



Titre de thèse : *Stress antibiotique et acquisition de résistance aux antibiotiques par les intégrons en biofilm*

Financement : MESR

Encadrante : Sandra DA RE

Contact : sandra.da-re@unilim.fr / 05 19 56 42 63

Nom de l'équipe et du directeur : UMR Inserm 1092 RESINFIT (Anti-infectieux : Supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques) - Pr Marie-Cécile PLOY

Mots clés : Intégrons ; Biofilm ; Régulation ; Résistance Antibiotiques ; Bactéries Gram négatif

Profil et compétences recherchées : microbiologie, biologie moléculaire, PCR temps réel, biofilm, microscopie confocale.

Description de la problématique de recherche :

La multi-résistance bactérienne aux antibiotiques est un problème majeur de santé publique. Devant l'absence de nouveaux antibiotiques dans un futur proche, il est essentiel de mieux comprendre les mécanismes d'acquisition/dissémination de la résistance aux antibiotiques afin de les limiter. Lorsqu'elles sont confrontées à des stress, les bactéries s'adaptent très rapidement en mutant ou par l'acquisition de nouveaux éléments génétiques. L'émergence de bactéries multi-résistantes résulte essentiellement de cette capacité des bactéries à s'échanger des gènes de résistance aux antibiotiques via le transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles (EGM) tels que les plasmides, transposons, séquences d'insertion, îlots génomiques et cassettes de gène d'intégrons.

Ce sujet de thèse s'inscrit dans l'un des axes de recherche de l'UMR S-1092 Inserm qui vise à mieux comprendre les mécanismes et régulations mis en jeu par les bactéries pour acquérir des gènes de résistance aux antibiotiques, en utilisant le modèle des intégrons.

Thématiques Domaine Contexte :

Les intégrons de résistance jouent un rôle majeur dans la dissémination des résistances aux antibiotiques. Ceux sont des éléments génétiques permettant aux bactéries d'acquérir et d'exprimer des gènes de résistance sous forme de cassettes (Gillings, 2014). Plus de 130 cassettes de résistance ont été décrites à ce jour conférant des résistances à quasiment toutes les familles d'antibiotiques (Partridge et al., 2009). L'acquisition de cassettes est catalysée par l'intégrase IntI via des recombinaisons spécifiques de sites. Les intégrons n'étant pas doués de

capacités de transfert, ils sont hébergés par des plasmides ou des transposons qui assurent de façon efficace leur dissémination (Cambray et al., 2010). En microbiologie clinique, cinq classes d'intégrons hébergeant des cassettes de résistance aux antibiotiques ont été décrites selon la séquence en acides aminés de la protéine IntI, les intégrons de classe 1 à 3 étant les plus fréquemment retrouvés dans les études épidémiologiques. De part le rôle majeur joué par les intégrons dans l'acquisition et la dissémination des résistances aux antibiotiques chez les BGNs, nous avons centré nos travaux précédents sur la régulation du système intégron. Nos travaux en cultures planctoniques ont montré que l'expression de l'intégrase de classe 1, était sous le contrôle de la réponse SOS bactérienne (Guerin et al., 2009). La réponse SOS est une réponse de défense bactérienne aux dommages à l'ADN qui peut être induite par différents stress dont certains antibiotiques (Erill et al., 2007; Baharoglu and Mazel, 2014). Cherchant à nous rapprocher au plus près des modes de vie naturels des bactéries, nous avons ensuite développé un modèle de biofilm en culture continue. En effet le biofilm est le mode de vie privilégié des bactéries dans les écosystèmes naturels environnementaux (eaux, sols, ...), humains ou animaux (microbiote digestif). Le biofilm est un environnement très hétérogène (variation en concentration d'oxygène, de nutriments, pH, etc) hautement favorable au transfert d'ADN entre bactéries, et dans lequel les gènes de réponse aux stress sont induits (Beloin et al., 2004). Nous avons ainsi pu montrer que le mode de vie biofilm induit via la réponse stringente, une augmentation du niveau d'expression de l'intégrase via la réponse SOS et via une régulation biofilm-spécifique dont tous les acteurs ne sont pas encore connus (Strugeon et al., 2016). Nous souhaiterions maintenant étudier l'impact du mode de vie biofilm sur la capacité des bactéries à s'échanger des cassettes de résistance par le système intégron et l'influence des traitements antibiotiques sur ces échanges en biofilms.

Objectifs :

Les objectifs de ce travail de thèse sont d'une part de continuer la caractérisation de la régulation de l'expression de l'intégrase en biofilm en absence et présence de stress antibiotiques, et d'autre part d'étudier les échanges de cassettes de résistance via les intégrons en biofilm et le rôle de la pression antibiotique sur ces transferts.

Il s'agira donc i) d'identifier le(s) chaînon(s) manquant de la régulation biofilm spécifique de l'expression de l'intégrase via la réponse stringente ; ii) d'étudier le rôle potentiel d'autres régulateurs globaux tels que CRP, Fis, etc... ; iii) le biofilm étant un environnement hétérogène, il serait intéressant de localiser l'expression de l'intégrase d'intégron et de la réponse SOS au sein du biofilm ; existe-t-il des microniches plus fortement induites dans le biofilm ou le niveau est-il homogène ? ; iv) mettre au point des biofilms mixtes mono- et bi-espèces afin de v) développer une approche par FACS et/ou microscopie confocale de suivi d'échange de cassettes entre bactéries au sein du biofilm et vi) étudier l'influence d'antibiotiques sur les échanges de cassettes d'intégrons en biofilm.

Méthode :

Afin de préciser la régulation de l'expression de l'intégrase IntI1, le candidat comparera en conditions biofilm et culture planctonique chez des mutants générés au laboratoire et/ou à

général, les niveaux d'expression et d'activité de l'intégrase (essais β -galactosidase et test d'excision) ; réalisera des expériences de complémentations pour les mutants impliqués.

La localisation de l'expression de l'intégrase et de la réponse SOS se fera à l'aide de fusions transcriptionnelles entre les promoteurs d'intérêt et des gènes codant des protéines fluorescentes (*gfp* ou *mcherry*) dans un système de flow-cell en microfluidique. Ce système est disponible depuis peu au laboratoire et le développement de biofilm dans ce système est actuellement mis en place par une stagiaire en Master 2. Ce système sera aussi utilisé pour tester l'effet d'antibiotiques sur les niveaux d'expression.

L'échange de cassettes de résistance sera d'abord étudié à l'aide d'intégron synthétique qui permettra de suivre l'échange par fluorescence. Les constructions nécessaires sont en cours de constructions au laboratoire. Ces échanges seront suivis dans des biofilms mixtes constitués des deux souches d'une même espèce (*Escherichia coli*) ou de deux espèces (*E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa*). Ces biofilms devront être mis au point en culture continue en microfermenteur et en microfluidique. Le suivi d'échange de cassettes sera réalisé par cytométrie de flux ou microscopie confocale, techniques disponibles au sein de la plateforme Biscem de l'institut GEIST auquel appartient le laboratoire.

Résultat attendus :

Ce projet permettra de vérifier l'hypothèse d'une implication potentielle des systèmes toxines/antitoxines dans la régulation biofilm spécifique et réponse stringente dépendante de l'expression de l'intégrase d'intégron de classe 1. Il permettra aussi de déterminer si d'autres régulateurs globaux jouent un rôle dans la régulation de *intII* en biofilm.

L'approche par microfluidique et microscopie confocale devrait nous permettre de déterminer l'existence ou non de microniches au sein du biofilm favorables à une expression accrue de la réponse SOS et/ou de l'intégrase, ainsi que de visualiser *in situ* et dans le temps l'induction de ces expressions, ainsi que l'échange de cassettes de gène en réponse à des traitements antibiotiques.

L'utilisation de biofilms mixtes mono- et bi-espèces permettra d'une part d'évaluer l'impact du biofilm sur la capacité des bactéries à s'échanger des cassettes de résistance et le rôle que certains antibiotiques peuvent avoir sur ces échanges.

L'ensemble de ce travail devrait ainsi permettre de mieux définir les régulations contrôlant l'expression de l'intégrase d'intégron en biofilm, mode de vie bactérien dans lequel s'observent les échanges de résistances antibiotiques dans les écosystèmes naturels. A plus long terme, cela devrait permettre i) d'identifier et de développer des stratégies nouvelles visant à empêcher l'expression des intégrases et ainsi limiter le recrutement de cassettes au sein des intégrons et la propagation des multirésistances ; ii) d'identifier des antibiotiques à utiliser avec précaution, car favorisant les échanges de gènes de résistance.

Références bibliographiques :

- Baharoglu, Z., and Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS microbiology reviews* 38, 1126-1145.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagenen, J.A., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., *et al.* (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular microbiology* 51, 659-674.
- Cambray, G., Guerout, A.M., and Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual review of genetics* 44, 141-166.
- Erill, I., Campoy, S., and Barbe, J. (2007). Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS microbiology reviews* 31, 637-656.
- Gillings, M.R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 78, 257-277.
- Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbe, J., Ploy, M.C., and Mazel, D. (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science* 324, 1034.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., and Iredell, J.R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS microbiology reviews* 33, 757-784.
- Strugeon, E., Tilloy, V., Ploy, M.C., and Da Re, S. (2016). The Stringent Response Promotes Antibiotic Resistance Dissemination by Regulating Integron Integrase Expression in Biofilms. *MBio* 7.



Title : *Antibiotic stress and antibiotic resistance acquisition via integron in biofilms*

Financing : MESR

Nom de l'équipe et du directeur : UMR Inserm 1092 RESINFIT (Anti-infectieux : Supports moléculaires des résistances et innovations thérapeutiques) - Pr Marie-Cécile PLOY

Encadrante : Sandra DA RE

Contact : sandra.da-re@unilim.fr / 05 19 56 42 63

Mots clés : Intégrons ; Biofilm ; Regulation ; Antibiotic Resistance ; Gram négative bacteria

Profil et compétences recherchées : microbiology, molecular biology, real time PCR réel , confocale microscopy

Description de la problématique de recherche :

Bacterial antibiotic multiresistance is a major health problem. Given the dearth of new antibiotics in the development pipeline, there is an urgent need to improve our knowledge of how antibiotic resistance determinants are acquired and disseminate. When confronted with stresses, bacteria adapt very rapidly by mutating or by acquiring new genetic elements. The main driving force in the emergence of bacterial multidrug resistance is their capacity to exchange antibiotic resistance genes via the horizontal transfer of mobile genetic elements (MGE), like plasmids, insertion sequences, transposons, genomic islands and integron gene cassettes.

This doctoral subject is part of one of the research axis of UMR S-1092 Inserm aiming at a better understanding of bacterial mechanisms and regulations involved in the acquisition of antibiotic resistance genes, using the integron model.

Thématiques Domaine Contexte :

Resistance integrons play a major role in the dissemination of antibiotic resistance. They are genetic elements allowing bacteria to acquire and express resistance genes embedded within gene cassettes (Gillings, 2014). More than 130 cassettes encoding resistance to nearly all antibiotic families have been described so far (Partridge et al., 2009). The integrase IntI catalyzes site-specific recombinations that lead to the incorporation of gene cassettes within the integron. Integrons can not transfer by themselves, they are carried on plasmids or transposons which allow their dissemination very efficiently (Cambray et al., 2010). In clinical microbiology, five classes of integrons have been identified on the basis of the IntI

amino acid sequence; class 1 to 3 being the most frequently described in epidemiologic studies. From the major role played by integrons in the acquisition and dissemination of antibiotic resistance among Gram negative bacteria, we previously focused our attention on the regulation of the integron system. Our works performed in planktonic cultures showed that class 1 integrase expression is under control of the bacterial SOS response (Guerin et al., 2009). The SOS response is a bacterial defence response to DNA damages, that can be induced by various stresses such as antibiotics (Baharoglu and Mazel, 2014; Erill et al., 2007). With the aim of getting closer to natural bacterial lifestyle, we have then developed a continuous culture biofilm model. Indeed the biofilm is the favoured lifestyle of bacteria in environmental (waters, soils) and human or animal natural ecosystems. The biofilm is a heterogeneous environment (variation in oxygen concentration, nutrients availability, pH, etc) highly favourable to DNA transfer between bacteria, where stress response genes are induced (Beloin et al., 2004). We could show that the biofilm lifestyle induces via the stringent response an increase of the integrase expression level both via the SOS response and a biofilm specific regulation, which has not been completely deciphered yet (Strugeon et al., 2016). Now, we would like to study the impact of the biofilm lifestyle on the ability of bacteria to exchange resistance gene cassettes via integrons and the influence of antibiotics on these exchanges in biofilms.

Objectifs :

The aims of this project are to continue the characterization of the regulation of the integrase expression in biofilm in the absence and presence of antibiotics and to study exchanges of resistance cassettes via integrons in biofilm and the antibiotic pressure role on these transfers.

To do so, the following tasks will be performed i) identifying the missing links in the biofilm-specific regulation of the integrase via the stringent response; ii) studying the potential role of other global regulators such as CRP, Fis, etc; iii) the biofilm being a heterogeneous environment, it would be interesting to localize integron integrase and SOS response within the biofilm; are there microniches where these expressions are more induced or are the level of expression homogeneous throughout the whole biofilm ? ; iv) setting up mixed biofilms mono- and bi-species in order to v) develop a FACS and/or confocale microscopy approach to follow integrons cassettes exchange between bacteria within the biofilm and vi) to study the influences of antibiotics on these exchanges.

Méthode :

To unravel IntI1 biofilm-specific regulation, the candidate will compare expression the level and activity of the integrase in mutants already made at the laboratory or to be made, in planktonic and biofilm cultures (β -galactosidase assays and excision test). Complementation experiments will be performed for interesting mutants.

The localisation of integrase and SOS response expression will be done using transcriptional fusions between promoters of interest and genes coding fluorescent proteins (*gfp* ou *mcherry*)

in a microfluidic flow-cell system. This system is available at the laboratory and is currently set up by a master 2 degree student. This system will also be used to test antibiotic effects on expression levels.

Resistance gene cassettes exchange will be first studied using synthetic integrons that will allow following cassettes exchange with fluoresce approach. The constructions needed are currently being made. Cassettes exchanges will be looked at in mixed biofilms made of two strains of a single specie (*Escherichia coli*) or two species (*E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* or *Pseudomonas aeruginosa*). These biofilms need to be set up in the lab in continue culture and in microfluidic flow-cells. Cassette exchanges will be estimated using flow cytometry or confocal microscopy, both techniques being available at the Biscem platform of the GEIST institute, to which UMR1092 belongs.

Résultats attendus :

This project should allow i) verifying the hypothesis of a potential role of toxin/antitoxin systems in the stringent response dependent biofilm-specific regulation of the class 1 integron integrase; ii) figuring out if other global regulators could be involved in *intI1* regulation in biofilm.

The microfluidic and confocal microscopy approaches should set up the existence or not of microniches within the biofilm that are favourable to an increased expression of SOS response and/or integrase, and also to visualise *in situ* and in time induction of these expressions as well as gene cassette exchange in response to antibiotics.

The use of mixed biofilms (mono- and bi-species) should help to evaluate the impact of the biofilm lifestyle on the ability of bacteria to exchange resistance cassettes and the role that some antibiotic may have on these exchanges.

Altogether this work should help to better understand regulations controlling integron integrase expression in biofilms, a bacterial lifestyle where exchanges of antibiotic resistance are observed in natural settings. On the longer term, it will help i) identifying and developing new strategies aiming to prevent integrase expression and thus to limit recruitment of new cassette within the integron and the dissemination of multiresistances; ii) identifying antibiotics to be used with caution as favouring resistance gene exchange.

Références bibliographiques :

- Baharoglu, Z., and Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS microbiology reviews* 38, 1126-1145.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Haagenen, J.A., Molin, S., Prensier, G., Arbeille, B., *et al.* (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular microbiology* 51, 659-674.
- Cambray, G., Guerout, A.M., and Mazel, D. (2010). Integrons. *Annual review of genetics* 44, 141-166.

- Erill, I., Campoy, S., and Barbe, J. (2007). Aeons of distress: an evolutionary perspective on the bacterial SOS response. *FEMS microbiology reviews* 31, 637-656.
- Gillings, M.R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 78, 257-277.
- Guerin, E., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Da Re, S., Gonzalez-Zorn, B., Barbe, J., Ploy, M.C., and Mazel, D. (2009). The SOS response controls integron recombination. *Science* 324, 1034.
- Partridge, S.R., Tsafnat, G., Coiera, E., and Iredell, J.R. (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS microbiology reviews* 33, 757-784.
- Strugeon, E., Tilloy, V., Ploy, M.C., and Da Re, S. (2016). The Stringent Response Promotes Antibiotic Resistance Dissemination by Regulating Integron Integrase Expression in Biofilms. *MBio* 7.