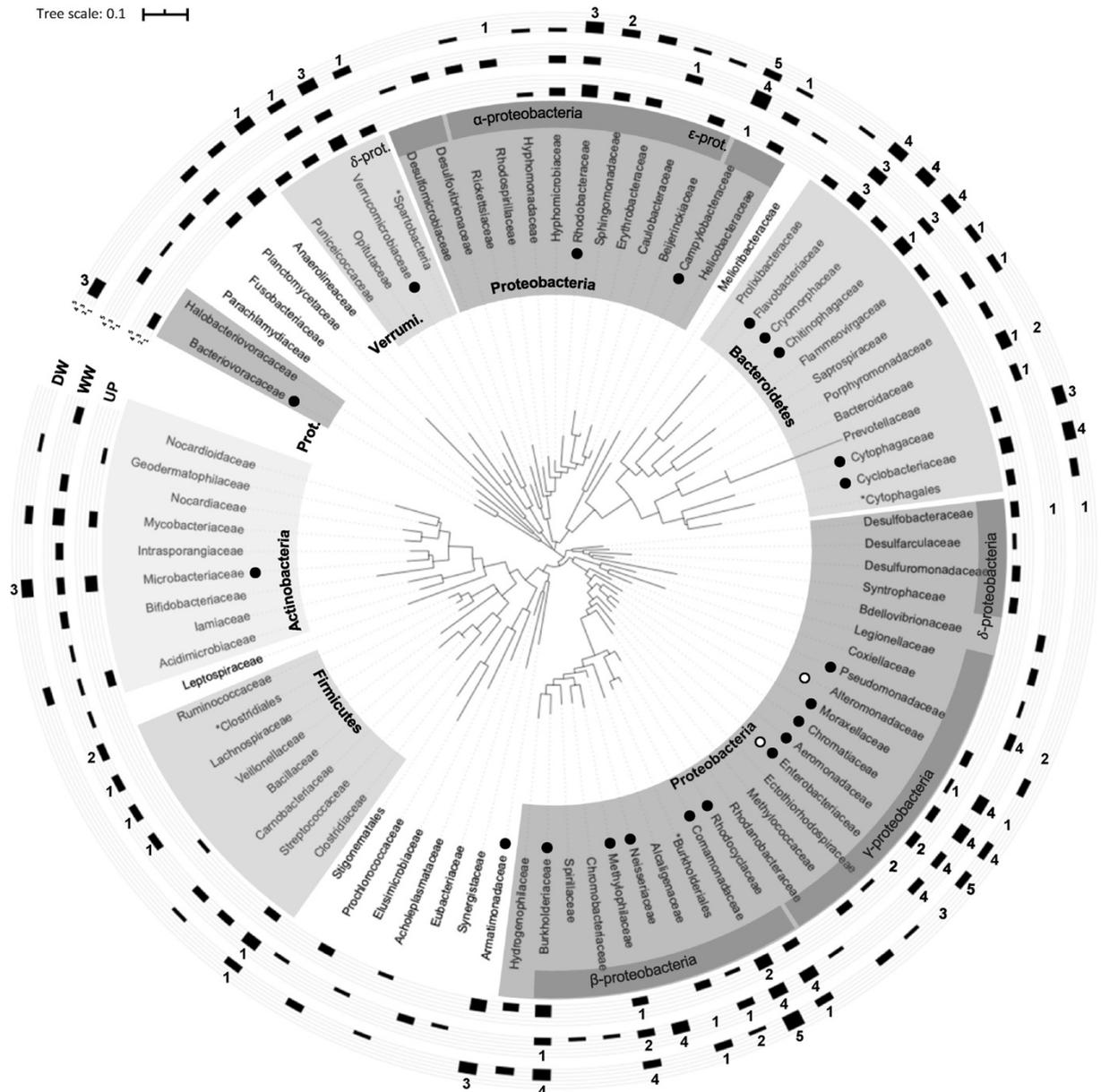


Figure 36 : Spectre d'hôtes des éléments SXT/R391 dans les eaux de la Meurthe identifiés par epicPCR. UP : échantillon d'eau de la rivière prélevée en amont de de la STEP, WW : échantillon d'eau prélevé dans l'effluent de la STEP, DW : échantillon d'eau prélevé en aval de la STEP. L'arbre phylogénétique a été construit en utilisant l'OTU le plus abondant de chaque famille. Cinq niveaux de confiance ont été définis (N=1 à N=5) pour caractériser la présence des éléments SXT/R391 dans les familles présentes sur cet arbre. Les familles présentant un cercle vide ont déjà été décrites dans la littérature comment étant des hôtes des éléments SXT/R391, celles présentant un cercle plein ont obtenu le meilleur niveau de confiance dans ce travail (N≥3). Les

rectangles noirs représentent l'abondance relative du gène codant l'ARNr 16S pour chacune des familles définies en UP, WW et DW (Log_{10} (somme du nombre de séquences d'OTU d'une même famille / somme des séquences d'un échantillon) \times 100 000). Les astérisques () représentent les familles non identifiées.*

Tableau 10 : Résultats de l'analyse des données d'epicPCR réalisées sur la Meurthe et l'Orne, lorsque le nombre de séquences codant le gène de l'ARNr 16S était inférieur à 10 séquences par OTU (et par conséquent non représentés dans les arbres phylogénétiques respectifs). D'après (Veronica L. Roman et al., 2021a).

River	Sampling site	Level of confidence	Family
Meurthe	UP	1	Campylobacteraceae
		2	Enterobacteriaceae ○
		1	Idiomarinaceae ○
		2	Oceanospirillaceae ●
	WW	1	Alcaligenaceae
		1	Desulfobacteraceae
		1	*alphaproteobacteria
		1	Pasteurellaceae
	DW	2	Bacteroidaceae
		1	Desulfobacteraceae
		4	Enterobacteriaceae ○
		1	Moraxellaceae
		2	Pseudomonadaceae
1		Rhodospirillaceae	
1		Idiomarinaceae ○	
1		Oceanospirillaceae ●	
1		Oxalobacteraceae	
4		Planococcaceae	
4		Shewanellaceae ○	
1	Spirochaetaceae		
Orne	UP	1	Oceanospirillaceae ●
		1	Enterobacteriaceae ○
	WW	1	Desulfomicrobiaceae
		1	Ignevibacteriaceae
		1	Oceanospirillaceae ●
		2	*Burkholderiales
	2	Campylobacteraceae	
	DW	1	Vibrionaceae ○
		1	*Burkholderiales
		1	Aeromonadaceae
2		Oceanospirillaceae ●	

Les astérisques (*) représentent les familles non classées ("unclassified families"). Les cercles vides et pleins (gris) représentent les familles d'hôtes des éléments SXT/R391 déjà identifiées respectivement dans la littérature ou détectées dans ce travail (résultats des approches clonage/séquençage et epicPCR).

En outre, l'analyse des hôtes d'ICE SXT/R391 dans différentes sections de la rivière et dans les rejets d'une station d'épuration, a permis de révéler l'origine anthropique ou environnementale probable de certains hôtes dans les deux écosystèmes étudiés. Ainsi, le pathogène humain et animal *Arcobacter cryaerophilus* (*Campylobacteraceae*) n'a été identifié que dans les effluents de STEP et dans les eaux de la Meurthe en aval de la STEP, il pourrait donc s'agir d'une bactérie d'origine anthropique polluant l'écosystème, alors que *Neptunomonas acidivorans* (*Oceanospirillaceae*), une bactérie halophile non-pathogène, a été uniquement identifiée dans la rivière mais pas dans les effluents, il s'agirait alors d'une bactérie strictement environnementale. Malgré l'absence d'effet quantifiable des rejets de STEP sur l'abondance des hôtes d'ICE SXT/R391 (Figure 23), les données d'epicPCR ont permis d'observer une modification de la composition des populations de ces hôtes dans les rivières en aval des STEP. De plus, s'il apparaît que les hôtes environnementaux des ICE SXT/R391 sont plus nombreux et variés que ce qui pouvait être attendu en se basant sur les études sur isolats réalisées précédemment, ils sont véhiculés à la fois par des bactéries anthropiques et des bactéries environnementales.

Les données obtenues par epicPCR ont permis de cerner des espèces de bactéries qu'il serait écologiquement pertinent d'utiliser comme bactéries donneuses dans des expériences de transfert de SXT/R391 vers des communautés microbiennes environnementales maintenues en microcosmes. En accord avec les données de la littérature et les résultats obtenus, les bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* semblent être un choix judicieux puisqu'il s'agit de γ -protéobactéries trouvées à la fois dans la rivière et les effluents et identifiées dans ce travail comme étant des hôtes des éléments SXT/R391 avec un des meilleurs niveaux de confiance. C'est ainsi notamment chez *E. coli*, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*, qu'a été étudié l'induction du transfert de l'élément SXT^{MO10} *in vitro*.

PARTIE 2 : ETUDE DE LA REGULATION ET DU TRANSFERT DE L'ICE SXT^{MO10}

Ubiquitaires chez les bactéries, les EGM jouent un rôle fondamental dans la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques (Partridge *et al.*, 2018). A ce jour, au moins cinq familles d'EGM ont été décrites comme régulées par la présence d'antimicrobiens à des concentrations sub-inhibitrices (Tableau 11) (Tomich, An and Clewell, 1980; Salyers, Shoemaker and Li, 1995; Beaber, Hochhut and Waldor, 2004; Cambray *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2017; Scornec *et al.*, 2017), c'est-à-dire des concentrations en dessous de la CMI qui pourraient être potentiellement retrouvées dans l'environnement. La régulation par des antimicrobiens est particulièrement vraie chez les ICE de la famille SXT/R391, où les fonctions d'excision et de transfert conjugatif sont régulées par l'expression des promoteurs appartenant aux régulons SetR et SetCD, qui sont eux-mêmes contrôlés par la réponse SOS, c'est à dire la réponse globale aux stress génotoxiques. Certains antibiotiques sont capables d'induire la réponse SOS, c'est notamment le cas de la ciprofloxacine, une fluoroquinolone capable d'inhiber la réplication de l'ADN. Ainsi, l'exposition à la ciprofloxacine d'une souche d'*E. coli* portant un élément SXT/R391 a été démontrée comme augmentant la fréquence de transfert de l'élément d'un facteur 20 (Beaber, Hochhut and Waldor, 2004). Certaines études indiquent que l'induction de la réponse SOS pourrait varier en partie en fonction de l'hôte bactérien. Dans un exemple précis, Baharoglu et Mazel (Baharoglu and Mazel, 2011) montrent que le chloramphénicol, un antibiotique ciblant la synthèse protéique, peut être à l'origine de l'activation de la réponse SOS chez *V. cholerae* mais pas chez *E. coli*. Que ce soit dans un contexte d'antibiothérapie ou bien dans l'environnement, cela voudrait dire que l'inductibilité du transfert des ICE SXT/R391 pourrait dépendre des hôtes bactériens dans lesquels ils se trouvent, ou bien encore des polluants/antibiotiques présents dans ces milieux.

Tableau 11 : Familles d'éléments génétiques mobiles dont certaines fonctions de transfert, transposition ou d'induction de la recombinaison sont induites par l'exposition à des antibiotiques à des concentrations sub-inhibitrices.

Eléments mobiles	Stimulateurs	Effets <i>in vitro</i>	Références
CTnDOT (ICE)	Tétracycline	Transfert induit × 1000	Salyers <i>et al.</i> , 1995
Tn917 (transposon)	Erythromycine	Transposition induit × 6-7	Clewell <i>et al.</i> , 1982
Tn916 (ICE)	Tétracycline et MLS	Transfert induit × 1000	Scornec <i>et al.</i> , 2017
SXT^{MO10}	Ciprofloxacine	Transfert induit × 20	Beaber <i>et al.</i> , 2004
Intégrons	Quinolones, UV, Mitomycine C	Induction de la recombinaison	Cambray <i>et al.</i> , 2011
SCCmec (îlots génomiques)	Betalactames, Quinolones ...	Excision et Intégration × 10 à 10 ⁵ ; Réponse SOS	Lieu <i>et al.</i> , 2017

Le projet AquaResist, dans lequel s'inscrit ce travail, consiste à étudier l'effet des pratiques en médecine vétérinaire sur la régulation et le transfert des ICE SXT/R391 dans l'environnement. Dans ce contexte, l'ICE SXT^{MO10} a été notre modèle d'étude et nous nous sommes intéressés à définir les antibiotiques ou polluants classiquement utilisés ou présents dans les systèmes aquacoles qui pourraient induire le transfert des éléments SXT/R391. Pour cela, une méthode de criblage sur milieu solide mise en place au laboratoire a été utilisée pour étudier l'effet d'une série de molécules sur l'induction de promoteurs contrôlant les fonctions de transfert de l'élément. Pour certains antibiotiques, les concentrations d'induction optimales ont ensuite été déterminées en milieu liquide afin de les tester dans des expériences de conjugaison *in vitro*. Enfin, plusieurs bactéries hôtes de SXT^{MO10} ont été étudiées afin de définir dans quelle mesure la nature de l'hôte pouvait influencer la dissémination de l'élément. Accessoirement, les résultats obtenus permettront d'identifier des bactéries donneuses de SXT^{MO10} à utiliser dans la dernière partie de ce travail qui consistera à étudier le transfert de l'ICE en conditions complexes, des microcosmes de rivière, un

environnement par ailleurs démontré comme étant riche en éléments SXT/R391 (Cf. Partie 1, §2.2.2).

1. ÉTUDE DE L'INDUCTION ET DE LA MOBILITE DE SXT^{MO10} CHEZ *E. COLI*

Chez la famille d'ICE SXT/R391, la mobilité de l'élément est contrôlée par SetR qui joue le rôle de répresseur du promoteur P_{s086}. Ce dernier, considéré comme le promoteur central de la régulation des ICE SXT/R391, est responsable de l'expression du régulon SetCD qui contrôle l'excision et le transfert de l'élément (Beaber, Hochhut and Waldor, 2004). Ainsi, la dissémination des ICE SXT/R391 est la conséquence directe de l'expression de gènes impliqués dans ce transfert, et l'évaluation de l'expression de ces gènes peut être utilisée comme indicateur de l'activation des fonctions d'excision et de transfert de ces éléments. Réciproquement, connaître les conditions ou molécules qui induisent l'expression de ces fonctions, et donc des promoteurs correspondants, est susceptible d'être un bon indicateur de ce qui promeut, ou pas, le transfert de l'élément. Quoi qu'il en soit, étudier l'expression de promoteurs gouvernant la mobilité de SXT/R391 pour comprendre l'effet de molécules reste extraordinairement fastidieux. En effet, il n'est à priori pas possible de savoir si une molécule donnée est active, et si elle l'est, à quelles concentrations ses effets s'exercent. Une partie du problème a pu être contournée grâce à une méthode de criblage originale développée au LCPME. Pour partie, ce travail a contribué à enrichir les développements méthodologiques de la méthode notamment en établissant des correspondances entre l'induction de l'expression des promoteurs gouvernant la mobilité de SXT^{MO10} et la réalité d'une induction du transfert conjugatif de l'élément. De nouveaux inducteurs ont ainsi pu être identifiés.

1.1. METHODE DE CRIBLAGE POUR L'IDENTIFICATION DE MOLECULES INDUCTRICES DE LA MOBILITE DES ICE SXT^{MO10}

Dans une étude récente menée au laboratoire, des fusions transcriptionnelles ont été réalisées entre les gènes rapporteurs *luxCDABE*, codant une luciférase avec une activité de bioluminescence, et différents promoteurs impliqués dans les fonctions de conjugaison, d'intégration/excision ou de mobilité, associées à l'élément SXT^{MO10}. Les promoteurs étudiés sont annotés sur la Figure 37 (Guilloteau *et al.*, 2021). Les

fusions transcriptionnelles construites ont ensuite été introduites dans deux souches d'*E. coli*, MG1656 et MG1656::SXT^{MO10}, afin de tenir compte de l'effet de l'élément SXT^{MO10} sur la régulation de ses propres promoteurs. La liste des souches obtenues, ici appelées biosenseurs, est présentée dans le Tableau 5.

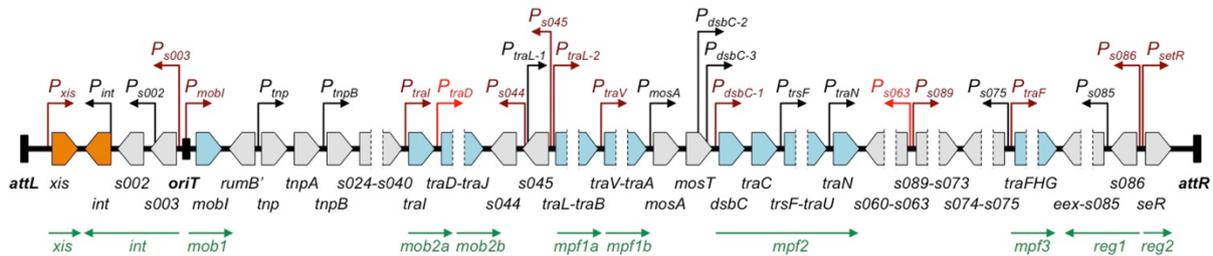


Figure 37 : Promoteurs impliqués dans les fonctions de mobilité des éléments SXT^{MO10}. Les gènes sont représentés par les flèches épaisses colorées en bleu lorsqu'ils sont impliqués dans les fonctions de conjugaison, ou en orange lorsqu'ils sont impliqués dans les fonctions d'intégration ou d'excision de SXT^{MO10}. Les flèches épaisses coupées par des lignes en pointillées représentent des opérons délimités par le premier et le dernier gène. Les flèches fines au-dessus des gènes représentent les promoteurs potentiels (en noir) ou confirmés par d'autres études (en marron) (Beaber and Waldor, 2004; Dziewit et al., 2007; Garriss, Poulin-Laprade and Burrus, 2013; Poulin-Laprade, Carraro and Burrus, 2015). Les opérons impliqués dans la mobilité de l'élément SXT^{MO10} sont marqués par des flèches fines et vertes en dessous des gènes, comme annotés dans l'étude de Poulin-Laprade et al., (Poulin-Laprade, Carraro and Burrus, 2015). D'après Guilloteau et al, 2021.

Afin de s'affranchir des limites posées par le choix des concentrations des molécules à tester, la méthode d'évaluation développée consiste à déposer un disque chargé d'antibiotique à la surface d'une gélose préalablement inoculée avec l'un ou l'autre des biosenseurs construits. Dans ces conditions, le biosenseur n'est pas seulement exposé à une concentration définie de manière arbitraire, mais il est exposé au gradient de concentration créé par la diffusion de l'antibactérien dans la gélose (Figure 38 a). Une caméra à comptage de photons (caméra CCD) à haute sensibilité est ensuite utilisée pour prendre des photographies et mesurer les niveaux de luminescence émis, ce qui permet d'obtenir respectivement un antibiogramme et un « luminogramme » (Figure 38 b). Les images obtenues peuvent être visualisées grâce

à l'interface du logiciel d'acquisition IndiGO qui permet de paramétrer la mesure de la luminescence et où les couleurs les plus chaudes traduisent les émissions de luminescence les plus élevées. Quoiqu'il en soit, l'interface IndiGo ne permet guère une analyse autre que visuelle alors même que la quantité de photons émis au niveau de chaque pixel a été enregistrée. Pour pousser plus loin l'analyse, les luminogrammes obtenus ont été traités grâce à un programme d'extraction et d'analyse des données de luminescence, développé en collaboration avec Cédric Pradalier de Georgia Tech-Lorraine (Guilloteau *et al.*, 2021). Un exemple de profil de luminescence est représenté en Figure 38 c. Ce type de profil recense la variation de la luminescence enregistrée pixel par pixel et permet de calculer un facteur d'induction de la luminescence émise par le biosenseur portant un promoteur d'intérêt, en fonction de la distance au disque de dépôt. Dans l'exemple de la Figure 38 c, la toxicité de la molécule testée crée un halo d'inhibition (antibiogramme) pour lequel la luminescence est inférieure au bruit de fond jusqu'à 40 pixels après la zone de dépôt. Au-delà de cette zone, la toxicité diminue et la valeur du facteur d'induction augmente pour atteindre 2, à 55 pixels du dépôt. Bien qu'une conversion des distances exprimées en pixels en millimètres soit possible car les images sont toujours prises à une distance fixe, celle-ci n'a pas d'intérêt dans le cadre de ce travail. Pour chaque biosenseur, l'automatisation de la méthode d'analyse d'image permet d'extraire des données de bruit de fond, d'émission de luminescence et le calcul du facteur d'induction pour 16 couples d'antibiotique/biosenseur à la fois, à 3 temps d'exposition (1 s, 10 s, 30 s) et en triplicata, ce qui permet également de calculer les moyennes et écarts-types de chacun des paramètres étudiés. Non seulement cette méthode permet d'étudier l'effet de toute une gamme de concentration d'un antibiotique donné mais en plus, l'automatisation de la méthode d'analyse rend désormais possible de traiter une image en moins de 2 s, et donc d'étudier un grand nombre de couples biosenseur/antibiotique.

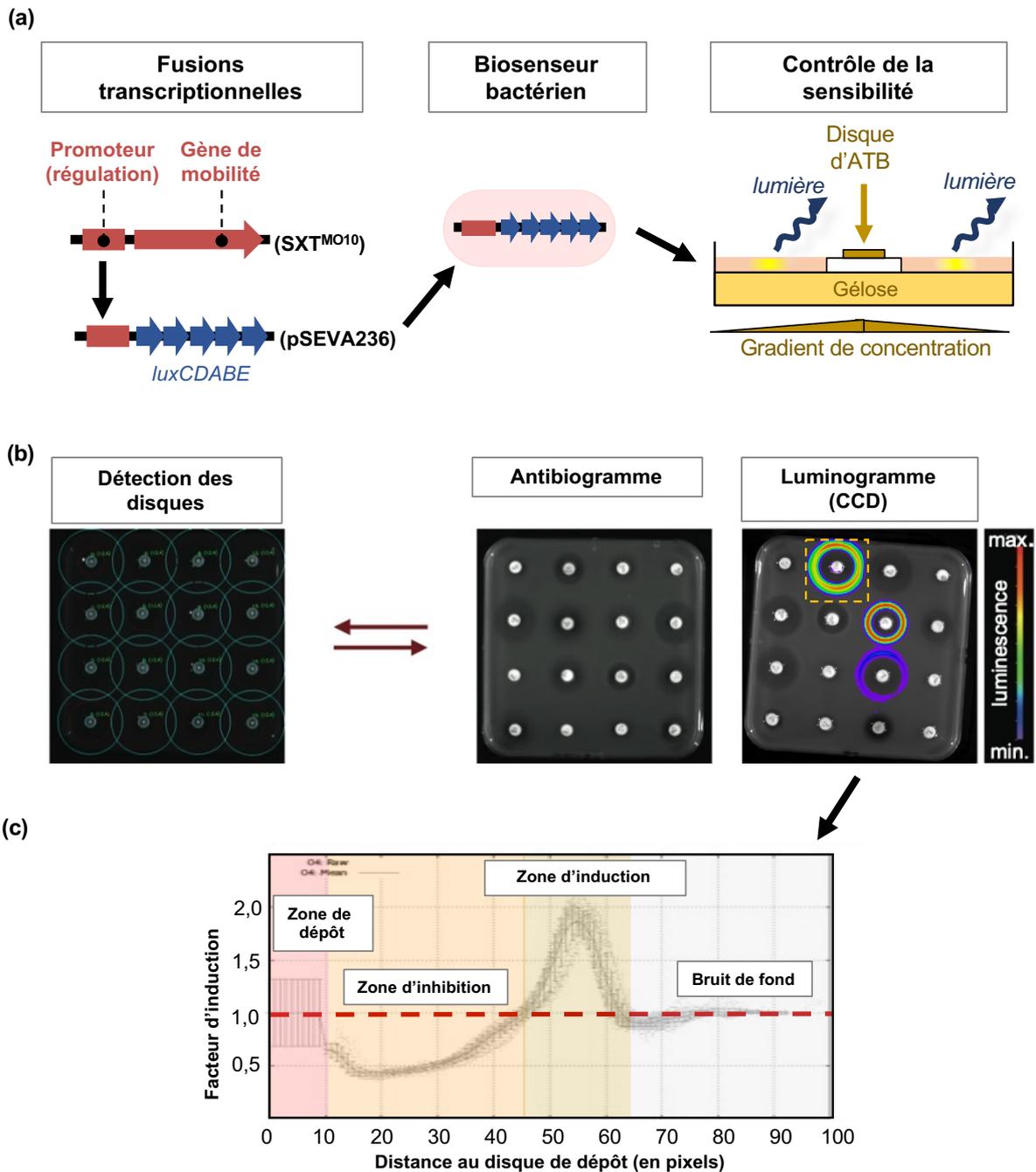


Figure 38 : Méthode d'identification de molécules inductrices de promoteurs de l'élément SXT^{MO10}. (a) Exposition de biosenseurs luminescents à des gradients de concentration d'antibiotiques. (b) Antibiogramme et luminogramme obtenus grâce à une caméra CCD haute sensibilité. (c) Profil d'induction après traitement des données (facteur d'induction en fonction de la distance au disque de dépôt en pixels). D'après Guilloteau et al., 2021.

1.2. INDUCTION DES PROMOTEURS DE L'ICE SXT^{MO10}

1.2.1. CRIBLAGE A GRANDE ECHELLE DES EFFETS DE 48 ANTIBIOTIQUES SUR LES PROMOTEURS DE SXT^{MO10}

Une analyse de séquence à l'aide du logiciel BPROM de Softberry, Inc. (Guilloteau *et al.*, 2021), a permis de prédire 27 promoteurs possibles comme étant probablement impliqués dans l'expression de fonctions de conjugaison, d'intégration, d'excision, de stabilité ou de mobilité d'EGM au sein de l'ICE SXT^{MO10} (Tableau 12). Parmi ces promoteurs, tous ne sont pas sous le contrôle de SetR et SetCD et par conséquent, tous ne sont probablement pas sous contrôle direct de la réponse SOS, d'autant plus qu'aucune boîte LexA n'a été détectée à l'aide du logiciel Softberry. Dans ces conditions, on pourra différencier les molécules qui induisent systématiquement tous les promoteurs, de celles qui induisent uniquement les promoteurs présents dans un même régulon. Sur les 27 promoteurs identifiés, 25 ont pu être clonés en amont des gènes rapporteurs *luxCDABE* du vecteur pSEVA236, alors que 2 d'entre eux, P_{s045} et P_{traL-1}, n'ont pu être clonés malgré plusieurs tentatives (travaux de C. Merlin, H. Guilloteau et X. Bellanger dans le cadre du projet ANR RéguloMobile). Les 25 fusions transcriptionnelles (*ie*, gènes *luxCDABE* + promoteur d'intérêt) ainsi réalisées ont ensuite été introduites indépendamment dans les souches MG1656 et MG1656::SXT^{MO10} d'*E. coli*. Cependant, 4 fusions transcriptionnelles correspondant aux promoteurs P_{s002}, P_{tnp}, P_{trsF} and P_{s089} n'ont pu être introduites dans *E. coli* MG1656::SXT^{MO10}, possiblement en raison d'une incompatibilité entre les constructions, et l'élément SXT^{MO10} et/ou le bagage génétique de la souche transformée (une surexpression de la luciférase peut être toxique, par exemple). Au total, 46 biosenseurs ont été générés, et les deux séries de biosenseurs (avec et sans SXT^{MO10}) devaient permettre de mettre en évidence toute forme de régulation apportée par l'élément SXT^{MO10} lui-même ou par la souche hôte. Notons finalement, qu'après que ces souches aient été construites, une publication de Poulain-Laprade *et al.* (2015) a rapporté une identification expérimentale des promoteurs des régulons SetR/SetCD (Poulain-Laprade, Carraro and Burrus, 2015). Cette étude a permis de vérifier que la plupart des fusions transcriptionnelles obtenues portaient bien un promoteur complet hormis 2 d'entre elles où les promoteurs se sont avérés incomplets P_{traD} et P_{s043}.

Tableau 12 : Biosenseurs construits avec les promoteurs de *SXT^{MO10}*. D'après Guilloteau et al, 2021.

Promoter identification			Sequence comparison		Cloning mode		MG1656 derivatives biosensor strains ²³	
Designation	BPROM prediction	Mapped promoters (reference)	BPROM / Mapping match	BPROM / Mapping overlap	Sequence synthesis	PCR cloning	Without SXT	With SXT
<i>SXT promoters</i>								
P _{xis}	+	(17)	(-)	+	+		CM696	CM739
P _{int}	+		NA	NA	+		CM716	CM728
P _{s002}	+		NA	NA	+		CM720	(-)
P _{s003}	+	(17)	(-)	+	+		CM692	CM730
P _{mobI}	+	(17)	(-)	+	+		CM700	CM726
P _{tnp}	+		NA	NA	+		CM681	(-)
P _{tnpB}	(-)		NA	NA	+		CM718	CM863
P _{traI}	+	(17)	(-)	+	+		CM678	CM747
P _{traD}	+	(17)	(-)	(-)	+		CM682	CM741
P _{s044}	(-)	(22)	(-)	NA	+		CM686	CM736
P _{s045}	+	(22)	+	+	(-)		ND	ND
P _{traL-1}	+		NA	NA	(-)		ND	ND
P _{traL-2}	(-)	(17)	(-)	+	(-)	+	CM1284	CM1286
P _{traV}	ND	(17)	NA	+	NA	+	CM1280	CM1282
P _{mosA}	+		NA	NA	+		CM690	CM734
P _{dsbC-3}	+		NA	NA	+		CM644	CM378
P _{dsbC-2}	+		NA	NA	+		CM640	CM662
P _{dsbC-1}	+	(17)	(-)	+	+		CM677	CM660
P _{trsF}	+		NA	NA	+		CM656	(-)
P _{traN}	+		NA	NA	+		CM714	CM763
P _{s063}	+	(17)	(-)	(-)	+		CM673	CM749
P _{s089}	+	(17, 21)	(-)	+	+		CM632	(-)
P _{s075}	+		NA	NA	+		CM671	CM636
P _{traF}	+	(17)	(-)	+	+		CM537	CM724
P _{s085}	+		NA	NA	+		CM541	CM654
P _{s086}	+	(15)	+	+	(-)	+	CM994	CM996
P _{setR}	+	(15)	+	+	+		CM630	CM722
<i>Constitutive promoters</i>								
P _{J102} (force 0.86)		(A)	NA	NA		+	CM1105	CM1117
P _{J105} (force 0.24)		(A)	NA	NA		+	CM1107	CM1119
P _{J107} (force 0.36)		(A)	NA	NA		+	CM1109	CM1121
P _{J115} (force 0.15)		(A)	NA	NA		+	CM1111	CM1123
P _{J117} (force 0.06)		(A)	NA	NA		+	CM1113	CM1118
P _{J118} (force 0.56)		(A)	NA	NA		+	CM1115	CM1122

(15) (Beaber and Waldor, 2004) ; (17) (Poulin-Laprade, Carraro and Burrus, 2015) ; (21) (Garriss, Poulin-Laprade and Burrus, 2013) ; (22) (Dziewit *et al.*, 2007). D'après Guilloteau et al, 2021. NA: not applicable; ND: not done; +: successful; (-): failed; (A) Anderson promoter collection (<http://parts.igem.org>).

Un criblage à grande échelle a été réalisé avec la méthode décrite ci-dessus (§1.2.1), dans laquelle les 46 biosenseurs (Tableau 12) ont été exposés à 48 molécules représentant différentes familles d'antibiotiques ayant pour cible la paroi bactérienne, la membrane cytoplasmique, le ribosome, ou encore le métabolisme de l'ARN et de l'ADN. Au total, le criblage a permis de générer 2208 profils d'induction de couples biosenseur-antibiotique (Figure 39). Globalement, les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que les antibiotiques qui ciblent la synthèse de la paroi cellulaire ou la membrane cytoplasmique n'induisent aucune augmentation notable de luminescence chez aucun des biosenseurs, contrairement à certaines molécules qui ciblent l'ADN, les ribosomes ou l'ARN.

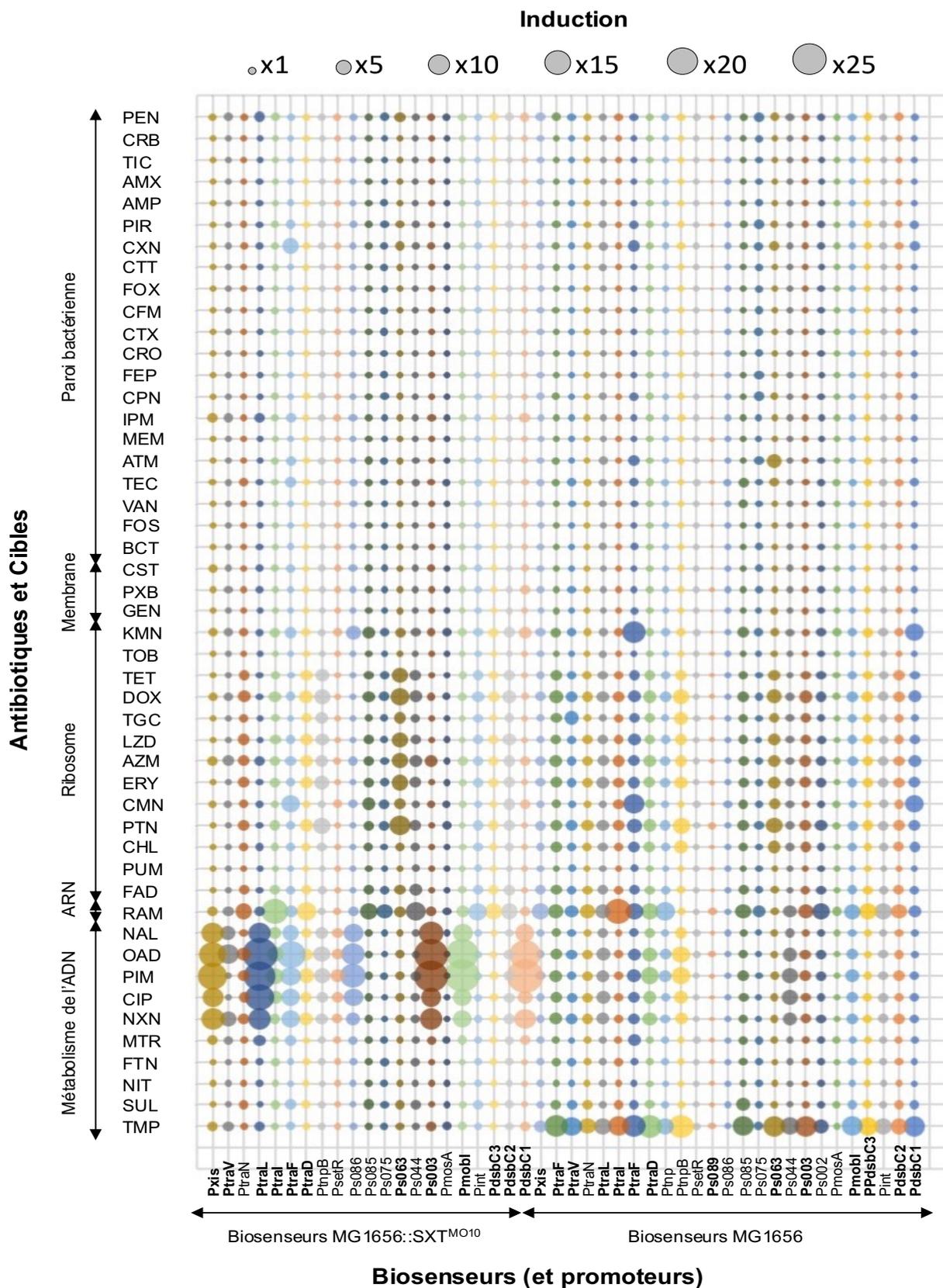


Figure 39 : Profils d'induction de 46 biosenseurs dérivés *E. coli* MG1656 et *E. coli* MG1656::SXT^{MO10} exposés à 48 antibiotiques. Les promoteurs du régulon SetCD

apparaissent en caractères gras sur la figure. Les promoteurs du régulon SetR sont P_{s086} et P_{setR} . D'après Guilloteau et al, 2021.

1.2.2. CARACTERISATION D'INDUCTIONS DE LUMINESCENCE ASPECIFIQUES

Si certaines inductions semblent cohérentes avec les données de la littérature qui indiquent que l'expression des gènes de transfert des éléments SXT/R391 est induite lors de l'activation de la réponse SOS par des quinolones (Beaber, Hochhut and Waldor, 2004; Baharoglu and Mazel, 2011), ce n'est pas le cas des inductions provoquées par les autres classes d'antibiotiques. De manière surprenante, certains antimicrobiens comme la rifampicine sont apparus capables d'induire une luminescence chez la plupart des biosenseurs alors qu'ils ne font pas tous partie de la même boucle de régulation. Ce type de réponse, à priori considérée comme « aspécifique », a été étudiée plus en détail grâce à l'utilisation de promoteurs constitutifs, donc non régulés. Sur le principe, si l'expression de promoteurs constitutifs est activée suite à l'exposition à un quelconque antibiotique, alors la réponse sera considérée réellement aspécifique. Six promoteurs constitutifs, non régulés et de force variable, ont servi à la construction de 12 nouveaux biosenseurs chez *E. coli* MG1656 avec ou sans SXT^{MO10} (Tableau 12). L'exposition de ces biosenseurs aux 48 antibiotiques précédemment utilisés, a permis d'identifier 3 profils d'induction types. Dans le premier cas de figure (Figure 40 a), le rapport entre le maximum de luminescence et le bruit de fond est égal à 1 (pas d'induction) pour l'ensemble des biosenseurs constitutifs, que ce soit des souches avec ou sans l'élément SXT^{MO10}. Dans ces conditions, il n'y a pas d'effet de l'antibiotique sur l'émission de luminescence, et les niveaux de luminescence des différents biosenseurs se distribuent sur une ligne médiane (induit *versus* bruit de fond). Dans le deuxième cas de figure (Figure 40 b), l'induction de luminescence est supérieure à 1 et identique chez tous les promoteurs constitutifs. Ici, les niveaux de luminescence maximum se distribuent donc sur une ligne parallèle à la médiane. Dans le dernier cas de figure (Figure 40 c), l'induction d'émission de luminescence des promoteurs constitutifs est inversement proportionnelle à la force des promoteurs. Pourtant, si on considère que les promoteurs sont exprimés de manière constitutive, l'induction de luminescence devrait être indépendante de la force du promoteur, et les facteurs d'induction de

l'ensemble des promoteurs devraient s'aligner sur la médiane comme sur le profil de la Figure 40 a, ou de manière parallèle à cette médiane comme sur le profil de la Figure 40 b. Ce dernier cas de figure correspondrait plutôt à problème lié à l'activité de la luciférase, l'enzyme à l'origine de la bioluminescence. En effet, l'hypothèse émise dans l'étude réalisée par Guilloteau *et al* (2021) serait que certains antibiotiques pourraient bloquer le flux d'électrons destinés à la chaîne respiratoire, et que ce « trop-plein » d'électrons (sous forme NAD(P)H) serait redirigé vers la luciférase (Figure 41 c). Dans une telle circonstance, les promoteurs les plus faibles ne permettent de produire que peu de luciférase et, toute proportion gardée, un arrêt / ralentissement de la respiration provoque un apport massif de substrat NAD(P)H vers l'enzyme, d'où une augmentation de la luminescence relativement importante mais indépendante de l'activité de transcription/traduction bactérienne. Lorsque le promoteur constitutif est fort, beaucoup de luciférase est produite et une redirection du flux d'électron provoque moins d'effet sur la luminescence car, proportionnellement, moins de NAD(P)H sont disponible par enzyme. Cette hypothèse a été vérifiée en exposant l'ensemble de biosenseurs constitutifs dérivés d'*E. coli* à différentes concentrations d'azide de sodium, un composé connu comme étant un inhibiteur de la chaîne respiratoire. D'après les résultats regroupés sur la Figure 41 c, la plus forte induction de luminescence a été obtenue pour le promoteur le plus faible, et cette induction est d'autant moins importante que le promoteur constitutif est fort, comme prédit. Il en résulte, qu'un profil d'induction comme celui obtenu avec la rifampicine avec les promoteurs de SXT^{MO10} (Figure 341 a) résulte uniquement d'une interférence avec la chaîne respiratoire, et n'implique pas d'induction de promoteur. D'un point de vue pratique, il découle de ces observations que, pour considérer une induction de promoteur de SXT^{MO10} comme vraie, il faudra s'assurer que le niveau d'expression de luminescence induit dépasse celui délimité par la ligne de base d'expression des promoteurs constitutifs soumis au même inducteur.

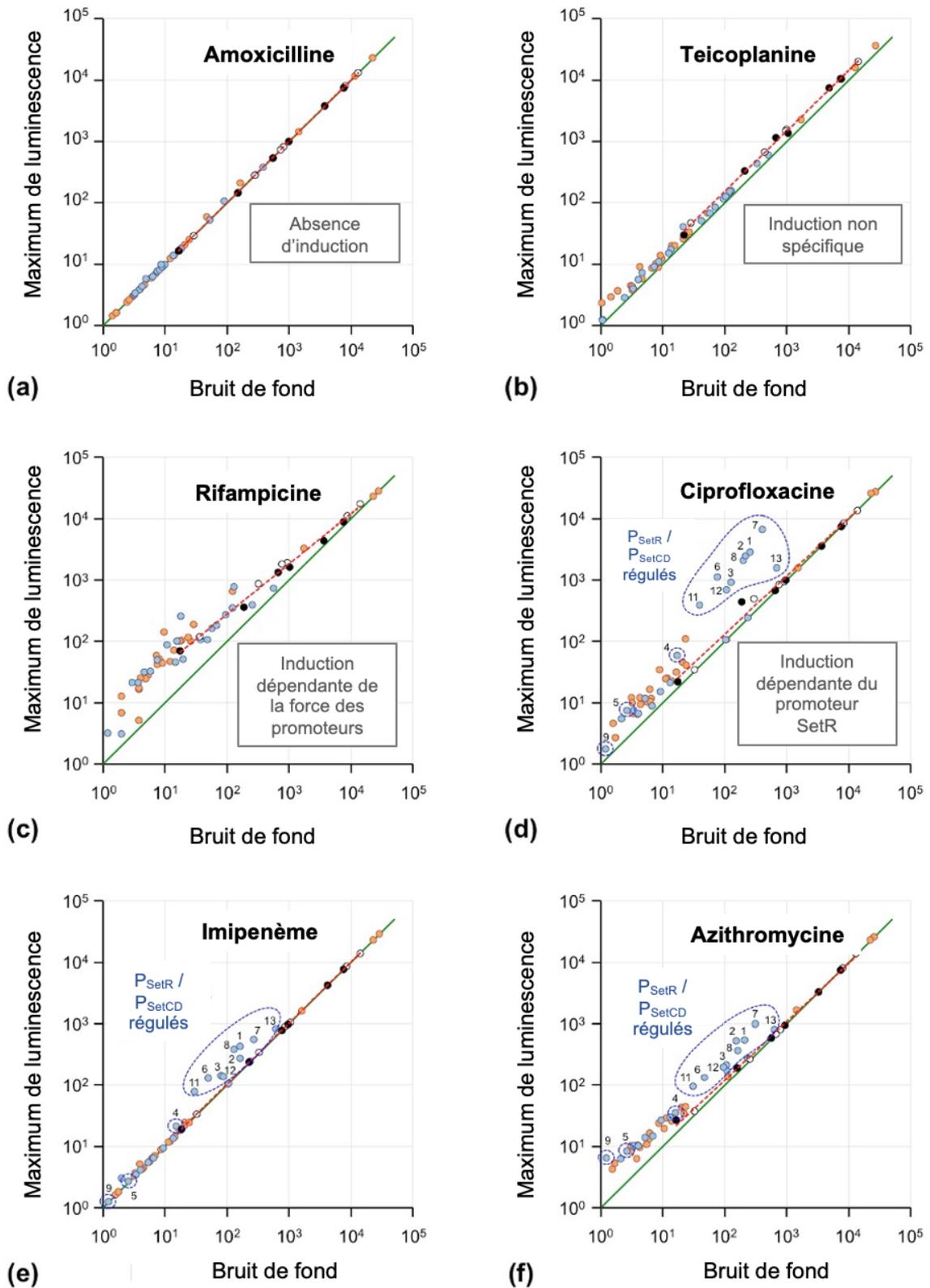


Figure 40 : Profils d'induction des biosenseurs d'*E. coli* portant des promoteurs de SXT^{MO10} dans MG1656 (●) et MG1656:: SXT^{MO10} (●), ou des promoteurs constitutifs dans MG1656 (○) et MG1656:: SXT^{MO10} (●), exposés à divers antibiotiques. La ligne

continue verte représente la médiane, et les pointillés rouges représentent la ligne de base d'expression des promoteurs constitutifs (a) Cas de figure sans induction, comme avec l'amoxicilline ; (b) Induction non spécifique de l'ensemble des promoteurs par la teicoplanine ; (c) Induction dépendante de la force du promoteur constitutif, comme avec la rifampicine ; (d) Induction des régulons SetR et SetCD par des quinolones comme la ciprofloxacine ; (e et f) Induction des régulons SetR et SetCD par des molécules autres que des quinolones, comme l'imipénème et l'azithromycine. Les points numérotés correspondent aux biosenseurs réalisés avec les promoteurs appartenant aux régulons SetR et SetCD (1: P_{xis} ; 2: P_{s003} ; 3: P_{mobI} ; 4: P_{traI} ; 5: P_{traD} (non-fonctionnel) ; 6: P_{traL-2} ; 7: P_{traV} ; P_{dsbC-1} ; 9: P_{s063} (non-fonctionnel) ; 10: P_{s089} ; 11: P_{traF} ; 12: P_{s086} ; 13: P_{setR}). Chaque valeur de luminescence est une moyenne d'un triplicata d'expériences réalisé par biosenseur.

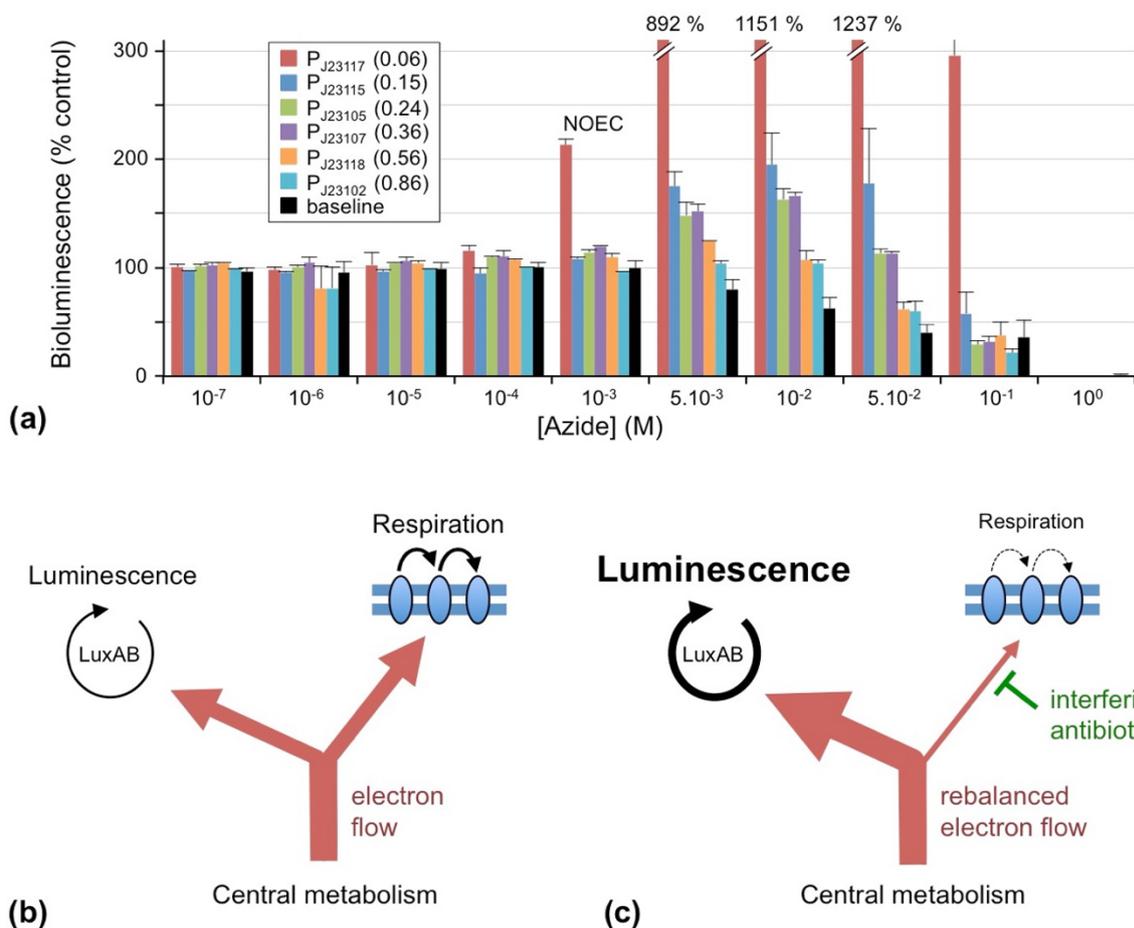


Figure 41 : Interférence des flux d'électrons (NAD(P)H) entre l'émission de luminescence et la respiration. (a) Émission de bioluminescence des biosenseurs *E. coli* MG1656 composés de promoteurs constitutifs avec différents niveaux de

transcription (notés entre parenthèses), exposés à des concentrations croissantes d'azide de sodium. Chaque valeur a été obtenue en duplicata et les barres d'erreur représentent l'erreur standard à la moyenne. (b) Schéma représentant le partage du flux d'électrons entre la luciférase et la chaîne respiratoire, (c) redistribution du flux d'électrons en cas d'inhibition de la respiration par des antibiotiques. D'après (Guilloteau et al., 2021).

1.2.3. IDENTIFICATION DE NOUVEAUX ANTIBIOTIQUES INDUCTEURS DES REGULONS SETR/SETCD

Au total, 58 biosenseurs (incluant les promoteurs de SXT^{MO10} et les promoteurs constitutifs) ont été exposés à 48 antibiotiques. L'utilisation de biosenseurs composés de promoteurs constitutifs avec différents niveaux de transcription, a permis de définir une ligne d'induction de base qu'il faut dépasser pour considérer qu'une induction est dépendante de l'expression du promoteur, et pas uniquement liée à une quelconque interférence avec la chaîne respiratoire. Dans ces conditions, 2 nouveaux antibiotiques n'appartenant pas aux quinolones (Figure 40 d), semblent induire l'expression des promoteurs du régulon SetR et SetCD chez *E. coli*. Il s'agit de l'imipénème (Figure 40 e) et de l'azythromycine (Figure 40 f). En raison de l'étude réalisée par Beaber *et al* (Beaber, Hochhut and Waldor, 2004), l'induction des fonctions d'excision et de transfert de l'élément SXT^{MO10} par la ciprofloxacine était un évènement attendu que nous avons utilisé comme contrôle lors d'expériences de conjugaison. En revanche, l'imipénème et l'azythromycine ne sont pas décrits dans la littérature comme pouvant interférer avec la régulation des éléments SXT/R391, ou encore activer directement la réponse SOS.

Dans le cadre du projet AquaResist, nous avons étendu l'étude de l'induction de la mobilité de l'élément à d'autres molécules actuellement ou autrefois utilisées en pisciculture. Le biosenseur *E. coli* MG1656 ::SXT^{MO10} construit à partir du promoteur P_{s086}, le promoteur central de la régulation des éléments SXT/R391 et représentatif de l'induction des autres promoteurs sous le contrôle de SetR et SetCD, a ainsi été exposé à une série de molécules utilisées pour la désinfection (eau de Javel, peroxyde d'hydrogène), des colorants utilisés comme antifongiques/antiseptiques (Vert Malachite, Victoria Blue, Crystal Violet) ou un anesthésiant (eugénol présent dans l'huile essentielle de clou de girofle/cannelle). Les résultats obtenus ont permis de

constater qu'aucune de ces molécules n'était capable d'induire l'expression de P_{s086} (Facteurs d'induction = 1). Cela démontre que, dans le contexte des pratiques aquacoles actuelles ou anciennes, en termes de désinfection ou traitement des eaux des bassins de pisciculture, seuls les traitements antibiotiques semblent susceptibles d'avoir un effet sur la régulation de l'expression de gènes de d'excision et de transfert de l'élément SXT^{MO10} chez *E. coli*. Ces possibles effets sont évidemment limités à une gamme de concentrations qui reste à définir et n'exclut pas la possibilité de synergies entre antibiotiques et/ou polluants.

1.3. DE L'INDUCTION DE PROMOTEURS A L'INDUCTION DU TRANSFERT DE SXT^{MO10}

Dans cette partie, nous avons souhaité vérifier que les antibiotiques identifiés comme inducteurs de luminescence dans le criblage précédent étaient bien capables d'induire le transfert le SXT^{MO10} *in vitro*. Ensuite, nous nous sommes concentrés sur l'inductibilité du transfert de l'élément chez *E. coli* MG1656 par la ciprofloxacine. Il s'agira alors d'établir si la concentration à laquelle on mesure le maximum d'induction du promoteur P_{s086} coïncide avec la concentration induisant un maximum de transfert de cet élément. On se posera également la question de savoir si l'ICE SXT^{MO10} porté une souche résistante à la ciprofloxacine continue à être inductible par l'antibiotique. En comparant les concentrations de ciprofloxacine d'intérêt à celles retrouvées dans l'environnement, on pourra alors commencer à émettre des hypothèses sur le rôle de certains antibiotiques dans la dissémination des éléments $SXT/R391$ dans l'environnement. Enfin, ces différents résultats permettront d'optimiser les chances de suivre le transfert de l'ICE SXT^{MO10} dans des conditions environnementales, et de conclure sur les conditions du transfert de l'élément dans l'environnement.

1.3.1. EFFET DES ANTIBIOTIQUES INDUCTEURS DU REGULON SETR/SETCD SUR LA DISSEMINATION DE SXT^{MO10}

Démontrer une induction du promoteur P_{s086} de SXT^{MO10} ne permet pas de démontrer formellement l'effet d'une molécule sur le transfert de SXT^{MO10} *sensu stricto*, ni l'ampleur des effets attendus. Ici, nous nous sommes attachés à caractériser l'effet de 3 antibiotiques identifiés comme inducteurs (la ciprofloxacine, l'imipénème et l'azythromycine) sur le transfert de l'élément dans des expériences de conjugaison bactérienne. Étant donné que les émissions de luminescence ont été observées en

dehors de la zone de toxicité des antibiotiques, c'est-à-dire à des concentrations sub-inhibitrices, les valeurs de CMI dans nos conditions expérimentales ont d'abord été déterminées afin de tester des concentrations inférieures ou proches de la CMI. Ainsi, les CMI ont été définies en milieu liquide à 40 ng/mL pour la ciprofloxacine, 0,5 µg/mL pour l'imipénème et 20 µg/mL pour l'azythromycine chez la souche *E. coli* MG1656::SXT^{MO10}-tagpB10 (CM1272, Cam^R) que l'on a choisi pour être la donneuse dans des expériences de conjugaison sur filtre. Après une culture de nuit sans antibiotique, la bactérie donneuse a été remise en phase exponentielle de croissance puis exposée pendant 3h à différentes concentrations en antibiotiques, allant de CMI /20 à CMI ×20. Les bactéries donneuses (D) ont ensuite été lavées puis mélangées aux bactéries receveuses (R) *E. coli* MG1655 Nal^R (CM125), l'ensemble des cellules déposé sur filtre pendant 2 h, avant que les bactéries donneuses, les receveuses et les transconjugants (Tc) ne soient titrés sur milieu sélectif en fonction des profils de résistance attendus (Chl^R, Nal^R). Les fréquences de transfert en transconjugants par bactérie donneuse (Tc/D) ont été calculées et regroupées dans la Figure 42. Connue pour induire la réponse SOS, et par conséquent l'expression des gènes de mobilité des éléments SXT/R391, la ciprofloxacine a été utilisée en tant que contrôle (Figure 42 c). L'exposition de la bactérie donneuse à 40 ng/mL de ciprofloxacine, soit la valeur de la CMI, a permis d'observer une augmentation de la fréquence de transfert d'un facteur 430 par rapport à la fréquence de base (sans antibiotique). En outre, il est possible de constater que la fréquence de transfert ne diminue pas à CMI ×12, bien qu'il y ait une toxicité évidente en raison d'une perte de 4 ordres de grandeur des souches donneuses (données non représentées). Contrairement à la ciprofloxacine, aucun effet de l'azythromycine (Figure 42 a) n'a pu être constaté dans les expériences menées sur le transfert de l'élément. Enfin, en ce qui concerne l'exposition à l'imipénème (Figure 42 b), la fréquence de transfert reste constante jusqu'à la CMI mais augmente d'un facteur 17 à CMI ×20. Toutefois, la toxicité de l'antibiotique a été mise en évidence à partir de la CMI/5. A cette concentration, l'aspect visqueux de la culture semblait suggérer une lyse, au moins partielle, des cellules. Bien que cet effet soit inattendu au regard de la littérature, l'imipénème semblerait donc bien capable d'induire les gènes de mobilité de SXT^{MO10} chez *E. coli*, mais dans une mesure moindre que celle observée pour la ciprofloxacine. Pour les deux antibiotiques, on peut cependant s'interroger sur le fait que l'induction du transfert soit observée au-delà des valeurs de CMI.

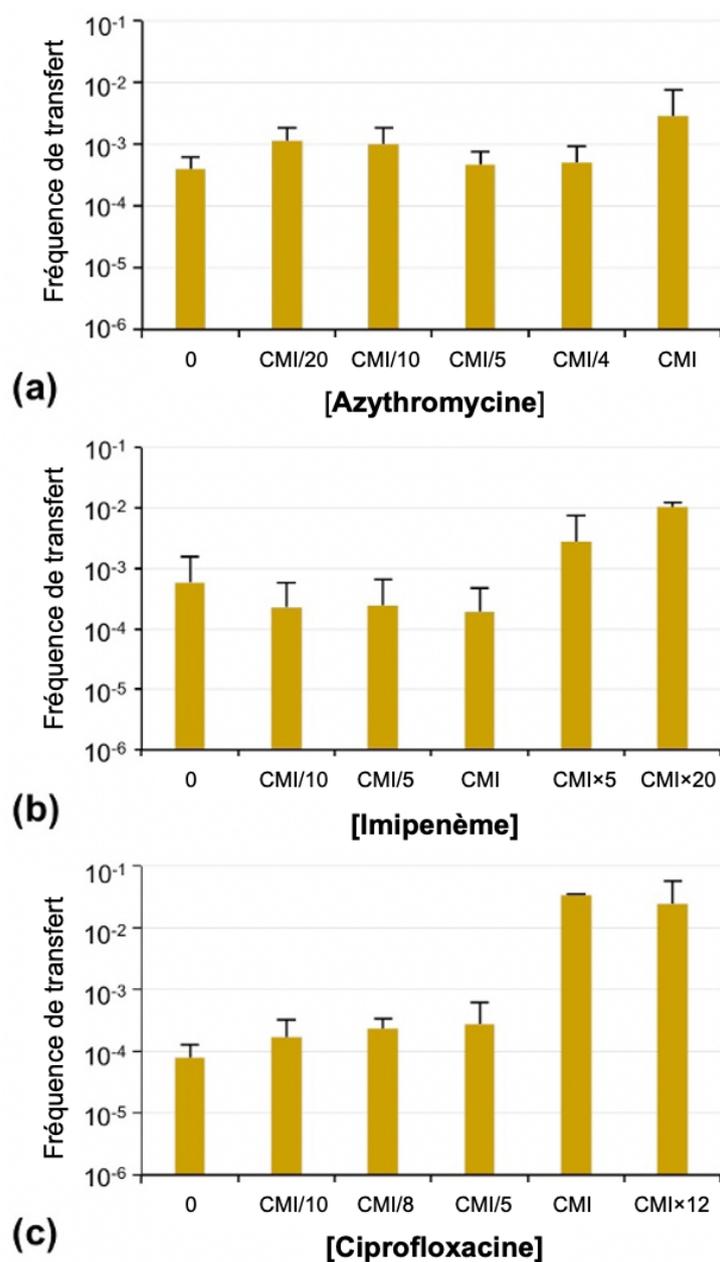


Figure 42 : Induction du transfert de SXT^{MO10} par (a) l'azithromycine, (b) l'imipénème et (c) la ciprofloxacine. Les fréquences de transfert sont représentées en transconjugants par bactéries donneuses. Les barres d'erreur représentent l'écart-type ($n=3$). Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) ont été déterminées à 20 $\mu\text{g/mL}$ pour l'azithromycine, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ pour l'imipénème et 40 $\mu\text{g/mL}$ pour la ciprofloxacine.

1.3.2. INDUCTION DU PROMOTEUR P_{s086} CHEZ *E. COLI* SENSIBLE A LA CIPROFLOXACINE (CIP^S)

Les expériences d'imagerie de luminescence menées sur l'inductibilité de P_{s086} chez *E. coli* ont permis d'identifier des antibactériens inducteurs sans toutefois en préciser les concentrations effectives. Pourtant, déterminer ces concentrations permettrait de préciser dans quelle gamme de concentration l'antibiotique exerce ses effets, et éventuellement d'identifier les environnements où l'on pourrait retrouver des conditions propices à une expression accrue des gènes de transfert. D'un point de vue pratique, déterminer les concentrations où la ciprofloxacine exerce ses effets permettra à terme, d'arrêter un choix sur une ou quelques concentrations remarquables dans le cadre d'expérience de transfert de SXT^{MO10} en microcosme.

Dans un premier temps, l'effet de la ciprofloxacine sur l'induction du promoteur P_{s086} , a été étudié à l'aide de la souche biosenseur CM996 (*E. coli* MG1656:: SXT^{MO10} (pSEVA236:: P_{s086})). Cette dernière a été exposée à une gamme de concentration de ciprofloxacine distribuée de part et d'autre de la CMI, estimée à 40 ng/mL pour cette souche en milieu liquide. En pratique, la souche *E. coli* MG1656:: SXT^{MO10} (pSEVA236:: P_{s086}) a été incubée en microplaque avec ou sans ciprofloxacine (22 concentrations testées allant de 1,25 ng/mL à 1,92 µg/mL), et des mesures de bioluminescence ont été réalisées après 2 h, 3 h, 4 h, 5 h et 6 h d'exposition. Les données ont ensuite été normalisées par la biomasse (DO_{600}) avant de déterminer le facteur d'induction par rapport à un contrôle non traité. Les résultats obtenus, regroupés sur la Figure 43, indiquent que l'expression du promoteur P_{s086} présente une induction visible dès 3 h d'exposition à l'antibiotique, et atteint un maximum après 4 h à 40 ng/mL de ciprofloxacine, soit la valeur définie pour la CMI. Après 4 h d'incubation, les valeurs du facteur d'induction diminuent et les pics s'étalent pour des raisons qui restent encore difficiles à expliquer. Aussi, en raison des faibles écarts entre les données obtenues après 3 h ou 4 h d'incubation, il a été choisi de continuer cette étude avec un temps d'exposition à l'antibiotique de 3 h. Quoi qu'il en soit, il apparaît que l'induction du promoteur P_{s086} puisse survenir à des concentrations au-delà de la CMI (facteur d'induction supérieur à 10), alors que ces concentrations sont supposées bactéricides.

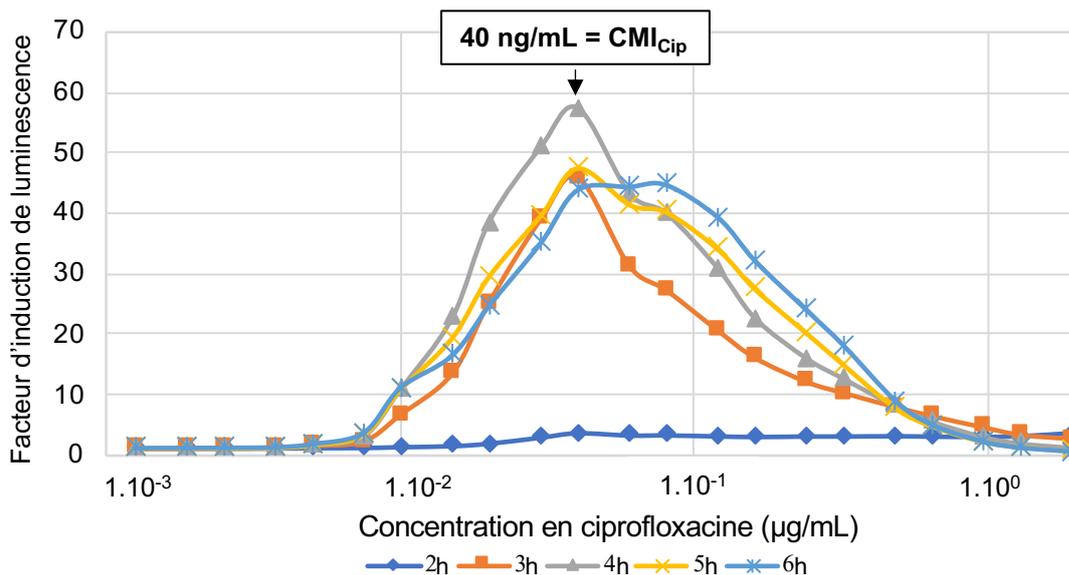


Figure 43 : Détermination des conditions d'induction optimales du promoteur P_{s086} par la ciprofloxacine chez *E. coli* MG1656::SXT^{MO10}.

1.3.3. INDUCTION DU TRANSFERT DE L'ICE SXT^{MO10} CHEZ E. COLI PAR LA CIPROFLOXACINE

Afin de pouvoir comparer les effets de la ciprofloxacine sur l'induction du promoteur, aux effets sur le transfert de l'élément SXT^{MO10}, des expériences de conjugaison bactérienne sur filtre ont été réalisées après avoir exposées les bactéries donneuses à différentes concentrations de ciprofloxacine. Dans un premier temps, la souche donneuse CM1272 (*E. coli* MG1656::SXT^{MO10}-tagpB10 ; Cam^R, Tet^R), a été exposée pendant 3 h aux mêmes concentrations de ciprofloxacine que pour les expériences d'induction de luminescence (§1.3.2). Des conjugaisons ont alors été réalisées pendant 2 h sur filtre, entre la souche donneuse *E. coli* MG1656::SXT^{MO10}-tagpB10 « induite » et la souche receveuse *E. coli* MG1655 (Nal^R), CM125. Ensuite, les bactéries donneuses, les receveuses et les transconjugants ont été dénombrées sur milieu sélectif afin de définir les fréquences de transfert en transconjugants par receveuse (Figure 44 a) et comparer l'évolution des fréquences de transfert à celle de l'induction du promoteur P_{s086} (Figure 44 b). Le maximum de transfert est observable à 5 ng/mL de ciprofloxacine, soit CMI /8, une concentration pour laquelle la fréquence de transfert a augmenté d'environ 1 ordre de grandeur par rapport à la fréquence de base déterminée en absence d'antibiotique. En revanche, à la CMI, concentration à laquelle le maximum d'induction avait été observé pour du promoteur P_{s086} , la

fréquence de transfert est redevenue la même que celle sans exposition à l'antibiotique (fréquence de base).

Globalement, cette expérience montre qu'il existe un certain déphasage entre les concentrations de ciprofloxacine qui permettent d'obtenir un maximum d'induction du promoteur P_{s086} , et celles qui permettent un maximum de transfert. Dans les deux cas, il apparaît que l'induction de P_{s086} et l'induction du transfert de SXT^{MO10} cessent d'augmenter au voisinage de la CMI, laissant entrevoir une probable limite en raison de la toxicité de l'antibiotique. A cet égard, Il est tout à fait notable de constater que des transconjugants sont dénombrés même lorsque la bactérie donneuse est exposée à des concentrations bien au-delà de la CMI, jusqu'à 48 fois cette valeur qui correspond à la concentration maximale testée lors de cette étude. Compte tenu du fait que la ciprofloxacine soit un antibiotique bactéricide, la question s'est posée de savoir si le transfert de ces éléments n'avait pas été possible grâce à une sous population de bactéries donneuses « Cip^R » devenues résistantes à cet antibiotique (par mutation spontanée du gène de la gyrase par exemple).

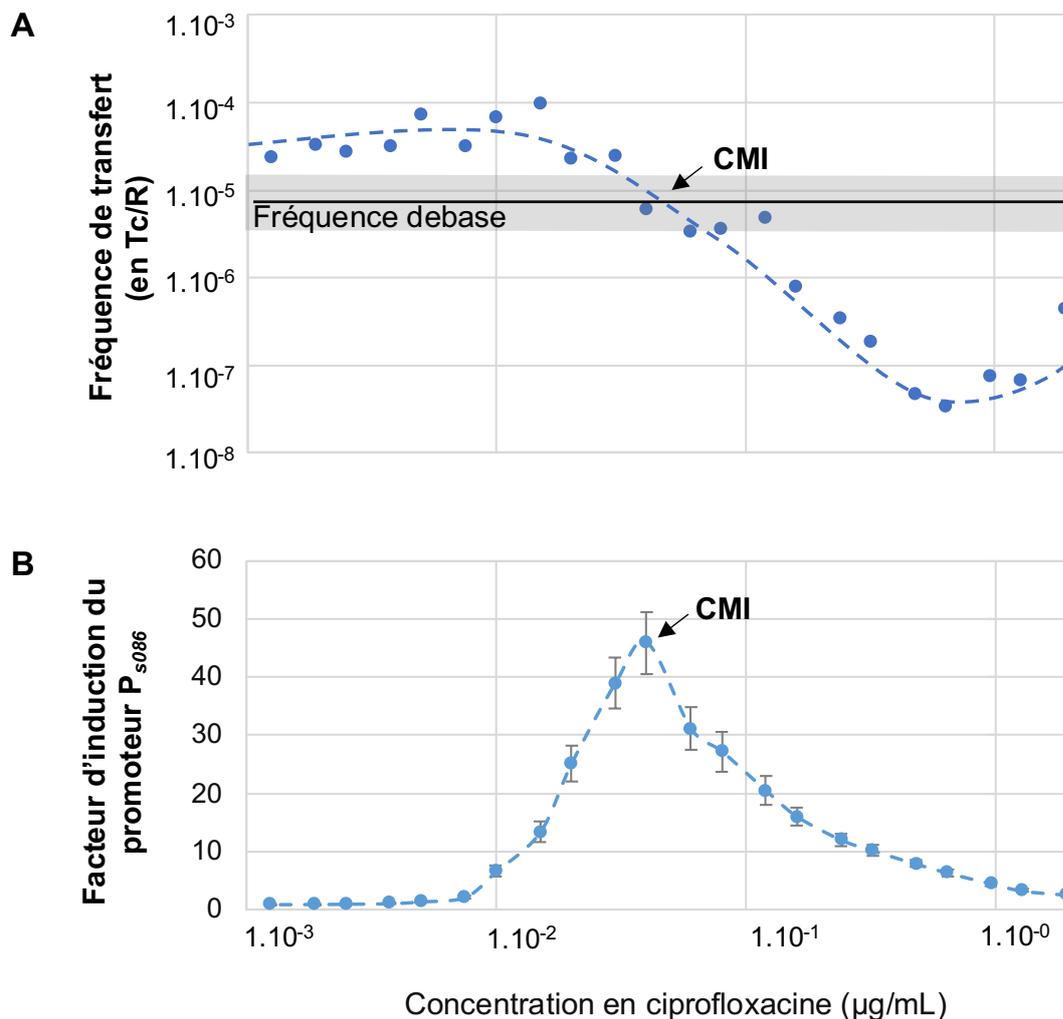


Figure 44 : Effet d'un traitement à la ciprofloxacine sur le transfert de SXT^{MO10}. Les fréquences de conjugaison sont exprimées en nombre de transconjugants par receveuse (A) ou sous forme de facteur d'induction par rapport à la condition non induite (B).

1.3.3.1. EFFET DE L'EXPOSITION A LA CIPROFLOXACINE : IDENTIFICATION D'UNE SOUS-POPULATION DE DONNEUSES CIP^R

Afin de confirmer la présence d'une sous-population de bactéries donneuses résistantes à la ciprofloxacine, nous avons pensé exposer une population sensible et une population résistance à l'antibiotique, et comparer leur sensibilité respective à la ciprofloxacine à travers des changements de morphologie cellulaire. Pour faire cela, nous avons commencé par isoler un mutant spontané Cip^R de la souche *E. coli* MG1656::SXT^{MO10}-tagpB10 (ou CM1366). En se basant sur le protocole de

conjugaison bactérienne, ces deux souches Cip^S (CM1272) et Cip^R (CM1366) ont été exposées pendant 3 h à 40 ng/ml et 5 ng/ml de ciprofloxacine, puis observées par microscopie (Figure 45). Pour rappel, ces deux concentrations correspondent respectivement à la CMI de la souche Cip^S mais aussi au maximum d'induction du promoteur P_{s086}, et au maximum de transfert de l'élément. Les observations en microscopie optique (Figure 45) ont permis de mettre en évidence que de faibles concentrations de ciprofloxacine étaient capables d'induire une filamentation des cellules de la souche sensible, attestant d'un stress génotoxique (Huisman, D'Ari and Gottesman, 1984). Comme attendu, cette filamentation est moins visible chez la souche résistante aux concentrations testées. Par ailleurs, les bactéries ont été marquées au SYBR Green, et leur niveau de fluorescence a été mesuré par cytométrie en flux à différentes étapes clés de ce qui correspond au protocole de conjugaison bactérienne : (A) avant l'exposition à l'antibiotique, (B) juste après les 3 h d'exposition à 5 ng/mL de ciprofloxacine, et (C) 2 h après la fin de l'étape d'exposition à l'antibiotique (Figure 46). Les cytogrammes obtenus indiquent que, sans traitement antibiotique, les cellules Cip^R émettent légèrement plus de fluorescence que les cellules Cip^S (Figure 46, A), ce qui pourrait s'expliquer par une légère différence de surenroulement de l'ADN entre la souche sauvage et sa dérivée mutée dans le gène codant la gyrase (Cip^R). La fluorescence de la souche sensible augmente après les 3 h d'exposition à la ciprofloxacine, ce qui est cohérent avec le début du processus de filamentation au cours de laquelle la quantité d'ADN augmente dans la cellule (Bos *et al.*, 2015). La souche résistante quant à elle, n'augmente pas sa fluorescence car la gyrase n'est pas sensible à la ciprofloxacine à ces concentrations. Enfin, si 2 h après la remise en culture suivant l'exposition à l'antibiotique, il n'y a qu'un seul pic de fluorescence synonyme d'une seule population pour la souche Cip^R, deux pics distincts sont clairement visibles pour la souche Cip^S. Il semblerait ici qu'une partie de la population Cip^S ait repris son cycle normal de division (sous-population la moins fluorescente) alors que l'autre partie, toujours aussi fluorescente, soit probablement bloquée sous forme de filaments multinuclées, comme décrit par Bos *et al.*, (Bos *et al.*, 2015). Ces observations suggèrent donc que la population Cip^S est hétérogène et qu'une partie de cette population reste capable de se multiplier même après exposition à des doses létales de ciprofloxacine. A ce stade, il est difficile de prédire si cette sous-population a pu acquérir une mutation Cip^R mais cela pourrait expliquer une absence totale de toxicité de l'antibiotique, y compris au regard du transfert de SXT^{MO10}.

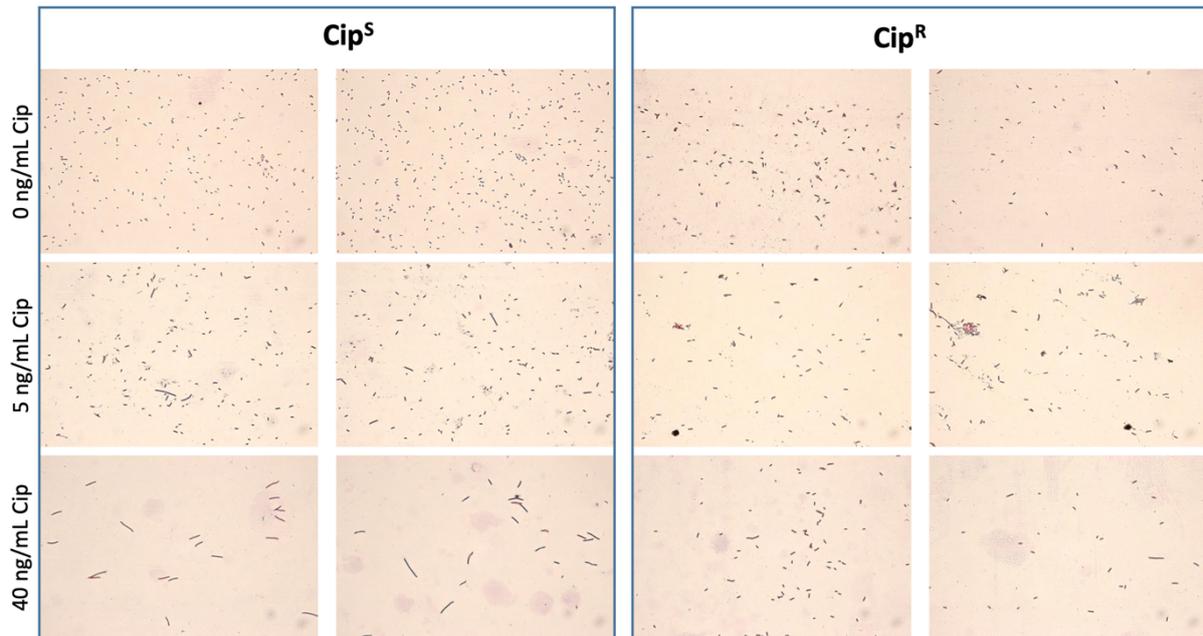


Figure 45 : Images de microscopie ($G40 \times 2$) de souches d'E. coli $MG1656::SXT^{MO10}$ - $tagpB10$ sensibles (CM1272) et résistantes (CM1366) à la ciprofloxacine, et exposées à différentes concentrations de cet antibiotique.

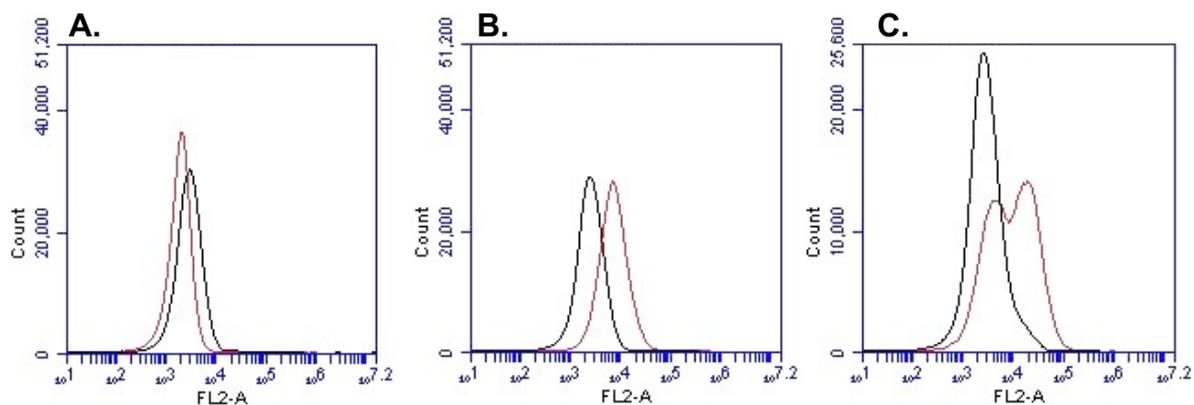


Figure 46 : Distribution de la fluorescence dans des cultures d'E. coli $MG1656::SXT^{MO10}$ - $tagpB10$ Cip^R et Cip^S marquées aux SYBR Green. Mesure cytométrique du nombre d'évènements en fonction de l'intensité de fluorescence d'une souche d'E. coli $MG1656::SXT^{MO10}$ - $tagpB10$ sensible (en rouge) et résistante (en noir) à la ciprofloxacine. Ces données ont été obtenues, (A) avant le traitement, (B) après 3 h d'exposition à 5 ng/mL de ciprofloxacine et (C) 2 h après l'exposition à l'antibiotique.

1.3.3.2. INDUCTIBILITE DU PROMOTEUR P_{S086} CHEZ E. COLI CIP^R

Pour étudier l'effet de la mutation Cip^R sur l'inductibilité de l'ICE SXT^{MO10} par la ciprofloxacine, un nouveau biosenseur a été construit en introduisant le plasmide pSEVA236 ::P_{S086} dans la souche mutante Cip^R d'*E. coli* MG1656::SXT^{MO10}-tagpB10 (CM1366), pour produire la souche CM1441 (CM1366(pSEVA236::P_{S086})). Les CMI ont été déterminées en milieu liquide à 860 ng/ml et 20 ng/ml de ciprofloxacine, respectivement pour les souches biosenseurs Cip^R (CM1441) et Cip^S (CM996). Dans ces conditions, une nouvelle gamme de concentration en ciprofloxacine a été définie de manière à englober les deux CMI. Ainsi, les deux souches ont été exposées à une gamme de concentration de ciprofloxacine allant de 17 µg/mL à 25 mg/mL, et les facteurs d'induction ont été calculés, après 6 h d'exposition à l'antibiotique plutôt que 3 h comme précédemment (Figure 47). En effet, ces expériences sur l'effet d'une mutation Cip^R sur le comportement de l'ICE SXT^{MO10}, ont été réalisées par A. Seghier alors en stage de M1 au LCPME. Nous avons constaté quelques différences par rapport aux résultats obtenus préalablement (Figure 44). Au-delà d'un effet « expérimentateur », les variations constatées peuvent être dues à la différence de temps d'exposition à l'antibiotique, ce qui a pu influencer les valeurs de concentrations critiques et/ou inductrices sans pour autant changer la différence de comportement des deux souches l'une par rapport à l'autre. Ainsi, la souche Cip^S présente un maximum d'induction du promoteur P_{S086} lorsqu'elle est exposée à 102 ng/mL de ciprofloxacine, et elle n'est plus induite au-delà de 1 µg/mL. En ce qui concerne la souche Cip^R, elle n'est pas induite aux mêmes concentrations de ciprofloxacine que la souche Cip^S, et présente un maximum d'induction à 6,3 µg/mL d'antibiotique. Globalement, les plus fortes valeurs d'induction ont été obtenues à des concentrations au-delà des valeurs de CMI pour les deux souches, ce qui suggère qu'il n'y a pas encore d'effet totalement bactéricide de la ciprofloxacine à ces concentrations.

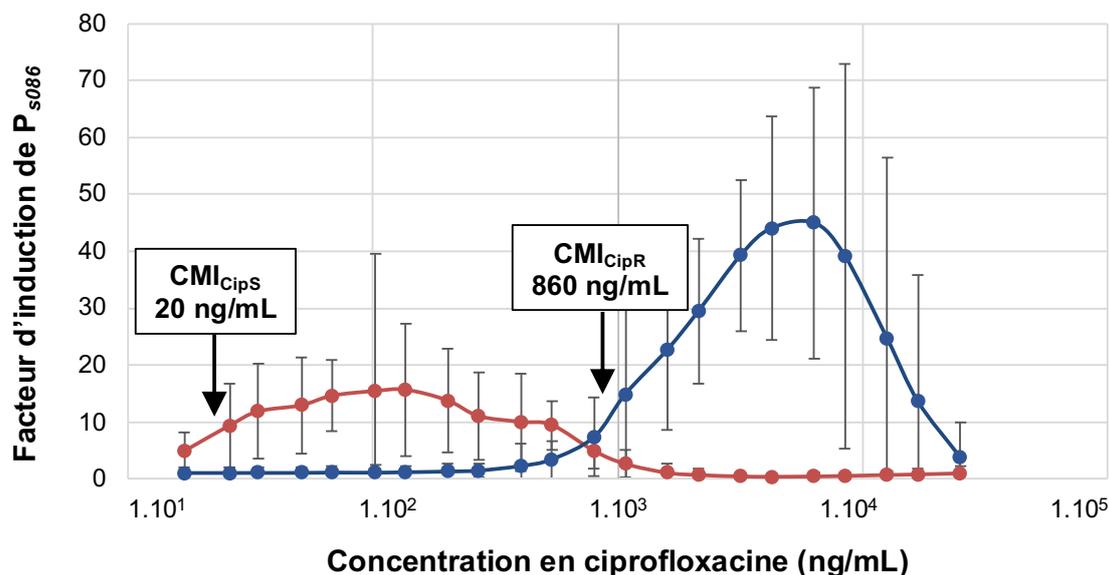


Figure 47 : Effet du traitement à la ciprofloxacine sur l'induction du promoteur P_{5086} dans une souche sensible (Cip^S) et une souche résistante (Cip^R) à la ciprofloxacine. Les barres d'erreur représentent l'écart-type. Ces résultats issus du rapport de stage d'A. Seghier (M1 au LCPME).

1.3.3.3. COMPARAISON DE L'INDUCTION DE LA DISSEMINATION DE SXT^{MO10} PAR LA CIPROFLOXACINE CHEZ $E. COLI$ CIP^R ET $E. COLI$ CIP^S

L'effet de la ciprofloxacine sur le transfert de l'élément SXT^{MO10} depuis des bactéries donneuses Cip^S et Cip^R a été étudié grâce à des expériences de conjugaison bactérienne sur filtre en suivant le même protocole utilisé que précédemment (§1.3.1). La Figure 46 regroupe les fréquences de conjugaison en transconjugants par receveuse pour chacune des souches donneuses. Pour la souche Cip^S , la fréquence de transfert basale de SXT^{MO10} est de $3,5 \times 10^{-5}$ transconjugants par receveuse (Tc/R), et le maximum de transfert de $7,3 \times 10^{-4}$ Tc/R est atteint après une exposition à 40 ng/mL de ciprofloxacine. Pour la souche Cip^R , la fréquence de transfert basale est de $1,4 \times 10^{-4}$ Tc/R, et le maximum de $1,7 \times 10^{-3}$ Tc/R est atteint après une exposition à 1920 ng/mL de ciprofloxacine. La fréquence de transfert basale de SXT^{MO10} dans la souche Cip^R est 4 fois supérieure à celle de la souche Cip^S , mais ce rapport reste trop faible pour conclure sur un réel effet de la mutation Cip^R sur la fréquence de dissémination basale de l'élément avec ce type d'expérience. Avec les deux bactéries donneuses, le maximum de transfert est à nouveau atteint à des concentrations au-

delà de leurs CMI respectives, ce qui remet encore une fois en question l'effet bactéricide de l'antibiotique, ou du moins pose question de l'effet « durée d'exposition à l'antimicrobien ». En considérant une population hypothétique mixte qui comprendrait à la fois la souche Cip^S et des variants Cip^R, on peut conclure que la ciprofloxacine pourrait exercer une action inductrice sur le transfert de SXT^{MO10} sur une gamme de concentration qui couvre 3 ordres de grandeur.

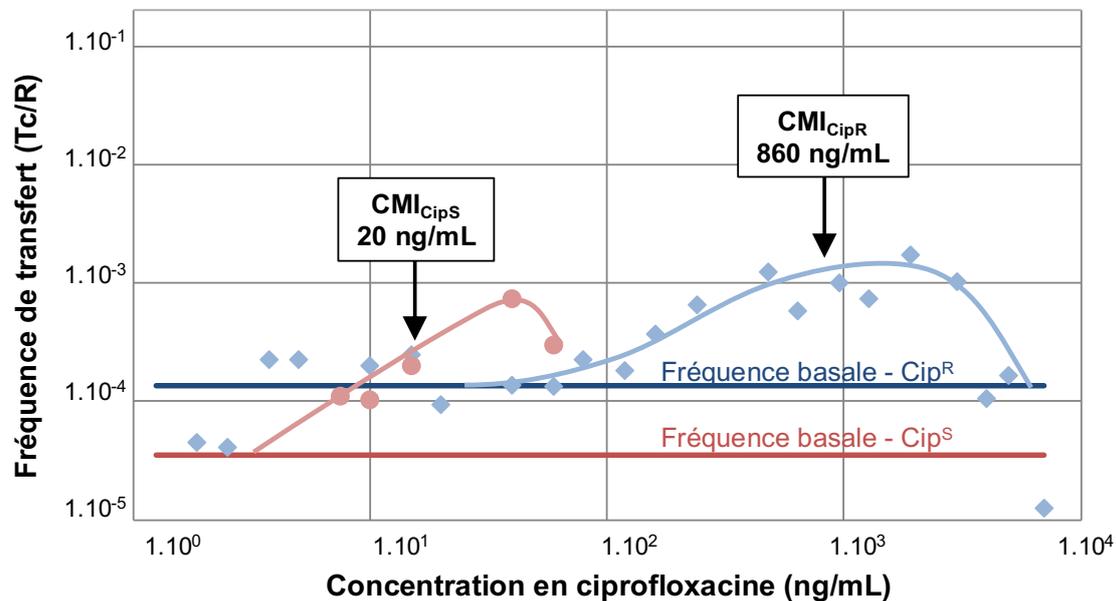


Figure 48 : Effet d'un traitement à la ciprofloxacine sur le transfert de l'élément SXT^{MO10} chez deux souches d'E. coli, CM1272 (Cip^S en rouge) et CM1366 (Cip^R en bleu). Les fréquences de transfert sont exprimées en nombre de transconjugants par bactéries receveuses. Résultats extraits du rapport de Stage d'A. Seghier (Master 1 au LCPME).

En résumé, ces données permettent de mettre en évidence que la ciprofloxacine n'a pas un effet bactéricide homogène sur une culture pure sensible à l'antibiotique. En se basant sur la fréquence de transfert de SXT^{MO10} exposé à différentes concentrations de ciprofloxacine, il semblerait qu'en fonction de la sensibilité de la souche à l'antibiotique, la ciprofloxacine soit capable d'induire le transfert de l'élément sur une gamme de concentration couvrant 3 ordres de grandeur, et que cette hausse d'induction est finalement limitée par l'augmentation de la toxicité de l'antibiotique. Dans un contexte environnemental, l'induction du transfert de SXT^{MO10} à des concentrations toxiques de l'antibiotique seraient néanmoins possible s'il s'agit d'une exposition transitoire.

2. EFFET DE L'HÔTE SUR L'INDUCTION ET LA MOBILITE DE L'ICE SXT^{MO10} IN VITRO

Les études réalisées jusqu'ici dans ce travail ou dans la littérature, ont principalement porté sur l'hôte *E. coli* pour lequel certaines molécules ont des effets inattendus sur l'expression des promoteurs impliqués dans la dissémination de l'élément, et donc sa fréquence de transfert. Si une partie de la régulation de SXT^{MO10} nous échappe, il est clairement apparu que même une culture pure d'*E. coli* présente déjà une certaine hétérogénéité qui pourrait expliquer l'inductibilité de l'élément au-delà de la CMI. Replacé dans un contexte environnemental, un niveau supérieur d'hétérogénéité est à considérer si l'on tient compte de la succession d'hôtes dans lesquels SXT^{MO10} peut transiter. En outre, compte tenu du fait que la réponse SOS puisse présenter des variations d'une espèce à l'autre, il est probable que l'élément pourra montrer une certaine variabilité comportementale vis à vis de sa régulation et donc de son transfert en fonction des hôtes rencontrés.

2.1. INDUCTION DE LA MOBILITE DES ICE SXT/391 CHEZ DIVERSES PROTEOBACTERIES

Une étude réalisée par Baharoglu et Mazel (2011), a permis de démontrer que les molécules capables d'induire la réponse SOS chez *E. coli*, ne sont pas forcément les mêmes que celles chez *V. cholerae*, et inversement (Baharoglu and Mazel, 2011). Dans leur étude, les auteurs ont utilisé une fusion transcriptionnelle entre le promoteur P_{recN} du régulon SOS et le gène codant la GFP qu'ils ont placé dans différentes souches/espèces : *E. coli* MG1655 et *V. cholerae* N16961 *hapR*⁺, ainsi que leurs mutants *lexA*^{ind} respectifs, mutants qui ne peuvent plus induire la réponse SOS car le répresseur LexA ne peut être clivé. Ces 4 systèmes rapporteurs ont ensuite été exposés à divers antibiotiques (Introduction §2.3, Figure 10) ce qui a permis de montrer, qu'en fonction de la nature de l'hôte, des antibiotiques autres que les classiques quinolones pouvaient être impliquées dans l'induction de la réponse SOS et donc, dans notre cas, possiblement le transfert des éléments SXT/R391.

2.1.1. INDUCTION DE P_{S086} DANS DIFFERENTES PROTEOBACTERIES : CRIBLAGE PRELIMINAIRE

Chez les bactéries hôtes des ICE de la famille SXT/R391, l'activation de la réponse SOS lève la répression exercée par SetR sur le promoteur P_{S086} . Ce dernier,

considéré comme le promoteur central de la régulation des ICE SXT/R391, permet donc l'expression de *setCD* qui code un complexe activateur stimulant la transcription des gènes de mobilité de ces ICE. Précédemment, nous avons démontré que P_{s086} était représentatif de l'induction des autres promoteurs des régulons de SetR et SetCD. L'influence de l'hôte sur l'expression de P_{s086} a ici été étudiée en remplaçant la fusion transcriptionnelle $pSEVA236::P_{s086}$ dans différentes souches de protéobactéries identifiées comme pouvant héberger un élément SXT/R391 : *Aeromonas hydrophila* CM1452, *Proteus mirabilis* BB2000, *Proteus mirabilis* HI4320, *V. cholerae hapR^{WT}*, *V. cholerae hapR⁺* et *V. vulnificus* CM1445. Comme précédemment avec *E. coli*, la fusion transcriptionnelle a été introduite dans des souches isogéniques avec ou sans SXT^{MO10} pour distinguer toute forme de régulation apportée par l'élément lui-même, à l'exception de *P. mirabilis* HI4320 qui possédait déjà un élément SXT/R391 endogène d'origine inconnue.

L'ensemble des biosenseurs construits à partir de P_{s086} et possédant SXT^{MO10} ont été exposés à un panel restreint de 16 antibiotiques ciblant la paroi, la membrane cellulaire, le ribosome, ou encore le métabolisme de l'ARN et de l'ADN, en suivant le protocole de criblage déjà présenté. Les luminogrammes obtenus ont rapidement montré des différences de profil en fonction de l'espèce ou de la souche étudiée (Figure 49). Chez *E. coli*, les molécules qui induisent l'expression d'une émission de luminescence sont celles qui génèrent un stress génotoxique, à savoir la ciprofloxacine, l'acide nalidixique et la norfloxacine. En revanche, chez *P. mirabilis* BB2000, le biosenseur semble également répondre à un stress sur la paroi cellulaire causé par l'imipénème (carbapénème), la céfépime ou encore la céfotaxime (céphalosporines), tandis que chez *A. hydrophila*, le biosenseur semble répondre à un stress traductionnel causé par la tétracycline et le chloramphénicol.

Dans certains cas, l'utilisation du protocole initialement établi pour les biosenseurs dérivés d'*E. coli* n'a pas permis l'exploitation des données en raison d'un niveau de luminescence basal en dessous de la limite de quantification de 5 coups par seconde (cps) pour 10 s de temps d'exposition (photo). Cette limitation peut être constatée visuellement par le manque d'homogénéité et la pixélisation des images de luminescence sur la Figure 49, notamment chez les biosenseurs dérivés de *V. cholerae* et *V. vulnificus*.

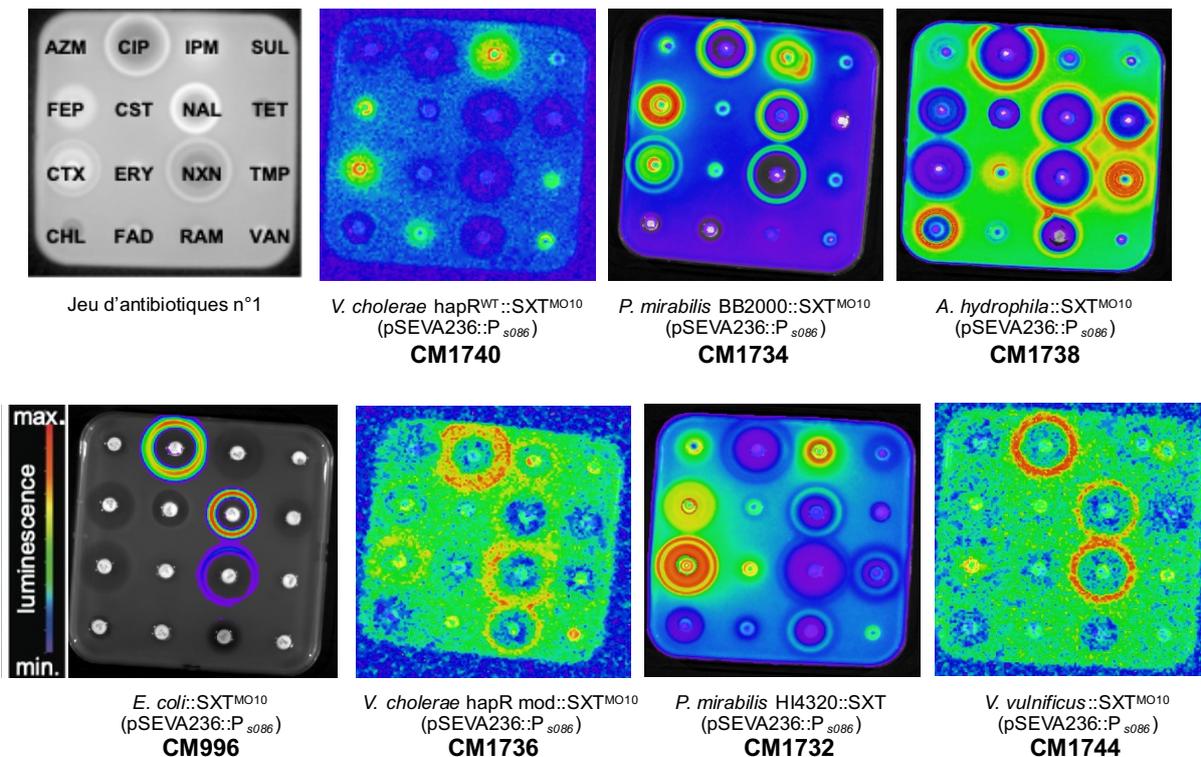


Figure 49 : Luminogrammes de 8 souches bactériennes d'espèces différentes exposées au même jeu de 16 antibiotiques. AZM (azithromycine), FEP (céfépime), CTX (céfotaxime), CHL (chloremphénicol), CIP (ciprofloxacine), CST (colistine), ERY (erythromycine), FAD (acide fusidique), IPM (imipénème), NAL (acide nalidixique), NXN (norfloxacine), RAM (rifampicine), SUL (sulfamide), TET (tétracycline), TMP (triméthoprime), VAN (vancomycine).

Les valeurs du bruit de fond de chacune de ces souches ont été extraites et regroupées dans la Figure 50. Il apparaît clairement que les différences de niveau dans le bruit de fond indiquent d'ores et déjà que le promoteur P_{s086} ne s'exprime probablement pas aussi bien d'une souche à l'autre, ni même entre deux souches d'une même espèce. C'est ce qui a été observé pour les deux souches de *P. mirabilis*, dont les profils d'induction aux antibiotiques ont été regroupées sur la Figure 51. De manière générale, les molécules qui induisent la luminescence chez *P. mirabilis* BB2000::SXT^{MO10}(pSEVA236::P_{s086}), sont les mêmes que pour *P. mirabilis* HI4320 (pSEVA236::P_{s086}) qui contient naturellement un ICE SXT/R391. Ceci est vrai sauf pour quelques antibiotiques qui ciblent les topoisomérases, comme la ciprofloxacine (CIP) et la norfloxacine (NXN). La différence dans les profils d'induction pourrait éventuellement s'expliquer par la nature de l'élément SXT/R391, qui est SXT^{MO10} dans le biosenseur dérivé de *P. mirabilis* BB2000, alors que dans le biosenseur dérivé de

P. mirabilis HI4320, il s'agit d'un élément SXT/R391 endogène de nature inconnue. Ce dernier possède un gène *s086* identique à 99% à celui de SXT^{MO10}, ce qui pourrait éventuellement expliquer quelques variations d'expression ou de régulation. Quoiqu'il en soit, il est apparu nécessaire d'adapter le protocole initial pour élever la luminescence au-dessus des limites de quantification chez les hôtes faiblement bioluminescent et ainsi comparer le comportement des souches les unes par rapport aux autres vis à vis de l'expression P_{s086}.

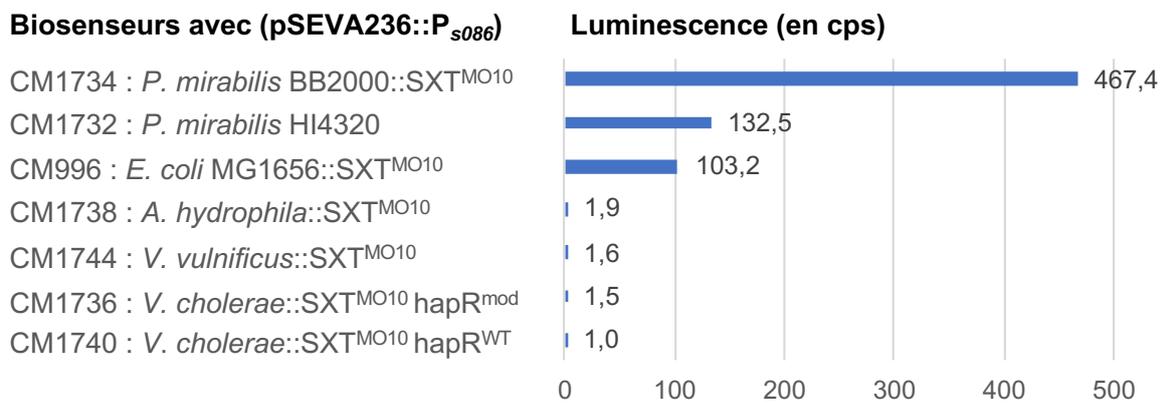


Figure 50 : Bruit de fond (en cps) en fonction de la nature de la souche bactérienne. La luminescence a été mesurée pendant 30 secondes (temps d'exposition photo) après 7 h d'incubation à 30°C.

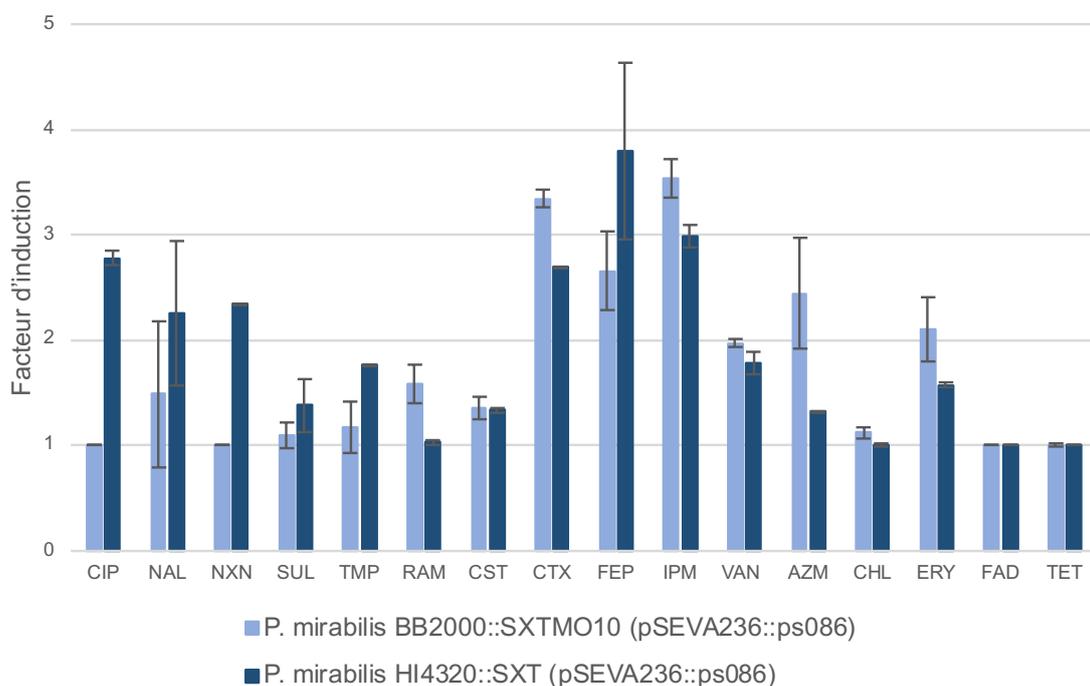


Figure 51 : Induction du promoteur P_{s086} en milieu LB par 16 antibiotiques chez deux individus d'une même espèce portant deux éléments SXT différents. Les cibles des antibiotiques sont les suivantes : l'ADN (CIP, NAL, NXN, SUL, TMP), l'ARN polymérase (RAM), la membrane (CST), la paroi (CTX, FEP, IPM, VAN) et le ribosome (AZM, CHL, ERY, FAD, TET). AZM (azithromycine), FEP (céfépime), CTX (céfotaxime), CHL (chlorempénicol), CIP (ciprofloxacine), CST (colistine), ERY (erythromycine), FAD (acide fusidique), IPM (imipénème), NAL (acide nalidixique), NXN (norfloxacine), RAM (rifampicine), SUL (sulfamide), TET (tétracycline), TMP (triméthoprime), VAN (vancomycine). Les expériences ont été réalisées en triplicatas et les barres d'erreur représentent l'écart-type.

2.1.2. ADAPTATION METHODOLOGIQUE POUR LE CRIBLAGE DE BIOSENSEURS A BAS NIVEAU DE LUMINESCENCE

Utilisé tel quel, le protocole selon Guilloteau et al (2021) ne permet pas d'évaluer l'induction de luminescence par les antibiotiques sur certains biosenseurs autres que ceux dérivés d'*E. coli* (Guilloteau et al., 2021). L'objectif ici était d'obtenir un niveau de bruit de fond (état non induit) au-dessus de la limite de quantification (LOQ). Pour cela, les différents hôtes porteurs de la fusion transcriptionnelle pSEVA236:: P_{s086} ont été utilisés pour tester trois paramètres susceptibles d'augmenter le niveau basal de luminescence mesuré : (1) le volume d'inoculum dans le tapis bactérien (0,3 ; 0,5 ; 1,5 et 3 mL), (2) le temps d'incubation sur la boîte (1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 7 h, 8 h et 24 h) au cas où l'optimum de luminescence différerait de celui d'*E. coli*, et (3) le temps de pose de la caméra CCD pour la mesure de la luminescence (1 s, 10 s, 60 s).

Globalement, les valeurs de la luminescence (en cps) augmentent en fonction du temps d'incubation (indépendamment du temps d'exposition) et le maximum d'intensité de luminescence est atteint à 8 h, après quoi ces valeurs diminuent fortement (données non présentées). Pour des raisons pratiques, la luminescence sera mesurée après 7 h, un temps d'incubation où les valeurs obtenues sont suffisamment élevées et permettent la réalisation des expériences dans une même journée de travail. D'après les résultats obtenus avec les biosenseurs *P. mirabilis* BB2000:: SXT^{MO10} (pSEVA236:: P_{s086}) (ou CM1734), *P. mirabilis*

HI4320::SXT^{end}(pSEVA236::P_{s086}) (ou CM1732) et *E. coli* MG1656::SXT^{MO10} (pSEVA236::P_{s086}) (ou CM996), il faudra au minimum 2 h d'incubation et 10 s de pose pour la mesure de la luminescence afin d'obtenir des valeurs au-dessus de la LOQ indépendamment du volume de bactéries dans le tapis (Figure 52). En ce qui concerne *V. cholerae* N16961 *hapR*^{WT}::SXT^{MO10}(pSEVA236::P_{s086}) (ou CM1740) et *V. vulnificus* CM1445::SXT^{MO10} (pSEVA236::P_{s086}) (ou CM1744), le temps de pose devra être au minimum de 60 s pour être exploitable. Enfin, aucune des conditions testées n'a permis d'obtenir des valeurs de luminescence exploitables pour les souches de *V. cholerae* N16961 *hapR*⁺::SXT^{MO10}(pSEVA236::P_{s086}) (ou CM1736) et *A. hydrophila* CM1452::SXT^{MO10}(pSEVA236::P_{s086}) (ou CM1738), pour lesquelles il faudrait sans doute un temps d'exposition supérieur à 60 s, ce qui est incompatible avec la faible stabilité de la luciférase dans le temps (données non représentées car inférieures à la LOQ). Cela signifie également que le promoteur P_{s086} n'est pour ainsi dire pas ou très peu actif chez ces souches et ouvre la question de savoir si ces dernières sont susceptibles de réellement promouvoir la dissémination de SXT^{MO10} vers d'autres bactéries faute d'expression de leurs fonctions de transfert.

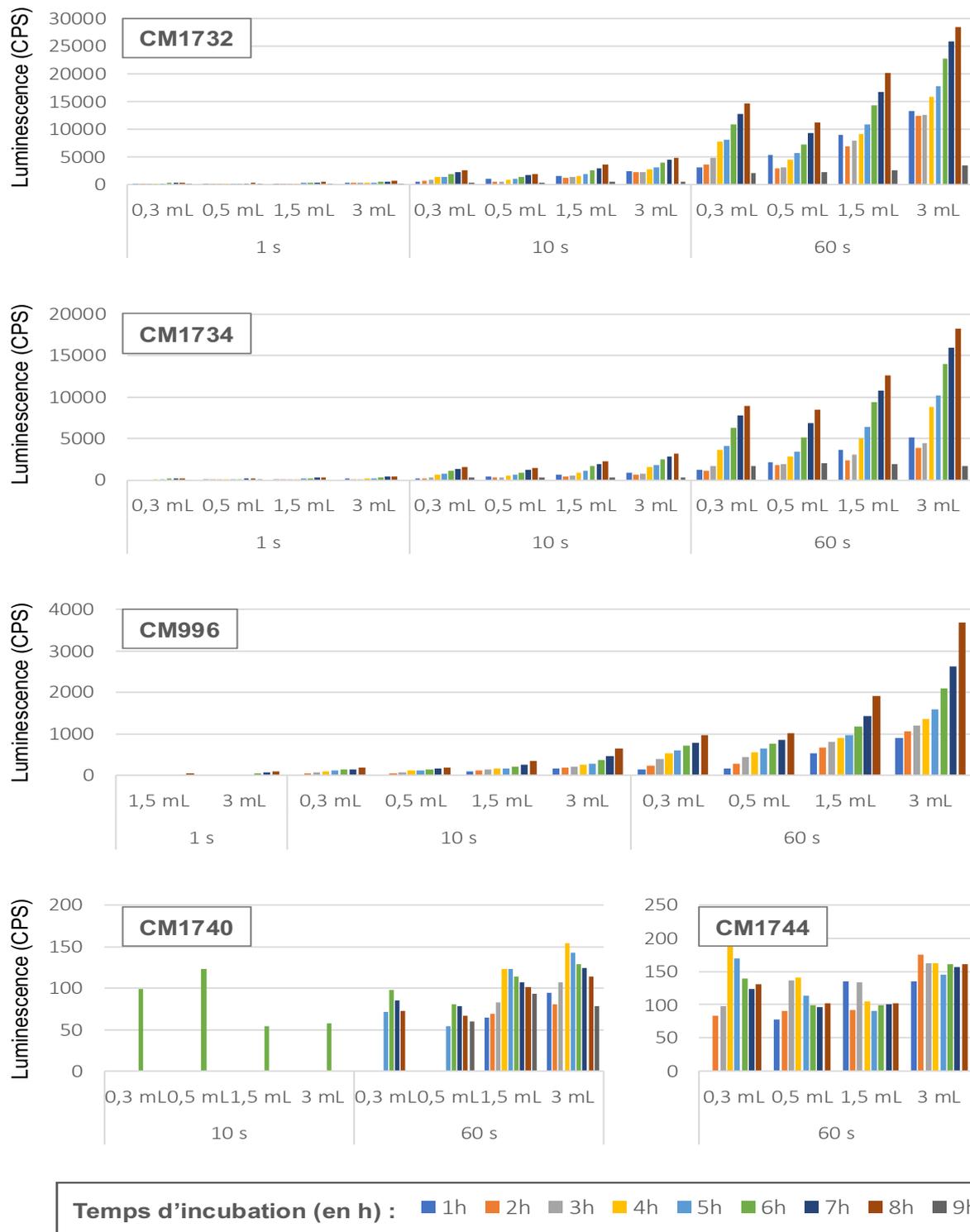


Figure 52 : Intensité de luminescence en fonction de la nature de la souche bactérienne, de la quantité de bactéries mises en jeu (0,3 mL à 3,0 mL), du temps d'incubation (1h à 9h) et du temps d'exposition (1 s à 60 s). Pour chacune des souches CM1732 (*P. mirabilis* HI4320::*SXT*^{end}(*pSEVA236*::*P*_{s086})), CM1734 (*P. mirabilis* BB2000::*SXT*^{MO10}(*pSEVA236*::*P*_{s086})), CM996 (*E. coli* MG1656::*SXT*^{MO10}(*pSEVA236*::*P*_{s086})), CM1740 (*V. cholerae* N16961

hapR^{WT}::SXT^{MO10}(pSEVA236::P_{s086}) et *CM1744 (V. vulnificus CM1445::SXT^{MO10}(pSEVA236::P_{s086}))* la luminescence a été mesurée à 1 s, 10 s et 60 s (temps d'exposition) pendant 9 h d'incubation. Seuls les résultats supérieurs à la LOQ (dépendante du temps d'exposition et de la quantité de bactéries mises en jeu) sont représentés sur les graphiques.

Les nouvelles conditions d'acquisition testées permettent d'obtenir des valeurs de luminescence exploitables, mais les données d'induction obtenues grâce à ces différentes conditions (différences d'inoculum et/ou du temps de pose d'une souche à l'autre) ne peuvent être comparées directement en tant que telles. Le travail effectué par A. Porteu de la Morandière pendant son stage de 2^{ème} année de Master a, en partie, consisté à mesurer la luminescence des souches biosenseurs en fonction de la taille de l'inoculum et du temps d'exposition. Les données récoltées ont permis d'établir que des facteurs de correction pouvaient être appliqués pour comparer des niveaux de luminescence obtenus avec des volumes d'inoculum et de temps de pose différents. L'utilisation de différents paramètres n'est donc pas une limite à la méthode, et dans ces conditions, la luminescence pourra être mesurée après 7 h d'incubation, durant un temps de pose de (i) 10 s sur un tapis contenant 0,5 mL de *P. mirabilis* HI4320 ::SXT^{end} (pSEVA236 ::P_{s086}), *P. mirabilis* BB2000 ::SXT^{MO10} (pSEVA236 ::P_{s086}) et *E. coli* MG1656 ::SXT^{MO10} (pSEVA236 ::P_{s086}) ; et (ii) 60 s sur un tapis contenant 0,5 mL de *V. cholerae* N16961 *hapR^{WT}::SXT^{MO10}* (pSEVA236 ::P_{s086}) et *V. vulnificus* CM1445 ::SXT^{MO10} (pSEVA236 ::P_{s086}). Dans l'ensemble, il reste à déterminer si les différences de profil observées reflètent également une différence de comportement dans la régulation du promoteur ou pas.

2.1.3. EFFET DE L'HOTE DONNEUR SUR LA FREQUENCE DE TRANSFERT DE SXT^{MO10}

Précédemment, nous avons constaté des différences dans l'expression de P_{s086} en fonction de la bactérie hôte (Figure 49), mais sans pour autant confirmer cet effet sur le transfert de l'élément. Certains ICE de la famille SXT/R391 ont déjà été étudiés *in vitro* pour leur capacité à se transférer par conjugaison bactérienne d'une bactérie donneuse porteuse de l'élément d'intérêt vers une bactérie receveuse (ICE*PmiJpn1* (Lei *et al.*, 2016), SXT^{MO10} (M K Waldor, Tschäpe and Mekalanos, 1996) à des

fréquences parfaitement mesurables, sans que la relation entre le donneur et l'efficacité de transfert n'ait été mise plus en avant. Afin d'étudier l'effet de la souche hôte (donneuse) sur la dissémination de l'élément, des expériences de conjugaison bactérienne ont été réalisées avec diverses espèces connues pour être des porteurs d'éléments SXT/R391 dans la littérature.

Dans la série d'expériences qui va suivre, l'élément SXT^{MO10} a été introduit dans différents hôtes par conjugaison bactérienne entre la souche donneuse suicide (car DAP⁻) *E. coli* CM413::SXT^{MO10} (CM1466), et les différentes souches receveuses *V. parahaemolyticus* CM1446, *V. vulnificus* CM1445, *V. cholerae* N16961 version *hapR*^{WT}, *A. hydrophila* CM1452 et *P. mirabilis* BB2000. Les transconjugants ont été sélectionnés sur un milieu LB (ou PY pour *P. mirabilis*) sans DAP (non permissif pour la bactérie donneuse) supplémenté en sulfaméthoxazole dont la résistance est apportée par SXT^{MO10}. Au total, 5 souches portant l'élément SXT^{MO10} ont été obtenues (CM1599, CM1597, CM1595, CM1482 et CM1702).

Dans un second temps, des expériences de conjugaison bactérienne ont été réalisées *in vitro*, entre les 5 souches porteuses de SXT^{MO10} nouvellement construites, *V. parahaemolyticus* ::SXT^{MO10} (CM1599), *V. vulnificus*::SXT^{MO10} (CM1597), *V. cholerae*::SXT^{MO10} *hapR*^{WT} (CM1595), *A. hydrophila* ATCC7966::SXT^{MO10} (CM1482) et *P. mirabilis* BB2000 ::SXT^{MO10} (CM1702), mais aussi *E. coli* MG1656::SXT^{MO10}-tagpB10 (CM1272), et la bactérie receveuse *E. coli* MG1655 (CM125, Nal^R). Les croisements entre chaque couple de D/R ont été réalisés sur filtre comme précédemment (§1.3.3), et la Figure 53 regroupe les fréquences de transfert calculées en transconjugants par receveuse (Tc/R) pour chacune des souches donneuses. Globalement, les fréquences de transfert ne varient pas seulement entre les différents genres ($3,3 \times 10^{-7}$ Tc/R pour *V. vulnificus* vs $1,3 \times 10^{-5}$ Tc/R pour *E. coli*), mais elles diffèrent également entre les individus d'un même genre, allant de $8,9 \times 10^{-5}$ Tc/R pour *V. parahaemolyticus* à moins de $1,0 \times 10^{-9}$ Tc/R pour *V. cholerae*. Cependant, on observe quand même des fréquences de transfert similaires entre *E. coli* et *P. mirabilis* qui sont de l'ordre de $1,0 \times 10^{-5}$ Tc/R.

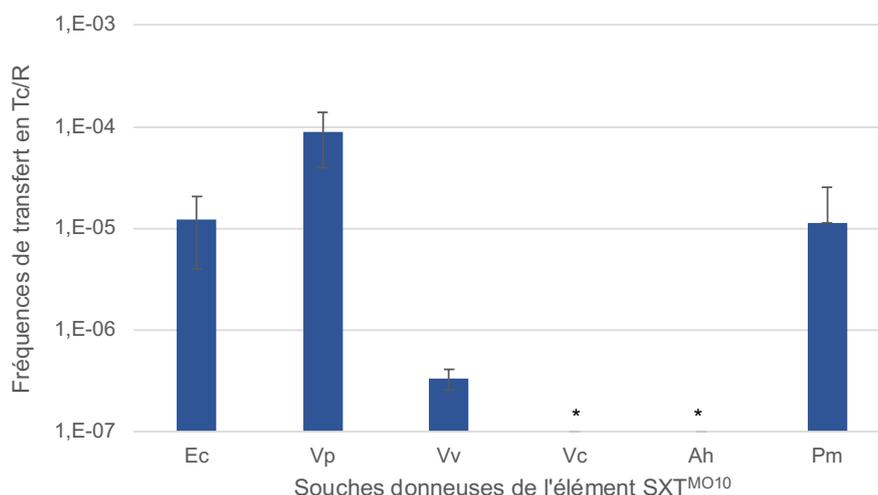


Figure 53 : Fréquences de transfert en transconjugants (Tc) par bactéries receveuses (R), en fonction de la souche donneuse de l'élément SXT^{MO10}. Ec : *E. coli* MG1656::SXT^{MO10}-tagpB10 (CM1272) ; Vp : *V. parahaemolyticus* ::SXT^{MO10} (CM1599) ; Vv : *V. vulnificus* ::SXT^{MO10} (CM1597) ; Vc : *V. cholerae*::SXT^{MO10} hapR^{WT} (CM1595) ; Ah : *A. hydrophila* ATCC7966::SXT^{MO10} (CM1482) ; Pm : *P. mirabilis* BB2000 ::SXT^{MO10} (CM1702). Les expériences de conjugaison ont été réalisées dans le milieu de culture LB. (*) pour Vc et Ah qui présentent un nombre de Tc inférieur à 30 UFC à la plus forte concentration, la fréquence de transfert en Tc/R a été considérée comme étant inférieure à $1,0 \times 10^{-9}$. Les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne, où n=3 sauf pour Vv où n=2.

L'ensemble des données a permis de démontrer un effet hôte important sur la capacité de dissémination de l'élément SXT^{MO10}. Ces observations sont à mettre en relation avec l'absence d'inductibilité de SXT^{MO10} chez certaines bactéries, soulignant que l'élément n'est pas régulé de la même façon dans différents hôtes. La raison à cela est encore obscure. On peut cependant noter que l'absence de transfert à partir de *V. cholerae* hapR^{WT} (CM1595), par exemple, se corrèle à une expression quasi-inexistante du promoteur P_{s086} (Figure 49). Dans cet exemple, il se pourrait que la protéine SetR de SXT^{MO10} ne soit pas reconnue par la protéine RecA de la souche hôte, ce qui empêcherait de lever la répression et l'expression des gènes ayant des fonctions de dissémination. D'autres explications sont possibles, comme l'incompatibilité entre partenaires, par exemple lorsque l'un émet un composé antagoniste vis à vis de l'autre, réduisant ainsi les chances qu'un échange survienne.

Globalement, on devrait s'attendre à avoir différents comportements dans la dissémination de l'élément dans l'environnement, et l'hôte a un rôle très important dans la chaîne de transmission, notamment dans des environnements complexes. Plusieurs paramètres entreraient en jeu pour que le transfert de l'élément soit un succès, dont la nature de la bactérie donneuse qui pourrait également jouer sur le spectre de bactéries receveuses, sa fréquence de transfert de base et/ou son inductibilité par des antibiotiques ou d'autres molécules. Dans ces conditions, il serait judicieux d'étudier le transfert de SXT^{MO10} dans des conditions environnementales en utilisant au moins deux bactéries avec des fréquences transfert basales similaires, mais dont seule l'une peut être induite par un antibiotique. A ce propos, divers profils d'induction ont été obtenus en fonction de la nature des souches de bactéries biosenseurs. Des inductions de luminescence ont été observées par des antibiotiques qui ciblent l'ADN, mais aussi par d'autres familles d'antibiotiques plus inattendus, comme ceux qui ciblent la paroi cellulaire ou créent un stress ribosomique. Cependant, nous avons vu avec les biosenseurs dérivés d'*E. coli* que nous pouvions avoir de fausses inductions. Pour aller plus loin, la méthode initialement développée pour l'étude de biosenseurs dérivés d'*E. coli*, reposant sur l'emploi de fusion avec des promoteurs constitutifs, a été adaptée à d'autres souches du genre *Proteus* et *Vibrio*. Toutefois, dans le cadre de ce travail, nous allons plus particulièrement étudier *P. mirabilis* BB2000::SXT^{MO10}(pSEVA236 ::P_{s086}), qui a un niveau basal de luminescence qui est supérieur à celui d'autres biosenseurs. Ce dernier présente une sensibilité à davantage d'inducteurs que *E. coli* avec qui il partage des fréquences de transfert basales similaires. En outre, il s'agit d'une bactérie adaptée à l'environnement dulcicole et qui pourrait être utilisée de manière pertinente et appropriée en tant que donneuse de SXT^{MO10} lors d'expériences de transferts en microcosmes de rivière, contrairement à des souches du genre *Vibrio* qui sont plutôt retrouvées dans des eaux saumâtres.

2.2. INDUCTION DU PROMOTEUR P_{s086} CHEZ *P. MIRABILIS* BB2000

2.2.1. 2.2.2.1 CARACTERISATION DES PROFILS D'INDUCTION DE LUMINESCENCE

Dans un premier temps, le biosenseur *P. mirabilis* BB2000::SXT^{MO10}(pSEVA236::P_{s086}), aussi appelé CM1734, a été exposé à 16 antibiotiques en milieu LB comme précédemment (Figure 54 a). Contrairement à ce qui avait été observé chez *E. coli*, toutes les molécules testées chez *P. mirabilis* n'ont pas nécessairement créées un halo d'inhibition autour de la zone de dépôt de l'antibiotique. Dans ces conditions, deux types de profils d'induction ont été observés (Figure 54 b) : soit une induction discrète qui se manifeste par un halo de luminescence distinct lorsqu'un maximum d'induction est atteint à distance du disque (cas de la ciprofloxacine et de l'acide nalidixique), soit une induction diffuse lorsque l'induction augmente en se rapprochant du dépôt sans pour autant atteindre un maximum (cas de l'imipénème et du triméthoprim). Dans ce deuxième cas de figure, il semble que la molécule testée ne soit pas suffisamment concentrée pour atteindre un maximum d'induction, ce qui se corrobore avec l'absence de toxicité observée (pas de halo d'inhibition). Cela pourrait signifier que, pour quelques antibiotiques, la souche *P. mirabilis* CM1734 répond possiblement à des concentrations d'antibiotiques plus élevées que dans le cas d'*E. coli* CM996. Étant donné que, dans le cas d'une induction partielle, le maximum d'induction n'ait pu être observé, quelques antibiotiques comme l'azitromycine, la rifampicine, la céfotaxime, l'imipénème, le triméthoprim et l'érythromycine ont été à nouveau testés mais avec des charges de disque allant de 2 à 400 fois plus élevées pour voir si le maximum d'induction pouvait être atteint (données non-montrées). Curieusement, aucune tentative n'a permis d'atteindre ce maximum hypothétique.

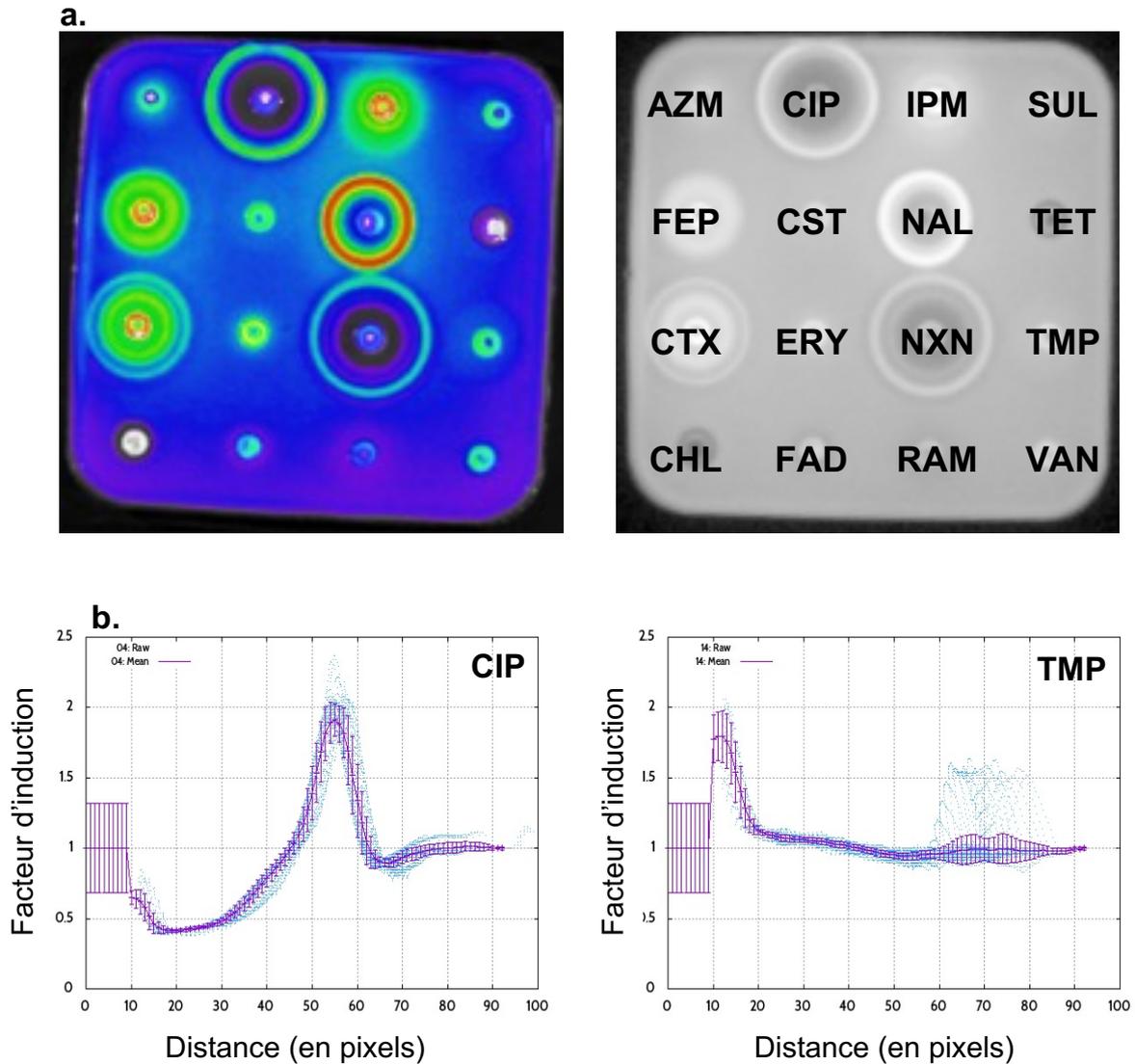


Figure 54 : Luminogramme et profils d'induction obtenus pour l'expression du promoteur P_{s086} chez *P. mirabilis* $BB2000::SXT^{MO10}(pSEVA236::P_{s086})$, *CM1734*, après 7h d'exposition à 16 antibiotiques sur milieu de culture LB. (a) Luminogramme visualisé grâce à l'interface du logiciel d'acquisition IndiGO où les couleurs les plus chaudes indiquent une augmentation de l'expression du promoteur testé. (b) Profils d'induction en fonction de la distance au dépôt (extraits à partir du luminogramme). AZM (azithromycine), FEP (céfépime), CTX (céfotaxime), CHL (chlorempénicol), CIP (ciprofloxacine), CST (colistine), ERY (erythromycine), FAD (acide fusidique), IPM (imipénème), NAL (acide nalidixique), NXN (norfloxacine), RAM (rifampicine), SUL (sulfamide), TET (tétracycline), TMP (triméthoprim), VAN (vancomycine).

2.2.2. EFFET DU MILIEU DE CULTURE SUR L'INDUCTION DE P_{S086} ET LA MOBILITE DE SXT^{MO10}

2.2.2.1. EFFET DU MILIEU DE CULTURE SUR L'INDUCTION DE LUMINESCENCE

Parmi les 16 antibiotiques testés sur *P. mirabilis* BB2000:: SXT^{MO10} (pSEVA236 :: P_{S086}) en milieu LB (Figure 54 a), la céfotaxime (CTX) se démarque des autres en raison d'une émission de luminescence détectable à l'intérieur d'un halo d'inhibition et qui serait à l'origine d'un double pic d'induction (Figure 55 a). Considérant que sur un milieu LB, *P. mirabilis* forme des colonies qui diffusent sans limite à la surface de la gélose, nous nous sommes posés la question de savoir si la luminescence observée à l'intérieur du halo d'inhibition ne pouvait pas résulter de la recroissance du biosenseur dans cette zone. Pour vérifier cela, les expériences ont été renouvelées en utilisant le milieu PY, à basse concentration en électrolytes, de manière à limiter la diffusion de *P. mirabilis* sur la gélose. Les luminogrammes et profils d'induction obtenus montrent clairement que, pour des antibiotiques tels que la céfotaxime, les inductions diffuses observées en LB ont disparu en milieu PY (Figure 55 b), où il ne subsiste que les inductions de luminescence discrètes (Figure 56). Une explication possible pour expliquer ce phénomène serait que la diffusion de certains antibiotiques comme la céfotaxime génère un halo d'inhibition mais que, la diffusion aidant, la concentration en antibiotique finisse par décroître au cours du temps et que, dans des conditions où la bactérie est mobile, une recolonisation de la zone du halo d'inhibition redevient possible. Alternativement, il pourrait s'agir d'une forme de résistance associée à cette version mobile de la bactérie (« swarmer cell ») par ailleurs connue pour présenter des modifications physiologiques profondes (Armbruster and Mobley, 2012). Quoi qu'il en soit, ces observations montrent que le milieu de culture influence le profil d'induction de luminescence et peut générer des observations artéfactuelles. Le choix du milieu reste donc un point critique pour évaluer l'inductibilité du promoteur P_{S086} , en particulier chez *P. mirabilis*.

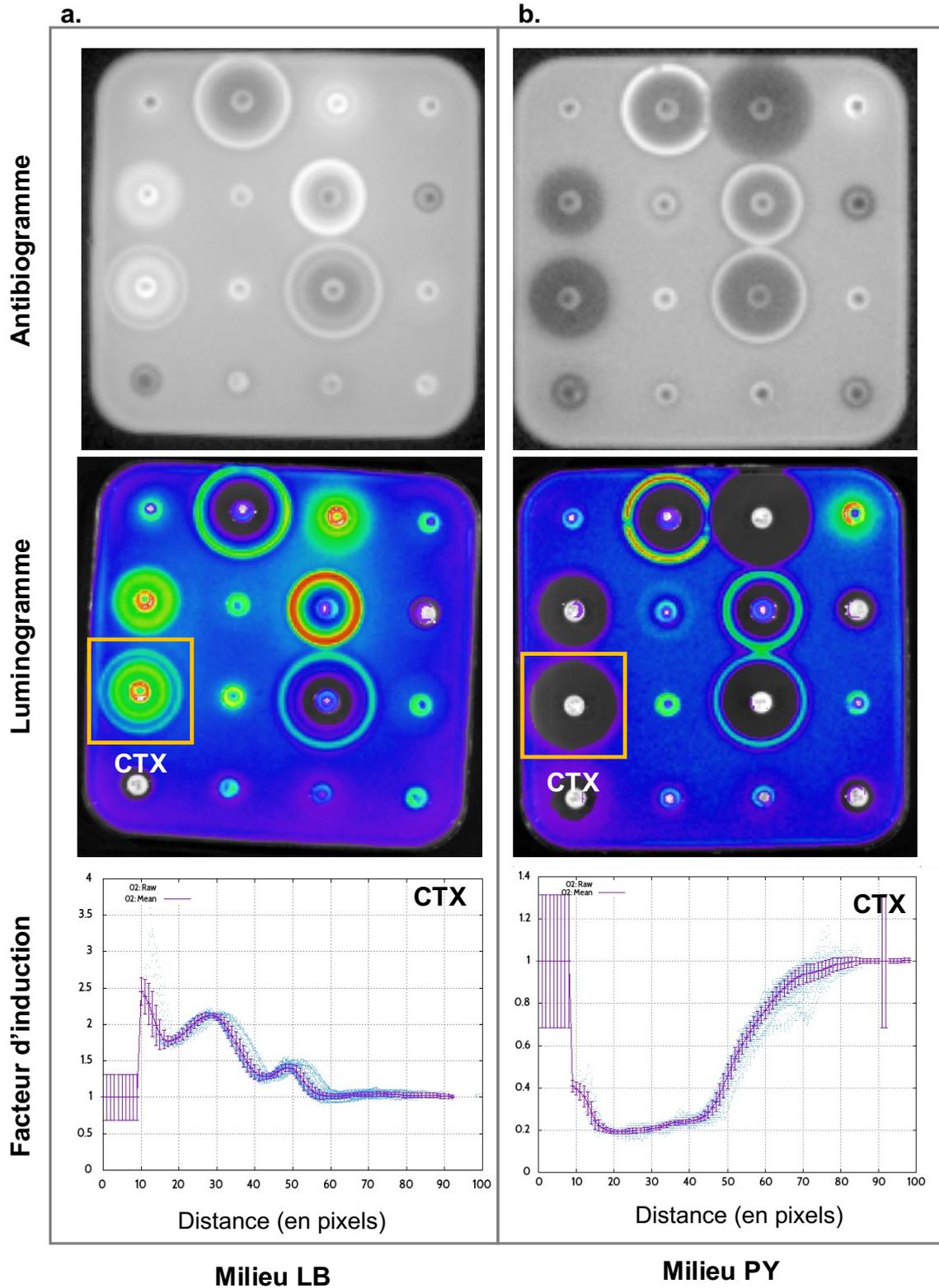


Figure 55 : Antibigrammes et luminogrammes de *P. mirabilis* BB2000::SXT^{MO10} (pSEVA236 ::P_{s086}) (CM1734) obtenus après 7 h d'exposition à 16 antibiotiques comme précédemment (Figure 54), ainsi que les profils d'induction de la céfotaxime (CTX) cultivés (a) sur milieu de culture LB, et (b) sur milieu de culture PY. Les

luminogrammes sont visualisés grâce à l'interface du logiciel d'acquisition IndiGO où les couleurs les plus chaudes indiquent une augmentation de l'expression du promoteur testé.

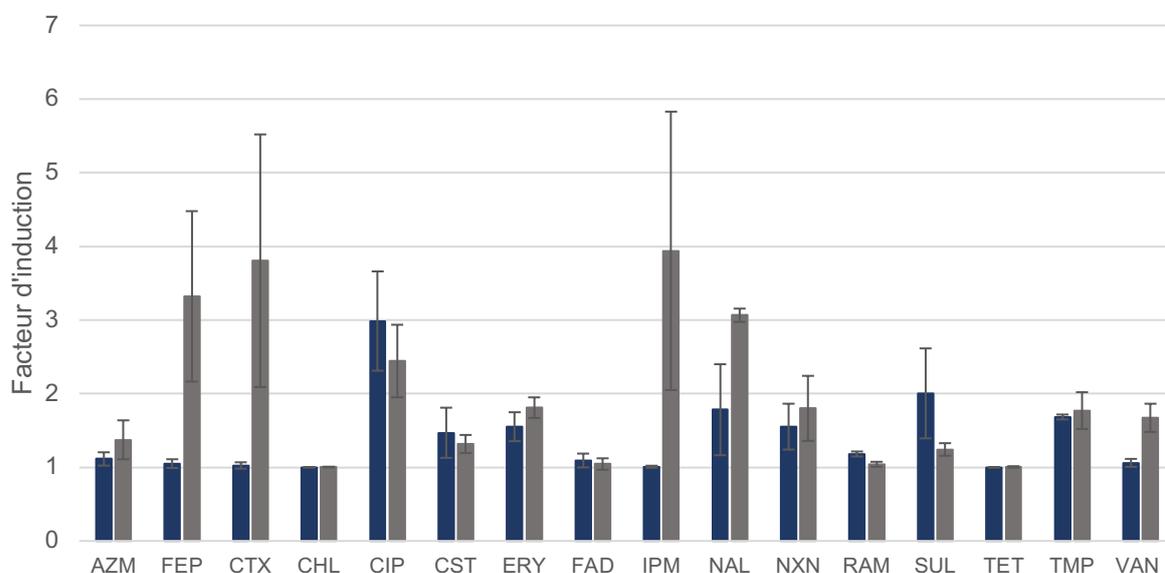


Figure 56 : Induction de luminescence chez *P. mirabilis* BB2000::SXT^{MO10} (pSEVA236::P_{s086}) sur les milieux de culture PY (en bleu), et LB (en gris). AZM (azithromycine), FEP (céfépime), CTX (céfotaxime), CHL (chloremphténicol), CIP (ciprofloxacine), CST (colistine), ERY (érythromycine), FAD (acide fusidique), IPM (imipénème), NAL (acide nalidixique), NXN (norfloxacine), RAM (rifampicine), SUL (sulfamide), TET (tétracycline), TMP (triméthoprime), VAN (vancomycine). Les expériences ont été réalisées en triplicatas et les barres d'erreur représentent l'écart standard à la moyenne.

2.2.2.2. INDUCTIBILITE DU PROMOTEUR P_{S086} CHEZ *P. MIRABILIS* BB2000

Nous savons, grâce à nos travaux menés sur *E. coli*, que l'émission de luminescence peut varier indépendamment de l'expression des promoteurs lorsqu'une interférence avec la respiration survient (§1.2.2). Cette possible interférence a également été évaluée chez *P. mirabilis* BB200 et ses dérivées. Ainsi, des fusions transcriptionnelles avec des promoteurs constitutifs de différentes forces ont également été introduites chez *P. mirabilis* BB2000 avec ou sans SXT^{MO10} (Tableau

5). Ces biosenseurs constitutifs ont été exposés aux 16 antimicrobiens sur les milieux de culture LB et PY pour tenir compte de la diffusion de la bactérie. L'analyse des luminogrammes montre que, comme pour *E. coli*, trois types de profils d'induction sont discernables (Figure 57) : (1) une absence d'effet de l'antibiotique sur l'émission de luminescence des biosenseurs constitutifs, (2) une induction de luminescence identique chez tous les biosenseurs constitutifs et (3) une émission de luminescence inversement proportionnelle à la force des promoteurs. Les données obtenues ont été utilisées pour construire des lignes de base afin d'identifier les inductions vraies du promoteur P_{s086} pour chacun des antibiotiques testés. Nos résultats indiquent que, quelles que soient les molécules testées et indépendamment des milieux de culture utilisés, l'expression du promoteur P_{s086} ne dépasse jamais la ligne de base définie par la réponse des biosenseurs constitutifs. De fait, aucune molécule ne semble induire l'expression des régulons SetR et SetCD chez *P. mirabilis* BB2000::SXT^{MO10}, suggérant qu'il n'est pas régulé par ces antibiotiques, y compris les quinolones, contrairement à ce qui avait été observé chez *E. coli*.

La comparaison des niveaux de luminescence entre les expériences menées en milieu LB et celles menées en PY semblait indiquer que P_{s086} était plus fortement exprimé dans le premier. Dans une dernière série d'expériences, l'efficacité du transfert de SXT^{MO10} sur les deux milieux a été évaluée en utilisant le même protocole de conjugaison que précédemment entre la bactérie donneuse *P. mirabilis* BB2000 ::SXT^{MO10} (CM1702, ChI^R) et la bactérie receveuse *E. coli* MG1655 (CM125, Nal^R). Les résultats obtenus ont finalement montré que les fréquences de transfert obtenues sur les deux milieux étaient semblables, de l'ordre de 1×10^{-5} Tc/R (Figure 58), excluant donc tout effet du milieu de culture sur la régulation de l'élément. On notera par ailleurs que cette fréquence de base est également semblable à celle obtenue pour *E. coli* (Figure 53), limitant donc la différence entre les deux espèces à une perte de l'inductibilité de P_{s086} chez *P. mirabilis* BB2000.

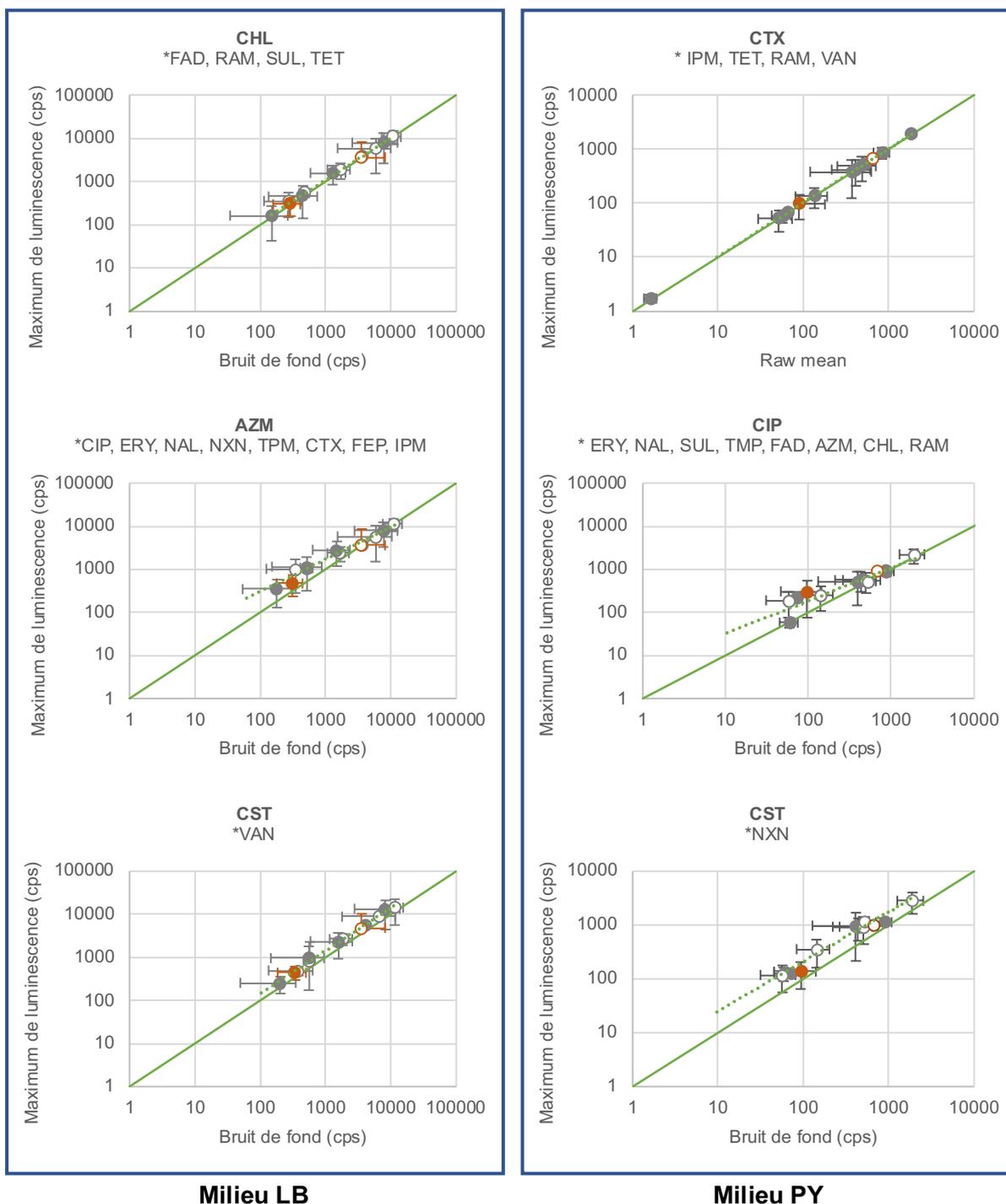


Figure 57 : Profils d'induction des biosenseurs portant le promoteur P_{s086} de SXT^{MO10} dans *P. mirabilis* BB2000 (○) et *P. mirabilis* BB2000:: SXT^{MO10} (●), ainsi que des promoteurs constitutifs dans *P. mirabilis* BB2000 (○) et *P. mirabilis* BB2000:: SXT^{MO10} (●), exposés à divers antibiotiques sur les milieux de culture LB et PY. La ligne continue verte représente la médiane, et les pointillés rouges représentent la ligne de base d'expression des promoteurs constitutifs dans (i) le cas de figure sans induction comme le chloramphénicol (CHL) et la céfotaxime (CTX); (ii) une induction dépendante

de la force du promoteur constitutif, comme avec l'azytromycine (AZM) ou la ciprofloxaïne (CIP) ou (iii) une Induction non spécifique de l'ensemble des promoteurs par la colistine (CST). Les astérisques correspondent aux antibiotiques qui ont le même profil d'induction. Chaque valeur de luminescence est une moyenne d'un triplicata expérimental et les barres d'erreur représentent l'erreur normale à la moyenne. AZM (azithromycine), FEP (céfépime), CTX (céfotaxime), CHL (chlorempénicol), CIP (ciprofloxacine), CST (colistine), ERY (érythromycine), FAD (acide fusidique), IPM (imipénème), NAL (acide nalidixique), NXN (norfloxacine), RAM (rifampicine), SUL (sulfamide), TET (tétracycline), TMP (triméthoprim), VAN (vancomycine).

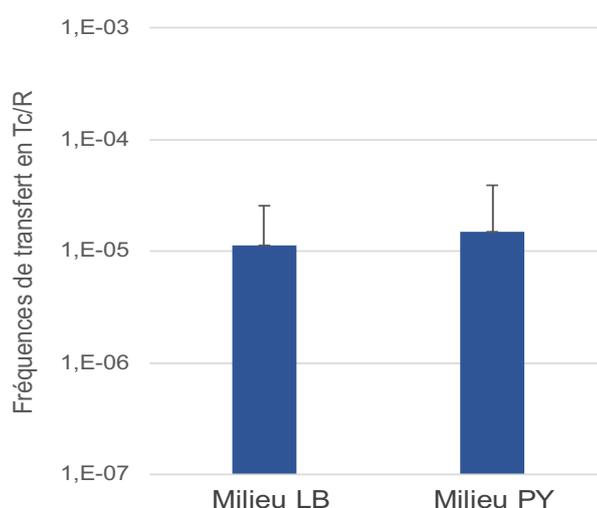


Figure 58 : Effet du milieu de culture sur les fréquences de transfert de SXT^{MO10} chez *P. mirabilis* BB2000:: SXT^{MO10} (CM1702). Les fréquences de transfert sont calculées en transconjugants (Tc) par bactéries receveuses (R). Les expériences de conjugaison ont été réalisées dans les milieux de culture LB et PY. Les barres d'erreur représentent les écarts à la moyenne, où $n=3$.

3. TRANSFERT DE SXT^{MO10} DANS L'ENVIRONNEMENT

Le projet AquaResist a pour objectif d'étudier le transfert de l'antibiorésistance par les éléments SXT/R391 en milieu piscicole dulcicole et en rivière. En d'autres termes, il s'agit d'environnements aquatiques en eau douce. De ce fait, nous avons décidé d'exclure de la suite de l'étude les souches du genre *Vibrio* qui sont préférentiellement retrouvées dans des environnements salins. *A. hydrophila* ne

transférant que très peu l'élément SXT^{MO10} *in vitro* a également été écartée. Ainsi, seules *E. coli* et *P. mirabilis* ont été retenues pour la suite de ce travail pour les utiliser en tant que bactéries donneuses lors de l'étude du transfert de SXT^{MO10} dans des microcosmes de rivières. Étant donné qu'elles présentent des fréquences de transfert basales similaires *in vitro* (1×10^{-5} Tc/R), nous pourrions étudier l'effet de la bactérie hôte sur la régulation de l'élément *in situ*. En outre, une différence importante réside dans l'inductibilité du transfert de l'élément par la ciprofloxacine chez *E. coli*, mais pas chez *P. mirabilis*. Cependant, il n'est pas exclu que, dans l'environnement, des bactéries receveuses soient capables de relayer SXT^{MO10} et d'être elles-mêmes inductibles par la ciprofloxacine. Dans cette dernière partie de ce travail, Il s'agissait d'étudier la dissémination de l'ICE SXT^{MO10} en situation complexe vers des communautés environnementales maintenues en microcosme et de déterminer si un antibiotique tel que la ciprofloxacine pouvait avoir un impact sur le devenir de l'élément. En résumé, les deux espèces donneuses *E. coli* et *P. mirabilis* envisagées pour inoculer une série de microcosmes de rivière, ont été sélectionnées car toutes deux (1) permettent de transférer l'élément à une fréquence de base relativement importante, (2) sont compatibles avec un scénario de contamination anthropogénique de rivières, et (3) que l'une supporte une induction de l'élément par la ciprofloxacine *in vitro*.

Pour suivre la dissémination de SXT^{MO10} dans une matrice environnementale, nous avons adapté l'approche moléculaire développée par Bonot et Merlin (2010) et présentée dans l'introduction. Ce type d'expériences de transfert consiste à introduire une bactérie donneuse porteuse d'un EGM conjugatif dans une matrice environnementale maintenue en microcosme, puis de quantifier de manière spécifique à la fois la bactérie donneuse et l'élément d'intérêt au cours du temps (Figure 59). L'évolution du rapport entre l'élément et son hôte donneur indique s'il y a eu transfert vers des bactéries autochtones ou pas. Tout repose sur l'existence de marqueurs spécifiques aux protagonistes pour dessiner et utiliser des réactions de qPCR ciblées. A ce propos, cette partie du travail a débuté par l'étiquetage de SXT^{MO10} et l'optimisation des qPCR destinées à la quantification de l'élément et de la première bactérie donneuse choisie, *E. coli* MG1655 Δ lacZY (CM408). Dans un deuxième temps nous nous sommes intéressés au deuxième hôte donneur choisi, *P. mirabilis* BB2000.

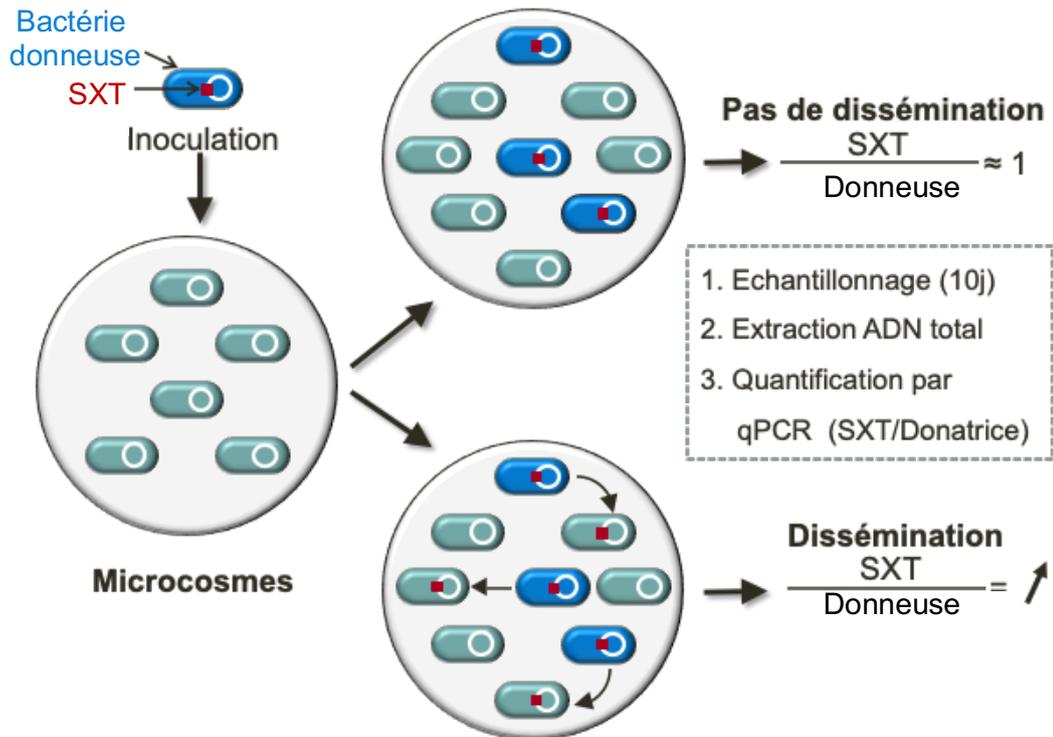


Figure 59 : Méthode adaptée de Bonot et Merlin (2010, LCPME) pour le suivi du transfert de l'élément SXT/R391 dans l'environnement.

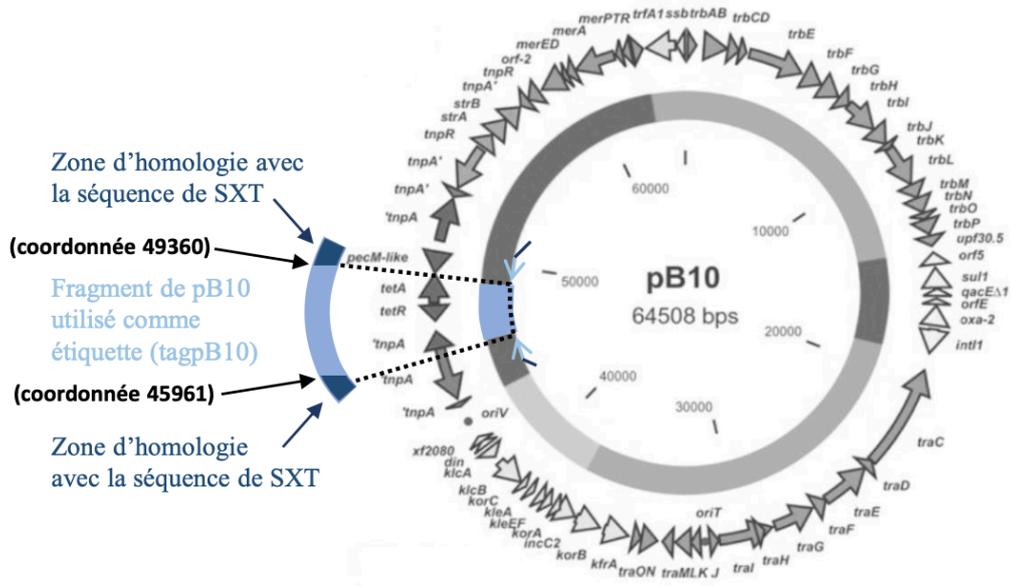
3.1. ÉTIQUETAGE ET CONTROLE DE L'INTEGRITE FONCTIONNELLE DE L'ICE SXT^{MO10}

A l'origine, la méthode moléculaire destinée à suivre la dissémination d'un élément mobile a été développée par Bonot et Merlin (2010) pour le plasmide pB10. Le génome de ce dernier est une mosaïque formée de fragments génétiques d'origines diverses. En effet, pB10 est composé d'une ossature classique de plasmide IncP, qui a acquis un intégron de classe 1 et 4 transposons présentant des degrés d'altération variables. Cette structure en mosaïque avait permis la détection d'une région unique comprise entre deux gènes tronqués (*tnpA*) codant les transposases du transposon Tn1721 et de la séquence d'insertion IS1071 (Figure 60, A). Une paire d'amorces et une sonde Taqman avaient précédemment été développées pour la quantification spécifique par qPCR de cette cible que l'on appellera « tag pB10 » dans la suite de ce travail (Bonot and Merlin, 2010). Dans ces conditions, nous avons décidé d'utiliser la même cible en l'insérant dans SXT^{MO10}.

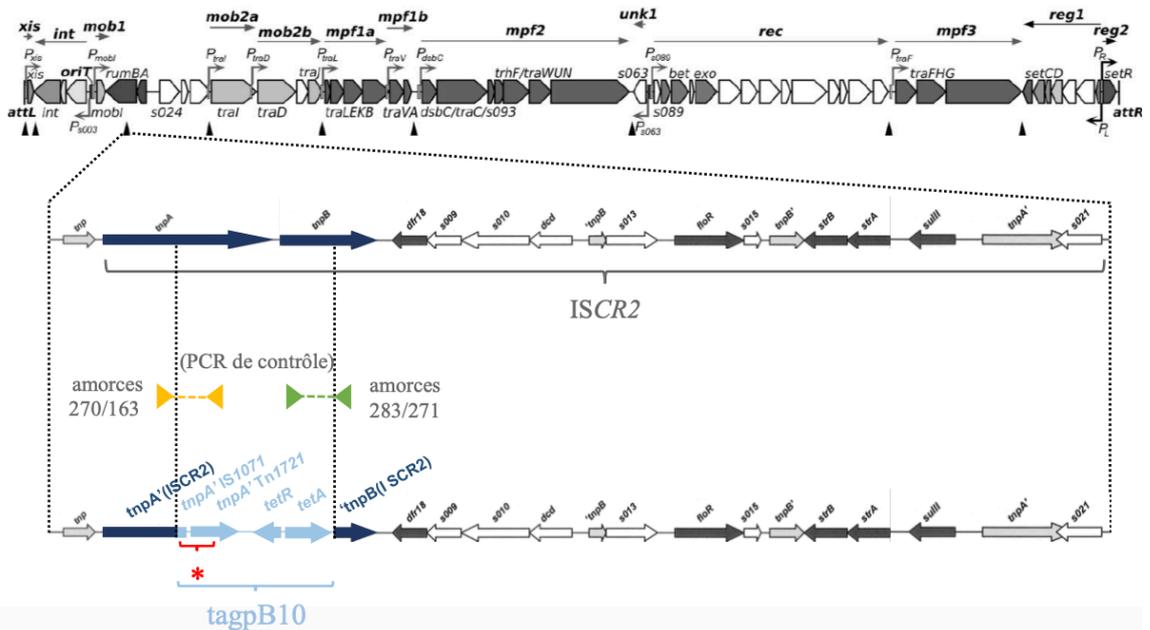
Dans un premier temps, l'étiquette « tag pB10 » pouvant servir de marqueur moléculaire et contenant le gène *tetA* de résistance à la tétracycline, a été amplifiée à

partir du plasmide pB10 avec les amorces Tag-pB10_SXT-up et Tag-pB10_SXT-down (Figure 60, A). Ces amorces possèdent, à leur extrémité 5', une courte séquence de 50 nts parfaitement identique à des fragments de SXT^{MO10} en vue de l'utilisation de l'approche basée sur le système de recombinaison λ red inducible à l'arabinose et développé par Datsenko et Wanner (Datsenko and Wanner, 2000). Le produit de PCR obtenu a été purifié puis électroporé dans la souche *E. coli* MG1656::SXT^{MO10} portant le plasmide thermosensible pKD46 hébergeant le système λ red et cultivée en présence d'arabinose. Des transformants ont ensuite été isolés sur LB tétracycline afin d'obtenir des clones chez qui l'ICE SXT^{MO10} avait probablement été marqué par insertion du « tag pB10 ». Pour confirmer le marquage de l'élément, l'ADN génomique de certains clones a été extrait, et l'insertion de l'étiquette « tag pB10 » a été vérifiée par PCR en utilisant deux couples d'amorces spécifiques s'hybridant de part et d'autre des fragments de jonction de l'insert avec l'élément (Figure 60). Les profils électrophorétiques des produits d'amplification ont révélé la présence de deux fragments d'environ 275 et 589 pb, correspondant aux tailles attendues et confirmant la présence de l'étiquette dans l'ICE SXT^{MO10}-tag.

A



B



C

Figure 60 : Construction de l'ICE SXT^{MO10}-tagB10. (A) Organisation génétique du plasmide pB10 d'après Schlüter (2003). Le segment bordé par des flèches est amplifié par PCR pour servir de marqueur moléculaire (« tagB10 »). (B) Organisation génétique de l'ICE SXT^{MO10} (Schlüter et al., 2003; Poulin-Laprade, Carraro and Burrus, 2015) et détail de la région modifiée par l'insertion du tagB10. (C) Structure génétique de la région modifiée après la double recombinaison homologue ayant permis d'intégrer le segment tagB10 dans SXT^{MO10}. Les deux couples d'amorces, SXT-1 / Tn out-1 (en jaune) et pB10-3 / SXT-2 (en vert), destinés aux PCR de contrôle spécifiques des fragments de jonctions entre le segment tagB10 dans SXT^{MO10} sont également représentés. Le segment d'ADN indiqué par un astérisque correspond au

segment spécifiquement détecté par qPCR grâce au couple d'amorces 162/163 (d'après Merlin et Bonot, 2010).

Pour vérifier que l'étiquetage de SXT^{MO10} n'a pas eu d'effet sur la mobilité de l'élément et son inductibilité, des expériences de conjugaison bactérienne ont été réalisées en présence et en absence de ciprofloxacine. La bactérie donneuse *E. coli* MG1656::SXT^{MO10} (Chl^R), avec (CM1272) ou sans (CM527) le tagpB10, a été cultivée sur la nuit avec ou sans 5 ng/mL de ciprofloxacine. Les cultures ont été lavées puis mélangées aux bactéries receveuses *E. coli* MG1655 Nal^R (CM125) pendant 2 h. Les bactéries donneuses, receveuses et transconjugants ont été titrés sur milieu sélectif en fonction des profils de résistance des différentes bactéries (Chl^R, Nal^R ou les deux). La fréquence de transfert de l'ICE SXT^{MO10} a été comparée à celle de l'élément étiqueté (SXT^{MO10}-tagpB10), et les données ont été regroupées dans la Figure 61. D'après les résultats obtenus, les fréquences de transfert basales sont du même ordre de grandeur, soit $4,3 \times 10^{-6}$ et $2,2 \times 10^{-6}$ Tc/R pour les éléments SXT^{MO10} et SXT^{MO10}-tagpB10, respectivement. En exposant préalablement les bactéries donneuses à la ciprofloxacine avant de les mettre en contact avec les bactéries receveuses, les fréquences de transfert de SXT^{MO10} et SXT^{MO10}-tagpB10 augmentent parallèlement d'un facteur 150, pour atteindre respectivement $4,3 \times 10^{-4}$ et $5,0 \times 10^{-4}$ Tc/R. Ces données confirment que la mobilité de l'élément SXT^{MO10}-tagpB10 n'est pas altérée par la présence de l'étiquette « tag-pB10 », et que ce marquage n'a pas d'influence sur l'inductibilité de l'élément par la ciprofloxacine.

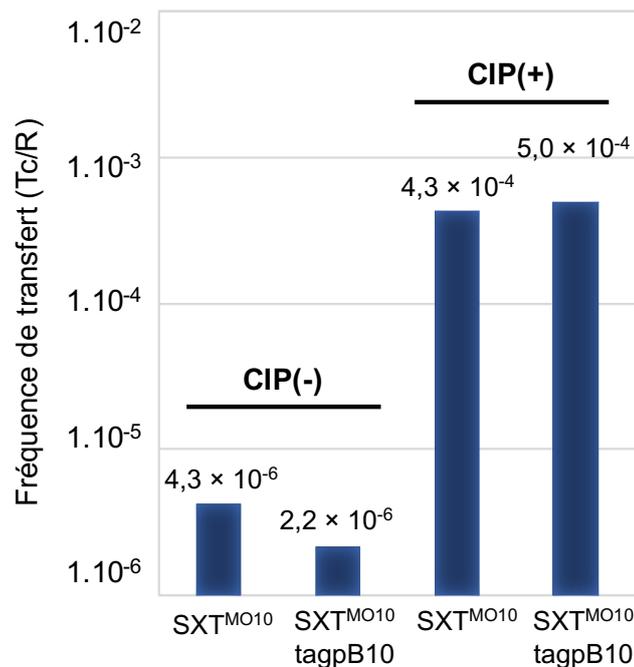


Figure 61 : Vérification du transfert des ICE SXT^{MO10}, marqué ou non, en présence ou en absence de ciprofloxacine. Résultats des conjugaisons entre les souches donneuses *E. coli* MG1656::*SXT*^{MO10} (annotée SXT^{MO10}) et *E. coli* MG1656::*SXT*^{MO10}-*tagpB10* (SXT^{MO10}-tag), résistantes au chloramphénicol (*Chl*^R), et la souche receveuse dérivée de *E. coli* MG1655 résistante à l'acide nalidixique (*Nal*^R) en absence de ciprofloxacine (CIP⁻). La fréquence de transfert est le rapport entre le nombre de transconjugants (clones *Chl*^R *Nal*^R) et le nombre de receveuses. La même expérience a été réalisée en incubant préalablement les donneuses avec 5 ng/mL de ciprofloxacine (CIP⁺).

3.2. CONSTRUCTION ET ETIQUETAGE DES BACTERIES DONNEUSES

Pour les expériences de transfert, les bactéries donneuses devaient également pouvoir être détectées de manière spécifique et quantifiées par qPCR à partir de l'ADN extrait de matrices environnementales. Pour *E. coli*, nous avons décidé d'utiliser la souche *E. coli* MG1655Δ*lacZY* (ou CM56), chez laquelle une délétion des gènes *lacZY* a laissé une cicatrice unique dans le génome que nous avons utilisé pour élaborer des couples d'amorces / sonde de part et d'autre de la délétion. Pour apporter l'élément SXT^{MO10}-*tagpB10*, nous avons commencé par introduire le plasmide thermosensible pG+*host9* afin de disposer d'un marqueur de sélection (résistance à l'érythromycine). La souche obtenue, CM56(pG+*host9*), a ensuite été conjuguée avec la bactérie

donneuse *E. coli* MG1656::SXT^{MO10}-tagpB10 (CM1272, tet^R) et les transconjugants ayant reçu SXT^{MO10}-tagpB10 ont été sélectionnés à 30°C sur gélose supplémentée en érythromycine et tétracycline. Ces derniers ont ensuite été déchargés du plasmide pG+host9 par culture à 37°C en absence de sélection pour aboutir à la souche *E. coli* MG1655 Δ lacZY::SXT^{MO10}-tagpB10 (ou CM1295). Des amorces ont ensuite été élaborées pour cibler spécifiquement la délétion Δ lacZY et tandis que celles ciblant le tag-pB10 existaient déjà (Tableau 7). Les qualités des jeux d'amorces/sondes élaborés et leurs efficacités dans le contexte de la nouvelle souche créée ont été évalués par qPCR sur des gammes de dilution d'ADN génomique d'*E. coli* MG1655 Δ lacZY::SXT^{MO10}-tagpB10. Les données obtenues montrent des efficacités d'amplification de 99,83% (R²=0,9998) pour la bactérie donneuse (délétion chromosomique lacZY) et 95,04% pour SXT^{MO10}-tagpB10 (R²=0,9997), avec des rapports de l'ordre de 1 entre SXT^{MO10}-tag et son hôte. Ces résultats indiquent donc que les amorces élaborées sont utilisables pour quantifier la bactérie donneuse et l'élément étiqueté.

Un travail similaire a dû être réalisé avec *P. mirabilis* BB2000 (CM1450), destinée à servir de bactérie hôte donneuse pour des expériences de dissémination de SXT^{MO10}. La souche *P. mirabilis* BB2000 a d'abord été marquée à l'aide d'un mini transposon Tn7 grâce à un croisement tétraparental entre : *E. coli* CC118 λ pir (pTn7-M) (ou CM2051) donneuse de mini-Tn7 (résistant à la gentamicine Gm^R), *P. mirabilis* BB2000 (sensible à la gentamicine, Gm^S), la souche auxiliaire CM305 permettant la mobilisation en *trans* du plasmide pTn7-M et la souche auxiliaire CM307 pour apporter en *trans* les fonctions de transposition du mini-Tn7. Une fois hors de la souche, *E. coli* CC118 λ pir, pTn7-M qui est un réplicon R6K ne peut plus se répliquer dans *P. mirabilis* BB2000 mais le mini-Tn7 aura pu se transposer dans le site cible en 3' du gène *glmS* avant que le plasmide ne disparaisse de la receveuse. Pour cela, chaque partenaire a été cultivé sur la nuit, mélangés à volume égal et incubés sur une gélose nutritive pendant une nuit. Finalement, des clones dérivés de *P. mirabilis* BB2000::mini-Tn7 (ou CM2055) ont pu être isolés sur LB supplémenté en gentamicine en se focalisant sur les colonies présentant le phénotype « swarming » typique de *Proteus sp.* (la donneuse *E. coli* CM2051 est Gm^R mais non-motile). Les clones de *P. mirabilis* BB2000::mini-Tn7 ont été purifiés sur PY supplémenté avec le même antibiotique. Finalement, la conjugaison entre la souche *P. mirabilis* BB2000::mini-Tn7 (CM2055)

nouvellement construite et la bactérie donneuse *E. coli* β 2150::SXT^{MO10}-tagpB10 (CM1465), mutée dans le gène *dapA* et dont la croissance est conditionnée à l'apport d'acide diaminopimélique (DAP), a permis d'apporter l'élément SXT^{MO10}-tagpB10 pour conduire à la souche *P. mirabilis* BB2000 ::Tn7 ::SXT^{MO10}-tagpB10 (ou CM2057). L'insertion de mini-Tn7 dans le génome de la souche BB2000 a pu être ciblée de manière spécifique pour élaborer un couple d'amorces et une sonde (BB2000tag-down, BB2000 tag-up, BB2000-tag-probe) chevauchant la jonction entre le site chromosomique cible *att*_{Tn7} et une extrémité du mini-Tn7 inséré, permettant ainsi l'amplification d'une séquence dont une analyse BLASTn a montré l'absence dans les bases de données. L'efficacité d'amplification des amorces ciblant le marquage BB2000 ::mini-Tn7 a été déterminée par qPCR, sur des gammes de dilution d'ADN génomique de *P. mirabilis* BB2000 ::mini-Tn7. Les résultats obtenus montrent une efficacité de 93,4% pour un R² = 0,9997. A ce stade du travail, nous disposons donc des souches d'*E. coli* MG1655 Δ lacZY::SXT^{MO10}-tagpB10 (ou CM1295) et *P. mirabilis* (BB2000::mini-Tn7)::SXT^{MO10}-tagpB10 (ou CM2057) utilisables comme donneuses pour suivre le transfert de SXT^{MO10} dans des matrices environnementales, et étudier l'effet de la bactérie hôte sur ce transfert.

3.3. TRANSFERT DE SXT^{MO10} VERS DES COMMUNAUTES ENVIRONNEMENTALES

3.3.1. OPTIMISATION PRELIMINAIRE AUX EXPERIMENTATIONS EN MICROCOSMES UTILISANT E. COLI COMME DONNEUSE

Suivre le transfert de SXT^{MO10} vers des bactéries environnementales maintenues en microcosmes de rivière nécessite tout d'abord de déterminer la quantité de bactéries donneuses à inoculer dans les microcosmes. Il faut en effet qu'il y ait assez de donneuses pour permettre le transfert mais ne pas en mettre trop sous peine de saturer et perturber les communautés microbiennes. Il faut en outre vérifier la spécificité des deux couples d'amorces/sondes utilisées pour quantifier la bactérie donneuse et son ICE marqué afin de s'assurer de l'absence de bruit de fond dans les ADN environnementaux. Dans des expériences préliminaires, 7 microcosmes de rivière (sédiments et eaux de l'Orne) ont été inoculés avec des concentrations croissantes d'*E. coli* MG1655 Δ lacZY::SXT^{MO10}-tagpB10 allant de 5×10^5 à 5×10^9 UFC pour 100 mL de mélange sédiments/eau de rivière. Des prélèvements ont alors été effectués dans les 5 minutes après inoculation, et les ADN

totaux ont été extraits pour quantifier la bactérie donneuse et son ICE marqué par qPCR (Figure 62). Les résultats obtenus indiquent que le plus faible inoculum ($5,2 \times 10^5$ bactéries) ne permet pas de détecter les marqueurs associés à l'inoculum, alors que c'est le cas pour les inocula allant de $5,2 \times 10^6$ à $5,2 \times 10^9$ UFC/100 mL de matrice environnementale. En outre, étant donné que l'ICE SXT^{MO10} est retrouvé en une seule copie dans le génome de la bactérie hôte, les quantités de bactérie donneuse et de leur ICE devraient être similaires (1:1). C'est effectivement le cas pour l'ensemble des échantillons analysés, sauf pour l'inoculum avec 5.10^6 bactéries qui présente un rapport de 1 bactérie donneuse pour 15 SXT, probablement dû à une contamination par de l'ADN. D'autres analyses par qPCR ont été effectuées sur des échantillons contrôles (sans bactérie donneuse), et les résultats indiquent l'absence de signaux de « bruit de fond » aspécifiques dans les limites de quantification pour les marqueurs de la bactérie donneuse et de son ICE. Ces tests n'ont pas seulement permis de confirmer la spécificité des amorces pour les cibles d'intérêt, mais également de démontrer que le protocole d'extraction d'ADN total utilisé est adapté à ce type d'expérience.

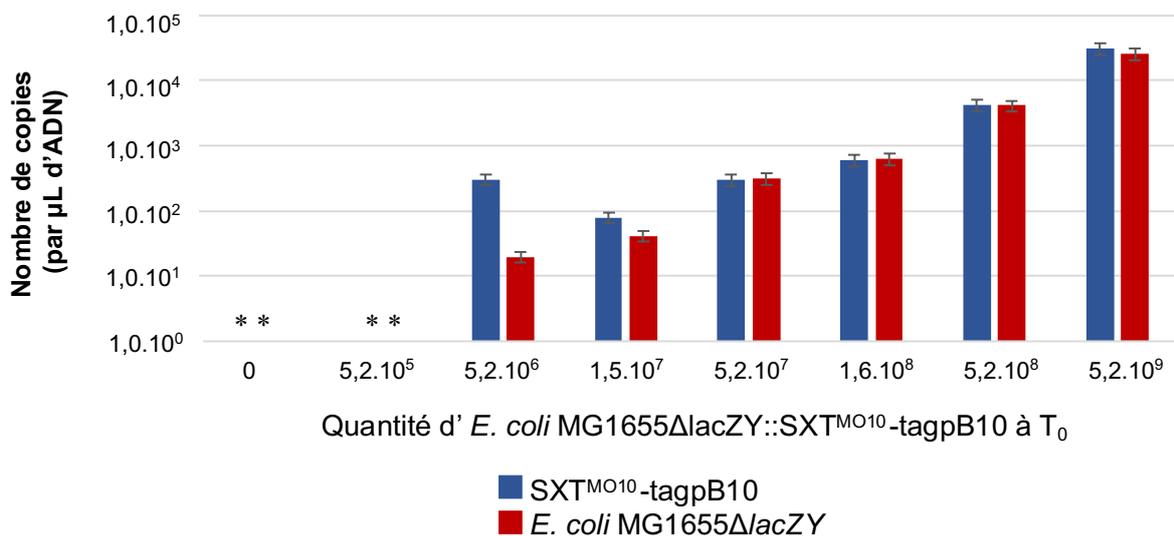


Figure 62 : Évaluation de la quantité de souche donneuse *E. coli* MG1655ΔlacZY::SXT^{MO10}-tagpB10 qu'il faut inoculer à t₀ pour permettre le suivi du transfert de SXT^{MO10} en microcosme. Le nombre de copie de chromosomes et d'éléments SXT^{MO10} ont été respectivement dénombrés par les qPCR ciblant la délétion ΔlacZY et l'étiquette « tag-pB10 ». Les astérisques représentent les valeurs sous la limite de détection. L'écart-type est représenté par les barres d'erreur (n=2).

La survie de la bactérie donneuse dans les microcosmes de rivière doit également être prise en considération dans ce type d'expérience où il est à la fois nécessaire que la bactérie survive suffisamment longtemps pour transférer l'ICE, mais disparaître suffisamment tôt aussi pour observer une variation notable dans le rapport « bactérie donneuse / SXT ». Ainsi, 3 concentrations d'*E. coli* MG1655Δ*lacZY*::SXT-tagpB10 allant de 2×10^8 à 2×10^{10} UFC ont été inoculés dans 100 mL de mélange sédiments/eau de rivière de l'Orne et le tout maintenu à 30°C. Des prélèvements de 2 mL ont été effectués après agitation, 5 minutes après l'ajout de l'inoculum, 3 jours plus tard et 10 jours plus tard. Comme précédemment, l'ADN génomique total de ces échantillons a été extrait avant d'y quantifier la bactérie donneuse et l'ICE par qPCR (Figure 63). Globalement, les 3 doses d'inoculum permettent de quantifier les éléments d'intérêt jusqu'à J3, après quoi seulement les doses les plus élevées permettent de continuer à détecter la bactérie donneuse et son ICE à J10. Le rapport entre SXT^{MO10} et la bactérie donneuse a été calculé, et a révélé un rapport d'environ 1 pour tous les échantillons analysés. Les résultats obtenus ici correspondent typiquement au cas de figure où la bactérie donneuse a trouvé un environnement qui autorise une persistance relative sans toutefois qu'un transfert ait pu être détecté.

En se basant sur l'ensemble des données recueillies, nous avons choisi pour la suite des expériences d'utiliser un inoculum d'environ 2×10^8 UFC / 100 mL de matrice environnementale, afin de permettre de quantifier la bactérie donneuse et son ICE à au moins 2 ordres de grandeur au-dessus du seuil de détection, sans toutefois que l'inoculum soit ajouté en abondance pour éviter de saturer les communautés microbiennes autochtones.

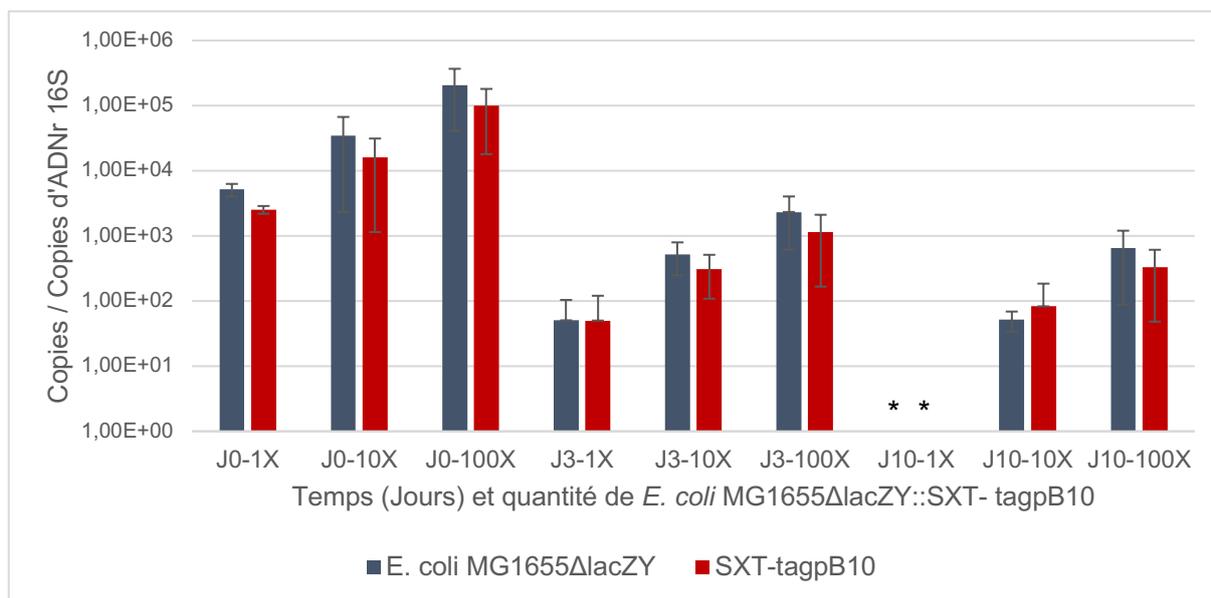


Figure 63 : Évaluation de la quantité d'*E. coli* MG1655ΔlacZY::SXT-tagpB10 nécessaire pour le suivi du transfert de SXT en microcosme d'eau et sédiments de rivière, et étude son évolution au cours du temps (J0, J3, J10). 1X correspond à 2×10^8 UFC d'*E. coli* MG1655ΔlacZY::SXT-tagpB10 ajoutés à J0 pour 100 mL de microcosmes, 10X à 2×10^9 UFC et 100X à 2×10^{10} UFC. Le nombre de chromosomes et d'éléments SXT ont été respectivement dénombrés par les qPCR ciblant la délétion ΔlacZY et l'étiquette « tag-pB10 ». L'écart-type est représenté par les barres d'erreur (n=3). Les astérisques représentent les valeurs sous la limite de détection.

3.3.2. TRANSFERT DE SXT^{MO10} EN MICROCOSME A PARTIR D'UNE DONNEUSE E. COLI

Afin de suivre le transfert de SXT^{MO10} et d'étudier l'effet de la ciprofloxacine sur ce transfert dans des conditions environnementales, des microcosmes ont été réalisés en triplicata avec des sédiments de surface et de l'eau de rivière de l'Orne en proportions égales. Trois concentrations de ciprofloxacine (0 ng/mL, 4 ng/mL ou 40 ng/mL) ont été ajoutées dans ces milieux avant d'y introduire la souche *E. coli* MG1655ΔlacZY::SXT^{MO10}-tagpB10. Ces concentrations ont été choisies car elles correspondent au maximum d'induction du transfert de l'élément (4 ng/mL) et au maximum d'induction du promoteur P_{s086} (40 ng/mL), comme déterminé plus tôt dans cette étude. Les premiers prélèvements ont été effectués 45 minutes après l'ajout de la bactérie (J0), puis à J1, J2, J3, J7 et J10, en prenant soin d'homogénéiser le mélange eau-sédiments avant échantillonnage. L'extraction des ADN totaux a été

suivie de la quantification de la souche donneuse et de SXT^{MO10} par qPCR. Ces valeurs ont ensuite été normalisées à la biomasse bactérienne en les rapportant à la quantité de gènes 16S eubactériens présents. Les données ont permis de définir deux profils, en fonction du transfert ou non de l'élément (Figure 64). Dans le cas de figure A (Figure 64 A), la concentration relative de la bactérie donneuse diminue en même temps que la concentration relative en SXT^{MO10}-tagpB10, et le rapport entre ces deux marqueurs reste relativement stable au cours du temps ce qui indique qu'aucun transfert n'est détecté. A contrario, dans le cas de figure B (Figure 64 B), la concentration relative de la bactérie donneuse diminue bien plus rapidement que celle de SXT^{MO10}, à tel point qu'à J1 il y a déjà 10 fois plus de SXT^{MO10}-tagpB10 par donneuse et qu'à J10 il y en a 47 fois plus. Cette méthode permet donc bien de détecter le transfert des éléments SXT dans des communautés environnementales.

Pour cette série d'expériences, le cas relaté dans Figure 64 B n'a été observé que dans un seul des triplicatas des microcosmes non-traités (sans ciprofloxacine). Ces résultats semblent déjà mettre en évidence un aspect aléatoire dans le transfert de l'ICE SXT^{MO10} dans une matrice complexe. Cela peut signifier que de tels transferts (à un niveau détectable) relèvent d'évènements rares. En ce qui concerne les résultats obtenus avec la série de microcosmes exposés à différentes concentrations de ciprofloxacine, les deux exemples présentés dans la Figure 65 indiquent que le rapport entre SXT^{MO10} et les bactéries donneuses n'augmente pas notablement au cours du temps et que dans ces conditions le transfert n'a pu être observé.

On notera finalement que, si le transfert de SXT^{MO10} n'a pas été observé dans la plupart des cas, la bactérie donneuse est apparue notablement persistante avec une décroissance de seulement deux ordres de grandeur en 10 jours. Dans l'ensemble, le transfert reste du domaine du possible lorsque des conditions environnementales permissives surviennent, notamment en termes d'interaction entre le donneur et les communautés autochtones, mais prévoir la survenue d'évènements de transfert dans les conditions utilisées où la bactérie donneuse est volontairement ajoutée en faibles quantités reste impossible.

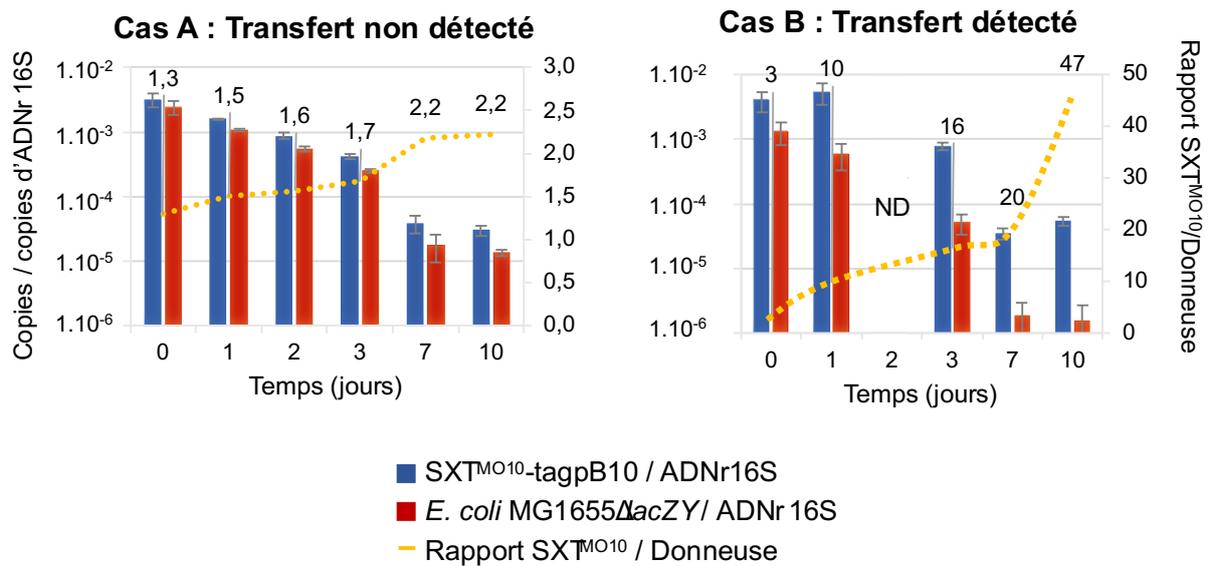


Figure 64 : Évolution de la concentration de la bactérie donneuse MG1655ΔlacZY et de son ICE SXT^{MO10}-tagpB10 en microcosmes de sédiments/eau de rivière en absence de traitement à la ciprofloxacine (Série 1). Le nombre de copies de SXT^{MO10} ou de bactérie donneuse sont normalisées par le nombre de copies d'ADNr 16S. Deux cas de figure ont été observés : absence de transfert évident (A) et transfert de l'ICE SXT^{MO10} (B). Les chiffres reportés sur les graphiques correspondent au rapport entre le nombre de copies de la bactérie donneuse et le nombre de copies de SXT^{MO10}-tagpB10. Chaque point est la moyenne de 3 valeurs (6 pour le Cas de Figure B) obtenues par qPCR. L'écart-type est représenté par les barres d'erreur. ND : Non détecté.

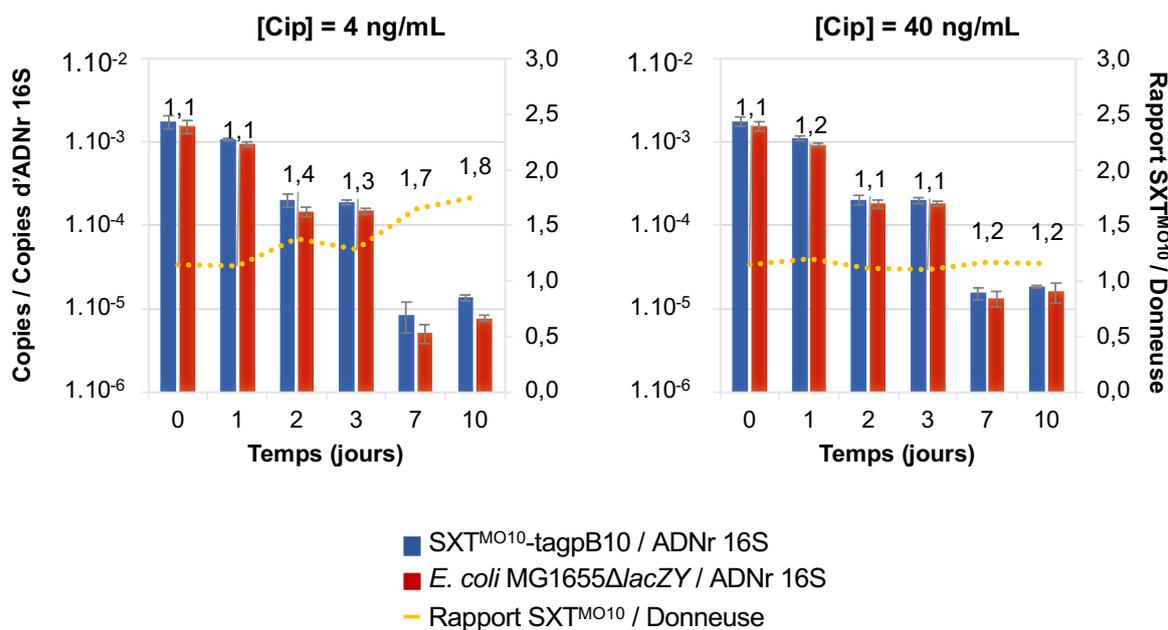


Figure 65 : Évolution de la concentration de la bactérie donneuse MG1655ΔlacZY et de son ICE SXT^{MO10}-tagpB10 en microcosmes de sédiments/eau de rivière traités à la ciprofloxacine (Série 1). Le nombre de copies de SXT^{MO10} ou de bactérie donneuse sont normalisées par le nombre de copies d'ADNr 16S. Deux conditions d'induction du transfert de l'ICE ont été testées : avec 4 ng/mL ou 40 ng/mL de ciprofloxacine. Les chiffres reportés sur les graphiques correspondent au rapport entre le nombre de copies de la bactérie donneuse et le nombre de copies de SXT^{MO10}-tagpB10. Chaque point est la moyenne de 3 valeurs obtenues par qPCR. L'écart-type est représenté par les barres d'erreur.

3.3.3. TRANSFERT DE SXT^{MO10} EN MICROCOSME A PARTIR D'UNE DONNEUSE *P. MIRABILIS* BB2000

L'effet hôte donneur sur le transfert de l'élément SXT^{MO10} en conditions environnementales a été étudié avec la bactérie donneuse *P. mirabilis* BB2000 ::mini-Tn7 ::SXT^{MO10}-tagpB10 (ou CM2057) dans une nouvelle série de microcosmes d'eau et de sédiments de rivière de l'Orne. Bien que les promoteurs impliqués dans la dissémination de l'élément chez *P. mirabilis* BB2000 ne soient pas induits par la ciprofloxacine, nous avons tout de même testé cet antibiotique pour étudier son effet dans un contexte environnemental sachant qu'une fois transféré, SXT^{MO10} pouvait très bien se retrouver dans une bactérie permissive à une induction par la ciprofloxacine. En parallèle, nous avons conduit une série des microcosmes contrôles avec *E. coli*

MG1655 Δ lacZY::SXT^{MO10}-tagpB10 en tant que donneuse, exposée ou non aux mêmes concentrations d'antibiotiques que précédemment. Des prélèvements ont été réalisés comme précédemment pendant 10 jours, puis les ADN totaux ont été extraits. Dans cette série de microcosmes, la quantification de l'ADNr 16S par qPCR sur des dilutions en cascade des ADN extraits a démontré que des inhibiteurs de la réaction PCR avaient été co-extraits, et que leurs effets persistaient même en utilisant de l'ADN dilué au 1/100^e. Ce niveau d'inhibiteurs avait ici atteint un seuil critique car il devenait impossible de quantifier les bactéries donneuses et l'élément SXT^{MO10} en raison des limites de quantification atteintes à la suite des dilutions imposées des ADN extraits. Cette difficulté a été contournée en changeant de technique de quantification avec une approche impliquant la ddPCR (droplet digital PCR), une technique qui s'affranchit des problèmes d'inhibiteurs et qui rend possible l'utilisation d'extraits d'ADN non dilués.

Que ce soit avec la donneuse *E. coli* ou la donneuse *P. mirabilis*, l'élément SXT^{MO10}-tagpB10 a été détecté par ddPCR dans tous les microcosmes à des concentrations inférieures à 1×10^3 copies par mg de sédiment extrait (Tableau 13). A titre de comparaison, il y avait $6,7 \times 10^4$ copies de SXT^{MO10}-tagpB10 par mg d'échantillon extrait à J0-1X (Figure 63), ce qui correspondait à $2,5 \times 10^3$ copies de SXT^{MO10}-tagpB10 par réaction, alors que la limite de quantification était comprise entre 1×10^2 - 10^3 en qPCR. Les données du Tableau 13 confirment donc qu'il n'aurait pas été possible de quantifier l'élément par qPCR puisque la dilution de l'échantillon n'aurait pas permis d'être dans les limites de quantification du standard. L'analyse des microcosmes contrôles inoculés avec la donneuse *E. coli* MG1655 Δ lacZY::SXT^{MO10}-tagpB10 a montré une perte progressive de la bactérie sur 7 jours sans que le rapport entre l'élément et son hôte n'évolue notablement (Figure 66), signifiant à nouveau que le transfert de SXT^{MO10} dans ces conditions est du domaine de l'évènement rare, si il existe. Le même profil est obtenu lorsque les microcosmes ont été exposés à la ciprofloxacine, indiquant encore une fois qu'il n'y a pas d'effet visible de l'antibiotique sur le transfert de l'élément. On notera également que, par rapport à ce qui avait été observé dans les premières expériences en microcosmes réalisées précédemment (cf § 3.3.2), la bactérie donneuse *E. coli* MG1655 Δ lacZY::SXT^{MO10}-tagpB10 est apparue légèrement moins persistante avec une disparition complète au bout de 7 jours alors qu'auparavant elle continuait à être quantifiée après 10 jours. A ce stade, l'effet de la persistance d'une bactérie donneuse sur l'efficacité de transfert vers une communauté autochtone reste une question ouverte.

[Cip] ng/mL	Replicat n°	Prélèvement (jour)	Copies de SXT ^{MO10} / mg extrait	
			Donneuse <i>E. coli</i>	Donneuse <i>P. mirabilis</i>
0	1	0	5,7E+02	1,8E+02
		1	3,6E+02	1,8E+02
		3	4,4E+00	0,0E+00
		7	1,9E+00	2,8E+01
	2	0	7,3E+02	1,4E+02
		1	4,1E+02	2,5E+01
		3	1,1E+00	3,2E+01
		7	0,0E+00	0,0E+00
	3	0	5,6E+01	1,9E+02
		1	3,1E+02	5,1E+01
		3	1,2E+01	4,7E+00
		7	2,9E+00	1,6E+00
5	1	0	1,3E+03	1,5E+01
		1	3,1E+02	6,6E+02
		3	1,2E+02	9,2E+00
		7	1,8E+00	2,6E+00
	2	0	3,1E+02	5,4E+01
		1	4,4E+02	1,2E+03
		3	1,8E+00	2,4E+00
		7	0,0E+00	9,4E-01
	3	0	1,0E+03	2,9E+02
		1	2,8E+02	2,2E+02
		3	3,7E+00	8,5E+00
		7	1,3E+01	2,2E+00

Tableau 13 : Quantification de l'ICE SXT^{MO10}-tagpB10 par ddPCR à partir d'ADN environnementaux extraits de microcosmes de sédiments/eau de rivière. L'ICE SXT^{MO10}-tagpB10 a été introduit dans ces environnements via deux bactéries donneuses *E. coli* MG1655ΔlacZY::SXT^{MO10}-tagpB10 (nommée ici *E. coli*) et *P. mirabilis* BB2000::mini-Tn7::SXT^{MO10}-tagpB10 (nommée ici *P. mirabilis*).

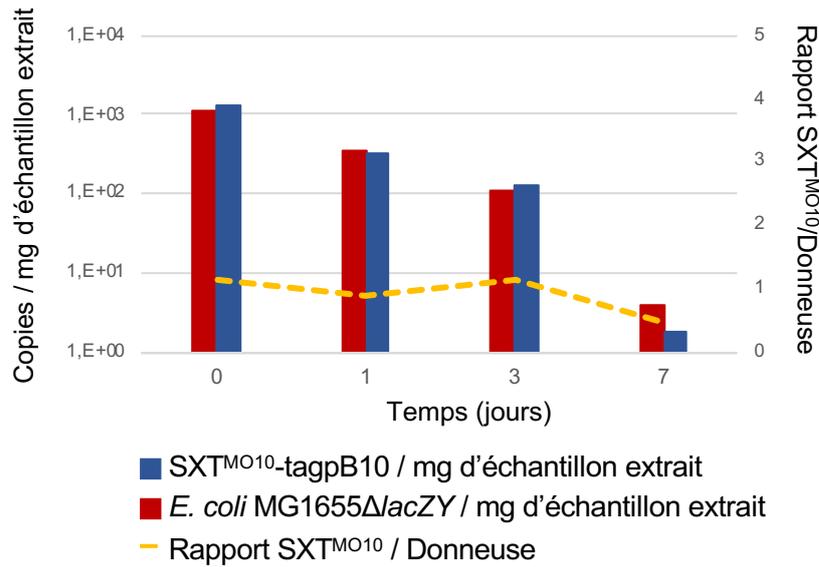


Figure 66 : Évolution de la concentration de la bactérie donneuse *E. coli* MG1655ΔlacZY et de son ICE SXT^{MO10}-tagpB10 en microcosmes de sédiments/eau de rivière (Série 2). Deux conditions ont été testées : avec ou sans 5 ng/mL de ciprofloxacine. La courbe en pointillés jaunes correspond à l'évolution du rapport entre le nombre de copies de la bactérie donneuse et le nombre de copies de SXT^{MO10}-tagpB10.

Curieusement, dans la série de microcosmes inoculés avec la bactérie donneuse *P. mirabilis*, les quantifications par ddPCR sur les différents ADN extraits n'ont pas permis de détecter l'étiquette chromosomique liée au mini-Tn7 contrairement au SXT^{MO10}-tagpB10 de la souche donneuse qui était parfaitement quantifiable. Des vérifications sur de l'ADN extrait de la souche pure ont permis d'observer une certaine instabilité de l'étiquetage associé au mini-Tn7 pour des raisons encore inconnues. L'hypothèse la plus probable est que la culture utilisée pour préparer l'inoculum a malencontreusement étéensemencée avec un mutant ayant perdu l'étiquetage puisque le problème a été observé sur l'ensemble des microcosmes analysés. Dans ces conditions, un nouveau jeu d'amorces/sonde (BB2000-1, BB2000-2 et BB200-P, Tableau 7) a été élaboré pour cibler directement la bactérie donneuse *P. mirabilis* BB2000 sur des éléments de séquences qui les distinguent des autres souches de séquences connues de la même espèce. Les résultats des microcosmes exposés ou non à la ciprofloxacine sont regroupés sur la Figure 67. D'après ces résultats il s'agirait bien de la souche de *P. mirabilis* BB2000 qui a été inoculée dans les microcosmes de

sédiments/eau de rivière. D'une manière surprenante, toutes conditions confondues à J0, il y a environ 2 à 12 fois plus de copies de SXT^{MO10} que de copies de bactérie donneuse. Cette différence qui pourrait signifier que la réaction d'amplification n'est pas optimale (défaut « d'amplificabilité » avec le jeu d'amorces élaboré) ou que le transfert de SXT^{MO10} aurait eu lieu très rapidement après l'ajout de la bactérie, ce qui est fort peu probable. Toutefois, même si la réaction d'amplification n'est pas optimale, il est possible de constater que dans certains cas (n°1 sans ciprofloxacine ou n°1 et n°3 avec ciprofloxacine) le rapport de SXT^{MO10}/bactérie donneuse augmente à J1 ce qui pourrait démontrer un début de transfert. Quoiqu'il en soit, ce rapport diminue ensuite rapidement ou il n'est plus possible de le calculer en raison de la perte de la bactérie donneuse ou de l'ICE SXT^{MO10}. L'augmentation du rapport restant ponctuelle, on ne peut exclure un artefact d'amplification. Le transfert de SXT^{MO10} à partir de *P. mirabilis* BB2000 par conséquent très hypothétique, et peu différent de l'expérience réalisée avec *E. coli* dans la même série de microcosmes.

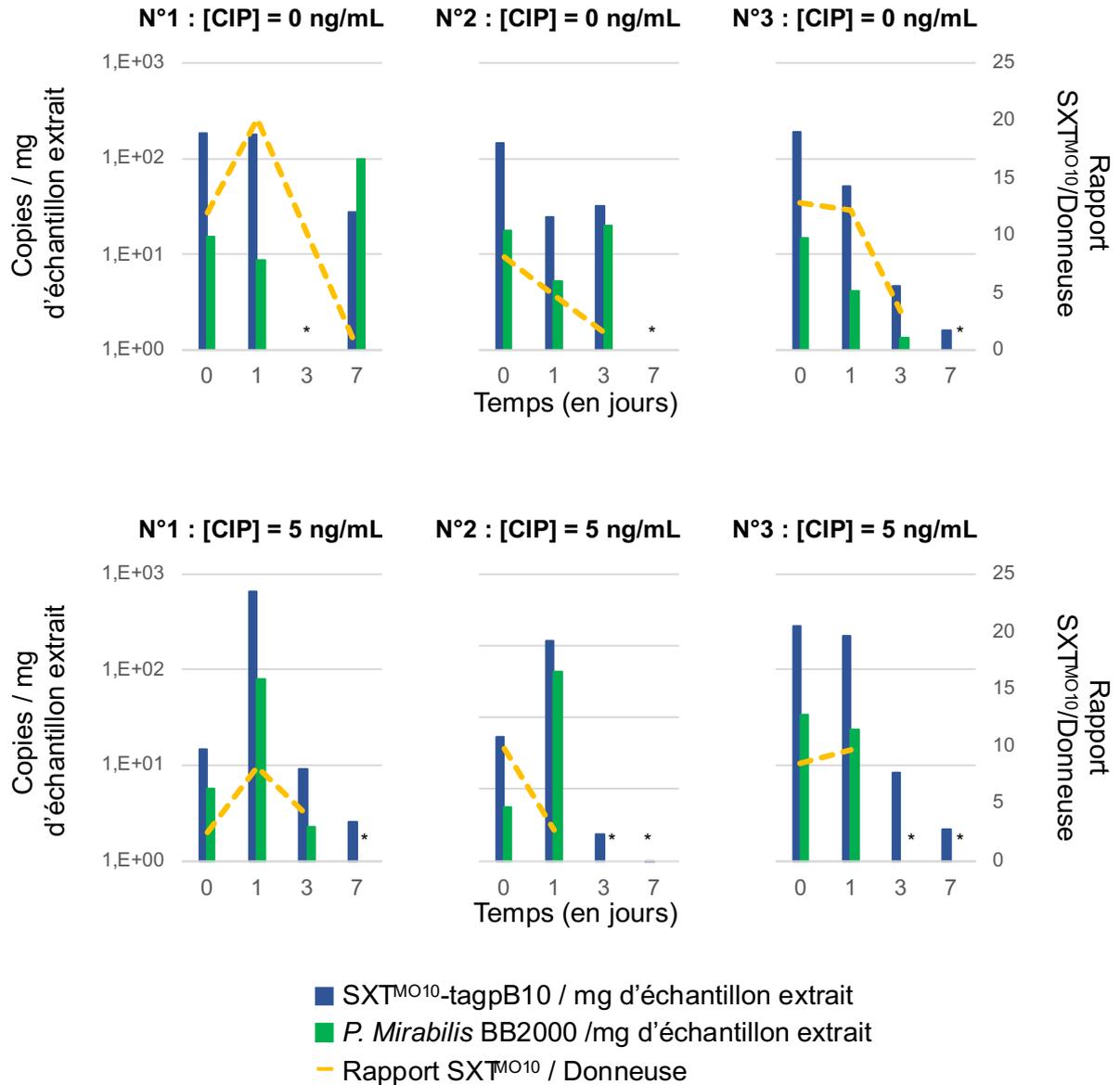


Figure 67 : Évolution de la concentration de la bactérie donneuse *P. mirabilis* BB2000 et de son ICE SXT^{MO10}-tagpB10 en microcosmes de sédiments/eau de rivière de l'Orne. Deux conditions ont été testées en triplicata : avec ou sans 5 ng/mL de ciprofloxacine (Cip). La courbe en pointillés jaunes correspond à l'évolution du rapport entre le nombre de copies de la bactérie donneuse et le nombre de copies de SXT^{MO10}-tagpB10. Les astérisques (*) correspondent aux valeurs non quantifiées en ddPCR.

DISCUSSION

L'émergence et la dissémination de gènes d'antibiorésistance est un problème de santé publique majeur de portée mondiale, qui remet fortement en question l'efficacité des antibiotiques. On estime aujourd'hui que près de 700 000 morts par an dans le monde sont dues à des bactéries résistantes aux antibiotiques, et certaines prédictions estiment que ce chiffre atteindra 10 millions en 2050 (de Kraker, Stewardson and Harbarth, 2016; O'Neill, 2016). L'acquisition de mécanismes de résistance aux antibiotiques est un phénomène qui survient naturellement chez les bactéries et dont la persistance est fixée par l'exposition à un antibiotique (Courvalin, 2005; Furuya and Lowy, 2006). Ces gènes de résistance sont naturellement transférés à la descendance par transfert vertical mais aussi à d'autres bactéries *via* des EGM par transfert horizontal, ce qui rend la dissémination de l'antibiorésistance difficilement évitable. Le problème réside principalement dans la surconsommation ou la mauvaise utilisation des antibiotiques (Courvalin, 2005; Furuya and Lowy, 2006). Ces mauvaises pratiques accentuent, voir accélèrent ces phénomènes en raison de l'exposition répétée des bactéries à des antibactériens et concernent tout autant les bactéries pathogènes que les commensales présentes chez l'Homme ou l'animal, ou encore celles présentes dans l'environnement. L'antibiothérapie chez l'Homme et les animaux d'élevage favorise l'émergence et la sélection de bactéries résistantes qui, avec les antibiotiques, finissent dans le compartiment environnemental (rivières, sols, nappes phréatiques...) à travers leurs déjections. Ceci expose d'avantage les bactéries environnementales aux bactéries résistantes et aux antibiotiques, et contribue à son tour à l'émergence et/ou la dissémination d'antibiorésistances. Il semble alors évident que la médecine humaine et vétérinaire ainsi que l'environnement sont interconnectées, et c'est pour cette raison que pour lutter contre l'antibiorésistance, l'Organisation Mondiale de la Santé préconise une vision globale dans l'approche « One Health » (« Une Santé ») dans laquelle s'inscrit ce travail (World Health Organization, 2017b; CDC, 2021)

Dans cette étude, nous avons souhaité nous intéresser à l'effet de la bactérie hôte et à l'action d'un antibiotique, la ciprofloxacine, sur le transfert l'ICE SXT^{MO10} en milieu aquatique, en utilisant une approche moléculaire inspirée de Bonot et Merlin (2010). Pour cela, nous avons commencé par identifier les environnements riches en éléments SXT/R391 et étudié le spectre d'hôtes de ces éléments par deux méthodes d'identification. *In vitro*, nous avons étudié l'effet de la bactérie donneuse d'un ICE

SXT/R391 dans l'induction du transfert de l'élément par divers antibiotiques, et mis en place des moyens de suivi moléculaire de leur dissémination afin de tester leur transfert dans des conditions environnementales. Ainsi, nous avons constaté au cours de ce travail que travailler avec des bactéries autre que le modèle *E. coli* K12 est relativement difficile et en même temps riche de contrastes tant la biologie d'une bactérie peut varier d'une espèce à l'autre.

1. PREVALENCE DE SXT/R391 EN MILIEU AQUATIQUE

A ce jour, aucune étude sans à priori n'avait été réalisée pour identifier le spectre d'hôtes des ICE SXT/R391 dans l'environnement. Pourtant, sachant que la plupart des pathogènes déjà identifiés comme hébergeant un élément SXT/R391 sont peu enclins à perdurer dans l'environnement, caractériser ce spectre d'hôtes reste primordial pour comprendre la chaîne de transmission de l'élément mobile au niveau environnemental. De fait, définir le spectre d'hôtes devrait contribuer à définir les environnements sensibles à fort risque de dissémination et permettrait peut-être indirectement de mieux contrôler la propagation de ce type d'éléments.

L'objectif principal de ce travail était d'identifier les conditions permissives au transfert des éléments SXT/R391. Dans ce contexte, l'évaluation de la dissémination de l'ICE SXT^{MO10} en microcosme par la méthode de Bonot et Merlin (2011) nécessitait une bactérie donneuse suffisamment adaptée à l'environnement pour transmettre l'élément, mais dont la survie serait suffisamment limitée dans le temps pour observer une persistance de l'élément qui résulterait de son transfert. Ainsi, nous avons axé une partie de notre travail sur l'identification de bactéries hôtes environnementales pour évaluer dans quelle mesure elles pouvaient être plus aptes à envahir des communautés naturelles et transférer leur élément SXT^{MO10}.

1.1. PREVALENCE DE SXT/R391 DANS ISOLATS ENVIRONNEMENTAUX

A notre connaissance, les éléments SXT/R391 ont majoritairement été identifiés chez des γ -protéobactéries d'origine clinique appartenant principalement aux genres *Vibrio*, et en ciblant le gène codant l'intégrase *int_{prfC}* de l'élément comme signature moléculaire. Cependant, une étude récente a révélé que ce gène d'intégrase ne faisait pas partie du groupe de gènes communs partagés par l'intégralité des membres de cette famille d'EGM (Bioteau, Durand and Burrus, 2018). Ainsi, non seulement la

diversité du spectre d'hôtes des ICE SXT/R391 a sans doute été restreinte par la cible choisie, mais l'évaluation de leur occurrence dans l'environnement a aussi pu être sous-estimée. Jusqu'ici, la principale méthode d'identification d'un hôte de la famille SXT/R391 était basée sur l'étude d'isolats cliniques de bactéries entériques (Balado, Lemos and Osorio, 2013; Lei *et al.*, 2016; Sato *et al.*, 2020; Shinde, Raval and Haldar, 2020), ce qui oriente fortement le spectre d'hôtes des éléments SXT/R391 vers des bactéries pathogènes. C'est probablement pour cette raison que les ICE SXT/R391 ont principalement été identifiés chez des bactéries du genre *Vibrio*, et plus spécifiquement chez *V. cholerae* qui est l'agent pathogène responsable du choléra. L'étude d'isolats implique également la culture des bactéries, ce qui apparaît également comme un facteur limitant l'identification d'hôtes environnementaux possibles dans la mesure où seule une faible proportion de bactéries de l'environnement est cultivable (Amann, Ludwig and Schleifer, 1995).

La recherche d'hôtes environnementaux de SXT/R391 dans ce travail s'est fait à travers deux approches : l'une consistant à détecter spécifiquement les ICE SXT/R391 directement dans des banques de bactéries isolées de divers environnements hydriques, et l'autre consistant à identifier ces hôtes sans à priori grâce à l'epicPCR. Pour cela, il était avant tout nécessaire de pouvoir détecter et quantifier les ICE SXT/R391 spécifiquement et exhaustivement. Ainsi, nous avons identifié une nouvelle séquence cible de 81 pb dans le gène *traB* appartenant aux gènes communs à la famille d'ICE SXT/R391, puis nous avons développé un nouveau jeu d'amorces/sonde pour le cibler de manière plus spécifique par qPCR Taqman. Les ICE SXT/R391 ont été recherchés parmi des banques d'isolats environnementaux, dont des *V. cholerae*, souvent décrits comme les hôtes prédominants de ces éléments. Dans l'ensemble, sur 168 isolats de *V. cholerae* non-O1 / non-O139 d'eaux saumâtres et marines, 8% possédaient un élément SXT/R391 alors qu'aucun n'a été détecté chez d'autres bactéries isolées d'environnements aquatiques dulcicoles et de poissons (1435 gamma-protéobactéries (hors *Vibrio*) et 443 *Aeromonas ssp* testées). Ces résultats tendent à confirmer *V. cholerae* comme l'hôte majoritaire des ICE SXT/R391 dans l'environnement. Cela reste cependant limité à un panel d'isolats cultivables et nous ne pouvons pas pleinement extrapoler ce genre de conclusion sans passer par une étude sans à priori et en prenant en compte la part de bactéries environnementales non cultivables. Dans ces conditions, l'epicPCR est apparue comme la méthode moléculaire de choix pour identifier les hôtes environnementaux des ICE SXT/R391.

1.2. ABONDANCE DES ICE SXT/R391 DANS L'ENVIRONNEMENT

Si l'epicPCR permet d'obtenir une vue d'ensemble des hôtes des éléments SXT/R391 en s'affranchissant de la culture des bactéries, il s'agit d'une méthode qui reste uniquement applicable à des environnements suffisamment riches en éléments d'intérêt, avec un seuil de détection ici estimé à environ 1×10^2 séquences cibles sur 3×10^6 bactéries engagées par réaction d'epicPCR. Pour cette raison, il convient d'abord d'identifier les environnements suffisamment riches en éléments SXT/R391. Ainsi, les éléments de cette famille ont été détectés dans différents environnements aquatiques (bassins de pisciculture, biofilms, eau et sédiments de rivière, poisson) et quantifiés à des concentrations allant de 1×10^{-6} à 1×10^{-3} copies de *traB* par copies d'ADNr 16S Eubactériens. Il en résulte que les ICE SXT/R391 peuvent être considérés comme relativement ubiquitaires. Cependant, ces environnements ne semblent pas vraiment favorables au développement de *V. cholerae* qui est pourtant considéré comme l'hôte majoritaire des éléments SXT/R391 dans la littérature, car cette bactérie est habituellement identifiée dans des environnements saumâtres. Ces observations posaient donc la question de l'identité des bactéries hôtes dans ces différentes matrices environnementales.

Dans la suite de ce travail, nous avons utilisé l'epicPCR pour identifier le spectre d'hôtes des ICE SXT/R391 dans deux rivières, dont l'une est plus riche en éléments SXT/R391 que l'autre. Les données d'epicPCR devaient permettre de déterminer si les bactéries issues des effluents de station d'épuration qui terminent leur course dans la rivière sont à l'origine d'un gain de diversité dans les hôtes des ICE SXT/R391, et éventuellement de justifier du choix d'une bactérie donneuse à utiliser pour évaluer le transfert de SXT^{MO10} en microcosme.

1.3. SPECTRE D'HOTES DE SXT/R391 DANS L'ENVIRONNEMENT

L'étude du spectre d'hôtes des éléments SXT/R391 dans la Meurthe et l'Orne, ainsi que dans les effluents des stations d'épuration respectives, a permis de montrer que les hôtes environnementaux des ICE SXT/R391 appartenaient majoritairement aux γ -protéobactéries, comme les *Enterobacteriaceae* ou les *Aeromonadaceae*. Si les premiers avaient déjà été rapportés dans la littérature, ce n'est pas le cas des *Aeromonadaceae* dont l'espèce hôte majoritaire dans nos prélèvements est *Tolomonas auensis*, une bactérie initialement découverte dans un lac d'eau douce.

Les environnements dans lesquelles cette bactérie peu étudiée a été identifiée sont donc semblables à ceux considérés dans ce travail.

Curieusement, si des éléments SXT/R391 ont déjà été identifiés dans diverses bactéries d'une même famille comme les *Vibrionaceae*, l'étude de la prévalence des ICE SXT/R391 dans une collection d'*Aeromonas* isolés d'une autre rivière (Queffleuth) n'avait révélé la présence d'aucun élément SXT/R391. Pourtant les *Aeromonadaceae* comme *T. auensis* ont été identifiées comme hôtes des ICE SXT/R391 par epicPCR. Plusieurs hypothèses pourraient être envisagées pour expliquer cette dissonance. D'abord, il se pourrait que les éléments SXT/R391 ne soient pas présents dans les environnements dans lesquels ont été isolées ces *Aeromonas ssp* de la collection d'isolats criblée, auquel cas une quantification moléculaire des ICE SXT/R391 dans des populations bactériennes collectées dans de tels environnements permettrait de démontrer une faible abondance de ces ICE dans les communautés en général. Ensuite, il se pourrait que la méthode d'isolement ne soit pas suffisamment inclusive pour toutes les bactéries de cette famille, ce qui limiterait le criblage à un ou plusieurs sous-groupes du genre. D'ailleurs, il se pourrait qu'il existe une part d'*Aeromonas ssp*. non-cultivables et donc uniquement détectables par des techniques moléculaires.

La première hypothèse est peut-être la plus simple à étudier mais certainement aussi la plus laborieuse puisqu'elle consisterait d'abord à identifier des environnements riches en ICE SXT/R391 et ensuite à multiplier les expériences d'epicPCR pour énumérer les espèces hôtes. A cet égard, on pourrait se focaliser sur les environnements dans lesquels on retrouve une forte abondance de ces bactéries, comme dans le tractus intestinal de la truite arc en ciel (Kim, Brunt and Austin, 2007) et démontrer (ou pas) un portage significatif par des *Aeromonas*. Ensuite, nous pourrions rechercher différentes méthodes d'isolement adaptées aux *Aeromonas*, si elles existent, afin d'être plus inclusifs quant à la formation de banques d'isolats avant criblage pour la présence des éléments SXT/R391 (Abbott, Cheung and Janda, 2003). Enfin, pour aller plus loin et déterminer si les ICE SXT/R391 pourraient se trouver dans une fraction de bactéries non-cultivables, nous pourrions envisager des approches de métagénomique globale qui permettrait une analyse exhaustive de la composition taxonomique d'un échantillon, une identification des génomes porteur d'éléments SXT/R391 et une caractérisation génotypique de ces derniers. L'analyse pourrait éventuellement mettre l'accent sur des sous-groupes taxonomiques présentant a priori des exigences trophiques ou des caractéristiques atypiques expliquant une absence

d'isolement en tant qu'*Aeromonas*. Quoi qu'il en soit, des expériences similaires devraient être réalisées en ciblant *Tolomonas auensis*, afin de comparer les résultats à ceux obtenus pour les *Aeromonas* ssp, il s'agira de comprendre pourquoi les éléments SXT/R391 sont si abondants dans cette espèce, et pourquoi nous ne sommes pas capables de les identifier dans d'autres membres de la famille des *Aeromonadaceae*.

1.4. RELATION ENTRE LA SALINITE DE L'ENVIRONNEMENT ET LE SPECTRE D'HOTES DE SXT/R391

Globalement, les ICE SXT/R391 sont apparus particulièrement abondants dans l'eau de rivière de la Meurthe par rapport à l'Orne ($4,4 \times 10^{-5}$ à $7,3 \times 10^{-4}$ contre $1,9 \times 10^{-7}$ à $8,7 \times 10^{-5}$ copies/ADNr 16S, respectivement). Étant donné que la Meurthe se distingue par sa salinité sur la partie aval du cours d'eau, une étude plus précise de l'abondance de SXT/R391 le long de cette rivière a été réalisée et nous avons pu mettre en évidence une corrélation positive entre l'abondance en éléments SXT/R391 et la conductivité de l'eau. Ces résultats semblent indiquer que la salinité de l'eau pourrait favoriser le développement d'hôtes préférentiels des éléments SXT/R391. L'analyse des séquences obtenues par epicPCR ont permis d'identifier *Nitrincola schmidtii*, une espèce bactérienne déjà isolée dans d'autres environnements salins (Borsodi *et al.*, 2017), mais jamais identifiée comme étant un hôte de cette famille d'éléments. Ainsi, il se pourrait qu'il existe un groupe taxonomique « relativement halophile » qui soit vecteur des éléments SXT/R391 dans l'environnement .

Pour confirmer la relation entre la salinité et le spectre d'hôtes des ICE SXT/R391, nous pourrions identifier d'autres rivières à salinité élevée, quantifier les éléments SXT/391 et définir leur spectre d'hôtes par epicPCR. Ces résultats pourraient être croisées avec le spectre d'hôtes des éléments SXT/R391 dans d'autres environnements dulcicoles afin d'identifier les taxons uniquement présents dans ces conditions.

1.5. HOTES PREFERENTIELS DES ELEMENTS SXT/R391

Les bactéries hôtes identifiés par epicPCR semblent indiquer qu'il y a relativement peu de diversité dans les bactéries véhiculant des éléments SXT/R391. Une première explication à cela serait que ces éléments sont plus stables dans

certaines bactéries. Si c'est le cas, il serait concevable que la stabilité de ces éléments dans certains hôtes soit liée au niveau d'expression de certaines de leurs fonctions de mobilité. Par exemple, si la fréquence d'excision augmente par rapport à celle d'intégration, on peut imaginer que l'ICE impliqué soit plus facilement perdu lors des divisions cellulaires faute de réplication sous sa forme intégrée au chromosome. Nous pourrions envisager d'évaluer l'effet de la bactérie hôte sur l'expression relative des gènes *xis* et *int* tout en quantifiant sa stabilité en culture continue par exemple. A cet égard, l'utilisation de notre batterie de biosenseurs luminescents impliquant différents promoteurs de gènes de mobilité (excision, intégration, conjugaison) pourrait permettre de quantifier des niveaux d'expression relatifs variables hôtes-dépendants. Bien que la perte d'un élément soit a priori un évènement relativement rare, de l'ordre d'un élément perdu pour 1×10^7 bactéries d'après Wozniak et Waldor (Wozniak and Waldor, 2009), la nature de la bactérie hôte pourrait ainsi s'avérer jouer un rôle déterminant sur la fréquence de perte des ICE SXT/R391. Des questions similaires pourraient se poser vis-à-vis de l'expression des fonctions de conjugaison qui, si elles sont trop faiblement exprimées, limiteraient la possibilité de dissémination au sein des communautés, et donc limiteraient la présence de SXT/R391 à quelques hôtes seulement en privilégiant le transfert vertical au transfert horizontal, tandis qu'une trop forte expression pourrait nuire à la survie de la bactérie hôte par une accumulation protéique ou une perturbation de la stabilité de la paroi/membrane par accumulation de protéines du pore de conjugaison.

1.6. LES LIMITES DE LA METHODE D'EPICPCR

La méthode d'epicPCR ne se résume pas uniquement à l'amplification d'un produit de fusion entre un gène d'intérêt et un marqueur phylogénétique, mais comprend également l'amplification de fragments d'ADNr 16S à partir des amplicons d'epicPCR et de l'ADN total, ainsi que leur séquençage. En ce qui concerne la famille des *Vibrionaceae* à laquelle appartient *V. cholerae*, leur abondance n'était pas suffisante dans les échantillons analysés pour apparaître sur les arbres phylogénétiques réalisés à partir de l'ADN total. Cependant, les *Vibrionaceae* ont toutefois été identifiés par epicPCR. Il s'agit d'un exemple typique où la limite de la méthode a pu être atteinte, puisque pour confirmer qu'un hôte soit bien porteur de l'élément d'intérêt il faut que les bactéries soient à la fois identifiées par l'analyse du gène codant l'ARNr 16S à la fois

dans l'ADN total d'un échantillon et par epicPCR. Sans cette double identification, la bactérie ne sera pas prise en considération, et pourtant les *Vibrionaceae* sont connus pour être porteurs des éléments SXT/R391. Une hypothèse possible serait donc que la méthode d'extraction soit à l'origine de sa faible abondance. En effet, nous avons comparé diverses méthodes d'extraction de l'ADN génomique total à partir de différentes matrices environnementales, et nous avons constaté que les rendements en copies de gènes codant l'ARNr 16S ou TraB étaient similaires toutes méthodes d'extraction confondues. Une étude menée par Rubin *et al* (2014) a révélé que la méthode d'extraction n'avait pas d'influence sur la composition bactérienne générale d'un échantillon, mais que des différences significatives ont été retrouvées dans les abondances de certaines populations. Ainsi, il faudrait envisager d'analyser les données obtenues grâce à différentes méthodes d'extraction pour prendre en considération les taxons peu abondants (Rubin *et al.*, 2014). Une autre limite communément rencontrée dans l'environnement est la présence d'inhibiteurs de la réaction PCR, ce qui pourrait diminuer l'efficacité d'amplification de l'ADNr 16S à partir de l'ADN total, et par conséquent limiter l'abondance de certaines bactéries relativement moins abondantes lors du séquençage. Dans ces conditions, tester d'autres réactifs et polymérases pourrait permettre de s'affranchir des limites posées par la présence d'inhibiteurs (Trombley Hall *et al.*, 2013; Uchii *et al.*, 2019). Enfin, le résultat du séquençage est également impacté par la méthode de quantification de l'ADN. L'étude de Robin *et al.*, (2016) suggère que l'utilisation de la ddPCR ou du fluoromètre Qubit pour doser l'ADN utilisé pour la préparation des bibliothèques NGS, permet l'obtention de résultats plus fiables que d'autres méthodes de dosage (Robin *et al.*, 2016)

2. DISSEMINATION DE SXT^{MO10} DANS L'ENVIRONNEMENT

Des concentrations sub-inhibitrices de certains antibiotiques, comme les quinolones, peuvent induire une plus forte fréquence de transfert des ICE de la famille SXT/R391. En effet, les fonctions d'excision et de transfert conjugatif de ces éléments sont régulées par l'expression de promoteurs impliquant des régulateurs eux-mêmes régulés par la réponse SOS, qui peut être initiée par un stress génotoxique causé par un antibactérien. L'activation de la réponse SOS semble alors jouer un rôle primordial pour rehausser la fréquence de transfert de l'élément. Cette régulation a ici été étudiée

à travers l'expression du promoteur P_{s086} , considéré comme un promoteur central dans la régulation de l'élément SXT^{MO10} . Cependant, certaines études montrent que l'activation de la réponse SOS peut varier en partie en fonction de l'hôte bactérien (Baharoglu and Mazel, 2011). Dans ce contexte, nous nous sommes posés la question de l'effet de la bactérie hôte sur la dissémination des ICE $SXT/R391$ dans l'environnement, et si les antibiotiques inducteur continuaient d'exercer leurs effets au-delà du contexte de l'antibiothérapie humaine ou vétérinaire.

2.1.EFFET DE LA BACTERIE HOTE SUR LA REGULATION ET LA DISSEMINATION DE SXT^{MO10}

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de la bactérie hôte sur la régulation de SXT^{MO10} en étudiant l'expression du promoteur P_{s086} dans diverses bactéries identifiées comme pouvant héberger un ICE de type $SXT/R391$. Il en résulte que les variations de la régulation du promoteur P_{s086} concourent à dire que SXT^{MO10} n'est pas régulé de la même façon chez les différents hôtes, et que sa fréquence de transfert risque d'être variable d'un hôte à l'autre si l'expression P_{s086} reflète vraiment l'expression des fonctions de transfert. En outre, nous avons réalisé des expériences de conjugaison bactérienne avec diverses bactéries donneuses, et nous avons constaté que SXT^{MO10} ne présentait pas les mêmes fréquences de transfert basales en fonction de l'hôte.

D'une manière plus précise, nous avons étudié l'effet de 16 antibiotiques (azithromycine, céfépime, céfotaxime, chloramphénicol, ciprofloxacine, colistine, érythromycine, acide fusidique, imipénème, acide nalidixique, rifampicine, sulfamide, tétracycline, triméthoprime et vancomycine) sur l'induction du promoteur P_{s086} chez *E. coli* MG1656 et *P. mirabilis* BB2000 (Partie 2 : §1.2.2 et §2.2.2.2; Figures 40 et 57), les seules deux bactéries testées qui présentaient des fréquences de transfert basales similaires (Partie 2 §2.1.3). Si aucun de ces antibiotiques n'était capable d'induire véritablement le promoteur P_{s086} chez *P. mirabilis* BB2000, ce n'est pas le cas chez *E. coli* MG1656. Chez cette dernière, 3 antibiotiques inducteurs (la ciprofloxacine, l'imipénème et l'azithromycine) du promoteur P_{s086} ont également été testés pour leurs effets au niveau de la fréquence de transfert dans des expériences de conjugaison *in vitro*, où seuls la ciprofloxacine et l'imipénème étaient capables d'augmenter la fréquence de transfert de SXT^{MO10} .

La réponse SOS, telle qu'elle est connue chez *E. coli*, est dépendante de deux protéines, RecA et LexA. Cette dernière a un rôle de répresseur qui empêche l'expression des gènes du régulon SOS. Cependant, lorsque de l'ADN simple brin est généré, il est reconnu par la protéine RecA qui forme un complexe nucléoprotéique (RecA*) induisant à son tour l'autoprotéolyse de LexA et levant la répression sur le régulon SOS (Simmons *et al.*, 2008). En parallèle, le complexe RecA* est également capable d'induire l'autoclivage du répresseur SetR, ce qui active l'expression du régulon SetCD et permet le transfert des éléments SXT/R391. Ainsi, si la ciprofloxacine n'est pas capable d'induire le promoteur P_{s086} la chez *P. mirabilis* alors que c'est le cas chez *E. coli*, plusieurs hypothèses pourraient être envisagées (Beaber, Hochhut and Waldor, 2004).. D'abord, il se pourrait que la protéine SetR de SXT^{MO10} ne soit pas reconnue par la réponse SOS *via* la protéine RecA* de *P. mirabilis*. Dans ces conditions, la répression exercée par SetR est maintenue et l'élément ne peut être transféré qu'à sa fréquence basale. Afin de vérifier que le complexe RecA* de *P. mirabilis* ne reconnaît pas SetR_{SXT}, nous pourrions d'abord vérifier que la réponse SOS est bien induite chez *P. mirabilis* et *E. coli* (utilisée comme contrôle) toutes les deux exposées à la ciprofloxacine. Pour faire cela, nous pourrions quantifier l'expression du gène *recA* grâce à la fusion transcriptionnelle *recA* ::*lacZ* (Casaregola, D'Ari and Huisman, 1982), ou des fusions de type *recA* ::*luxCDABE*. Il s'agira ensuite d'échanger des promoteurs canoniques du régulon SOS, et vérifier s'ils continuent à s'induire lors de l'exposition à l'antibiotique à l'aide de système rapporteurs. Une autre hypothèse serait que SetR soit naturellement peu, voire pas du tout, exprimé. Dans ces conditions le promoteur P_{s086} ne serait pas réprimé et présenterait toujours un même niveau d'expression maximum qui dépendrait que de son interaction avec l'ARN polymérase de son hôte. Par voie de conséquence, l'élément SXT/R391 présenterait toujours des fréquences de transfert élevées. Pour étudier cette éventualité, nous pourrions étudier l'expression de P_{s086} en présence et en absence d'antibiotique inducteur, et dans différents hôtes en absence de l'ICE SXT^{MO10}, donc sans apport de SetR. La comparaison des niveaux d'expression avec ceux obtenus dans des souches isogéniques mais avec l'ICE devra permettre d'identifier les souches pour lesquelles l'absence de SetR n'influence pas le niveau d'expression à partir de P_{s086}.

Dans un contexte environnemental, SXT^{MO10} pourrait se transférer à des fréquences variables en fonction des hôtes rencontrés dans son environnement immédiat. Mais certains hôtes pourraient également freiner le transfert de l'élément

lorsque le répresseur SetR n'est pas reconnu lors de l'induction de la réponse SOS, limitant les fréquences de transfert aux fréquences basales. Ce cas de figure pourrait être envisagé dans des cas où nous avons pu constater des fréquences de transfert très basses comme *V. cholerae* et *A. hydrophila* (Figure 53) qui étaient inférieures à $1,0 \times 10^{-9}$ transconjugants par bactéries receveuse (Tc/R) alors que la fréquence de transfert de *V. parahaemolyticus* était de l'ordre de $1,0 \times 10^{-4}$ Tc/R. Il resterait à vérifier l'absence d'induction en présence de ciprofloxacine. En outre, il a été décrit dans la littérature, que lorsque deux éléments SXT/R391 se retrouvent dans une même cellule, l'un peut utiliser la machinerie de transfert de l'autre (Burrus and Matthew K. Waldor, 2004).

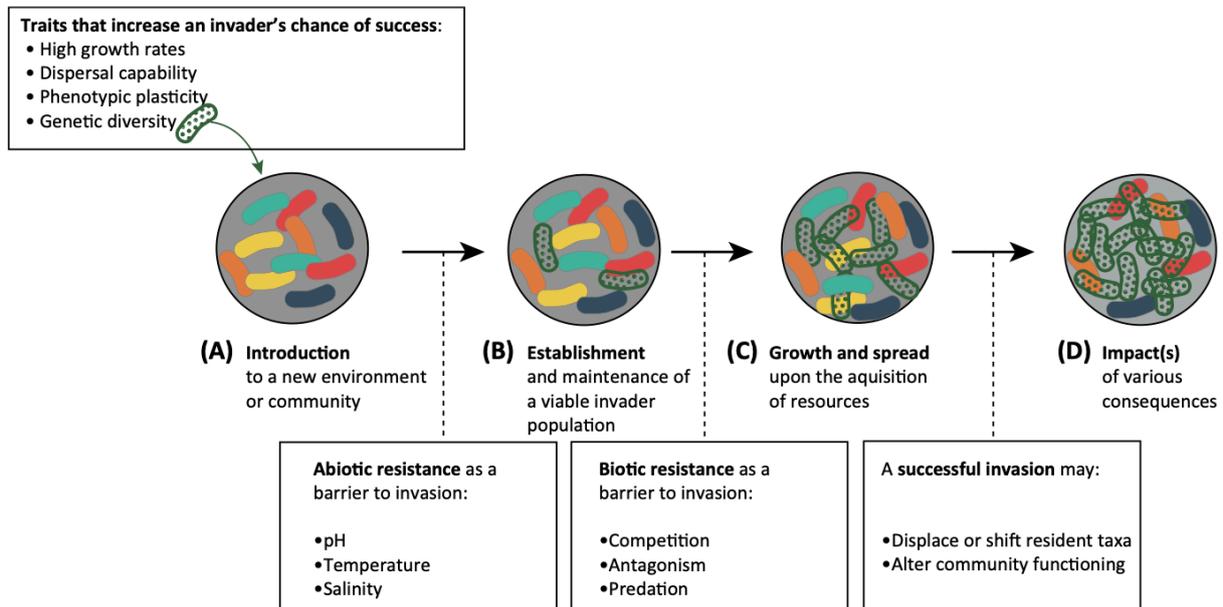
2.2. CAUSES PLAUSIBLES DE L'ABSENCE DE TRANSFERT DE SXT^{MO10} DANS L'ENVIRONNEMENT

Dans ce travail, nous avons constaté que l'abondance des éléments SXT/R391 n'augmente pas dans la rivière en aval de la STEP, une source possible de ces éléments. Plusieurs hypothèses sont envisagées à ce propos. D'abord, il se pourrait que les bactéries receveuses potentielles aient déjà un élément SXT/R391. En effet, il existe un système d'exclusion chez les ICE de cette famille pour limiter les échanges entre deux bactéries qui possèdent déjà un de ces éléments (Burrus and Matthew K. Waldor, 2004), afin d'éviter un coût énergétique inutile aux bactéries. Ensuite, il faut aussi prendre en considération le fait que la bactérie donneuse d'origine anthropique est diluée dans la rivière en aval, ce qui limite les contacts avec les potentielles bactéries receveuses. Enfin, il se pourrait également que la bactérie donneuse colonise la niche d'une bactérie qui avait préalablement l'élément dans cet environnement et la remplace. Dans ces conditions le remplacement d'une bactérie hôte par une autre n'apporterait pas de différences dans l'abondance de l'élément.

Une autre hypothèse serait que des bactéries porteuses d'un élément SXT/R391 nouvellement arrivées dans un environnement rencontrent des difficultés à s'implanter dans les communautés naturelles déjà installées, et donc à les enrichir de nouveaux hôtes hébergent un ICE. Un tel phénomène serait d'autant plus visible dans le cas d'une diffusion faible des ICE dans les communautés par transfert horizontal. Dans un article de revue sur l'invasion biologique, Mallon *et al.* (2015) expliquent que les bactéries qui n'appartiennent pas naturellement à un environnement donné vont

rencontrer plusieurs barrières physiques et biologiques, ce qui va être un facteur limitant pour leur implantation dans une communauté (Figure 68) (Mallon, Elsas and Salles, 2015). Ceci est d'autant plus vrai lorsque la communauté bactérienne autochtone est diversifiée, et que toutes les niches sont occupées. Dans de tels cas, les ressources sont relativement inaccessibles pour l'envahisseur qui ne peut s'implanter dans cet environnement et sera donc rapidement exclu des communautés bactériennes déjà installées (Mallon, Elsas and Salles, 2015). Au contraire, une communauté peu diverse n'utilise qu'une partie des ressources disponibles, ce qui autorise plus facilement l'invasion par une bactérie exogène. Un facteur déterminant est donc la relation entre diversité des communautés indigènes et disponibilité des ressources. Globalement, il apparaît que l'implantation d'une bactérie exogène dans un environnement pourrait être facilitée par un événement concomitant qui déstabilise la communauté bactérienne déjà présente, comme la présence de polluants toxiques, ou l'apport de nouvelles ressources, ce qui crée de nouvelles niches vacantes.

La déstabilisation d'une communauté naturelle et de sa niche est phénomène attendu en cas de pression anthropique et la question peut éventuellement se poser de l'impact des effluents de station d'épuration susceptibles d'être sources de bactéries non-autochtones mais aussi de nouvelles ressources. Par epicPCR, la bactérie *Arcobacter cryaerophilus* (*Campylobacteraceae*) a été identifiée dans les effluents de STEP et en aval de de la rivière, mais pas en amont. Il s'agit sans doute d'une bactérie d'origine anthropique qui semble persister après avoir été libérée dans l'environnement. Difficile de dire avec cette simple observation si *Arcobacter cryaerophilus* a envahi ou pas la communauté autochtone sur une base de temps aussi courte après rejet, mais il serait intéressant de voir si une telle bactérie pouvait avoir des capacité d'implantation/invasion particulière en microcosme. Si l'invasion devait devenir un mécanisme *sine qua non* à l'implantation de bactéries donneuses et au transfert d'EGM, cette bactérie pourrait sans doute être une bonne candidate pour des expériences de dissémination en microcosme.



Trends in Microbiology

Figure 68 : Principales étapes de l'invasion d'une bactérie dans un nouvel environnement. La bactérie verte à pois représente la bactérie envahisseuse introduite dans une nouvelle communauté composée de plusieurs taxons bactériens. L'état de cette communauté est représenté à chaque étape de l'invasion, lors desquelles la bactérie envahisseuse sera exposée à de nouvelles contraintes pour survivre. Après son introduction dans la communauté (A) la bactérie doit s'adapter aux contraintes abiotiques (pH, température, salinité) pour pouvoir s'établir (B) mais la communauté qui continue d'exercer une résistance biotique à son encontre. Si l'envahisseuse passe outre cette résistance biotique, elle pourra alors se multiplier en disposant des ressources (C) avec des conséquences sur la structure et le fonctionnement des communautés (D). D'après Mallon et al., (2015).

2.3. EFFET INDUCTEUR DE LA CIPROFLOXACINE SUR LA REGULATION ET LA DISSEMINATION DE SXT^{MO10} CHEZ E. COLI

Dans le cas d'une exposition à la ciprofloxacine ou l'imipénème chez *E. coli*, les fréquences de transfert de SXT^{MO10} augmentent au fur et à mesure que la concentration de l'antibiotique se rapproche de la CMI et continuent à augmenter au-delà même de cette valeur. Ces bactéries sont donc capables de transférer l'élément dans un environnement toxique, et ce à des fréquences de transfert supérieures aux fréquences basales sans traitement à la ciprofloxacine. Cela pose la question de l'existence de bactéries plus ou moins résistantes à l'antibiotique et dont le niveau de

résistance aurait un effet sur la régulation de SXT^{MO10}, en particulier au regard des concentrations auxquelles le transfert de l'élément est induit. Dans le cas d'une population hétérogène, il en résulte qu'une plus grande gamme de concentration est susceptible d'avoir un effet sur l'induction du transfert de l'ICE. En prenant l'exemple des souches d'*E. coli* MG1656 Cip^S et Cip^R ensemble, nous avons démontré que la ciprofloxacine pouvait avoir un effet inducteur sur l'expression des promoteurs des régulons SetR et SetCD et le transfert de l'élément à des concentrations qui couvrent environ 3 ordres de grandeur (cf Partie 2 §1.3.3.3 ; Figure 48). Une question reste ouverte cependant en ce qui concerne l'induction de P_{s086} et le transfert de l'ICE au-delà de la CMI mesurée pour les bactéries *E. coli* Cip^R. Plusieurs hypothèses sont alors envisageables, soit les bactéries sont capables d'acquérir des mutations et par conséquent d'autres niveaux de résistance au fur et à mesure qu'elles sont exposées à l'antibiotique, ce qui pourrait modifier la concentration à laquelle l'antibiotique commence à être bactéricide, soit la ciprofloxacine n'a finalement pas un effet bactéricide mais plutôt un effet bactériostatique (sur des temps d'exposition courts) jusqu'au moment où on observe une décroissance de la fréquence de transfert de l'élément, assimilée à la mort cellulaire des bactéries donneuses. La morphologie des cellules a été étudiée après exposition à différentes concentrations de l'antibiotique, il s'avère que les cellules commencent à filamenter lorsqu'elles sont exposées à au moins 3,75 ng/mL de ciprofloxacine (environ 2-3 fois la taille de la cellule non exposée à l'antibiotique), puis continuent à filamenter lorsqu'elles sont exposées de 15 ng/mL à 240 ng/mL d'antibiotique (environ 4-5 fois la taille de la cellule non exposée). Enfin, à 960 ng/mL de ciprofloxacine (24 fois la CMI), les bactéries conservent une morphologie proche de celles qui n'ont pas été exposées. Il serait intéressant d'exposer les bactéries aux antibiotiques, étudier leur morphologie et dénombrer les cellules viables afin de déterminer la concentration d'antibiotique à laquelle nous avons un effet bactéricide. A cet égard, on notera que l'exposition à l'antibiotique a été réalisé sur des temps courts (3 heures) en ce qui concerne les mesures d'induction du transfert. Il est envisageable que l'induction de P_{s086} soit possible malgré un effet plus ou moins bactériostatique de l'antibiotique, et que cette induction se traduise par une induction du transfert de l'élément proprement dit lorsque la bactérie donneuse est lavée de l'antibiotique dans le contexte des tests de conjugaison.

2.4. INDUCTION DE SXT^{MO10} AU-DELA DE LA CMI DANS UN CONTEXTE ENVIRONNEMENTAL

Les antibiotiques sont généralement retrouvés dans l'environnement à des concentrations de l'ordre du ng/mL. Pourtant, étant donné que la vitesse de dégradation varie d'un antibiotique (hydrolyse, photolyse, oxydation, réduction, température...), il n'est pas exclu de les retrouver localement dans certaines matrices environnementales à des fortes concentrations. Par exemple, la plupart des fluoroquinolones sont très stables dans l'environnement, sont difficilement dégradées par hydrolyse, et ont tendance à passer rapidement de l'eau aux sédiments. Les pénicillines, quant à elles, peuvent être hydrolysées au bout de plusieurs semaines et ne s'adsorbent pas directement aux sédiments à moins qu'elles forment des complexes qui finissent par retomber sur ces sédiments. En général, les antibiotiques qui ont un meilleur potentiel d'adsorption dans le sol/sédiments vont s'y accumuler et persister, alors que d'autres sont plutôt hydrophiles et resteront majoritairement dans la fraction aquatique (Polianciuc *et al.*, 2020). Il apparaît donc que, si les concentrations environnementales moyennes en antibiotiques sont généralement faibles, la compartimentation des antibiotiques dans l'environnement peut conduire à des concentrations locales plus élevées. Il reste désormais à définir si ces concentrations localement élevées à l'échelle d'une microniche sont suffisantes pour activer le transfert d'un élément SXT/R391 chez l'hôte adéquat.

Plus communément, les bactéries sont principalement exposées à de fortes concentrations en antibiotique lors d'antibiothérapies, et finissent par rejoindre le compartiment environnemental ensuite (Cf. Figure 6, Exemples de voies de dissémination et d'enrichissement de bactéries résistantes et/ou gènes d'antibiorésistance). Plusieurs cas de figures sont envisageables quant au devenir de l'élément SXT/R391 que ces bactéries véhiculent, en fonction des concentrations d'antibiotiques présentes dans l'environnement récepteurs de telles bactéries. Dans le premier cas de figure, les bactéries résistantes à l'antibiotique inducteur, une fois qu'elles se retrouvent dans l'environnement, restent transitoirement induites et pourraient transférer l'élément à de plus fortes fréquences après avoir rencontré un partenaire receveur. C'est typiquement ce nous avons fait lors d'expériences de transfert par conjugaison bactérienne, où les bactéries donneuses ont été exposées à l'antibiotique, puis lavées avant d'être engagées dans une expérience de transfert. C'est dans ces conditions que nous avons observé l'augmentation de la fréquence de

transfert des éléments SXT/R391 par la ciprofloxacine. Dans le deuxième cas de figure, la bactérie donneuse et les bactéries receveuses restent sous la pression de sélection de l'antimicrobien, et si la bactérie donneuse est induite, les conditions toxiques liées à l'antimicrobien pourraient limiter les interactions entre les couples donneurs et receveurs uniquement aux seules bactéries relativement résistantes à l'antibiotique. Enfin, si le transfert est limité en raison de la toxicité de l'antibiotique, les bactéries résistantes auraient toutefois à disposition toutes les ressources nécessaires pour se multiplier et coloniser une nouvelle niche, et par conséquent augmenter l'abondance de l'élément (par transfert vertical).

Au cours de ce travail, nous avons étudié l'effet des antibiotiques de manière séparée dans chacune de nos expériences, et pourtant des études indiquent que la combinaison de deux ou plusieurs antibiotiques peut conduire à un effet antagoniste ou synergique (Ocampo *et al.*, 2014). Il serait sans doute judicieux d'étudier des effets cocktails sur la régulation de l'élément SXT^{MO10}. Il est probable que de faibles concentrations aisément retrouvées dans l'environnement puissent être à l'origine d'une induction de la dissémination de l'élément SXT^{MO10} lorsque l'on considère ces effets cocktails.

2.5. TRANSFERT DANS DES CONDITIONS ENVIRONNEMENTALES

L'évaluation de la dissémination de l'ICE SXT^{MO10} dans des matrices environnementales a été réalisée en utilisant la méthode de suivi moléculaire développée par Bonot et Merlin (Bonot and Merlin, 2010). Cette méthode consiste à ajouter une étiquette moléculaire à la fois dans la bactérie donneuse et dans l'élément mobile d'intérêt. Ainsi, deux bactéries ont été étudiées pour leur faculté à transférer l'élément SXT^{MO10}, à savoir, *E. coli* MG1656::SXT^{MO10}-tagpB10 (CM1272) et *P. mirabilis* BB2000::SXT^{MO10} tout en sachant que l'ICE SXT^{MO10} n'est inductible par la ciprofloxacine que chez *E. coli* MG1656::SXT^{MO10}-tagpB10.

Dans un premier temps, les bactéries donneuses *E. coli* MG1655Δ*lacZY* (CM56) et *P. mirabilis* BB2000 (CM1450) ont été marquées, puis l'ICE SXT^{MO10}-tagpB10 marqué a été transféré à ces bactéries donneuses. A notre grande surprise, nous avons constaté une certaine instabilité de mini-Tn7 chez *P. mirabilis* BB2000 ::mini-Tn7::SXT^{MO10}-tagpB10 (CM2057), qui s'est avérée problématique à posteriori dans le contexte de nos expériences de transfert en microcosmes. Un

nouveau jeu d'amorces/sonde a donc été élaboré pour quantifier la bactérie donneuse de manière spécifique.

Au total, au moins 21 microcosmes ont été réalisés avec ou sans ciprofloxacine, sans tenir compte des microcosmes qui ont servi à paramétrer l'expérience. Il en résulte que seulement l'un d'entre eux a permis la détection, sans ambiguïté, du transfert de SXT^{MO10} dans des conditions environnementales, en utilisant *E. coli* MG1655Δ*lacZY* en tant que bactérie donneuse de SXT^{MO10}-tagpB10 (Figure 65). Le transfert de SXT^{MO10} a peut-être été observé dans 3 des microcosmes réalisés avec la donneuse *P. mirabilis* (Figure 67), avec une hausse transitoire du rapport du nombre de copies de SXT^{MO10} sur le nombre de copies de bactéries donneuses. Le fait que ces transferts aient été observés dans une très faible proportion de microcosmes réalisés en triplicata, indique qu'il s'agit probablement d'évènements rares alors même que l'environnement utilisé était riche en éléments SXT/R391 naturels. Cette situation rappelle celle rencontrée avec le plasmide pB10 transférable à très haute fréquence *in vitro* et pour lequel seuls quelques évènements de transferts ont été détectés sur plus de 150 microcosmes réalisés (Bellanger et al, 2014). Le transfert des EGM est-il fréquent dans l'environnement ? Une stimulation ou une pression de sélection suffit-elle à favoriser la dissémination de l'élément ? Des questions difficiles à répondre à l'échelle de ce type d'expérimentations. Quoi qu'il en soit un évènement rare ne signifie pas qu'il n'existe pas mais simplement qu'il est peu fréquent à échelle humaine sans pour autant ne pas être un succès écologique sur le long terme.

D'autres expériences de transfert pourraient être réalisées avec divers hôtes en marquant SXT^{MO10} de façon à identifier les transconjugants par une approche d'epicPCR. Avec l'emploi d'étiquettes moléculaires différentes, ce type d'expériences pourrait permettre de réaliser des expériences de transfert avec plusieurs bactéries donneuses en même temps, nous pourrions ainsi suivre quel élément se dissémine le mieux en fonction de la bactérie hôte. Dans l'ensemble, bien que le transfert dans l'environnement apparaisse comme un évènement rare, la dissémination de l'antibiorésistance est un fait incontesté. La raison à cela est peut-être à rechercher dans la combinaison évènement rare - succès écologique. Si le premier ne permet pas la détection aisée des phénomènes d'intérêt, la seconde, quant à elle, permet à un nouvel individu d'émerger et de finir par dominer les communautés au cours du temps. Le succès de la dissémination de l'antibiorésistance et/ou des EGM résiderait alors dans l'alternance entre transfert horizontal et transfert vertical.

REFERENCES

- Abbott, S.L., Cheung, W.K.W. and Janda, J.M. (2003) 'The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes', *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), pp. 2348–2357. doi:10.1128/JCM.41.6.2348-2357.2003.
- Alanis, A.J. (2005) 'Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era?', *Archives of Medical Research*, 36(6), pp. 697–705. doi:10.1016/j.arcmed.2005.06.009.
- Ali, M. *et al.* (2015) 'Updated Global Burden of Cholera in Endemic Countries', *PLOS Neglected Tropical Diseases*. Edited by J.V. Remais, 9(6), p. e0003832. doi:10.1371/journal.pntd.0003832.
- Altschul, S. (1997) 'Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs', *Nucleic Acids Research*, 25(17), pp. 3389–3402. doi:10.1093/nar/25.17.3389.
- Amann, R.L., Ludwig, W. and Schleifer, K.H. (1995) 'Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation', *Microbiological Reviews*, 59(1), pp. 143–169. doi:10.1128/mr.59.1.143-169.1995.
- Armbruster, C.E. and Mobley, H.L.T. (2012) 'Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*', *Nature Reviews Microbiology*, 10(11), pp. 743–754. doi:10.1038/nrmicro2890.
- Babakhani, S. and Oloomi, M. (2018) 'Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria', *Journal of Basic Microbiology*, 58(11), pp. 905–917. doi:10.1002/jobm.201800204.
- Badhai, J. and Das, S.K. (2016) 'Characterization of Three Novel SXT/R391 Integrating Conjugative Elements ICEMfulnd1a and ICEMfulnd1b, and ICEMprChn1 Identified in the Genomes of *Marinomonas fungiae* JCM 18476T and *Marinomonas profundimaris* Strain D104', *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.01896.
- Baharoglu, Z. and Mazel, D. (2011) 'Vibrio cholerae Triggers SOS and Mutagenesis in Response to a Wide Range of Antibiotics: a Route towards Multiresistance', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(5), pp. 2438–2441. doi:10.1128/AAC.01549-10.
- Balado, M., Lemos, M.L. and Osorio, C.R. (2013) 'Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family from fish-isolated *Vibrios* encode restriction-modification systems that confer resistance to bacteriophages', *FEMS Microbiology Ecology*, 83(2), pp. 457–467. doi:10.1111/1574-6941.12007.
- Baquero, F. *et al.* (2002) 'Antibiotic consumption and resistance selection in *Streptococcus pneumoniae*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(suppl_3), pp. 27–38. doi:10.1093/jac/dkf504.
- Barraud, O. *et al.* (2010) 'Quantitative multiplex real-time PCR for detecting class 1, 2 and 3 integrons', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(8), pp. 1642–1645.

doi:10.1093/jac/dkq167.

Beaber, J.W., Hochhut, B. and Waldor, M.K. (2002) 'Genomic and Functional Analyses of SXT, an Integrating Antibiotic Resistance Gene Transfer Element Derived from *Vibrio cholerae*', *Journal of Bacteriology*, 184(15), pp. 4259–4269. doi:10.1128/JB.184.15.4259-4269.2002.

Beaber, J.W., Hochhut, B. and Waldor, M.K. (2004) 'SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes', *Nature*, 427(6969), pp. 72–74. doi:10.1038/nature02241.

Beaber, J.W. and Waldor, M.K. (2004) 'Identification of operators and promoters that control SXT conjugative transfer', *Journal of Bacteriology*, 186(17), pp. 5945–5949. doi:10.1128/JB.186.17.5945-5949.2004.

Beaz-Hidalgo, R. *et al.* (2009) '*Aeromonas piscicola* sp. nov., isolated from diseased fish', *Systematic and Applied Microbiology*, 32(7), pp. 471–479. doi:10.1016/j.syapm.2009.06.004.

Bellanger, X., Payot, S., *et al.* (2014) 'Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity', *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), pp. 720–760. doi:10.1111/1574-6976.12058.

Bellanger, X., Guilloteau, H., Bonot, S., *et al.* (2014) 'Demonstrating plasmid-based horizontal gene transfer in complex environmental matrices: A practical approach for a critical review', *Science of The Total Environment*, 493, pp. 872–882. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.06.070.

Bellanger, X., Guilloteau, H., Breuil, B., *et al.* (2014) 'Natural microbial communities supporting the transfer of the IncP-1[†] plasmid pB10 exhibit a higher initial content of plasmids from the same incompatibility group', *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00637.

Bengtsson-Palme, J. *et al.* (2014) 'Shotgun metagenomics reveals a wide array of antibiotic resistance genes and mobile elements in a polluted lake in India', *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00648.

Bennett, P.M. (2008) 'Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria: Plasmid-encoded antibiotic resistance', *British Journal of Pharmacology*, 153(S1), pp. S347–S357. doi:10.1038/sj.bjp.0707607.

Bioteau, A., Durand, R. and Burrus, V. (2018) 'Redefinition and Unification of the SXT/R391 Family of Integrative and Conjugative Elements', *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by E.V. Stabb, 84(13), pp. e00485-18. doi:10.1128/AEM.00485-18.

Blattner, F.R. *et al.* (1997) 'The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12', *Science (New York, N.Y.)*, 277(5331), pp. 1453–1462. doi:10.1126/science.277.5331.1453.

Bonot, S. *et al.* (2010) 'Improving the recovery of qPCR-grade DNA from sludge and sediment', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(6), pp. 2303–2311.

doi:10.1007/s00253-010-2686-0.

Bonot, S. and Merlin, C. (2010) 'Monitoring the Dissemination of the Broad-Host-Range Plasmid pB10 in Sediment Microcosms by Quantitative PCR', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), pp. 378–382. doi:10.1128/AEM.01125-09.

Borsodi, A.K. *et al.* (2017) 'Nitricola alkalilacustris sp. nov. and Nitricola schmidtii sp. nov., alkaliphilic bacteria isolated from soda pans, and emended description of the genus Nitricola', *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(12), pp. 5159–5164. doi:10.1099/ijsem.0.002437.

Bos, J. *et al.* (2015) 'Emergence of antibiotic resistance from multinucleated bacterial filaments', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(1), pp. 178–183. doi:10.1073/pnas.1420702111.

Brañas, P. *et al.* (2015) 'Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone', *International Journal of Antimicrobial Agents*, 46(1), pp. 111–116. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.02.019.

Brock, T.D. *et al.* (2018) *Biologie des micro-organismes*.

Burrus, V. *et al.* (2006) 'SXT-Related Integrating Conjugative Element in New World *Vibrio cholerae*', *Applied and Environmental Microbiology*, 72(4), pp. 3054–3057. doi:10.1128/AEM.72.4.3054-3057.2006.

Burrus, V. and Waldor, Matthew K. (2004) 'Formation of SXT Tandem Arrays and SXT-R391 Hybrids', *Journal of Bacteriology*, 186(9), pp. 2636–2645. doi:10.1128/JB.186.9.2636-2645.2004.

Burrus, V. and Waldor, Matthew K (2004) 'Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements', *Research in Microbiology*, 155(5), pp. 376–386. doi:10.1016/j.resmic.2004.01.012.

Cambray, G. *et al.* (2011) 'Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons', *Mobile DNA*, 2(1), p. 6. doi:10.1186/1759-8753-2-6.

Carattoli, A. (2013) 'Plasmids and the spread of resistance', *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6–7), pp. 298–304. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.001.

Carraro, N. and Burrus, V. (2014) 'Biology of Three ICE Families: SXT/R391, ICEBs1, and ICeSt1/ICeSt3', *Microbiology Spectrum*, 2(6). doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0008-2014.

Casaregola, S., D'Ari, R. and Huisman, O. (1982) 'Quantitative evaluation of recA gene expression in *Escherichia coli*', *Molecular and General Genetics MGG*, 185(3), pp. 430–439. doi:10.1007/BF00334135.

CDC (2020) *About Antibiotic Resistance*. Available at: (<https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>) (Accessed: 18 September 2020).

CDC (2021) *One Health*. Available at: <https://www.cdc.gov/onehealth/index.html> (Accessed: 12 July 2021).

Chandler, M. and Siguier, P. (2013) 'Insertion Sequences', in *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Elsevier, pp. 86–94. doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.00799-3.

Choi, K.-H. *et al.* (2005) 'A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system', *Nature Methods*, 2(6), pp. 443–448. doi:10.1038/nmeth765.

Chokshi, A. *et al.* (2019) 'Global contributors to antibiotic resistance', *Journal of Global Infectious Diseases*, 11(1), p. 36. doi:10.4103/jgid.jgid_110_18.

Cirz, R.T. *et al.* (2006) 'Defining the *Pseudomonas aeruginosa* SOS Response and Its Role in the Global Response to the Antibiotic Ciprofloxacin', *Journal of Bacteriology*, 188(20), pp. 7101–7110. doi:10.1128/JB.00807-06.

Coetzee, J.N., Datta, N. and Hedges, R.W. (1972) 'R Factors from *Proteus rettgeri*', *Journal of General Microbiology*, 72(3), pp. 543–552. doi:10.1099/00221287-72-3-543.

Confédération Suisse (2019) *Causes and transmission paths of antibiotic resistant bacteria*. Available at: <https://www.bag.admin.ch/bag/en/home/krankheiten/infektionskrankheiten-bekaempfen/antibiotikaresistenzen/wie-breiten-sich-antibiotikaresistenzen-aus-.html> (Accessed: 4 June 2021).

Courvalin, P. (2005) 'Antimicrobial Drug Resistance: "Prediction Is Very Difficult, Especially about the Future"¹', *Emerging Infectious Diseases*, 11(10), pp. 1503–1506. doi:10.3201/eid1110.051014.

Datsenko, K.A. and Wanner, B.L. (2000) 'One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), pp. 6640–6645. doi:10.1073/pnas.120163297.

Davies, J. (2006) 'Where Have all the Antibiotics Gone?', *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17(5), pp. 287–290. doi:10.1155/2006/707296.

Demarre, G. *et al.* (2005) 'A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncPα) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains', *Research in Microbiology*, 156(2), pp. 245–255. doi:10.1016/j.resmic.2004.09.007.

Dupraz, P. (2004) 'Interdiction des promoteurs de croissance antibiotiques et commerce international'. Journées Recherche Porcine. Available at: interdiction des promoteurs de croissance antibiotiques et commerce international.

Dziewit, L. *et al.* (2007) 'The SXT Conjugative Element and Linear Prophage N15 Encode Toxin-Antitoxin-Stabilizing Systems Homologous to the *tad-ata* Module of the *Paracoccus aminophilus* Plasmid pAMI2', *Journal of Bacteriology*, 189(5), pp. 1983–1997. doi:10.1128/JB.01610-06.

Edgar, R.C. (2010) 'Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST', *Bioinformatics*, 26(19), pp. 2460–2461. doi:10.1093/bioinformatics/btq461.

Espéli, O., Moulin, L. and Boccard, F. (2001) 'Transcription attenuation associated with bacterial repetitive extragenic BIME elements 1 Edited by I. B. Holland', *Journal of Molecular Biology*, 314(3), pp. 375–386. doi:10.1006/jmbi.2001.5150.

Ferrières, L. *et al.* (2010) 'Silent Mischief: Bacteriophage Mu Insertions Contaminate Products of Escherichia coli Random Mutagenesis Performed Using Suicidal Transposon Delivery Plasmids Mobilized by Broad-Host-Range RP4 Conjugative Machinery', *Journal of Bacteriology*, 192(24), pp. 6418–6427. doi:10.1128/JB.00621-10.

Fischer-Romero, C., Tindall, B.J. and Juttner, F. (1996) 'Tolomonas auensis gen. nov., sp. nov., a Toluene-Producing Bacterium from Anoxic Sediments of a Freshwater Lake', *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46(1), pp. 183–188. doi:10.1099/00207713-46-1-183.

Frost, L.S. *et al.* (2005) 'Mobile genetic elements: the agents of open source evolution', *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), pp. 722–732. doi:10.1038/nrmicro1235.

Furuya, E.Y. and Lowy, F.D. (2006) 'Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting', *Nature Reviews Microbiology*, 4(1), pp. 36–45. doi:10.1038/nrmicro1325.

Gaillard, M. *et al.* (2010) 'Transcriptome analysis of the mobile genome ICEclc in Pseudomonas knackmussii B13', *BMC Microbiology*, 10(1), p. 153. doi:10.1186/1471-2180-10-153.

Garriss, G., Poulin-Laprade, D. and Burrus, V. (2013) 'DNA-Damaging Agents Induce the RecA-Independent Homologous Recombination Functions of Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 Family', *Journal of Bacteriology*, 195(9), pp. 1991–2003. doi:10.1128/JB.02090-12.

Gaze, W.H. *et al.* (2011) 'Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment', *The ISME Journal*, 5(8), pp. 1253–1261. doi:10.1038/ismej.2011.15.

Girden ER. ANOVA: Repeated measures. Sage; 1992.

Goossens, H. (2009) 'Antibiotic consumption and link to resistance', *Clinical Microbiology and Infection*, 15, pp. 12–15. doi:10.1111/j.1469-0691.2009.02725.x.

Guglielmini, J. *et al.* (2011) 'The Repertoire of ICE in Prokaryotes Underscores the Unity, Diversity, and Ubiquity of Conjugation', *PLoS Genetics*. Edited by J. Casadesús, 7(8), p. e1002222. doi:10.1371/journal.pgen.1002222.

Guilloteau, H. *et al.* (2021) 'High-throughput whole-cell biosensor assays for the identification of antibiotics triggering the dissemination of antibiotic resistance genes by SXT.', 2021. Soumis.

Guo, J. *et al.* (2017) 'Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as

hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements', *Water Research*, 123, pp. 468–478. doi:10.1016/j.watres.2017.07.002.

Hochhut, B. *et al.* (2001) 'Formation of Chromosomal Tandem Arrays of the SXT Element and R391, Two Conjugative Chromosomally Integrating Elements That Share an Attachment Site', *Journal of Bacteriology*, 183(4), pp. 1124–1132. doi:10.1128/JB.183.4.1124-1132.2001.

Hochhut, Bianca *et al.* (2001) 'Molecular Analysis of Antibiotic Resistance Gene Clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT Constins', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(11), pp. 2991–3000. doi:10.1128/AAC.45.11.2991-3000.2001.

Huisman, O., D'Ari, R. and Gottesman, S. (1984) 'Cell-division control in *Escherichia coli*: specific induction of the SOS function SfiA protein is sufficient to block septation.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(14), pp. 4490–4494. doi:10.1073/pnas.81.14.4490.

Hultman, J. *et al.* (2018) 'Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent', *FEMS Microbiology Ecology*, 94(4). doi:10.1093/femsec/fiy038.

Kim, D.-H., Brunt, J. and Austin, B. (2007) 'Microbial diversity of intestinal contents and mucus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)', *Journal of Applied Microbiology*, 102(6), pp. 1654–1664. doi:10.1111/j.1365-2672.2006.03185.x.

Klein, E.Y. *et al.* (2018) 'Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(15), pp. E3463–E3470. doi:10.1073/pnas.1717295115.

Klümper, U. *et al.* (2015) 'Broad host range plasmids can invade an unexpectedly diverse fraction of a soil bacterial community', *The ISME Journal*, 9(4), pp. 934–945. doi:10.1038/ismej.2014.191.

de Kraker, M.E.A., Stewardson, A.J. and Harbarth, S. (2016) 'Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050?', *PLOS Medicine*, 13(11), p. e1002184. doi:10.1371/journal.pmed.1002184.

Lane, D. (1991) *16S/23S rRNA sequencing*. (Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics).

Lei, C.-W. *et al.* (2016) 'Characterization of SXT/R391 Integrative and Conjugative Elements in *Proteus mirabilis* Isolates from Food-Producing Animals in China', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(3), pp. 1935–1938. doi:10.1128/AAC.02852-15.

Li, Yinghui *et al.* (2018) 'Characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* SXT-related integrative and conjugative element ICEApI2 and analysis of the encoded FloR protein: hydrophobic residues in transmembrane domains contribute dynamically to florfenicol and chloramphenicol efflux', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(1), pp. 57–65. doi:10.1093/jac/dkx342.

Ligon, B.L. (2004) 'Penicillin: its discovery and early development', *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 15(1), pp. 52–57. doi:10.1053/j.spid.2004.02.001.

Liu, P. *et al.* (2017) 'Antibiotics trigger initiation of SCCmec transfer by inducing SOS responses', *Nucleic Acids Research*, 45(7), pp. 3944–3952. doi:10.1093/nar/gkx153.

Maguin, E. *et al.* (1992) 'New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria', *Journal of Bacteriology*, 174(17), pp. 5633–5638. doi:10.1128/jb.174.17.5633-5638.1992.

Mallon, C.A., Elsas, J.D. van and Salles, J.F. (2015) 'Microbial Invasions: The Process, Patterns, and Mechanisms', *Trends in Microbiology*, 23(11), pp. 719–729. doi:10.1016/j.tim.2015.07.013.

Martin, M. (2011) 'Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads', *EMBnet.journal*, 17(1), p. 10. doi:10.14806/ej.17.1.200.

Martinez, J.L. (2008) 'Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Natural Environments', *Science*, 321(5887), pp. 365–367. doi:10.1126/science.1159483.

Martinez, R.M., Megli, C.J. and Taylor, R.K. (2010) 'Growth and laboratory maintenance of *Vibrio cholerae*', *Current Protocols in Microbiology*, Chapter 6, p. Unit 6A.1. doi:10.1002/9780471729259.mc06a01s17.

McNemar Q. Note on the sampling error of the difference between correlated proportions or percentages. *Psychometrika* [Internet]. 1947 Jun;12(2):153–7. Available from: <https://doi.org/10.1007/bf02295996>

Merlin, C. *et al.* (2002) 'The *Escherichia coli* metD locus encodes an ABC transporter which includes Abc (MetN), YaeE (MetI), and YaeC (MetQ)', *Journal of Bacteriology*, 184(19), pp. 5513–5517. doi:10.1128/JB.184.19.5513-5517.2002.

Merlin, C. *et al.* (2011) 'Persistence and dissemination of the multiple-antibiotic-resistance plasmid pB10 in the microbial communities of wastewater sludge microcosms', *Water Research*, 45(9), pp. 2897–2905. doi:10.1016/j.watres.2011.03.002.

Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G. (1993) 'Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA', *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), pp. 695–700.

Ocampo, P.S. *et al.* (2014) 'Antagonism between bacteriostatic and bactericidal antibiotics is prevalent', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(8), pp. 4573–4582. doi:10.1128/AAC.02463-14.

O'Neill, J. (2016) 'TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS'.

Partridge, S.R. *et al.* (2018) 'Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance', *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4). doi:10.1128/CMR.00088-17.

Pearson, M.M. *et al.* (2008) 'Complete Genome Sequence of Uropathogenic *Proteus mirabilis*, a Master of both Adherence and Motility', *Journal of Bacteriology*, 190(11), pp. 4027–4037. doi:10.1128/JB.01981-07.

Pembroke, J.T. and Piterina, A.V. (2006) 'A novel ICE in the genome of *Shewanella putrefaciens*: comparison with the SXT/R391 ICE-like elements', *FEMS Microbiology Letters*, 264(1), pp. 80–88. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00452.x.

Peterson, E. and Kaur, P. (2018) 'Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens', *Frontiers in Microbiology*, 9, p. 2928. doi:10.3389/fmicb.2018.02928.

Plackett, B. (2020) 'No money for new drugs Nature', in. *Nature*. Available at: <https://media.nature.com/original/magazine-assets/d41586-020-02884-3/d41586-020-02884-3.pdf>.

Polianciuc, S.I. *et al.* (2020) 'Antibiotics in the environment: causes and consequences', *Medicine and Pharmacy Reports* [Preprint]. doi:10.15386/mpr-1742.

Porteous, L.A., Seidler, R.J. and Watrud, L.S. (1997) 'An improved method for purifying DNA from soil for polymerase chain reaction amplification and molecular ecology applications', *Molecular Ecology*, 6(8), pp. 787–791. doi:10.1046/j.1365-294X.1997.00241.x.

Poulin-Laprade, D., Carraro, N. and Burrus, V. (2015) 'The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids', *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00837.

Poyarsalmeron, C. (1990) 'Transferable plasmid-mediated antibiotic resistance in *Listeria monocytogenes*', *The Lancet*, 335(8703), pp. 1422–1426. doi:10.1016/0140-6736(90)91447-1.

Robin, J.D. *et al.* (2016) 'Comparison of DNA Quantification Methods for Next Generation Sequencing', *Scientific Reports*, 6(1), p. 24067. doi:10.1038/srep24067.

Rocha, J. *et al.* (2020) 'Inter-laboratory calibration of quantitative analyses of antibiotic resistance genes', *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(1), p. 102214. doi:10.1016/j.jece.2018.02.022.

Roman, Veronica L. *et al.* (2021a) 'Abundance and environmental host range of the SXT/R391 ICEs in aquatic environmental communities', *Environmental Pollution*, 288, p. 117673. doi:10.1016/j.envpol.2021.117673.

Roman, Véronica L. *et al.* (2021b) 'EpicPCR 2.0: Technical and Methodological Improvement of a Cutting-Edge Single-Cell Genomic Approach', *Microorganisms*, 9(8), p. 1649. doi:10.3390/microorganisms9081649.

Rubin, B.E.R. *et al.* (2014) 'DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure', *MicrobiologyOpen*, 3(6), pp. 910–921. doi:10.1002/mbo3.216.

Salyers, A.A., Shoemaker, N.B. and Li, L.Y. (1995) 'In the driver's seat: the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize', *Journal of Bacteriology*, 177(20), pp.

5727–5731. doi:10.1128/jb.177.20.5727-5731.1995.

Sato, J.L. *et al.* (2020) 'Genomic Analysis of SXT/R391 Integrative Conjugative Elements From *Proteus mirabilis* Isolated in Brazil', *Frontiers in Microbiology*, 11, p. 571472. doi:10.3389/fmicb.2020.571472.

Schlüter, A. *et al.* (2003) 'The 64 508 bp IncP-1 β antibiotic multiresistance plasmid pB10 isolated from a waste-water treatment plant provides evidence for recombination between members of different branches of the IncP-1 β group', *Microbiology*, 149(11), pp. 3139–3153. doi:10.1099/mic.0.26570-0.

Scornec, H. *et al.* (2017) 'Inducibility of Tn916 conjugative transfer in *Enterococcus faecalis* by subinhibitory concentrations of ribosome-targeting antibiotics', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(10), pp. 2722–2728. doi:10.1093/jac/dkx202.

Seier-Petersen, M.A. *et al.* (2014) 'Effect of subinhibitory concentrations of four commonly used biocides on the conjugative transfer of Tn916 in *Bacillus subtilis*', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(2), pp. 343–348. doi:10.1093/jac/dkt370.

Seshadri, R. *et al.* (2006) 'Genome Sequence of *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966', *Journal of Bacteriology*, 188(23), pp. 8272–8282. doi:10.1128/JB.00621-06.

Shinde, A.H., Raval, I.H. and Haldar, S. (2020) 'SXT int harboring bacteria as effective indicators to determine high-risk reservoirs of multiple antibiotic resistance in different aquatic environments of western coast of Gujarat, India', *Ecological Indicators*, 113, p. 106143. doi:10.1016/j.ecolind.2020.106143.

Silva-Rocha, R. *et al.* (2013) 'The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes', *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp. D666–D675. doi:10.1093/nar/gks1119.

Simmons, L.A. *et al.* (2008) 'The SOS Regulatory Network', *EcoSal Plus*. Edited by J.M. Slauch, 3(1), p. ecosalplus.5.4.3. doi:10.1128/ecosalplus.5.4.3.

Simon Andrews (2010) *FastQC*, *Babraham Bioinformatics*. Available at: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.

Sørensen, S.J. *et al.* (2005) 'Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review', *Nature Reviews Microbiology*, 3(9), pp. 700–710. doi:10.1038/nrmicro1232.

Spearman, C (1904). "The proof and measurement of association between two things". *American Journal of Psychology*. 15 (1): 72–101. doi:10.2307/1412159. JSTOR 1412159.

Spencer, S. *et al.* (2015) 'epicPCR (Emulsion, Paired Isolation, and Concatenation PCR)', *Protocol Exchange* [Preprint]. doi:10.1038/protex.2015.094.

Spencer, S.J. *et al.* (2016) 'Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers', *The ISME Journal*, 10(2), pp. 427–436. doi:10.1038/ismej.2015.124.

Student. The probable error of a mean. *Biometrika*. 1908;1–25.

Sugita, H. *et al.* (1995) 'Distribution of *Aeromonas* species in the intestinal tracts of river fish', *Applied and Environmental Microbiology*, 61(11), pp. 4128–4130. doi:10.1128/aem.61.11.4128-4130.1995.

Sullivan, N.L. *et al.* (2013) 'The Complete Genome Sequence of *Proteus mirabilis* Strain BB2000 Reveals Differences from the *P. mirabilis* Reference Strain', *Genome Announcements*, 1(5). doi:10.1128/genomeA.00024-13.

Tao, W. *et al.* (2016) 'High Levels of Antibiotic Resistance Genes and Their Correlations with Bacterial Community and Mobile Genetic Elements in Pharmaceutical Wastewater Treatment Bioreactors', *PLOS ONE*. Edited by Y. Luo, 11(6), p. e0156854. doi:10.1371/journal.pone.0156854.

Tomich, P.K., An, F.Y. and Clewell, D.B. (1980) 'Properties of erythromycin-inducible transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*', *Journal of Bacteriology*, 141(3), pp. 1366–1374. doi:10.1128/jb.141.3.1366-1374.1980.

Tremblay, J. *et al.* (2015) 'Primer and platform effects on 16S rRNA tag sequencing', *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.00771.

Trombley Hall, A. *et al.* (2013) 'Evaluation of Inhibitor-Resistant Real-Time PCR Methods for Diagnostics in Clinical and Environmental Samples', *PLoS ONE*. Edited by B. Lin, 8(9), p. e73845. doi:10.1371/journal.pone.0073845.

Uchii, K. *et al.* (2019) 'Comparison of inhibition resistance among PCR reagents for detection and quantification of environmental DNA', *Environmental DNA*, 1(4), pp. 359–367. doi:10.1002/edn3.37.

Ventola, C.L. (2015) 'The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats', *P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 40(4), pp. 277–283.

Versporten, A. *et al.* (2011) 'European Surveillance of Antimicrobial Consumption (ESAC): outpatient penicillin use in Europe (1997-2009)', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(suppl 6), pp. vi13–vi23. doi:10.1093/jac/dkr454.

Větrovský, T. and Baldrian, P. (2013) 'The Variability of the 16S rRNA Gene in Bacterial Genomes and Its Consequences for Bacterial Community Analyses', *PLoS ONE*. Edited by J. Neufeld, 8(2), p. e57923. doi:10.1371/journal.pone.0057923.

Waldor, M. K., Tschäpe, H. and Mekalanos, J.J. (1996) 'A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139', *Journal of Bacteriology*, 178(14), pp. 4157–4165. doi:10.1128/jb.178.14.4157-4165.1996.

Waldor, M K, Tschäpe, H. and Mekalanos, J.J. (1996) 'A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139.', *Journal of bacteriology*, 178(14), pp. 4157–4165. doi:10.1128/JB.178.14.4157-4165.1996.

Wang, Q. *et al.* (2020) 'Heavy metal copper accelerates the conjugative transfer of antibiotic resistance genes in freshwater microcosms', *Science of The Total Environment*, 717, p. 137055. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.137055.

World Health Organization (2017a) *L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques*. Available at: <https://www.who.int/fr/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.

World Health Organization (2017b) *One Health*. Available at: <https://www.who.int/news-room/q-a-detail/one-health> (Accessed: 12 July 2021).

World Health Organization (2019) *Face à la lenteur des progrès, l'OMS propose un nouvel outil et fixe un objectif pour accélérer l'action contre la résistance aux antimicrobiens*. Available at: <https://www.who.int/fr/news/item/18-06-2019-in-the-face-of-slow-progress-who-offers-a-new-tool-and-sets-a-target-to-accelerate-action-against-antimicrobial-resistance> (Accessed: 7 June 2021).

World Health Organization (2020a) *Résistance aux antibiotiques*. Available at: <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance> (Accessed: 7 June 2021).

World Health Organization (2020b) *Tuberculosis*. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (Accessed: 21 April 2021).

Wozniak, R.A.F. *et al.* (2009) 'Comparative ICE Genomics: Insights into the Evolution of the SXT/R391 Family of ICEs', *PLoS Genetics*. Edited by I. Matic, 5(12), p. e1000786. doi:10.1371/journal.pgen.1000786.

Wozniak, R.A.F. and Waldor, M.K. (2009) 'A Toxin–Antitoxin System Promotes the Maintenance of an Integrative Conjugative Element', *PLoS Genetics*. Edited by J. Casadesús, 5(3), p. e1000439. doi:10.1371/journal.pgen.1000439.

Wozniak, R.A.F. and Waldor, M.K. (2010) 'Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow', *Nature Reviews Microbiology*, 8(8), pp. 552–563. doi:10.1038/nrmicro2382.

Yoo, K. *et al.* (2020) 'Exploring the antibiotic resistome in activated sludge and anaerobic digestion sludge in an urban wastewater treatment plant via metagenomic analysis', *Journal of Microbiology*, 58(2), pp. 123–130. doi:10.1007/s12275-020-9309-y.

Zhang, J. *et al.* (2014) 'PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR', *Bioinformatics*, 30(5), pp. 614–620. doi:10.1093/bioinformatics/btt593.

Zobel, S. *et al.* (2015) 'Tn7-Based Device for Calibrated Heterologous Gene Expression in *Pseudomonas putida*', *ACS Synthetic Biology*, 4(12), pp. 1341–1351. doi:10.1021/acssynbio.5b00058.

ANNEXES

Roman, Véronica L. *et al.* (2021a) 'Abundance and environmental host range of the SXT/R391 ICEs in aquatic environmental communities', *Environmental Pollution*, 288, p. 117673. doi:10.1016/j.envpol.2021.117673.

Roman, Véronica L. *et al.* (2021b) 'EpicPCR 2.0: Technical and Methodological Improvement of a Cutting-Edge Single-Cell Genomic Approach', *Microorganisms*, 9(8), p. 1649. doi:10.3390/microorganisms9081649.

Guilloteau, H. *et al.* (2021) 'High-throughput whole-cell biosensor assays for the identification of antibiotics triggering the dissemination of antibiotic resistance genes by SXT.', 2021. Accepté dans "Journal of Antimicrobial Chemotherapy".



Abundance and environmental host range of the SXT/R391 ICEs in aquatic environmental communities[☆]

Veronica L. Roman^a, Christophe Merlin^a, Sandrine Baron^b, Emeline Larvor^b,
Laetitia Le Devendec^b, Marko P.J. Virta^c, Xavier Bellanger^{a,*}

^a LCPME, CNRS, Université de Lorraine, Nancy, France

^b Mycoplasma-Bacteriology and Antimicrobial Resistance Unit, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (Anses), Ploufragan, France

^c Department of Microbiology, University of Helsinki, Helsinki, Finland

ARTICLE INFO

Keywords:

Mobile genetic elements
Aquatic environments
Resistance gene dissemination
Environmental host range

ABSTRACT

Mobile genetic elements (MGEs) such as plasmids or integrative conjugative elements (ICEs) are widely involved in the horizontal transfer of antibiotic resistant genes (ARGs), but their environmental host-range and reservoirs remain poorly known, as mainly assessed through the analysis of culturable and clinical bacterial isolates. In this study, we used a gradual approach for determining the environmental abundance and host-range of ICEs belonging to the SXT/R391 family, otherwise well known to bring ARGs in *Vibrio* spp. epidemic clones and other pathogens. First, by screening a set of aquatic bacteria libraries covering 1794 strains, we found that almost 1% of the isolates hosted an SXT/R391 element, all belonging to a narrow group of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae*. However, when SXT/R391 ICEs were then quantified in various aquatic communities, they appeared to be ubiquitous and relatively abundant, from 10^{-6} to 10^{-3} ICE copies per 16 S rDNA. Finally, the molecular exploration of the SXT/R391 host-range in two river ecosystems impacted by anthropogenic activities, using the single-cell genomic approach epicPCR, revealed several new SXT/R391 hosts mostly in the Proteobacteria phylum. Some, such as the pathogen *Arcobacter cryaerophilus* (Campylobacteraceae), have only been encountered in discharged treated wastewaters and downstream river waters, thus revealing a likely anthropogenic origin. Others, such as the non-pathogenic bacterium *Neptunomonas acidivorans* (Oceanospirillaceae), were solely identified in rivers waters upstream and downstream the treated wastewaters discharge points and may intrinsically belong to the SXT/R391 environmental reservoir. This work points out that not only the ICEs of the SXT/R391 family are more abundant in the environment than anticipated, but also that a variety of unsuspected hosts may well represent a missing link in the environmental dissemination of MGEs from and to bacteria of anthropogenic origin.

1. Introduction

The emergence and dissemination of antibiotic resistance have been recognized long ago as an unavoidable aspect of bacterial evolution following the use of antibiotics (Courvalin, 2005), which is well illustrated by the relationship between the occurrence of resistances and the antibiotic consumption (Davies, 2007; Davies and Davies, 2010; Furuya and Lowy, 2006). Mechanistically speaking, the increasing occurrence of antibiotic resistant bacteria (ARB) is mostly attributed to the selection

of resistant variants that outcompete susceptible bacteria in microbial communities during antibiotic therapies (Andersson and Hughes, 2014). In parallel, antibiotic resistance genes (ARGs) also accumulate in anthropized environments, even though local antibiotic concentrations are often far below known minimal selective concentrations (Knapp et al., 2010; Aubertheau et al., 2017). Considering that ARB released in anthropic/animal wastes are not really fit to survive in the receiving environment, the accumulation of ARGs has been proposed to result from the horizontal gene transfer (HGT) of ARGs from released ARB to

[☆] This paper has been recommended for acceptance by Klaus Kümmerer.

* Corresponding author. LCPME - Equipe Microbiologie Environnementale, UMR 7564 CNRS - Université de Lorraine, Institut Jean Barriol, Campus Brabois Santé, Bâtiment AB, 3ème étage, 9, Avenue de la Forêt de Haye, BP 20199, 54505, Vandoeuvre-les-Nancy, Cedex. France.

E-mail address: xavier.bellanger@univ-lorraine.fr (X. Bellanger).

<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117673>

Received 13 March 2021; Received in revised form 23 June 2021; Accepted 27 June 2021

Available online 29 June 2021

0269-7491/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

local environmental communities (Martinez, 2009). This suggests that, once released in the receiving environment, ARB from anthropic/animal wastes may survive long enough to disseminate the ARGs they carry to local environmental communities by horizontal gene transfer (HGT), reinforcing the natural ability of environmental communities to be ARGs reservoirs. Any accumulation of ARB in the environment necessarily impacts our exposure to ARGs, and increases the chances of back transfer to human/animal microbiomes, e.g. through vegetables grown in amended soils or recreative water, and be further selected upon new antibiotic therapies. With that respect, the dissemination of antibiotic resistances appears as an amplification loop where ARB/ARGs cycle between the environment and the animal/human microbiota, and where the increasing occurrence of ARB is fueled by each new antibiotic consumption (Xiong et al., 2018). It is now widely accepted that understanding and controlling the spread of antibiotic resistances can only be achieved through a comprehensive 'One Health' approach that includes human, animal and environmental health. A more appropriate and restricted usage of antibiotics in human and animal health practices probably results from this global awareness and encouraging outcomes start to be visible (Aarestrup et al., 2001). Nevertheless, over the selective effect of antibiotics, late epidemiologic studies also pointed out that the spread of ARB/ARGs seems to be the dominant factor to control (Collignon et al., 2018). In that regard, identifying intermediate environmental hosts involved in the global ARG transmission pathways remains to be done. This probably lies in the fact that problematic ARGs have been isolated first because of their association with pathogens. By way of consequences, much effort is given to the identification of known resistant pathogens contaminating the environment, and little case is made to the fact that, because of their association with mobile genetic elements (MGEs), i.e. plasmids, integrative conjugative elements (ICEs) or transposons, ARGs continue to spread toward and/or from environmental hosts by HGT. In this study, we explored the environmental microbial reservoir of ICEs belonging to the SXT/R391 family, often described as major ARG-carrying MGEs in clinical *Vibrio cholerae* strains (Spagnoletti et al., 2014).

V. cholerae O1/O139 is the causative agent of cholera, an acute diarrheal disease, still responsible for 20 000 to 140 000 deaths per year worldwide (WHO, 2020; WHO, 2019). The ICE SXT was first reported as the vector having brought ARGs in a clinical isolate of *V. cholerae* O139 isolated in India in 1993 (Waldor et al., 1996). Because of a conserved genetic organization (Hochhut et al., 2001), SXT was grouped with the R391 element, another ICE formerly identified by Coetzee et al. (1972), which provides resistance genes for antibiotics and metals to a clinical strain of *Providencia rettgeri*. At present, the SXT/R391 ICEs form a family of more than 100 members sharing a core set of 43 genes, many of which being involved in DNA recombination, repair, replication and conjugative transfer (Bioteau et al., 2018). In addition, SXT/R391 ICEs differ by acquisition of genetic materials either in five defined hot-spots (HS1-5) or in four variable regions (VRI-IV) of the core sequence, conferring element specific properties like metal or antibiotic resistances (Wozniak et al., 2009). If the majority of known SXT/R391 ICEs integrate at the 5' end of *prfC*, a gene coding for the peptide chain release factor 3 (Hochhut and Waldor, 1999), a recent study demonstrated that some others integrate at the 3' end of a *tRNA-Ser* encoding gene (Bioteau et al., 2018). Hence, the site-specific integration into the 5' end of *prfC* is no more a standard to be part of this family, which is now divided in 4 groups according to their insertion sites, together with their structural organization and their distribution in bacterial species (Bioteau et al., 2018).

To date, SXT/R391 ICEs were mostly found in *Vibrio* and *Proteus* species from human/animal bacteria isolated based on their resistance profile and molecular typing (Lei et al., 2016; Sato et al., 2020). These ICEs have not been widely searched for in environmental species, although they have been identified in a few environmental gammaproteobacteria like *Shewanella*, *Marinomonas* or *Actinobacillus* (Pembroke and Piterina, 2006; Badhai and Das, 2016; Li et al., 2018). To the best of

our knowledge, SXT/R391 ICEs have been mainly (i) detected through culture-dependent approaches, (ii) from clinical isolates, and (iii) using molecular typing targeting the integrase gene of the element, which seems now to be obsolete (Balado et al., 2013; Lei et al., 2016; Shinde et al., 2020; Sato et al., 2020). As a matter of fact, our knowledge regarding the ecology of SXT/R391 ICEs is very limited and the prevalence of these elements in the environment is mostly unknown.

In this study, we explored the abundance and host range of SXT/R391 ICEs in environmental aquatic communities and wastewaters using culture-based and molecular-based approaches in a gradual analysis. First, four collections of bacterial strains isolated in France from environmental waters, wastewaters and fishes were screened for the presence of SXT/R391 ICEs using new PCR primer/probe designs. The environmental abundance of SXT/R391 ICEs was then determined by quantitative real time PCR (qPCR) for identifying possible reservoirs in some French rivers, wastewaters and fish associated communities. Finally, the environmental hosts of the SXT/R391 ICEs were further identified using a state-of-the-art technique referred as epicPCR (Emulsion, Paired Isolation and Concatenation PCR). This approach revealed that SXT/R391 ICEs are quite common in environmental aquatic communities and wastewaters, and allowed us to identify new bacterial host species of this family of elements that could well constitute environmental reservoirs of these ICEs.

2. Materials and methods

2.1. Sample collection and bacteria libraries

Water and fish samples were first collected from two fish farming facilities differing by their fish cultures and their water circulation systems. The first one, managed by the DAC team of the UR AFPA laboratory based in Nancy (North-East of France), grows sturgeon, perch and zander in controlled systems fed by the same tap-water source that is independently treated and re-circulated in each pond. The second one, managed by the PVP from the Anses laboratory based in Ploufragan-Plouzané (North-West of France), grows rainbow-trout in semi-open raceways fed by natural fresh water. These two sample sets were collected on July 2019 and December 2018, respectively. Water samples were also taken from two different municipal treatment plants in Nancy and Joeuf cities, located in the North-East of France, and the Meurthe and the Orne Rivers which are their respective receiving rivers. These samples were collected on November 2017 and September 2019 in the Meurthe River ecosystem, and on September 2018, March 2019 and September 2019 in the Orne River ecosystem. The wastewater treatment plant (WWTP) located in Nancy processes around 12 000 m³ of wastewater a day from 120 000 residents, while the one located in Joeuf processes around 7700 m³ of wastewater a day from 30 000 residents. Water was also collected from Mont-sur-Meurthe (MSM), Damelevières (DAM), Saint-Nicolas-de-Port (SNP), Art-sur-Meurthe (ASM) and Nancy (NAN) which are cities located along a 30 km long section of the Meurthe River, and from Joeuf (Upstream WWTP) and Beth barrage (Downstream WWTP) on the Orne River. Finally, this study also focused on the SXT/R391 content of 1794 bacteria isolated from four aquatic environments and wastewaters at the Anses Ploufragan-Plouzané laboratory. The 4 corresponding strain libraries mainly containing *V. cholerae* non-O1 non-O139, *Aeromonas* spp., and *Pseudomonas* spp. strains collected over 19 years in France (Table S1). *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* spp. strains were isolated and identified as described in Baron et al. (2013) and Baron et al. (2017), respectively. *Pseudomonas* spp. strains were isolated on RAPID[®].aeruginosa Agar (Bio-Rad) before being identified by PCR according to Benami et al. (2013). For epicPCR, 200 mL of water samples were centrifuged for 40 min at 8000 g and 4 °C. After discarding the supernatant, the remaining cell pellets were resuspended in 20% glycerol and stored at -20 °C until use.

2.2. DNA extraction

For total community DNA extractions, 100 mL of water samples, or ca. 100 mg of fish samples were dispersed in 100 mL of apyrogenic water (BBraun), were filtered on polycarbonate membranes (Whatman Nucleopore filter, pore size 0.22 µm, diameter 47 mm) using a filtration device (Combisart 6-branch Manifold, Sartorius) and stored at - 20 °C until DNA extraction. Total community DNAs from stored filters were extracted using the “PowerWater DNA Isolation Kit” (MO BIO laboratories Inc) according to the manufacturer recommendations. DNAs were eluted from silica columns with 100 µL of PCR grade water (RNase-Free Water, Qiagen). Genomic DNAs from bacterial isolates (libraries) were isolated using the InstaGene Matrix (BioRad) according to the manufacturer recommendations. DNA concentrations and purities were estimated by spectrophotometry according to standard procedures and/or using a QuBit fluorometer.

2.3. Primers design and specificity checking

The ICE SXT_{MO10} from *V. cholerae* O139 MO10 (GenBank: AY055428.1) (Beaber et al., 2002b) was used as reference in order to browse databases and recover sequenced SXT/R391 ICEs using BLASTn (Altschul et al., 1997) in September 2017. All collected sequences were confirmed to be part of SXT/R391 elements by the presence of *prfC*, *int_{prfC}* and/or *setR* genes, corresponding to the ICE *attB* site, the ICE integrase gene and the ICE master regulatory gene, respectively. The SXT/R391 sequences corresponding to the conserved *traB* and *int_{prfC}* genes were aligned using ClustalW and, for each, a couple of primers and a Taqman probe were designed (Table S2). Primer specificities were checked thanks to endpoint PCRs targeting SXT/R391 *traB* or *int_{prfC}* genes on total community DNA extracted from the Meurthe River water. These PCRs were performed using Phusion polymerase (Thermo Fisher Scientific) with the following cycling conditions: initial denaturation at 98 °C for 30s, then 35 cycles at 98 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 73 °C for 15 s, and a final extension for 10 min at 72 °C. The amplicons were cloned using the “Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit” (Invitrogen) before the inserts of 100 recombinant plasmids were sequenced (Genewiz) for confirming their SXT/R391 origin.

2.4. Quantitative PCR assays

SXT/R391 elements were detected and quantified by qPCR by targeting either the *traB* or the *int_{prfC}* genes from genomic and total environmental DNAs. The *traB* gene has been preferentially used as SXT/R391 ICEs exhibiting different *int* gene variants have been reported (Bioteau et al., 2018). Quantitative PCRs were performed in triplicate using a “StepOnePlus Real-Time PCR System” (Applied Biosystems) with the “Taqman Universal Master Mix No UNG” when targeting the SXT/R391 ICEs, or with the “Power SYBR® Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems) when the targeting class 1 integrons and 16 S rRNA genes. SXT/R391 elements were quantified by qPCR according to the kit manufacturer, using primers at 40 µM (Table S2) and the following cycling conditions: initial denaturation at 50 °C for 2 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 15s and 60 °C for 1 min for annealing and extension. Class 1 integrons and eubacterial 16s rRNA genes were quantified according to De la Cruz Barrón et al. (2018). Plasmids pBELX2, containing a *traB* gene fragment from ICE SXT_{MO10}, or pNORM1, containing *int1* and 16 S rRNA gene fragments (Rocha et al., 2020), linearized with either *NdeI* or *BamHI*, were used as qPCR standards for the quantification of SXT/R391 ICEs or class 1 integrons and environmental bacteria, respectively. These plasmids were extracted using the “Wizard plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) according to the manufacturer recommendations. Their DNA concentrations and purities were estimated by spectrophotometry according to standard procedures and/or using a QuBit fluorometer. The absence of residual inhibitors in the DNA extracts was checked by

comparing qPCR amplifications from serially diluted DNA templates.

2.5. 16 S rRNA gene metagenomics

For the Orne River water samples, the PCR amplifications and sequencing of the V3–V4 region of the 16 S rRNA genes were performed on total microbial DNAs at the Institute of Biotechnology, University of Helsinki, Finland, according to Hultman et al. (2018). For the Meurthe River water samples, PCR amplification of the V3–V4 region of the 16 S rRNA genes on total microbial DNA was done with the 515 F and 806 R primers (Table S2) using Phusion polymerase and HF buffer (New England Biolabs). The cycling conditions were as follows: initial denaturation at 98 °C, followed by 28 cycles at 98 °C for 10 s, 58 °C for 30 s and 72 °C for 15 s, and a final extension for 5 min at 72 °C. The PCR products were pooled, cleaned (Monarch PCR & DNA Cleanup Kit) and sequenced on Illumina Miseq (2 × 250) (Genewiz). All 16 S rRNA gene sequences have been deposited in GenBank (BioProject accession no. SUB8106542 and SUB8106791).

2.6. EpicPCR

EpicPCR (Emulsion, Paired Isolation and Concatenation PCR) is a recent single-cell genomic method, based on fusion-PCR amplifications performed on bacteria isolated in polyacrylamide beads. This method allows linking a functional sequence of interest to a 16 S rRNA gene fragment, before sequencing for the taxonomic assignment of the bacteria carrying the functional sequence. Before the polyacrylamide beads formation step, cells were stained with SYBR Green I (Invitrogen), filtered on a track-etched polycarbonate membrane (Whatman Nucleopore, 0,2 µm) and enumerated on an epifluorescence microscope. The epicPCR amplifications were done as described by Hultman et al. (2018) with the modifications proposed by Roman et al. (2021). The PCR products were pooled, purified with the Monarch PCR & DNA Cleanup Kit (NEB) following the manufacturer recommendations. Thereafter, they were either directly sequenced on the Illumina Miseq (2 × 250) platform (Genewiz) or cloned using the Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) as previously described, before approximately 100 clones were sent for Sanger sequencing.

2.7. Sequencing data analysis

For recombinant plasmids, inserts were sequenced using the Sanger method (Genewiz) using primers listed in Table S2. The sequences obtained were analyzed using BLASTn (Altschul et al., 1997). For metagenomics, 16 S rDNA reads were joined with Pear (Zhang et al., 2014) using default options, sequence quality was checked with FastQC (Andrews, 2020), primer sequences and short reads (<330 bp) were removed using cutadapt (Martin, 2011). Unique sequences were identified using USEARCH -fastx_uniques command (Edgar, 2010). OTUs were clustered and reads were mapped to reference sequences with the USEARCH -cluster_otus command with the -minsize 2 parameter. Taxonomic classification of OTUs was done using the USEARCH -sintax command, using the ltp_16s_v123 database with the classifier cutoff set at 60. A representative sequence from each bacterial family (constituted of at least 10 reads) was aligned with MUSCLE (Madeire et al., 2019), before a phylogenetic tree was built with Fasttree (Price et al., 2009) and visualized in iTol (Letunic and Bork, 2019). Reads resulting from epicPCR amplifications were analyzed as described by Roman et al. (2021) and a confidence level (CL) in the detection of OTU determined, from level 1 (the lower), to level 5. This corresponds to the validation of an OTU based on its detection in epicPCR replicates as follows: (i) in only one replicate (CL = 1), (ii) in either 2 out of 2 replicates of technical duplicates (so called a “2/2 technical replicates” validation method) or “2/3 technical” replicates (CL = 2), (iii) in “3/3 technical” replicates (CL = 3), (iv) in either “2/2 biological” or “2/3 biological” replicates (CL = 4) or (v) “3/3 biological” replicates (CL = 5).

3. Results and discussion

3.1. Design of new set of SXT/R391 targeting primers

Until now, the vast majority of PCR-based identifications of SXT/R391 ICEs were performed by targeting the *int_{prfC}* gene coding for the integrase of elements integrated in the *prfC* gene 5' end (Balado et al., 2013; Lei et al., 2016; Shinde et al., 2020). Only recently, some authors focused on the conserved *rumA* gene (Sato et al., 2020). Another recent study highlighted that SXT/R391 elements can carry an alternative integrase gene, signifying that *int_{prfC}* is no more considered as part of the core sequence of the entire SXT/R391 ICEs (Bioteau et al., 2018). Hence, a new SXT/R391 PCR target was here searched for in order to broadly and specifically detect/quantify these ICEs in isolates and environmental samples, and even further identify new environmental hosts by epicPCR. In this context, we designed a new set of primers/probe targeting the *traB* gene, itself part of the SXT/R391 core sequence, coding for a protein involved in the conjugation process, and only presents in one copy per ICE (Table S2). Browsing database allowed verifying that the *traB* targeted fragment was only found in members of this ICE family, despite the fact that more globally, the *tra* genes of SXT/R391 ICEs are related to those of the IncF plasmids (Beaber et al., 2002a). Further verifications of the primer design were performed by amplifying, cloning and sequencing amplicons obtained by PCR performed on total genomic DNA of microbial communities sampled in the Meurthe River. The 34 sequences obtained were identified by multi-alignment analysis as corresponding to 5 different *traB* sequence variants. The three most abundant of these variants were so far not listed in databases (Table S3). In spite of this novelty, the 5 sequence variants were confirmed to actually belong to the *traB* gene of SXT/R391 ICEs. Indeed, the BLASTn analyses of each of 5 sequence variants with the parameters “query cover” > 99% and “percent identity” > 90% allow identifying 206 sequences. These sequences include 205 ICE fragments annotated as such or chromosome fragments, therefore likely ICEs, and a single IncF plasmid fragment belonging to plasmid pRHBSTW-00054.2 and identical to sequence variant n°2 also detected in ICEVchCHN4210 (Table S3). Nevertheless, other IncF plasmids were not identified with the parameters used, since they have both query cover and percent identity ≤ 83%. Given the relationship between the conjugation modules of SXT/R391 ICEs and IncF plasmids, it is likely that, with the IncF plasmid pRHBSTW-00054.2, we identified an allelic exchange between a part of the plasmid conjugation module and the one of an SXT/R391 ICE closely related to ICEVchCHN4210. Whatever, the isolation of 3 *traB* new sequences variant suggests a broader diversity of SXT/R391 ICEs sequence in the environment than up to now reported. Finally, qPCR amplifications performed on environmental DNA with, either a SYBR Green or a Taqman chemistry, resulted in the detection of a single and expected 81 bp-band in an agarose gel electrophoresis (Figure S1), which further validate the proper specificity of the designed primers/probe.

3.2. Abundance of SXT/R391 ICEs in environmental bacteria libraries

SXT/R391 elements were first discovered in a clinical strain of *V. cholerae* O139 (SXT_{MO10}) (Beaber et al., 2002b) and thereafter most of the time reported in other *Vibrio* strains/species (Bioteau et al., 2018). We therefore first screened two libraries (Table S1, libraries #2 and #3) made after the sampling of aquatic environments supporting these bacteria and having indeed proved to contain 168 non-O1/non-O139 *V. cholerae* strains. These environments were fresh waters sampled in the Rance and the Queffleuth Rivers (North-Western France), raw and treated wastewaters, marine water, and brackish water (see Table S1 for details). The detection of SXT/R391 elements was performed using a qPCR targeting the conserved *traB* gene and resulted in spotting 14 SXT/R391 carrying strains, which represent 8% (14/168) of the total *V. cholerae* collection, all recovered from the Rance River environment. Thirteen of the 14 detected SXT/R391 ICEs were further characterized

with a qPCR targeting the *int_{prfC}* integrase gene. We determined that 8 of these ICEs carried the *int_{prfC}* gene (Table S4), suggesting that the 5 remaining strains may host an ICE integrated in an alternative *attB* site, such as the already identified *tRNA-Ser* encoding gene (Bioteau et al., 2018). This again reinforces the idea that ICEs from the SXT/R391 family are numerous and diverse.

The literature reported that non-*Vibrio* SXT/R391 carriers, all belonging to gamma-proteobacteria, including *Proteus* spp. or *Shewanella* spp. (Bioteau et al., 2018), were sporadically isolated from aquatic environments, stool samples and infected patients, and that some are known to be human- or animal-pathogens, notably fishes. For this reason, we also screened other libraries containing 1626 strains from 42 genera (of which 1436 gamma-proteobacteria but no *Vibrio* sp.), isolated from environmental waters, wastewaters and wild fishes, but none of them was shown to carry any SXT/R391 element. At this stage, it is worth mentioning that, among the 1626 characterized strains, 443 were *Aeromonas* spp. isolates. All in all, if the new gene target *traB* allowed detecting SXT/R391 elements in a few environmental non-O1/non-O139 *V. cholerae* strains, none were identified in strains belonging to any other species/genus, which tends to comfort data from literature suggesting that SXT/R391 elements are mainly hosted by *V. cholerae* and other *Vibrio* spp. strains. Nevertheless, it is well known that culture-based approaches only capture a partial picture of the reality. To go further, we decided to investigate the environmental host range of the SXT/R391 elements using epicPCR. To do so, it was first necessary to assess the feasibility of the approach by determining the relative abundance of the SXT/R391 ICE family in the environment. In addition, such abundance study would valuably provide insight on the type of environments permissive to the SXT/R391 family, as well as a better vision of the significance of the SXT/R391 ICEs in the environment.

3.3. Abundances of SXT/R391 ICEs in aquatic environments

To date, all known hosts of SXT/R391 ICEs are either waterborne bacteria or human/animal intestinal bacteria that may entered aquatic environments through the discharge of WWTP effluents or agricultural activities such manure/slurry spreading. In this context, we investigated the relative abundances of SXT/R391 ICEs in various aquatic ecosystems impacted by Human activities. We first studied the abundance of these MGEs in two fish farming facilities differing by their fish cultures and water circulation systems. Water and biofilm samples were collected from sturgeon, perch, zander and rainbow-trout growing basins. The stomach contents, intestine contents and feces of three rainbow-trout were also collected (details in Supplementary material). Total community DNAs were extracted from these samples, and their contents in SXT/R391 ICEs were determined by qPCR targeting the *traB* gene as described above. The SXT/R391 ICE quantities in communities were further normalized by the 16 S rDNA abundance, also estimated by qPCR, so as to get a comparable assessment of the ICE abundance. The relative abundances of SXT/R391 ICEs in water, biofilm and fish samples are presented in Fig. 1A. SXT/R391 ICEs were detected in all analyzed communities and their relative abundances range from 10⁻⁶ copies per 16 S rDNA in fishpond-associated biofilm, to almost 10⁻³ copies per 16 S rDNA in fish feces. Concerning the recirculation systems, no significant variation of SXT/R391 ICEs relative abundances was observed after the mechanical filtering nor the UV-treatment steps, indicating that those steps do not have any visible effect on the abundance of SXT/R391 ICEs. The comparison of SXT/R391 ICE abundance in the different basins showed almost 10 times more ICEs in water samples from Perch basins, suggesting a possible host-fish effect on the abundance of SXT/R391 elements. In the raceway systems containing rainbow-trout, the relative abundance of SXT/R391 ICEs is from 1 to 2 orders of magnitude lower in water samples than in fish samples, indicating that these animals may act as reservoirs and vectors of SXT/R391 carrying bacteria, from where they would further disseminate in their

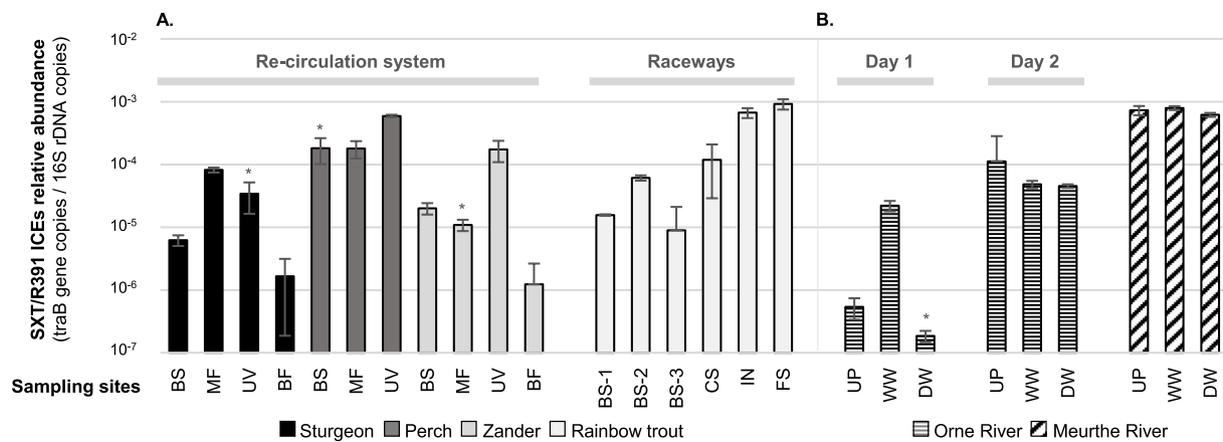


Fig. 1. Relative abundance of SXT/R391 ICEs in (A) water, biofilm and fish samples from two fish farming facilities and (B) water samples from the Orne and the Meurthe Rivers. BS, water from the basin; MF, water from the mechanical filtering system; UV, water collected after the UV treatment system; BF, inner tank surface biofilm; SC, fish stomach contents; IN, fish intestine content; FS, fish feces; UP, river water collected upstream a WWTP; WW, WWTP effluents; DW, river water collected downstream a WWTP. Error bars indicate the standard error of the mean ($n = 3$ except for BS, MF, UV and BF where $n = 1$ and for which error bars indicate the standard error of the qPCR triplicates). Asterisks indicate detected values close to the qPCR limit of quantification.

surrounding environment.

Taking these observations into account, we then studied the abundance of SXT/R391 ICEs in water samples from two rivers impacted by the discharge of urban WWTP effluents. The relative abundance of SXT/R391 ICEs in water sample sets collected upstream and downstream two WWTPs located on the bank of the Orne and Meurthe Rivers as well as in the corresponding effluents are presented Fig. 1B. Given that there is no increase of the relative abundance of SXT/391 ICEs after the WWTPs in both rivers, we conclude that, in these ecosystems, there was no observable effect of the WWTP effluent discharge on the global SXT/391 content of the receiving river, even for the first sampling day on the Orne River when abundance river water in upstream WWTP and in its effluents were very different. This absence of quantitative effect is likely due to the high dilution of the WWTP effluents in the studied river waters, since, in this area of France, there is no real water scarcity. However, this apparent quantitative stability does not presume of a substantial change in the river microbial community composition of the river water after the WWTP discharge points.

The Meurthe River flows close to industrial facilities exploiting rock salt and discharging salted residual water in the river, therefore creating a salt concentration gradient along the course of the river, which may favor community changes. The SXT/R391 elements were quantified at five different locations along a 30 km-long section of the Meurthe River encompassing the Saint-Nicolas-de-Port and Art-sur-Meurthe urban areas where the rock salt exploiting industries are located. The relative abundances of class 1 integrons, usually used as a proxy for anthropogenic pollution, were also determined in order to get a reference with a broadly used MGE proxy. The relative abundance of SXT/R391 ICEs and class 1 integrons in the Meurthe River are presented Fig. 2, where the corresponding conductivity of the water samples provides an idea of the evolution of the salt concentration. As expected, there is an increase in the river water conductivity values starting from Saint-Nicolas-de-Port (SNP) to Nancy (NAN). The relative abundances of class 1 integrons in those water samples are 13–140 times higher than the ones of SXT/R391 ICEs. But, the relative abundance of SXT/R391 elements gradually increase by approximately 1 order of magnitude from upstream to downstream, while the relative abundance of class 1 integrons remained stable. Statistical analyses allowed pointing out that (i) the relative abundances of SXT/391 elements evolved independently from those of class 1 integrons (Spearman's rank correlation test: $P = 0.78$), (ii) the relative abundance of class 1 integrons does not correlate water conductivity (Spearman's rank correlation test: $P = 0.78$), while (iii) the relative abundance of SXT/391 elements does (Spearman's rank correlation test: $P = 0.02$), thus highlighting salinity as an important driving

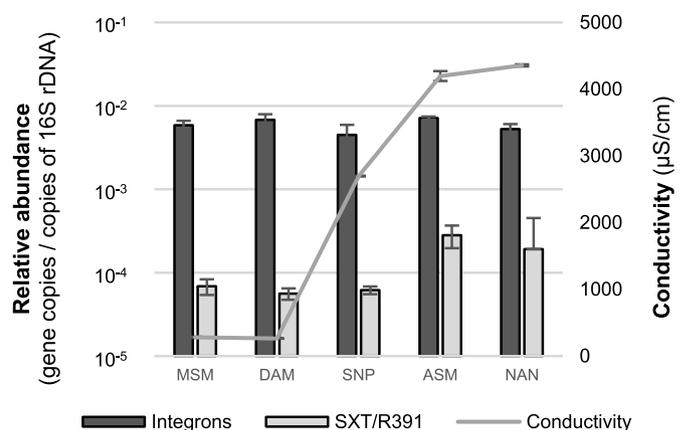


Fig. 2. Relative abundance of SXT/R391 ICEs and class 1 integrons in water samples from the Meurthe River and conductivity measurements. Samples were collected in various cities along the Meurthe River continuum, from upstream to downstream: MSM, Mont-sur-Meurthe; DAM, Damelevières; SNP, Saint-Nicolas-de-Port; ASM, Art-sur-Meurthe; NAN, Nancy. All the sampling sites are located upstream of the WWTP of the Nancy City area and its discharging point into the Meurthe River. Error bars indicate the standard error of the mean ($n = 3$).

parameter for SXT/R391 hosts ecology.

Regarding the data obtained on the sole Orne River (Fig. 1B), the results obtained at two different sampling dates showed that these abundances varied up to two orders for a same sampling site, suggesting a sampling date effect (ANOVA test, $P = 0.12$). When considering the data obtained from the different sampling campaigns performed on the Meurthe River (Figs. 1 and 2), we were not able to detect any sampling date effect (Student T test for paired values, $P = 0.26$). Anyway, it can be noticed that SXT/R391 elements tend to be more abundant in the Meurthe River (from 4.4×10^{-5} to 7.3×10^{-4} copies/16 S rDNA) than in the Orne River (from 1.9×10^{-7} to 8.7×10^{-5} copies/16 S rDNA). The latter result raises the question of the higher abundance of SXT/R391 ICEs in the Meurthe River, as well as its increase along the course of the river together with salinity. This enrichment could well relate to community shifts originating from changes in environmental conditions favoring some meso/polyhaline bacterial species hosting SXT/R391 elements, such as *Vibrio cholerae*, as oppose to oligohaline bacteria. Other meso/polyhaline bacteria species that do not belong to the *Vibrio*

genus may also be involved in this phenomenon.

Finally, as they have been detected in all tested environmental samples, SXT/R391 ICEs appeared to be widespread and likely ubiquitous. A very recent paper also demonstrate that the elements of this family are likely very abundant in WWTP effluents (Calderón-Franco et al., 2020), even suggesting they would be one of the most abundant ICE family.

3.4. Identification of SXT/R391 hosts in the Orne and Meurthe River ecosystems by epicPCR

Having detected the SXT/R391 elements in large enough abundances in the Orne and Meurthe Rivers, as well as in WWTP effluents, their host range was further investigated using the cutting-edge single cell metagenomic approach epicPCR (Emulsion, Paired, Isolation and Concatenation PCR). By doing so, we attempted to determine both if SXT/R391

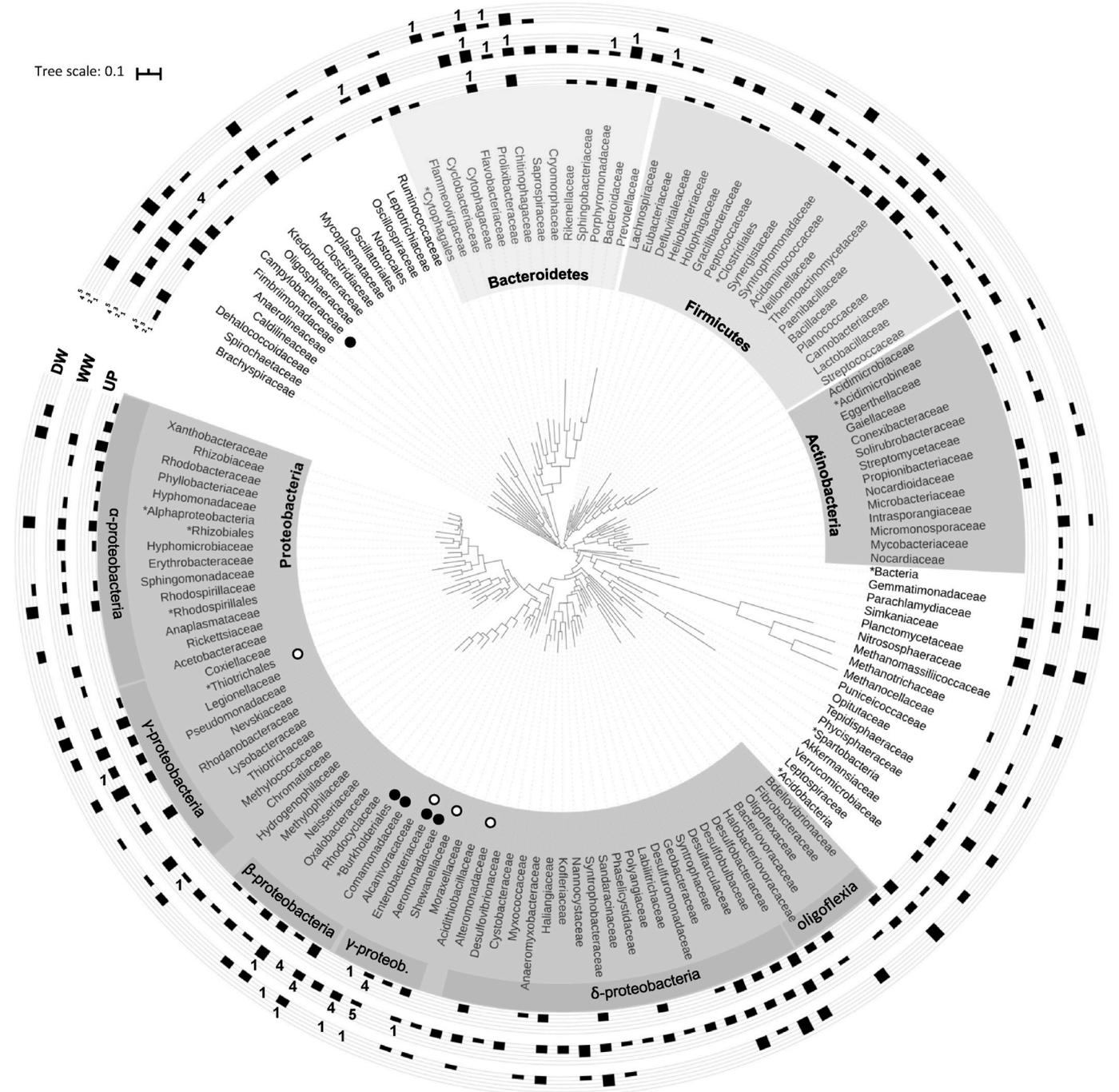


Fig. 3. Host range of SXT/R391 ICEs in the Orne River ecosystem identified by epicPCR. WW: wastewater treatment plant effluents; UP: river water collected upstream of the WWTP; DW: river water collected downstream of the WWTP. The phylogenetic tree was constructed from family-level OTUs based on 16 S rRNA gene amplicon sequences. The five confidence levels (from 1, the lowest, to 5) of the presence of SXT/R391 elements in a bacteria family are indicated by numbers. Open and full black circles indicate taxonomic families where SXT/R391 elements have been previously detected or detected in the present work with a high confidence level (CL ≥ 3), respectively. The confidence levels are not related to the black rectangles in the UP, WW and DW rings that display the relative abundances of 16 S rDNA reads for the considered family. The numbers at the edge of the rings indicate the Log₁₀ values of the calculation (sum of OTU reads from a family/total reads of a sample) * 100 000 expressing the relative OTU read abundances. Asterisks are for unclassified families.

as the unseen majority of non-culturable environmental bacteria.

For the SXT/R391 elements, epicPCR was implemented by targeting the *traB* gene, as above for qPCR. Before proceeding to massive sequencing analyses, we first validated the adequacy of our primer design for epicPCR (Table S2) by implementing this techniques at lower scale using cells recovered from the Meurthe River water upstream the WWTP, *i.e.* by cloning and sequencing the nested-PCR products obtained so as to confirm the specific fusion between SXT/R391 *traB* and 16 S rDNA fragments. Of the 88 sequences obtained, all carried an expected *traB*-16 S rRNA gene fusion product. Sixty-four of the corresponding 16 S rDNA fragments were identified as matching the species *Nitrincola schmidtii*, a bacterium previously isolated from water of inland salt water bodies (Borsodi et al., 2017). Twenty other sequences were attributed to uncultured *Aeromonas* species identical to strains isolated from aquaculture water, and the 4 remaining sequences corresponded to uncultured bacterial clones from sewage/sludge, sediment and piglet intestine. Interestingly, *Nitrincola* and *Aeromonas* species have never been identified as SXT/R391 hosts until now.

Once validated for fusion PCR, the primer design was further used to run epicPCR on water samples collected from the Orne and the Meurthe River waters (upstream and downstream of a WWTP discharging point), and on WWTP effluents discharged. After sequencing, data was analyzed, and phylogenetic trees were constructed as described by Roman et al. (2021) (Figs. 3 and 4). Five confidence levels (CLs; from 1, the lower one, to 5) were defined for assigning the SXT/R391 elements to bacterial genus, depending on their presence in either technical or biological replicates (Roman et al., 2021). SXT/R391 elements were found with different CLs in several phyla, but mainly in families belonging to the Proteobacteria phyla, as expected according to literature (Bioteau et al., 2018). Despite the lack of detection of SXT/R391 ICEs in the environmental *Aeromonas* ssp. isolates from our strain libraries, such elements were found in bacteria belonging to the Aeromonadaceae with the highest CLs in all tested samples covering river waters and WWTP effluents. A deeper analysis allowed identifying *Tolomonas auensis*, a non-pathogenic toluene-synthesizing bacterium previously identified in freshwater lake environments (Fischer-Romero et al., 1996), as the major SXT/R391 host of this family. All the SXT/R391 hosts detected with the higher CLs belong to the β -, γ - and ε -Proteobacteria phyla, such as the ε -Proteobacteria Campylobacteraceae and the β -Proteobacteria Comamonadaceae (Figs. 3 and 4), although all known hosts reported until now were γ -Proteobacteria (Bioteau et al., 2018). In both ecosystems, SXT/R391 elements were found in bacteria families already mentioned in the literature, like the Enterobacteriaceae family (CLs 3 or 4 in WWTP effluents and 1 to 3 in river waters). Even if the sampling periods (September 2018 and 2019) were favorable to the environmental detection of *Vibrio* species (Croci et al., 2001), members of this last family were not abundant enough for being detected by the 16 S metagenomic approach and therefore were absent from the 16 S rDNA-based phylogenetic trees (Figs. 3 and 4). Considering that usually enrichment methods are necessary for recovering environmental *Vibrio* strains (Robert-Pillot et al., 2002), their absence was not really surprising. Nevertheless, SXT/R391 carrying bacteria were detected with a low CL in Vibrionaceae collected in the Orne River water (Table S4). Other putative SXT/R391 hosts belonging to other taxonomic families were widely detected with a high or a low CL scores in both river ecosystems. Rather than uncertain results, and considering the relatively low abundance of SXT/R391 ICEs, the epicPCR results with a low CL score may well represent poorly abundant hosts at the edge of the detection limits of the different approaches used and should be attentively considered. Finally, an analysis of aggregated epicPCR results at the OTU level (Figure S2) demonstrated that, for the two river ecosystems studied, the WWTP effluent origins of some of the SXT/R391 hosts can be distinguished from those already present in the river upstream WWTP. This is the case, for instance, of the pathogen *Arcobacter cryaerophilus* (Campylobacteraceae) exclusively encountered in effluents and downstream river waters, as opposed to the halophilic

non-pathogenic bacterium *Neptunomonas acidivorans* (Oceanospirillaceae) typically identified in rivers waters upstream and downstream the WWTP effluent discharge points. This also demonstrated that, if a quantitative impact of WWTP effluent discharges was not visible in the downstream river water regarding the abundance of SXT/R391 ICEs, a qualitative impact on the composition of SXT/R391 carrying bacterial communities could be detected. However, the results obtained also established that the environmental host-range of SXT/R391 elements differs substantially from what was observed until now, thus suggesting the existence of large environmental reservoirs that may play a pivotal role in the transmission of these ICEs from and to pathogens.

3.5. Environmental significance of SXT/R391 host range broadness

This work has not been focused on the cargo genes that the environmental SXT/R391 ICEs carry, *i.e.* the phenotypic traits they encode and may horizontally disseminate. Nevertheless, it could be mentioned that roughly 60% and 20% of the SXT/R391 ICEs described so far carry ARGs and metal/trace element resistance genes, respectively (Bioteau et al., 2018). As example, ICEVchBan9 carries 6 ARGs (*sul2*, *floR*, *strAB*, *tetA*, *dfrA1*) conferring resistance to 5 antibiotic classes, and 1 metal/trace element resistance gene (*zitB*). Only one fourth of these elements do not seem to encode cargo genes.

Otherwise, epicPCR allows very interesting and deep metagenomic analyses but can only offer an instant picture of a microbial community. This host range does not solely reflect the sets of different bacteria meet by the SXT/R391 ICEs, but may also have a deep mechanistic implication regarding their fate and behaviors in the context of their dissemination. First, the excision of these ICEs from the chromosome of their bacterial host, the earliest step of their transfer, has been shown as being either dependent or independent of host encoded protein factors. This dependence or independence is species-specific and may impair the ability some hosts to be good SXT/R391 donors (McLeod et al., 2006). When present in two bacteria belonging to different species, the same SXT/R391 element can present basal transfer frequencies differing by more than one order of magnitude, and can exhibit transfer frequencies differently induce by a same concentration of an inducing molecule (Waldor et al., 1996; Beaber et al., 2004). Beyond these phenomena, SXT/R391 ICEs can carry a huge allelic variety of core genes and promoters (Bioteau et al., 2018), that again multiplies the kinds of behavior they can have in a same species. The study of another ICE, Tn916, has shown that the same element can be very stable in a species, while highly unstable in another one. This instability has been linked to a very high excision frequency of the ICE and its subsequent lost during cell divisions, likely because of the misregulation of the promoters controlling the ICE recombination module (Scott et al., 1988). Indeed, as the consensus sequences of bacterial promoters vary between species, a same gene can be differently expressed in two species because of the distinct recognition efficiencies of its promoter by the sigma factors of the bacteria where it has transferred (Haugen et al., 2008). Finally, as others MGEs, SXT/R391 ICEs carry addiction modules, actually toxin-antitoxin systems, that promote the maintenance of the acquired elements (Wozniak and Waldor, 2009). Any mutation or misregulation in the expression of such an addiction module can lead in the ICE loss at a high frequency, or may impact on the viability of the bacterial cells carrying an MGE. All in all, these different phenomena draw a complex picture where the same SXT/R391 element can excise, transfer, integrate and maintained over cell divisions at different frequencies when it is harbored by hosts belonging to different bacterial species. Thus, if SXT/R391 elements are present in a variety of hosts within a microbial community, they likely behave differently, may have many fates, and may variously respond to the same stimulating molecules. Therefore, there may be as much behaviors of SXT/R391 ICEs than combinations of such an ICE within a particular host. The host range and abundance of such MGEs in a microbial community should then have to be though as

ever-changing equilibriums rather than fixed characteristics. This again complexifies the role these ICEs could have in disseminating the cargo genes they encode, and augurs new and exciting studies to better define the role plays by these elements in ecosystems.

4. Conclusion

The design of new sets of primers/probe targeting the conserved *traB* gene of SXT/R391 elements was a key step towards the quantification and the taxonomic assignment of these ICEs in aquatic environments. All in all, SXT/R391 elements appeared to be likely ubiquitous and much more abundant than anticipated (from 10^{-6} to 10^{-3} ICE per 16 S rRNA gene), especially in slightly salty or brackish water that may well represent a key environmental parameter responsible for the persistence of SXT/R391 hosts, and thus a putative environmental hot spot for SXT/R391-based ARG propagation. Thanks to the epicPCR, the environmental host range of SXT/R391 hosts could be explored without *a priori* beyond the limits of the classically described *Vibrio* spp. SXT/R391 elements were rather found in bacterial families (Aeromonadaceae, Campylobacteraceae Comamonadaceae) and species (*T. auensis*; *A. cryaerophilus*) that were until now not mentioned in literature. Considering the fact that *Vibrio* spp. were classically reported and monitored as the most frequent hosts of SXT/R391 ICEs, this work shows that, actually, great care should be given to the unseen majority represented by the environmental bacteria hosting SXT/R391 elements that likely are the main sources of these MGEs and their carried ARGs towards pathogens. In other words, following the One Health concept, the propagation of MGEs/ARGs should also be investigated in non-clinical isolates when it comes to understanding the connection between environmental reservoirs, pollution sources (e.g. WWTP effluents) and human/animal exposure.

Funding sources

VLR has been supported by a Short-Term Scientific Mission Grant from the Nereus COST Action ES1403. CM and XB wish to thank the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Project “AquaResist,” PNEREST Anses, 2018/1/052), the Carnot Institute ICÉEL, and the Zone Atelier Moselle for research funding. SB was supported by grants from the European Maritime and Fisheries Fund (project Resist3A), Ecoantibio 1 plan (French Ministry of Agriculture; project Antibiofish), and the Service des études médicales of Électricité de France (EDF). MV is funded by Academy of Finland.

Credit author statement

Veronica L. Roman: Investigation, Methodology, Visualization, Writing - original draft. **Christophe Merlin:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Methodology, Project administration, Supervision, Writing - original draft, Writing - review & editing. **Sandrine Baron:** Data curation, Funding acquisition, Writing - review & editing. **Emeline Larvor:** Investigation. **Laetitia Le Devendec:** Investigation. **Marko P. J. Virta:** Data curation, Methodology, Writing - review & editing. **Xavier Bellanger:** Conceptualization, Data curation, Funding acquisition, Methodology, Supervision, Writing - original draft; Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

The authors want to thank B. Gassilloud, A. Wilhelm (MALDI-TOF

platform, Nancy Hydrology Laboratory (LHN, Anses), T. Morin, M. Danion (Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, Anses), M. Montargès-Peletier, C. Gaultier (LIEC, CNRS, Université de Lorraine), T. Lecocq, Y. Ledore (URAFPA, Université de Lorraine), C. Demangeclaude and S. Trévarin (Véolia, Maxéville), the Métropole du Grand Nancy (inter-communal structure centered on Nancy City) for their help in sampling and fish associated strains isolation and characterization.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117673>.

References

- Aarestrup, F.M., Seyfarth, A.M., Emborg, H.D., Pedersen, K., Hendriksen, R.S., Bager, F., 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 (7), 2054–2059. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.7.2054-2059.2001>.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25 (17), 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.* 12 (7), 465–478. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3270>.
- Andrews S. FastQC. Babraham Bioinformatics [cited on July 6, 2020]. Accessible on: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.
- Aubertheau, E., Stalder, T., Mondamert, L., Ploy, M.C., Dagot, C., Labanowski, J., 2017. Impact of wastewater treatment plant discharge on the contamination of river biofilms by pharmaceuticals and antibiotic resistance. *Sci. Total Environ.* 579, 1387–1398. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.136>.
- Badhai, J., Das, S.K., 2016. Characterization of three novel SXT/R391 integrating conjugative elements ICEMfulnd1a and ICEMfulnd1b, and ICEMprChn1 identified in the genomes of *Marinomonas fungiae* JCM 18476T and *Marinomonas profundimar* strain D104. *Front. Microbiol.* 7, 1896. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01896>.
- Balado, M., Lemos, M.L., Osorio, C. R., 2013. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family from fish-isolated *Vibrios* encode restriction–modification systems that confer resistance to bacteriophages. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83 (2), 457–467. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12007>.
- Baron, S., Lesne, J., Moore, S., Rossignol, E., Rebaudet, S., Gazin, P., et al., 2013. No evidence of significant levels of toxigenic *V. cholerae* O1 in the Haitian aquatic environment during the 2012 rainy season. *PLoS currents* 5 <https://dx.doi.org/10.1371%2Fcurrents.outbreaks.7735b392bdc749ba5812d2096d331e>.
- Baron, S., Granier, S.A., Larvor, E., Jouy, E., Cineux, M., Wilhelm, A., et al., 2017. *Aeromonas* diversity and antimicrobial susceptibility in freshwater—an attempt to set generic epidemiological cut-off values. *Front. Microbiol.* 8, 503. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00503>.
- Beaber, J.W., Burrus, V., Hochhut, B., Waldor, M.K., 2002a. Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 59 (12), 2065–2070. <https://doi.org/10.1007/s000180200006>.
- Beaber, J.W., Hochhut, B., Waldor, M.K., 2002b. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 184 (15), 4259–4269. <https://doi.org/10.1128/JB.184.15.4259-4269.2002>.
- Beaber, J.W., Hochhut, B., Waldor, M.K., 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427 (6969), 72–74. <https://doi.org/10.1038/nature02241>.
- Benami, M., Gross, A., Herzberg, M., Orlofsky, E., Vonshak, A., Gillor, O., 2013. Assessment of pathogenic bacteria in treated graywater and irrigated soils. *Sci. Total Environ.* 458, 298–302. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.04.023>.
- Bioteau, A., Durand, R., Burrus, V., 2018. Redefinition and unification of the SXT/R391 family of integrative and conjugative elements. *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (13) <https://doi.org/10.1128/AEM.00485-18>.
- Borsodi, A.K., Korponai, K., Schumann, P., Spröer, C., Felföldi, T., Máriaiget, K., et al., 2017. *Nitriicola alkalilacustris* sp. nov. and *Nitriicola schmidti* sp. nov., alkaliphilic bacteria isolated from soda pans, and emended description of the genus *Nitriicola*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67 (12), 5159–5164. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002437>.
- Calderón-Franco, D., van Loosdrecht, M.C., Abeel, T., Weissbrodt, D.G., 2020. Free-floating Extracellular DNA: Systematic Profiling of Mobile Genetic Elements and Antibiotic Resistance from Wastewater. *Water Research*, p. 116592.
- Coetzee, J.N., Datta, N., Hedges, R.W., 1972. R factors from *Proteus rettgeri*. *Microbiology* 72 (3), 543–552. <https://doi.org/10.1099/00221287-72-3-543>.
- Collignon, P., Beggs, J.J., Walsh, T.R., Gandra, S., Laxminarayan, R., 2018. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *The Lancet Planetary Health* 2 (9), e398–e405. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30186-4](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30186-4).

- Courvalin, P., 2005. Antimicrobial drug resistance: "Prediction is very difficult, especially about the future. *Emerg. Infect. Dis.* 11 (10), 1503 <https://dx.doi.org/10.3201%2F1110.051014>.
- Croci, L., Serratore, P., Cozzi, L., Stacchini, A., Milandri, S., Suffredini, E., Toti, L., 2001. Detection of *Vibrionaceae* in mussels and in their seawater growing area. *Lett. Appl. Microbiol.* 32 (1), 57–61. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2001.00855.x>.
- Davies, J., 2007. Microbes have the last word: a drastic re-evaluation of antimicrobial treatment is needed to overcome the threat of antibiotic-resistant bacteria. *EMBO Rep.* 8 (7), 616–621. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7401022>.
- Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74 (3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>.
- De la Cruz Barrón, M., Merlin, C., Guilloteau, H., Montargès-Pelletier, E., Bellanger, X., 2018. Suspended materials in river waters differentially enrich class 1 integron-and IncP-1 plasmid-carrying bacteria in sediments. *Front. Microbiol.* 9, 1443. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01443>.
- Edgar, R.C., 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26 (19), 2460–2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>.
- Fischer-Romero, C., Tindall, B.J., Jüttner, F., 1996. *Tolumonas auensis* gen. nov., sp. nov., a toluene-producing bacterium from anoxic sediments of a freshwater lake. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 46 (1), 183–188. <https://doi.org/10.1099/00207713-46-1-183>.
- Furuya, E.Y., Lowy, F.D., 2006. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol.* 4 (1), 36–45. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1325>.
- Haugen, S.P., Ross, W., Gourse, R.L., 2008. Advances in bacterial promoter recognition and its control by factors that do not bind DNA. *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (7), 507–519. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1912>.
- Hochhut, B., Beaver, J.W., Woodgate, R., Waldor, M.K., 2001. Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative chromosomally integrating elements that share an attachment site. *J. Bacteriol.* 183 (4), 1124–1132. <https://doi.org/10.1128/JB.183.4.1124-1132.2001>.
- Hochhut, B., Waldor, M.K., 1999. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol. Microbiol.* 32 (1), 99–110. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01330.x>.
- Hultman, J., Tamminen, M., Pärnänen, K., Cairns, J., Karkman, A., Virta, M., 2018. Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94 (4), fty038. <https://doi.org/10.1093/femsec/fty038>.
- Knapp, C.W., Dolfig, J., Ehlert, P.A., Graham, D.W., 2010. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ. Sci. Technol.* 44 (2), 580–587. <https://doi.org/10.1021/es901221x>.
- Lei, C.W., Zhang, A.Y., Wang, H.N., Liu, B.H., Yang, L.Q., Yang, Y.Q., 2016. Characterization of SXT/R391 integrative and conjugative elements in *Proteus mirabilis* isolates from food-producing animals in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (3), 1935–1938. <https://doi.org/10.1128/AAC.02852-15>.
- Letunic, I., Bork, P., 2019. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* 47 (W1), W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>.
- Li, Y., Li, Y., Fernandez Crespo, R., Leanse, L.G., Langford, P.R., Bossé, J.T., 2018. Characterization of the *Actinobacillus pleuropneumoniae* SXT-related integrative and conjugative element ICE $_{Apl2}$ and analysis of the encoded FloR protein: hydrophobic residues in transmembrane domains contribute dynamically to florfenicol and chloramphenicol efflux. *J. Antimicrob. Chemother.* 73 (1), 57–65. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx342>.
- McLeod, S.M., Burrus, V., Waldor, M.K., 2006. Requirement for *Vibrio cholerae* integration host factor in conjugative DNA transfer. *J. Bacteriol.* 188 (16), 5704–5711. <https://doi.org/10.1128/JB.00564-06>.
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Lopez, R., 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47 (W1), W636–W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>.
- Martin, M., 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal* 17 (1), 10–12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.
- Martinez, J.L., 2009. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environ. Pollut.* 157 (11), 2893–2902. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.05.051>.
- Pembroke, J.T., Piterina, A.V., 2006. A novel ICE in the genome of *Shewanella putrefaciens* W3-18-1: comparison with the SXT/R391 ICE-like elements. *FEMS Microbiol. Lett.* 264 (1), 80–88. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00452.x>.
- Price, M.N., Dehal, P.S., Arkin, A.P., 2009. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.* 26 (7), 1641–1650. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp077>.
- Robert-Pillot, A., Baron, S., Lesne, J., Fournier, J.M., Quilici, M.L., 2002. Improved specific detection of *Vibrio cholerae* in environmental water samples by culture on selective medium and colony hybridization assay with an oligonucleotide probe. *FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Ecol.* 40 (1), 39–46. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00934.x>.
- Rocha, J., Cacace, D., Kampouris, I., Guilloteau, H., Jäger, T., Marano, R.B., et al., 2020. Inter-laboratory calibration of quantitative analyses of antibiotic resistance genes. *Journal of Environmental Chemical Engineering* 8 (1), 102214. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.02.022>.
- Roman VL, Merlin C, Virta MPJ, Bellanger X. EpicPCR 2.0: technical and methodological improvement of a recent single-cell genomic approach. (under submission).
- Sato, J.L., Fonseca, M.R., Cerdeira, L.T., Tognim, M.C., Sincero, T.C., do Amaral, M.C.N., Galhardo, R.S., 2020. Genomic analysis of SXT/R391 integrative conjugative elements from *Proteus mirabilis* isolated in Brazil. *Front. Microbiol.* 11 <https://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2020.571472>.
- Scott, J.R., Kirchman, P.A., Caparon, M.G., 1988. An intermediate in transposition of the conjugative transposon Tn916. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 85 (13), 4809–4813. <https://doi.org/10.1073/pnas.85.13.4809>.
- Shinde, A.H., Raval, I.H., Haldar, S., 2020. SXT *int* harboring bacteria as effective indicators to determine high-risk reservoirs of multiple antibiotic resistance in different aquatic environments of western coast of Gujarat, India. *Ecol. Indic.* 113, 106143. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106143>.
- Spagnoletti, M., Ceccarelli, D., Rieux, A., Fondi, M., Taviani, E., Fani, R., et al., 2014. Acquisition and evolution of SXT-R391 integrative conjugative elements in the seventh-pandemic *Vibrio cholerae* lineage. *mBio* 5 (4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01356-14>.
- Spencer, S.J., Tamminen, M.V., Preheim, S.P., Guo, M.T., Briggs, A.W., Brito, I.L., Alm, E. J., 2016. Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. *ISME J.* 10 (2), 427–436. <https://doi.org/10.1038/ismej.2015.124>.
- Waldor, M.K., Tschäpe, H., Mekalanos, J.J., 1996. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol.* 178 (14), 4157–4165. <https://doi.org/10.1128/jb.178.14.4157-4165.1996>.
- World Health Organization, 2019. Cholera [cited on July 6, 2020]. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cholera>.
- World Health Organization, 2020. Global Health Observatory (GHO) - Number of Deaths Due to Cholera [cited on July 6, 2020]. https://www.who.int/gho/epidemic_diseases/cholera/situation_trends_deaths/en/.
- Wozniak, R.A., Fouts, D.E., Spagnoletti, M., Colombo, M.M., Ceccarelli, D., Garriss, G., et al., 2009. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet.* 5 (12), e1000786.
- Wozniak, R.A., Waldor, M.K., 2009. A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet.* 5 (3), e1000439 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000439>.
- Xiong, W., Wang, Y., Sun, Y., Ma, L., Zeng, Q., Jiang, X., et al., 2018. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome* 6 (1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0419-2>.
- Zhang, J., Kobert, K., Flouri, T., Stamatakis, A., 2014. PEAR: a fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* 30 (5), 614–620. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt593>.



Article

EpicPCR 2.0: Technical and Methodological Improvement of a Cutting-Edge Single-Cell Genomic Approach

Véronica L. Roman ¹, Christophe Merlin ¹, Marko P. J. Virta ² and Xavier Bellanger ^{1,*}

¹ Université de Lorraine, CNRS, LCPME, F-54000 Nancy, France; veronica.roman@univ-lorraine.fr (V.L.R.); christophe.merlin@univ-lorraine.fr (C.M.)

² Department of Microbiology, University of Helsinki, 00790 Helsinki, Finland; marko.virta@helsinki.fi

* Correspondence: xavier.bellanger@univ-lorraine.fr; Tel.: +33-(0)3-72-74-72-45

Abstract: EpicPCR (Emulsion, Paired Isolation and Concatenation PCR) is a recent single-cell genomic method based on a fusion-PCR allowing us to link a functional sequence of interest to a 16S rRNA gene fragment and use the mass sequencing of the resulting amplicons for taxonomic assignment of the functional sequence-carrying bacteria. Although it is interesting because it presents the highest efficiency for assigning a bacterial host to a marker, epicPCR remains a complex multistage procedure with technical difficulties that may easily impair the approach depth and quality. Here, we described how to adapt epicPCR to new gene targets and environmental matrices while identifying the natural host range of SXT/R391 integrative and conjugative elements in water microbial communities from the Meurthe River (France). We notably show that adding a supplementary PCR step allowed us to increase the amplicon yield and thus the number of reads obtained after sequencing. A comparison of operational taxonomic unit (OTU) identification approaches when using biological and technical replicates demonstrated that, although OTUs can be validated when obtained from three out of three technical replicates, up to now, results obtained from two or three biological replicates give a similar and even a better confidence level in OTU identification, while allowing us to detect poorly represented SXT/R391 hosts in microbial communities.

Keywords: PCR-based technic; epicPCR; single-cell metagenomic; taxonomic assignment; high throughput sequencing



Citation: Roman, V.L.; Merlin, C.; Virta, M.P.J.; Bellanger, X. EpicPCR 2.0: Technical and Methodological Improvement of a Cutting-Edge Single-Cell Genomic Approach. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1649. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081649>

Academic Editor: Mar Rodriguez Jovita

Received: 18 June 2021
Accepted: 29 July 2021
Published: 2 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) is one of the biggest challenges faced by human and veterinary medicine [1]. ARGs are not homogeneously distributed in bacterial genomes but are rather clustered within mobile genetic elements (MGEs), that ensure their interbacterial mobility [2]. Identifying MGEs bacterial hosts along their dissemination routes is of prime importance to understand and control the spread of ARGs. So far, this question has mostly been addressed by non-targeted approaches, such as shotgun metagenomics, which suffer from several technical limitations such as a lack in coverage depth when it comes to identify bacterial hosts of rare ARGs/MGEs [3–5]. Moreover, linking plasmids with their hosts by shotgun metagenomics is inherently difficult because of the discontinuity between replicons. These limitations may be overcome using few recent approaches such as Hi-C (High-throughput chromosomal confirmation capture) [6] or epicPCR (Emulsion, Paired Isolation and Concatenation PCR) [5,7]. EpicPCR relies on a fusion-PCR linking a functional sequence of interest to a 16S rRNA gene fragment from the host. An epicPCR amplification is performed using a template consisting in polyacrylamide beads-entrapped cells dispersed in a stable emulsion to avoid amplifying cross-genome products and, for increasing the desired PCR product quantity, an additional nested-PCR step is carried out during which blocking-primers (BPs) are used to prevent the formation of chimeric amplicons [7]. So far, epicPCR has only been reported for the taxonomic assignment of some ARGs and class 1 integrons that appeared as relatively frequent marker in bacterial

communities [8]. In a twin work very recently published elsewhere [9], we explored in depth the environmental host range of another ARG carrying-MGE, namely the integrative and conjugative elements (ICEs) of the SXT/R391 family [10], using different culture-based and molecular-based approaches. Here, we report in detail on significant improvements of the epicPCR workflow made from the original protocol described by Spencer et al. (2016) and Hultman et al. (2018) that allow for pushing forward the limits of the epicPCR. By doing so, we identified several environmentally abundant and never before described SXT/R391 bacterial hosts and proposed a way to qualify these identifications with a system of confidence levels. We also discuss whether the modifications made would be suitable or directly applicable or not in future studies concerning any new target that would be investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Bacterial Strain

The strain CM527 is an *Escherichia coli* MG1656 [11] deriving bacterium containing the SXT_{MO10} element initially isolated from a pathogenic *Vibrio cholerae* strain [12]. *E. coli* MG1656::SXT_{MO10} (CM527) cells were grown in LB broth without antibiotic (160 rpm, 30 °C) for 16 h before cells were used for improving/testing epicPCR conditions.

2.2. Sample Collection and Microbial Cells Extraction

Three water and three sediment samples were collected from the Meurthe River (Malzéville, Lorraine, France; 48°43'16.0" N 6°10'34.2" E) on September 2019. These choices have been made as the vast majority of SXT/R391-carrying bacteria have been isolated from water or fecal samples and that the sampling point is precisely located in a river downstream the release point of a large wastewater treatment plant (500,000 equivalent inhabitants). Moreover, although the conductivity of river waters usually ranges from 50 to 1500 µS/cm [13], that of the Meurthe River water at the sampling point reaches 4500 µS/cm [9], that may favor the survival/growth of some already known SXT/R391 hosting bacteria as *Vibrio* sp. [14]. Sonication treatments were conducted in attempts to disaggregate cells embedded in water suspended particles or in sediment particles. For water, 45 mL of samples were sonicated for 15 s, 30 s, 45 s, 1 min, 2 min, 5 min or 10 min at 26 W in an ultrasonic bath, just once or twice with a 60 s interval. For sediment samples, 0.5 g or 1.0 g of sediments were dispersed in 700 µL of 1 × PBS using a vortex, and then sonicated two or three times as described for water. 350 µL of sonicated samples were delicately deposited on the top of a 2 mL tube containing 1 mL of a 53.3% Histodenz solution (i.e., 0.8 g·mL⁻¹), before being centrifuged at 4 °C for 20 min at 5000× g. The top and middle phase were centrifuged again at 4 °C for 10 min at 13,000× g after what the supernatant was removed. These steps were performed several times in parallel for each sample, after what the cell pellets obtained from the same sample were pooled and re-suspended in 50 µL of 1 × PBS solution. Water samples were also proceeded without sonication step. In that case, cells were recovered by centrifuging 200 mL of each water sample (40 min at 8000× g) before cells were re-suspended in 100–300 µL of molecular biology-grade water. All samples were processed within 1 h after collection and kept at ambient temperature (ca. 20 °C) during transportation. When required, recovered cells were mixed with glycerol (20% final concentration) and stored at –80 °C until use.

2.3. EpicPCR

2.3.1. Cell Enumeration and Bead Formation

For enumeration, cells aliquots were stained with SYBR Green I (Invitrogen, Waltham, MA, USA), filtered on a track-etched polycarbonate membrane (Whatman Nucleopore, 0.2 µM) and enumerated on an epifluorescence microscope in order to employ the appropriate cell number (i.e., 1–2 × 10⁷ cells) in beads formation, and to ensure the absence of cell aggregates as much as possible. Viability of isolated cells recovered after sonication treatments was determined using the LIVE/DEAD[®] BacLight[™] staining kit and a flow cytometer (BD Accuri[™] C6, BD Biosciences, San Jose, CA, USA) equipped with a 50-mW

laser emitting at 488 nm, as described previously [15]. The polyacrylamide beads were done as described by Hultman et al. (2018) with the following modifications. Prior bead formation, cells were resuspended in 30 μL of Nuclease-Free Water (Promega, Madison, WI, USA). Then, bead-entrapped cells were stained with SYBR Green I (Invitrogen) and observed to determine the occurrence of beads containing none, one or several cells. According to the Poisson law and considering that there is no cell aggregate, when a sample contains 90% of empty beads, the probability to get beads containing two cells is $p = 4.5 \times 10^{-3}$. When the frequency of the targeted gene/sequence in the population (f) is considered, the probability of having beads containing two cells of which one carries the target is $p = 2f (4.5 \times 10^{-3})$. Assuming this quite low probability whatever the f value/target, but also that environmental cells tend to be aggregated to each other, we only considered for further analyzes samples containing more than 90% of empty beads and for which 85% of non-empty beads carry only one cell. In this case, we assume the probability of having two cells in the same polyacrylamide bead, one of which carrying the targeted gene, can be considered as negligible.

2.3.2. Fusion, Nested and Blocking PCRs and Sequencing

As described by Hultman et al. (2018) with few modifications, fusion PCR amplifications (epicPCR first DNA amplifications) were performed using cells entrapped in polyacrylamide beads as template. Briefly, these PCRs were done using Phusion DNA Polymerase (NEB) with either the GC or HF buffer, and an annealing temperature of 51 $^{\circ}\text{C}$. The resulting amplification products were extracted/purified using the Monarch PCR & DNA Cleanup kit (NEB), eluted in 30 μL of Nuclease-Free Water (Promega), and stored at -20°C . Undiluted or a 10-fold dilution of the fusion PCR products were used as template DNA in either (i) nested PCR amplifications where blocking primers (BPs) were added as originally described by Spencer et al. (2016), in order to prevent random extension of unfused PCR products or, (ii) in “blocking PCRs”. Blocking PCRs have been inspired by the nested PCRs used by Spencer et al. (2016) but they are reactions in which BPs are the only primers used in order to get a full blocking of undesired fusion PCR products before carrying out a subsequent nested PCR. All the nested PCRs were performed with BPs as described by Hultman et al. (2018) with one of the four following BP concentrations: 3.2 μM , 0.32 μM , 0.032 μM or 0 μM (as a control). For the blocking PCRs, the mix used was the same as the one for the nested PCRs, excepting the absence of nested primers. The amplification program of blocking PCRs was the same that the one of nested PCRs depicted by Hultman et al. (2018). Nested PCR products were purified using the Monarch PCR and DNA Cleanup kit (NEB) and sequenced on the Illumina MiSeq 2 \times 250 platform (Genewiz, South Plainfield, NJ, USA). The primers used in this study are listed in Supplementary Table S1.

2.4. 16S rRNA Gene Amplification and Sequencing

The PCR amplifications of the V3-V4 region of the 16S rRNA genes were done on total microbial DNA with the 515F and 806R primers (Table S1) using Phusion polymerase and HF buffer (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The cycling conditions were as follows: initial denaturation at 98 $^{\circ}\text{C}$, followed by 28 cycles at 98 $^{\circ}\text{C}$ for 10 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ for 30 s and 72 $^{\circ}\text{C}$ for 15 s, and a final extension for 5 min at 72 $^{\circ}\text{C}$. The PCR products were pooled, cleaned (Monarch PCR & DNA Cleanup Kit; New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and sequenced on Illumina MiSeq (2 \times 250) (Genewiz, South Plainfield, NJ, USA).

2.5. Sequencing Data Analysis

EpicPCR sequence analyses were mostly performed as described by Hultman et al. (2018). Briefly, reads were joined using Pear [16] with default options, and sequence quality was checked with FastQC [17]. Primers and short reads (<250 bp) were removed before sequences were split into 16S rRNA and SXT/R391 sequences using cutadapt [18]. Unique sequences were identified using USEARCH -fastx_uniques command [19]. OTUs were clustered and

reads were mapped to reference sequences with the USEARCH `-cluster_otus` command with `-minsize 2` parameter. Taxonomic classification of OTUs was done using the USEARCH `-sintax` command, using the `ltp_16s_v123` database with the classifier cutoff = 60. A list of recovered OTUs is given in Supplementary Table S2. OTUs were considered for further analysis and validation when composed of at least 10 reads and detected in either technical or biological duplicates. Statistical analyses were performed using R 3.4.1 [20].

For the standard 16S rDNA metagenomics, reads were joined with Pear [16] using default options, sequence quality was checked with FastQC [17] and primer sequences and short reads (<330 bp) were removed using cutadapt [18]. Unique sequences were identified using USEARCH `-fastx_uniques` command [19]. OTUs were clustered and reads were mapped to reference sequences with the USEARCH `-cluster_otus` command with the `-minsize 2` parameter. Taxonomic classification of OTUs was done using the USEARCH `-sintax` command, using the `ltp_16s_v123` database with the classifier cutoff set at 60. A representative sequence from each bacterial family (constituted of at least 10 reads) was aligned with MUSCLE [21], and a phylogenetic tree was built with FastTree [22] and visualized in iTol [23].

3. Results and Discussion

3.1. Elaboration of Polyacrylamide Beads Carrying Isolated Environmental Cells

Isolating single environmental cells in polyacrylamide beads is mandatory for the good achievement of epicPCR in order to avoid chimeric PCR fusion products between markers originating from distinct bacteria. Here, we describe how we proceeded for creating beads from the water and sediment samples we collected. If this way to proceed could likely be used with other samples presenting the same characteristics and that some of the modifications we proposed to the protocol described by Hultman et al. (2018), such as those presented in Section 2.3.1, then it is likely to be suitable for all new samples that would be investigated; we do not think the approach presented below would be universal. We therefore want here to insist that, from our point of view, the best way to create polyacrylamide beads containing isolated bacteria for epicPCR purposes should have to be re-evaluated at the beginning of each epicPCR-based investigation. In our first series of experiments, polyacrylamide beads containing bacteria were created using microbial communities from water and sediments sampled in the Meurthe River (Malzéville City, France) in September 2019. Before forming polyacrylamide beads, several sonication conditions were tested, varying the duration and the intensity of the treatments, in attempts to disaggregate cells embedded in water suspended particles or sediment particles. The sonication conditions were adapted in order to reach the maximum effect without detectable loss of cell viability as seen by staining cells with the LIVE/DEAD[®] BacLight[™] kit. Unfortunately, numerous particles of sonicated samples, especially from sediments, had size range and fluorescence intensity range comparable to stained cells (data not shown), thus impairing the proper evaluation of cell viability. Such difficulties when using SYBR Green I for staining cells isolated from eutrophic environments are known for a long [24,25] and can result from autofluorescence of minerals or organic matter. In addition, whatever the conditions used, the sonication step allowed disaggregating particles in smaller ones. Although a 35 µm-mesh cell sieve is used to remove aggregates embedded in polyacrylamide after bead polymerization, in a large majority of cases, the use of sonicated samples for bead formation led to the recovery of a higher proportion of beads carrying small aggregates of few cells compared to non-sonicated samples. Considering the average diameter of bacteria around 0.2–2 µm, obtaining beads carrying more than one cell when disaggregating soil or water suspended particles can be expected. Regarding sediment samples, intrinsically highly charged in cell aggregates, isolated cells were tentatively extracted after sonication using an Histodenz density gradient, but the yield obtained never allowed reaching the minimum amount of 1.10^7 cells needed to properly create polyacrylamide beads. By taking these constraints into account, and while improving or experiencing other methods to extract a higher cell concentration from sediments but also from biofilm samples, this

study was conducted focusing on water samples only. To our hand, it appeared that the more appropriate and time saving option for recovering raw water cells dedicated being embedded in polyacrylamide beads was to vigorously vortex the samples, without any sonication step, before collecting cells by centrifugation. Practically speaking, the adequate volume of water sample corresponding to the $1\text{--}2 \times 10^7$ needed cells were vortexed for 2 min 30 in a microtube or a conical tube at maximal speed using a Vortex-Genie[®] 2 mixer, before to be centrifuged at $12,000 \times g$ for 1 min. The quality of all bead batches used for epicPCR amplifications were analyzed by microscopy as described in Section 2.3.1.

3.2. Checking epicPCR Design on Pure Culture

The primers used to target SXT/R391 ICEs have been recently designed to target a conserved gene of these elements, *traB*, by quantitative PCR [9]. Using these primers allows to get robust qPCR amplifications (efficiency: 97.3%; R^2 : 0.999; Quantification limit = Detection limit: 3 copies). Moreover, the sequencing of amplicons obtained with these primers while using environment genomic DNA as template confirmed they only amplified a sequence specific to SXT/R391 ICEs [9]. Therefore, we considered their design to be very good and very likely suitable for being used in epicPCR amplifications. This probable suitable design of the primers for fusion PCRs and nested PCRs as well as blocking reactions targeting SXT/R391 ICEs, was checked on the single strain *E. coli* MG1656::SXT_{MO10}. A suspension containing around 1×10^7 *E. coli* MG1656::SXT_{MO10} cells in water was used in order to prepare polyacrylamide beads carrying isolated cells as described by Hultman et al. (2018). These beads were thereafter used for optimizing the settings of epicPCR reactions targeting SXT/R391 elements. To do so, the annealing temperature was first adjusted to 51 °C according to the primer sequence properties (Supplementary Table S1). The fusion PCR and the subsequent nested PCR amplifications were then performed using the conditions depicted in Spencer et al. (2016), i.e., using the Phusion DNA Polymerase GC buffer, but no PCR product resulting from the fusion of SXT/R391 ICE and 16S rDNA gene fragments could be observed in agarose gel electrophoresis, unless BP were omitted (Figure 1, wells #1 and 2 vs. 4 and 5). This difficult amplification in epicPCR was surprising in regards of the amplification robustness that these primers allow to reach in qPCR [9]. We therefore rather considered replacing the GC buffer by the standard Phusion DNA Polymerase HF buffer because its use allows a lower error rate while incorporating nucleotides. This changing indeed enhanced the final amplicon yield but this one was still not enough to get nested PCR product in sufficient concentration for sequencing (Figure 1, lines #10 and 11). During this experiment, the lack of nested PCR products appeared to be linked to the use of the BPs that were otherwise supposed to prevent random extension of unfused PCR products. Considering the primer design was correct, we hypothesized that, at 3.2 µM, BPs prevent the proper nested PCR to proceed by competing with the complementary strand for annealing. Thus, the PCR fusion design has appeared robust, but the nested PCR inhibition and the weak final amplicon yield inherent to the original method when using the BPs were clearly redhibitory for a next NGS sequencing step. However, as described in Section 3.3, this aspect could be significantly improved with a better and careful usage of BPs during the epicPCR process. Regardless, we definitively think such a validation step of the epicPCR design on pure culture would be interesting to be performed with every new target that would be investigated, especially for adapting the PCR parameters (buffer, annealing temperature...).

3.3. Tuning the Use of BP to Maximize epicPCR Efficiency on Environmental Cells

In a next step, polyacrylamide beads carrying cells from the Meurthe River water were used to address the BP-associated inhibitory effects as reported in Figure 1. Two approaches were considered. In the first one (two steps protocol), the BP concentrations were modulated during the nested PCR whereas, in the second one (three steps protocol), a set of independent “blocking cycles” consisting of 30 extension reactions was added between the fusion and the nested PCR (Figure 2). The idea behind the addition of these independent “blocking cycles” was to allow the BPs to prevent the possibility of forming chimeric amplicons as before, without impairing the subsequent nested PCR by limiting the BPs

side effect. All in all, 3 BP concentrations, 3.2, 0.32 and 0.032 μM , were tested in the nested PCR step whatever the protocol used (two steps or three steps), while BPs were used at 3.2 μM in the blocking cycles of the three steps protocol. The results obtained are presented Figure 3. Here again, the use of the two-steps protocol initially published did not allow getting DNA fragments at the expected size (Figure 3, “epicPCR” arrow). Nevertheless, reducing the concentration of BPs at 0.32 or 0.032 μM , in either two- or three-steps protocols, significantly improved the detection of the expected DNA fragments. In the light of these experiments, we propose a new epicPCR protocol permitting the most efficient blocking reaction together with the best amplicon yield, i.e., the three-steps protocol consisting in a fusion PCR, a blocking PCR with BPs at 3.2 μM followed by a nested PCR run in presence of BPs at 0.32 μM (Figure 3, “epicPCR 2.0” arrow). Here again, we think this modification proposition would be suitable for every new target that would be investigated.

Buffer HF								+	+	+		+	+	+
Buffer GC	+	+	+	+	+	+								
Template	+	+		+	+			+	+			+	+	
BPs				+	+	+						+	+	+

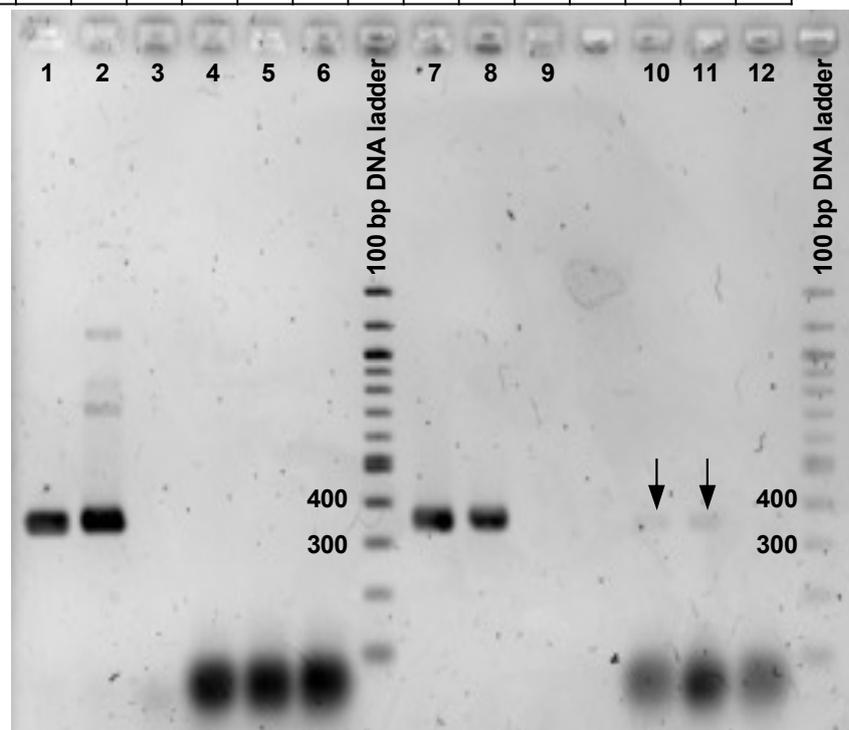
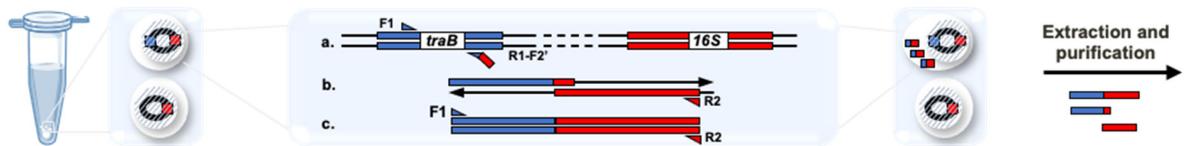
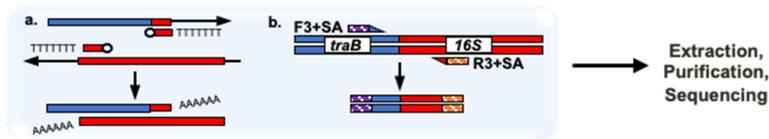


Figure 1. Control epicPCR amplifications targeting SXT/R391 ICEs performed on beads carrying *E. coli* MG1656::SXT_{MO10} as template. Each experiment was done in duplicates with a no-template DNA control, using either the Phusion DNA Polymerase GC or HF buffers. In the nested-PCR step, the use of blocking primers (BPs) has been done as depicted in Spencer et al. (2016), and usually performed so far. All these conditions are summarized in the table upper the gel. The expected size of the desired DNA fragment is 367 bp. Black arrows indicate epicPCR products obtained after performing fusion and nested PCRs using HF but not GC buffer.

A. Common first step: Fusion PCR



B. Second step of the two step method: Nested PCR with blocking primers



C. Second and third steps of the three step method: Blocking PCR then Nested PCR with blocking primers

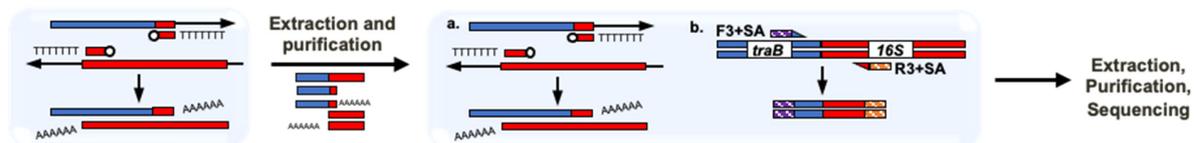


Figure 2. Principle of the two- and three-steps epicPCR protocols implemented. (A) Fusion PCR in polyacrylamide beads. (a) Amplification of the *traB* gene fragment using F1 and R1-F2' primers. The latter is added at limited concentration and will serve as forward primer for (b) the 16S rDNA gene fragment amplification. (c) Finally, F1 and R2 primers amplify the fused product. (B) Nested PCR with blocking primers. (a) Blocking of unfused fusion PCR products using BPs at 3.2 μM, along with (b) a nested PCR on fused products using F3 + SA and R3 + SA primers carrying sequencing adaptors (SA). (C) Blocking PCR then Nested PCR with blocking primers. Unfused products were first blocked using only BPs at 3.2 μM, before performing a PCR where (a) potentially residual unfused products were blocked using blocking primers at 0.32 μM, along with (b) a nested PCR on fused products using F3 + SA and R3 + SA primers.

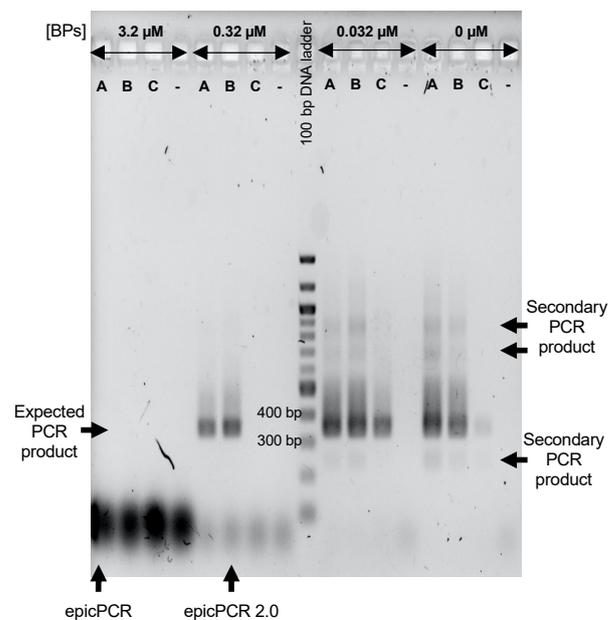


Figure 3. Efficiencies of two- and three-steps epicPCR protocols using different blocking primers (BPs) concentrations. The epicPCRs were run on SXT/R391 carrying bacteria from the Meurthe River water. A and C indicate wells with amplification products from two-steps epicPCR protocols (fusion-PCR on polyacrylamide beads + nested PCR). In the A lane, fusion-PCR products from the first step were used as template DNA in the second step without dilution whereas these products

were diluted ten times in line C to circumvent the possible presence of PCR inhibitors. B indicates wells loaded with amplification products resulting from a three-steps epicPCR protocol (fusion PCR on polyacrylamide beads + blocking PCR with BPs as sole primers + nested PCR). The expected size of the final nested-PCR product is around 350 bp (depending on the 16S rRNA gene fragment polymorphism). The conditions of epicPCR as used in Hultman et al. (2018) and that we determined to be the best in our conditions (epicPCR 2.0) are indicated by black arrows. The minus symbols indicate negative controls with epicPCRs run without polyacrylamide beads-template.

3.4. Exploring the Way to Validate OTUs in epicPCR Experiments

EpicPCR has been developed for the taxonomic assignment of moderately rare functional genes. However, the quite low abundances of SXT/R391 element-carrying bacteria in the environment, ranging from 10^{-3} to 10^{-7} SXT/R391 ICEs/16S rDNA copies [9], led us to reach the limits of this approach. In that respect, we focused our study on the Meurthe River ecosystem as it precisely appeared to be quite rich in SXT/R391 ICEs with relative abundances up to 10^{-3} MGEs/16S rDNA copies [9]. Considering (i) that the prevalence of the SXT/R391 ICEs in river communities could easily be as low as 10^{-6} – 10^{-7} MGEs/16S rRNA gene [9], and (ii) that a single epicPCR experiment hardly involve more than 3×10^6 polyacrylamide beads entrapped-cells, we hypothesized that at only very few cells carrying SXT/R391 elements can be implicated in an epicPCR reaction. In other words, this makes the number of reads, and therefore detectable operational taxonomic units (OTUs), very low, with the risk of missing interesting results if the parameters used for defining OTUs are too stringent. In such case, we had to reevaluate and properly adapt the way usually used to validate each OTU, which means here to identify a bacterial taxon hosting the targeted gene/MGE. In any case, it would be wise and time saving to systematically assess the relative abundance (copies/16S rDNA copies) of the target gene/sequence by qPCR in bacterial populations before each epicPCR experiment for avoiding the study of samples with too rare presence of bacterial hosts of this target gene/sequence of interest.

In the original epicPCR setup [7,8], an OTU was validated when obtained in each of the three technical replicates carried out using a same batch of polyacrylamide beads. Such methodology, now on referred as a “3/3 technical replicates” OTU validation method, was initially proposed to address the possibility of more than one cell becoming embedded in the same bead with only one hosting the target sequence since it would be unlikely to happen twice. However, such validation parameters may appear (i) inappropriate when the target sequence is too rare as its presence in a sub-batch of beads will appear stochastic and (ii) not representative enough of the sample content. To go forward, we considered OTUs obtained from biological replicates, i.e., in epicPCRs performed using different beads batches. The use of biological replicates also makes unlikely the possibility to run twice an epicPCR on a same kind of undesired beads carrying the same two bacterial species. We therefore assumed that the detection of rare OTUs from biological replicates will be at least as robust as the one resulting from technical replicates. This alternative was evaluated by comparing outcomes obtained using the original “3/3 technical replicates” method, to those obtained using “3/3 biological replicates” and “2/3” or “2/2” biological or technical replicates (see Figure 4 for epicPCR replicate strategy). To do so, we determined the significance of detecting a given OTU in all (“3/3” or “2/2”) or most (“2/3”) of the technical and/or biological replicates (Figures 5 and 6). Figure 5 depicts the influence of using a replicate strategy on the number and nature of OTUs that can be detected, while Figure 6 presents the global efficiency of each replicate strategy, i.e., the probability of detecting the maximal number of SXT/R391 hosts, expressed as the cumulative probabilities to detected the OTUs presented in Figure 5.

Of the 128 OTUs detected, 67 were validated as present in at least two replicates (Supplementary Tables S2 and S3). When comparing the way to proceed with duplicates or triplicates, we determined that validating OTUs from technical triplicates is not independent from validating OTUs from technical duplicates (McNemar test, $p = 2 \times 10^{-6}$),

because the considered replicates were performed using the same bead batch (Supplementary Table S3, Figures 5 and 6).

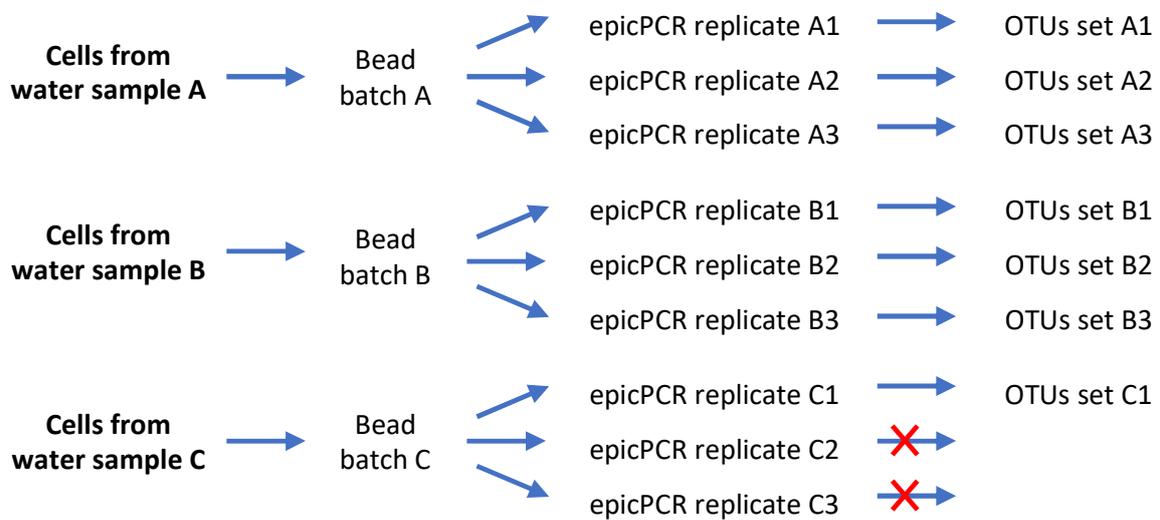


Figure 4. Replicate strategies for taxonomic assignment of SXT/R391 elements in the Meurthe River water by epicPCR. Each bead batch allowed performing the original epicPCR approach using a set of technical replicates that can be considered and analyzed as either triplicates (1 combination) or duplicates (3 combinations if ignoring one of the repeats without statistical a priori). The use of biological replicates implies using OTUs obtained from different bead batches. By doing so, 15 biological duplicates ($3 \times 3 + 3 \times 1 + 3 \times 1 = 15$ combinations) or 9 biological triplicates ($3 \times 3 \times 1 = 9$ combinations) can be considered. Red crosses indicate epicPCR amplifications for which the sequencing of the resulting amplicons did not reach the minimal quality requirement.

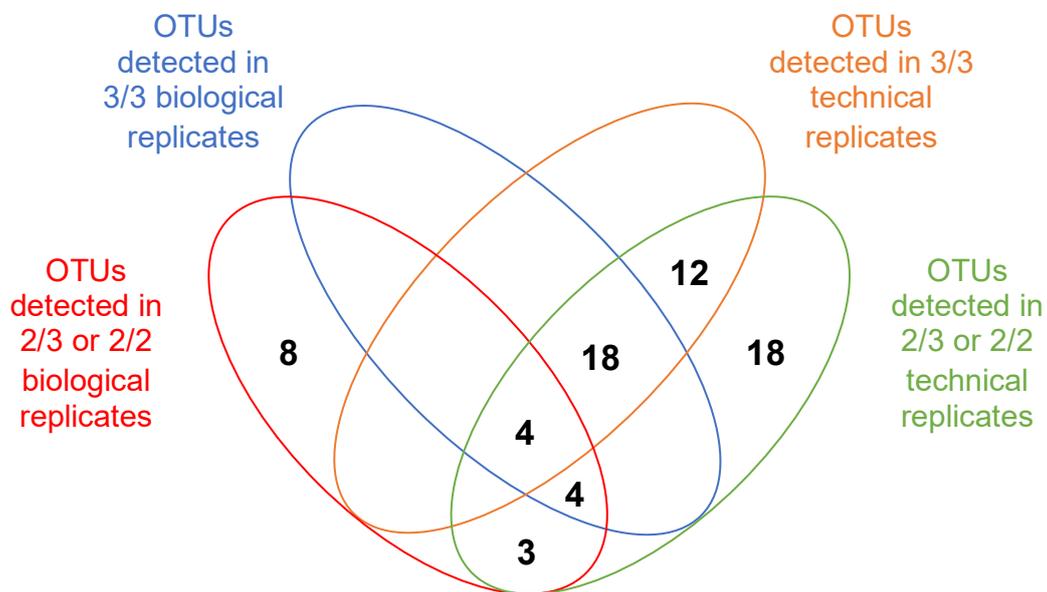


Figure 5. Comparing the influence of the epicPCR replicate strategies on OTU detection. This Venn diagram presents the distribution of the 67 validated OTUs resulting from the taxonomic assignment of SXT/R391 elements in bacteria from the Meurthe River water according to the methodologies used and presented Figure 4 and Supplementary Table S3. The bias toward detecting more OTUs in technical replicates is revealed by the high OTU numbers in the corresponding ellipses.

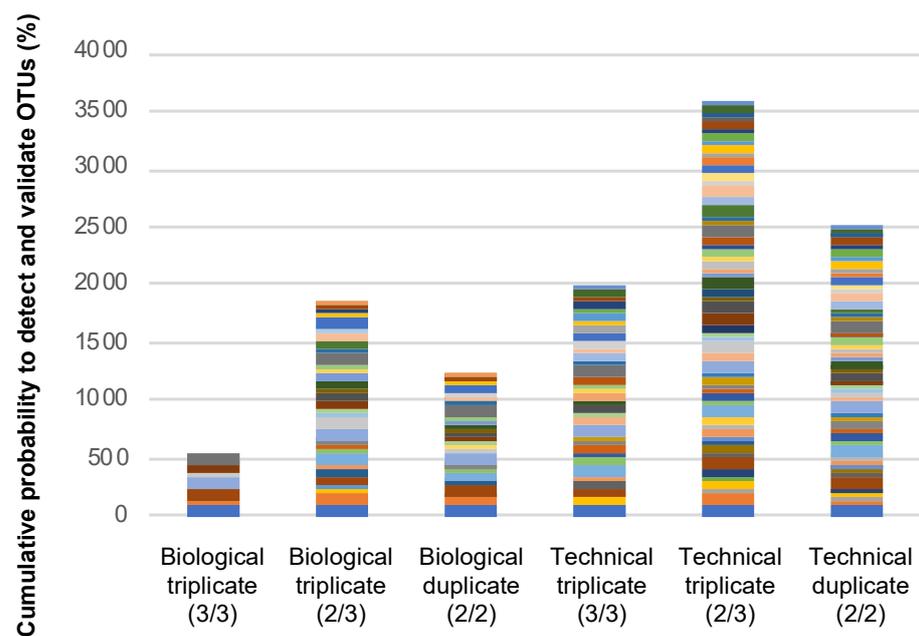


Figure 6. Efficiency of the epicPCR experiment expressed as the cumulative probability to detect OTUs of SXT/R391 hosts from the Meurthe River water. This figure considers each of the 67 validated OTUs mentioned in Figure 5 and Supplementary Tables S2 and S3 using either technical or biological replicates and, according to experimental plan presented in Figure 4. The ratios in brackets indicate the occurrence a given OTU must have between the considered replicates for being validated. Each color/band represents a given OTU.

In other words, detecting an OTU in one of the technical replicates is influenced by the presence of the same OTU in the other replicate(s), thus affecting the final set of validated OTUs. Such a dependence relationship has not been evidenced when biological duplicates and triplicates were performed (McNemar test, $p = 0.27$), meaning that the detected OTUs from a biological replicate does not influence OTUs detection in another replicate. At the same time, the biological replicates approach leads to the validation of fewer OTUs than with the technical replicates approach. On principle, the greater OTUs number obtained and the dependence relationship pinpointed when using technical replicates may result from using beads batches having some non-single cells-containing beads. Nevertheless, considering on the rigorous quality controls we implemented and on the rareness of the targeted genes/elements in the studied bacterial populations, we rather favored the idea that all bead batches created using bacteria originating from the Meurthe River water were probably not enough representative of the gene-of-interest carriers due to the rareness and the non-homogenous distribution of the target sequence in the population. By using different bead batches in biological replicates, we assume that we may not detect the rarer SXT/R391-carrying bacteria that would be present in one bead sample but not in the others, and that could be detected when following the technical replicates approach, i.e., when performing technical replicates using a sample presenting an unexpectedly rich proportion of rare SXT/R391-carrying bacteria. Therefore, even if using the “2/3 biological” and the “3/3 technical” approaches looked similar in terms of probability to detect a maximum number of OTUs (Student’s t test, $p = 0.68$) (Figure 6, Supplementary Table S2), the biological replicates approach offers a better confidence level for the detected OTUs, but it may not allow detecting the rarer SXT/R391-carrying bacteria in the population. Finally, validating OTUs in “2/3” or “2/2” replicates (technical and biological) allowed detecting the same OTU patterns, but the probability of detecting a given OTU is higher with “2/3” replicate approaches (Table S2, Figures 4 and 6).

All in all, with this comparative work, the epicPCR replicate strategy could be ranked with a decreasing level of confidence (LC) as follow: LC5: “3/3 biological” > LC4: “2/3 bio-

logical" = "2/2 biological" > LC3: "3/3 technical" > LC2: "2/3 technical" = "2/2 technical". The lower level of confidence (LC1) corresponds to the 61 of the 128 detected OTUs that have been found in only one replicate, and therefore that likely cannot be validated with an acceptable risk (Supplementary Tables S2 and S3). We recommend these OTU validation methods and corresponding CLs to be used in all future epicPCR-based analyses that will be undertaken.

3.5. Plotting epicPCR Results on a Gold-Standard 16S-rDNA Tree

Whatever their level of confidence, OTUs identified thanks to the epicPCR approach may appear as speculative until they are compared to/pointed on a gold-standard phylogenetic tree resulting from a metagenomic analysis of the bacterial population also used in the epicPCR amplifications. Here, the total genomic DNA of the bacterial population used to prepare the polyacrylamide beads were extracted before the V3–V4 variable regions of the 16S-rRNA gene were PCR amplified and sequenced. Then, a phylogenetic tree was constructed from family-level OTUs following a gold-standard approach and OTUs of SXT/R391 hosts identified by epicPCR were pointed on the obtained tree (Figure 7). Among the 67 validated OTUs in epicPCR, 17 were assigned to an unknown bacterial family and were not further considered. The 50 remaining OTUs belong to 22 bacterial families, with Aeromonadaceae, Chitinophagaceae and Flavobacteriaceae being the more represented ones clustering 4, 4 and 10 OTUs, respectively. Sixteen of these 22 bacterial families were indeed present in the phylogenetic tree (Figure 7) and, some bacteria belonging to one of those 16 families, identified with the best CL of 5, Aeromonadaceae, have already been described as hosting an SXT/R391 ICE [10]. Bacteria from the *Aeromonas* genus (Table S2, OTU12), and therefore belonging to Aeromonadaceae, have notably already been recently identified by our group as SXT/R391 hosts in the Meurthe River ecosystem by another approach [9]. These findings strongly suggest an at least partial validation of the obtained epicPCR results. The six bacterial families validated in epicPCR with a $LC \geq 2$ but that have not been able to be pointed on the phylogenetic tree were those of the Enterobacteriaceae ($LC = 4$), Planococcaceae ($LC = 4$), Shewanellaceae ($LC = 4$), Bacteroidaceae ($LC = 2$) and, Pseudomonadaceae ($LC = 2$). Nevertheless, members of Enterobacteriaceae and Shewanellaceae isolated in culture-based analyses have already been reported as being SXT/R391 hosts. The inability of pointing an epicPCR OTU in the phylogenetic tree thus appears to not necessarily be synonymous of having identified a false host family of the target gene/element. In the same way, the 61 OTUs detected in epicPCR with the lower level of confidence ($LC = 1$) (Table S2) can be clustered in 14 bacterial families of which 2 (Idiomarinaceae, Oceanospirillaceae) are already known to contain SXT/R391 hosts. As for the absence of Enterobacteriaceae and Shewanellaceae in the phylogenetic tree, this last finding strongly suggests that epicPCR, especially the epicPCR 2.0 approach, is a powerful technic that can highlight weakly abundant hosts of the targeted gene/element in the population that other metagenomic approaches could likely hardly identify. Considering the obtained results by the side of the SXT/R391 ICEs, our findings demonstrate that the environmental reservoir of these ICEs in the Meurthe River water is mainly composed by bacterial species not identified so far as SXT/R391 hosts, and that this reservoir does not seem to reflect the range of SXT/R391 hosts that the culture-based approaches up to now implemented, mainly in a clinical context, would lead us to suggest.

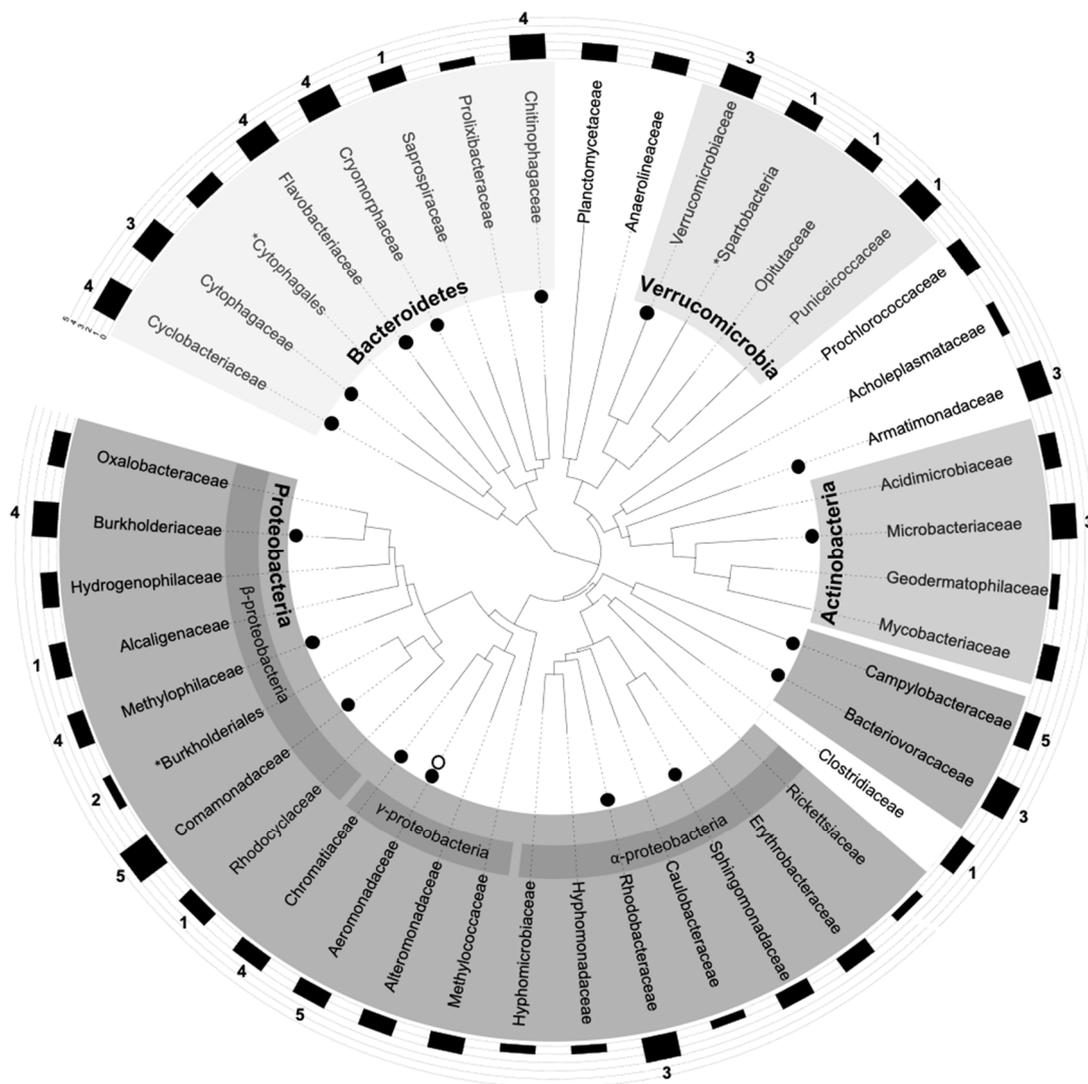


Figure 7. Host range of SXT/R391 ICEs in the Meurthe River water identified by epicPCR. The phylogenetic tree was constructed from family-level OTUs based on 16S rRNA gene amplicon sequences. The confidence levels of the presence of SXT/R391 elements in a bacteria family are indicated by numbers. Open and full black circles indicate taxonomic families where SXT/R391 elements have been previously detected or detected in the present work with a high level of confidence ($LC \geq 3$), respectively. The black rectangles display the relative abundances of 16S rDNA reads for the considered family ($\text{Log}_{10}(\text{sum of OTU reads from a family} / \text{total reads of a sample}) \times 100,000$). Asterisks are for unclassified families and undetermined OTUs are not shown.

3.6. Synthetic Comparison of epicPCR and epicPCR 2.0 Methodologies

The success of the epicPCR approach, especially for the taxonomic assignment of rare targets, is strongly linked to the efficiency in achieving its multiple steps from the molecular part to the subsequent bioinformatic analyses. In this last section, all the differences and improvements compared to the initial method that we implemented in the present work have been summed up for a better overview in Table 1. Whatever the methodologies used and even if new improvements would be made to the modified methodology we propose, some limitations will very likely always remain in epicPCR approaches, such as the difficulties to be sure of the presence of already know targeted gene/sequence-carrying bacteria in the investigated samples to fully validate the results. One possibility we did not initially consider could be to spike the sample to be studied with few cells of a genetically engineered bacterium in which a unique and artificial allele of the targeted gene/sequence would be inserted. For example, we can imagine, in a study focusing on a housekeeping gene, to clone a fragment of the target containing multiple non-sense mutations, that

are unlikely to occur in the environment and easily recognizable during the analyses of the sequencing reads. Identifying such an artificial target in the sole host used to spike the studied samples should definitively validate the quality of the bacteria containing-polyacrylamide beads created and still reinforce the validation of the final sequencing results. Spiking different dilutions/amounts of a genetically engineered bacterium would also advise about the detection limit of the approach in the considered samples. Finally, it should be stressed that the newly proposed epicPCR 2.0 approach does not significantly require more experimental nor analytical time than the initial protocol, while allowing us to get deeper and better characterized results.

Table 1. Comparison of the main characteristics of the initial epicPCR and the improved epicPCR 2.0 approaches.

Characteristics	epicPCR	epicPCR 2.0
Polyacrylamide beads formation	Done once per sample	Done three times in parallel per samples
Beads formation quality check (by microscopy after cell staining)	More than 90% of beads are empty	More than 90% of beads are empty and 85% of non-empty beads only carry one cell
Replicate strategy for performing the fusion-PCR	Triplicated amplification using a single beads batch per sample as template (=technical triplicates)	Single non-replicated amplification performed on each of the 3 beads batches (=biological triplicates)
Fusion-PCR ^{1,2}	Performed with primers F1, R1-F2' and R2 used at 1, 0.01 and 1 μ M, respectively	
Step between the fusion- and the nested-PCRs	None	Additional "blocking PCR" step using the blocking primers at 3.2 μ M alone
Nested-PCR ²	Performed with the primers F3 + SA and R3 + SA at 0.3 μ M and blocking primers at 3.2 μ M	Performed with the primers F3 + SA and R3 + SA at 0.3 μ M and blocking primers at 0.32 μ M
Minimum of reads for creating an OTU in each replicate	100	10
Preferential OTU validation method	OTU detected in each of the 3 technical replicates	OTU detected in each of the 3 biological replicates
Confidence levels for characterizing OTU validation	None	Yes; from 5, the best one, to 1

¹ Sole main step shared by the epicPCR and epicPCR 2.0 approaches. ² Primers are named according to Figure 2.

4. Conclusions

EpicPCR is one of the only techniques available for the taxonomic assignment of relatively rare functional markers in communities, but it remains relatively tricky to implement. With this work, we propose significant improvement of the epicPCR workflow at two main critical levels without burdening the experiments to be done. First, we propose a new workflow to adapt epicPCR conditions, notably by tuning the use of BPs in a blocking cycle that notably increase the amplification yield of the final epicPCR product. Second, we propose an alternative replicate strategy allowing us to increase the level of confidence of the validated OTUs while detecting poorly represented hosts of the marker in microbial communities.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms9081649/s1>, Table S1: List of the primers used in this study, Table S2: List of OTUs detected in the 3 Meurthe River water samples when targeting SXT/R391 carrying bacteria, Table S3: OTU detection according to the epicPCR methodology as presented Figure 4.

Author Contributions: C.M., X.B.: funding acquisition, study design, conceptualization. V.L.R.: investigation, data curation. X.B., V.L.R.: formal analysis, writing the original draft. M.P.J.V.: validation. C.M., M.P.J.V., X.B., V.L.R.: writing—reviewing and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: V.L.R. is a PhD Student funded by a Doctoral Grant from the French Ministry of Higher Education, Research and Innovation and that has been supported by a Short Term Scientific Mission Grant from the Nereus COST Action ES1403. CM and XB have been funded by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (Project “AquaResist,” PNREST Anses, 2018/1/052), the Carnot Institute ICÉEL, and the Zone Atelier Moselle. MV is funded by Academy of Finland.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All 16S rRNA gene sequences have been deposited in GenBank (Bio-Project accession no. PRJNA661996 and PRJNA662024).

Acknowledgments: The authors want to thank J. Hultman and J.T.K. Vääntinen (Department of Microbiology, University of Helsinki), and S. Leclercq (INRAE, Tours) for their advice in sequence data analyses.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Collignon, P.; Beggs, J.J.; Walsh, T.R.; Gandra, S.; Laxminarayan, R. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: A univariate and multivariable analysis. *Lancet Planet. Health* **2018**, *2*, e398–e405. [CrossRef]
2. Partridge, S.R.; Kwong, S.M.; Firth, N.; Jensen, S.O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **2018**, *31*, e00088–17. [CrossRef]
3. Bengtsson-Palme, J.; Larsson, D.J.; Kristiansson, E. Using metagenomics to investigate human and environmental resistomes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 2690–2703. [CrossRef] [PubMed]
4. Guo, J.; Li, J.; Chen, H.; Bond, P.L.; Yuan, Z. Metagenomic analysis reveals wastewater treatment plants as hotspots of antibiotic resistance genes and mobile genetic elements. *Water Res.* **2017**, *123*, 468–478. [CrossRef]
5. Larsson, D.J.; Andreumont, A.; Bengtsson-Palme, J.; Brandt, K.K.; de Roda Husman, A.M.; Fagerstedt, P.; Kvint, K.; Laxminarayan, R.; Manaia, C.M.; Nielsenn, K.M.; et al. Critical knowledge gaps and research needs related to the environmental dimensions of antibiotic resistance. *Environ. Int.* **2018**, *117*, 132–138. [CrossRef]
6. Stalder, T.; Press, M.O.; Sullivan, S.; Liachko, I.; Top, E.M. Linking the resistome and plasmidome to the microbiome. *ISME J.* **2019**, *13*, 2437–2446. [CrossRef]
7. Spencer, S.J.; Tamminen, M.V.; Preheim, S.P.; Guo, M.T.; Briggs, A.W.; Brito, I.L.; Weitz, D.A.; Pitkänen, L.K.; Vigneault, F.; Virta, M.P.J. Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. *ISME J.* **2016**, *10*, 427–436. [CrossRef] [PubMed]
8. Hultman, J.; Tamminen, M.; Pärnänen, K.; Cairns, J.; Karkman, A.; Virta, M.P.J. Host range of antibiotic resistance genes in wastewater treatment plant influent and effluent. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2018**, *94*, fiy038. [CrossRef]
9. Roman, V.L.; Merlin, C.; Baron, S.; Larvor, E.; Ledevendec, L.; Virta, M.P.J.; Bellanger, X. Abundance and environmental host range of the SXT/R391 ICE family of in aquatic microbial communities. *Environ. Pollut.* **2021**, 117673. [CrossRef] [PubMed]
10. Bioteau, A.; Durand, R.; Burrus, V. Redefinition and unification of the SXT/R391 family of integrative and conjugative elements. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*. [CrossRef]
11. Espéli, O.; Moulin, L.; Boccard, F. Transcription attenuation associated with bacterial repetitive extragenic BIME elements. *J. Mol. Biol.* **2001**, *314*, 375–386. [CrossRef]
12. Hochhut, B.; Waldor, M.K. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol. Microbiol.* **1999**, *32*, 99–110. [CrossRef]
13. Federation, W.E.; APH Association. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*; American Public Health Association (APHA): Washington, DC, USA, 2005.
14. Kirschner, A.K.T.; Pleininger, S.; Jakwerth, S.; Rehak, S.; Farnleitner, A.H.; Huhulescu, S.; Indra, A. Application of three different methods to determine the prevalence, the abundance and the environmental drivers of culturable *Vibrio cholerae* in fresh and brackish bathing waters. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 1186–1198. [CrossRef] [PubMed]
15. Boulos, L.; Prevost, M.; Barbeau, B.; Coallier, J.; Desjardins, R. LIVE/DEAD[®] BacLight[™]: Application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. *J. Microbiol. Methods* **1999**, *37*, 77–86. [CrossRef]
16. Zhang, J.; Kobert, K.; Flouri, T.; Stamatakis, A. PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End reAd mergeR. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 614–620. [CrossRef]
17. Andrews, S. FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. 2010. Available online: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 21 October 2020).
18. Martin, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J.* **2011**, *17*, 10–12. [CrossRef]

19. Edgar, R.C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 2460–2461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2017. Available online: <https://www.R-project.org/> (accessed on 23 June 2020).
21. Madeira, F.; Park, Y.M.; Lee, J.; Buso, N.; Gur, T.; Madhusoodanan, N.; Basutkar, P.; Tivey, A.R.N.; Potter, C.S.; Finn, R.D. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W636–W641. [[CrossRef](#)]
22. Price, M.N.; Dehal, P.S.; Arkin, A.P. FastTree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol. Biol. Evol.* **2009**, *26*, 1641–1650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree of Life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, W256–W259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Duhamel, S.; Jacquet, S. Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments. *J. Microbiol. Methods* **2006**, *64*, 316–332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Patel, A.; Noble, R.T.; Steele, J.A.; Schwalbach, M.S.; Hewson, I.; Fuhrman, J.A. Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Identification of antibiotics triggering the dissemination of antibiotic resistance genes by SXT/R391 elements using a dedicated high-throughput whole-cell biosensor assay

Hélène Guilloteau¹, Cédric Pradalier ², Véronica L. Roman¹, Xavier Bellanger ¹, Patrick Billard³ and Christophe Merlin ^{1*}

¹Université de Lorraine, CNRS, LCPME, F-54000, Nancy, France; ²GeorgiaTech Lorraine, CNRS, UMI, 2958 GT-CNRS, F-57070, Metz, France; ³Université de Lorraine, CNRS, LIEC, F-54000, Nancy, France

*Corresponding author. E-mail: Christophe.Merlin@univ-lorraine.fr

Received 9 April 2021; accepted 16 September 2021

Background: Mobile genetic elements (MGEs) are widely involved in the dissemination of antibiotic resistance genes and some of them, such as the integrative and conjugative element SXT, are even induced by specific antibiotics at sub-lethal concentrations.

Objectives: This work explores collateral effects of a broad range of antibiotics on the mobility of the SXT^{MO10} element using a specifically designed high-throughput screening test.

Methods: Twenty-five promoters involved in the mobility of SXT and six artificial constitutive promoters were transcriptionally fused to *luxCDABE* bioluminescent genes and introduced into *Escherichia coli* strains with or without SXT to build whole-cell biosensors for a large-scale screening involving 48 antibiotics. A bioluminescent assay implementing a classical agar diffusion approach was coupled to an automated data processing pipeline developed to extract and analyse luminescence data from over 2000 antibiotic/biosensor combination profiles.

Results: In addition to quinolones previously reported as inducing the expression of SXT mobility genes, we found that specific antibiotics belonging to other classes, such as imipenem and azithromycin, also behave as inducers. The use of a control set of constitutive biosensors also revealed an unexpected intricate relationship between cell respiration and light production that allowed the identification of antibiotics interfering with the respiration process.

Conclusions: The effect of antibiotics goes beyond the interaction with their primary cell targets and may lead to adverse effects such as triggering the dissemination of resistance by MGEs, sometimes in unpredictable ways. Identifying such MGE-triggering antibiotics is of prime importance for better controlling collateral effects during therapy.

Introduction

With a worst-case scenario predicting 10 million annual deaths worldwide by 2050, the fight against antibiotic-resistant pathogens has become one of the biggest challenges faced by mankind.^{1,2} The ever-increasing occurrence of antibiotic-resistant bacteria (ARB) in clinical settings and the environment has long been attributed to an unavoidable aspect of bacterial adaptation to antibiotic exposure that is fuelled by our long misuse and over-use of antibiotics.^{3,4} However, according to recent epidemiological studies, the selective effects of antibiotics are probably not the only driving parameters as the dissemination of ARB and their antibiotic resistance genes (ARGs) may well represent a dominant contributing factor.⁵

The dissemination of ARGs among bacteria is widely attributed to mobile genetic elements (MGEs) that mobilize ARGs within and between bacterial genomes.⁶ MGEs encode their own mobility functions whose expression can be transcriptionally regulated. The induction of MGEs by sub-inhibitory concentrations (sub-MICs) of antibiotics has been reported in a very limited number of element/antibiotic pairs.^{7–11} Although this may partly explain the relationship between antibiotic consumption and occurrence of antibiotic resistance, this phenomenon has not been studied much further because of an evident lack of efficient screening tools to identify effective triggering molecules.

Considering that mobility of MGEs is driven by the expression of their mobility genes, reporting on the expression level of such

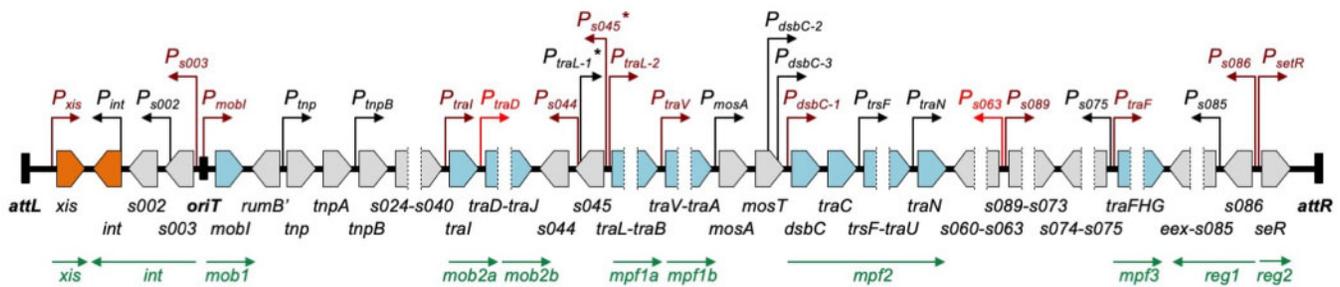


Figure 1. Promoters identified in SXT. Genes are represented by thick arrows, coloured in blue and orange when involved in the conjugation or the integration/excision of SXT, respectively. Arrows interrupted by dotted lines represent operon-like structures delimited by the first and last genes. Small broken arrows above the genes represent promoters predicted (in black) or confirmed in previous reports (in brown).^{15,16,24,25} Red broken arrows indicate predicted promoters that were revealed to be non-functional according to Poulin-Laprade et al.¹⁶ (see Table S1 for details). Operons involved in SXT mobility are indicated by horizontal arrows below the genes as in Poulin-Laprade et al.¹⁶ Asterisks indicate promoters that failed to be cloned. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

genes can provide an indication of MGE activating conditions. Transcriptional fusions between key MGE promoters and reporter genes were used to demonstrate that, for some MGEs, the expression of mobility functions was induced by sub-MICs of antibiotics interfering with DNA metabolism. This is the case for SXT (Figure 1), an integrative and conjugative element (ICE) belonging to a family involved in the dissemination of about 15 different ARGs among *Vibrio* species, and more generally among Proteobacteria.^{12–14} The excision and conjugative transfer of SXT is controlled by the expression of genes belonging to the SetR and SetCD regulons, themselves triggered by the SOS response.^{7,15,16} The use of a transcriptional fusion between the SXT central promoter P_{s086} and the *lacZ* reporter gene could demonstrate the inducibility of SXT mobility genes by genotoxic drugs.⁷ Even if such transcriptional fusions can be used to build whole-cell bacterial biosensors for the identification of antibiotics interfering with the regulation of mobility genes, the approach remains tricky because there is no easy way to anticipate (i) which molecules are potentially active and, if they are, (ii) at which concentrations such molecules should be tested. This can be worked around using the antibiogram-like approach proposed by Davies and co-workers,^{17–19} where antibiotic diffusion gradients are allowed to establish over a lawn of a bioluminescent bacterial biosensor using antibiotic-impregnated discs. Induction of the luminescent biosensor appears then as a glowing circle at a certain distance from the disc corresponding to a given (but unknown) concentration around inducing antibiotic deposits, which can be recorded using a sensitive CCD (charge-coupled device) camera. We successfully used this methodology with an *Enterococcus faecalis* biosensor reporting the activation of Tn916 (an ICE involved in the dissemination of the *tet(M)* gene). We could show that not only sub-MICs of tetracyclines were triggering the transfer of Tn916, but also a dozen antibiotics belonging to distinct classes; therefore, demonstrating that some antibiotics could trigger the transfer of genes conferring resistance to other classes of antibiotics.¹⁹ This finding motivated developing a wider biosensor-based screening approach to identify molecules collaterally triggering the expression of promoters involved in the expression of MGE mobility functions. Although plate diffusion assays save time and allow testing an exhaustive range of concentrations compared with classical liquid culture-based assays, methods for

rapid processing of image data, analysis and compilation of the induction profiles are needed.

In this article, we used the well-known SXT^{MO10} ICE¹⁵ to develop a rapid biosensor-based screening methodology making use of transcriptional fusions between SXT regulated promoters and luciferase genes to identify triggering drugs. A piece of software was designed to automatically extract and process massive luminescence data embedded in CCD pictures resulting from the exhaustive screening of 46 SXT biosensor strains exposed to 48 antibiotics. This methodology allowed the identification of non-quinolone antibiotics never reported so far (to our knowledge) as inducing the mobility of the SXT element. Additionally, the analysis of massive luminescence datasets pointed out unexpected but important physiological artefacts intrinsically linked to the use of luciferase as a reporter. This appeared as resulting from interference between bioluminescence and cell respiration, accounting for false-positive inductions, but also allowing the identification of antibiotics interfering with cell respiration.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains used in this study are described in Table 1. Bacteria were routinely cultured in LB medium (LB Broth Miller, Difco™) supplemented with kanamycin (50 mg/L) for the selection of plasmid pSEVA236 and derivatives when necessary.²³ For solid media, agar was added at 15 mg/mL.

Construction of SXT promoter reporter strains

SXT promoters selected for the construction of transcriptional fusions are listed in Table 2, their position on SXT is depicted in Figure 1 and their annotated sequences are provided in Table S1 (available as Supplementary data at JAC Online). Most SXT promoters were produced by gene synthesis and cloned upstream of the *luxCDABE* genes of plasmid pSEVA236 (Eurofins Genomics, Courtaboeuf, France).²³ For the three SXT promoters P_{traL-2} , P_{traV} and P_{s086} , the gene synthesis approach failed to produce recombinant plasmid with the expected sequence. The sequences were thus PCR amplified from MG1656::SXT DNA and cloned in the same vector using standard procedures (Table S2). In order to construct control bioluminescent reporters, a set of six 35 bp-long constitutive promoters of different known strengths were selected from the iGEM Anderson's catalogue (<http://parts.igem.org/Promoters/Catalog/Anderson>). The promoters were assembled by annealing oligonucleotides and cloned into plasmid pSEVA236. Recombinant

Table 1. Bacterial strains and plasmids

Name	Characteristics	References
<i>E. coli</i> strains		
MG1655	F ⁻ λ ⁻ derivative of <i>E. coli</i> K12	20
MG1656	MG1655 Δ <i>lacMluI</i>	21
CM125	NAL ^R derivative of MG1655	22
CM527	MG1656::SXT (CHL ^R provided by the native SXT ^{MO10})	this study
CM1272	MG1656::SXT* (CHL ^R provided by SXT ^{MO10} and TET ^R resulting from the insertion of <i>tetR-tetA</i> genes in the <i>ISCR2</i> of SXT ^{MO10})	this study
Plasmid		
pSEVA236	pBBR1-based replicon with <i>luxCDABE</i> bioluminescence genes flanked by sets of terminators (KMN ^R)	23

CHL^R, KMN^R and NAL^R, resistance to chloramphenicol, kanamycin and nalidixic acid, respectively.

pSEV236 derivatives were then introduced in the two genetic backgrounds, *Escherichia coli* MG1656 and *E. coli* MG1656::SXT (Table 2). Annotated promoter sequences (Table S1), primer sequences (Table S2) and detailed cloning protocols are available as [Supplementary data](#).

Bioluminescence assays

Bacterial reporter strains were cultured overnight in LB at 30°C under agitation (160 rpm) after which 500 μL was mixed with 5.5 mL of LB and 12 mL of pre-warmed (42°C) soft LB agar (0.7%) and poured onto a 120 × 120 mm LB agar square plate. The soft agar was allowed to solidify for 15 min at room temperature before applying sets of 16 antibiotic-impregnated discs (Bio-Rad Laboratories) arranged in 4 × 4 patterns. Plates were incubated for 7 h at 30°C before recording the emission of luminescence using a CCD camera (NightSHADE LB985, Berthold). Bioluminescence data were further extracted and processed with purposed-built software described in the Bioluminescence data processing pipeline section. Antibiotics are listed in Table 3 and details are provided in the [Supplementary data](#).

Azide bioluminescence extinction assays

Constitutive biosensors derived from *E. coli* MG1656 (with constitutive promoters cloned into plasmid pSEV236) were grown overnight in LB medium at 30°C. Bacterial cells were harvested by centrifugation (3000 rpm, 10 min), and resuspended in fresh LB medium with an OD₆₀₀ adjusted to 0.3. The cell suspension (180 μL) was then distributed in clear-bottom, black microtitre plates (Isoplate-96F, PerkinElmer), filled beforehand with various dilutions of sodium azide to reach a 200 μL final volume. Microplates were maintained at 30°C in a VICTOR3 Multilabel Counter plate reader (PerkinElmer), where light emission and OD₆₀₀ (for normalization) were recorded every 15 min after a 10 s double orbital shaking. All experiments were carried out in triplicate.

Bioluminescence data processing pipeline

The luminescence data encoded in the image files were extracted and processed in a series of sequential steps in the processing pipeline described below (Figure 2).

Pattern detection

Every shot taken by the CCD camera consist of a pair of images: one taken with artificial illumination by a normal camera, in which the discs are visible, and a second one taken without illumination with the high-sensitivity CCD camera (Figure 2b, top right). Given that the geometric relationship between the camera and the plate is constant, the discs are always captured with approximately the same apparent size. A circle detection with a constrained radius range (10–15 pixel) using the Hough transform from OpenCV²⁶ detects most of the discs but may still miss one or detect a disc where there is not one. The plates are placed in the NightShade acquisition chamber by hand, so the position and orientation of the plate needs to be computed from the detected circles. To this end, the first step is to identify the discs belonging to the 4 × 4 pattern and where discs may have been missed. This is achieved with a RANSAC algorithm,²⁷ which identifies the largest group of detected discs consistent with the expected pattern. As long as the correct detections are the majority (which is the case in practice), this stage always recovers the correct position and orientation of the pattern. The discs missed in the first detection stage are then automatically located with a local search in a thresholded image around the expected disc position given the pattern (Figure 2b, top left).

Background reconstruction

Without antibiotic discs, the detected luminescence in a plate mostly depends on the local bacterial cell quantity, which fluctuates because of thickness imperfections in the bacterial mat. Background luminescence was estimated by interpolating it from the observed brightness in areas of the plate that are sufficiently far from the discs to be free of antibiotics. Empirically, we decided to use the half-distance between two discs d_{inter} as a threshold, above which the observed luminescence is the background luminescence. Mathematically, the background brightness is estimated everywhere on the plate by Gaussian Process interpolation,²⁸ assuming the points sufficiently far from the discs are observed and that the other points need to be interpolated. Denoting as F the observed points, the luminescence $L_{bg}(P)$ of a pixel P is computed as a weighted mean of the pixel values in F. The weight $w(P,Q)$ of the influence of a pixel Q, at a distance $d(P,Q)$ of pixel P, is computed using a Gaussian window (the farther apart two points are, the less they should affect each other):

$$w(P, Q) = \exp\left(\frac{-1 d(P, Q)^2}{2 d_{inter}^2}\right)$$

The background luminescence at P is then the weighted average of the luminescence measured for the pixel in F (Figure 2b, bottom right):

$$L_{bg}(P) = \frac{\sum_{Q \in F} L(Q) w(P, Q)}{\sum_{Q \in F} w(P, Q)}$$

Profile construction

All the pixels around a disc are used to build an induction profile, which is an expression of the ratio between the observed luminescence and background luminescence calculated above, as a function of the distance to the centre of the disc (in pixel). This raises two challenges. Firstly, because the set of pixels around a disc is discrete, the induction measurements are only available at a discrete set of distances from the disc (Figure 2b, bottom left). Secondly, because all the pixels around a disc contribute to the measurement of the induction, localized variations are expected. This was considered by representing the induction profile with a Gaussian Process fitted to the measured induction so as to provide both the mean and uncertainty of the induction as a continuous function of the distance to the disc.

Table 2. SXT^{MO10} promoters used for the construction of biosensors

Promoter identification			Sequence comparison ^b		Cloning mode		MG1656 derivatives biosensor strains	
designation	BPROM prediction	mapped promoters (reference)	BPROM/mapping match	BPROM/mapping overlap	sequence synthesis	PCR cloning	without SXT	with SXT
SXT promoters								
P _{xis}	+	16	(-)	+	+		CM696	CM739
P _{int}	+		NA	NA	+		CM716	CM728
P _{s002}	+		NA	NA	+		CM720	(-)
P _{s003}	+	16	(-)	+	+		CM692	CM730
P _{mobI}	+	16	(-)	+	+		CM700	CM726
P _{tnp}	+		NA	NA	+		CM681	(-)
P _{tnpB}	(-)		NA	NA	+		CM718	CM863
P _{traI}	+	16	(-)	+	+		CM678	CM747
P _{traD}	+	16	(-)	(-)	+		CM682	CM741
P _{s044}	(-)	24	(-)	NA	+		CM686	CM736
P _{s045}	+	24	+	+	(-)		ND	ND
P _{traL-1}	+		NA	NA	(-)		ND	ND
P _{traL-2}	(-)	16	(-)	+	(-)	+	CM1284	CM1286
P _{traV}	ND	16	NA	+	NA	+	CM1280	CM1282
P _{mosA}	+		NA	NA	+		CM690	CM734
P _{dsbC-3}	+		NA	NA	+		CM644	CM378
P _{dsbC-2}	+		NA	NA	+		CM640	CM662
P _{dsbC-1}	+	16	(-)	+	+		CM677	CM660
P _{trsF}	+		NA	NA	+		CM656	(-)
P _{traN}	+		NA	NA	+		CM714	CM763
P _{s063}	+	16	(-)	(-)	+		CM673	CM749
P _{s089}	+	16,25	(-)	+	+		CM632	(-)
P _{s075}	+		NA	NA	+		CM671	CM636
P _{traF}	+	16	(-)	+	+		CM537	CM724
P _{s085}	+		NA	NA	+		CM541	CM654
P _{s086}	+	15	+	+	(-)	+	CM994	CM996
P _{setR}	+	15	+	+	+		CM630	CM722
Constitutive promoters^a								
P _{J102} (force 0.86)			NA	NA		+	CM1105	CM1117
P _{J105} (force 0.24)			NA	NA		+	CM1107	CM1119
P _{J107} (force 0.36)			NA	NA		+	CM1109	CM1121
P _{J115} (force 0.15)			NA	NA		+	CM1111	CM1123
P _{J117} (force 0.06)			NA	NA		+	CM1113	CM1118
P _{J118} (force 0.56)			NA	NA		+	CM1115	CM1122

NA, not applicable; ND, not done; +, successful; (-), failed.

^aAnderson promoter collection (<http://parts.igem.org/Promoters/Catalog/Anderson>).

^bDetails related to promoter prediction using BPROM software or previously mapped promoters can be found in [Table S1](#).

Finally, for normalization, the measured luminescence (counts) was converted to CPS (count/s) by dividing by the exposure time.

Statistic collection

Out of the induction profile, the final stage was to identify the maximum induction (position, mean, SD and raw luminescence), the size of the induction peak and the maximum inhibition (position, mean, SD and raw luminescence). These data, with the background luminescence, are then

exported into one line of the final CSV file. For a multi-exposure image, every exposure leads to one individual line in the CSV file.

Database organization

After importing the CSV file into a database, every biosensor/antibiotic pair is associated with at least three replicates, each of which contains an induction profile acquired at three exposure times (1, 10 and 30 s) so as to cover weak- and strong-activity promoters. Because luminescence values have been normalized in CPS, different exposure times can be combined to get

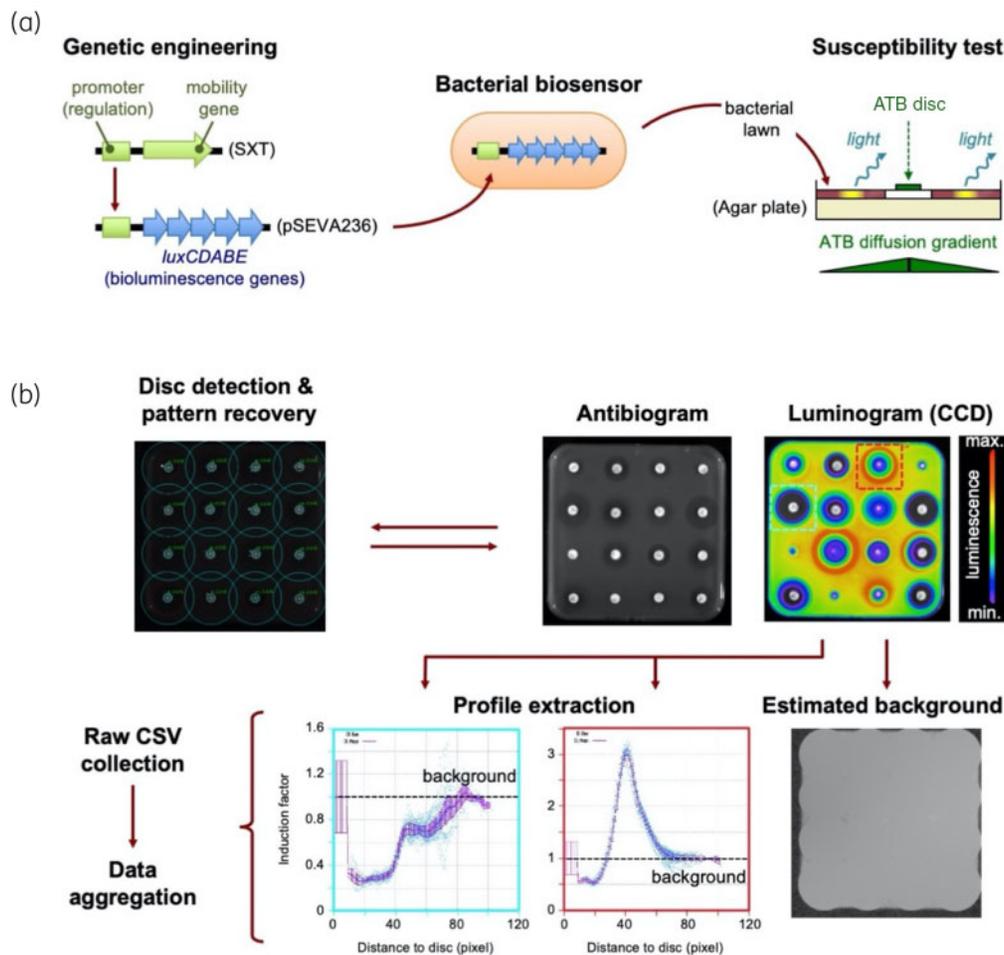


Figure 2. Bioassay for the identification of biosensor/antibiotic responding pairs. (a) Experimental design for exposing engineered luminescent biosensors to diffusion gradients of selected antibiotics. (b) Typical result obtained from the CCD camera and image processing pipeline. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

the final luminescence estimate. Various luminescence limits have been defined (Limit of Detection, Limit of Quantification, Saturation) and the induction values are qualified with these tags when applicable. In some situations, the luminescence maximum is detected next to the disc, because the projection of the disc can locally distort or thicken the bacterial mat around the disc. Where the induction cannot be reliably estimated, induction profiles are tagged accordingly. Based on these tags, every exposure time of every replicate can be qualified with a reliability assessment: reliable luminescence measurements are those that are above the limits of detection or quantification, below saturation and where the induction happens far enough from the disc. For a given replicate, if these conditions cannot be met for all the exposure times, then the replicate is deemed unreliable. If multiple reliable exposures exist, the measurements at 10 s were chosen for the homogeneity of the database. If the 10 s exposure is not reliable, we select first the 1 s exposure and as a last resort the 30 s exposure, because long exposure may lead to higher noise sensitivity. The final luminescence mean and SD are then computed by selecting, for each replicate, the most reliable exposure time. When more than three replicates are available, the first three most reliable ones are selected. The final mean and SD are finally tagged with the worst reliability of the three replicates.

SXT conjugation assays

The conjugative transfer of SXT was evaluated using filter-mating tests between the *E. coli* donor strain CM1272 (i.e. MG1656::SXT⁺) and the recipient strain CM125 (a spontaneous nalidixic acid-resistant derivative of *E. coli* MG1655²²). After overnight culture in LB at 30°C under agitation (160 rpm), donor and recipient were diluted (1:10) in fresh broth and cultures were incubated at 30°C for 3 h, without agitation, and with different concentrations of antibiotics for the donor. Cultures were then washed by centrifugation (3000 g, 5 min) with pre-warmed LB and approximately 10⁹ cells of each strain were mixed, filtered on a 0.45 µm pore size cellulose nitrate filter (Sartorius, Germany), then the filters were placed on LB agar plates and incubated for two more hours at 30°C. Bacteria were then dispersed and serially diluted in LB before being spread on LB agar plates with the appropriate antibiotic selection: chloramphenicol (20 mg/L), nalidixic acid (20 mg/L) or both, for the enumeration of donor bacteria (CHL^R), recipient (NAL^R) and transconjugant (CHL^R, NAL^R), respectively. Colony counts were carried out after 24 h at 37°C, and SXT transfer frequency was calculated as the transconjugant count to donor count ratio. The statistical significance of the antibiotic effect on the transfer of SXT was assessed using an ANOVA test (significance level set at 0.05), while the identification of a significant dose-response effect for each concentration tested

was provided by a Tukey–Kramer HSD *post hoc* test (with a statistical significance level of 0.05 and 95% CI).

Results and discussion

Screening antibiotics for induction of SXT promoters

Sequence analysis of SXT^{MO10} together with a literature search identified 27 putative or known promoters controlling the expression of SXT functions for recombination, transfer, or stability. For 25 of them, the corresponding promoter regions were transcriptionally fused to *luxCDABE* bioluminescence genes by cloning into the pSEVA236 vector. The 25 reporter fusions obtained were introduced into the two closely related genetic backgrounds, *E. coli* strains MG1656 and MG1656::SXT, so as to consider the effect of the SXT element on the regulation of its own promoters (Table 2). At this stage, the two promoters P_{S045} and P_{traL-1} could not be cloned despite several attempts, the two promoters P_{traD} and P_{S063} appeared to be uncomplete according to Poulin-Laprade et al.¹⁶ (Table S1) and strain MG1656::SXT systematically failed to be transformed with four of the reporter fusions (namely fusion with P_{S002}, P_{tnp}, P_{trSF} and P_{S089}), highlighting the significant role played by the genetic background of the bacterial host, as overexpression of luciferase from unregulated promoters may be toxic.

The 46 SXT biosensor strains constructed were individually exposed to a set of 48 molecules covering most classes of antibiotics. To avoid testing arbitrarily chosen antibiotic concentrations, exposure to antibiotic concentration gradients was performed using a plate diffusion assay to produce ‘lumino-grams’, where inducing antibiotics leads to concentric inductions of luminescence at a specific distance from the loaded discs (Figure 2). All in all, this approach generated 2208 response profiles. Beyond the visual analysis of the bioluminescence images, robust data processing was required to handle quantitative data for in-depth analyses of the antibiotic effect. This was achieved by developing an automated image processing pipeline as follows (Figure 2b): first, the 4 × 4 pattern of discs was detected; second, the CCD image was analysed to reconstruct the background luminescence; third, the luminescence and induction profile was extracted; and fourth, the profile statistics were exported to a CSV file. The concatenated set of CSV files was then processed in a database to group replicates, select appropriate exposure periods and label profiles based on the measurement reliability. The retained data were then further processed to provide mean, SD of background luminescence as well as the induction level for each antibiotics/biosensor pair. On average, our pipeline processes the images of a plate in less than 2 s on a mid-grade PC. Once collected, all the induction profiles could be organized, represented and compared at a glance. As displayed in Figure 3, it already appeared that antibiotics such as those targeting the bacterial cell wall or the cell membranes did not alter the expression of the selected SXT promoters, while some of the antibiotics targeting the ribosome or the DNA/RNA metabolism seemed to interfere with the normal expression of some SXT promoters.

Non-specific luminescence induction in lux biosensors

The detailed analyses of the induction profiles obtained above confirmed the expected inductions of the SXT promoters

belonging to the SetCD and SetR regulons when exposed to sub-MICs of antibiotics triggering the SOS response (e.g. ciprofloxacin, Figure 4d and Figure S1). Surprisingly, some antibiotics such as rifampicin seemed to induce luminescence for most of the SXT promoters (Figure 4c), suggesting non-specific biosensor responses. This was further investigated by studying the effect of the 48 antibiotics on the expression of the *luxCDABE* genes fused to six constitutive promoters of different strengths, and introduced into *E. coli* strains MG1656 and MG1656::SXT. Depending on the antibiotics, the luminescence profiles fell into three categories (Figure 4a–c): (i) no antibiotic effect, (ii) a same bioluminescence induction for all the promoters, and (iii) a bioluminescence induction that was inversely proportional to the promoter strength. Considering that the promoters were constitutive, we hypothesized that any antibiotic-dependent induction of the bioluminescence should result from an interference with either the global level of promoter expression in the cell or simply with the bioluminescence biochemistry, or both. Although difficult to demonstrate, but already reported for some antibiotics,²⁹ the first case scenario could result from an alteration of DNA supercoiling, leading to a global increase of the promoter activities that should appear independent from the promoter strength. In this case, the induced levels observed align parallel to the median in the graphic induction profiles (Figure 4b). With its promoter strength-dependent bioluminescence induction, the second case scenario suggests a link with the level of luciferase produced. Here, we hypothesized that the luciferase enters in competition with the respiratory chain for the electron substrates (NADH, H⁺/NADPH, H⁺) delivered by the central metabolism, which is in agreement with the role of ‘dissipating valve’ attributed to the luciferase by Bourgois et al.³⁰ Any limitation of the electron flow in the respiratory chain should make more electron substrates available for the luciferase, and thus increase its specific bioluminescence activity. This increase should then be all the stronger when the level of luciferase is low (weak promoter) because the electron flux redirected toward the luciferase would be proportionally bigger (Figure 5). This hypothesis was verified by exposing the six constitutive biosensors derived from *E. coli* MG1656 to dilution series of sodium azide, a known inhibitor of the respiratory chain.³¹ When the bioluminescence is recorded immediately after azide addition (*t* = 0), the same typical bioluminescence extinction curve is obtained for all the constitutive biosensors. Shortly after, the luminescence starts to increase for azide concentration close to the NOEC (No Observed Effect Concentration) (Figure 5a). As anticipated, the highest increases were observed for the constitutive promoters exhibiting the lower strength.

All in all, these observations tell us that using together a set of constitutive biosensors of different promoter strengths is of prime importance to set the baseline above which an induction can be considered as promoter dependent. Second, it also provides a means to report on antibiotic molecules interfering with the respiratory chain even though they are known to have alternative cellular targets. Antibiotics exhibiting such an interference with the respiratory chain are not restricted to a given antibiotic class, which further indicates a possible side effect rather than a consequence of interacting with a primary target (Figure S1 and Table 3).

Table 3. Antibiotic collateral effects

Antibiotics and targets	SXT induction ^a	Global promoter expression ^b	Respiration interference ^c
Cell wall targeting antibiotics			
amoxicillin	-	-	-
ampicillin	-	-	-
aztreonam	-	-	-
carbenicillin	-	-	-
cefalexin	-	-	-
cefepime	-	-	-
cefixime	-	-	-
cefotaxime	-	-	-
cefotetan	-	-	-
cefoxitin	-	-	-
ceftaroline	-	-	-
ceftriaxone	-	-	-
fosfomicin	-	-	-
imipenem	+	-	-
meropenem	-	-	-
penicillin	-	-	+
piperacillin	-	-	-
teicoplanin	-	+	-
ticarcillin	-	-	+/-
vancomycin	-	+	-
Cell membrane targeting antibiotics			
bacitracin	-	-	-
colistin	+/-	-	-
polymyxin	-	-	-
Protein synthesis targeting antibiotics			
azithromycin	+	-	+
chloramphenicol	-	+/-	-
clindamycin	-	+	-
doxycycline	-	-	+
erythromycin	-	-	+
fusidic acid	-	-	+/-
gentamicin	-	-	-
kanamycin	-	+	+/-
linezolid	-	-	+
mupirocin	-	-	-
pristinamycin	-	+	+/-
tetracycline	-	+	-
tigecycline	-	-	-
tobramycin	-	-	-
RNA polymerase targeting antibiotics			
rifampicin	-	-	++
DNA metabolism targeting antibiotics			
ciprofloxacin	++	-	+
metronidazole	+	+	-
nalidixic acid	++	-	+
nitrofurantoin	-	-	+/-
nitroxolin	-	-	-
norfloxacin	++	-	+
oxolinic acid	++	-	+
pipemidic acid	++	-	+
sulphonamides	-	-	-
trimethoprim	-	-	+

^aSXT induction corresponding to a clear increase of expression for promoters belonging to the SetR/SetCD regulons.

^bCorresponds to the global increase of promoter expression whatever the promoter considered.

^cCorresponds to a luminescence induction that is promoter strength-dependent. The corresponding induction profiles are detailed in [Figure S1](#).

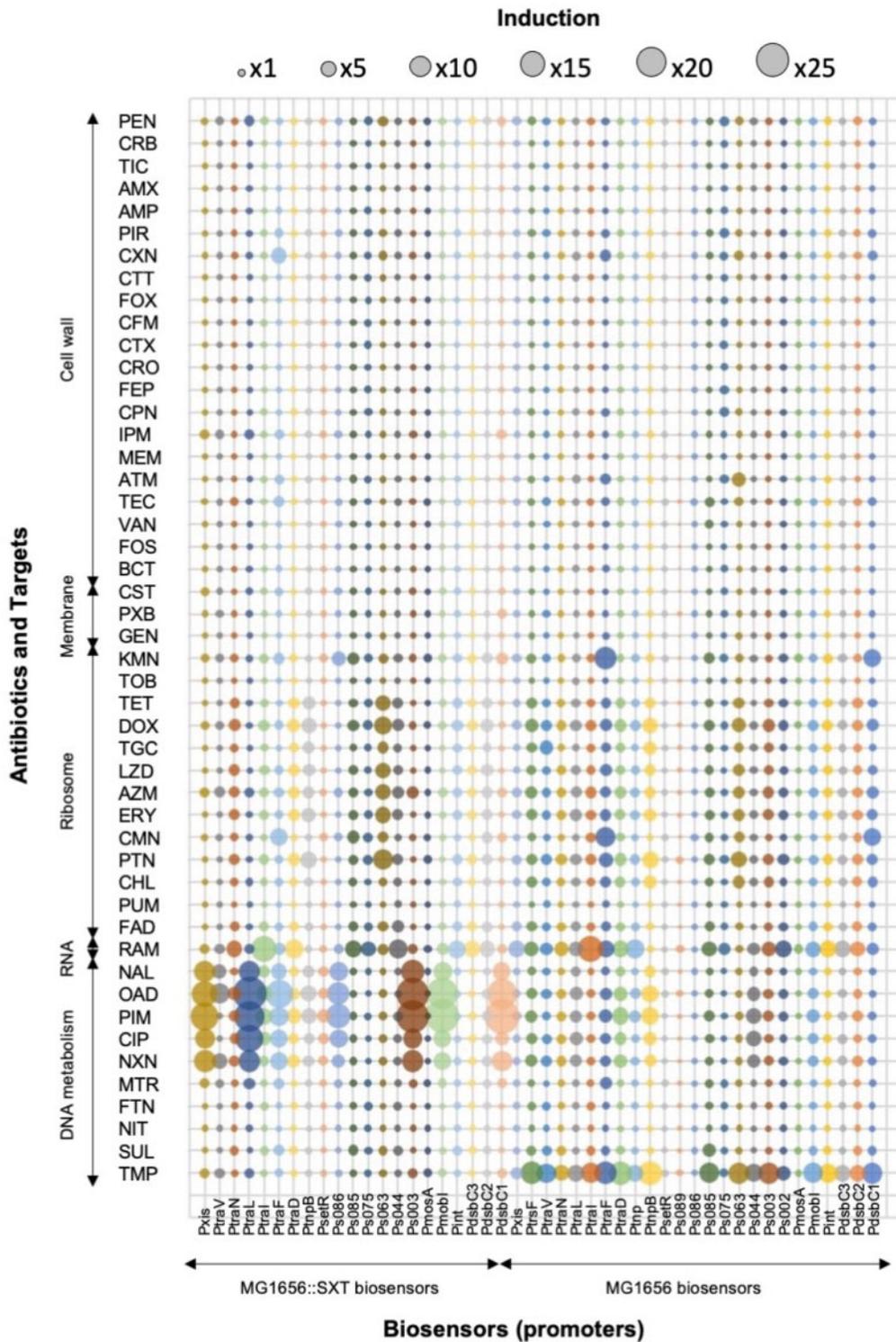


Figure 3. Combined luminescent induction profiles for 46 SXT biosensors exposed to 48 antibiotics (antibiotic abbreviations and disc loads are provided in the [Supplementary data](#)). This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the print version of JAC.

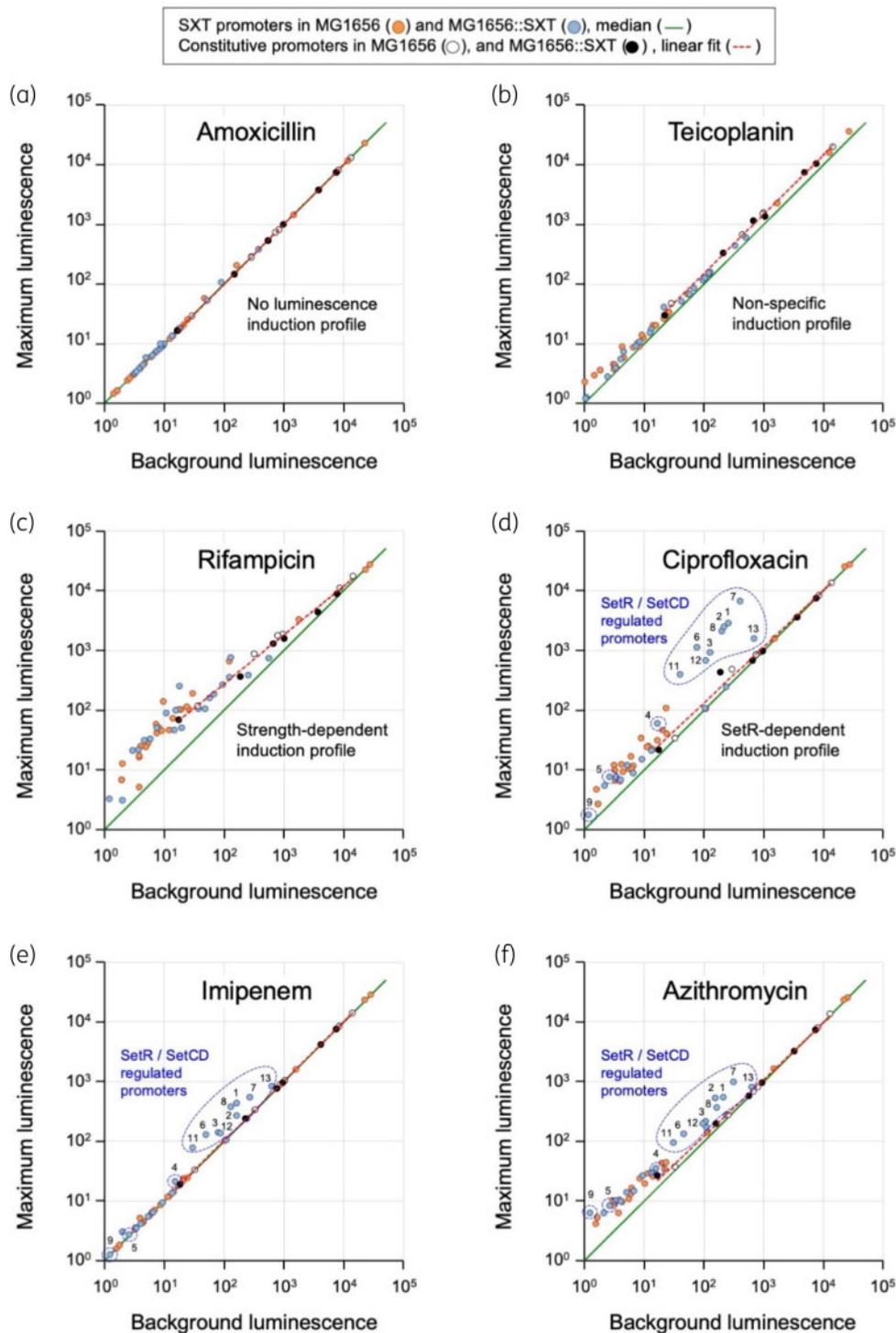


Figure 4. Typical antibiotic-dependent variability of the bioluminescence induction profiles. (a) No induction as seen with amoxicillin. (b) Global luminescence shift as seen with teicoplanin. (c) Promoter strength-dependent induction of luminescence as observed with rifampicin. (d) Typical SetR-dependent induction of the promoters belonging to the SetCD and SetR regulons by quinolones, as shown for ciprofloxacin. (e, f) Unexpected induction of SetCD and SetR regulons by the non-quinolone antibiotics imipenem and azithromycin. Numbered data points indicate biosensors for SetCD/SetR regulated promoters [1, P_{xis} ; 2, P_{s003} ; 3, P_{mob1} ; 4, P_{tra1} ; 5, P_{traD} (non-functional, see Table S1); 6, P_{traL-2} ; 7, P_{traV} ; 8, P_{dsbc-1} ; 9, P_{s063} (non-functional, see Table S1); 10, P_{s089} ; 11, P_{traF} ; 12, P_{s086} ; 13, P_{setR}]. Each data point represents the mean luminescence values of triplicate experiments for a given biosensor strain. For clarity, SDs are not represented here but can be found in the complete set of induction profiles for all antibiotics in Figure S1. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

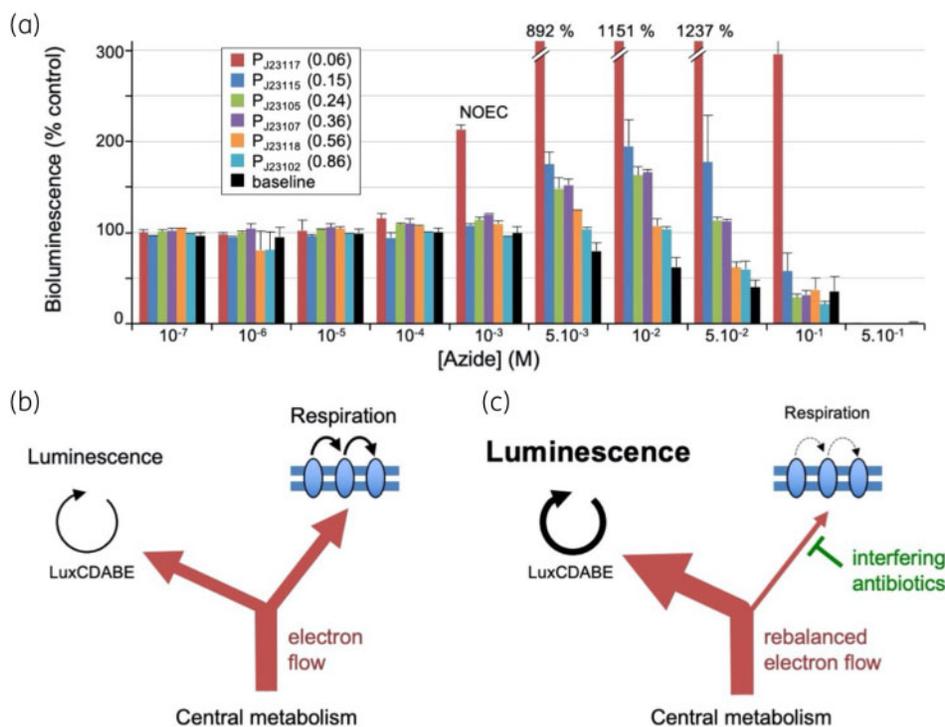


Figure 5. Interference between luminescence and respiration. (a) Bioluminescence extinction assays with increasing concentration of sodium azide after 1 h exposure. Each colour bar indicates a different biosensor with a different constitutive promoter whose relative strength is in parentheses (from 0.06 to 0.86). Close to NOEC, azide induces luminescence with a level of induction that is stronger as the promoter is weaker. The baseline was obtained at $t = 0$ before azide had time to exert any effect other than respiratory inhibition. Each data point represents the mean luminescence values of duplicated experiments [error bars represent the maximum deviation from the mean ($n = 2$), while for the baseline the error bars represent the SD ($n = 10$)]. This figure appears in colour in the online version of *JAC* and in black and white in the print version of *JAC*.

Identification of non-quinolone antibiotics triggering SXT mobility

Knowing the way each of the 48 antibiotics tested alters background levels of luminescence, the analysis of the induction profiles of the SXT promoters could finally proceed to identify antibiotics triggering the mobility of the element. As expected, nalidixic acid, oxolinic acid, piperidic acid, ciprofloxacin and norfloxacin, all quinolones, induced a luminescence in reporter strains harbouring (i) functional SetR/SetCD-regulated promoters and (ii) a SXT in the chromosome to provide regulatory genes (Figure 4 and Figure S1). Interestingly, a similar induction pattern was observed for imipenem, colistin and azithromycin, three antibiotics of different classes that do not target the DNA metabolism and that have never been described as inducing an SOS response in *E. coli*. This was further investigated phenotypically by assessing the effect of two antibiotics on the conjugative transfer of SXT. Conjugative transfer was assayed after pre-incubating the SXT donor strain with sub-MICs of imipenem and azithromycin, and ciprofloxacin as control inducer. As expected, the ciprofloxacin control showed a significant increase (ANOVA test, $P = 7.4 \times 10^{-5}$) in SXT transfer frequency (430 \times) at concentration approaching the MIC (Figure 6). The elevated transfer frequency was maintained at concentration slightly above the MIC (MIC \times 12) despite a marked toxicity of the antibiotic (approximately four orders of magnitude

loss of donor cells). Azithromycin had no significant effect on SXT transfer (Figure 6a, ANOVA test, $P = 0.21$). In contrast, imipenem appeared to induce SXT transfer moderately (17 \times) but significantly (ANOVA test, $P = 2 \times 10^{-5}$) at concentrations slightly above the MIC (Figure 6b), even though cell lysis was noticed from MIC \times 5.

Conclusions

By developing a fast data processing tool, we could manage a large-scale screening study for the identification of antibiotics promoting collateral effects. The first outcome, rather surprising, was the non-specific induction of luminescence associated with some antibiotics that seems to be linked to the status of the respiratory chain (Table 3). On the one hand, this points out the importance of including proper controls in *lux*-based luminescence assays, using *lux* fusions with constitutive promoters exhibiting a strength close to that of the promoters studied. On the other hand, such constitutive biosensors also happened to be an interesting tool to highlight antibiotics affecting the respiratory electron flow as an alternative target. A second outcome was the identification a non-quinolone antibiotic, imipenem, which could induce the transfer of SXT while other carbapenems do not, showing that the collateral effects of antibiotics cannot simply be associated to a given antibiotic class and should be evaluated on a case-by-case basis.

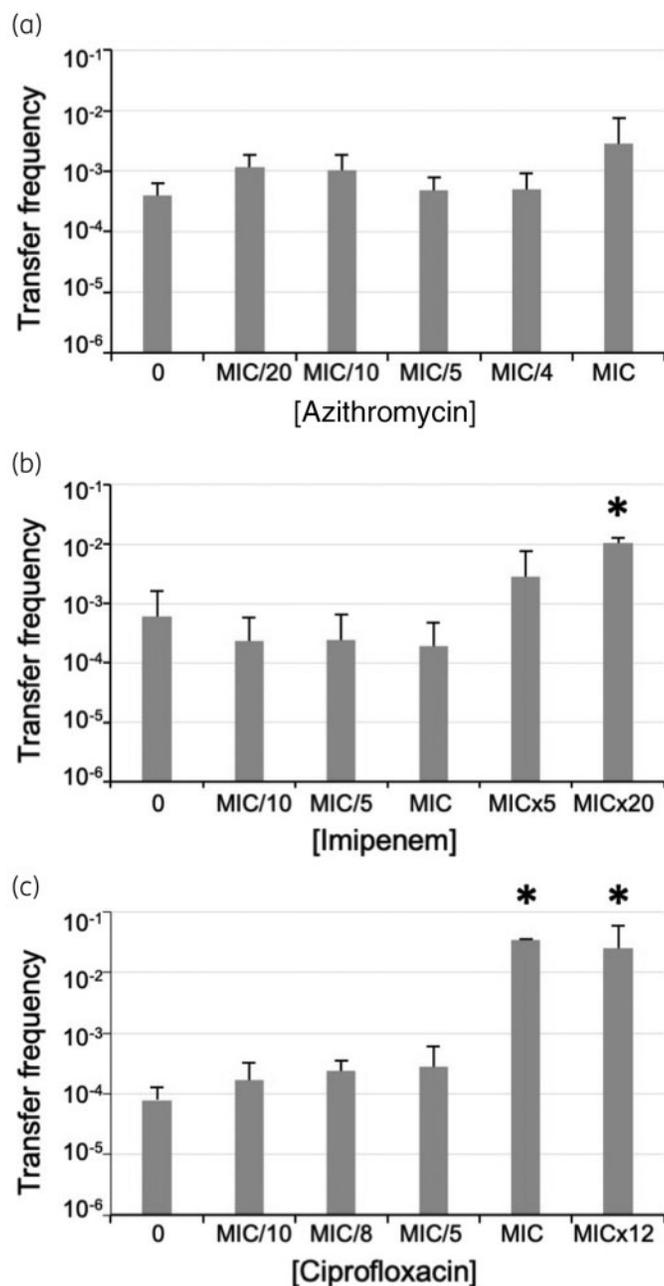


Figure 6. Induction of SXT transfer by (a) azithromycin, (b) imipenem and (c) ciprofloxacin. Transfer frequencies are given as transconjugant to donor ratio. Error bars indicated SD for $n=3$. Antibiotic concentrations are given relative to MIC (20 mg/L for azithromycin, 0.5 mg/L for imipenem and 40 mg/L for ciprofloxacin). An asterisk indicates concentrations for which a significant change of the transfer frequency was observed compared with control (Tukey–Kramer HSD *post hoc* test, P value <0.05 and 95% CI).

Considering the need to improve antibiotic usage, it might be wise to characterize antibiotic collateral effects on a panel of bacterial functions relevant to human and animal health, including antibiotic resistance gene transfer, pathogenesis or virulence. Antibiotics or even other drugs with identified collateral effects on

bacterial functions posing a risk for health, may then fall into a category of restricted and controlled drug use.

Acknowledgements

We wish to thank Mélanie Monteiro and H el ene Scornec for their contribution.

Funding

This work was supported by the French National Agency for Research (ANR project ‘ReguloMobile’, no. ANR-13-ADAP-0009) and the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (Project ‘AquaResist’, PNREST Anses, 2018/1/052). Additional support was obtained from the LTSER-France and the Lorraine Region through the research network of Zone Atelier Moselle (ZAM), and the Institut Carnot ICEEL.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Supplementary data, including Tables S1 and S2 and Figure S1 are available as Supplementary data at JAC Online.

References

- de Kraker ME, Stewardson AJ, Harbarth S. Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050? *PLoS Med* 2016; **13**: e1002184.
- O’Neill J. Tackling Drug-Resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations. 2016. https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf.
- Courvalin P. Antimicrobial drug resistance: prediction is very difficult, especially about the future. *Emerg Infect Dis* 2005; **11**: 1503–6.
- Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* 2006; **4**: 36–45.
- Collignon P, Beggs JJ, Walsh TR *et al*. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. *Lancet Planet Health* 2018; **2**: e398–405.
- Partridge SR, Kwong SM, Firth N *et al*. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 2018; **31**: e00088–17.
- Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 2004; **427**: 72–4.
- Bellanger X, Roberts AP, Morel C *et al*. Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICES_{t1} and ICES_{t3} from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 2009; **191**: 2764–75.
- Salyers AA, Shoemaker NB, Li LY. In the driver’s seat: the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize. *J Bacteriol* 1995; **177**: 5727–31.
- Shaw JH, Clewell DB. Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*. *J Bacteriol* 1985; **164**: 782–96.
- Su YA, He P, Clewell DB. Characterization of the *tet(M)* determinant of Tn916: evidence for regulation by transcription attenuation. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; **36**: 769–78.

- 12** Bioteau A, Durand R, Burrus V. Redefinition and unification of the SXT/R391 family of Integrative and conjugative elements. *Appl Environ Microbiol* 2018; **84**: e00485-18.
- 13** Roman VL, Merlin C, Baron S et al. Abundance and environmental host range of the SXT/R391 ICEs in aquatic environmental communities. *Environ Pollut* 2021; **288**: 117673.
- 14** Garriss G, Burrus V. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family. In: Roberts AP, Mullany P, eds. *Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements*. Landes Bioscience, 2013: 217–34.
- 15** Beaver JW, Waldor MK. Identification of operators and promoters that control SXT conjugative transfer. *J Bacteriol* 2004; **186**: 5945–9.
- 16** Poulin-Laprade D, Carraro N, Burrus V. The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids. *Front Microbiol* 2015; **6**: 837.
- 17** Goh EB, Yim G, Tsui W et al. Transcriptional modulation of bacterial gene expression by subinhibitory concentrations of antibiotics. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 17025–30.
- 18** Tsui WHW, Yim G, Wang HH et al. Dual effects of MLS antibiotics: transcriptional modulation and interactions on the ribosome. *Chem Biol* 2004; **11**: 1307–16.
- 19** Scornec H, Bellanger X, Guilloteau H et al. Inducibility of Tn916 conjugative transfer in *Enterococcus faecalis* by subinhibitory concentrations of ribosome-targeting antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2017; **72**: 2722–8.
- 20** Blattner FR, Plunkett G 3rd, Bloch CA et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 1997; **277**: 1453–74.
- 21** Espéli O, Moulin L, Boccard F. Transcription attenuation associated with bacterial repetitive extragenic BIME elements. *J Mol Biol* 2001; **314**: 375–86.
- 22** Bellanger X, Guilloteau H, Bonot S et al. Demonstrating plasmid-based horizontal gene transfer in complex environmental matrices: a practical approach for a critical review. *Sci Total Environ* 2014; **493**: 872–82.
- 23** Silva-Rocha R, Martínez-García E, Calles B et al. The Standard European Vector Architecture (SEVA): a coherent platform for the analysis and deployment of complex prokaryotic phenotypes. *Nucleic Acids Res* 2013; **41**: D666–75.
- 24** Dziejewicz L, Jazurek M, Drewniak L et al. The SXT conjugative element and linear prophage N15 encode toxin-antitoxin-stabilizing systems homologous to the *tad-ata* module of the *Paracoccus aminophilus* plasmid pAMI2. *J Bacteriol* 2007; **189**: 1983–97.
- 25** Garriss G, Poulin-Laprade D, Burrus V. DNA-damaging agents induce the RecA-independent homologous recombination functions of Integrating Conjugative Elements of the SXT/R391 family. *J Bacteriol* 2013; **195**: 1991–2003.
- 26** Bradski G. The OpenCV Library. *Dr. Dobbs's Journal of Software Tools* 2000; **120**: 122–5. <https://www.drdobbs.com/open-source/the-opencv-library/184404319>.
- 27** Fischler MA, Bolles RC. Random sample consensus: a paradigm for model fitting with applications to image analysis and automated cartography. *Commun ACM* 1981; **24**: 381–95.
- 28** Stein ML. *Interpolation of Spatial Data: Some Theory for Kriging*. Springer Science & Business Media, 2012.
- 29** Martis SB, Forquet R, Reverchon S et al. DNA supercoiling: an ancestral regulator of gene expression in pathogenic bacteria? *Comput Struct Biotechnol J* 2019; **17**: 1047–55.
- 30** Bourgois JJ, Sluse FE, Baguet F et al. Kinetics of light emission and oxygen consumption by bioluminescent bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 2001; **33**: 353–63.
- 31** Kita K, Konishi K, Anraku Y. Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. *J Biol Chem* 1984; **259**: 3368–74.

RÉSUMÉ VULGARISÉ / LAY SUMMARY

(FR)

L'antibiorésistance est un problème de santé publique majeur. En 2016, un rapport sur la résistance aux antibiotiques a estimé qu'il y avait près de 700 000 morts par an liées à la résistance aux antibiotiques dans le monde. Des projections estiment qu'en 2050, ce chiffre atteindra près de 10 millions de morts en absence de nouvelles mesures pour limiter l'émergence et la propagation de résistances entre Hommes et animaux via notre environnement (O'Neill, 2016).

Dans ce travail, nous avons identifié les bactéries d'origine humaine ou environnementale susceptibles de participer au transfert de gènes d'antibiorésistance véhiculés par une famille d'éléments appelés SXT/R391. Nous avons également identifié quelques antibiotiques stimulant, ou non, la dissémination de ces éléments en fonction de la nature la bactérie hôte. Enfin, nous avons étudié leur tendance à se transférer dans des conditions se rapprochant au plus près des conditions environnementales.

Mots clés : Antibiorésistance, Transfert de gènes, ICE SXT/R391

(EN)

Antibiotic resistance is a major global health issue. In 2016, a report on antibiotic resistance estimated that at least 700,000 deaths per year, and worldwide, were linked to antibiotic resistance. Projections indicate that by 2050, the number of deaths could reach 10 million per year in the absence of new measures to control the emergence and the spread of antibiotic resistances (O'Neill, 2016).

In this study, we determined the bacterial host range of the integrative conjugative elements (or ICEs) from the SXT/R391 family by qPCR from environmental strain collections, then from two aquatic environments using an epicPCR approach. We also identified some antibiotics activating the dissemination, or not, of those elements, depending on their host. Finally, we study their transfer in environmental conditions.

Keywords : Antibiotic resistance, Gene transfer, SXT/R391 ICEs

RESUME / ABSTRACT

Résumé : L'antibiorésistance est un problème de santé publique majeur. En 2016, un rapport sur la résistance aux antibiotiques a estimé que près de 700 000 morts par an étaient liées à la résistance aux antibiotiques dans le monde. Des projections estiment qu'en 2050, ce chiffre pourrait atteindre 10 millions de morts annuelles en absence de nouvelles mesures pour limiter l'émergence et la propagation de résistances (O'Neill, 2016). Si la sélection de l'antibiorésistance par l'antibiothérapie est une composante importante du problème, on estime aujourd'hui que la dissémination de bactéries résistantes ou de leurs gènes de résistance, dans ou entre les sphères humaines animales et environnementales, en est probablement la clé.

Il existe plusieurs familles d'éléments génétiques mobiles à l'origine de la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques entre bactéries et finalement, assez peu d'études qui traitent de leurs abondances et spectres d'hôtes respectifs ou de leur dissémination dans l'environnement. Dans ce travail, nous avons notamment déterminé le spectre d'hôtes des éléments intégratifs et conjugatifs (ou ICE) de type SXT/R391, dans des collections d'isolats environnementaux par qPCR, puis dans deux environnements aquatiques grâce à une approche par epicPCR. L'epicPCR est méthode de biologie moléculaire permet de lier un fragment du gène codant l'ARNr 16S à un fragment d'intérêt, ici un fragment spécifique au gène *traB* des éléments SXT/R391. Ainsi, nous avons identifié une batterie d'hôtes environnementaux, encore jamais décrits à ce jour (eg *Tolomonas auensis*), comme possible courroie de transmission environnementale des ICE SXT/R391 et de leurs gènes cargo. Ces données tendent à démontrer que, contrairement à ce qui prévaut dans la littérature, la conséquence de la dissémination des ICE SXT/R391 ne se limitent pas à une diffusion de l'antibiorésistance au sein des *Vibrio*, notamment *Vibrio cholerae*.

Nous avons également identifié des molécules induisant l'expression de gènes de transfert de l'ICE SXT^{MO10} chez *E. coli* MG1656, évalué l'effet de plusieurs de ces molécules, dont la ciprofloxacine, sur la fréquence de transfert de l'élément *in vitro*, et suivi sa dissémination dans des conditions environnementales. Des expériences menées dans d'autres hôtes susceptibles d'héberger un ICE SXT/R391 dans l'environnement montrent des schémas de régulation différents allant de la perte d'inductibilité à l'absence de transfert. Bien que relativement préliminaires, ces résultats indiquent que, dans le contexte d'une dissémination environnementale, le comportement des ICE SXT/R391 est relativement versatile en fonction de l'hôte qui les héberge.

Mots clés : Antibiorésistance, Transfert de gènes, ICE SXT/R391

Abstract: Antibiotic resistance is a major global health issue. In 2016, a report on antibiotic resistance estimated that at least 700,000 deaths per year worldwide, were linked to antibiotic resistance. Projections indicate that by 2050, the number of deaths could reach 10 million per year in the absence of new measures to control the emergence and the spread of antibiotic resistances (O'Neill, 2016). While antibiotic therapy is an important part of the antibiotic resistance selection problem, the spread of resistant bacteria, or their resistance genes in or between human, animal, and environmental spheres, might be the key.

There are several families of mobile genetic elements at the origin of the dissemination of antibiotic resistance genes between bacteria, but relatively few studies on their relative abundances, their respective host range, or their dissemination in the environment. In this study, we determined the bacterial host range of the integrative conjugative elements (or ICEs) from the SXT/R391 family by qPCR from environmental strain collections, then from two aquatic environments using an epicPCR approach. The latter allows linking a fragment of the 16S rRNA gene to a fragment of interest, here a specific fragment of the *traB* gene from SXT/R391 elements. We then identified new environmental hosts, so far never described in the literature (*ie Tolomonas auensis*), as a possible vector of SXT/R391 ICEs and their genes. Therefore, our data demonstrated that, contrary to what we find in the literature, the dissemination of SXT/R391 ICEs is not only limited to *Vibrio* species like *Vibrio cholerae*.

We also identified molecules activating the expression of the ICE SXT^{MO10} transfer genes in *E. coli* MG1656, evaluated the real effect *in vitro* of some of those molecules (like ciprofloxacin) on the transfer frequency of the element, and monitored its dissemination in environmental conditions. Experiments conducted in other hosts likely to have an ICE SXT/R391 in the environment, demonstrated different regulatory patterns ranging from the loss of inducibility to the lack of transfer. Those preliminary results indicate that, in the context of an environmental dissemination, the behavior of SXT/R391 ICEs depends on their host.

Keywords : Antibiotic resistance, Gene transfer, SXT/R391 ICEs