



HAL
open science

Caractérisation moléculaire de la résistance de *F.tularensis* aux fluoroquinolones

Claire Siebert

► **To cite this version:**

Claire Siebert. Caractérisation moléculaire de la résistance de *F.tularensis* aux fluoroquinolones. Biochimie, Biologie Moléculaire. Université Grenoble Alpes, 2018. Français. NNT : 2018GREAV025 . tel-01996605

HAL Id: tel-01996605

<https://theses.hal.science/tel-01996605>

Submitted on 28 Jan 2019

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE GRENOBLE ALPES

Spécialité : **Virologie, Microbiologie, Immunologie**

Arrêté ministériel : 25 mai 2016

Présentée par

Claire SIEBERT

Thèse dirigée par **Patricia Renesto, DR-CNRS, TIMC UMR 5525**
et

codirigée par **Sandrine BOISSET, MCU-PH, TIMC UMR 5525**
préparée au sein du **Laboratoire TIMC UMR 5525, Equipe
TheREx**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Caractérisation moléculaire de la résistance de *Francisella tularensis* aux fluoroquinolones

Thèse soutenue publiquement le **25 Octobre 2018**
devant le jury composé de :

Dr Patricia RENESTO

DR-CNRS, TIMC-IMAG, Directeur de Thèse

Dr Sandrine BOISSET

MCU-PH, Université Grenoble Alpes, Co-Directeur de Thèse

Dr Thomas HENRY

DR-INSERM, CIRI, Rapporteur

Dr Jean-Michel JAULT

DR-CNRS, IBCP, Rapporteur

Dr Sophie JARRAUD

MCU-PH, Université Lyon I, Examineur

Pr Patrice FAURE (Président du jury)

PU-PH, Université Grenoble Alpes, Examineur



RESUME

Francisella tularensis est une bactérie à Gram négatif, hautement pathogène, responsable de la tularémie, pathologie pour laquelle les fluoroquinolones (FQ) sont prescrites en première intention. Le fort taux d'échecs thérapeutiques et de rechutes observées en dépit de traitements adaptés demeure préoccupant. L'hypothèse de l'émergence de bactéries résistantes aux FQ n'est donc pas à exclure et il est important d'y remédier.

J'ai d'abord abordé cette problématique par l'analyse des conséquences fonctionnelles de mutations de l'ADN gyrase (cible des FQ) observées sur des lignées de *F. novicida* hautement résistantes aux FQ et générées *in vitro*. Les données obtenues, basées entre autres sur des tests de supercoiling et de clivage de l'ADN réalisés à partir de sous-unités gyrases recombinantes, ont clairement démontré que les mutations de GyrA et de GyrB ne rendaient pas compte à elles seules de la résistance aux FQ.

L'analyse génomique de mutants de *F. tularensis* subsp *holarctica* LVS résistants aux FQ m'a ensuite orientée vers un autre acteur potentiel de la résistance aux FQ, soit la protéine FupA/B. Ainsi, le second aspect traité au cours de cette thèse a été de caractériser le rôle de FupA/B dans la résistance aux FQ. En utilisant des approches de trans-complémentation /mutagenèse, nous avons démontré que l'expression de FupA/B était bien liée à la sensibilité aux FQ, ce qui valide l'hypothèse de départ. De plus, nous avons montré que la souche virulente *F. tularensis* subsp *tularensis* SCHU S4, dépourvue de la protéine homologue FupA, présentait aussi une moindre sensibilité aux FQ. La délétion de la lipoprotéine FupA/B favorise une sécrétion accrue d'« Outer membrane vesicles » (OMVs). L'analyse protéomique, par spectrométrie de masse, des OMVs des souches LVS et LVS- Δ fupA/B a permis l'identification de 801 protéines parmi lesquelles un sous-ensemble de 23 protéines qui présente une abondance différentielle entre les OMVs des deux souches. Les modifications observées pourraient contribuer à l'augmentation de la sensibilité aux FQ. En particulier, l'expression accrue de RecA est couplée à une augmentation de la tolérance de LVS- Δ fupA/B non seulement à la ciprofloxacine, mais aussi à la gentamicine. Enfin nous avons démontré que les OMVs sont des éléments structuraux des biofilms de *F. tularensis* qui assurent une protection contre les FQ.

L'ensemble de ces résultats indiquent que les mutations ciblant FupA/B, contribuent à la résistance aux antibiotiques par des modulations quantitatives et qualitatives de la production d'OMVs et de la formation de biofilms. L'ensemble de ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives de recherche dans la lutte contre la résistance et/ou la persistance de *Francisella* aux antibiotiques.

ABSTRACT

Francisella tularensis is a highly pathogenic Gram-negative bacterium responsible for Tularemia, a disease for which fluoroquinolones (FQ) are prescribed as the first-line therapy. The high rate of treatment failures and relapses observed despite appropriate treatment is a main concern. The emergence of FQ resistant bacteria has been thus hypothesized and a better characterization of the molecular mechanisms of bacterial resistance would be helpful.

In a first part, I analyzed the functional consequences of mutations on the DNA gyrase (FQ target) observed on *F. novicida* isolates highly-resistant to FQ and generated *in vitro*. The data obtained, based on supercoiling and DNA cleavage assays performed using recombinant gyrase subunits, clearly demonstrated that mutations on GyrA and GyrB were *not accounting alone* for FQ resistance.

In a second part, and based on the genomic analysis of FQ resistant mutants of *F. tularensis* subsp *holarctica* LVS, I considered another potential actor of FQ resistance, namely the FupA/B protein. Several approaches were thus carried out to characterize the role of this protein found to be inactivated in FQ resistant isolates. Using trans-complementation/mutagenesis approaches, we demonstrated that the expression of FupA/B is indeed related to the FQ sensitivity, thus validating our hypothesis. In addition, we have shown that the virulent strain *F. tularensis* subsp *tularensis* SCHU S4, lacking the FupA homologous protein, also had a lower FQ sensitivity. The deletion of FupA/B lipoprotein promotes increased secretion of "Outer Membrane Vesicles" (OMVs). The mass spectrometry proteomic analysis of the OMVs from the LVS and LVS- Δ fupA/B strains allowed the identification of 801 proteins among which a subset of 23 proteins of differential abundance between both strains. The observed changes could contribute to the increase in FQ sensitivity. Importantly, we observed that the overexpression of RecA was coupled with a higher tolerance of LVS- Δ fupA/B not only to ciprofloxacin, but also to gentamicin. Finally, we have shown that OMVs are structural key elements of *F. tularensis* biofilms known to provide protection against FQ.

Together, these results indicate that mutations targeting FupA/B contribute to antibiotic resistance through quantitative and qualitative modulations of OMVs production and biofilm formation. All these results open the way for exploring new pathways that would be helpful to combat *Francisella* resistance and / or persistence against antibiotics.

**Une alouette s'élève –
je respire la brume
je marche sur les nuages !**

Masaoka Shiki

**Suspendre la lune au pin –
la décrocher
pour mieux la contempler !**

Tachibana Hokushi

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé au Laboratoire TIMC-IMAG UMR5525 dirigé par le professeur Philippe Cinquin, au sein de l'équipe TheREx dirigé par le professeur Bertrand Toussaint.

Je remercie les docteurs Thomas Henry et Jean Michel Jault de m'avoir fait l'honneur d'accepter le rôle de rapporteur pour évaluer mes travaux de Thèse. Je remercie les examinateurs, le docteur Sophie Jarraud et le professeur Patrice Faure, d'avoir jugé mon travail et de l'intérêt qu'ils y ont porté.

Je tiens à remercier sincèrement ma directrice de Thèse, le docteur Patricia Renesto pour m'avoir encadrée, conseillée et soutenue tout au long de mon parcours. Tes conseils avisés, ton aide au quotidien et ta présence m'ont énormément appris et m'ont permis de m'épanouir dans la réalisation de la Thèse et sur le plan personnel. Pour reprendre un terme souvent employé au laboratoire, je dirai que ces quatre années passées à tes côtés ont été « topissimes » ! Patricia, je te remercie infiniment.

Je remercie ma co-directrice de Thèse, le docteur Sandrine Boisset, pour m'avoir fait confiance et m'avoir accompagnée dans mes débuts en tant qu'interne IPR où le monde de la recherche était encore pour moi peu familier. Merci beaucoup pour tes conseils durant tout mon parcours.

Je remercie le docteur Corinne Villers, pour son aide et sa présence au quotidien. C'est un plaisir pour moi de travailler à tes côtés, merci.

Je remercie les membres des équipes TheREx, GEM et BNI pour leur aide, leurs conseils avisés et leur bonne humeur au quotidien qui font que la vie au laboratoire est agréable.

Je remercie mes amis Anne-Laure, Agathe, Soizic, Sophie, Emeline, Clara, Pauline, Amélie, Mylène, Flore-Anne, Gabrielle, Thibaut, Grégoire, Thibault, Florent, Antoine, Adrien, Rémi et mes belles rencontres de la SDS. Tant de souvenirs partagés, merci pour tout.

Je termine ces remerciements avec une grande pensée pour ma famille. A mes parents, pour leur soutien infailible. Merci de m'avoir épaulée et accompagnée dans tous mes choix. Maman, ton écoute et tes nombreux conseils m'ont permis de m'épanouir et de trouver ma voie, merci. Mes remerciements vont également à tous les membres de ma famille, grands-parents, sœur ... et à ma belle-famille, merci sincèrement d'être là pour moi. Enfin, merci à toi Julien, mon compagnon de route. Je t'avais dit il y a un an que le meilleur était à venir, je pense que ça y est, nous y sommes.

TABLE DES MATIERES

Table des illustrations	13
Abréviations	14
AVANT-PROPOS	15
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	17
A- <i>Francisella</i>, agent causal de la tularémie	19
I- Le genre <i>Francisella</i>	19
I-1. Contexte historique	19
I-2. Taxonomie	19
II- <i>Francisella tularensis</i>	23
I-1. Caractéristiques phénotypiques	23
II-2. Caractéristiques génomiques et phylogéographiques	24
II-3. <i>Francisella tularensis</i> : un agent potentiel de bioterrorisme	25
II-4. Pouvoir pathogène et facteurs de virulence	26
III- La tularémie	34
III-1. Réservoirs et modes de contaminations	34
III-2. Données épidémiologiques	36
III-3. Diagnostic clinique et biologique	38
III-4. Prise en charge thérapeutique	42
B- Les Fluoroquinolones	48
I- Structure	48
II- Spectre d'action	48
III- Mécanisme d'action	49
III-1. Les ADN topoisomérases	49
III-2. Les ADN topoisomérases de Type IIA bactériennes	51
III-3. Mode d'action des fluoroquinolones	53
IV- Mécanismes de résistance aux fluoroquinolones	54
IV-1. Résistances chromosomiques	54
IV-2. Résistances plasmidiques	57
IV-3. Autres mécanismes de résistance aux fluoroquinolones	58

PROBLEMATIQUE	63
TRAVAUX SCIENTIFIQUES	65
Publication n°1: Fonctionnal characterization of the DNA Gyrases in Fluoroquinolone-resistant mutants of <i>Francisella novicida</i>	67
Publication n°2: The FupA lipoprotein of <i>Francisella tularensis</i> plays a major role in fluoroquinolone resistance through regulation of vesicle secretion and biofilm formation	91
RESULTATS COMPLEMENTAIRES	145
I- Introduction.....	145
II- Procédures	147
III- Résultats	149
ANNEXES	161
BIBLIOGRAPHIE	217

TABLE DES ILLUSTRATIONS

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Arbre phylogénétique de 16 espèces de γ -protéobactéries	20
Figure 2. Aspect phénotypique de <i>F. tularensis subsp holarctica</i>	24
Figure 3. Cycle de vie intracellulaire de <i>F. tularensis</i>	27
Figure 4. Morphologie de la souche parentale (A) et du mutant déficient en capsule (B) de <i>F. tularensis</i> LVS	31
Figure 5. Structure du LPS de <i>F. holarctica</i> et <i>F. novicida</i>	32
Figure 6. Représentation schématique de l'enveloppe de <i>F. tularensis</i> et son rôle dans la virulence	33
Figure 7. Les deux principaux cycles de vie de <i>F. tularensis</i> en Europe.....	36
Figure 8. Ulcère d'inoculation et tularémie ganglionnaire.....	
Figure 9. Distribution des formes cliniques parmi les cas de tularémie déclarés en France de 2002 à 2012 selon l'InVS	
Figure 10. Structure commune aux quinolones et fluoroquinolones	48
Figure 11. Représentation schématique de la séquence et l'assemblage des topoisomérases de type IIA	51
Figure 12. Structure du cœur catalytique de l'ADN gyrase de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	53
Figure 13. Mécanismes de résistance aux FQ.....	55
Figure 14. Modèle de formation d'un biofilm par <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	59
Figure 15. Mécanismes potentiels de tolérance des biofilms vis à vis des biocides.....	
Figure 16. Représentation schématique du gène <i>fupA/B</i> de la souche LVS	92
Figure 17. Etude du lien fonctionnel entre les protéines FupA et FupB à partir de la base de données STRING	143
Figure 18. Représentation schématique en 2D de la protéine FupA/B au sein de la membrane externe à partir du programme PRED-TMBB	145
Figure 19. Modélisation 3D de la structure de FupA/B réalisée à partir du logiciel Phyre ²	146
Figure 20. Etapes de production des protéoliposomes.....	147
Figure 21. Purification des protéoliposomes sur gradient de sucrose.....	150
Figure 22. Evaluation de l'activité porine de FupA/B.....	151

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Taxonomie des <i>Francisella</i>	19
Tableau 2. Classification des bactéries du genre <i>Francisella</i>	21
Tableau 3. CMI (mg/L) de différents antibiotiques vis à vis de 59 souches de <i>F. tularensis</i> de Type B isolées entre 2006 et 2016	45
Tableau 4. Principales quinolones et spectre d'action	49

ABRÉVIATIONS

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ANS	8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid
ANTS	8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid sodium salt
BRD	Breakage Reunion Domain
CDC	Centers for Disease Control
CFU	Colony Forming Unit
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CL	CardioLipine
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMI	Concentration Minimale Inhibitrice
CNR	Centre National de Référence
CTD	C-terminal Domain
DLS	Dynamic Light Scattering
DO	Densité optique
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FCP	<i>Francisella</i> containing phagosome
FDA	Food and Drug Administration
FNI	<i>Francisella novicida</i> island
FPI	Ilot de Pathogénicité de <i>Francisella</i>
FQ	Fluoroquinolone
Fup	Fer Utilization Protein
Fur	Ferric Uptake Regulator
ICP-AES	Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy
ICT	Immunochromatographie
IFI	Immunofluorescence Indirecte
InVs	Institut national de Veille sanitaire
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
kDa	Kilodalton
KDO	acide 2-keto-3-deoxyoctulonic
KO	Knock-out
LPS	Lipopolysaccharide
LVS	Live Vaccine Strain
MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation Time Of Flight
MAT	Micro-agglutination
MBP	Maltose binding protein
MDO	Maladie à Déclaration Obligatoire
MFS	Major Facilitator Superfamily
MLST	Multilocus sequence typing
MLVA	MultiLocus Variable-number tandem repeat Analysis
MR	Mannose Receptor
NRBC	Nucléaires, Radiologiques, Biologiques et Chimiques
NSB2-3	Niveau Sécurité Biologique (2 ou 3)
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
OMV	Outer Membrane Vesicle
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PE	PhosphatidylEthanolamine
PG	PhosphatidylGlycérol
PL	Protéoliposome
PMQR	Résistance aux Quinolones Médiés par un Plasmide
QBP	Quinolone Binding Pocket
Qnr	Quinolone resistance
QRDR	Quinolone Resistance Determining Region
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RND	Resistance nodulation division
ROS	Reactive Oxygen Species
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SST6	Système de Sécrétion de Type VI
TLR	Toll Like Receptors
UE	Union Européenne
VBNC	Viable But Not Culturable
VNTR	Variable Number Tandem Repeat markers
WB	Western Blot

AVANT-PROPOS

Francisella tularensis, agent étiologique de la tularémie, est une bactérie coccobacille à Gram négatif intracellulaire facultative, hautement pathogène chez l'homme. Il existe 6 formes cliniques de la maladie dont la forme pulmonaire qui entraîne 30% de mortalité en l'absence de traitement adapté. Ce micro-organisme est hautement infectieux dans la mesure où l'inhalation de 10 bactéries suffit à entraîner la maladie. Ces critères de pathogénicité et de virulence justifient son classement comme agent du bioterrorisme de classe A par le CDC (Centers for Disease Control).

Les données microbiologiques et cliniques indiquent que les fluoroquinolones (FQ) représentent la meilleure alternative pour traiter la tularémie. Toutefois, au cours des deux dernières décennies, l'utilisation excessive de ces antibiotiques est à l'origine d'une augmentation de la prévalence de bactéries résistantes. Ainsi, et malgré un traitement adapté, des échecs thérapeutiques ainsi que des rechutes qui pourraient résulter d'une évolution des *Francisella ssp* vers un haut niveau de résistance aux FQ sont observés dans 5 à 10% des cas. C'est pourquoi la compréhension des mécanismes d'acquisition des résistances aux FQ est d'un intérêt majeur.

Afin de mieux comprendre l'acquisition de la résistance aux FQ chez les bactéries du genre *Francisella*, un protocole d'évolution expérimentale a été réalisé au laboratoire à partir de 3 souches de référence : *Francisella tularensis* subsp *holarctica* LVS (live vaccine strain: souche de virulence atténuée), *F. novicida* et *F. philomiragia*. Ceci a permis d'obtenir des clones de haut niveau de résistance aux FQ dont l'étude phénotypique et génotypique a été réalisée à partir des mutants intermédiaires et terminaux. Cette étude a confirmé que chez *F. tularensis* la première cible des FQ est l'ADN gyrase qui est un hétérotétramère A₂B₂. En plus de mutations dans les « quinolone resistance determining region » (QRDR-A et QRDR-B), régions à fort taux de mutations, ce travail a mis en évidence plusieurs substitutions ou délétions dans d'autres régions de GyrA ou de GyrB, mutations jamais décrites antérieurement.

L'un des objectifs auxquels j'ai participé a été de clarifier l'impact de ces mutations de l'ADN gyrase sur la sensibilité de cette enzyme aux FQ en utilisant des tests *in vitro* de surenroulement et de coupure de l'ADN à partir des protéines A₂B₂ recombinantes, et en restaurant l'expression des protéines natives chez les isolats mutés. Outre ces mutations attendues sur l'ADN gyrase, nous avons observé que 80% des souches LVS exposées aux FQ

présentaient des mutations non-sens au niveau du gène *fupA/B*. L'apparition de ces mutations fait suite aux mutations sur l'ADN gyrase et est accompagnée d'une augmentation modérée mais significative de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des FQ. FupA/B (Fer-Utilization Protein) est une protéine exclusive aux bactéries du genre *Francisella* impliquée dans l'acquisition du fer sidérophore-dépendante et dont le rôle dans la virulence bactérienne a été suggéré. En revanche, la contribution possible de FupA/B dans la résistance aux FQ n'avait jamais été rapportée.

L'objectif majeur de mon travail de Thèse a été de rechercher un lien entre la protéine FupA/B et la résistance aux FQ par une combinaison d'approches biochimiques et génétiques. Au cours de ma première année de thèse, la description par une équipe Américaine, de mutations de *fupA/B* chez des isolats de LVS rendus résistants par exposition aux FQ nous a confortés dans notre hypothèse de travail. Enfin, plus récemment, des travaux préliminaires nous ont permis de mettre au point la formation de protéoliposomes et à aborder des aspects structure-fonction de FupA/B.

Les données obtenues relatives aux mécanismes de résistance des bactéries *Francisella* aux FQ évoqués ci-dessus sont rapportées dans la partie « Travaux Scientifiques » de ce manuscrit et font l'objet de deux publications, l'une acceptée et l'autre sur le point d'être soumise. Ces données feront suite à une Introduction Bibliographique dans laquelle seront respectivement décrits la bactérie, la maladie et les traitements ainsi que les mécanismes de résistance aux FQ. Au cours de ma thèse, j'ai également participé à l'étude d'un mutant Δfur de la souche virulente CHUGA-Ft6. Fur est un régulateur de l'homéostasie du fer qui joue un rôle crucial dans la virulence bactérienne. L'article qui fait l'objet de ce travail et dont je suis co-auteur sera présenté en Annexe.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

A- FRANCISELLA, AGENT CAUSAL DE LA TULAREMIE

I- Le genre *Francisella*

I-1. Contexte historique

La bactérie *Francisella tularensis* a été décrite en tant que pathogène humain au début des années 1900. Divers cas d'infections animales s'apparentant à la tularémie avaient été rapportés aux Etats-Unis en 1908, en Norvège en 1890 ou encore au Japon en 1818 (1). Cependant, ce n'est qu'en 1911 que le premier cas réel de tularémie fut décrit par McCoy et Chapin chez des écureuils atteints de « pseudo peste » en Californie, dans le comté de Tulare (2). La souche fut isolée en 1912 par Mc Coy et Chapin, qui la nommèrent *Bacterium tularense*, en rapport avec le lieu de sa découverte. En 1925, Edward Francis établit que de nombreux symptômes chez l'homme étaient liés à l'infection par cette bactérie ; il nommera cette infection la tularémie en 1933. C'est en son honneur que la bactérie fut rebaptisée *Francisella tularensis* (3).

I-2. Taxonomie

Le Tableau 1 ci-dessous illustre la position taxonomique des bactéries du genre *Francisella*.

Tableau 1. Taxonomie des *Francisella*

Domaine	Bactérie
Embranchement	Protéobactérie
Classe	Gammaprotéobactérie
Ordre	<i>Thiotrichales</i>
Famille	<i>Francisellaceae</i>
Genre	<i>Francisella</i>

La position taxonomique des bactéries du genre *Francisella* est complexe et a longtemps été discutée. Dans les années 1920, et sur la base d'études sérologiques, la bactérie a d'abord été considérée comme appartenant au genre *Pasteurella* puis provisoirement au genre *Brucella* (4). En 1966, les résultats d'hybridation ADN-ADN ont montré que celle-ci n'était en fait pas reliée au genre *Pasteurella* (5), ce qui a validé la proposition faite par Dorofe'Ve de classer ces bactéries dans un nouveau genre *Francisella*, unique membre de la famille des *Francisellaceae* (6). Ultérieurement, l'analyse de l'ARN 16S proposé par Woese a permis de situer ces bactéries dans la classe des Gammaproteobactéries (7). Les résultats de cette étude

indiquaient que l'organisme le plus proche de *F. tularensis* était la bactérie intracellulaire *Wolbachia persica*, récemment reclassifié en *Francisella persica* (8). En outre, *F. tularensis* possède un ancêtre commun avec les pathogènes humains *Coxiella burnetii* et *Legionella* (9). En 2005, l'analyse phylogénétique basée sur l'alignement de dix protéines de 16 Gammaprotéobactéries dont *F. tularensis* a montré que celle-ci était la lignée la plus profondément divergente au sein de cette classe (Figure 1) (10).

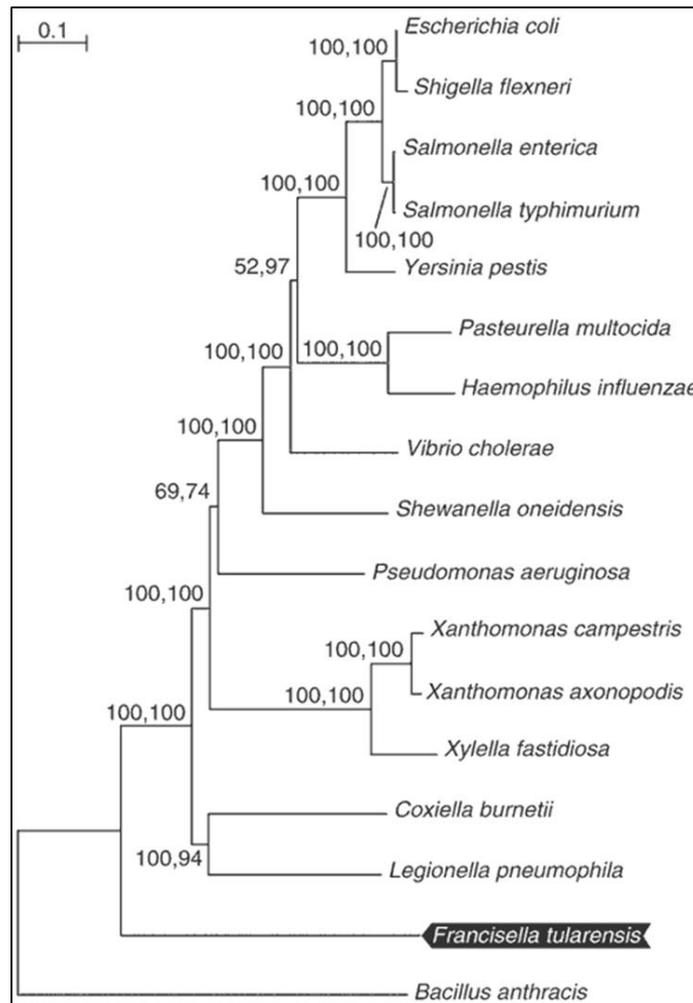


Figure 1. Arbre phylogénétique de 16 espèces de γ -protéobactéries basé sur l'alignement de 10 protéines (d'après Larsson et al. 2005)

On dénombre trois espèces principales de *Francisella* qui sont *F. tularensis*, *F. novicida* et *F. philomiragia* et dont les caractéristiques sont rapportées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Classification des bactéries du genre *Francisella*

Espèce	Sous-espèce	Biovar	Localisation géographique	Virulence
<i>F. tularensis</i>	<i>tularensis</i> (TypeA)		Amérique du nord	Très forte
	<i>holarctica</i> (TypeB)	Biovar I (Ery ^S)	Hémisphère Nord	Forte
		Biovar II (Ery ^R)	Hémisphère Nord	
		Biovar <i>japonica</i>	Japon	
	<i>mediasiatica</i>		Asie Centrale	Forte
<i>F. novicida</i>			Amérique du nord, Australie	Faible
<i>F. philomiragia</i>			Hémisphère nord	Faible

L'espèce *F. tularensis* est divisée en 3 sous-espèces : *tularensis* (Type A), *holarctica* (Type B) et *mediasiatica* selon des critères épidémiologique, biochimique, génomique, géographique et de virulence (11). Ce sont les sous-espèces *tularensis* et *holarctica* qui sont responsables des cas de tularémie dans le monde. Elles ont été caractérisées en 1959 par Olsufiev *et al.* qui ont montré qu'il existait différents niveaux de virulence des souches en fonction de leur localisation géographique (12). Les souches de Type A sont majoritairement retrouvées en Amérique du Nord. Quelques isolats ont également été identifiés dans l'environnement et dans des arthropodes en Slovaquie et en Autriche (13). Ces souches sont hautement virulentes, seulement 10 bactéries pouvant entraîner l'infection et être à l'origine d'une forme sévère de la maladie. Les souches de Type B, moins virulentes, sont présentes dans tout l'hémisphère nord et sont responsables des cas de tularémie en Europe. La sous-espèce *holarctica* est classiquement divisée en 3 biovars : biovar I dont les souches sont sensibles à l'érythromycine, biovar II dont les souches sont résistantes à l'érythromycine et le biovar *japonica* dont les souches sont majoritairement retrouvées au Japon (14). Les souches cliniques que nous avons étudiées appartiennent à cette sous-espèce et au biovar I. *F. tularensis* subsp *mediasiatica* a été isolée en Asie centrale et sa virulence est comparable à celle de la sous-espèce *holarctica* (15).

Au début du XX^{ème} siècle, l'incidence de la maladie en Russie a conduit au développement de vaccins contre la tularémie, vaccins basés sur l'utilisation de souches vivantes atténuées. En 1956, l'un de ces vaccins a été exporté aux Etats-Unis où la bactérie a été isolée et a été nommée *F. tularensis* subsp *holarctica* LVS pour « Live Vaccine Strain » (16). La vaccination par la souche LVS diminuait l'incidence de la tularémie pulmonaire mais n'avait pas d'effet sur la tularémie ulcéro-ganglionnaire (17). Cette souche qui ne protège pas tous les individus n'est aujourd'hui plus utilisée comme vaccin aux Etats-Unis (1). Les mutations responsables de l'atténuation de son caractère virulent n'ont pas été entièrement caractérisées, bien que récemment, la réintroduction des gènes inactivés *pilA* et FTT_0918 ait permis de restaurer la virulence de LVS au niveau de celle des souches de Type B (18). Actuellement, la souche LVS qui présente un taux élevé de conservation génétique avec les souches de Type A et B est largement utilisée comme modèle expérimental, du fait de sa moindre pathogénicité pour l'homme, elle est manipulable en laboratoire NSB2, elle présente une cinétique de réplication intracellulaire comparable à celle des souches virulentes et est hautement pathogène dans le modèle animal souris (19–21).

C'est en 1950, que *F. novicida* a été isolée à partir d'eau de la baie d'Ogden en Utah. Cette souche morphologiquement identique à *F. tularensis*, fermente le sucrose et est non pathogène chez l'homme. Elle présente environ 98% d'identité nucléotidique avec la souche *F. tularensis* (22). Du fait de ces caractéristiques communes, sa classification en tant qu'espèce et non sous-espèce reste controversée (23). Il s'agit de la souche la plus utilisée en recherche dans les laboratoires. En effet, contrairement aux souches de *F. tularensis*, *F. novicida* n'est pas classée en tant que MOT (MicroOrganisme et Toxines hautement pathogènes) dont la manipulation impose des autorisations réglementaires relativement contraignantes.

Enfin, la troisième espèce de *Francisella* est assez peu décrite dans la littérature. *F. philomiragia* initialement appelée *Yersinia philomiragia* a été isolée pour la première fois en 1959 à partir d'un rat musqué en Utah et l'année suivante à partir de 4 échantillons de prélèvements d'eau (24). Sur la base de caractéristiques biochimiques, d'hybridation ADN-ADN et de l'analyse de la composition en acide gras de la paroi bactérienne, elle fut reclassée dans le genre *Francisella* en 1989 (25).

Depuis les dix dernières années, la diversité du genre *Francisella* a significativement évolué. Aux espèces majeures connues, soient *F. tularensis*, *F. novicida* et *F. philomiragia*, se sont ajoutées *F. noatunensis* isolée en Norvège sur des morues d'élevage malades (26), *F. hispaniensis* isolée à partir de sang humain (27), *F. piscicida* responsable d'infections graves chez le cabillaud (28), *F. haliaticida* souche pathogène d'ormeaux géants du Japon (29) et enfin *F. guangzhouensis* isolée dans les systèmes d'air conditionné en Chine (30). Très récemment, quatre autres nouvelles espèces ont été décrites dont trois proviennent d'échantillons environnementaux : *F. salina*, *F. uliginis*, *F. frigiturris*. La quatrième espèce a été isolée chez un patient immunodéprimé : *F. opportunistica* qui est décrite comme une souche opportuniste capable d'infecter ce type de patients (11).

II- *Francisella tularensis*

I-1. Caractéristiques phénotypiques

F. tularensis est une bactérie coccobacille à Gram négatif immobile, aérobie stricte, non sporulée et de petite taille (0,2 µm de large, 0,2 à 0,7 µm de long) (Figure 2A). Cette bactérie intracellulaire facultative est entourée d'une capsule de 100 à 250 kDa pour les souches virulentes. Les lipides de la paroi sont, pour une bactérie à Gram-négatif, en proportions inhabituelles (70 %), la nature des acides gras étant particulière à ce genre bactérien. La structure particulière du lipide A du lipopolysaccharide (LPS) de *F. tularensis* est à l'origine d'un faible effet endotoxinique du fait de l'absence d'activation de la voie des récepteurs TLR4 (Toll Like Receptors) (19). L'activité catalase est faiblement positive et celles de l'oxydase et de l'uréase négatives.

F. tularensis est une bactérie exigeante dont la culture est fastidieuse et requiert des milieux de culture enrichis, notamment en L-cystéine. En ce qui concerne les milieux solides, on utilise les géloses « chocolat » enrichies en vitamines « PolyViteX » (BioMérieux®) ou des géloses « Mueller-Hinton modifié » enrichies en glucose (0,1%), L-cystéine (0,1%) et pyrophosphate de fer (0,025%). En ce qui concerne les milieux liquides, on distingue le milieu Chamberlain, le bouillon Mueller-Hinton modifié et le bouillon « Schaedler K3 » (BioMérieux®). Les bactéries poussent de manière optimale à 37°C sous 5% de CO₂. Les colonies présentent un aspect nacré et glaireux avec une absence d'hémolyse et apparaissent en 48 heures (Figure 2B).

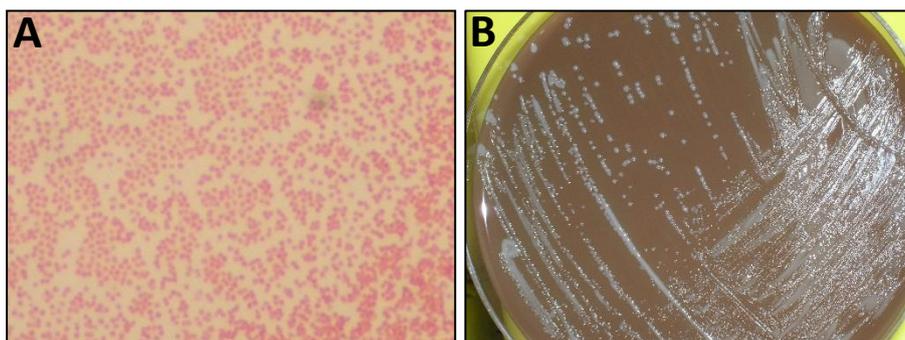


Figure 2. Aspect phénotypique de *F. tularensis* subsp *holarctica*

A. Coloration de Gram : petit coccobacille à Gram-négatif

B. Colonies nacrées sur gélose chocolat supplémentées en « PolyViteX »

II-2. Caractéristiques génomiques et phylogéographiques

Le premier génome de *Francisella* a été séquencé en 2005 (10). Il s'agit du génome de la souche *F. tularensis* subsp *tularensis* SCHU S4 qui est hautement virulente pour l'homme. Le chromosome circulaire de petite taille (1,89 millions de paires de bases) est pauvre en guanine et cytosine (32,9%) et contient 1 804 régions codantes dont 302 spécifiques du genre *Francisella*. Les analyses du génome ont mis en évidence la présence de 201 pseudogènes pouvant s'expliquer par un taux important (>10%) de mutations par délétions, insertions et substitutions entraînant la perte de certaines fonctions métaboliques : biosynthèse d'acides aminés, transports et métabolisme de l'ADN.

C'est en 2006 que l'analyse du génome de la souche *Francisella tularensis* subsp *holarctica* OSU18, isolée chez un castor mort de la tularémie dans l'état Oklahoma en 1978, a été effectuée (31). Ce génome qui possède 1,89 millions de paires de bases, est constitué de 1 934 régions codantes et présente une homologie de séquence proche de 99% avec la souche SCHU S4 de Type A. La différence majeure observée entre les deux sous-espèces *holarctica* et *tularensis* réside dans le nombre et la position de réarrangements génomiques observés et orchestrés par de nombreuses séquences d'ADN répétées, appelées séquences d'insertion ISFtu1 et ISFtu2 qui sont plus abondantes chez les souches de Type A.

Enfin, l'analyse du génome de la souche *F. novicida* U112 en 2007 par Rohmer *et al*, a montré une homologie de 97,8 % avec la souche LVS et de 98,1 % avec SCHU S4. *F. novicida* possède moins de séquences d'insertion et seulement 1% de gènes inactivés par mutations, ce qui explique sans doute la réplification plus rapide de cette souche (32).

Au cours des deux dernières décennies, les avancées technologiques en biologie moléculaire et la disponibilité de ces génomes ont permis le développement de nouveaux outils pour le typage et l'étude phylogénétique et phylogéographique des souches de *F. tularensis*. Les

techniques telles que l'électrophorèse sur gel en champs pulsé, l'analyse multi-locus de séquences répétées en tandem en nombre variable (MLVA, multilocus variable-number tandem repeat analysis), l'analyse des régions de différences, et l'étude du polymorphisme nucléotidique (SNP, Single Nucleotide Polymorphism), ont permis de distinguer des clades et sous-clades au sein des sous-espèces de *Francisella* (33).

La sous-espèce *tularensis* est sous divisée en 2 clades, A.I et A.II, génétiquement et de distribution géographique différentes. Le clade A.I, divisible en deux sous-clades (a et b) et comprenant la souche SCHU S4, est retrouvé dans l'Est des Etats-Unis et en Californie. Le second clade A.II, divisible en quatre sous-clades, est retrouvé dans les zones montagneuses de l'Ouest. Les 2 sous-populations se distinguent selon leur vecteur, leur hôte, leur distribution géographique et leur virulence (29).

Les souches de Type B présentent une diversité génétique moindre, suggérant une émergence plus récente. L'étude du polymorphisme nucléotidique des génomes d'isolats de *F. tularensis* subsp *holarctica* a permis de distinguer 4 clades principaux et de nombreux sous-clades phylogénétiques au sein même de la sous-espèce. A noter que toutes les souches françaises responsables de cas humains de tularémie sont regroupées dans le sous-clade particulier B.FNTF002-00 et se caractérisent par la présence de la région de différence RD₂₃ (33–35).

II-3. *Francisella tularensis* : un agent potentiel de bioterrorisme

Du fait de leurs caractéristiques, les sous-espèces de Type A et B sont considérées comme des agents du bioterrorisme, classées catégorie A par le CDC comme c'est le cas de *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Yersinia pestis*, *Variola* et les Filovirus (Ebola, Marburg) ainsi que les Arénavirus (Lassa, Machupo).

En effet, ces souches présentent un fort potentiel infectieux chez l'homme (<10 bactéries), sont facilement isolables à partir du réservoir animal et persistent au sein de l'environnement. Elles peuvent être transmises par aérosol et entraîner des cas graves de tularémie pulmonaire dont l'issue peut être fatale. De plus, comme nous l'avons évoqué ci-dessus, il n'existe pas de vaccin efficace contre la maladie et peu d'antibiotiques sont actifs contre ces bactéries pour lesquelles la construction de souches résistantes est largement envisageable. La propagation intentionnelle d'aérosols infectieux pourrait être à l'origine de nombreux cas de pneumonies associées à un fort taux de mortalité en l'absence de traitement (>30%). Selon un comité d'expert de l'OMS, la dispersion par aérosols de 50 kg de bactéries virulentes sur une ville de 5 millions d'habitants pourrait entraîner 250 000 victimes dont 19 000 décès (36,37).

Dans le contexte de la préparation à la réponse contre une éventuelle action malveillante (plan de prévention des risques nucléaires, radiologiques, biologiques et chimiques (NRBC)), la surveillance nationale de la tularémie a été mise en place en France en 2002. La tularémie est aujourd'hui une maladie à déclaration obligatoire (MDO) et un Centre National de Référence (CNR) a été créé afin d'analyser les sérums et de caractériser les souches de *F. tularensis* isolées à partir de patients infectés. Le CNR *Francisella* se trouve actuellement au sein du laboratoire de bactériologie du CHU de Grenoble dirigé par le Pr Max Maurin.

II-4. Pouvoir pathogène et facteurs de virulence

II-4.1. Virulence

La différence de virulence entre les sous-espèces de *F. tularensis* a été déterminée *via* la mesure du nombre de micro-organismes requis pour entraîner la mort de 50 à 100% des modèles animaux infectés (souris, lapins, cochons d'Inde). Le délai entre l'étape d'infection et la mort de l'animal constitue également un critère de virulence.

Les multiples expériences d'infection montrent que les bactéries appartenant à la sous-espèce *tularensis* sont les plus virulentes, quelle que soit la voie de contamination et le modèle animal utilisés.

Les bactéries *F. tularensis* de Type A et B inoculées par voie sous-cutanée sont toutes les deux hautement virulentes chez la souris et le cochon d'Inde avec une dose létale DL_{100} égale à 1 bactérie (38). Le temps nécessaire pour entraîner la mort de l'animal est toutefois plus long pour la sous-espèce *holarctica*. Au sein de la sous-espèce *tularensis*, les résultats montrent que les bactéries du clade A.I.b entraînent une mort plus précoce des souris infectées par voie intradermique que les bactéries du clade A.I.a et A.II (39). Chez le lapin, en revanche, la différence de virulence entre les 2 sous-espèces est nettement plus marquée avec une DL_{100} égale à 1 pour les souches de Type A administrées par voie sous-cutanée *versus* 10^9 bactéries pour les souches de Type B.

Bien que les souches de Type B soient moins virulentes, elles sont à l'origine de plus de cas de tularémie à travers le monde (4,19). Enfin, et bien que *F. novicida* soit très rarement la cause de maladie chez l'homme, cette souche est couramment utilisée comme substitut de laboratoire pour *F. tularensis*. En effet, *F. novicida* dont le génome présente de fortes homologies avec celui de *F. tularensis* (97.8%), est une bactérie hautement pathogène chez la souris (40,41). De plus, bien que des différences aient été décrites en fonction de la voie d'injection et du modèle animal utilisé, son injection chez la souris, le cochon d'inde, le lapin

ou le rat peut être fatale, la virulence de *F. novicida* étant toutefois moindre que celle de *F. tularensis* SCHU S4 (39).

II-4.2. Cycle de vie intracellulaire

F. tularensis est une bactérie intracellulaire facultative. Son pouvoir pathogène réside dans sa capacité à entrer, persister et proliférer dans différents types de cellules hôtes qui sont les cellules phagocytaires telles que les macrophages et les cellules dendritiques mais également les hépatocytes et les cellules épithéliales et endothéliales (20). La bactérie est décrite dans de nombreuses publications comme un pathogène « discret » capable d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte tout en induisant une libération de cytokines par la cellule hôte suivie de la mort de celle-ci (20,42,43). De plus, *F. tularensis* possède des voies métaboliques et des systèmes de capture des nutriments lui permettant d'assurer sa survie intracellulaire (44).

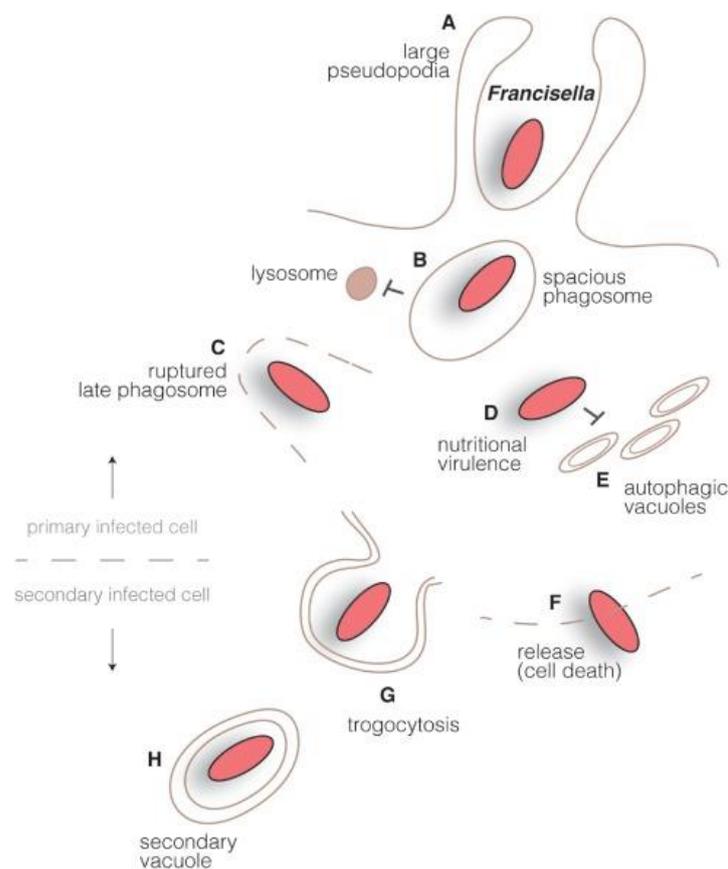


Figure 3. Cycle de vie intracellulaire de *F. tularensis* (d'après Pizzaro-Cerdà *et al.* 2016)

Les cellules phagocytaires et notamment les macrophages, constituent le principal compartiment cellulaire de multiplication de la bactérie. De ce fait, nous ne détaillerons que

le cycle de vie intracellulaire de *F. tularensis* dans les macrophages. Les principales étapes schématisées Figure 3, sont la phagocytose *via* l'attachement suivi de l'internalisation dans les cellules hôtes, l'échappement du phagosome, la réplication et la survie dans le cytosol et enfin la libération de la bactérie qui fait suite à la lyse de la cellule infectée et entraîne un autre cycle infectieux (45).

- **Attachement et internalisation dans la cellule hôte**

L'internalisation de la bactérie (A) est initiée par une étape de reconnaissance et d'attachement à la surface de la cellule hôte *via* l'interaction adhésine-récepteur. Bien que de nombreux récepteurs cellulaires aient été identifiés, les facteurs bactériens qui contribuent à l'attachement de la bactérie à la cellule hôte parmi lesquels les pili de Type IV, la protéine membranaire FsaP (FTL_1658) de LVS ou le facteur d'élongation Tu (EF-Tu) sont encore mal caractérisés (46). Cette étape de phagocytose met en jeu différents récepteurs présents à la surface de la membrane du macrophage. En l'absence d'opsonisation, les récepteurs du mannose (MR) jouent un rôle important dans l'adhésion de la bactérie. En effet, le blocage de ces récepteurs par des anticorps, entraîne une diminution de l'entrée de *F. tularensis* dans les cellules hôtes (47–49). Cette inhibition n'est cependant pas totale ce qui suggère l'existence d'autres récepteurs impliqués dans l'adhésion de la bactérie.

L'opsonisation de *F. tularensis*, c'est-à-dire son recouvrement par des molécules dites opsonines, favorise son internalisation (49–51). Le facteur du complément C3 se lie au LPS et à la capsule de la bactérie et permet l'adhésion de celle-ci aux récepteurs du complément CR3 présents à la surface du macrophage. Les récepteurs « scavenger » A (SR-A), du fragment Fc des IgG (FcγRs) et la nucléoline ont également été décrits comme ayant un rôle dans l'adhésion des bactéries opsonisées. Après opsonisation et adhésion, la formation d'un long pseudopode asymétrique permet l'entrée de la bactérie à l'intérieur d'une vacuole d'endocytose qui rétrécit progressivement pour devenir un phagosome (Figure 3).

- **Echappement du phagosome**

Après phagocytose, *F. tularensis* se retrouve dans un phagosome (B). Ce “*Francisella*-containing phagosome” (FCP) exprime à sa surface les protéines EEA-1 et CD63 puis LAMP-1, LAMP-2 et Rab7 qui sont respectivement les marqueurs endosomaux précoces et tardifs. A l'intérieur du phagosome, la bactérie fait face aux systèmes de défenses antimicrobiens en inhibant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) *via* le blocage de la formation du complexe de l'enzyme NADPH oxydase. *F. tularensis* possède également des enzymes

telles que la superoxyde dismutase, la catalase et l'acide phosphatase qui lui permettent de résister à l'environnement hostile du phagosome (45). En fonction de l'état d'opsonisation des bactéries, cet état phagosomal peut durer 30 minutes pour les bactéries non-opsonisées et jusqu'à 4 heures pour les bactéries opsonisées. L'acidification ou non du FCP reste une notion discutée. Certaines études montrent que celle-ci pourrait jouer un rôle important dans l'échappement de la bactérie (52), résultats en contradiction avec les travaux de l'équipe de Clemens (53).

Au lieu de fusionner avec le lysosome, la bactérie a la capacité de dégrader la membrane phagosomale et est libérée dans le cytosol (C). Les mécanismes moléculaires impliqués ne sont pas totalement caractérisés bien qu'il ait été montré que la délétion de gènes de l'îlot de pathogénicité de *F. tularensis* (FPI) rendait impossible l'échappement de la bactérie (54,55). Une fois libérées dans le cytosol, la disponibilité de nutriments favorise la réplication bactérienne (D) qui s'initie rapidement et de manière assez intense avec un temps de duplication intracellulaire de la souche virulente SCHU S4 de l'ordre d'une heure (56).

- **Diffusion de la bactérie**

Enfin, la bactérie qui a la capacité d'échapper à l'autophagie (E) diffuse dans l'environnement extracellulaire suite à la lyse de la cellule *via* apoptose et/ou pyroptose (F). Récemment, un nouveau mécanisme de dissémination du pathogène a été identifié. Il s'agit de la trogocytose (G, H), un phénomène unique qui permet l'échange de contenu intracellulaire par contact direct entre deux cellules donneuses et receveuses (57,58).

I-4.3. Facteurs de virulence

Au cours des dernières décennies, les connaissances relatives aux facteurs de virulence de *F. tularensis* ont été significativement accrues, notamment grâce à la mise en place d'approches génétiques qui ont permis d'identifier de nombreux gènes impliqués dans la pathogénicité de cette bactérie.

La création d'une banque de transposons de *F. novicida* par Gallagher *et al.* a largement contribué à l'identification de gènes nécessaires à la virulence de la bactérie (59). Il s'agit notamment des gènes du FPI impliqués dans l'échappement du phagosome, des gènes codant pour l'antigène O du LPS ainsi que de 44 autres gènes essentiels pour la virulence de *F. novicida* (20,60). La plupart de ces gènes ont un rôle dans l'adaptation au milieu intracellulaire, l'acquisition de nutriments et la modification de la réponse immune de l'hôte.

De la même manière, un criblage des gènes impliqués dans la réplication de la bactérie *F. tularensis* SCHU S4 dans les macrophages a été réalisé (61). Les données obtenues ont montré que les mutants de la banque de transposon de SCHU S4 délétés pour la production de la capsule, de l'antigène O, pour l'expression de gènes du FPI ou encore nutritionnels présentaient un défaut de réplication dans les macrophages.

Globalement, le pouvoir pathogène de *F. tularensis* est principalement médié par les facteurs de virulence suivants : la capsule, le LPS, le pilus de type IV et les protéines codées par les gènes du FPI que nous allons détailler ci-dessous.

- **La capsule**

On appelle capsule, l'enveloppe qui entoure la paroi de certaines bactéries (Figure 4) (62). Il s'agit d'un système de défense de la bactérie qui se protège contre la lyse induite par le complément, la phagocytose et la réponse immune de l'hôte. Elle peut être de nature polysaccharidique comme chez *E. coli*, *Neisseria meningitidis* et *Streptococcus pneumoniae* ou protéique comme chez *Bacillus anthracis*.

Les bactéries *F. tularensis* de Type A et B possèdent une capsule de nature polysaccharidique, d'une épaisseur de 0,02 à 0,04 μm , avec une masse moléculaire comprise entre 100 et 250 kDa. L'analyse biochimique de la capsule montre la présence d'une structure identique à l'antigène O composant le LPS. La capsule contient un motif répété de 3 sucres, le 2-acetamido-2,6-dideoxy-o-glucose (o-QuiNAc), le 4,6-dideoxy-4-formamido-D-glucose (o-Qui4NFm), et le 2-acetamido-2-deoxy-o-galacturnoamide (o-GalNAcAN) (63). L'analyse de la capsule purifiée montre que ni le lipide A, ni l'acide 2-keto-3-deoxyoctulonic (KDO) (constituants du LPS) ne sont attachés à la structure capsulaire suggérant que le LPS et la capsule ne sont pas liés.

La capsule de *F. tularensis* joue un rôle essentiel dans la virulence *in vitro* et *in vivo*. Une étude a montré que la perte de la capsule chez la souche SCHU S4 était à l'origine d'une diminution de la réplication intracellulaire due à l'apoptose ou pyroptose de la cellule hôte (64). Ceci souligne l'importance de la capsule qui permet d'éviter une induction précoce de la mort du macrophage et la destruction de la niche répliquative. De la même manière, un mutant de LVS non capsulé s'est avéré moins virulent dans des modèles de macrophages et de souris infectés (65).

Enfin, le rôle de la capsule dans la résistance à l'activité bactéricide du sérum n'est pas encore clarifié. Alors que certaines études suggèrent que la capsule permet de bloquer la fixation des

anticorps et du complément à la surface bactérienne, d'autres montrent que la résistance au sérum ne peut pas lui être exclusivement attribuée (19).

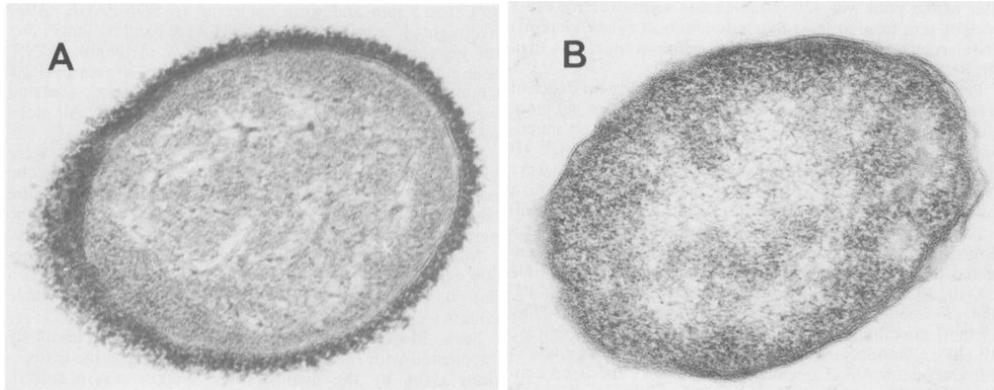


Figure 4. Morphologie de la souche parentale (A) et du mutant déficient en capsule (B) de *F. tularensis* LVS (d'après Sandström et al. 1988)

- **Le Lipopolysaccharide**

Le LPS est un composant essentiel de la face externe de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Il est composé de trois parties : le lipide A, le core oligosaccharidique et l'antigène O (Figure 5) (66). Le lipide A constitue l'ancrage hydrophobique du LPS à la membrane (Figure 6). Il est doté de propriétés toxiques et correspond à l'endotoxine des bactéries à Gram négatif. Le lipide A représente ainsi le domaine responsable de l'activité biologique du LPS et de l'activation du système immunitaire inné. Une variation dans le domaine lipide A constitue une des stratégies des bactéries à Gram négatif pour échapper à la reconnaissance par le système immunitaire (67). C'est le cas de *F. tularensis*, bactérie qui synthétise un lipide A qui n'est que très faiblement reconnu par le TLR4. Son lipide A atypique est constitué de 4 chaînes d'acides gras acylés de 16 à 18 carbones contrairement à celui de nombreuses bactéries à Gram négatif dont *E. coli* qui est constitué de 6 chaînes d'acides gras acylés de 12 à 14 carbones et d'un groupement phosphate permettant l'interaction avec TLR4 et l'activation d'une réponse pro-inflammatoire (68).

Lors de l'infection de la cellule hôte, le LPS bactérien induit la production de molécules pro-inflammatoires qui, en cascade, vont conduire à l'élaboration d'une réponse immunitaire innée. La nature du LPS des bactéries du genre *Francisella* leur permet de déjouer la surveillance du système immunitaire. Toutefois, des travaux récents publiés par l'équipe de Thomas Henry ont montré que chez l'homme, la caspase 4 et ses cofacteurs contribuent à la neutralisation de l'agent infectieux ce qui pourrait rendre compte d'une plus grande sensibilité de l'homme au choc septique que ne le sont les souris (69).

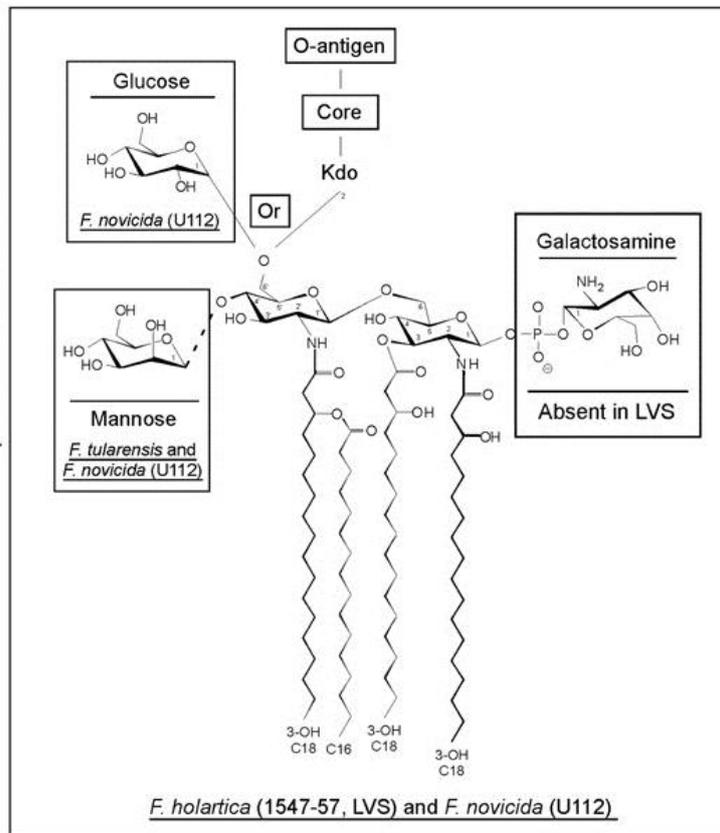


Figure 5. Structure du LPS de *F. holarctica* et *F. novicida* (d'après Gunn et Ernst. 2007)

- **Le pilus de type IV**

Les pili de type IV sont des appendices filamenteux flexibles multifonctionnels. Ils participent à l'adhésion et l'agrégation bactérienne, à la mobilité par contraction et à la formation de biofilm. Ces propriétés en font des acteurs importants pour la colonisation de l'hôte et la virulence de certains pathogènes comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria spp*, *vibrio cholerae* et *Moraxella catarrhalis* (Figure 6) (70).

Les analyses génomiques montrent que les bactéries du genre *Francisella* possèdent tous les gènes requis pour l'expression d'un pilus de type IV fonctionnel incluant les gènes codants pour 6 sous-unités pilines constituant le pilus: *pilA*, *pilE*, *pilV*, FTT0861, FTT0230, and FTT1314. Toutefois, des différences ont été identifiées entre les sous-espèces de *Francisella*. L'ensemble de ces gènes est conservé chez les souches de Type A alors qu'on les retrouve sous forme de pseudogènes (*pilE*, *pilV*, FTT0861) chez les souches moins virulentes de Type B.

Parmi les différents gènes codant pour une sous-unité piline, seul *pilA* est nécessaire à la virulence des souches de Type A et B. L'étude d'une souche de Type B isolée à partir d'un lièvre possédant la délétion spontanée de *pilA* a montré une virulence réduite à des niveaux comparables à ceux de la souche LVS, qui est également dépourvue de *pilA* et de plusieurs gènes d'assemblage du pilus (71).

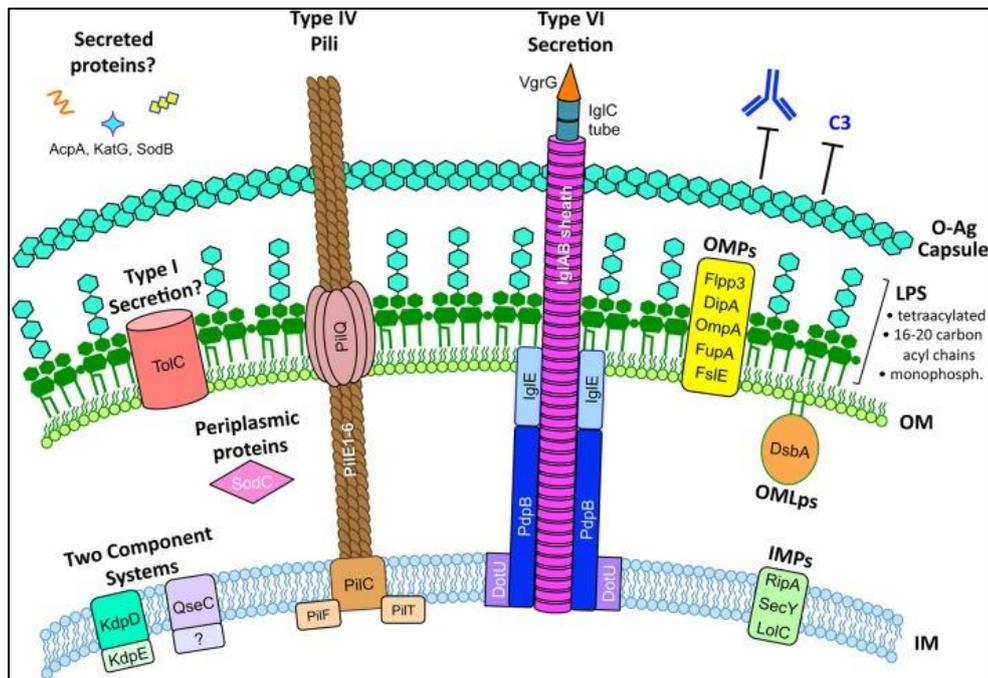


Figure 6. Représentation schématique de l'enveloppe de *F. tularensis* et son rôle dans la virulence (d'après Hannah and Jason Huntley. 2015)

- **L'îlot de pathogénicité de *Francisella***

Les gènes nécessaires à la survie intracellulaire et à la virulence de *Francisella* sont regroupés dans le FPI dont la taille est d'environ 34 kb. Cet îlot de pathogénicité est dupliqué dans les souches virulentes des sous-espèces *tularensis* et *holarctica* alors qu'un seul exemplaire est présent chez *F. novicida* et *F. philomiragia* ce qui pourrait expliquer la différence de virulence des souches chez l'homme. Le pourcentage de GC dans cet îlot est plus faible que pour le reste du génome, ce qui témoigne d'un transfert horizontal de gènes. Le FPI est constitué de 16 à 19 cadres ouverts de lecture répartis en deux opérons et sous le contrôle positif de 5 protéines MglA, SspA, FevR (PigR), MigR, et PmrA. L'opéron *iglABCD* code les protéines nécessaires à la réplication intra-macrophagique et à la virulence ; IglA, IglB et IglC sont essentiels à l'échappement bactérien du phagosome dans le cytoplasme. Des similarités entre le système de sécrétion de type VI (SST6) de *Vibrio cholerae* et le FPI de *Francisella* ont été mises en évidence. En particulier, il est important de souligner que le FPI de *Francisella* code

un système de sécrétion de type VI (SST6), très différent des autres SST6 décrits et dont le fonctionnement et les effecteurs sont mal connus mais dont les homologies avec *Shigella flexneri* suggèrent qu'il pourrait intervenir dans la lyse de la vacuole de phagocytose (72). *F. novicida* possède un autre îlot génomique nommé FNI pour *F. novicida* Island, et qui coderait un autre SST6 qui n'est impliqué ni dans la réplication bactérienne dans les macrophages de mammifère ni dans un modèle murin de tularémie (73). Selon ces auteurs, le FNI pourrait favoriser la réplication de *F. novicida* dans l'amibe.

De nombreux autres déterminants de virulence ont pu être caractérisés au cours des dernières années. Nous pouvons citer de manière non exhaustive les transporteurs d'acides aminés impliqués dans la « virulence nutritionnelle », tels que les transporteurs GadC, AnsP, IleP et ArgP respectivement transporteurs de glutamate, d'asparagine, d'isoleucine et d'arginine (44). Les protéines impliquées dans l'acquisition du fer sont également en lien avec la virulence de la bactérie (74). Il s'agit en particulier des protéines codées par l'opéron *fslABCDEF* et *FeoB* qui sont sous le contrôle transcriptionnel de *Fur* (Ferric Uptake Regulator) et de *FupA* (Fer-Utilization Protein). Enfin les appareils de sécrétion permettant le relargage de protéines impliquées dans la survie intracellulaire constituent des facteurs de virulence essentiels (19).

III- La tularémie

III-1. Réservoirs et modes de contaminations

III-1.1. Niche écologique

F. tularensis possède de nombreux réservoirs animaux vertébrés et invertébrés. La bactérie est préférentiellement retrouvée chez les lagomorphes (lièvres et lapins) et rongeurs (campagnols, écureuils et castors) qui constituent la source la plus importante d'infections chez l'homme (35,39). Des cas d'infections d'animaux domestiques comme le chat et le chien ont également été rapportés aux Etats-Unis et en Norvège (75–77). Le fait que les animaux développent le plus souvent des infections aiguës fatales suggère qu'il existe très certainement d'autres réservoirs « à long terme » de la bactérie.

Les arthropodes hématophages dont les tiques et les moustiques peuvent être infectés par l'eau ou les animaux contaminés et transmettre la bactérie à l'homme ou l'animal par morsure (78,79). En Europe, les tiques les plus fréquemment retrouvées appartiennent au genre *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalinema*, *Ixodes*, *Boophilus*, *Hyalomma* et *Rhipicephalus* (35). Une étude a montré que la bactérie pouvait être transmise entre les différents stades de développement de la tique *Ixodes ricinus* (80). En revanche, il n'y a pas de transmission

transovarienne de *F. tularensis* subsp *holarctica* chez la tique ce qui pose la question de son rôle en tant que réservoir. En 2015, Bäckman *et al.* ont démontré la possibilité de transmission des bactéries chez la souris par des moustiques adultes ayant acquis le pathogène à partir de leur habitat larvaire aquatique (81). Plus que des réservoirs, les arthropodes sont davantage considérés comme des vecteurs permettant le transfert du pathogène de son réservoir animal ou aquatique vers l'homme ou d'autres animaux.

Des analyses par PCR (polymerase chain reaction) en temps réel ont mis en évidence la présence de la souche *F. tularensis* subsp *holarctica* dans des échantillons d'eau et de sédiments recueillis en Suède, ce qui suggère que la bactérie persiste dans l'environnement (82). Une autre étude menée sur des échantillons d'eau prélevés en zone probable de contamination, ont confirmé que l'eau était également une source d'infection en Turquie (83). Par ailleurs, il a été montré que *F. tularensis* était capable de se multiplier à l'intérieur des amibes *Acanthamoeba* ce qui pourrait expliquer ce mécanisme de persistance (84).

Ainsi, la survie de la bactérie dans la nature implique l'existence d'un cycle dans lequel les mammifères hôtes favorisent l'amplification de la souche et les arthropodes sa vectorisation à l'homme ou d'autres espèces animales.

III-1.2. Modes de contamination

La tularémie est une zoonose qui peut être transmise de l'animal à l'homme. La contamination intervient de manière directe ou indirecte. La transmission directe peut se faire par voie cutanéomuqueuse lors de la manipulation d'animaux infectés (spécialement les lièvres), par voie digestive après ingestion d'aliments ou d'eau contaminés ou encore par voie respiratoire *via* l'inhalation d'aérosols lors de la manipulation d'animaux infectés ou à l'occasion de travaux de jardinage sur un terrain contaminé. La transmission indirecte vectorielle repose essentiellement sur des morsures de tiques ou piqûres de moustiques. Les personnes les plus touchées sont les chasseurs, fermiers et personnels de laboratoire. La transmission d'homme à homme n'a jamais été documentée (35).

III-1.3. Cycle de vie de *Francisella tularensis* subsp *holarctica* en Europe

Sur la base de données cliniques et épidémiologiques publiées dans la littérature, en Europe, deux cycles de vie de la bactérie *F. tularensis* sont pressentis: terrestre et aquatique (Figure 7). Le cycle de vie terrestre est majoritairement décrit dans la plupart des pays Européens incluant l'Autriche, l'Allemagne, la Suisse, la France, la Hongrie, la Slovaquie et la République Tchèque (14,85–87). Les lagomorphes, les rongeurs terrestres et les tiques sont la principale

cause d'infection. Dans ce contexte, les cas sont rares et sporadiques bien que des cas groupés familiaux puissent survenir après ingestion d'aliments contaminés.

Le cycle de vie aquatique a été rapporté en Bulgarie, Kosovo, Turquie, Suède et Finlande. L'environnement aquatique (rivières, lacs, puits d'eau, étangs) contaminé par les excréments et les carcasses d'animaux morts constitue la source première d'infection de l'homme (35,88–90). Le nombre de cas dus au cycle de vie aquatique est plus important que pour le cycle de vie terrestre. Les deux cycles de vie peuvent co-exister au sein du même pays à différents endroits et à différents temps comme c'est le cas en Espagne (35).

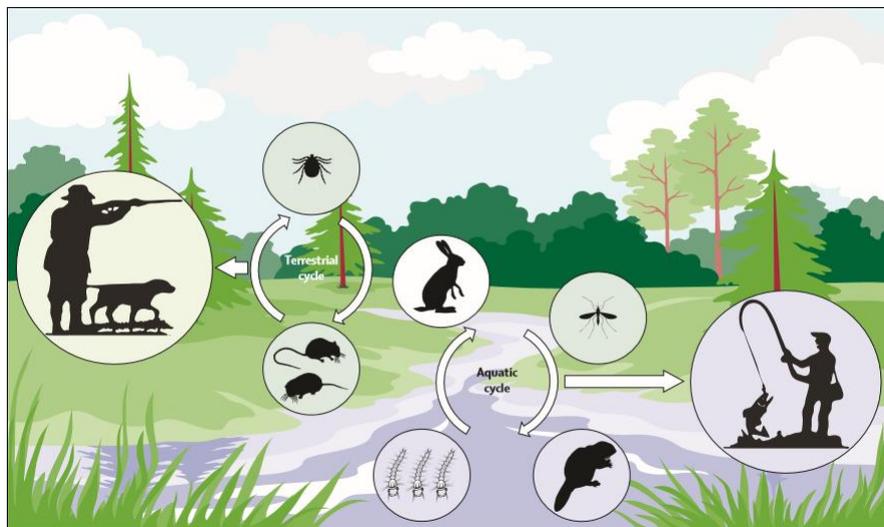


Figure 1: The two main lifecycles—terrestrial and aquatic—of *Francisella tularensis* in Europe
Ticks and rodents are reservoir hosts in the terrestrial cycle. Lagomorphs, mosquitoes, mosquito larvae, and rodents are reservoirs in the aquatic cycle.

Figure 7. Les deux principaux cycles de vie de *F. tularensis* en Europe (d'après Maurin et Gyuranecz. 2016)

III-2. Données épidémiologiques

III-2.1. Distribution géographique de la tularémie

La tularémie sévit principalement dans les pays de l'hémisphère nord et de rares cas sporadiques ont été rapportés dans l'hémisphère sud. En 2017, une souche de *F. tularensis* subsp *holarctica* biovar *japonica* a été isolée chez un possum à queue en anneaux malade à Sydney en Australie (91). Les données épidémiologiques montrent que la tularémie est une maladie émergente ou ré-émergente dans de nombreux pays de l'Union Européenne (UE) (92). Depuis 2005, le Centre Européen pour la prévention et le contrôle des maladies assure le recensement annuel des cas de tularémie dans la zone UE. En Europe, la maladie survient majoritairement dans la partie Est du continent. Des zones d'endémies ont été décrites en Turquie, Russie, Finlande et Suède (93). De 1992 à 2012, sur les 18 343 cas de tularémie

rapportés en UE, 25% ont été déclarés en Suède, 22% en Finlande et 13% en Turquie (92). Des épidémies à l'origine de centaines de cas ont eu lieu au Portugal, en Suède mais également en Espagne et Turquie (94,95). Bien que la pathologie soit rare en Allemagne, on observe une réémergence de celle-ci, avec la multiplication par 10 du nombre de cas enregistrés depuis 15 ans. Ceci peut s'expliquer par l'augmentation de la présence du pathogène dans l'environnement, des contacts entre l'homme et l'environnement ou encore de la déclaration plus systématique de la maladie (96). La Grèce, Chypre, l'Islande, l'Irlande, le Luxembourg, la Lettonie, la Macédoine, Malte et le Royaume-Uni sont des pays dans lesquels la maladie n'a pas encore été déclarée.

En ce qui concerne les Etats-Unis, et selon le CDC, 126 cas ont été déclarés en moyenne par an de 2000 à 2010. Plus de 50% de ces cas ont été enregistrés en Arkansas, Missouri, Dakota du Sud et Oklahoma.

III-2.2. Données épidémiologiques en France (Données CNR)

En France, du 1^{er} octobre 2002 au 31 décembre 2012, 433 cas de tularémie ont été diagnostiqués et déclarés, soit une incidence annuelle moyenne de 0,07 cas pour 100 000 habitants. Parmi les 433 cas déclarés, 395 étaient des cas sporadiques et 39 (9%) appartenaient à 10 épisodes de cas groupés. Un pic épidémique a été enregistré (environ 2 fois et demi le nombre moyen annuel de cas) durant l'hiver 2007/2008. Cette épidémie s'est produite de manière concomitante à l'augmentation du nombre de cas mis en évidence chez le lièvre (97). Environ 60% des cas déclarés ont été expertisés par le CNR *Francisella* pour confirmation du diagnostic et recherche d'éventuelles résistances aux antibiotiques.

Entre 2007 et 2017, le CNR *Francisella* a expertisé 1 960 dossiers de patients suspectés de tularémie. Le diagnostic a été confirmé pour 253 d'entre eux, dont 175 hommes et 78 femmes (sexe ratio : 2,24), d'âge moyen 49,5 ans. Parmi eux, 165 cas ont été confirmés (58 par culture, 103 par PCR, 15 par séroconversion ou multiplication par 4 du titre sérologique). Les 88 cas restants ont été classifiés comme probables (un titre sérologique positif associé à des données cliniques et épidémiologiques compatibles). L'ensemble des cas confirmés par culture ou PCR étaient des infections à *F. tularensis* subsp *holarctica* biovar I. La majorité des cas sont survenus de manière sporadique et sur le territoire de France métropolitaine. Quelques cas groupés sont survenus après consommation d'aliments contaminés notamment des lièvres. Outre son rôle d'expertise, la mission du CNR est d'assurer la caractérisation et le stockage des souches de *Francisella*. Certaines souches de cette collection ont été utilisées dans le cadre de cette thèse.

III-3. Diagnostic clinique et biologique

III-3.1. Formes cliniques

Le diagnostic est difficile à établir d'autant que la maladie est rare en France et les signes cliniques peu évocateurs. En France, seule la souche de Type B de virulence modérée est retrouvée. La symptomatologie est très protéiforme, le plus souvent il s'agira d'un état grippal. C'est pourquoi, le contexte épidémiologique est d'une importance capitale pour orienter les cliniciens.

La tularémie se manifeste après une période d'incubation de 3 à 5 jours par un syndrome pseudo-grippal se traduisant par les signes cliniques suivants : fièvre, maux de têtes, myalgies et arthralgies. Il existe six formes cliniques majeures de la pathologie qui dépendent de la porte d'entrée de la bactérie (1,35). Ces formes sont décrites ci-dessous.

- **Formes ulcéro-ganglionnaire et ganglionnaire**

La transmission se fait par voie cutanée au niveau de la peau et des muqueuses. Elle se manifeste par l'apparition d'un ulcère cutané d'inoculation (Figure 8A), associé à des adénopathies se situant sur le territoire de drainage de la lésion. La forme ganglionnaire pure est dépourvue de lésions initiales (Figure 8B).

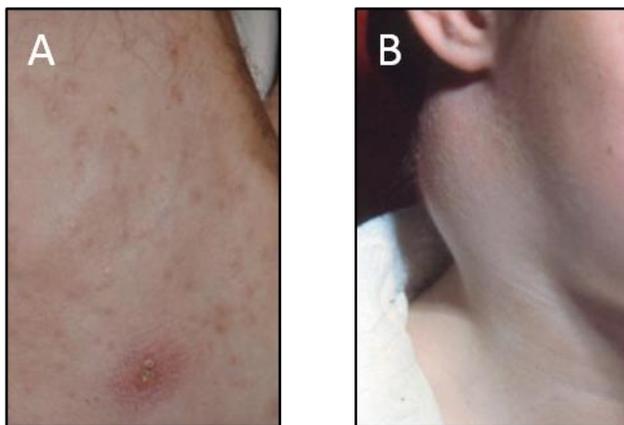


Figure 8. Ulcère d'inoculation et tularémie ganglionnaire

Ces formes sont les plus fréquentes. En France, elles représentent 72% des cas déclarés de 2002 à 2012 selon l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS) (Figure 9). Entre 2007 et 2017, sur les 253 patients répertoriés par le CNR, 117 (46,2%) cas correspondaient à une forme ganglionnaire ou ulcéro-ganglionnaire.

- **Forme pharyngo-ganglionnaire**

Elle survient après ingestion d'eau ou d'aliments contaminés et se traduit par une pharyngite chronique s'accompagnant parfois d'ulcères muqueux associés à des ganglions lymphatiques cervicaux gonflés et douloureux.

- **Forme oculo-ganglionnaire de Parinaud**

C'est une forme rare (5% des cas) qui se manifeste par une conjonctivite unilatérale très douloureuse accompagnée d'adénopathies localisées.

- **Forme pulmonaire**

Cette forme clinique rare survient après inhalation d'aérosols infectés ou dissémination hémotogène de la bactérie à partir d'une autre forme clinique. L'inhalation de 10 bactéries peut suffire à entraîner la maladie. Elle se manifeste par une pneumonie aiguë ou chronique. L'atteinte respiratoire fait partie des signes de gravité de la maladie et peut mettre en jeu le pronostic vital, avec possibilité de syndrome de détresse respiratoire. En l'absence de traitement adapté, le taux de mortalité peut atteindre 30% dans le cas d'infection avec le biotype A.

- **Forme typhoïdique**

Il s'agit d'une forme septicémique qui peut être associée à une forme digestive. Elle se traduit par une fièvre avec prostration et perte de poids.

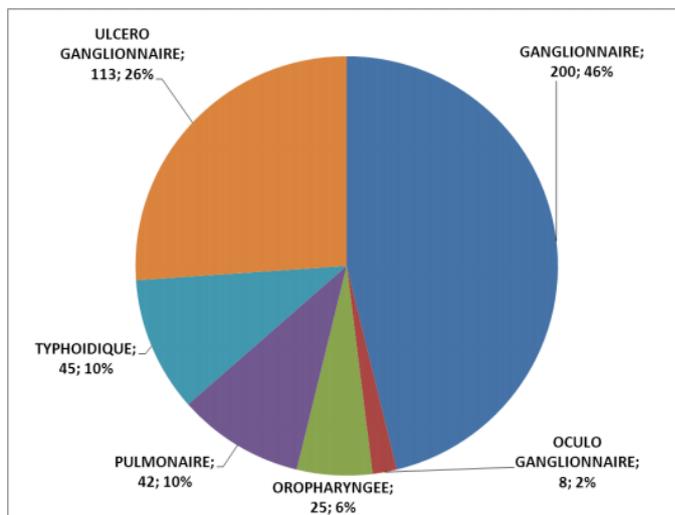


Figure 9. Distribution des formes cliniques parmi les cas de tularémie déclarés en France de 2002 à 2012 selon l'InVS (d'après Mailles and Vaillant. 2014)

III-3.2. Diagnostic biologique

Le diagnostic de la maladie de la tularémie s'appuie sur les critères définis par l'OMS.

Un cas de tularémie est confirmé dès lors que le patient présente une clinique et un contexte épidémiologique compatible avec la pathologie, associé à l'un des critères suivants :

- Une culture positive à *F. tularensis*
- Une séroconversion ou la multiplication par 4 du titre d'anticorps, déterminée par un test de micro-agglutination (MAT) et/ou test d'immunofluorescence indirecte (IFI) à partir de deux sérums collectés à deux semaines d'intervalles
- Une PCR positive à *F. tularensis*

Le diagnostic biologique repose essentiellement sur la sérologie et la biologie moléculaire.

- **Culture**

F. tularensis est une bactérie exigeante dont la culture est fastidieuse. Sa croissance requiert un milieu riche complétement en cystéine ou avec un milieu nutritif (PolyViteX) et une incubation à 37°C en présence de 5% de CO₂ pendant 24 à 48 heures.

Cette bactérie est difficilement isolée (< 10 % des cas) à partir de prélèvements ganglionnaires, cutanés, conjonctivaux, oropharyngés ou sanguins. L'utilisation d'antibiotiques sélectifs dans les milieux et la diminution du délai entre le prélèvement et la mise en culture pourraient favoriser son isolement (98). Récemment, une étude a montré que sur 43 tentatives de mise en culture de *F. tularensis* à partir d'échantillons de ganglions lymphatiques positifs par PCR en temps réel pour la bactérie, seulement 1 souche a pu être isolée (2%), ce qui confirme la difficulté d'isolement de *F. tularensis* (99). Au CNR *Francisella*, 13 souches ont été isolées à partir de prélèvements humains au cours de l'année 2016.

Il est important de souligner que *F. tularensis* étant hautement virulente, sa manipulation se fait dans un laboratoire de niveau de sécurité microbiologique de niveau 3 (NSB-3).

- **Spectrométrie de masse : MALDI-TOF**

L'identification rapide et à bas coût des sous-espèces de bactéries du genre *Francisella* peut aujourd'hui être réalisée par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation- -Time of Flight Mass Spectrometry) (100). Cette technique impose cependant d'isoler au préalable la souche, ce qui n'est pas très fréquent comme nous venons de l'indiquer. Pour des raisons de sécurité, la souche doit être inactivée avant la réalisation du dépôt sur la plaque de MALDI-TOF, l'automate étant généralement situé à l'extérieur du laboratoire P3.

- **Sérologie**

Les tests sérologiques sont effectués en première intention. Il s'agit de mettre en évidence les anticorps (IgM et IgG) dirigés contre la bactérie et présents dans le sérum des patients par une technique d'immunofluorescence indirecte et une technique de séro-agglutination (micro et macro-agglutination) sur plaque, qui sont les techniques les plus fréquemment utilisées notamment au CNR. La souche LVS de virulence atténuée est généralement utilisée pour préparer l'antigène qui sert de témoin positif. Les anticorps sont détectables environ 1 à 2 semaines après la survenue des premiers signes cliniques, atteignent un taux maximal en 3 à 4 semaines puis diminuent progressivement. Le seuil significatif est de 1:160 en macro-agglutination et 1:128 en micro-agglutination. Le diagnostic est confirmé dès lors que l'on observe une séroconversion ou une multiplication par un facteur d'au moins 4 des titres sérologiques sur deux sérums prélevés à 15 jours d'intervalle (101). Les résultats de sérologie sont spécifiques malgré des réactions croisées avec les bactéries du genre *Brucella* par exemple. Récemment, une étude comparative entre les tests sérologiques « faits maison » (MAT et IFI) utilisés au laboratoire de diagnostic du CHUGA et des tests commerciaux rapides d'immuno-chromatographie (ICT) et de détection immuno-enzymatique ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) a été réalisée au CNR. Les résultats indiquent que le test ELISA commercial permet une détection plus précoce des anticorps spécifiques dirigés contre *F. tularensis* (1 à 2 semaines vs 2 à 3 semaines après le début des symptômes) par rapport aux tests de MAT et d'IFI. Ce test ELISA peut donc être utilisé dans le diagnostic de la tularémie mais doit être accompagné par d'autres tests tels que la MAT et l'IFI, particulièrement dans les zones de faible endémie. En revanche la faible spécificité de la méthode ICT n'encourage pas à utiliser cette technique en routine (102).

- **Biologie moléculaire : PCR**

Les techniques de biologie moléculaire sont essentielles pour établir le diagnostic d'infection à *F. tularensis*. La PCR basée sur l'amplification de séquences spécifiques du génome bactérien présente deux avantages : 1) elle peut être réalisée à partir de prélèvements cliniques (sang, lésions cutanées, biopsies ganglionnaires...) ne nécessitant pas l'isolement de la bactérie et 2) de très faibles quantités de l'agent infectieux peuvent être détectées. Les gènes cibles pour l'identification du genre *Francisella* sont :

- *ISFtu2* : séquence d'insertion (103)
- Un gène codant une protéine de 23 kDa (104)
- *tul4* : code une protéine de surface (105)

- *fopA* : code une protéine de la membrane externe (106)
- *lpnA* : code une lipoprotéine (107)

La séquence d'insertion *ISFtu2* est utilisée pour discriminer les espèces. Le séquençage de la région inter-génique de l'ARN 16S-23S permet de différencier les sous-espèces (108).

Des études cliniques ont montré l'intérêt de la PCR dans le diagnostic de la tularémie ulcéroganglionnaire (85). De plus, pour améliorer la détection de *F. tularensis* dans les échantillons complexes, Versage *et al.* ont développé une PCR multiplexe ciblant *ISFtu2*, le gène codant la protéine de 23 kDa et *tul4* (109). Leurs résultats montrent que la technique est plus sensible que la culture.

Le CNR a recours à la PCR ciblant la séquence d'insertion *ISFtu2* pour réaliser le diagnostic de la tularémie à partir des prélèvements cliniques. En cas de réponse positive, une seconde PCR en temps réel permet de vérifier l'appartenance de la bactérie au Type B. Cette PCR cible une jonction entre *ISFtu2* et une région flanquante en 3' (GenBank AY06) (110).

D'autres méthodes ont été développées pour différencier les sous-espèces de *F. tularensis* et génotypes incluant : la PCR couplée au séquençage, l'utilisation de puces à ADN, l'amplification aléatoire de l'ADN polymorphe (RAPD), l'amplification par PCR de séquences répétées palindromiques extragéniques, le typage génomique multi-locus (MLST), la recherche de SNP et insertions/délétions canoniques et enfin l'analyse multi-locus de séquences répétées en tandem en nombre variable (VNTR) (35).

III-4. Prise en charge thérapeutique

III-4.1. Le traitement

Malgré de nombreux progrès dans le diagnostic et la prise en charge de la maladie, l'issue de la tularémie de Type A peut encore être fatale. La tularémie de Type B, bien que moins virulente, est fréquemment associée à des complications et à de longues périodes de convalescence. Un traitement précoce et adapté à la gravité de la maladie est indispensable pour une bonne prise en charge des patients. Les signes cliniques peu évocateurs, tels qu'une fièvre prolongée, sont cependant souvent associés à un traitement empirique par les β -lactamines qui s'avèrent inefficaces. *F. tularensis* est en effet naturellement résistante *in vitro* à divers antibiotiques dont les β -lactamines. *F. tularensis* de Type B biovar II est quant à elle résistante aux macrolides. Par ailleurs, du fait de sa localisation intracellulaire facultative, l'utilisation d'antibiotiques présentant des propriétés pharmacocinétiques et

pharmacodynamiques adaptées est nécessaire. On distingue deux types de traitement : curatif et prophylactique. Le traitement curatif est destiné aux patients infectés et atteints de tularémie alors que le traitement prophylactique est destiné aux patients ayant été potentiellement en contact avec *F. tularensis*.

- **Traitement curatif**

Les aminosides (streptomycine, gentamicine), les fluoroquinolones (FQ) (ciprofloxacine, lévofloxacine) et les tétracyclines (doxycycline) sont les antibiotiques utilisés en première intention (36).

- *Formes de gravité légère à modérée*

L'utilisation de FQ ou de tétracyclines est préconisée dans les cas de formes de gravité légère à modérée. La ciprofloxacine est administrée à une dose de 800 à 1 000 mg/jour par voie intraveineuse ou orale pendant 10 à 14 jours. La doxycycline qui peut être utilisée comme alternative, est administrée à raison de 200 mg/jour. Du fait de son activité bactériostatique la durée de traitement est allongée à 15 jours pour éviter les risques de rechute (111).

- *Formes de gravité sévère*

Les aminosides sont des antibiotiques avec une forte activité bactéricide. Ils représentent le traitement approprié dans le cas des formes sévères de la maladie. La streptomycine a longtemps été l'aminoside de référence (97% de guérison) mais du fait de sa toxicité cochléo-vestibulaire et des risques de réaction d'hypersensibilité, elle a été remplacée par la gentamicine qui est administrée à raison de 5 mg/kg/jour pour voie intra-veineuse pendant 10 jours. Des dosages sériques de l'antibiotique sont effectués en parallèle pour limiter les risques de néphrotoxicité et d'ototoxicité (111).

- *Enfants*

Dans les cas de formes sévères, la gentamicine à 5 mg/kg associée à un suivi par dosage sérique est recommandée chez l'enfant. Pour les formes de gravité modérée, la ciprofloxacine à la dose de 15 mg/kg est une alternative bien que non recommandée pour les patients de moins de 15 ans. Dans tous les cas, la durée de traitement doit être d'au moins 10 jours.

- *Femmes enceintes*

Bien que la ciprofloxacine et la gentamicine soient des antibiotiques contre-indiqués par la FDA durant la grossesse, leur utilisation a été préconisée par un groupe de travail de biodéfense civile. Ces antibiotiques sont des options aux mêmes doses que pour les patientes non-enceintes mais avec une durée de traitement à adapter (112).

L'azithromycine peut également être une option pour le traitement de la femme enceinte dans le cas où la souche de *F. tularensis* serait sensible aux macrolides (113).

- *Patients immunodéprimés*

Dans le cas des patients immunodéprimés, les aminosides sont prescrits en première ligne de traitement et la ciprofloxacine reste une alternative. Ils sont recommandés aux mêmes doses que pour les patients immunocompétents pour une durée de traitement de 14 jours.

- **Traitement prophylactique**

Le traitement prophylactique doit être initié 24 h après l'exposition, pendant une durée de 14 jours avec de la ciprofloxacine à la dose de 1 g/jour ou avec de la doxycycline 200 mg/ jour (OMS Guidelines-2014).

III-4.2 Sensibilité aux antibiotiques

Une étude américaine a déterminé les valeurs des CMI de 92 souches *F. tularensis* de Type A et 77 souches de Type B isolées aux Etats-Unis et au Canada entre 1974 et 2005 (114). Les CMI ont été déterminées en milieu liquide selon la technique de dilutions en plaques en utilisant le milieu Mueller Hinton ajusté en cations et enrichi en vitamine (2% Polyvitex[®]) recommandé par le CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Aucune résistance naturelle de *F. tularensis* aux antibiotiques utilisés en thérapeutique (FQ, aminosides, tétracyclines) n'a été démontrée selon les seuils de sensibilité fixés par le CLSI.

Récemment, le CNR *Francisella* de Grenoble a évalué la sensibilité *in vitro* à 18 antibiotiques de 59 souches de *F. tularensis* de Type B (sous clade B.FTNTF002-00) isolées entre 2006 et 2016. Les mesures de CMI ont été effectuées en milieu liquide selon les recommandations du CLSI. Les souches de référence *F. tularensis* LVS NCTC 10857 et *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ont été utilisées en tant que contrôles. Les résultats obtenus sont regroupés dans le tableau 3 ci-après (115).

Les résultats de CMI montrent que toutes les souches sont sensibles à la ciprofloxacine, lévofloxacine, gentamicine, doxycycline et au chloramphénicol selon les seuils fixés par le

CLSI. Les valeurs de CMI les plus faibles sont obtenues pour la ciprofloxacine et la lévofloxacine (CMI₉₀ 0,03 et 0,06 respectivement). Par opposition, l'ensemble des bactéries est naturellement résistante aux β lactamines, ampicilline et meropénème, à la daptomycine, au linezolid et à la clindamycine. A ce jour aucune souche résistante aux traitements indiqués n'a été isolée.

Tableau 3. CMI (mg/L) de différents antibiotiques vis-à-vis de 59 souches de *F. tularensis* de Type B isolées entre 2006 et 2016 (d'après Caspar et al. 2017)

Antibiotic	Dilution range tested (mg/L)	<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> (59 strains)			<i>F. tularensis</i> subsp. <i>holarctica</i> LVS NCTC10857	Breakpoints (mg/L)	
		MIC ₅₀ (mg/L)	MIC ₉₀ (mg/L)	Range (mg/L)	MIC (mg/L)	S ≤	R >
Gentamicin	0.03–16	0.125	0.125	≤0.03–0.25	0.06	4 ^a	
Tobramycin	0.03–16	0.125	0.25	0.06–0.25	0.125		
Ofloxacin	0.008–4	0.06	0.125	0.06–0.125	0.06	0.25 ^b	0.5 ^b
Ciprofloxacin	0.001–0.5	0.03	0.03	0.016–0.06	0.016	0.5 ^a	
Levofloxacin	0.001–0.5	0.03	0.06	0.016–0.06	0.016	0.5 ^a	
Moxifloxacin	0.002–1	0.125	0.125	0.06–0.25	0.03	0.25 ^b	0.25 ^b
Doxycycline	0.03–16	0.25	0.25	0.125–0.25	0.125	4 ^a	
Tigecycline	0.032–16	0.25	1	0.125–1	0.06	0.25 ^b	0.5 ^b
Ampicillin	0.25–128	>128	>128	64≥ 128	>128	2 ^b	8 ^b
Meropenem	0.06–32	>32	>32	>32	>32	2 ^b	8 ^b
Erythromycin	0.06–32	1	1	0.5–2	>32	0.5 ^c	16 ^c
Azithromycin	0.06–32	0.5	1	0.25–1	>32	0.125 ^c	4 ^c
Telithromycin	0.016–8	0.125	0.25	0.03–0.5	>8	0.125 ^c	8 ^c
Clindamycin	0.03–16	8	16	4–16	>16		
Linezolid	0.125–64	8	16	4–16	4	2 ^b	4 ^b
Chloramphenicol	0.06–32	1	2	0.5–2	1	8 ^a	
Rifampicin	0.004–2	0.5	1	0.125–1	0.03	1 ^c	1 ^c
Daptomycin	0.016–8	>8	>8	>8	>8		
Ethanol (%)	0.016–8	2	2	1–2	2		
Acetic acid (%), pH adjusted to 7.1	0.016–8	0.125	0.25	0.125–0.5	0.5		

^aCLSI breakpoints ; ^bEUCAST PK/PD breakpoints ^c*Haemophilus influenzae* EUCAST breakpoints. MIC of all antibiotics tested for the control strain *S. aureus* ATCC29213 were within the acceptable range determined by CLSI.

Les tests d'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques ne sont pas effectués systématiquement en routine étant donné qu'il n'y a pas de résistance naturelle des souches aux traitements recommandés. La mesure de CMI en milieu liquide (Mueller-Hinton supplémenté en vitamines) peut être utilisée selon les recommandations du CLSI (116). L'antibiogramme par bandelettes E-test, basé sur un gradient de diffusion d'antibiotiques sur géloses peut également être employé (117,118).

Du fait de l'utilisation potentielle de la souche à des fins de bioterrorisme, l'étude de la résistance aux antibiotiques reste un sujet d'importance. Dans le cadre d'expérimentations *in*

vitro, des souches de *F. tularensis* résistantes à la ciprofloxacine ont été générées afin d'étudier les mécanismes potentiels d'acquisition de la résistance aux FQ et de développer des outils pour déterminer la résistance éventuelle (119–121). Nous reviendrons sur ce point dans la suite du manuscrit.

III-4.3. Résistances connues de *F. tularensis*

Comme nous l'avons évoqué dans le précédent paragraphe, *F. tularensis* présente des résistances naturelles vis-à-vis de certaines classes d'antibiotiques dont les β lactamines.

L'un des mécanismes de résistance identifié contre les β lactamines repose sur l'inactivation enzymatique. Les bactéries *F. tularensis* produisent l'enzyme constitutive β lactamase FTU-1 de classe A qui confère une résistance aux dérivés de la pénicilline et à la ceftazidime. L'addition d'acide clavulanique, un inhibiteur des β lactamases permet de restaurer partiellement la sensibilité aux pénicillines. Cette enzyme n'a qu'une faible activité sur les céphalosporines de 1^{ère}/2^{ème} génération et les carbapénèmes (122). Une autre étude a montré que le gène nommé *bla2* de la souche *F. tularensis* LVS codait pour une β lactamase fonctionnelle, qui hydrolyse les pénicillines mais qui n'exerce pas d'effet sur les céphalosporines de troisième génération (123).

Les systèmes de pompes à efflux appartenant à la famille de transporteurs RND (resistance-nodulation-division) sont également impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Ainsi, le système d'efflux AcrAB RND de *F. tularensis* intervient dans la résistance aux β lactamines. En effet, l'inactivation du gène correspondant entraîne chez le mutant une augmentation de la sensibilité pour les antibiotiques testés, pénicillines et céphalosporines. Cette pompe à efflux est également impliquée dans la virulence de la bactérie chez la souris (124).

Enfin, les souches Biovar II de *F. tularensis* subsp *holarctica* naturellement résistantes à l'érythromycine, présentent une substitution (A2059C) sur le gène *rrl*, codant l'ARN ribosomal 23S. Cette mutation est bien connue pour altérer l'interaction des macrolides avec la sous-unité ribosomale 50S cible de cette classe d'antibiotiques (125).

III-4.3. Echecs thérapeutiques et rechutes

Bien que les aminosides, les FQ et les tétracyclines soient indiquées dans les cas de tularémie de formes légère à grave, on observe jusqu'à 40% d'échecs thérapeutiques. Ils sont très souvent associés aux formes ganglionnaires, ulcéro-ganglionnaires, oculo-ganglionnaires et oropharyngées ; se présentant sous la forme d'adénopathies chroniques fluctuantes. Dans la

plupart des cas de rechutes ou d'échecs, le traitement consiste en une antibiothérapie alternative associée au drainage ou à l'excision du ganglion.

Une étude a comparé l'efficacité de trois antibiotiques (streptomycine, ciprofloxacine et doxycycline) utilisés lors de la première épidémie de tularémie en Espagne. Les résultats ont montré que sur les 142 patients atteints, le taux d'échecs thérapeutiques était de 22,5%, les FQ étant les antibiotiques avec le plus faible taux d'échecs (4,5%) et entraînant le moins d'effets secondaires. Les échecs thérapeutiques sont majoritairement survenus dans les formes ulcéro-ganglionnaires et en cas d'utilisation de la doxycycline en traitement de première intention (94). Une autre étude menée de septembre 2009 à novembre 2012 sur 100 enfants turcs atteints de tularémie a montré que la réponse au traitement était meilleure et les rechutes moindres chez les enfants âgés de 5 à 10 ans. Les facteurs de risques associés aux échecs thérapeutiques, sont le sexe féminin, un délai de 16 jours pour initier le traitement et l'utilisation de doxycycline (126). Ces observations ont été confirmées dans une récente étude réalisée sur 19 patients atteints de tularémie oropharyngée. Cette dernière montre que le délai d'initiation du traitement et que les ganglions suppurants sont des facteurs qui favorisent la survenue d'échecs thérapeutiques (127).

La conclusion qui ressort de ces travaux est que les FQ sont à l'origine d'un plus faible taux de rechute que les tétracyclines (35,128). Par ailleurs, on note que les échecs thérapeutiques et les rechutes sont plus fréquents dans les cas où le délai pour initier le traitement est allongé, chez les patients immunodéprimés et en cas de lymphadénopathies suppurées ; cas pour lesquels un traitement de 2 à 3 semaines est insuffisant.

B- LES FLUOROQUINOLONES

I- Structure

Les FQ sont les premiers antibiotiques de synthèse qui ont été mis sur le marché. Ces molécules dérivées de l'acide nalidixique découvert en 1962 sont parmi les antibiotiques les plus fréquemment prescrits dans le monde (129). La structure de base des quinolones est un noyau pyridone- β -carboxylique (Figure 10). L'ajout de l'atome de fluor en position 6 et d'un noyau aromatique en position 7 dans les années 1980 a permis d'augmenter fortement la biodisponibilité et la pénétration des molécules quinolones (x200) dans les cellules et ainsi donner naissance aux FQ. Depuis, de nombreuses molécules ont été développées dans le but d'augmenter l'activité antibactérienne et d'élargir leur spectre d'action (130).

Au niveau de leur structure, toutes les FQ ont en commun :

- Un noyau pyridone β -carboxylique
- Un atome d'azote variablement substitué en position 1 (R1)
- Un groupement carboxyle non substitué en position 3
- Un groupement cétone non substitué en position 4
- Un atome de fluor en position 6 (R6)
- Un noyau aromatique variable en position 7 (R7)

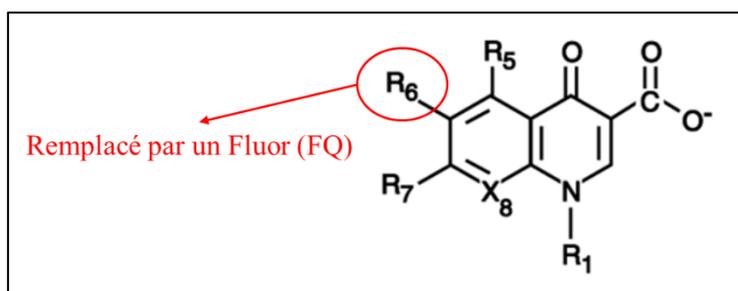


Figure 10. Structure commune aux quinolones et fluoroquinolones

II- Spectre d'action

On compte actuellement quatre générations de quinolones dont les principales molécules associées à leur spectre d'action sont décrites dans le Tableau 4 ci-dessous. La première génération de quinolones avait une activité réduite aux infections à entérobactéries du tractus urinaire du fait de la diffusion restreinte de ces molécules dans l'organisme. Le spectre des

autres générations de molécules, correspondant aux FQ, a été largement étendu aux bactéries à Gram négatif et à Gram positif. Les dernières molécules (3^{ème} et 4^{ème} générations) permettent en particulier de cibler le pneumocoque et les anaérobies.

Tableau 4. Principales quinolones et spectres d'action associés

Génération	Molécule	Spectre
1 ^{ère} génération	Acide nalidixique	- Bactéries à Gram négatif - Entérobactéries
2 ^{ème} génération	<u>FQ urinaires :</u> Norfloxacin NOROXINE® Enoxacin ENOXOR® Loméfloxacine LOGOFLOX® <u>FQ systémiques :</u> Ofloxacine OFLOCET® Ciprofloxacine CIFLOX® Péfloxacine PEFLACINE®	- Bactéries intracellulaires - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> sensible à la méticilline
3 ^{ème} génération	Lévofloxacine TAVANIC®	- Bactéries à Gram positif - Streptocoques (dont pneumocoque)
4 ^{ème} génération	Moxifloxacine IZILOX®	- Elargissement vers anaérobies - Pneumocoque

III- Mécanisme d'action

Les FQ inhibent la réplication de l'ADN bactérien en ciblant les ADN topoisomérases de Type II regroupant les ADN gyrases et ADN topoisomérases de type IV qui sont impliquées dans la topologie de l'ADN. Ces enzymes qui sont spécifiques des procaryotes constituent une cible idéale pour les molécules à visée antibactérienne.

III-1. Les ADN topoisomérases

Les ADN topoisomérases sont des enzymes ubiquitaires retrouvées dans l'ensemble des êtres vivants (bactéries, archées, eucaryotes et certains virus). En contrôlant la topologie de l'ADN elles jouent un rôle vital lors de nombreuses étapes de la vie cellulaire dont la réplication, la transcription et la recombinaison de l'ADN (131,132).

La réaction enzymatique catalysée par ces enzymes consiste à faire passer un fragment d'ADN au travers d'un autre en effectuant une coupure transitoire de l'ADN. L'opération se fait en trois temps : coupure de l'ADN, passage d'un autre segment à travers la coupure, fermeture de la brèche. Dans tous les cas les enzymes utilisent un résidu tyrosine pour couper la liaison

phosphodiester de l'ADN (133). La réaction de cassure s'effectue en effet par attaque nucléophile d'un oxygène d'une tyrosine de l'enzyme sur un groupement phosphate du squelette de l'ADN. Ainsi, il se forme une liaison phosphodiester covalente temporaire entre l'enzyme et l'ADN. Toutes les topoisomérases fonctionnent sur ce principe général. Il existe deux groupes de topoisomérases qui sont principalement classées en fonction du nombre de brins qu'elles coupent : ainsi, les enzymes de Type I et de Type II coupent respectivement un et deux brins d'ADN.

- Les topoisomérases de Type I, qui sont quasi-exclusivement monomériques, effectuent des coupures simple-brin dans l'ADN. Ces enzymes présentes chez les eucaryotes, procaryotes, archées et virus ont une activité ATP-indépendante à l'exception des gyrases inverses. En fonction de leur mode d'action et de l'architecture des domaines structuraux, elles ont été sous-divisées en trois familles IA, IB et IC. Les enzymes appartenant au sous-Type IA forment une liaison transitoire avec le phosphate 5' de l'ADN tandis que celles du sous-Type IB et IC interagissent avec le phosphate 3' (134).
- Les topoisomérases de Type II, qui sont toujours des dimères ou des tétramères, effectuent un clivage double-brin dans un segment d'ADN. L'activité de ces enzymes nécessite l'hydrolyse de molécules d'ATP. Elles sont retrouvées dans tous les domaines du vivant et sont organisées en deux familles, Topo IIA et IIB. A l'exception des *Thermoplasmatales*, les Topo IIB aussi appelées Topo VI, sont ubiquitaires chez les Archées. On les trouve également chez les plantes que sont les algues rouges et vertes. Les Topo IIA ont en commun un domaine ATPase et un site de liaison et de clivage de l'ADN, domaines présents sur la même chaîne polypeptidique ou sur différentes sous-unités. Ainsi, et en dépit d'une forte homologie de séquence, les Topo IIA présentent différents états d'oligomérisation: homodimères pour les Topo II eucaryotes, hétérotétramères pour les Topo IIA bactériennes tandis la Topo IIA du bactériophage T4 forme un hétérohexamère (135).

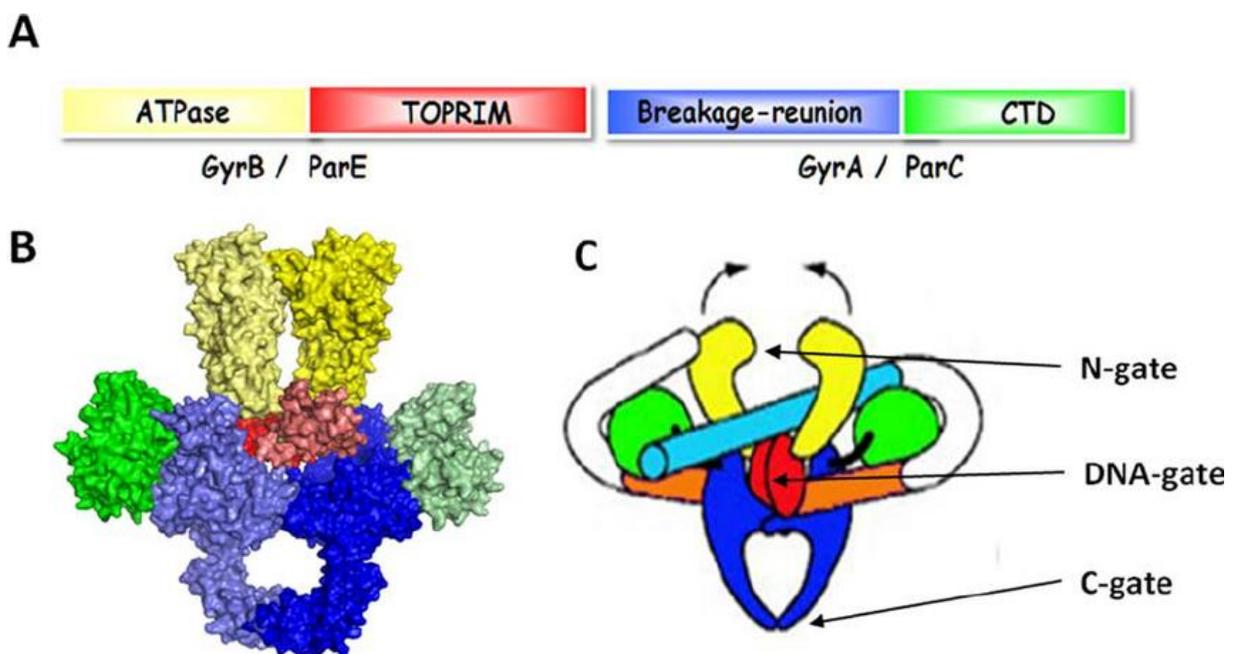
Les inhibiteurs de topoisomérases cliniquement pertinents sont extrêmement sélectifs pour un type d'enzyme. De nombreuses molécules ciblant les topoisomérases de Type I ou de Type II

sont utilisées dans la chimiothérapie anticancéreuse. Ce sont les topoisomérases de Type II bactériennes, décrites dans le paragraphe suivant, qui sont la cible spécifique des FQ.

III-2. Les ADN topoisomérases de Type IIA bactériennes

Il s'agit de l'ADN gyrase et des topoisomérases de Type IV. Ces enzymes s'assemblent sous forme d'une structure hétérotétramérique (A_2B_2) dont les sous-unités sont respectivement codées par *gyrA* et *gyrB*, ou *parcC* et *parE*. L'assemblage de ces complexes est illustré Figure 11. Les différents domaines s'assemblent de manière à former un cœur catalytique de l'enzyme dont la structure cristallographique a été résolue pour certains pathogènes dont *Mycobacterium tuberculosis* (136).

Figure 11. Représentation schématique de la séquence et l'assemblage des topoisomérases de type IIA (d'après Mayer *et al.* 2012)



(A) Représentation schématique de l'organisation des sous-unités de l'ADN topoisomérase de Type IIA. (B) Les topoisomérases de Type IIA s'assemblent sous forme d'hétérotétramères (A_2B_2) composés de 2 sous-unités GyrA (bleu et vert) et 2 sous-unités GyrB (jaune et rouge) dans le cas de la DNA gyrase (sous-unités ParE et ParC pour la Topo IV). Le cœur catalytique est formé par le domaine C-terminal de GyrB et le domaine N-terminal de GyrA (C) Proposition d'un modèle schématique de fonction de la topoisomérase IIA avec le brin d'ADN en turquoise.

III-2.1. L'ADN gyrase

L'ADN gyrase est formée par les sous-unités GyrA et GyrB. La sous-unité GyrA possède un domaine N-terminal de 59 kDa appelé « Breakage-reunion domain » (BRD) jouant un rôle dans le clivage de l'ADN et un domaine C-terminal (CTD) de 35 kDa enveloppant l'ADN et essentiel pour l'activité de surenroulement négatif de l'ADN. La sous-unité GyrB comprend un domaine ATPase N-terminal de 43 kDa impliqué dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP et un domaine C-terminal de 47 kDa nommé TOPRIM (Topoisomérase primase) qui interagit avec la sous unité GyrA et l'ADN (137).

L'ADN gyrase qui s'assemble sous forme d'hétérotétramère comme illustré Figure 11, interagit avec deux domaines de l'ADN au sein de son cœur catalytique. Le domaine BRD se lie au segment G (« gate ») de l'ADN (orange) au niveau du domaine « DNA-Gate » de l'enzyme. La coupure double brin du segment G facilite le passage du segment T (« transported ») de l'ADN (bleu) à travers le segment G et ainsi à travers l'interface protéique de l'enzyme. L'ADN est ensuite refermé et le segment T est libéré par le domaine « C-Gate » (Figure 11). Cette réaction se fait en présence d'ATP et aboutit à la formation d'un surenroulement négatif. Il s'agit d'une spécificité exclusive de cette enzyme qui est aussi capable de relâcher le surenroulement positif qui se produit lors de la progression de la fourche de réplication. Enfin, elle intervient dans la liaison (caténation) ou la séparation (décaténation) de molécules circulaires de l'ADN (135,138).

III-2.2. L'ADN topoisomérase de Type IV

Les topoisomérases de Type IV, découvertes plus récemment, sont aussi des hétérotétramères composés de sous-unités distinctes appelées ParC et ParE qui sont respectivement homologues à GyrA et GyrB. Le site actif tyrosine est situé sur la sous unité ParC et la sous-unité ParE est responsable de l'activité ATPase. Bien que la topoisomérase de Type IV partage environ 40% d'homologie avec l'ADN gyrase, leur mécanisme et leurs fonctions cellulaires semblent être très différents : la topoisomérase semble être une bonne décaténase, en comparaison avec l'ADN gyrase. Elle serait donc davantage impliquée dans la séparation des brins nouvellement répliqués en aval de la fourche de réplication. Certaines bactéries, en particulier *M. tuberculosis* ne possèdent pas de Topo IV mais seulement la DNA gyrase (135,139,140).

III-3. Mode d'action des fluoroquinolones

La gyrase et la topoisomérase IV génèrent des cassures double brin dans le chromosome bactérien. Ainsi, tout en étant essentielles à la survie des cellules, ces enzymes ont le potentiel de fragmenter le génome. Les FQ tirent profit de cette caractéristique en augmentant la concentration des complexes de clivage enzyme-ADN, entraînant ainsi la mort cellulaire. Comme dans la plupart des bactéries à Gram négatif, la cible principale des FQ chez *F. tularensis* est l'ADN gyrase. Comme nous l'avons évoqué ci-dessus, cette enzyme, essentielle pour la réplication bactérienne est absente chez les eucaryotes, ce qui en fait une cible antimicrobienne idéale (140). L'analyse de la structure cristallographique de ces complexes a permis de mettre en évidence que les régions N-terminale de GyrA et C-terminale de GyrB formaient avec l'ADN, une poche appelée QBP « Quinolone Binding Pocket » dans laquelle s'inséraient les FQ (141,142). Cette structure est illustrée dans la Figure 12 ci-après.

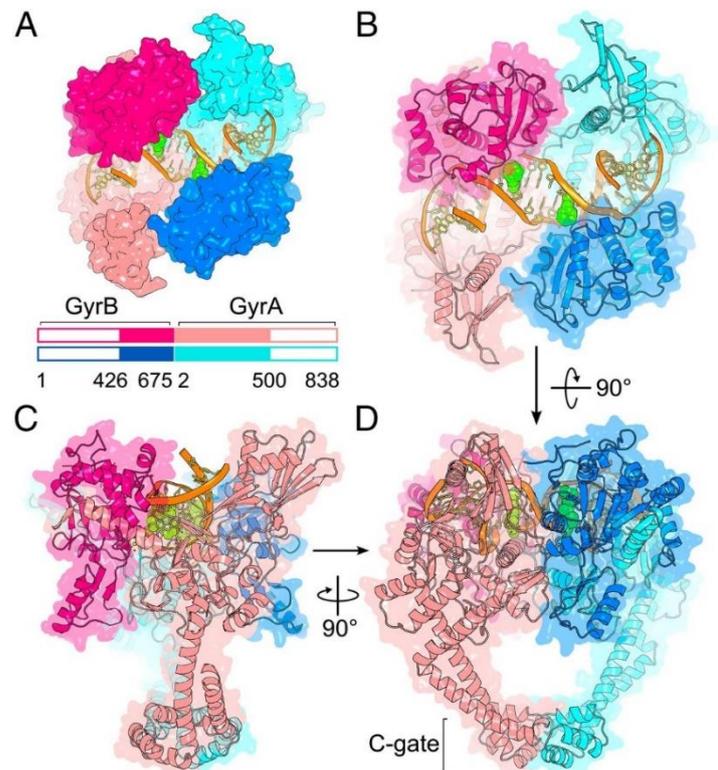


Figure 12. Structure du cœur catalytique de l'ADN gyrase de *Mycobacterium tuberculosis* (d'après Blower *et al.* 2016)

(A) Le polypeptide de fusion GyrAB a été produit en incluant les acides aminés 426 à 675 de GyrB et 2 à 500 de GyrA. La structure du complexe recombinant obtenu et illustré ici correspond à l'assemblage de 2 polypeptides de fusion, l'un dans les deux tons de rose et le second dans deux tons de bleu. Les sections les plus foncées correspondent au domaine C-terminal de GyrB. L'ADN est représenté en orange, la moxifloxacin (FQ) en vert et les ions magnésium en jaune. (B-D) Vues orthogonales du cœur catalytique représentées selon différents angles de rotation.

Les FQ se lient de manière réversible au complexe formé par l'ADN et l'enzyme, à proximité de la tyrosine du site actif (Tyr122 pour GyrA d'*E. coli*). Il a été démontré récemment que la liaison quinolone-topoisomérase était liée à la formation d'un pont ionique eau-métal. L'ion Mg^{2+} non catalytique coordonné avec quatre molécules d'eau, forme un pont entre les quinolones et les résidus sérine et acide qui servent de points d'ancrage à l'enzyme (143). En outre, en inhibant l'action de l'enzyme, la fixation des quinolones entraîne une accumulation du complexe intermédiaire catalytique enzyme-ADN bloquant ainsi l'évolution de la fourche de réplication, le complexe de transcription et générant des cassures doubles brins de l'ADN (143). La formation de ces cassures de l'ADN active la réponse SOS et d'autres voies de réparation de l'ADN dont le couple LexA-RecA est l'acteur central chez *E. coli* et de nombreuses autres bactéries. Il s'agit d'un système de survie en réponse à des lésions, qui dès lors qu'il est confronté à des dommages trop importants, ne permet plus d'empêcher la mort de la bactérie.

IV- Mécanismes de résistance aux fluoroquinolones

Les mécanismes principaux de résistance des bactéries à Gram négatif aux FQ sont la modification de la cible et la diminution de l'accumulation intracytoplasmique d'antibiotiques. Plus rarement, la résistance aux FQ peut être d'origine plasmidique par protection de la cible ou modification de l'antibiotique. La Figure 13 regroupe l'ensemble des mécanismes de résistance potentiellement développés par la bactérie. Ils seront détaillés dans les paragraphes suivants.

IV-1. Résistances chromosomiques

IV-1.1. Modification de la cible enzymatique (Figure 13a)

À la suite d'une exposition aux FQ, il a été observé que les bactéries génèrent des mutations sur *gyrA* et *gyrB* (ou *parC* et *parE*), mutations qui se traduisent par des modifications (Insertions/ Délétions/Substitutions) au niveau des acides aminés. Chez les bactéries à Gram négatif, la gyrase est plus susceptible d'être inhibée par les FQ que la topoisomérase IV, alors que chez les bactéries à Gram positif, la topoisomérase IV est habituellement la cible principale. Chez les bactéries à Gram négatif, ces mutations sont essentiellement retrouvées au niveau de régions spécifiques des ADN gyrases appelées « Quinolone Resistance Determining Region » QRDR-A (pour GyrA) et QRDR-B (pour GyrB) (140).

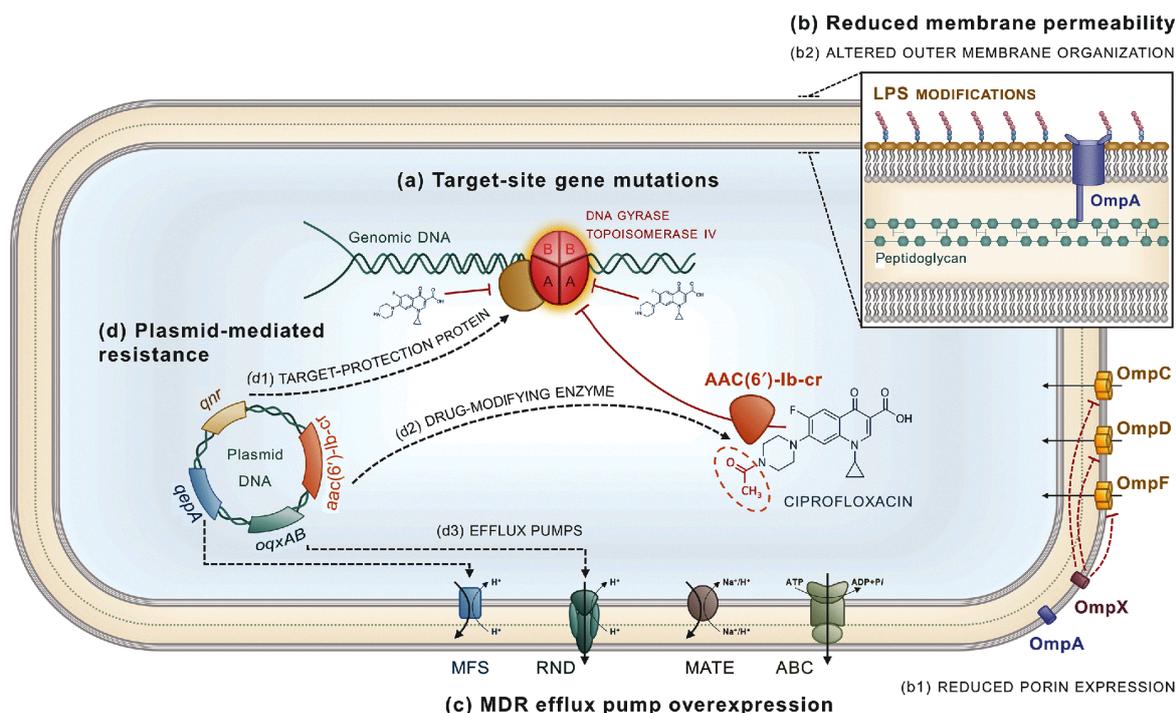


Figure 13. Mécanismes de résistance aux FQ (d'après Correia et al. 2017)

Les QRDR-A et -B sont localisées dans la QBP et il est évident que des mutations dans cette région peuvent altérer la structure de la protéine et altérer l'affinité de l'antibiotique à sa cible. Ainsi, le domaine QRDR-A décrit chez *E. coli* se situe entre les acides aminés 67 et 106 avec des « hot spots » de mutations au niveau des acides aminés en position 83 et 87 (144). Cette région est proche de la tyrosine 122 impliquée dans la liaison covalente de l'enzyme au groupement phosphate de l'ADN. Chez *E. coli*, le fort taux de mutations observé sur la sérine en position 83 peut s'expliquer par le fait que cette mutation n'affecte que légèrement l'activité catalytique de l'enzyme alors que les mutations présentes au niveau des résidus acides entraînent une diminution de l'activité enzymatique de 5 à 10 fois (140,143). Lorsqu'une première mutation au niveau de *gyrA* réduit la sensibilité d'une bactérie à Gram négatif aux FQ, des mutations additionnelles sur *gyrA* ou encore sur *gyrB* ou *parC* augmentent le niveau de résistance de la souche.

A ce jour, aucune bactérie du genre *Francisella* résistante aux FQ n'a été isolée à partir de patient infecté. Les seules souches résistantes ont été générées *in vitro* après exposition des bactéries aux FQ. *In vitro*, la mutation c248t (substitution T83I) a été identifiée dans le QRDR-A d'une souche de *F. tularensis* subsp *holarctica* ayant acquis une résistance aux quinolones (isolat URFTCIPR) (145). Cette même mutation, accompagnée de la substitution g259t (D87Y) a également été observée chez une souche SCHU S4 de *F. tularensis* résistante aux FQ et obtenue après exposition à des concentrations croissantes de ciprofloxacine (121). Plus

récemment, une étude d'évolution expérimentale menée au laboratoire sur les différentes souches de *Francisella* a généré un grand nombre de mutants résistants avec des mutations sur les gyrases, dans le QRDR mais aussi en dehors de cette région (119). La même approche a été réalisée avec la souche LVS avec des résultats comparables (120). Nous reviendrons sur les conséquences fonctionnelles des mutations identifiées notamment au niveau de *gyrA* et *gyrB* dans la suite de ce manuscrit.

IV-1.2. Diminution de la concentration intracellulaire

Une diminution de la concentration intracellulaire en FQ peut être la conséquence d'une réduction du nombre de porines ou de l'altération de l'activité de diverses pompes à efflux.

- **Perméabilité réduite (Figure 13b)**

Pour atteindre leurs cibles, les quinolones doivent traverser la paroi cellulaire et la membrane cytoplasmique des bactéries à Gram positif. Dans le cas des bactéries à Gram négatif, les quinolones doivent traverser une membrane externe supplémentaire. La plupart des FQ traverse de manière passive la membrane externe des bactéries à Gram négatif *via* les porines OmpD, OmpF et OmpC (chez *E. coli*).

Par conséquent, les mutations qui entraînent une diminution ou une perte de l'expression des porines (OmpF, OmpC, OmpD et OmpA) ou une modification de la taille ou de la conductance du canal porine entraîneront une diffusion limitée et sensiblement plus lente des quinolones dans la cellule à l'origine d'une résistance aux antibiotiques généralement de bas niveau. De plus, la surexpression d'OmpX, qui a été décrite comme un régulateur négatif de l'expression des porines, entraîne une diminution de l'expression des porines OmpC, OmpD, OmpF, LamB et Tsx, entraînant une résistance accrue à une variété d'antibiotiques, dont les quinolones (Figure 13, b1) (146).

Enfin, un autre aspect qui peut être associé à la réduction de la perméabilité de la membrane est l'altération de l'organisation de la membrane externe (Figure 13, b2). Il a en effet été montré que des modifications de la structure du LPS avaient un impact sur la résistance aux antibiotiques.

A ce jour aucune porine n'a été formellement identifiée chez *F. tularensis*.

- **Pompes à efflux (Figure 13c)**

Les bactéries à Gram négatif et positif disposent de systèmes actifs d'efflux non spécifiques. L'augmentation de l'activité de ces pompes entraîne une diminution de la concentration intracellulaire en antibiotiques qui peut être à l'origine d'une augmentation de la résistance aux FQ.

Concernant les bactéries à Gram négatif, la majorité des pompes à efflux impliquées dans la résistance aux FQ appartiennent à la famille RND, « resistance-nodulation-division ». Il s'agit de complexes protéiques tripartites composés d'un transporteur protéique de la membrane interne, d'un canal protéique de la membrane externe et d'une protéine de fusion situé au niveau de l'espace périplasmique reliant les protéines des membranes externe et interne (147). Du fait de leur structure, ces pompes peuvent directement excréter les molécules telles que les FQ dans le milieu extérieur. Chez *E. coli*, il s'agit de la pompe AcrAB-TolC, des mutations survenant dans le gène *acrR* (répresseur de *acrAB*) augmentent l'activité de la pompe à l'origine de la résistance aux FQ (148). D'autres pompes à efflux de type RND impliquées dans la résistance aux FQ ont été identifiées chez de nombreuses espèces bactériennes.

Les pompes de type MFS, « major facilitator superfamily » et MATE, « multidrug and toxic compound extrusion » capables d'extruder les FQ, ont également été identifiées chez des bactéries à Gram négatif et peuvent être impliquées dans la résistance aux FQ.

IV-2. Résistances plasmidiques

IV-2.1. Les protéines Qnr (quinolone resistance) (Figure 13d1)

Les mécanismes de résistance aux quinolones médiés par un plasmide (PMQR) ont été décrits pour la première fois à la fin des années 1990 et ont fait depuis l'objet de nombreuses recherches. L'étude d'un plasmide pMG252 provenant d'un isolat clinique de *K. pneumoniae* multirésistant a mis en évidence l'existence du gène *qnrA*, impliqué dans la résistance aux FQ. Ce plasmide confère une résistance subclinique aux quinolones et FQ, et entraîne une augmentation de la CMI vis-à-vis de l'acide nalidixique de 8 fois et de 8 à 64 fois pour les autres FQ. A ce jour, environ 100 variants Qnr ont été identifiés, classés en six familles distinctes : QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrC, QnrD et QnrVC. Les protéines Qnr appartiennent à la famille des protéines à motifs pentapeptidiques répétés. Elles exercent un effet protecteur sur l'ADN gyrase et la topoisomérase IV contre les actions inhibitrices des FQ en se liant aux enzymes (144).

IV-2.2. Le mécanisme AAC(6')-Ib-cr (d2)

En 2006, une étude menée par Robicsek *et al.* (149), a mis en évidence l'existence d'un second mécanisme de résistance plasmidique. Ces travaux ont été réalisés à partir d'un plasmide isolé d'une souche clinique d'*E. coli* collectée à Shanghai et conférant une augmentation de la CMI à la ciprofloxacine à 1 mg/L, non liée à une augmentation du niveau d'expression du gène *qnrA* (149). Cette équipe a découvert l'existence d'un variant d'une aminoside acétyltransférase AAC(6')-Ib, qui présente deux substitutions d'acides aminés spécifiques en position 102 (Trp102Arg) et 179 (Asp179Tyr). Cette enzyme nommée AAC(6')-Ib-cr pour « *ciprofloxacin resistant* » et codée par le gène *aac(6-')-Ib-cr* est capable d'acétyler l'azote amine d'un groupement pipérazine en position 7 du noyau FQ à l'origine de la résistance aux FQ. Du fait de cette réaction enzymatique très spécifique, seule l'efficacité de la ciprofloxacine et de la norfloxacine est affectée.

IV-2.3. Pompes à efflux plasmidiques (d3)

La pompe QepA, découverte en 2002, est codée par le gène *qepA* situé sur un plasmide de résistance d'une souche clinique d'*E. coli* isolée d'urine. Cette pompe confère une résistance de bas niveau aux FQ. *QepA* code une protéine de 511 acides aminés qui est une pompe à efflux du type 14-TMS (« transmembrane segment ») appartenant à la famille MFS. Cette pompe confère une résistance de bas niveau à l'origine d'une augmentation de la CMI des FQ hydrophiles (ciprofloxacine, enrofloxacine et norfloxacine) de 32 à 64 fois (150). Depuis la découverte de *qepA*, un variant, *qepA1*, a été identifié. Il confère un phénotype de résistance similaire à celui de QepA.

En outre, un plasmide porteur d'un gène *oqxAB* codant une pompe à efflux non spécifique OqxAB a été mis en évidence dans une souche clinique d'*E. coli*. Ce mécanisme rare est associé à une résistance de bas niveau aux FQ (151).

IV-3. Autres mécanismes de résistance aux fluoroquinolones

IV-3. Les Biofilms

La grande majorité des scientifiques s'accorde à dire que les biofilms constituent le mode de vie privilégié des bactéries dans la nature et que la phase planctonique ne serait qu'un passage permettant la dissémination vers de nouvelles surfaces.

Les biofilms se définissent comme une population bactérienne englobée dans une matrice extracellulaire, fixée sur des surfaces naturelles ou artificielles. Le développement de l'architecture des biofilms bactériens est en grande partie lié à la production de la matrice

extracellulaire par les bactéries du biofilm. Cette matrice inclut tous les éléments du biofilm autres que les micro-organismes. Elle est essentiellement composée d'eau (jusqu'à 97 %), de polymères polysaccharidiques sécrétés par les microorganismes, de produits de dégradation et de substances provenant du milieu extérieur. Néanmoins, on peut également y trouver d'autres composants, tels que de l'ADN, de l'ARN et des lipides (152,153).

Les étapes de formation du biofilm sont schématisées dans la Figure 14 ci-après. L'étape initiale d'attachement des bactéries fait intervenir des appendices générateurs de mouvement qui permettent d'approcher la surface à coloniser. Cette étape d'attachement transitoire permet à la bactérie « d'évaluer » la surface sur laquelle elle se trouve. Dans un second temps, une association stable se met en place. Cette association de bactéries conduit à la formation de micro-colonies aboutissant à l'élaboration du biofilm (Figure 14).

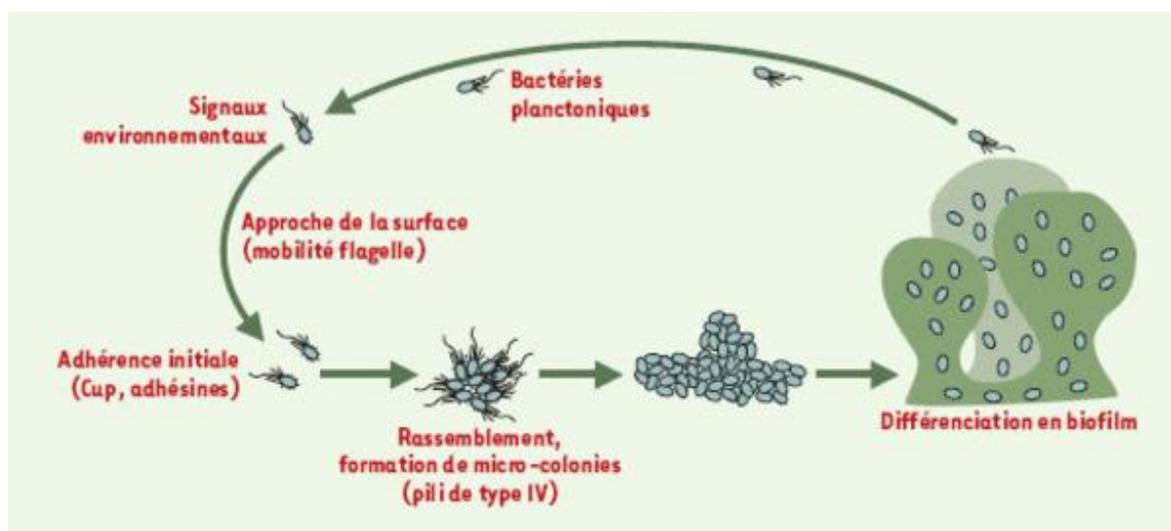


Figure 14. Modèle de formation d'un biofilm par *Pseudomonas aeruginosa* (d'après Filloux et Vallet. 2003)

Les biofilms posent de nombreux problèmes dans le domaine médical car ils peuvent être à l'origine de nombreuses infections chez l'homme. Celles-ci sont de deux types, en fonction du type de surface colonisée. D'une part, les biofilms peuvent se développer à la surface d'un matériel implanté dans le corps du patient et induire alors des infections liées aux soins ou nosocomiales. D'autre part, les biofilms peuvent être responsables d'infections chroniques à la surface d'une muqueuse humaine, indépendamment d'un corps étranger. Le point commun de ces infections est d'être difficiles à traiter du fait de la capacité des biofilms à survivre à toutes sortes d'agressions, en particulier à la présence de fortes concentrations d'antibiotiques (154).

Bien que les infections chroniques dues aux biofilms concernent essentiellement des bactéries commensales comme *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*, les bactéries du genre *Francisella* peuvent aussi produire des biofilms *in vitro* (155). Ces bactéries sont des pathogènes à culture fastidieuse qui ont la capacité de survivre dans l'environnement naturel. La formation de biofilm pourrait leur permettre une persistance environnementale, similaire à celle observée pour *Legionella pneumophila* (156). C'est cette hypothèse qui a conduit l'équipe de M. Van Hoek à mesurer la formation de biofilm par *F. novicida* (155). La formation de biofilm a aussi été observée avec *F. philomiragia* (157). En revanche les travaux de Margolis *et al*, indiquent que la souche virulente SCHU S4 sécrète beaucoup moins de biofilm que *F. novicida* (158).

Outre ce rôle protecteur dans l'environnement, il est désormais admis que le biofilm joue un rôle majeur en médecine humaine dans le cadre de nombreuses infections chroniques se développant sur les muqueuses de l'hôte. Deux situations pathologiques illustrent les caractéristiques principales de ce type d'infections : les difficultés thérapeutiques et les rechutes. Au sein du biofilm, les bactéries peuvent survivre à de très fortes concentrations en antibiotiques, on parle de « tolérance des biofilms ». Plusieurs mécanismes peuvent expliquer ce phénomène (Figure 15) (159). Tout d'abord, la matrice qui entoure les bactéries est une barrière de diffusion pour les antibiotiques ralentissant leur pénétration. Toutefois ce phénomène ne peut rendre compte de la tolérance des biofilms pour les antibiotiques ayant une bonne diffusion tels que les FQ. Il a été également démontré que les bactéries au sein du biofilm étaient dans un état de carence nutritionnelle. En effet les micro-organismes situés en profondeur dans la matrice accèdent plus difficilement à l'oxygène et aux nutriments nécessaires à leur activité métabolique. Ce métabolisme ralenti les rend insensibles à certains antibiotiques actifs uniquement sur les bactéries en phase de multiplication. L'environnement des bactéries au sein du biofilm peut également entraîner l'expression de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques. Enfin, il a été démontré que la tolérance des biofilms était due à l'existence de populations dites persistantes (1%) ou en état de dormance capables de survivre à de fortes concentrations en antibiotiques (154).

Dans le cas des bactéries du genre *Francisella*, bien que la formation de biofilm ait été décrite, à notre connaissance aucune étude rapportant un lien entre biofilm et augmentation de la résistance aux antibiotiques n'a été publiée.

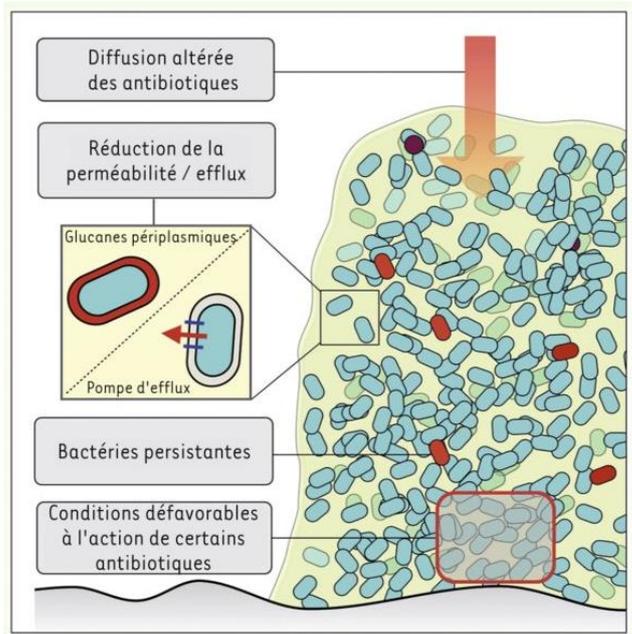


Figure 15. Mécanismes potentiels de tolérance des biofilms vis à vis des biocides (d'après Lebeaux et Ghigo. 2012)

PROBLEMATIQUE

F. tularensis est un agent pathogène classé dans la catégorie A de la liste des agents du bioterrorisme du CDC. En dépit de son utilisation potentielle comme arme biologique, aucun vaccin n'est disponible. Les FQ qui inhibent la synthèse d'ADN en ciblant les topoisomérases de type II, représentent la meilleure alternative pour le traitement de la tularémie dans les formes de gravité légère à modérée. Cependant, au cours des deux dernières décennies, leur utilisation excessive a entraîné une augmentation de la prévalence des bactéries résistantes, ce qui est une préoccupation majeure. Bien que les FQ soient les antibiotiques recommandés dans les cas de tularémie de gravité légère à modérée qui sont les formes les plus répandues en Europe, on observe en effet un nombre important de rechutes et d'échecs thérapeutiques, et ce malgré un traitement adapté. A ce jour, aucune souche de *F. tularensis* résistante aux FQ n'a été isolée à partir de biopsie de patient infecté, mais différents modèles développés *in vitro* ont montré la capacité de la bactérie LVS ou SCHU S4, à acquérir un haut niveau de résistance aux FQ.

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la résistance aux FQ des bactéries du genre *Francisella* pourrait permettre d'envisager le développement de nouvelles molécules actives. Par ailleurs, l'identification et la caractérisation de nouvelles cibles et/ou acteurs de la résistance bactérienne doit être considérée. Dans les travaux décrits ci-après, ces deux aspects ont été abordés. Les résultats obtenus sont présentés sous forme de publication dont l'une est encore en préparation au moment de la rédaction de ce manuscrit.

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

PUBLICATION N°1

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE DNA GYRASES IN FLUOROQUINOLONE-RESISTANT MUTANTS OF *FRANCISELLA NOVICIDA*

Le point de départ de mon travail de Thèse a été une collection de souches de *Francisella* avec de très hauts niveaux de résistance aux FQ (CMI 32-64 mg/l) obtenues à partir d'un protocole d'évolution expérimentale appliqué *in vitro* à trois souches de référence que sont *F. tularensis* (souche LVS), *F. novicida* et *F. philomiragia* (119). L'étude phénotypique et génotypique de ces mutants a confirmé que chez *F. tularensis*, comme chez la plupart des bactéries à Gram-négatif, la première cible des FQ est l'ADN gyrase qui est un hétérotétramère A₂B₂. Les mutations observées se situent essentiellement dans les régions QRDR-A et QRDR-B et affectent des résidus clairement identifiés comme étant impliqués dans la résistance aux FQ d'autres pathogènes dont *E. coli* ou *M. tuberculosis*. Toutefois, et c'est particulièrement vrai pour *F. novicida*, cette analyse a aussi mis en évidence l'existence de mutations jamais décrites antérieurement et présentes dans d'autres régions des sous-unités GyrA ou GyrB,

Notre premier objectif a donc été d'analyser les conséquences fonctionnelles des mutations observées sur les lignées résistantes de *F. novicida*. Les différentes sous-unités de GyrA et de GyrB, mutées ou non, ont été clonées puis exprimées chez *E. coli* et les protéines recombinantes purifiées ont été utilisées pour reconstituer les complexes caractérisés au préalable dans les souches sensibles et résistantes. A partir de ces complexes recombinants, nous avons réalisé des tests fonctionnels (surenroulement et clivage de l'ADN) en présence de FQ afin de déterminer si les mutations générées *in vitro* modifiaient la sensibilité aux antibiotiques comparativement à la souche sauvage.

Les résultats obtenus, et en particulier la chronologie inhabituelle d'apparition des mutations GyrA/GyrB, nous ont également amené à effectuer des expériences de complémentation qui avaient pour but de restaurer l'expression de la sous-unité GyrB native et d'évaluer les conséquences des mutations sur cette cible précise.

Ces travaux ont fait l'objet d'un article publié en 2017 dans le Journal « Antimicrobial Agents and Chemotherapy » dont je suis co-premier auteur.



Functional Characterization of the DNA Gyrases in Fluoroquinolone-Resistant Mutants of *Francisella novicida*

Yvan Caspar,^{a,b} Claire Siebert,^{a,b} Vivien Sutura,^b Corinne Villers,^{a,c}
Alexandra Aubry,^{d,e} Claudine Mayer,^{f,g,h} Max Maurin,^{a,b} Patricia Renesto^a

TIMC-IMAG UMR 5525, UGA CNRS, Grenoble, France^a; Centre Hospitalier Universitaire Grenoble-Alpes, Centre National de Référence des Francisella, CS 10217, Grenoble, France^b; Université de Caen Normandie, EA4655 U2RM (Unité de Recherche Risques Microbiens), Caen, France^c; Sorbonne Université, UPMC Université Paris 06, CR7, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Team 13, INSERM U1135, Paris, France^d; AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Centre National de Référence des Mycobactéries et de la Résistance des Mycobactéries aux Antituberculeux, Bactériologie-Hygiène, Paris, France^e; Institut Pasteur, Paris, France^f; CNRS, UMR 3528, Paris, France^g; Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France^h

ABSTRACT Fluoroquinolone (FQ) resistance is a major health concern in the treatment of tularemia. Because DNA gyrase has been described as the main target of these compounds, our aim was to clarify the contributions of both GyrA and GyrB mutations found in *Francisella novicida* clones highly resistant to FQs. Wild-type and mutated GyrA and GyrB subunits were overexpressed so that the *in vitro* FQ sensitivity of functional reconstituted complexes could be evaluated. The data obtained were compared to the MICs of FQs against bacterial clones harboring the same mutations and were further validated through complementation experiments and structural modeling. Whole-genome sequencing of highly FQ-resistant lineages was also done. Supercoiling and DNA cleavage assays demonstrated that GyrA D87 is a hot spot FQ resistance target in *F. novicida* and pointed out the role of the GyrA P43H substitution in resistance acquisition. An unusual feature of FQ resistance acquisition in *F. novicida* is that the first-step mutation occurs in GyrB, with direct or indirect consequences for FQ sensitivity. Insertion of P466 into GyrB leads to a 50% inhibitory concentration (IC₅₀) comparable to that observed for a mutant gyrase carrying the GyrA D87Y substitution, while the D487E-ΔK488 mutation, while not active on its own, contributes to the high level of resistance that occurs following acquisition of the GyrA D87G substitution in double GyrA/GyrB mutants. The involvement of other putative targets is discussed, including that of a ParE mutation that was found to arise in the very late stage of antibiotic exposure. This study provides the first characterization of the molecular mechanisms responsible for FQ resistance in *Francisella*.

KEYWORDS DNA gyrase, fluoroquinolones, *Francisella*

Francisella tularensis is a Gram-negative, facultatively intracellular bacterium responsible for the zoonosis tularemia (1). Classically, the following two subspecies cause most human infections: *F. tularensis* subsp. *tularensis* (type A) in North America and *F. tularensis* subsp. *holarctica* (type B) throughout the Northern Hemisphere. Humans are contaminated through direct contact with infected animals (especially hares), arthropod bites (mainly from ticks), ingestion of contaminated food or water, and contact with contaminated environments. Depending on the portal of entry of bacteria, the disease may manifest in six clinical forms: the ulceroglandular and glandular forms, which are regional lymphadenopathies with and without a visible skin inoculation lesion, respectively; the oropharyngeal form, a pharyngitis with cervical lymphadenopathy; the oculoglandular form, a conjunctivitis with a pretragal or cervical lymphade-

Received 24 October 2016 Returned for
modification 4 December 2016 Accepted 20
January 2017

Accepted manuscript posted online 6
February 2017

Citation Caspar Y, Siebert C, Sutura V, Villers C,
Aubry A, Mayer C, Maurin M, Renesto P. 2017.
Functional characterization of the DNA gyrases
in fluoroquinolone-resistant mutants of
Francisella novicida. Antimicrob Agents
Chemother 61:e02277-16. [https://doi.org/
10.1128/AAC.02277-16](https://doi.org/10.1128/AAC.02277-16).

Copyright © 2017 American Society for
Microbiology. All Rights Reserved.

Address correspondence to Patricia Renesto,
patricia.renesto@univ-grenoble-alpes.fr.
Y.C. and C.S. contributed equally to this article.

nopathy; the pneumonic form, acquired after inhalation of a contaminated aerosol or through hematogenous spread of bacteria; and the typhoidal form, combining high fever and neurological symptoms that may mimic those of typhoid. Among these various clinical forms, respiratory tularemia has attracted the most attention because it may cause up to 30% mortality in humans if left untreated (2, 3). This highly infectious aerosolizable pathogen is considered a class A bioterrorism agent by the Centers for Disease Control and Prevention. However, despite its potential use as a biological weapon, no safe and potent vaccine is currently available (2, 3). A few antibiotic classes are effective for treating tularemia, including aminoglycosides, tetracyclines, and fluoroquinolones (FQs) (4). Microbiological and clinical data show that ciprofloxacin, and possibly other FQs, is the best alternative for oral therapy of tularemia in patients with clinical manifestations of mild to moderate severity, but failures and relapses are frequent (5, 6).

Quinolones are one of the most commonly prescribed classes of antibacterial agents in the world (7). These drugs inhibit DNA replication through interaction with complexes composed of DNA and either of the two target enzymes, DNA gyrase or topoisomerase IV, which belong to the type IIA topoisomerases (8). As in most Gram-negative bacteria, the primary target for FQs in *Francisella* strains is thought to be the DNA gyrase (9–11), which functions as an A₂B₂ heterotetrameric complex able to catalyze negative supercoiling of the bacterial circular chromosome (12). Resistance to FQs can result from single point mutations in GyrA and GyrB, leading to conformational changes of the whole complex, which in turn impair antibiotic-target interactions. Such mutations are described to be restricted mainly to discrete regions of the so-called quinolone resistance-determining regions (QRDRs). Another major mechanism of resistance relies on mutations affecting the bacterial entry/efflux systems, resulting in reduced quinolone accumulation in bacterial cells. Most of these efflux pumps are encoded on the chromosome, but quinolone-specific (QepA) as well as multidrug (OqxAB) efflux pumps were also found to be encoded by bacterial plasmids. Other plasmid-mediated quinolone resistance factors include the *qnr* genes, encoding pentapeptide repeat proteins that act as DNA mimics and protect the type II topoisomerases, and an allele of the aminoglycoside acetyltransferase-encoding gene (*aac*) that is able to decrease drug activity through acetylation (7, 13, 14).

Because of the widespread use (and overuse) of these drugs, the increased prevalence of quinolone-resistant strains is a growing concern for several bacterial species (15). To date, no resistant strain of *F. tularensis* has been isolated from patients (16), but successful culture of this fastidious pathogen is achieved in only 10% of tularemia cases (5). *In vitro*, the C248T mutation (encoding a T83I substitution) was found in the GyrA QRDR of a quinolone-resistant *F. tularensis* subsp. *holarctica* strain (URFtCIPR isolate) (9). This mutation was also observed in an *F. tularensis* SchuS4 strain isolated after *in vitro* exposure to increasing amounts of ciprofloxacin and was accompanied by the G259T (D87Y) GyrA QRDR substitution (10).

An evolution experiment was conducted in our lab by exposure of several *Francisella* sp. strains with attenuated virulence for humans to increasing concentrations of FQs (11). This approach, considered a powerful tool for investigating the acquisition dynamics of drug resistance (17, 18), led to the emergence of high-level resistant mutants on which phenotypic and genotypic analyses were carried out (11). Besides mutations in the QRDR-A and QRDR-B hot spot regions, novel substitutions or deletions were identified in both the *Francisella* GyrA and GyrB subunits. An elegant study by Jaing et al. (19) recently reported genome-wide mutations associated with ciprofloxacin-resistant *F. tularensis* LVS isolated *in vitro* and confirmed the GyrA and GyrB mutations described by Sutera et al. (11). However, while a structural model of DNA gyrase was built to achieve a better understanding of how mutations affect FQ resistance (19), their functional role was not investigated.

Our aim in the present study was to clarify the functional consequences of GyrA and GyrB mutations on FQ sensitivity in four independent lineages of *F. novicida* highly resistant to such antibiotics. While this *Francisella* species is not pathogenic to humans,

TABLE 1 Characteristics of the *F. novicida* lineages used in this study^a

Lineage	MIC (mg/liter)	Amino acid mutation(s)		Reference or strain no.
		GyrA	GyrB	
Fno_WT	0.064	No mutation	No mutation	CIP56.12
Fno1	128	D87Y	+P466	11
Fno2	128	D87G	D487E, ΔK488	11
Fno3	32	ΔE524, ΔS525	No mutation	11
Fno4	64	P43H	No mutation	11

^aThe bacteria used in this study included the FQ-sensitive parental strain *F. novicida* U112 (Fno_WT) and four lineages (Fno1 to Fno4) that acquired high FQ resistance levels associated with mutations in GyrA and GyrB after 14 subcultures in the presence of antibiotics (11). The ciprofloxacin MICs were measured on the bacterial clones selected for whole-genome sequencing at the final stage of the evolution procedure, using Mueller-Hinton 2 broth supplemented with 2% PolyViteX as described previously (11).

it is a widely used model for studying *F. tularensis* infections (20). This is the first study to describe the DNA supercoiling activity and FQ-induced DNA cleavage activity of *Francisella* proteins, using these functional characteristics as efficient ways to establish relationships between DNA gyrase mutations and FQ resistance (21).

RESULTS

Expression and purification of recombinant *F. novicida* DNA gyrases. To assess the relationships between resistance levels and mutations in GyrA and GyrB, we cloned and expressed the wild-type and mutated proteins listed in Table 1. High yields of recombinant His-tagged and soluble recombinant GyrB proteins were obtained with only a few changes of the protocol described by Tari et al. (22). In contrast, several attempts were required to optimize purification of the GyrA subunits, including variations in temperature, induction times, salt concentrations, and addition of detergents. As judged by SDS-PAGE analysis (see Fig. S1 in the supplemental material), the purity of all GyrA and GyrB constructs was >90%.

DNA supercoiling activity of *F. novicida* DNA gyrases. The wild-type DNA gyrase of *F. novicida* was reconstituted *in vitro* by use of equimolar amounts of the wild-type GyrA and GyrB proteins and examined for the capacity to convert relaxed pBR322 to its supercoiled form. As shown in Fig. 1, performing the assay with 35 mM Tris-HCl, pH 7.5, 24 mM KCl, 2 mM dithiothreitol (DTT), 0.1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 1.8 mM spermidine, and various concentrations of MgCl₂ and ATP demonstrated that the reconstituted complex could catalyze a magnesium-dependent supercoiling reaction, although the effect was not optimal. The catalytic activity of *F. novicida* DNA gyrase was significantly improved by the addition of 100 mM potassium glutamate (KGlu) and required MgCl₂ and ATP at optimum concentrations of 2 and 1 mM, respectively.

Respective contributions of GyrA and GyrB mutations to FQ resistance. To assess the respective roles of the GyrA and GyrB mutations in ciprofloxacin resistance, the inhibitory effect of FQs was first tested against the supercoiling activity of DNA gyrase complexes corresponding to the wild-type sensitive strain or complexes reconstituted using a recombinant mutated target in combination with its complementary

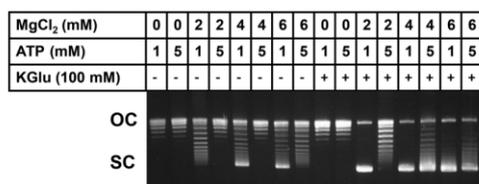


FIG 1 Supercoiling activity of reconstituted *F. novicida* DNA gyrase complex. Recombinant GyrA and GyrB subunits from *F. novicida* (250 ng of each) were assayed for DNA supercoiling activity for 30 min at 37°C, with 0.15 μg relaxed pBR322 as the substrate and in the presence of different concentrations of MgCl₂, ATP, and KGlu, as indicated. The DNA product was analyzed in a 0.8% agarose gel. OC and SC, open circular and supercoiled forms of pBR322, respectively.

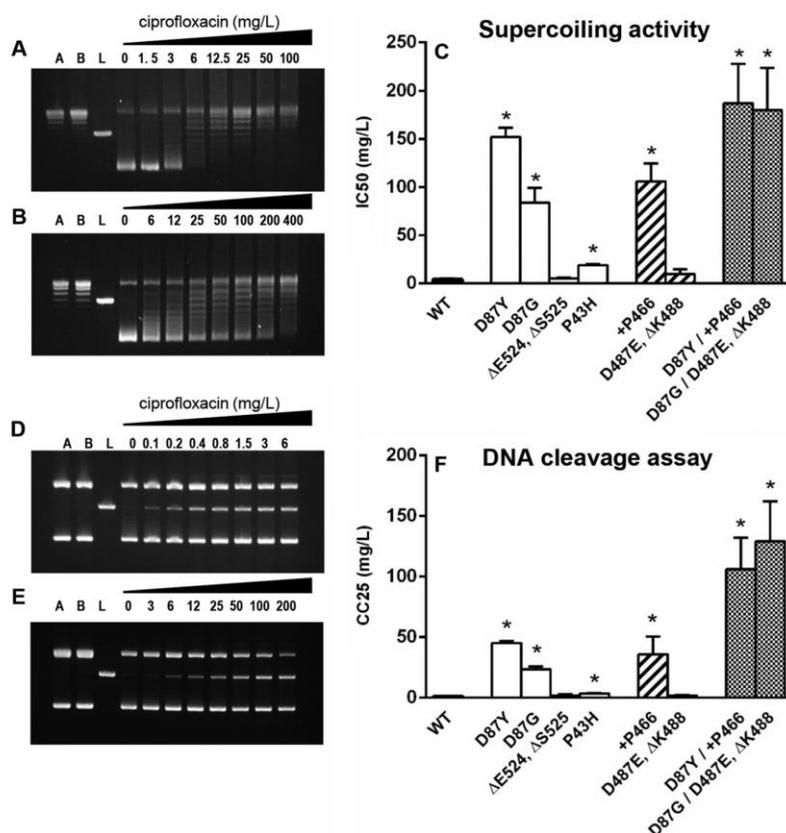


FIG 2 Ciprofloxacin inhibits DNA supercoiling and promotes DNA cleavage induced by wild-type and mutated DNA gyrases from *F. novicida*. The inhibitory activity of increasing concentrations of ciprofloxacin was measured for 30 min at 37°C against DNA supercoiling activity induced by DNA gyrase complexes reconstituted with recombinant *F. novicida* wild-type GyrA and GyrB (A) or the mutated GyrA (D87Y) and GyrB (+P466) proteins found in the resistant Fno1 lineage (B). Lanes A, relaxed pBR322 and GyrA (2 U); lanes B, relaxed pBR322 and GyrB (2 U); lanes L, pBR322 linearized by BamHI digestion; lanes 4 to 11, supercoiling activity obtained in the presence of increasing concentrations of ciprofloxacin in comparison to that with the positive control (2 U of each subunit) without an antibiotic. The gels are representative of at least three distinct experiments. (C) Ciprofloxacin sensitivity, expressed as the IC₅₀, was measured on DNA gyrase complexes sharing mutations in GyrA (white columns), GyrB (hatched columns), or both (dotted columns). (D to F) The same experiments as those described above, but using supercoiled pBR322 incubated for 1 h at 25°C in the presence of fixed amounts of recombinant proteins (125 nM) and increasing concentrations of ciprofloxacin. Fragmented DNA was detected following addition of proteinase K and SDS. Data represent the means ± SEM for three to nine distinct experiments conducted with two different batches of recombinant proteins. *, $P < 0.05$.

wild-type GyrA or GyrB subunit. Representative inhibition profiles are shown in Fig. 2A and B. For each condition, we verified that neither the GyrA nor GyrB subunit alone induced DNA supercoiling that could have resulted from a putative contamination of the recombinant proteins with the *Escherichia coli* enzymes (wells 1 and 2). Given that similar but not strictly identical patterns were obtained for experiments conducted with different batches of proteins, the data were expressed as means ± standard errors of the means (SEM) for the ciprofloxacin concentrations required to inhibit 50% of DNA supercoiling activity (IC₅₀) in different assays. As illustrated in Fig. 2C, the substitutions at position 87 in QRDR-A generated a high level of FQ resistance, with an IC₅₀ approximately twice as high when the aspartic acid residue was exchanged for a tyrosine as that when the aspartic acid was exchanged for a glycine (152.3 ± 9.2 mg/liter [$n = 4$] for the D87Y mutant versus 83.82 ± 15.2 mg/liter [$n = 6$] for the D87G

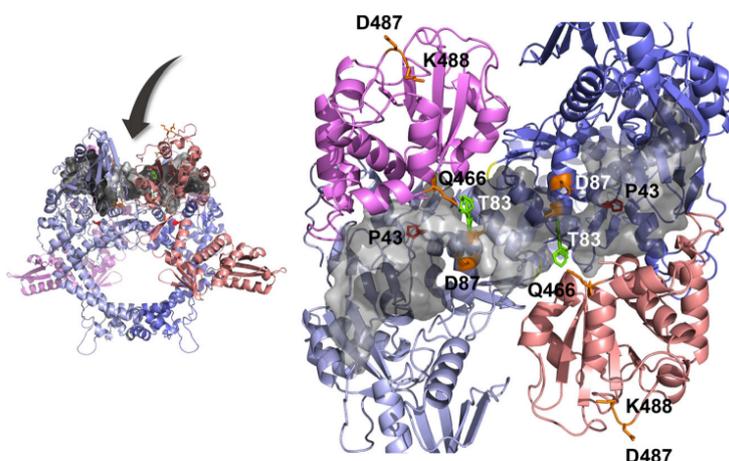


FIG 3 Three-dimensional structure modeling of the *F. novicida* QRDR. (Left) Front view of the complex, with the Toprim domains represented in magenta and pink, the breakage reunion domains in blue, and DNA in transparent gray. The black arrow indicates the location of the QBP of the catalytic core. (Right) Top-view zoom of the QBP. The catalytic Y122 residues are colored yellow, and residues at positions critical for FQ resistance are indicated.

mutant) ($P < 0.05$). To a lesser extent, but significantly, the P43H substitution in the GyrA N-terminal domain resulted in a ciprofloxacin sensitivity that was four times lower (18.9 ± 1.07 mg/liter [$n = 6$]) than that of the wild-type complex (4.11 ± 0.91 mg/liter [$n = 5$]). The three-dimensional (3D) structure of the *F. novicida* quinolone-binding pocket (QBP) together with FQs and DNA that was generated through homology modeling (Fig. 3) shows that this residue is located close to the catalytic Y122 residues where the DNA is bound and close to the D87 residues that interact with FQ. From this model, it can be assumed that the P-to-H substitution potentially affects the inhibitory effect of the drugs. Finally, the $\Delta E524$ and $\Delta S525$ deletions found in the C terminus of GyrA did not affect drug activity (4.98 ± 0.65 mg/liter [$n = 3$]).

Supercoiling data also evidenced that the QRDR-B insertion (+P466) led to a high resistance level (105.09 ± 18.86 mg/liter [$n = 6$]), in contrast to the D487E- Δ K488 mutation found in the C-terminal domain of the GyrB subunit, which failed to significantly affect FQ sensitivity (9.6 ± 1.07 mg/liter [$n = 5$]). The capacity of ciprofloxacin to inhibit DNA supercoiling activity was then evaluated against reconstituted DNA gyrase complexes corresponding to the high-level resistant clones isolated after the final (14th) passage of the Fno1 and Fno2 lineages sharing GyrA/GyrB double mutations (Fig. 2C). The IC_{50} measured with the reconstituted Fno1 complex, which possesses mutations in both QRDR-A (D87Y) and QRDR-B (+P466), was 186.9 ± 40.69 mg/liter ($n = 6$). This value was not significantly different from the value obtained with the reconstituted Fno2 complex (181.1 ± 43.09 mg/liter [$n = 9$]), which has a QRDR-A substitution (D87G) accompanied by a GyrB mutation outside the QRDR (D487E- Δ K488). A strictly similar pattern was obtained using moxifloxacin (not shown). Overall, these results are well correlated with the data obtained from the ciprofloxacin-mediated DNA cleavage assays (Fig. 2D to F; Table S3).

Stepwise appearance of GyrA and GyrB mutations. QRDR-A and the mutated GyrB regions were sequenced from the *F. novicida* Fno1 and Fno2 initial lineages as well as from resistant isolates saved at the different passages during the course of antibiotic exposure (11). For each passage of interest, six clones were analyzed and showed similar results. In both cases, and in contrast to what was expected, the GyrB mutation occurred first. In Fno1, the CTC nucleotide insertion leading to the appearance of an additional proline residue (+P466) in the GyrB subunit was detected as early as the second passage. The G-to-T substitution responsible for the D-to-Y change at position

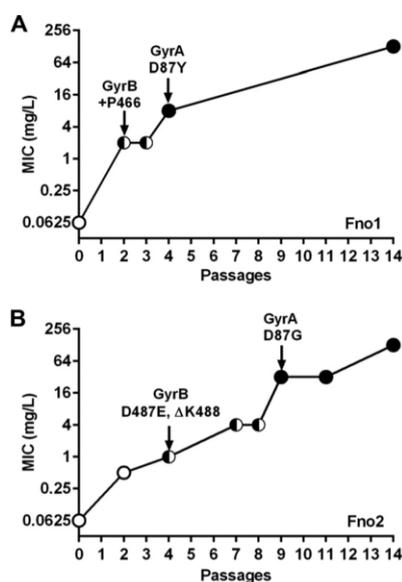


FIG 4 Stepwise appearance of GyrA/GyrB mutations and FQ resistance. The QRDR-A and mutated GyrB regions from initial lineages and resistant clones of *F. novicida* saved at different passages during the course of antibiotic exposure were sequenced using specific primers (Table S1) to check for the appearance of mutations, which are indicated by black symbols and arrows on the graph. Susceptibility to ciprofloxacin was also evaluated before and after acquisition of mutations; MICs are presented as MIC modal values. (A) Lineage Fno1; (B) lineage Fno2.

87 of QRDR-A arose later (passage 4). Similarly, in Fno2, the three-base deletion (TAA; positions 1460 to 1462) accounting for the D487E-ΔK488 mutation in GyrB was found at passage 4, while the A260G point mutation accounting for the GyrA QRDR D87G substitution occurred at passage 9. To evaluate the precise impacts of the detected mutations on ciprofloxacin resistance, MICs were then measured on the corresponding bacterial clones both before and after each mutation occurred. The chronological appearance of GyrA and GyrB mutations and the evolution of the ciprofloxacin MICs are summarized in Fig. 4. The shifts in the MIC observed upon acquisition of a QRDR-A substitution in bacterial isolates sharing a GyrB mutation ($\times 4$ in Fno1 and $\times 32$ in Fno2) were within the same range of magnitude as the IC_{50} shifts obtained with the recombinant DNA gyrase complexes carrying either single GyrB or double GyrA/GyrB mutations (see above). This result reinforces the contribution of DNA gyrase mutations to the FQ resistance of evolved bacterial clones. Moreover, the important shift in resistance observed upon acquisition of the QRDR-A mutation in Fno2, together with the moderate impact of the FQ resistance-conferring D87G mutation, suggests that the D487E-ΔK488 mutation found in GyrB, which fails to significantly affect the resistance phenotype on its own, indirectly contributes to an increased FQ resistance level.

Complementation study confirms the contribution of the GyrB D487E-ΔK488 mutation to FQ resistance. Complementation experiments were conducted on the *F. novicida* Fno2 single mutant (passage 4; QRDR-B D487E-ΔK488) or double mutant (passage 11; QRDR-B D487E-ΔK488 plus QRDR-A D87G), using a pFNLTP6 plasmid carrying the gene encoding either wild-type or mutated GyrB. Whichever plasmid was used, the MIC value obtained upon complementation of the *F. novicida* Fno2 clone isolated at passage 4, i.e., before acquisition of the GyrA mutation, remained unchanged. In contrast, we observed that the ciprofloxacin susceptibility of the clone isolated at passage 11 was partially restored upon complementation with wild-type GyrB, with this transformation conferring an approximately 2- to 3-fold decrease in the MIC relative to that for the same mutant transformed with the mutated protein (64 mg/liter).

TABLE 2 Single nucleotide polymorphisms and indels identified by whole-genome sequencing of the highly resistant evolved lineages

Lineage	Mutation(s)		Other mutations identified in the genomes of sequenced mutants				
	GyrA	GyrB	Gene no. ^a	Gene name	Description	Type of mutation	Consequence
Fno1	D87Y	+P466	FTN_0480	<i>fevR</i>	<i>Francisella</i> effector of virulence regulation	Point mutation in the promoter	Unknown
			FTN_1418	<i>manC</i>	Mannose-1-phosphate guanylyltransferase	Insertion	Stop codon 38
			FTN_1510	<i>secB2</i>	Preprotein translocase, subunit B	Deletion	Stop codon 89
			FTN_1652	<i>atpB</i>	ATP synthase	Deletion	Stop codon 10
Fno2	D87G	D487E, ΔK488	FTN_0402	<i>aroC</i>	Chorismate synthase	Deletion	Stop codon 140
			FTN_0480	<i>fevR</i>	<i>Francisella</i> effector of virulence regulation	Point mutation in the promoter	Unknown
			FTN_1083		Hypothetical protein	Point mutation	D128N mutation
			FTN_1421	<i>wbtH</i>	Glutamine amidotransferase/asparagine synthase	Deletion	Stop codon 313
			FTN_1550	<i>parE</i>	Topoisomerase IV, subunit B	Point mutation	P742S mutation
			FTN_1610		RND efflux transporter, AcrB/AcrD/AcrF family	Point mutation	Y320H mutation
Fno3	ΔE524, ΔS525		FTN_0444*	<i>fupA</i>	Fer utilization protein	Deletion	Stop codon 39
			FTN_0480	<i>fevR</i>	<i>Francisella</i> effector of virulence regulation	Point mutation in the promoter	Unknown
			FTN_0913	<i>rpoD</i>	RNA polymerase sigma-70 factor	Deletion	Deletion D52
			FTN_1029		Isoprenoid biosynthesis protein with amidotransferase-like domain	Insertion	Stop codon 43
			FTN_1115	<i>pilB</i>	Type IV pilus ATPase	Insertion	Stop codon 180
			FTN_1430*	<i>wbtQ</i>	Aminotransferase	Deletion	Stop codon 145
Fno4	P43H		FTN_0070	<i>pilE</i>	Type IV pili, pilus assembly protein	Deletion	Stop codon 117
			FTN_0480	<i>fevR</i>	<i>Francisella</i> effector of virulence regulation	Point mutation in the promoter	Unknown
			FTN_0504		Lysine decarboxylase	Insertion	Stop codon 612
			FTN_1471	<i>pcs</i>	(CDP-alcohol) phosphatidyltransferase	Deletion	Stop codon 92
			FTN_1609*		MexH family multidrug efflux RND transporter periplasmic adaptor subunit	Deletion	Deletion of Y101

^a, gene found to contain mutations in ciprofloxacin-resistant *F. tularensis* isolates (19).

Genome sequencing of *F. novicida* clones highly resistant to FQs. As shown above, the GyrA deletion found in the Fno3 lineage was not associated with FQ resistance; concerning Fno4, the inhibitory effect of ciprofloxacin on DNA supercoiling *in vitro* (Fig. 2C) did not correlate with the high MIC measured for the final bacterial isolates (Table 1). In addition, sequencing of *gyrA* and *gyrB* in the Fno1 and Fno2 lineages at different passages clearly showed that the MIC continued to increase after the appearance of mutations in these FQ target genes. Together, these data suggest that mutational events may occur in other genes. The genomic analysis of the four lineages highly resistant to FQs (passage 14) is summarized in Table 2. An interesting feature found in the Fno2 lineage was a mutation of the topoisomerase IV gene encoding ParE. However, sequencing data revealed that this mutation occurred at the final stage of antibiotic exposure (passage 14), as previously reported for the *F. tularensis* lineage (11). These data revealed that, besides changes in the DNA gyrases, another characteristic shared between all these isolates was a mutation within the promoter of the FTN_0480 gene. Other mutations detected were specific for each clone. Their putative impacts on FQ resistance are discussed below.

DISCUSSION

In the present study, we successfully produced the recombinant GyrA and GyrB subunits found in FQ-resistant and -susceptible lineages of *F. novicida*. All affinity-purified proteins were enzymatically active, as shown by the capacity of reconstituted complexes to promote supercoiling of relaxed pBR322. This specific *in vitro* DNA supercoiling assay has not been reported before for *Francisella* proteins and allowed us to clarify the roles of the different mutations in the FQ susceptibility of these bacterial pathogens.

One of the main features of *F. novicida* lineages exposed to FQs is a substitution affecting the D87 residue, located in QRDR-A, that has been associated with acquired quinolone resistance in several bacterial species, including *E. coli* and *Mycobacterium tuberculosis* (23) (corresponding residue D94 [see Fig. S2 in the supplemental material]). The work presented here clearly demonstrates that this residue is also a hot spot quinolone resistance target in *Francisella* strains. Its replacement by glycine or tyrosine indeed confers high-level resistance on mutated recombinant DNA gyrase from *F. novicida*, a result in agreement with structural studies showing that these substitutions adversely affect interactions with FQs by modifying the geometric properties of the QBP and by displacing the conserved water molecules involved in Mg²⁺ ion preservation, which is essential for FQ activity (13). The functional analysis of other *F. novicida* mutated GyrA subunits revealed that the P43H substitution, which has not been reported before, also contributes to FQ resistance, though to a lesser extent. The capacity of mutations outside QRDR-A to confer small increases in the MICs of ciprofloxacin and gatifloxacin was previously described for *E. coli* (A51V mutation) (24). The molecular model of the structure of the functional core of *F. novicida* DNA gyrase presented here shows that residue P43, which is conserved in several pathogens (Fig. S2), is located in close proximity to the catalytic tyrosine residues and to DNA and may thus play a role in the interaction between FQs and their target. In contrast, deletions within the C terminus of GyrA (Δ E524 and Δ S525) are not associated with resistance to ciprofloxacin. DNA supercoiling assays also showed that GyrB mutations are associated with high-level FQ resistance in *F. novicida*. Thus, insertion of residue P466 into QRDR-B alters the FQ inhibitory effect on supercoiling as efficiently as the QRDR-A D87 substitution does. While it is inactive on its own, the D487E- Δ K488 mutation indirectly contributes to the acquisition of a high level of FQ resistance in double GyrA/GyrB mutants, as confirmed by complementation experiments carried out on mutated lineages of *F. novicida* resistant to FQs.

In Gram-negative bacteria, resistance to FQs has predominantly been attributed to GyrA mutations, with GyrB mutations being encountered less commonly and often found secondary to alterations in GyrA (14). In Gram-positive bacteria, depending on the FQs used, different levels of inhibitory activity against DNA gyrase and topoisomerase IV are observed, but in several cases topoisomerase IV seems to be the more sensitive enzyme (25). In this case, the C subunit of topoisomerase IV (ParC) is considered the primary target of FQs, whereas mutations affecting the E subunit (ParE) occur at a lower frequency and as second-step mutations.

Here we identified, for the first time, mutations in GyrB that are associated with a high level of resistance and that represent the first step in selection for decreased susceptibility to FQs. This unusual order, in which GyrB is altered before GyrA, is consistent with our data on topoisomerase IV. While in the *F. novicida* lineages examined here topoisomerase IV mutation is a rare event that occurs at the late stage of FQ exposure and seems to play a minor role in the development of FQ resistance, it should be noted that the ParE substitution observed in the Fno2 lineage is not preceded by ParC changes. Such an unusual first-step mutation in GyrB was confirmed following a single-step selection with ciprofloxacin on plates *in vitro* (Table S3). Thus, of the 15 independent single-step mutants selected, 5 had a QRDR-A mutation and 10 shared a GyrB substitution, including 1 isolate with a P466 insertion and 7 isolates with a substitution of the GyrB S465 residue. Interestingly, a first-step mutation in GyrB was also recently evidenced in an FQ-resistant *Salmonella enterica* isolate from an infected patient (26). From this observation, it can be hypothesized that the mutation pattern observed in *F. novicida* is not based on the *in vitro* selection protocol but is likely to be observed *in vivo*. The preponderant role of GyrB in FQ resistance highlighted here fits well with the recently proposed inverted binding mode of FQs to gyrase-DNA complexes (27). Using *Mycobacterium smegmatis* as a model, Mustaev et al. (27) indeed proposed a role for the GyrB E466 or K447 residue as an alternative way to ensure stabilization of the drug-enzyme-DNA complex known to be mediated through the magnesium-water bridge with GyrA residues 83 and 87.

Overall, our findings provide new insights into the molecular mechanisms of FQ resistance in *F. novicida*. We noted some discrepancy between the IC₅₀ of reconstituted DNA gyrase and the MICs for resistant bacterial lineages, most particularly concerning Fno3 and Fno4 mutants, suggesting that other mechanisms, independent of GyrA or GyrB mutations, contribute to resistance, as is the case for several human pathogens (28, 29). Genome sequencing of the FQ-resistant *F. novicida* isolates identified, for each of the four lineages, a mutation within the promoter of the FTN_0480 gene, encoding the 110-amino-acid Fev protein, which is weakly homologous to the MerR family of transcription factors and characterized as an essential regulator of virulence in *Francisella* (30). Given that reports on the incidence of promoter mutations in *Francisella* are lacking, it is difficult to speculate on the consequences of this mutation for resistance to FQs. With this exception, the mutations detected are specific for each lineage. A set of three to five targets is mutated after antibiotic exposure, leading to several interrupted coding sequences. Concerning Fno3, for which the IC₅₀ against DNA supercoiling is low compared to the bacterial MIC, nonsense mutations are present in the *pilB* and *pilE* genes, required for the expression of functional type IV pili (31), as well as in FTN_1029, coding for a protein involved in the isoprenoid biosynthesis pathway. Interestingly, this metabolic pathway, known to be involved in major cellular processes, including cell wall biosynthesis or the regulation of membrane fluidity (32), has been described as a promising target for the development of novel antimicrobial drugs against *F. tularensis* (33). Another nonsense mutation is found in Fno3 *wbtQ*, which contributes to the biosynthesis of the *F. novicida* O antigen involved in bacterial resistance to macrolides (34). The *wbtH* gene targeted in the Fno2 lineage belongs to the same gene cluster. Overall, we noted that several mutations target genes encoding proteins located at the membrane or involved in transmembrane transport that may be impaired in their functions, leading to changes in antibiotic susceptibility. The erythromycin and doxycycline cross-resistance patterns of *F. novicida* lineages highly resistant to FQs reported in the work of Sutura et al. (11) reinforce the hypothesis of alterations in outer membrane permeability. While the precise consequences of such mutations remain to be investigated, it is tempting to speculate that they are somehow relevant to the emergence of *F. novicida* mutants that are highly resistant to FQs. This hypothesis is reinforced by the data of Jaing et al., who identified proteins possibly involved in *F. tularensis* ciprofloxacin resistance through a careful analysis of both microarray and next-generation sequencing data for 11 isolates that had acquired resistance *in vitro* upon exposure to increasing antibiotic concentrations (19). Besides the GyrA and GyrB substitutions, three identified *F. tularensis* LVS mutated targets are also mutated in *F. novicida*, including *fupA* (FTL_0439/FTN_0444), coding for the protein responsible for siderophore-mediated iron acquisition and thought to be involved in bacterial virulence (35, 36); *wbtQ* (FTL_0601/FTN_0430), as discussed above; and an efflux pump-encoding gene (FTL-1547/FTN_1609).

In summary, while the whole-genome analyses of resistant clones suggest that the response to FQ exposure might be much more complex than initially thought, we have functionally characterized, for the first time, DNA gyrase mutations through which FQ resistance emerges in *F. novicida*.

MATERIALS AND METHODS

Sample collection. The phenotypic and genotypic characteristics of the *F. novicida* lineages selected for this study are reported in Table 1. In contrast to the FQ-susceptible parental strain *F. novicida* U112, the four lineages studied here, designated Fno1 to Fno4 and propagated for 14 passages in the presence of ciprofloxacin, are highly resistant to FQs (11). A common feature of these FQ-resistant strains is the presence of mutations in the gene encoding GyrA. Concerning Fno1 and Fno2, the GyrA substitutions are localized within the QRDR and are accompanied by additional GyrB mutations, whereas Fno3 and Fno4 are mutated in GyrA regions outside the QRDR, without an additional GyrB mutation. Bacterial cultures grown from glycerol stocks stored at -80°C at each passage were used for sequencing, MIC determination, and preparation of competent cells. Whole-genome sequencing was performed for each lineage (Fno1 to Fno4) on one clone at the end of the evolution experiment (passage 14), using ABI Solid sequencing technology (ABI 5500xl genetic analyzer), and mutations observed were further confirmed by PCR amplification and sequencing of the corresponding DNA regions by use of a dye terminator sequencing approach.

Expression and purification of *F. novicida* GyrA and GyrB. The genes for GyrA and GyrB were amplified from genomic DNAs of the selected isolates by use of gene-specific primers (see Table S1 in the supplemental material) and were cloned into the pDEST-17 vector with a 6×His N-terminal tag sequence (Invitrogen, Carlsbad, CA). The integrity of all constructs was confirmed by DNA sequencing (Eurofins, Ebersberg, Germany). Protein expression was carried out in *Escherichia coli* BL21(DE3) or C41(DE3) grown at 37°C to an optical density at 600 nm (OD_{600}) of 0.6 in Luria broth (LB) supplemented with 100 µg/ml ampicillin before addition of 0.5 mM isopropyl β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Optimized conditions for each mutant are reported in Table S2. After sonication, the lysate was clarified by centrifugation and then passed over a Ni²⁺ affinity column (Qiagen) and extensively washed with Tris-HCl-NaCl buffer supplemented with 25 to 50 mM imidazole before elution of the His-tagged proteins in the presence of 300 mM imidazole. The purity of recombinant proteins was analyzed by SDS-PAGE and Coomassie blue staining before concentration using an Amicon Ultra centrifugal device. Purified proteins (0.5 to 1.0 mg/ml) were dialyzed overnight at 4°C (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 40% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) and stored at -80°C after flash freezing in liquid nitrogen. For Fno2 GyrA, 500 mM NaCl was added to the dialysis buffer to avoid protein precipitation.

DNA supercoiling assays. DNA supercoiling assays were carried out with reconstituted combinations of the GyrA and GyrB subunits from the wild-type and/or mutated strain. The protocol was similar to that applied for the analysis of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase (37), with minor modifications. The experiments were conducted in a final volume of 10 µl containing 35 mM Tris-HCl, pH 7.5, 24 mM KCl, 4 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0.1 mg/ml BSA, 1.8 mM spermidine, 100 mM potassium glutamate, 1 mM ATP, 6.5% (wt/vol) glycerol, and 0.15 µg relaxed pBR322 (Inspiralis, Norwich, United Kingdom) as the substrate. After 30 min of incubation at 37°C, the reaction was stopped by adding gel loading dye (New England Biolabs). Samples were analyzed by electrophoresis in 0.8% agarose gels run at 50 V for 6 h in 1× Tris-acetate-EDTA (TAE) buffer, stained with GelRed, and imaged on a UV transilluminator. For all combinations of GyrA and GyrB tested, we determined the minimal amounts of wild-type and/or mutated proteins required to convert 0.15 µg of relaxed pBR322 DNA to the supercoiled form (1 U). The inhibitory effect of ciprofloxacin (Sigma-Aldrich) or moxifloxacin (Bayer) against the wild-type and mutated DNA gyrases was assessed by determining the concentration of drug required to inhibit supercoiling activity by 50% (IC_{50}). Each experiment was conducted at least in triplicate, using two different batches of proteins. Statistical analysis was done using Prism v5.0 (GraphPad). The unpaired Student *t* test was used to determine the difference between the means of values obtained in independent experiments, with *P* values of <0.05 being considered significant.

DNA cleavage assays. DNA cleavage assays were performed in a 10-µl reaction volume, using the same buffer as that for supercoiling assays (but without ATP), 0.2 µg supercoiled pBR322 DNA (Inspiralis, Norwich, United Kingdom) as the substrate, and 125 nM (each) GyrA and GyrB subunits. Following 1 h of incubation at 25°C, SDS and proteinase K were added, and the incubation was continued for 30 min at 37°C as described previously (38). The extent of DNA cleavage was quantified after electrophoresis as described above, and the result was expressed as the FQ concentration required to induce 25% of the maximum DNA cleavage (CC_{25}).

Molecular modeling. The breakage reunion (GyrA N terminus) and Toprim (GyrB C terminus) domains were modeled using Phyre2 (39). The catalytic core model, composed of the breakage reunion and Toprim domains, DNA, and FQs, was generated by superpositioning onto the crystal structure of the *M. tuberculosis* DNA gyrase (40), using SSM implemented in Coot (41).

Transformation of *F. novicida* with a GyrB-encoding plasmid. The gene encoding *F. novicida* wild-type or D487E-ΔK488 GyrB was amplified using a primer pair in which NotI and AgeI restriction sites had been engineered (Table S1) and then was cloned into the pFNLP6 shuttle plasmid downstream of the *gro* promoter (42) by use of T4 DNA ligase (New England Biolabs). Following restriction enzyme digestion and sequencing, the constructs were introduced into selected *F. novicida* isolates by electroporation as described previously (43). Transformed colonies appeared after 2 days of incubation, and the presence of the plasmid was checked by PCR using specific primers (Table S1).

Accession number(s). The sequences of the final evolved clones are available in the Sequence Read Archive under accession numbers [SRX2188198](https://doi.org/10.1128/SRX2188198), [SRX2188197](https://doi.org/10.1128/SRX2188197), [SRX2188196](https://doi.org/10.1128/SRX2188196), and [SRX2188195](https://doi.org/10.1128/SRX2188195).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AAC.02277-16>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.9 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. Lopez and N. Fernandez for high-throughput sequencing, which was performed at the TGML platform, supported by grants from Inserm, GIS IBIISA, Aix-Marseille University, and ANR-10-INBS-0009-10. We also thank Linda Northrup for English editing.

This work was funded by the Direction Générale de l'Armement (DGA grant 07C0301). The French National Reference Center for *Francisella tularensis* is funded by an annual grant from the Institut National de Veille Sanitaire. C.S. received funding from

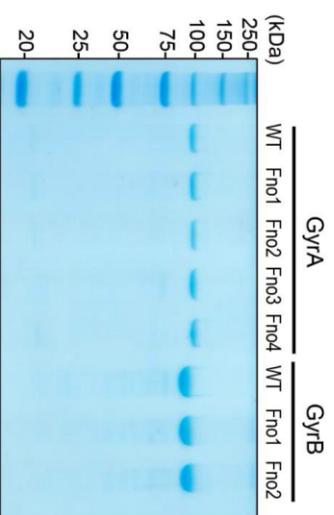
- quired for efficient utilization of iron. *Infect Immun* 77:4429–4436. <https://doi.org/10.1128/IAI.00702-09>.
36. Sen B, Meeker A, Ramakrishnan G. 2010. The *fsIE* homolog, FTL_0439 (*fupA/B*), mediates siderophore-dependent iron uptake in *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun* 78:4276–4285. <https://doi.org/10.1128/IAI.00503-10>.
 37. Aubry A, Pan XS, Fisher LM, Jarlier V, Cambau E. 2004. Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase: interaction with quinolones and correlation with antimycobacterial drug activity. *Antimicrob Agents Chemother* 48:1281–1288. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.4.1281-1288.2004>.
 38. Piton J, Petrella S, Delarue M, Andre-Leroux G, Jarlier V, Aubry A, Mayer C. 2010. Structural insights into the quinolone resistance mechanism of Mycobacterium tuberculosis DNA gyrase. *PLoS One* 5:e12245. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012245>.
 39. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. 2015. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10:845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.
 40. Blower TR, Williamson BH, Kerns RJ, Berger JM. 2016. Crystal structure and stability of gyrase-fluoroquinolone cleaved complexes from Mycobacterium tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113:1706–1713. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525047113>.
 41. Emsley P, Lohkamp B, Scott WG, Cowtan K. 2010. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 66:486–501. <https://doi.org/10.1107/S0907444910007493>.
 42. Maier TM, Havig A, Casey M, Nano FE, Frank DW, Zahrt TC. 2004. Construction and characterization of a highly efficient Francisella shuttle plasmid. *Appl Environ Microbiol* 70:7511–7519. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.12.7511-7519.2004>.
 43. Gesbert G, Ramond E, Rigard M, Frapy E, Dupuis M, Dubail I, Barel M, Henry T, Meibom K, Charbit A. 2014. Asparagine assimilation is critical for intracellular replication and dissemination of Francisella. *Cell Microbiol* 16:434–449. <https://doi.org/10.1111/cmi.12227>.

1 Supplementary Files

2 FIG S1 SDS-PAGE analysis of purified *F. novicida* DNA gyrases. Recombinant proteins expressed in *E. coli* and purified by Ni-NTA affinity
3 chromatography were resolved on SDS-PAGE (10%) and stained with Coomassie blue. Values on the left indicate molecular weights of the marker
4 proteins.

5 This figure shows that the apparent molecular weights of GyraA and GyraB are of around 100 and 93 kDa that corresponds to their expected molecular
6 masses. For each construct, the protein was purified to >90% purity.

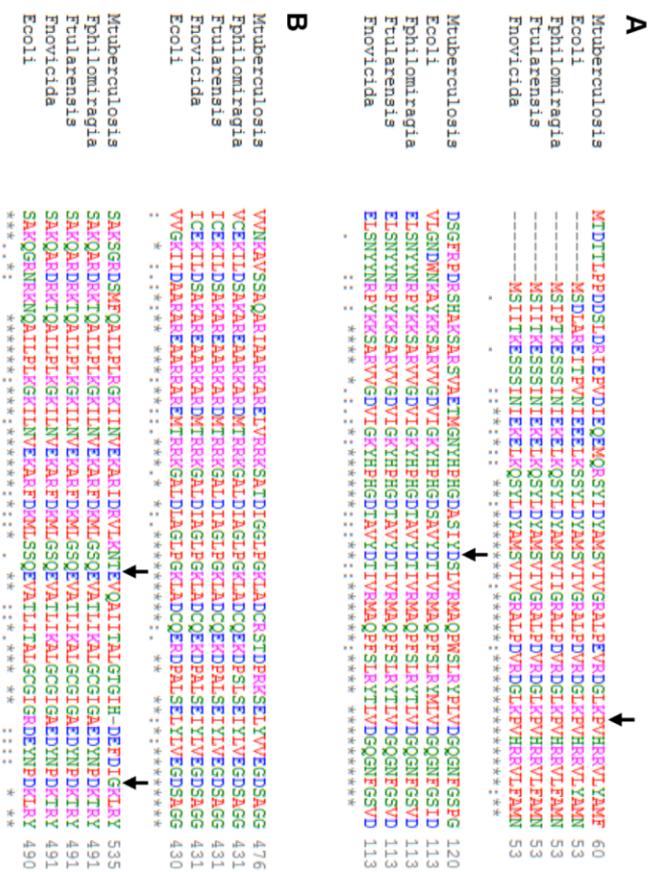
7



8

9

10 FIG S2 Multiple sequence alignment of DNA gyrases. The regions of DNA gyrase from *F. novicida* close to the QRDRs and exhibiting mutations
 11 were aligned with the sequences of other bacterial strains using Clustal Omega. (a) Gyra subunits from *F. tularensis* subsp. tularensis SCHU S4
 12 (gb/AJ168698.1), *F. tularensis* subsp. novicida U112 (gb/AJ161584.1), *F. philomiragia* subsp. philomiragia ATCC 25015 (gb/AJ174730.1), *M.*
 13 *tuberculosis* H37Rv (gb/AFN47847.1) and *E. coli* POAES4 (gi|84028817). (b) Gyrb subunits from *F. tularensis* subsp. tularensis SCHU S4
 14 (gb/AJ169659.1), *F. tularensis* subsp. novicida U112 (gb/AJ161801.1), *F. philomiragia* subsp. philomiragia ATCC 25015 (gb/AJ174249.1), *M.*
 15 *tuberculosis* H37Rv (gb/AAA83016.1), and *E. coli* POAES4 (gi|84028820). Mutated residues are indicated by arrows.



17 TABLE S1 List of primers used in this study

gene	primer name	nucleotide sequence
<i>Cloning in pDEST-17 expression vector</i>		
<i>gyrA</i>	Fno_gyrA_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAAACTGTACTTCCAGGGTTTATAATTACTAAAGAGTC
	Fno_gyrA_Rev	GGGGACCACTTTTGTACAAAGAAAGCTGGGCTTTATTATTCACTCTGCACAGTAAATCAG
	Fno_gyrB_F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAAACTGTACTTCCAGGGTTTGAAGAATAAAGCTTATGACTC
<i>gyrB</i>	Fno_gyrB_Rev	GGGGACCACTTTTGTACAAAGAAAGCTGGGCTTTATTAAACGTCAAAGTTAAAGCAG
	<i>Screening, PCR amplification and sequencing</i>	
<i>gyrA</i>	attB1	ACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
	attB2	ACCACTTTGTACAAAGAAAGCTGGGT
<i>gyrB</i>	Fno_gyrA_F	as above
	FnoGyrA_598R	TATCAATAAGAGCTATAGTACC
	Fno_gyrA_Rev	as above
<i>parE</i>	Fno_gyrB_F	see above
	FnoGyrB_839F	ATCCCAAAAAGAGATGGTGG
	Fno_gyrB_Rev	as above
<i>gyrB</i>	Fno_ParE_1267Fw	GGAGGTTCTGCTAAACAAGCAC
	Fno_ParE_1516Rv	ACATTGCACATAGTAGTGTGGC
<i>Cloning in pFNL16, screening and sequencing</i>		
<i>gyrB</i>	GyrB_FnoF_NotI	aattaaGGCGCCGATGCTGAGAAATAAAGCTTATGACTC
	GyrB_FnoR_AgeI	aattaaACCGGTTTAAACGTCCAAAGTTAAAGCATTAAAGAGC
	GyrB308F	TTATTTTGGACGGTGTGCATGCAGG
	GyrB956F	AACAGGTGAAGATACACGGCGAAAG
	GyrB1698F	TATAGGTCTAGAAGGCCGCTG
	pFNL16_3925F	AATATCTAGACTTGCAAAGAGCTTGG
pFNL16_5403R	AATGCACGCAAAATACATACCTGCC	

19 TABLE S2 Purification conditions for GyraA and Gyrb proteins used in this study
 20

Proteins	Nucleotide changes	AA changes	Optimized purification conditions			
			cells	induction	Lysis buffer	
Gyra_Fno wild-type	-	-	C41(DE3)	ON 18°C	Tris 50mM pH 8.8 - NaCl 500mM - imidazole 10 mM - CHAPS 1%	
Gyra_Fno1	g259t	D87Y	BL21 (DE3)	ON 16°C	Tris 50mM pH 8.8 - NaCl 500mM - imidazole 10 mM - CHAPS 1%	
Gyra_Fno2	a260g	D87G	C41(DE3)	ON 16°C	Tris 50mM pH 8.8 - NaCl 500mM - imidazole 10 mM - CHAPS 1%	
Gyra_Fno3	Δgagtca 1570-1575	ΔE524,ΔS525	C41(DE3)	ON 16°C	Tris 50mM pH 8.8 - NaCl 500mM - imidazole 10 mM - l-tyrosine 0.25 mg/ml - DTT	
Gyra_Fno4	c128a	P43H	C41(DE3)	ON 16°C	Tris 50mM pH 8.8 - NaCl 500mM - imidazole 10 mM - l-tyrosine 0.25 mg/ml - DTT	
Gyrb_Fno wild-type	-	-	BL21 (DE3)	4h 37°C	Tris 50mM pH 8.8 - NaCl 500mM - imidazole 10 mM - CHAPS 1%	
Gyrb_Fno1	+ctc 1396-1398	+P466	BL21 (DE3)	ON 16°C	Tris 50mM pH 8.8 - NaCl 500mM - imidazole 10 mM - CHAPS 1%	
Gyrb_Fno2	Δtaa 1460-1462	D487E,Δ488K	BL21 (DE3)	4h 37°C	Tris 50mM pH 8.8 - NaCl 500mM - imidazole 10 mM - CHAPS 1%	

21
 22
 23
 24

25 TABLE S3 Concentrations of ciprofloxacin inhibiting supercoiling activity (IC50) and stabilizing the cleavable-complex formation (CC 25) by
 26 the recombinant wild-type or mutant DNA gyrases from *F. novicida*.

27

28

Lineage	GyrA mutations	GyrB mutations	IC50 (mg/L)	CC25 (mg/L)
Wild-type	No mutation	No mutation	4.11 ± 0.91	0.9 ± 0.28
Fno1	D87Y	+P466	186.9 ± 40.69	105.9 ± 26.28
-	D87Y	No mutation	152.3 ± 9.2	44.84 ± 1.67
-	No mutation	+P466	105.09 ± 18.86	35.74 ± 14.58
Fno2	D87G	D487E, ΔK488	181.1 ± 43.09	129 ± 33.05
-	D87G	No mutation	83.82 ± 15.2	23.39 ± 2.438
-	No mutation	D487E, ΔK488	9.6 ± 1.07	1.667 ±
Fno3	ΔE524, ΔS52	No mutation	4.98 ± 0.65	1.673 ±
Fno4	P43H	No mutation	18.9 ± 1.07	3.293 ± 0.2945

29

30

31 TABLE S4 Gyra and GyrB mutations identified in ciprofloxacin resistant mutants obtained starting from a same single *F. novicida* colony and
 32 through a one-round selection protocol on enriched MHB agar plates containing 0.075 µg/mL Cipro as described by Jaing *et al* (1). Fifteen
 33 resistant colonies were picked from the plates and propagated in enriched MH broth with 0.05 µg/ml of antibiotic before sequencing of the
 34 QRDR-A and QRDR-B regions using primers described in Table (Fno_gyra_F / FnoGyra_598 and FnoGyrB_839F / Fno_gyrB_Rev).
 35

Mutant	Gyra		GyrB	
	Nucleotide change	AA change	Nucleotide change	AA change
Fno_OS1	c248t	T83I	No mutation	No mutation
Fno_OS2	No mutation	No mutation	+ctc 1396-1398	+P466
Fno_OS3	No mutation	No mutation	c1394t	S465F
Fno_OS4	No mutation	No mutation	c1394t	S465F
Fno_OS5	No mutation	No mutation	c1394t	S465F
Fno_OS6	c248t	T83I	No mutation	No mutation
Fno_OS7	No mutation	No mutation	c1394a	S465Y
Fno_OS8	g259a	D87N	No mutation	No mutation
Fno_OS9	No mutation	No mutation	a1780t	I594F
Fno_OS10	No mutation	No mutation	g1430a	C477Y
Fno_OS11	g259t	D87Y	a1020g	No mutation
Fno_OS12	No mutation	No mutation	c1394a	S465Y
Fno_OS13	No mutation	No mutation	t1393c	S465P
Fno_OS14	c248t	T83I	No mutation	No mutation
Fno_OS15	No mutation	No mutation	t1393c	S465P
Number of mutants		5		10

36
 37
 38 1. Jaing CJ, McLoughlin KS, Thissen JB, Zemla A, Gardner SN, Vergez LM, Bourguet F, Mabery S, Forfanov VV, Koshinsky H, Jackson PJ. 2016.
 39 Identification of Genome-Wide Mutations in Ciprofloxacin-Resistant *F. tularensis* LVS Using Whole Genome Tiling Arrays and Next Generation
 40 Sequencing. *PLoS One* 11:eo163458.
 41

RESULTATS ET DISCUSSION

Cette étude avait pour objectif d'analyser les conséquences fonctionnelles des mutations de l'ADN gyrase observées sur des lignées de *F. novicida* résistantes aux FQ et générées *in vitro*. Pour répondre à cet objectif, les sous-unités recombinantes GyrA et GyrB mutées ou sauvages ont été exprimées et purifiées afin de reconstituer les complexes hétérotétramériques. Grâce à la mise au point de tests de surenroulement et de clivage de l'ADN *in vitro*, jamais décrits jusqu'alors chez *Francisella*, nous avons ensuite pu clarifier le rôle des mutations identifiées dans la résistance aux FQ.

Les résultats obtenus ont montré que la substitution de l'acide aspartique en position 87 (D87) de GyrA était associée à un haut niveau de résistance aux FQ, avec une valeur d'IC₅₀ 2 fois plus élevée pour la mutation D87Y par rapport à la mutation D87G. Le rôle de ce résidu dans l'acquisition de la résistance aux FQ a été décrit dans la littérature pour d'autres bactéries dont *E. coli* et *M. tuberculosis* (160). Nos résultats indiquent qu'il s'agit également d'un « hot spot » de mutation associée à la résistance aux FQ pour les souches de *Francisella*. Dans une moindre mesure, nous avons aussi observé que la substitution P43H de GyrA, jusqu'alors jamais décrite, était également associée à la résistance aux FQ. La modélisation 3D de la structure du QRDR que nous avons réalisée en collaboration avec Claudine Mayer (Institut Pasteur, Paris), montre que ce résidu, qui est conservé dans l'ADN gyrase de nombreux pathogènes, est situé à proximité du site catalytique tyrosine Y122 de l'enzyme qui se lie à l'ADN et du résidu D87 qui interagit avec les FQ. Ainsi, compte tenu de sa localisation, il est vraisemblable que la mutation du résidu P43 puisse altérer l'interaction entre les FQ et la cible. Enfin, la délétion $\Delta E524-\Delta S525$, située en position C-terminale de GyrA et présente chez Fno3, n'affecte pas la sensibilité aux FQ. Les résultats des tests de surenroulement/clivage de l'ADN témoignent également des conséquences des mutations de GyrB dans la résistance aux FQ. Ainsi, l'insertion +P466 est associée à un haut niveau de résistance, contrairement à la mutation D487E- $\Delta K488$ située sur la région C-terminale de GyrB qui n'a pas d'incidence directe sur la résistance aux FQ.

Un point intéressant que nous avons mis en évidence dans ce travail concerne la chronologie d'apparition des mutations. Dans la littérature, il est en effet décrit que la résistance aux FQ des bactéries à Gram négatif est majoritairement associée aux mutations de GyrA, les mutations de GyrB étant moins fréquentes et consécutives à l'apparition des mutations sur GyrA. Le séquençage des gènes correspondant chez les isolats résistants qui

avaient été stockés à différentes étapes du protocole d'évolution expérimentale, a mis en évidence une caractéristique inhabituelle chez *F. novicida* puisque les mutations de GyrB surviennent antérieurement à celles de GyrA. Ce schéma inhabituel d'apparition précoce des mutations GyrB a été confirmé par des expériences d'évolution sur gélose « en une étape » que j'ai réalisées pour répondre à une question des reviewers au moment de la soumission de l'article. Le séquençage des régions cibles *gyrA* et *gyrB* des colonies résistantes à la ciprofloxacine a en effet montré que sur les 15 mutants sélectionnés, 5 présentaient une mutation sur *gyrA* et 10 sur *gyrB* dont 1 porteur de la mutation +P466.

En outre, nous avons observé que certaines mutations « fonctionnellement silencieuses » de GyrB et en l'occurrence la mutation D487E-ΔK488 qui n'a pas d'effet direct sur la sensibilité aux FQ, amplifie les conséquences fonctionnelles des mutations de GyrA et participe donc indirectement à l'acquisition de résistance aux FQ. Cette observation a été confirmée par des expériences de complémentation dans lesquelles je me suis plus particulièrement impliquée. Les résultats montrent que la complémentation du simple mutant GyrB_D487E-ΔK488 Fno2 avec le plasmide pFNLTP6 codant la sous-unité GyrB sauvage ne modifie pas les valeurs de CMI à la ciprofloxacine ce qui confirme que cette mutation sur GyrB n'a aucune conséquence fonctionnelle. En revanche, la sensibilité aux FQ du double mutant GyrB_D487E-ΔK488/GyrA_D87G_Fno2 est partiellement restaurée par complémentation avec la sous-unité GyrB native ce qui suggère un rôle indirect de cette mutation de GyrB dans la résistance aux FQ.

Ces travaux ont permis de souligner l'importance des mutations GyrB dans la résistance aux FQ des souches *Francisella*. Ces résultats sont cohérents avec le modèle de Mustaev *et al.* sur *Mycobacterium smegmatis* qui propose un rôle alternatif des résidus E466 ou K447 de GyrB dans la stabilisation du complexe FQ-enzyme-ADN, dont on sait qu'il est maintenu par les liaisons H₂O-Mg²⁺ formées avec les résidus 83 et 87 de GyrA (161). Très concrètement, cela pourrait ouvrir la voie au développement de nouvelles molécules inhibitrices dont le positionnement dans la QBP serait différent de celui des FQ dont on dispose actuellement. Dans cette perspective, des expériences préliminaires ont été réalisées au laboratoire afin de tenter de résoudre la structure du complexe DNA-gyrase de *F. novicida*. Les premiers résultats sont très encourageants car le complexe soluble a été purifié mais les tests de cristallisation n'ont pas été poursuivis pour le moment.

Une conclusion majeure qui ressort de ce travail est que, clairement, les mutations de GyrA et de GyrB ne rendent pas compte à elles seules de la résistance aux FQ. Ainsi, nous avons

montré que la délétion de GyrA observée chez le mutant résistant Fno3 n'avait pas d'effet sur la sensibilité aux FQ. En outre, les valeurs de CMI continuent d'augmenter après apparition des mutations sur ces deux cibles. Ces données suggèrent que d'autres mécanismes sont impliqués. Le séquençage et l'analyse du génome des mutants terminaux résistants aux FQ a permis de mettre en évidence d'autres mutations pouvant être liées à la résistance (données non publiées). Leur analyse a servi de support à la suite de mon travail de Thèse qui est développée dans le prochain paragraphe.

PUBLICATION N°2

THE FUPA LIPOPROTEIN OF *FRANCISELLA TULARENSIS* PLAYS A MAJOR ROLE IN FLUOROQUINOLONE RESISTANCE THROUGH REGULATION OF VESICLE SECRETION AND BIOFILM FORMATION

Les résultats décrits précédemment suggèrent l'existence de mécanismes de résistances aux FQ additionnels, indépendants des mutations sur GyrA et GyrB. Le séquençage des génomes des isolats intermédiaires et finaux a été réalisé sur toutes les lignées de *Francisella* engagées dans le protocole d'évolution expérimentale et ayant acquis un fort degré de résistance aux FQ (données non publiées). Plus spécifiquement, et de manière remarquable dans le cas des souches résistantes de *F. tularensis* LVS, nous avons observé que l'exposition aux antibiotiques induisait des mutations non-sens au niveau du gène *fupA/B* dans 70% des souches. L'apparition de ces mutations, qui sont précédées par les mutations sur l'ADN gyrase, est accompagnée d'une augmentation modérée mais significative de la CMI des FQ. Cette observation nous a conduits à formuler l'hypothèse d'un rôle de FupA/B dans la résistance aux FQ. Des travaux publiés par une équipe américaine en 2016 (120), alors que nous avons amorcé ce projet, nous ont confortés dans cette approche. En appliquant des méthodes de séquençage de nouvelle génération par microarrays et à haut débit sur des mutants LVS résistants aux FQ développés *in vitro*, des résultats comparables aux nôtres ont été obtenus. Ainsi, et outre les mutations sur *gyrA* (FTL_0533), Jaing *et al.* ont observé que 7 des 11 isolats résistants à la ciprofloxacine présentaient au moins un polymorphisme nucléotidique simple sur le gène FTL_0439 codant la protéine FupA/B. Avant de détailler la manière dont nous avons abordé la problématique, je vais exposer brièvement ce qui était connu de FupA/B au moment où nous avons commencé ce travail.

La protéine FupA/B (Fer Utilisation Protein) de la souche LVS est une protéine hybride qui correspond aux protéines FupA et FupB présentes chez les isolats cliniques de *F. tularensis* de Type A ou B ainsi que chez *F. novicida* et *F. philomiragia* (Figure 16).

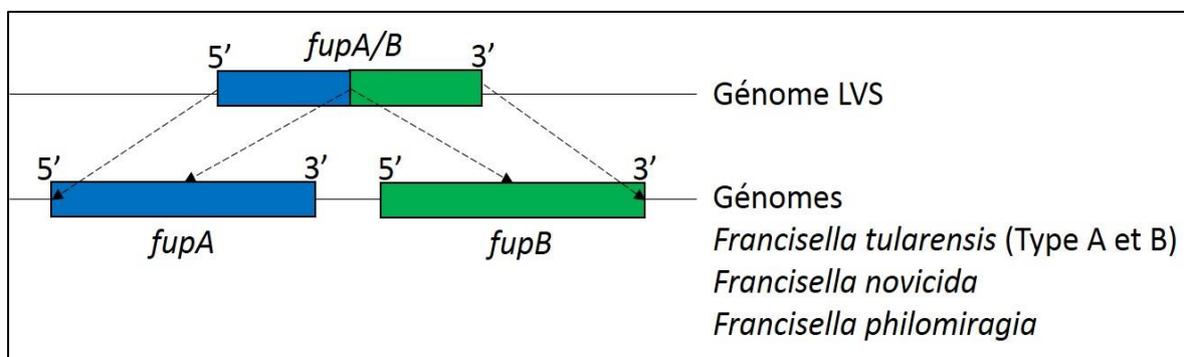


Figure 16. Représentation schématique du gène *fupA/B* de la souche LVS

Lors du séquençage du génome de la souche *Francisella tularensis* subsp *tularensis* SCHU S4 (premier génome de *Francisella* séquencé), les gènes FTT_0918 (FupA) et FTT_0919 (FupB) ont été annotés comme codant des protéines membranaires de fonction inconnue et exclusives au genre *Francisella* (10). C'est l'analyse d'un mutant spontané de SCHU S4 de virulence atténuée, isolé en Suède (FSC043), qui a permis de mettre en évidence pour la première fois la fusion FupA-FupB (162). Cette observation a motivé l'étude phénotypique de mutants de délétion afin de caractériser le rôle de ces gènes dans la virulence bactérienne. Ainsi, la construction du mutant de délétion SCHU S4- $\Delta fupA$ a permis de démontrer que ce gène était associé à la virulence de *Francisella*, contrairement à *fupB* (162). En parallèle, les travaux de Nallaparaju *et al.* ont montré que la protéine FupA de *F. novicida* était impliquée dans la virulence *in vitro* et *in vivo* (163). En effet, les mutants *F. novicida*- $\Delta fupA$ sont plus sensibles aux macrophages activés par l'IFN γ et présentent une stabilité membranaire réduite. Il a aussi été montré que FupA jouait un rôle dans l'acquisition du fer sidérophore-dépendante et indépendante, ce qui contribue à sa réplique et renforce son rôle dans la virulence. De ce fait, la protéine a été nommée FupA pour « Fer Utilization Protein » (164). Plus récemment, il a été décrit que l'expression de FupA n'était pas sous contrôle de la protéine régulatrice de l'acquisition du fer (Ferric Uptake regulator) Fur et était indépendante de la concentration en fer, ce qui a conduit les auteurs à formuler l'hypothèse que FupA pourrait avoir d'autres fonctions que le transport du fer (74).

En ce qui concerne la souche LVS de *F. tularensis*, la fusion des gènes *fupA* et *fupB* a été considérée comme l'un des facteurs d'atténuation de la virulence de la souche (165). Il a été démontré que la protéine hybride homologue, FupA/B, jouait un rôle similaire à celui de FupA dans l'acquisition du fer ferreux et du fer ferrique lié au sidérophore (166,167). De même, FupA/B participe à la croissance intracellulaire et à la virulence de la bactérie chez la souris infectée.

A notre connaissance aucun lien n'a été rapporté entre FupA, FupB, FupA/B et la résistance aux antibiotiques. Les observations décrites ci-dessus nous ont toutefois conduit à considérer le rôle potentiel de la protéine FupA/B dans la résistance aux FQ à partir du modèle expérimental LVS. Dans ce but, nous avons tout d'abord restauré par complémentation l'expression de la protéine dans les mutants d'évolution. Nous avons ensuite généré une souche knock-out (KO) grâce à laquelle nous avons confirmé le rôle de FupA/B dans la résistance aux FQ. L'étude phénotypique de ce KO nous a permis de mettre en évidence des caractéristiques associées à l'acquisition de la résistance.

Ces travaux font l'objet d'un article en préparation.

1 **Manuscrit en préparation**

2
3 The FupA lipoprotein of *Francisella tularensis* plays a major role in fluoroquinolone
4 resistance through regulation of vesicle secretion and biofilm formation

5
6 Claire Siebert^{a,b}, Helena Lindgren^c, Sabrina Ferré^d, Corinne Villers^{a,e}, Sandrine Boisset^{a,b},
7 Julien Perard^f, Anders Sjöstedt^c, Max Maurin^{a,b},
8 Yohann Couté^d, Patricia Renesto^{a,1}

9
10
11 ^aTIMC-IMAG UMR 5525 - UGA CNRS, 38042 Grenoble Cedex 9, France

12 ^bCHU Grenoble Alpes, Centre National de Référence des *Francisella*, CS 10217, 38043
13 Grenoble Cedex 9, France

14 ^cLaboratory for Molecular Infection Medicine Sweden and Department of Clinical
15 Microbiology, Umeå University, Umeå, Sweden

16 ^dUniv. Grenoble Alpes, CEA, Inserm, BIG-BGE, 38000 Grenoble, France

17 ^eUniversité de Caen Normandie, EA4655 U2RM, Caen, France

18 ^fUniv. Grenoble Alpes, CNRS, CEA, BIG-LCBM, 38000 Grenoble, France

19
20
21
22 ¹ To whom correspondence should be addressed.

23 Same address as above.

24 Tel. (33) 4 76 63 74 84

25 Email: patricia.renesto@univ-grenoble-alpes.fr

26
27 Keywords : *Francisella*, fluoroquinolones, OMVs, biofilm, tolerance

28 **Abstract**

29 *Francisella tularensis* is a Gram-negative bacteria responsible for tularemia, a disease for
30 which the high prevalence of failures and relapses is a main concern. Directed evolution
31 experiments carried out in presence of antibiotics revealed that acquisition of fluoroquinolones
32 (FQ) resistance was not exclusively related to mutations in DNA gyrase genes which are the
33 first targets of these molecules. Here, using *F. tularensis* LVS as model, we investigated the
34 role of FupA/B (Fer-Utilization Protein), whose possible contribution to FQ resistance was
35 recently hypothesized. Using trans-complementation/mutagenesis approaches we definitely
36 connected FupA/B expression to FQ sensitivity. Furthermore, we showed that the virulent strain
37 *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, lacking the homologous FupA protein, exhibited a
38 lower FQ susceptibility. Importantly, the deletion of this lipoprotein promotes an increased
39 secretion of outer membrane vesicles (OMVs). Mass spectrometry-based quantitative
40 proteomic characterization of OMVs from LVS and LVS- Δ fupA/B strains led to the
41 identification of 801 proteins among which a subset of 23 proteins exhibiting differential
42 abundance between both strains and may therefore contribute to the observed increased FQ
43 susceptibility. Thus, overexpression of RecA could well correlate with the observed tolerance
44 of the FupA/B deleted strain against bactericidal compounds. We finally demonstrated that
45 OMVs are structural key elements of *F. tularensis* LVS biofilms providing protection against
46 FQ. Taken together, these results showed that mutations targeting FupA/B contribute to
47 antimicrobial resistance through quantitative and qualitative modulations of OMV biogenesis
48 and biofilm formation, providing new basis for understanding and fighting against *Francisella*
49 antibiotic resistance and/or persistence.

50 **Significance statement**

51 Therapeutic failures and relapses are an important problem in the treatment of tularemia, a
52 severe disease caused by *Francisella tularensis*, a class A bioterrorism agent. While mutations

53 on DNA gyrases are for long considered as the essential way by which bacteria acquire
54 resistance against fluoroquinolones (FQ), this work identified a new target used by *F. tularensis*
55 LVS strain to cope with FQ stress. Among the phenotypic changes associated with FupA/B
56 deletion are an increased secretion of OMVs and formation of biofilms that provide bacteria
57 with better survival opportunities through enhanced resistance toward antibiotic stresses. This
58 study provides new insights into the mechanisms of *F. tularensis* resistance against FQ which
59 could be amenable to new therapeutic strategies.

60 **Introduction**

61 *Francisella tularensis* is a Gram-negative, facultative intracellular bacterium responsible for
62 tularemia, a re-emerging infectious disease. This highly infectious (<10 bacteria), aerosolizable,
63 and high-mortality rate pathogen naturally resistant to penicillin is classified as a class A
64 bioterrorism agent by the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (Oyston, Sjostedt
65 et al., 2004). The genus *Francisella* comprises three species, i.e. *F. tularensis*, *F. novicida*, and
66 *F. philomiragia*. *F. tularensis* is further subdivided into subspecies *tularensis* (Type A) and
67 *holarctica* (Type B) which are primarily responsible for human disease, while *F. philomiragia*
68 and *F. novicida* are avirulent in healthy humans. No safe vaccine is available and only a few
69 antibiotic classes are effective in treating tularemia, including fluoroquinolones (FQ). In the last
70 two decades, the overuse of these drugs in clinical practice led to an increased prevalence of
71 highly resistant bacteria of many species (Fabrega, Madurga et al., 2009) including *Francisella*.
72 Failures and relapses that are indeed frequently observed in patients suffering from tularemia
73 pose a serious threat in public health making the development of new antibiotics a priority
74 (Maurin & Gyuranecz, 2016).

75 To investigate the acquisition dynamics of drug resistance in *Francisella* spp., directed
76 experimental evolution protocols were applied on sensitive strains exposed to increasing FQ
77 concentrations (Jaing, McLoughlin et al., 2016, Loveless, Yermakova et al., 2010, Sutura,
78 Levert et al., 2014). These approaches led to the emergence of high-level resistant mutants and
79 confirmed that, in *Francisella* spp as in most Gram negative bacteria (Fabrega et al., 2009), the
80 DNA gyrase is the primary target of FQ. Through genomic analysis coupled to functional DNA
81 supercoiling and cleavage assays, we provided evidence that other mechanisms, independent
82 from GyrA or GyrB mutations, also contribute to FQ resistance in *F. novicida* (Caspar, Siebert
83 et al., 2017). Based on a careful analysis of both microarrays and next-generation sequencing
84 data from isolates that had acquired resistance *in vitro* upon exposure to increasing antibiotic

85 concentrations, a similar conclusion has been drawn with the attenuated *F. tularensis* subsp.
86 *holarctica* live vaccine (LVS) strain (Jaing et al., 2016). Interestingly, and besides *gyrA*
87 (FTL_0533) mutations, 7 out the 11 third round ciprofloxacin resistant isolates exhibited at
88 least one single-nucleotide polymorphism (SNP) in the gene FTL_0439 encoding FupA/B (Fer
89 Utilization Protein), the most common mutation observed being an Asp substitution at position
90 417. The hypothesis of a role played by FupA/B in the resistance of *F. tularensis* LVS against
91 FQ was reinforced by whole genome sequencing of highly resistant clones obtained in our lab
92 after 14 selective passages in presence of ciprofloxacin (Sutera et al., 2014) and which also
93 evidenced a high proportion of mutations on *fupA/B*. Such mutations arise as second-step events
94 after gyrase mutations are acquired and are accompanied with a moderate but significant
95 increase of the FQ minimal inhibitory concentration (MIC). While some amino acid
96 substitutions have been observed in FupA/B under our experimental conditions, 70% of mutants
97 analyzed resulted in stop-codon point mutations in the N-terminal region of the protein
98 (unpublished data).

99 FupA/B is a 58 kDa protein required for iron acquisition and bacterial virulence in *F.*
100 *tularensis* LVS (Lindgren, Honn et al., 2009, Sen, Meeker et al., 2010). It is encoded by the
101 *fupA/B* hybrid gene which results from a recombinational deletion event between adjacent *fupA*
102 (FTT_0918) and *fupB* (FTT_0919) paralogs present in the chromosome of *F. tularensis* subsp.
103 *holarctica* FSC200 and of other close relatives including *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU
104 S4 (Rohmer, Brittnacher et al., 2006). Together with FTT_0025c (*fsIE*), FTT_0267 (*Francisella*
105 metal and virulence; *fmvA*) and FTT_0602c (*fmvB*), *fupA* and *fupB* belong to a family of genes
106 described as unique to *Francisella* genus (Larsson, Oyston et al., 2005). These genes encode
107 outer membrane proteins sharing a DUF3573 domain of unknown function but harboring
108 functional divergences (Table S1, Fig. S1). *FsIE* was described to be a siderophore receptor that
109 shares with FupA the remarkable capacity to mediate iron uptake (Ramakrishnan, Meeker et

110 al., 2008) and to be a virulence factor (Twine, Bystrom et al., 2005) while FmvB was shown to
111 be another virulence factor involved in magnesium but not iron acquisition (Wu, Ren et al.,
112 2016). To date, and despite high degree of sequence homologies within this protein family (Fig.
113 S1), no functional role has been attributed to FupB and FmvA which were associated neither
114 with metal acquisition nor with bacterial virulence (Ramakrishnan, Sen et al., 2012, Twine et
115 al., 2005, Wu et al., 2016). Globally, the precise roles of these DUF3573-containing proteins
116 for which no structural data is available remain to be clarified. It was thus recently evidenced
117 that FupA expression is not regulated by the ferric uptake regulator (Fur) protein and is
118 independent of iron concentration, leading to the assumption that FupA may have alternative
119 functions besides iron transport (Ramakrishnan, 2017).

120 FupA/B contains the first 297 amino-terminal residues of FupA and the C-terminal region
121 of FupB. While a decreased virulence accompanies *fupA* and *fupB* gene fusion (Lindgren et al.,
122 2009, Sen et al., 2010), the chimeric protein retains high-affinity ferrous iron transport ability
123 (Ramakrishnan & Sen, 2014). Furthermore, unlike FupA from the SCHU S4 strain, FupA/B
124 can mediate siderophore-dependent ferric iron uptake (Ramakrishnan & Sen, 2014). Whether
125 the hypothesized link between FupA/B mutations and ciprofloxacin susceptibility (Jaing et al.,
126 2016) is another specific feature of the fusion protein or whether it is inherited from FupA
127 or/and FupB ancestors is questionable. In agreement with the latter hypothesis, we observed
128 that a FQ highly resistant mutant of *F. novicida* (Fno3) handling a DNA gyrase mutation
129 without functional defect (GyrA_ΔE524, ΔS525) exhibited a nonsense mutation in FTN_0444
130 (*fupA*) (Caspar et al., 2017). Moreover *fupA* was identified by others as one of the seven mutated
131 genes in a ciprofloxacin-resistant mutant of *F. tularensis* SCHU S4, besides *gyrA* and *parE*
132 (Chance, Chua et al., 2017).

133 In this work, we show that FupA/B deletion can be used by *Francisella* spp. as a new strategy
134 to cope with FQ stress. First, trans-complementation of *F. tularensis* LVS deletion mutants

135 allowed us to confirm the link between FupA/B and intracellular iron concentration measured
136 through Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectroscopy (ICP-AES) and to
137 validate the hypothesized relationship between deletion of this protein and FQ susceptibility.
138 We then demonstrated, using the virulent strain *F. tularensis* subsp. *tularensis* SCHU S4, that
139 *fupA* deletion contributes to a reduced FQ susceptibility whereas removal of the gene encoding
140 FupB has no effect. Interestingly, we observed that LVS Δ *fupA/B* is more prone to secrete outer
141 membrane vesicles (OMVs) than the wild-type strain. Mass spectrometry (MS)-based
142 quantitative proteomic analyses identified a subset of proteins whose abundance in OMVs is
143 modified between wild-type and Δ *fupA/B* LVS strains and which may therefore contribute to
144 the observed lower FQ susceptibility. Notably, a correlation could be established between the
145 increased expression of RecA and the observed tolerance of the FupA/B deleted strain against
146 ciprofloxacin and gentamicin. Finally, phenotypic analysis of the deletion mutant also revealed
147 that increased OMV secretion is accompanied with enhanced biofilm formation, a process
148 known to be associated with antibiotic resistance and bacterial persistence.

149 **Results**

150 **FupA/B deletion confers FQ resistance to *F. tularensis* LVS**

151 To investigate the impact of FupA/B deletion on FQ resistance in *F. tularensis* LVS, we first
152 complemented resistant mutants. For this, we took advantage of a directed experimental
153 evolution protocol achieved in our lab and based on sub-culturing of bacteria in the presence of
154 progressively increasing concentrations of FQ (Sutera et al., 2014). Because FupA/B mutations
155 arise as a second-step event after gyrase substitutions are acquired, we selected as control the
156 P2V1 mutant isolated at passage 2 and that exhibits a T83K substitution in GyrA accompanied
157 by a lower sensitivity (50 times) to ciprofloxacin than wild-type LVS (MIC 1 mg/L vs 0.02
158 mg/L). The P12V3 mutant, isolated at passage 12, exhibits the same T83K substitution as P2V1
159 as well as a nucleotide insertion at position 108 of the FTL_0439 gene producing a stop codon

160 at position 41 of FupA/B. This mutant which also presents a four amino acids deletion in the
161 FTL_0594 gene encoding the UDP-glc-4-epimerase is more resistant to ciprofloxacin than
162 P2V1 (Fig. 1A, right panel). Importantly, complementation of this clone with the wild-type
163 *fupA/B* restored not only protein expression (Fig.1A, left panel) but also ciprofloxacin resistance
164 at a level similar to the P2V1 parental strain while no difference was observed using an empty
165 plasmid (Fig.1A, right panel). This effect is likely to be specific for FQ since no difference was
166 observed for the other tested compounds including doxycycline, azitromycine, gentamicine and
167 linezolid (not shown). To definitely demonstrate that FupA/B deletion contributes to FQ
168 resistance and exclude a possible role for the UDP-glc-4 epimerase, we generated a FTL_0439
169 knock-out mutant of *F. tularensis* LVS (*LVSΔfupA/B*) in a two-step process using the *sacB*
170 suicide vector pMP812 (LoVullo, Sherrill et al., 2009b). While the sucrose-resistant colonies
171 lacking *fupA/B* had a small-colony phenotype, their growth kinetics in liquid modified Mueller
172 Hinton (MHM) media was comparable to wild-type LVS (Fig.S2A-D). Consistent with the
173 described role of FupA/B in iron acquisition (Lindgren et al., 2009, Sen et al., 2010),
174 *LVSΔfupA/B* exhibited a lower iron content than the wild-type strain ($44.74 \pm 5.65 \mu\text{g/L}$ vs
175 $102.5 \pm 12.7 \mu\text{g/L}$; n=4; $P<0.05$), a defect restored by the trans-functional complementation of
176 *fupA/B* ($183.2 \pm 1.72 \mu\text{g/L}$) (Fig.S2E). As shown in Fig.1B, the deletion of *fupA/B* in LVS
177 increased the ciprofloxacin MIC by a factor of 3, while a sensitivity comparable to the wild-
178 type was restored in the rescue strain. While the ciprofloxacin MIC values of these strains which
179 are devoid of DNA gyrase mutations are much lower than those of the directed evolution
180 mutants (Fig. 1A), these results strongly validate the role played by FupA/B in FQ sensitivity.
181 In agreement with the observations made with the evolution strains, this effect was found to be
182 specific for FQ (not shown).

183 To investigate whether the functional link between FupA/B and FQ resistance was inherited
184 from FupA and/or FupB or whether this effect was specific to the fusion protein, we compared

185 the susceptibility to ciprofloxacin of the highly virulent *F. tularensis* SCHU S4 to that of
186 mutants lacking *fupA*, *fupB* or both. The obtained results showed that FupA but not FupB
187 deletion is accompanied with an increased FQ resistance in *F. tularensis* SCHU S4 (Fig.1C).
188 Remarkably, and consistent with the relationships between FupA expression and the phenotypic
189 FQ sensitivity, the SCHU S4 mutant harboring the double deletion $\Delta fupA/\Delta fupB$ exhibited a
190 susceptibility profile similar to those of SCHU S4 $\Delta fupA$.

191 ***F. tularensis* LVS lacking FupA/B produce more OMVs**

192 Bioinformatic analysis of FupA/B paralogs (Table S1, Fig.S1) showed that FupA and FupA/B
193 share a lipoprotein signature at their N-terminus end (residue C18) (Huntley, Conley et al.,
194 2007). Ensuring envelope stability of Gram-negative bacteria is one of the functional
195 assignments of lipoproteins (Wilson & Bernstein, 2016). Thus, deletion of FupA/B may induce
196 outer membrane destabilization, an hypothesis supported by experiments in *F. novicida*
197 showing the presence of a greater abundance of proteins in the supernatant of a $\Delta fupA$
198 (FTN_0444) strain compared to that of the wild-type strain U112 (Nallaparaju, Yu et al., 2011).
199 In agreement with these observations made for *F. novicida*, our comparative proteomic analysis
200 of LVS and LVS $\Delta fupA/B$ secretomes revealed a strong enrichment of numerous proteins in
201 LVS $\Delta fupA/B$ supernatant. Despite the absence of bacterial lysis assessed by LDH release
202 measurement, the identified proteins included a large and unexpected proportion of cytosolic
203 candidates (not shown). In several Gram-negative bacteria the deletion of lipoproteins was also
204 found to promote OMV biogenesis (Schwechheimer & Kuehn, 2015). This point, together with
205 our preliminary proteomic results and the increased number of surface protrusions observed on
206 LVS lacking *fmvB* which belongs to the same gene family than *fupA* (Wu et al., 2016) (Table
207 S1), prompted us to explore the influence of FupA/B deletion on OMV production. We thus
208 purified OMVs from the different LVS strains grown either in the mid-exponential or stationary
209 phase and compared counting and sizing using a Nanoparticle Tracking instrument (Movie S1).

210 Results obtained show that *fupA/B* deletion induces an approximately 5-fold increase in number
211 of OMVs at the stationary phase, this hypervesiculating phenotype being restrained by
212 complementation with FupA/B (Fig.2A). The OMV size distribution between the strains is in
213 the same diameter range of around 220 nm (Fig.2B), a characteristic confirmed by dynamic
214 light scattering (DLS) which estimates an hydrodynamic diameter of 250.9 ± 2.96 and $249.9 \pm$
215 2.79 nm for LVS and LVS Δ *fupA/B* OMVs respectively (mean \pm SEM; N=20 ; $P>0.05$).
216 Immunostaining of the whole bacterial lysates and OMVs with anti-LPS antibody showed
217 similar ladder-like patterns for LVS, LVS Δ *fupA/B* as well as for the *fupA/B* complemented
218 strain (Fig.2C, left and middle panels). Of note, LPS profiles from bacteria and OMVs were
219 quite similar. Interestingly, protein patterns of OMVs from wild-type LVS and Δ *fupA/B* mutant
220 were shown to be similar as revealed by silver-stained SDS-PAGE (Fig.2C, right panel).

221 **OMV proteomes from wild-type *F. tularensis* LVS and *fupA/B* mutant are slightly** 222 **different**

223 In order to finely characterize the proteome content of OMVs from wild-type *F. tularensis* LVS
224 and its *fupA/B* mutant, we undertook a MS-based quantitative proteomic analysis. For this, the
225 proteins from 3 biological replicates of OMVs from both conditions were extracted and digested
226 with trypsin before analysis of the resulting peptides by nanoliquid chromatography coupled to
227 tandem MS. Informatics and statistical filtering allowed us to identify with high confidence 801
228 different proteins quantified in at least 3 biological replicates of one condition (Table S2). A
229 majority of these 801 proteins were already identified in published proteomic characterizations
230 of membrane fractions prepared from *F. tularensis* LVS strain (Chandler, Sutherland et al.,
231 2015, Post, Slutter et al., 2017). Interestingly, we identified the FtlA lipase recently shown to
232 be a component of *F. tularensis* LVS OMVs (Chen, Cui et al., 2017), as well as 13 proteins
233 encoded from the pathogenicity island. The use of Lipop (Juncker, Willenbrock et al., 2003)
234 allowed us to predict lipoprotein signal peptides for 53 of the identified proteins. As expected,

235 comparing localization prediction inferred by PSORTb (Yu, Wagner et al., 2010) of the total
236 predicted LVS proteome with our repertoire of 801 OMV proteins indicated that OMV fraction
237 is enriched with proteins predicted to be localized in the outer membrane, periplasm, cytoplasm,
238 or exhibiting multiple localizations (Fig. 3A). The crossing of intensity-based absolute
239 quantification (iBAQ) with localization prediction for each identified protein demonstrated that
240 the most represented categories in the OMV fraction were of outer membrane, cytoplasm and
241 unknown localization, regardless of whether OMVs were prepared from wild-type *F. tularensis*
242 LVS or $\Delta fupA/B$ mutant (Fig. 3B). However, a thorough quantitative comparison of the
243 proteomes of OMVs purified from both strains revealed 23 proteins with statistically
244 differential abundance (Fig. 3C, Table S2). Among them, FupA/B was the only protein to be
245 found enriched in OMVs purified from wild-type *F. tularensis* LVS. Interestingly, this group
246 of 23 proteins was found to be statistically enriched in predicted lipoproteins (Fisher's exact
247 test p-value < 0.02).

248 Strikingly, among the 22 proteins found to be enriched in OMVs purified from the $\Delta fupA/B$
249 mutant, FTL_1836, a member of FupA/FupB protein family (Table 1), was one of the highly
250 overexpressed protein. Deletion of *fupA/B* also led to an increased presence in vesicles of a
251 protein functionally related to iron acquisition as being involved in the synthesis of the
252 LucA/IucC siderophore family (FTL_1832). The LVS $\Delta fupA/B$ OMVs were also characterized
253 by a higher amount of proteins playing a role in bacterial replication (FTL_1025 ; FTL_1407
254 ; FTL_1842 ; FTL_1850; FTL_1931) and in the metabolism of glycerolipids (FTL_1644),
255 carbohydrates (FTL_1591 ; FTL_1899) or that of cofactors and vitamins (FTL_1274).

256 Interestingly, some of the identified candidates are possibly related to antibiotic resistance such
257 as RecA (FTL_0012). Other proteins that could be classified into the so-called intrinsic
258 resistome are membrane transport proteins that might potentially contribute to the permeability
259 of drugs into cells and including the Bcr/CflA drug resistance efflux transporter (FTL_1835),

260 the ABC transporter ATP-binding protein (FTL_0146) and the outer membrane protein
261 assembly factor BamB (FTL_1724). Upregulated targets also include the FTL_0449-encoded
262 protein which belongs to the MerR family of bacterial transcription regulators that mediate
263 responses to environmental stress including exposure to heavy metals, antibiotics, or oxygen
264 radicals (Brown, Stoyanov et al., 2003).

265 To check whether the observed upregulations result solely from a selective packing of proteins
266 that could take place during OMV biogenesis (Bonnington & Kuehn, 2014, Haurat, Aduse-
267 Opoku et al., 2011) or could reflect a differential expression of the selected genes in wild-type
268 and mutant strains, we undertook quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) analyses.
269 Globally, our results showed a good correlation between protein enrichment in OMVs and over-
270 expression of the corresponding gene, suggesting that differences in OMV content between
271 wild-type LVS and $\Delta fupA/B$ strains are probably linked to differences in selected gene
272 expression (Table 1).

273 **FupA/B deletion confers tolerance of *F. tularensis* to FQ**

274 Among LVS $\Delta fupA/B$ upregulated targets is RecA, a key activator of the widespread SOS
275 response allowing bacteria to counteract DNA damage and thus promoting their survival to FQ
276 exposure (Baharoglu & Mazel, 2014, Dorr, Lewis et al., 2009). This observation led us to
277 investigate whether the FupA/B deletion contributes to FQ tolerance in *Francisella*. For this,
278 we first determined the minimal bactericidal concentration (MBC)/MIC ratio which were found
279 to be of 66 vs 8.3 for LVS $\Delta fupA/B$ and the wild-type strain, respectively (n=3). Thus, and
280 according to the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines which defines
281 tolerance as a MBC/MIC ratio >32, LVS $\Delta fupA/B$ exhibits a tolerant phenotype (Barry, 1999).
282 This result was confirmed through the estimation of the MDK₉₉ (Minimum Duration for Killing
283 99% of the population), a new measure of tolerance recently proposed (Brauner, Fridman et al.,
284 2016, Brauner, Shores et al., 2017). As illustrated Fig.4A, when bacteria were exposed to 25x

285 the ciprofloxacin MIC, the delay required to reach 99% killing was substantially higher for
286 LVS Δ *fupA/B* than for the wild-type strain. Such an increased survival of the FupA/B deleted
287 strain was also observed with gentamicin (Fig.4B) while exposure of bacteria to 25x the
288 doxycycline MIC failed to induce 99% killing under the same time period (Fig.4C).

289 ***F. tularensis* lacking FupA/B produces more biofilm**

290 Among the many roles attributed to OMVs, their ability to promote bacterial resistance to
291 antibiotics is of particular interest in the context of this work (Schwechheimer & Kuehn, 2015).
292 OMVs can indeed exert this effect by acting as decoy targets for these compounds, by ensuring
293 the transfer of antibiotic-resistance genes or of enzymes with ability to degrade antibiotics, by
294 mediating the export of the drugs and by participating to biofilm formation (Medvedeva,
295 Baranova et al., 2014, Schwechheimer & Kuehn, 2015). Several arguments, *e.g.*, the presence
296 of genomic DNA onto the outer surface of *F. novicida* OMVs (Pierson, Matrakas et al., 2011),
297 support a possible structural role for such vesicles in the formation of *Francisella* biofilms that
298 was described as a key mechanism for bacterial survival and persistence within the environment
299 (van Hoek, 2013). Accordingly, results obtained here demonstrate that the biofilm formation is
300 significantly increased when *fupA/B* is lacking, an effect observed with the genetically modified
301 strain LVS Δ *fupA/B* (Fig.5A) as well as with the isolates P12V3 derived from the directed
302 evolution experiment (Fig.S3). Importantly, we also noticed a significant enhancement of
303 biofilm production when the LVS Δ *fupA/B* cell suspension was supplemented with purified
304 vesicles (Fig.5B).

305 Confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis of bacteria gently collected at the air-
306 buffer interface after a 48 h incubation without shaking at 37°C showed that, in contrast to LVS,
307 LVS Δ *fupA/B* was embedded into an extracellular polymeric substance (EPS) (Fig.5C-E). The
308 size of OMVs which is in the order of 200 nm is close to resolution limit of the confocal
309 microscope, making their observation tricky, whereas some particles seem to be distinguished

310 within the biofilm matrix (Fig.5E, arrows). The production of EPS was further confirmed by
311 specific staining. Interestingly, and besides the presence of α -mannopyranosyl and α -
312 glucopyranosyl residues in EPS specifically stained with the fluorescent-lectin-concanavalin A,
313 this analysis evidenced that, when embedded in a three-dimensional matrix, bacteria moves
314 from a bacillus-coccobacillus planktonic form to a coccus biofilm form with clusters of
315 bacterial cells (Fig6; Movie S2).

316 **Contribution of biofilm formation on FQ susceptibility**

317 To investigate whether biofilm was contributing to FQ resistance, planktonic and biofilm (72
318 h) populations of *LVS Δ fupA/B* were exposed to increasing concentrations of ciprofloxacin
319 above the MIC. The survival of bacteria was then determined by both the resazurin-based
320 metabolic activity assay and CFU counting. Using the broth dilution method and following the
321 CLSI recommendations (Barry, 1999), the ciprofloxacin MIC was previously determined to be
322 0.064 μ g/mL for *LVS Δ fupA/B* (Fig.1B) and considered as a reference value for such
323 experiments. To carefully compare the effects of ciprofloxacin on biofilm vs planktonic cells,
324 the effect of the antibiotic was evaluated in parallel on a bacterial cell suspension normalized
325 to the CFU detected in a 72h-biofilm (0.6 to 0.8×10^9 bacteria) and the antibiotic effect was
326 monitored by metabolic activity measurement. Under these conditions, following 24h
327 incubation with 0.064 μ g/mL of ciprofloxacin (MIC x1), the planktonic bacteria display a small
328 but significant ($P < 0.05$) decrease of metabolic activity (Fig. 7A) accompanied with a cell
329 replication decay (Fig.7B). In biofilm conditions, *LVS Δ fupA/B* was found much less vulnerable
330 to ciprofloxacin, the metabolic activity being altered starting from 10x the ciprofloxacin MIC
331 (Fig.7C). Interestingly, viable and metabolically active bacteria colonizing biofilm lost
332 culturability on gelose-enriched plates (Fig.7D).

333

334

335 **DISCUSSION**

336 In this work we demonstrated that deletion of the hybrid gene *fupA/B* results in an lower FQ
337 susceptibility of the *F. tularensis* LVS strain (Type B) and we characterized the related
338 phenotypic changes responsible for such an antibiotic resistance also observed following *fupA*
339 but not *fupB* deletion in the highly virulent SCHU S4 strain (Type A). While the role of the
340 lipoproteins FupA and FupA/B in iron acquisition and bacterial virulence is established since
341 long (Lindgren et al., 2009, Sen et al., 2010), these results provide the first evidence of their
342 relationship with FQ resistance. The time-kill curves of FQ susceptibility generated in this study
343 clearly demonstrated that LVS Δ *fupA/B* are FQ-tolerant bacteria as compared to the wild-type
344 strain. More strikingly, such an approach unveiled that LVS Δ *fupA/B* also exhibits an increased
345 survival under treatment with the bactericidal antibiotic gentamicin. In contrast, no difference
346 was observed doxycycline, a result in agreement with the fact that tolerance applies only to
347 bactericidal and not to bacteriostatic compounds (Brauner et al., 2016). The MDK metric used
348 here thus allowed to highlight a tolerance phenotype previously overlooked due to comparable
349 CMI level. Such a phenotype may well contribute to relapses and failures observed after
350 tularemia treatment completion in infected patients. As a consequence, and as previously
351 proposed (Brauner et al., 2017), this method should be used as standards for the *in vitro*
352 characterization of antibiotics sensitivity which ultimately may lead to more appropriate
353 treatments for recalcitrant infections.

354 Our results pointed out that the deletion of *fupA/B* results in a hypervesiculating phenotype in
355 *Francisella* LVS. The formation of OMV has been described as a physiological response of
356 several Gram-negative bacteria exposed to antibiotics (Schwechheimer & Kuehn, 2015).
357 Furthermore, and while the precise molecular mechanisms involved are still to be elucidated,
358 these vesicles are now considered as playing a crucial role in protecting bacteria against
359 antibiotics (Chattopadhyay & Jaganandham, 2015). In line with what we observed for FQ

360 resistance in *F. tularensis*, a higher amount of produced OMVs was reported for a
361 ciprofloxacin-resistant mutant of the mycoplasma *Acholeplasma laidlawii* (Medvedeva et al.,
362 2014). The capacity of several *Francisella* strains, including *F. tularensis* LVS and SCHU S4,
363 to produce OMVs was previously described (Brudal, Lampe et al., 2015, Chen et al., 2017,
364 McCaig, Koller et al., 2013, Pierson et al., 2011, Sampath, McCaig et al., 2017), but the
365 regulation of their biogenesis and secretion is still poorly documented. Since lipoproteins are
366 known to play critical roles in biogenesis and stabilization of OM (Wilson & Bernstein, 2016),
367 we hypothesized that removal of the FupA/B lipoprotein could directly promote OMV over-
368 production. Three main mechanisms can trigger an increase of OMV budding: a reduced
369 lipoprotein-dependent cross-linking between the OM and the underlying peptidoglycan layer,
370 the accumulation of peptidoglycan exerting a turgor pressure on the OM, and the enrichment
371 of OM with phospholipids or LPS (Jan, 2017). Several pieces of evidence obtained here suggest
372 that the increased OMV secretion observed in *LVSΔfupA/B* results from a reduced envelope
373 cross-linking. First, the electrophoretic pattern of LPS of the different strains was found
374 unchanged, meaning that the increased secretion of OMVs is not induced by LPS remodeling.
375 Moreover, homogeneity of vesicle size indicates that the bacterial phospholipid composition
376 which could affect the curvature is preserved whether FupA/B is expressed or not. Finally, our
377 analyses also revealed that whole cells and OMVs display similar LPS profiles, confirming the
378 OM origin of vesicles. Another recently proposed mechanism of OMV biogenesis involves the
379 ferric uptake regulator (Fur)-dependent downregulation of a lipid transport system under iron
380 limitation conditions (Roier, Zingl et al., 2016). While several combinatorial effects between
381 iron and antibiotics have been described, an impressive heterogeneity in published results has
382 been pointed out (Ezraty & Barras, 2016). Whether the lower intracellular iron concentration
383 detected in *LVSΔfupA/B* modulates in some way the FQ resistance cannot be formerly
384 excluded. Of note is that the enhanced antibiotic resistance observed with iron-deficient bacteria

385 is often associated with a growth defect that does not occur upon deletion of *fupA/B* which is
386 not under Fur-regulation.

387 OMVs are multifaceted particles whose composition depends on the regulation of their
388 biogenesis and which trigger either offensive or defensive functions aimed to protect bacteria
389 against various environmental stress (Schwechheimer & Kuehn, 2015). The analysis of the
390 proteomes of OMVs purified from *F. philomiragia* (Pierson et al., 2011), *F. novicida* (McCaig
391 et al., 2013, Pierson et al., 2011) and *F. tularensis* SCHU S4 (Sampath et al., 2017) allowed to
392 identify 100 to 400 different proteins. One of the common features that emerged from these
393 analysis is the high proportion of virulence factors and OM proteins, such as the highly
394 antigenic FopA, that make OMVs promising candidates for the development of protein-based
395 vaccines, an hypothesis strengthened by their capacity to reduce the severity of *Francisella*
396 infection in both mouse (McCaig et al., 2013, Pierson et al., 2011) and zebrafish (Brudal et al.,
397 2015) infection models. The proteomic analysis presented here provides a unique repertoire of
398 801 proteins identified in the OMVs purified from *F. tularensis* LVS. In line with the vesicle
399 biogenesis process (Schwechheimer & Kuehn, 2015), and as discussed above, many of the
400 OMV-enriched proteins are OM and periplasmic proteins.

401 The thorough quantitative comparison of the protein content of OMVs from wild-type LVS
402 and LVS Δ *fupA/B* strains grown under similar conditions and in absence of antibiotic challenge
403 revealed a subset of differentially expressed proteins. With a few exceptions, and as assessed
404 by qRT-PCR, the differentially expressed targets are in striking qualitative agreement with the
405 differential abundance of the corresponding bacterial mRNAs. Thus, and as observed for LPS,
406 the protein content of OMVs collected from bacteria grown at the stationary phase under
407 shaking is likely to reflect the underlying bacterial cell composition rather than resulting from
408 a selective sorting of cargo proteins (Bonnington & Kuehn, 2014). Interestingly, we observed
409 that the majority of changes arising from the *fupA/B* deletion was associated with upregulation

410 of proteins involved in bacterial metabolism. It is now acknowledged that the metabolic
411 alterations arising from antibiotic resistance are not necessarily conferring a reduced bacterial
412 fitness but can also trigger a gain of fitness in such a way that, in the absence of antibiotics,
413 resistant populations are not outcompeted by susceptible ones (Martinez & Rojo, 2011). The
414 need to increase pathogen survival when FupA/B is lacking is consistent with its role in iron
415 acquisition (Lindgren et al., 2009, Sen et al., 2010). On its own, a reduced level of this
416 nutritional element represents a main perturbation that most probably contributes to a reduction
417 of LVS Δ fupA/B fitness that could be compensated by such a metabolic adaptation. Another
418 strategy displayed by this mutant and relevant for iron uptake is the overexpression of the
419 siderophore biosynthesis protein encoded by FTL_1832 that presents some homologies with
420 the cytosolic legiobactin A endowed for the capacity to stimulate the growth of iron-starved
421 *Legionellae* (Allard, Viswanathan et al., 2006). Otherwise we showed that the fupA/B deletion
422 in *F. tularensis* LVS is also accompanied by an increased expression of RecA. By promoting
423 the autocatalytic cleavage of the LexA repressor, this protein is a central actor of the SOS-
424 response to DNA damage that could indirectly confer a phenotypic resistance and help bacteria
425 to survive antibiotic aggression (Baharoglu & Mazel, 2014). In agreement with this hypothesis,
426 we highlighted that LVS Δ fupA/B was more tolerant to the wild-type strain against both
427 ciprofloxacin and gentamicin.

428 Beyond the qualitative changes of the OMV composition that may reflect bacterial
429 adaptation to face antibiotic stress, we also demonstrated a quantitative modulation of their
430 production rate that could play a major role on FQ resistance by providing a structural support
431 for biofilm formation. Although previously suggested (van Hoek, 2013), this work reports the
432 first experimental evidence for of the role played by OMVs in the biofilm formation in
433 *Francisella* ssp. Through an accurate comparative analysis of the survival of planktonic and
434 biofilm LVS Δ fupA/B exposed to FQ, we established a clear relationship between the biofilm

435 growth mode and a lower FQ susceptibility. While biofilm bacteria from various species were
436 described as endowed with a greater capacity to resist to antibiotics than their planktonic
437 counterparts, such a contribution to drug resistance was never examined before for *Francisella*
438 ssp. Interestingly, and while still metabolically active, we observed that biofilm-embedded
439 LVS Δ fupA/B cells presented a growth defect and were likely to acquire a viable but non
440 culturable (VBNC) state as described for *Staphylococcus aureus* (Pasquaroli, Zandri et al.,
441 2013). We also noticed that LVS Δ fupA/B cells present within biofilms undergo morphological
442 changes, moving from a bacillus to a rounded shape, a phenomenon that may be related to a
443 survival mode.

444 The issue of antibiotic tolerance is complex and the resistance of *F. tularensis* against FQ is
445 definitely not the sole consequence of DNA gyrase mutations (Caspar et al., 2017, Jaing et al.,
446 2016). The work presented in this paper highlighted a new pathway based on FupA/B alteration
447 through which FQ could drive the emergence of drug resistance. Data gathered here shed light
448 on the tolerance phenotype of LVS Δ fupA/B, the increased MIC of biofilm bacteria as well as
449 on their VBNC state, thus providing new basis for more comprehensive studies in relation to
450 antibiotic challenge. The antibiotic tolerance/resistance is undoubtedly a multifactorial event
451 and we believe that these mechanisms contribute to treatment failures and to the development
452 of persister cells responsible for relapse events *in vivo*.

453 **Materials and Methods**

454 **Bacterial strains and growth conditions.**

455 *F. tularensis* subsp *holarctica* LVS (NCTC 10857) and *F. tularensis* subsp *tularensis* SCHU
456 S4 were used as parental strains. LVS strains were grown on Polyvitex-enriched chocolate agar
457 (PVX-CHA) plates (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France) and SCHU S4 on Modified Mueller-
458 Hinton (MMH) agar plates incubated at 37°C in a 5% CO₂-enriched atmosphere for 48-72 h.

459 Liquid cultures were carried out at 37°C in different media, as indicated. All experiments were
460 conducted in a biosafety level 3 laboratory.

461 **Production of anti-FupA antibody**

462 All the primers used for cloning and sequencing are listed in Table S3. The N-terminus end of
463 *fupA/B* (pb 4 to 528) was amplified from the genomic DNA of *F. tularensis* LVS using the
464 gene-specific primers p1/p2 and the High-Fidelity PCR master mix (Phusion, Finnzymes). The
465 resulting PCR product was cloned into the pDEST-17 vector with a 6xHis N-terminal tag
466 sequence using the Gateway cloning system from Invitrogen and following the manufacturer's
467 instructions. (Invitrogen, Carlsbad, CA). The integrity of the construct was confirmed by DNA
468 sequencing (Eurofins, Ebersberg, Germany).

469 The *E. coli* BL21(DE3) strain was used as the host for protein expression. The cells were grown
470 in Luria broth (LB) supplemented with ampicillin (100µg/ml) to an absorbance of
471 approximately 0.6 and expression was induced overnight at 16 °C by addition of 0.5 mM
472 isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG). The cells were pelleted by centrifugation (5,000
473 x g, 20 min), resuspended in lysis buffer (50 mM Tris pH 8.8, 200 mM NaCl, 10 mM imidazole,
474 1% CHAPS and Complete Protease Inhibitor® (Roche Diagnostics)), then disrupted by
475 sonication. After centrifugation (20,000 rpm, 30 min, 4°C) the bacterial lysate was applied onto
476 a Ni²⁺-NTA column (Qiagen) for affinity purification. After extensive washings (50 mM Tris
477 pH 8.8, 200 mM NaCl, 20 mM imidazole) the protein was eluted in presence of 300 mM
478 imidazole. The eluted fractions were analyzed on 12% SDS-PAGE and Coomassie blue
479 staining. The fractions containing the purified protein were pooled and concentrated using an
480 Amicon Ultra centrifugal device with 10-kDa cutoff membrane and further purified by size
481 exclusion chromatography (SEC) using an ENrich SEC 650 column and the NGC
482 Chromatography System (Bio-Rad). The purity of the N-ter-FupA/B protein was assessed by

483 SDS-PAGE before concentration to 1 mg/ml for rabbit immunization and production of a
484 polyclonal antibody (Biotem, France).

485 **Construction of the FupA/B complementation plasmid**

486 The *pfsIA* promoter and *fupA/B* were amplified from LVS genomic DNA using the High-
487 Fidelity PCR master mix and primer pairs p3/p4 and p5/p6, respectively. PCR primers were
488 engineered to introduce a BspEI restriction site in the 3' region of *pfsIA* and in the 5' region of
489 *fupA/B* allowing to generate the fusion. After purification (QIAquick PCR purification kit,
490 Qiagen) both PCR products were digested with BspEI and ligated with T4 DNA ligase. The
491 fused 1,979 bp construct was then amplified with the primers p3 and p6 which also contain
492 BamHI and EcoRI restriction sites, respectively.

493 Digested amplicon was cloned into the replicative plasmid pMP828 (LoVullo et al., 2009b)
494 digested by the same restriction enzymes. The resulting FupA/B complementation plasmid
495 designed pMP828-*fupA/B* was verified by sequencing. It was introduced by electroporation into
496 LVS strains and selected on media containing kanamycin. Complementation was confirmed by
497 PCR on purified DNA and by western-blot with the anti-FupA antibody on whole bacterial
498 extracts.

499 **Construction of a FTL_0439 knock-out strain**

500 LVS Δ FTL_0439 (LVS Δ *fupA/B*) was produced by a two-step process and using the suicide
501 plasmid pMP812 as previously described (Gesbert, Ramond et al., 2014, LoVullo, Molins-
502 Schneekloth et al., 2009a). Briefly, the recombinant plasmid pMP812- Δ *fupA/B* was obtained
503 by overlap PCR. A 829 bp 5' flanking region and a 421 bp intragenic region of *fupA/B* were
504 amplified from LVS genomic DNA and using primers p7/p8 and p9/p10, respectively. Primers
505 p8 and p9 have an overlapping sequence of 13 nucleotides resulting in deletion of the *fupA/B*
506 coding sequence from nucleotides 1 to 1,232 after cross-over PCR with primers p7 and p10
507 containing specific sequences of restriction sites NotI and BamHI to limit the fusion. The final

508 1,261 bp PCR product was digested by NotI and BamHI and cloned into the digested pMP812
509 to generate pMP812- $\Delta fupA/B$. This suicide plasmid was introduced into *F. tularensis* LVS
510 strain by electroporation and recombinant cells which have integrated the plasmid into their
511 genomes, were selected on PVX-CHA plates supplemented with kanamycin (10 μ g/ml).
512 Plasmid integration was checked on isolated colonies using primers located on the pMP812 and
513 either downstream or upstream the integration region (primer pairs p11/p12, p13/p14). Positives
514 clones were then grown in liquid medium without selection to allow the second recombination
515 to occur and were plated on PVX-CHA plates supplemented 5% (w/v) sucrose. Colonies were
516 analyzed for FTL_0439 deletion with primers p11/p14. The gene deletion was confirmed
517 through PCR and sequence analysis.

518 **Iron measurement**

519 Intracellular iron concentration was measured on stationary phase bacteria grown in MMH not
520 supplemented with iron over 15h into a shaking incubator (200 rpm at 37 °C). Briefly, the cells
521 have been washed several time with PBS-EDTA 10 mM before hydrolysis with HNO₃ at 65%
522 overnight at 95°C and measurements were performed ICP-AES (Shimadzu ICP 9000 with Mini
523 plasma Torch in axial reading mode) as previously described (Perard, Coves et al., 2016) and
524 using Ytterbium as an internal standard to prevent calibration drift and fluidic perturbation. The
525 results obtained were expressed in μ g/L.

526 **Minimal Inhibitory Concentration Measurement (MIC)**

527 For the *F. tularensis* LVS strains, the MICs were determined using a broth micro dilution
528 method recommended by the CLSI, as previously described (Sutera et al., 2014). To maintain
529 the plasmids into the evolution strains and LVS $\Delta fupA/B$ transformed with pMP818 or pMP828-
530 *fupA/B*, kanamycin (10 μ g/ml) was added to the Mueller-Hinton broth supplemented with 2%
531 PolyViteX® (MH-PVX) (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France). One row of a 96-well microtiter
532 plate was filled with 75 μ L of two-fold serial dilutions of ciprofloxacin in MH-PVX medium,

533 to obtain final FQ concentrations ranging from 0.125 to 32 µg/mL for the evolution mutants
534 and from 0.001 to 0.5 µg/ml for the other strains. A bacterial inoculum (75 µL per well, 5×10^5
535 CFU/mL of final inoculum) was then added to each well. Antibiotic free cultures were used as
536 a positive control and MH-PVX medium served as a negative control. Microplates were
537 incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. The MICs were read after 48 h culture incubation.
538 MICs corresponded to the minimum ciprofloxacin concentration that allowed complete
539 inhibition of visual growth of bacteria. Experiments were conducted at least thrice in triplicate.
540 The *F. tularensis* SCHU S4, SCHU S4Δ*fupA*, SCHU S4Δ*fupB* and SCHU S4Δ*fupA*Δ*fupB*
541 strains were exposed to a two-fold serial dilutions of ciprofloxacin in Chamberlain`s medium
542 in a range from 0.016 to 0.5 µg/mL. The OD_{600nm} of the inoculum was 0.02. The MICs were
543 read after 72 h and corresponded to the minimum ciprofloxacin concentration where the
544 OD_{600nm} from triplicate cultures did not significantly exceed 0.02 ($P > 0.05$). Otherwise the MIC
545 assay of ciprofloxacin for the SCHU S4 strain and mutants was determined essentially as
546 described for the LVS strain and mutants.

547 **Tolerance measurement**

548 The tolerance was first determined by the MBC/MIC ratio measured from the 96-well plates
549 used for the MIC determination. Briefly, supernatants were aspirated from wells where no
550 visible bacterial growth was observed and collected samples were diluted before plating onto
551 PVX-CHA plates and incubated at 37°C.

552 The tolerance was also evaluated using the method based on MDK metric (Brauner et al., 2016,
553 Brauner et al., 2017) as follows. Bacterial cultures were grown in 10 ml of MMH at 37°C under
554 shaking to OD_{600nm} 0.5 and were challenged with 25 times the MIC of ciprofloxacin (1.6 µg/ml),
555 gentamicin (6.25 µg/ml) or doxycycline (6.25 µg/ml) for 6h at 37°C under shaking. Every hour,
556 50 µl of culture were collected and 10-fold serial dilutions were performed in PBS before

557 plating onto PVX-CHA plates. The number of tolerant cells was assessed through CFU
558 counting and data were expressed as a percent of CFU relative to untreated bacteria.

559 **Western-blot analysis of FupA/B expression**

560 Bacteria pellets resuspended Laemmli loading buffer supplemented with NP-40 (1% final
561 concentration) were subjected to 12% polyacrylamide SDS-PAGE before transfer on
562 nitrocellulose membrane (Trans-Blot Turbo, Biorad). Western-blot analysis was performed
563 using a polyclonal antibody to FupA/B (1:40,000) and a rabbit secondary antibody coupled to
564 peroxidase (1:10,000 ; Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA, USA). The mouse anti-
565 *Francisella*-IglC (1:2000 ; *bei* Ressources, Manassas, VA, USA) coupled to the peroxidase-
566 conjugated anti-mouse (1:10,000 ; Jackson ImmunoResearch, Baltimore, PA, USA) was used
567 as positive control. Detection was carried out with enhanced chemiluminescence (Clarity™
568 Western ECL, Biorad®) signal was acquired using the Biorad Chemidoc XRS + System.

569 **Western-blot analysis of LPS expression**

570 Expression of LPS was performed as described above starting from bacterial lysates or OMVs
571 quantitatively normalized and separated on 4-20% gradient SDS-PAGE gel (Biorad). The
572 polyclonal rabbit anti-*F. tularensis* LVS Lipopolysaccharide (LPS) from Kerafast (Kerafast,
573 Inc., Boston, MA, USA) was diluted 1:10,000 and the rabbit secondary antibody-HRP at
574 1:10,000.

575 **Isolation and quantification of OMVs**

576 Bacterial cultures were grown in MMH at 37°C under shaking to late logarithmic (OD_{600nm} 0.8)
577 or stationary (OD_{600nm} 2) growth phase. After addition of azide (0.01% w/v), bacteria were
578 pelleted by centrifugation (7,000 × *g*, 10 min) and the supernatants passed through a 0.22-μm
579 filter unit to remove intact cells. In preliminary experiments, recovered supernatants were plated
580 on PVX-CHA plates to ensure sterility. The pelleted OMVs collected by ultracentrifugation
581 (Sorvall Ultracentrifuge; 100,000 × *g*, 2 h) were resuspended in PBS for washing. The

582 ultracentrifugation step was repeated and the freshly resuspended OMVs were used for direct
583 quantification (Nanosight, Malvern Instrument) as well as for SDS-PAGE analysis. The protein
584 concentration of the different batches of purified OMVs evaluated by Bradford assay was
585 ranging from 32 to 45 $\mu\text{g/ml}$.

586 **Dynamic Light Scattering**

587 Dynamic Light Scattering (DLS) (Wyatt instrument) was used to measure size, size distribution
588 and polydispersity of purified OMV particles in solution. Calibration was achieved using 50
589 nm and 100 nm latex beads (Malvern). Each sample was analyzed twice, each measure being
590 repeated 10 times and data merged to estimate the hydrodynamic radius of OMV particles. For
591 all samples analyzed the polydispersity index was below 0.16.

592 **Mass spectrometry-based quantitative proteomic analyses**

593 OMV proteins were stacked in the top of a SDS-PAGE gel (4-12% NuPAGE, Life
594 Technologies) and stained with Coomassie blue R-250 before in-gel digestion using modified
595 trypsin (Promega, sequencing grade) as previously described (Casabona, Vandebrouck et al.,
596 2013). Resulting peptides were analyzed by online nanoliquid chromatography coupled to
597 tandem MS (UltiMate 3000 and LTQ-Orbitrap Velos Pro, Thermo Scientific). Peptides were
598 sampled on a 300 μm x 5 mm PepMap C18 precolumn and separated on a 75 μm x 250 mm
599 C18 column (PepMap, Thermo Scientific) using a 120-min gradient. MS and MS/MS data were
600 acquired using Xcalibur (Thermo Scientific). Peptides and proteins were identified and
601 quantified using MaxQuant (version 1.5.8.3, (Cox & Mann, 2008) using *F. tularensis subsp.*
602 *holarctica* LVS database from MicroScope (Medigue, Calteau et al., 2017) and the frequently
603 observed contaminant database embedded in MaxQuant. Trypsin was chosen as the enzyme
604 and 2 missed cleavages were allowed. Peptide modifications allowed during the search were:
605 carbamidomethylation (C, fixed), acetyl (Protein N-ter, variable) and oxidation (M, variable).
606 Minimum peptide length was set to 7 amino acids. Minimum number of peptides and razor +

607 unique peptides were set to 1. Maximum false discovery rates - calculated by employing a
608 reverse database strategy - were set to 0.01 at peptide and protein levels. The mass spectrometry
609 proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE
610 (Vizcaino, Csordas et al., 2016) partner repository with the dataset identifier PXD010305.
611 Statistical analysis were performed using ProStaR (Wieczorek, Combes et al., 2017). Proteins
612 identified in the reverse and contaminant databases, proteins only identified by site, proteins
613 identified with only 1 peptide and proteins exhibiting less than 3 iBAQ values in one condition
614 were discarded from the list. After log₂ transformation, iBAQ values were normalized by
615 median centering before missing value imputation (replacing missing values by the 1 percentile
616 value of each column); statistical testing was conducted using limma t-test. Differentially
617 expressed proteins were sorted out using a log₂ (fold change) cut-off of 2 and a p-value cut-off
618 of 0.01 (FDR inferior to 5% according to the Benjamini-Hochberg method).

619 **Bioinformatics**

620 Subcellular localization of proteins of the *F. tularensis subsp. holarctica* LVS database were
621 predicted using PSORTb (version 3.0.2, (Yu et al., 2010)). Prediction of lipoprotein signal
622 peptides, other signal peptides and N-terminal membrane helices in proteins of the *F. tularensis*
623 *subsp. holarctica* LVS database were performed using LipoP (Juncker et al., 2003). If several
624 prediction categories (excluding cytoplasmic) were sorted out for the same protein, a delta score
625 was calculated ; if this delta score was below 5, both predictions were conserved.

626 **Quantitative Real-Time PCR**

627 Gene transcription was determined by quantitative Real-Time (qRT-PCR) from 500 µl bacterial
628 cultures grown to stationary phase (24h). Total RNA was extracted from bacterial pellets
629 resuspended in RNeasy Protect Bacteria Reagent (Qiagen, USA) and using the RNeasy Mini Kit
630 (QIAGEN) following the manufacturer's instructions. Contaminating genomic DNA was
631 removed using the Turbo DNA-free™ kit (Ambion) the final RNA concentration and purity

632 were measured using a Nanodrop spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc.). After a
633 reverse transcription step starting from 1 µg of RNA and using the iScript™ Reverse
634 Transcription Supermix (Biorad), the samples were used as templates for qPCR. For each
635 extraction, a control reaction without reverse transcriptase ruled out putative genomic DNA
636 contamination of RNA samples. Quantitative PCR was carried out with StepOnePlus Real-
637 Time PCR System (Applied Biosystems) in 10 µl reaction volume containing 1 µl of template
638 and 9 µl of fast SYBR® green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) containing 300 nM
639 of genes specific primers (Table S4). Relative changes in gene expression between LVS and
640 *LVSΔfupA/B* were assessed by the delta-delta cycle threshold (Ct) method and with rRNA 16S
641 as reference gene. All samples and controls were run in duplicate from at least 2 different
642 batches of cDNA.

643 **Biofilm assay**

644 Biofilm formation was quantified by Crystal violet assay as previously described (Dean, Chung
645 et al., 2015). Briefly, overnight bacterial cultures grown in MMH at 37°C under shaking were
646 diluted to a concentration of 1.10^9 cells/ml and 200 µl of the bacterial suspension was added to
647 a flat-bottom 96-well plate. After 72 h at 37°C in a 5% CO₂ incubator without shaking the
648 OD_{600nm} was measured to normalize bacterial growth (Tecan Plate reader) and bacteria were
649 gently aspirated before three well washings with sterile PBS. The plate was then incubated for
650 1 hour at 70°C, stained with 200 µl of 0.1% (w/v) Crystal violet/well for 15 minutes and washed
651 as described above. Solubilization and quantification of the biofilms was achieved by addition
652 of 200 µl acetic acid (30% v/v) and measurement of OD at 595 nm.

653 **Fluorescence microscopy**

654 Bacteria were grown as described above in conditions allowing biofilm formation. For each
655 time point (t_0 , 24 h, 48 h and 72 h), samples collected at the air-water interface were fixed with
656 4% (w/v) paraformaldehyde for 10 min at room temperature and washed twice with sterile PBS.

657 Slides were then incubated with FM[®]1-43FX membrane probe (Life Technologies) for 30 min
658 at RT and mounted with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, California,
659 USA). Bacteria and biofilms were observed and imaged with a confocal laser scanning
660 microscope LSM710 Zeiss equipped with a 63x/1.4 oil-immersion objective and the Zeiss Zen
661 software.

662 **Statistical analysis**

663 All data correspond to biological replicates. They were analyzed with Student's t- tests and
664 using the GraphPad PRISM software. The number of independent data points and P values are
665 reported in figure legends.

666 **Author contributions**

667 P.R., Y.C. and H.L. designed research;
668 C.S., H.L., S.F., C.V., S.B., J.P. and P.R. performed experiments;
669 A.S. and M.M. contributed new reagents and analytic tools;
670 C.S., H.L., S.F., C.V., Y.C. and P.R. analyzed data;
671 Y.C., P.R. wrote the paper.
672 The authors declare no conflict of interest.

673 **Acknowledgments**

674 Authors are very grateful to Alain Charbit and Gaël Gesbert (Institut Necker Enfants Malades,
675 Université Paris Descartes, Paris) for providing advices for the construction of the *LVSΔ_{fupA/B}*
676 mutant, to Bastien Touvet (IAB, Grenoble) for his wonderful support in video image processing
677 as well as to Rémi Sadoul and Christine Chatellard (Grenoble, Institute of Neurosciences,
678 Grenoble) for their help into the use of the Nanosight instrument. They also thank Yves Usson
679 for providing access to Life Science Imaging Facility (ISdV,IBiSA labelled) of the Grenoble-
680 Alpes University and Corinne Loeuillet for her valuable help in qRT-PCR primer design
681 (TIMC-IMAG, Grenoble). This work has been supported by the FINOVI Foundation.

Table 1. Proteins whose abundance significantly differs in FupA/B deleted strain as compared with LVS.

ORF	Description	Proteomic data ^a			qRT-PCR data ^b
		score	P-Value	LogFC	LogFC
FTL_0439	DUF3573 domain-containing protein FupA/B	196,48	5,5226E-05	-7,52577196	nd
FTL_1931	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase 2.4.2.8	35,762	3,7272E-06	7,95033342	4,97 ± 0,24
FTL_1836	DUF3573 domain-containing protein	106,53	8,1905E-06	7,66110499	4,45 ± 1,26
FTL_1835	Bcr/CflA family drug resistance efflux transporter	10,788	4,2138E-05	4,74375095	2,45 ± 0,50
FTL_1842	Aspartyl/glutamyl-tRNA amidotransferase subunit A	25,759	0,00070266	3,29921922	3,5 ± 0,37
FTL_0146	ABC transporter, ATP-binding protein	66,127	0,00103677	2,64293944	1,89 ± 0,38
FTL_0012	Recombinase A	23,629	0,00127529	3,38036766	1,86 ± 0,48
FTL_1644	Glycerol kinase	1,5761	0,001313	3,18959478	0,89 ± 0,33
FTL_1850	Adenylosuccinate lyase 4.3.2.2	76,329	0,00290404	2,93821586	1,47 ± 0,10
FTL_1274	Biotin synthesis protein BioC	8,5509	0,00310019	2,08179398	4,86 ± 1,39
FTL_0203	VWA domain-containing protein	67,725	0,00496868	2,28589582	6,56 ± 0,64
FTL_1724	Outer membrane protein assembly factor BamB	188,45	0,0050169	2,19810953	6,78 ± 1,06
FTL_1025	30S ribosomal protein S18	2,9555	0,00502734	2,03769224	2,6 ± 0,50
FTL_1045	Conserved hypothetical lipoprotein	50,354	0,00524306	2,362267	2,12 ± 0,36
FTL_1407	Threonyl-tRNA synthetase	20,082	0,00553302	2,07539867	1,73 ± 0,31
FTL_0449	HTH-MerR Superfamily transcription regulator protein	10,91	0,00624757	3,4734326	0,96 ± 0,46
FTL_1591	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit	73,596	0,00860376	2,01843356	2,38 ± 0,85
FTL_1899	Glutamine synthetase 6.3.1.2	74,386	0,00862336	3,80186705	1,23 ± 0,44
FTL_0738	Hypothetical lipoprotein	53,597	0,00923321	3,8760831	2,29 ± 1,29
FTL_1832	LucA/lucC family siderophore biosynthesis protein	16,088	0,00933872	2,72099163	3,9 ± 1,016

Changes in protein expression found with proteomic analysis were confirmed by qRT-PCR performed on at least two different batches of total RNA extracted from 24h bacterial cultures and using 16sRNA as control. ^aSee details in Table S2. ^bValues represent the average ± SEM of 3 to 6 measurements.

FIGURES

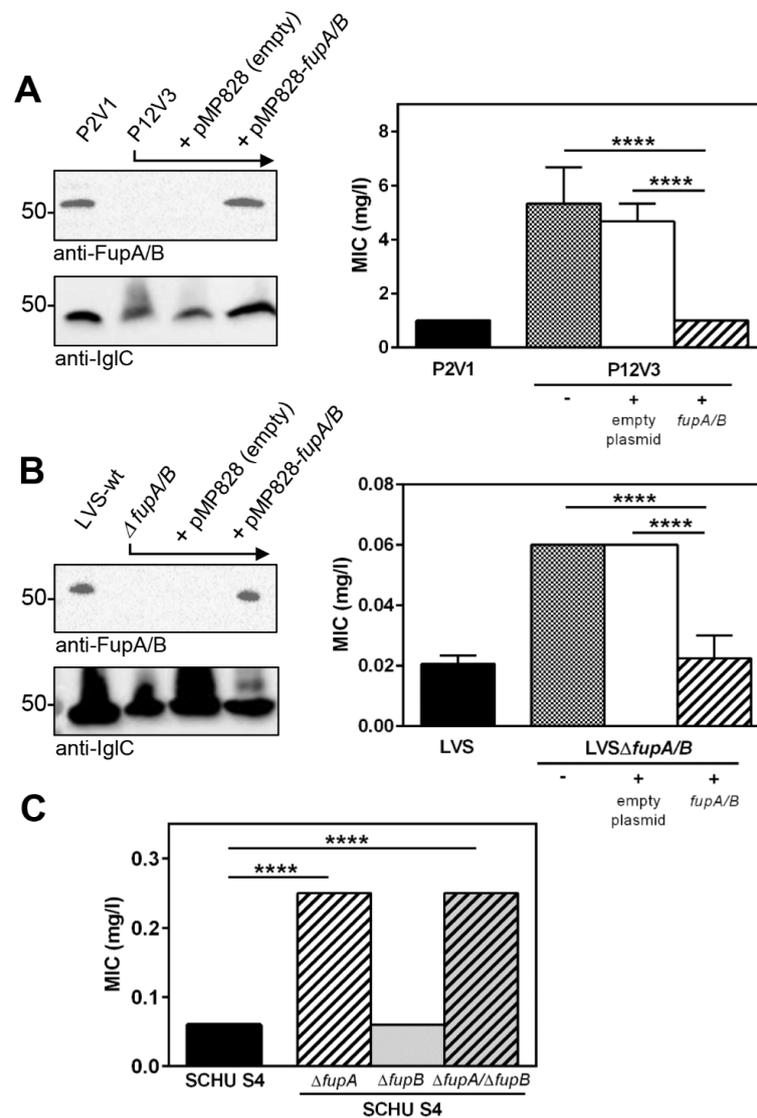


Fig. 1. Restoration of ciprofloxacin resistance phenotype in *fupA/B* complemented mutants.

(A) Left panel: FupA/B expression was evaluated by western-blot and using anti-IgIC as positive control on whole lysates of LVS mutants resulting from directed evolution experiments (Sutera et al., 2014) showing that protein expression in P12V3 is restored upon gene trans-complementation using the plasmid pMP828. Right panel: The same strains were assayed for ciprofloxacin susceptibility measured as MIC values. (B) Same experiments performed on LVS and LVS Δ *fupA/B* strains. (C) Ciprofloxacin susceptibility of *F. tularensis* SCHU S4 as well as Δ *fupA*, Δ *fupB* and the double Δ *fupA*/ Δ *fupB* deletion mutants. MIC were determined from triplicate cultures from three different experiments. (****) P<0.0001.

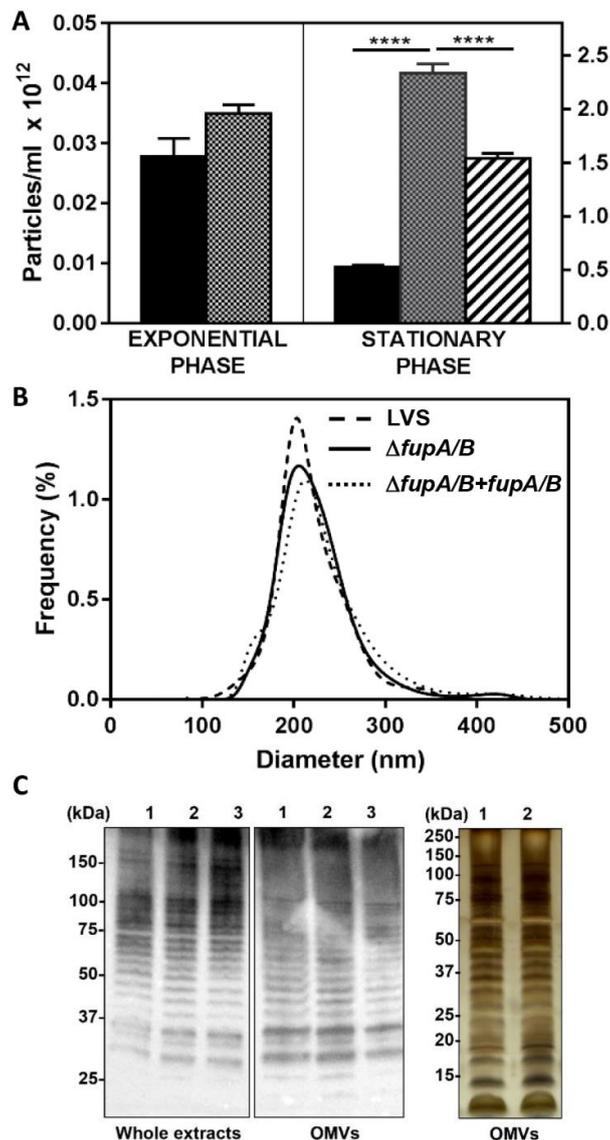


Fig. 2. Correlation between OMVs secretion and biofilm formation in *F. tularensis* LVS.

(A) Nanosight enumeration of OMVs purified from *F. tularensis* LVS (black columns), $\Delta fupA/B$ mutant (dotted columns) and $\Delta fupA/B$ mutant complemented with *fupA/B* (hatched columns). Bacteria grown in MHM at 37°C under shaking were collected either at the exponential or stationary growth phase, as indicated. Data are expressed as mean \pm SEM of 4 different experiments. (****) $P < 0.0001$. (B) Nanosight sizing of OMVs purified from stationary growth phase bacteria. (C) LPS and protein profiles of whole bacterial lysates and of purified OMVs. Left and middle panels: whole bacterial extracts (5 μ g) and OMVs samples (1.5 μ g) from (1) LVS, (2) $\Delta fupA/B$ or (3) $\Delta fupA/B + fupA/B$ strains were separated on 4-20% gradient gel before transfer and immunostaining with the anti-LPS antibody. Right panel: Silver staining of OMV proteins (1.5 μ g) separated on 12% SDS-PAGE.

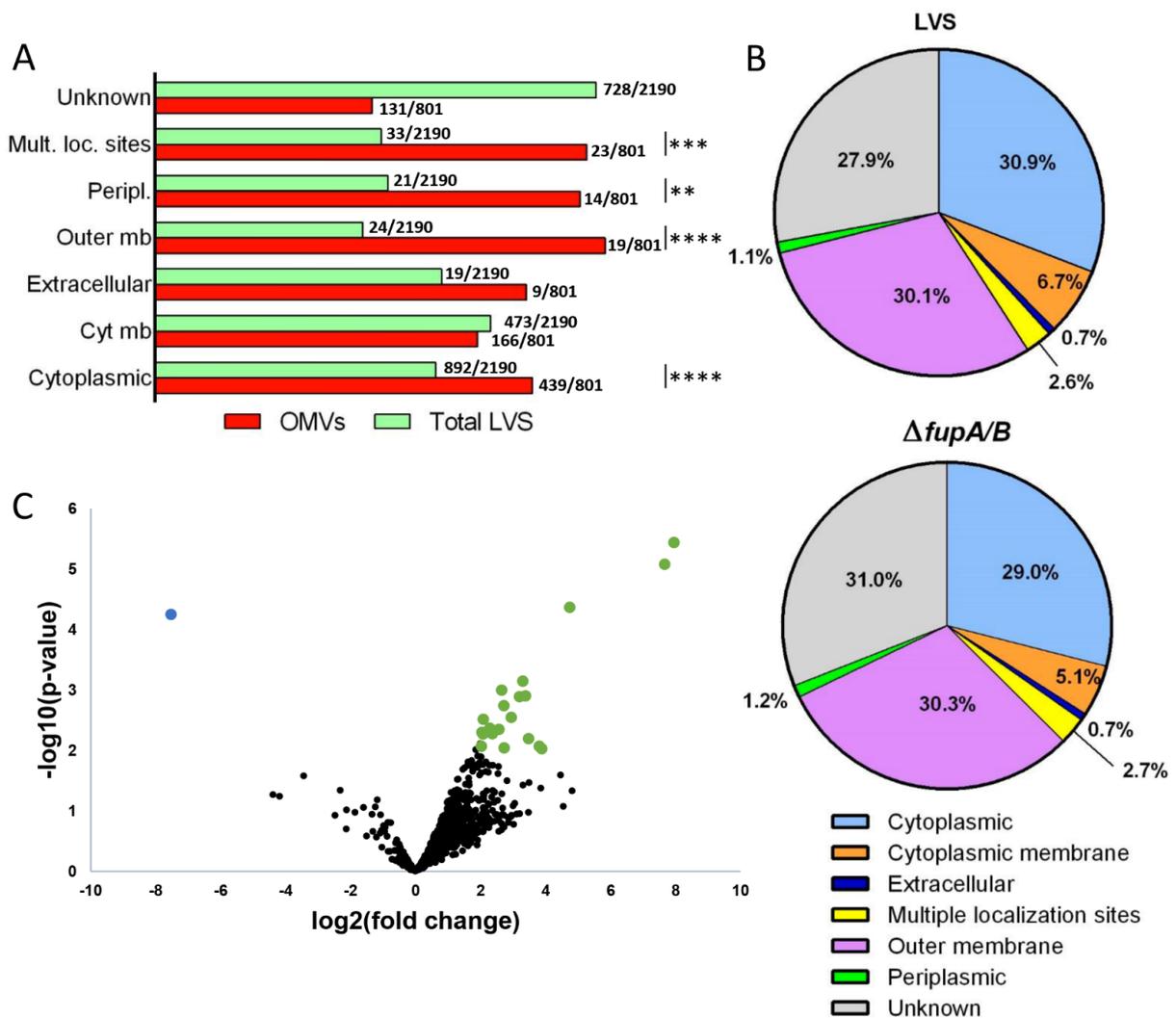


Fig.3. Proteomic characterization of OMV proteomes from wild-type *F. tularensis* LVS and the $\Delta fupA/B$ mutant.

(A) Localization of proteins from total proteome (2190 proteins) and purified OMVs (801 identified proteins) as predicted by PSORTb. Over-representation of OMVs proteins compared to total proteome in each category was tested using Fisher's exact test (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$). (B) Predicted localization of proteins identified in OMVs from wild-type LVS strain and $\Delta fupA/B$ mutant. Each category is represented by the summed abundances (iBAQ values) of the contributing proteins. (C) Volcano plot representing the $-\log_{10}(\text{P-value})$ plotted against the $\log_2(\text{fold change})$ for each quantified OMV protein. One protein from the mutants strain (green dots) and twenty-two proteins from the wild-type strain (blue dots) were found to be statistically differentially enriched.

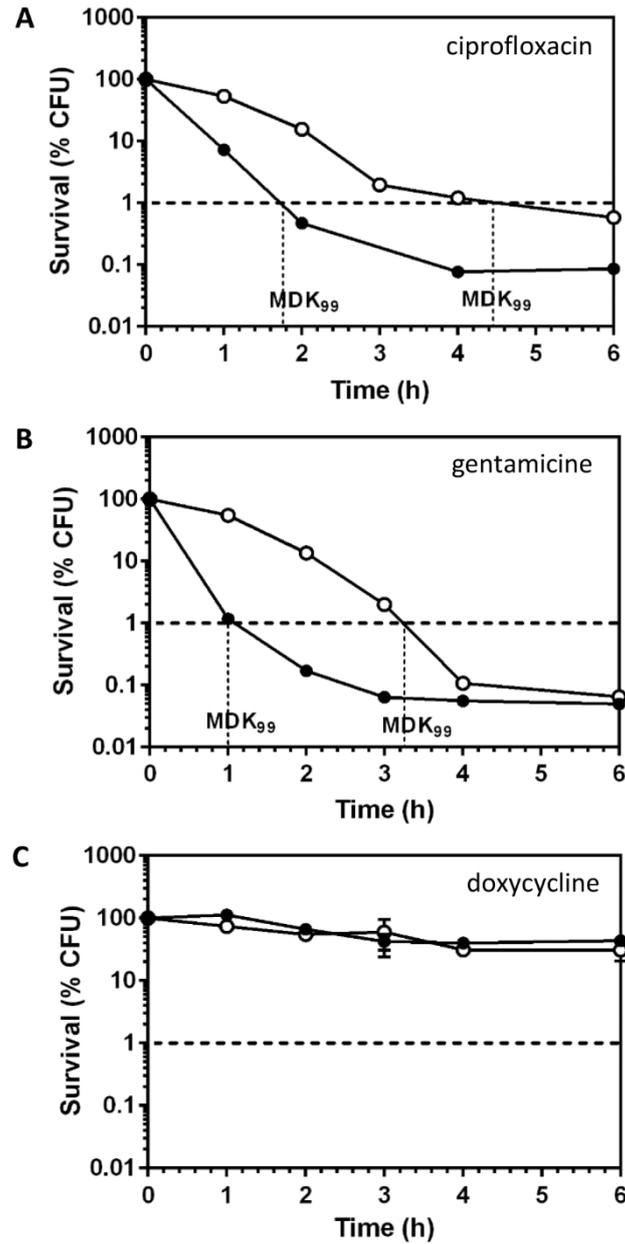


Fig.4. Killing curves of LVS and LVS Δ fupA/B

Exponential growth phase LVS (black circles) or LVS Δ fupA/B (white circles) were exposed to 25x the MIC of (A) ciprofloxacin (1.6 mg/L), (B) gentamicin (6.25 mg/L) or (C) doxycycline (6.25 mg/L) and the CFU were determined by plating. This graph is representative of 3 independent experiments.

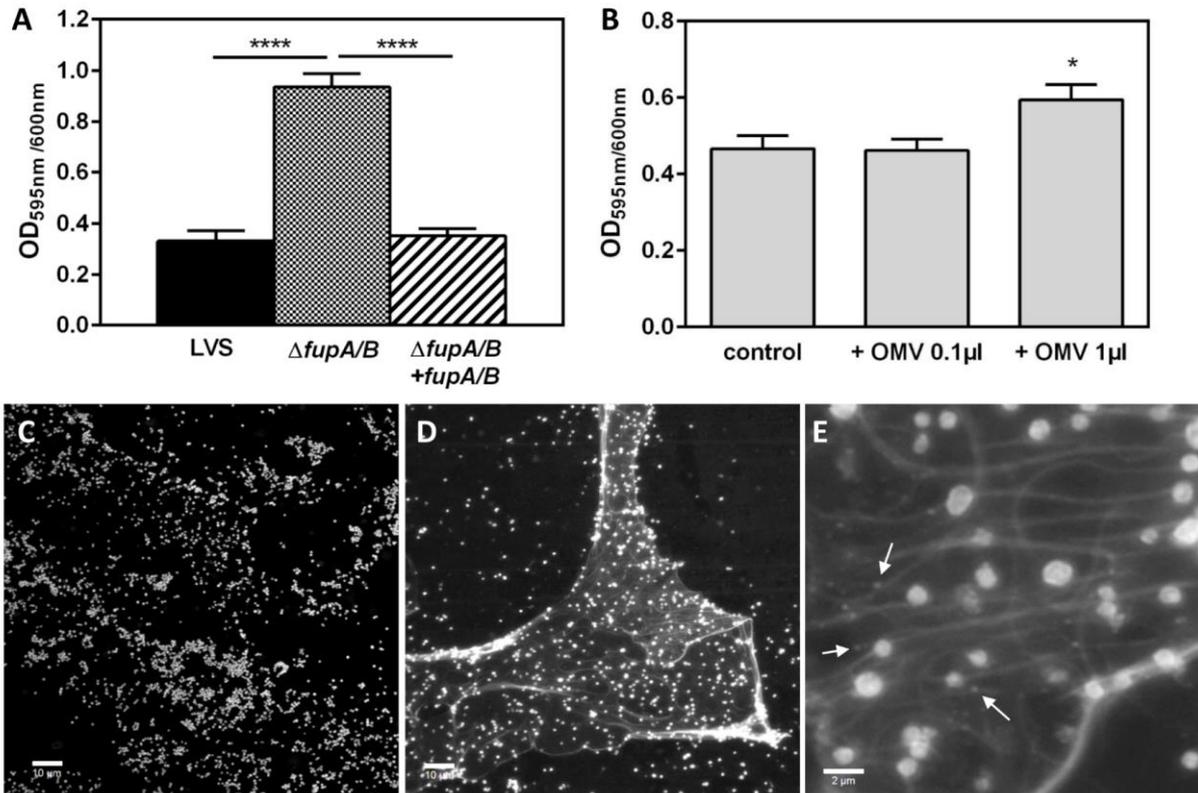


Fig. 5. Biofilm formation by *F. tularensis* LVS.

Crystal violet staining was performed to assess the biofilm formation by *F. tularensis* LVS (black columns), LVS $\Delta fupA/B$ (dotted columns) and LVS $\Delta fupA/B$ complemented with *fupA/B* (hatched columns) grown for 72h in 96 well plates at 37°C without shaking. (B) The biofilm formation was evaluated after 48h incubation of LVS $\Delta fupA/B$ supplemented with OMVs. Data are expressed as mean \pm SEM of 3 different experiments. (****) $P < 0.0001$, (*) $P < 0.05$. (C) Biofilm formation was also evaluated using *confocal* laser-scanning microscopy (CLSM) from *F. tularensis* LVS and (D, E) LVS $\Delta fupA/B$ stained with FM 1-43X dye. Bar scales 10 μ m (C, D) and 2 μ m (E). Arrows indicate the presence of OMVs.

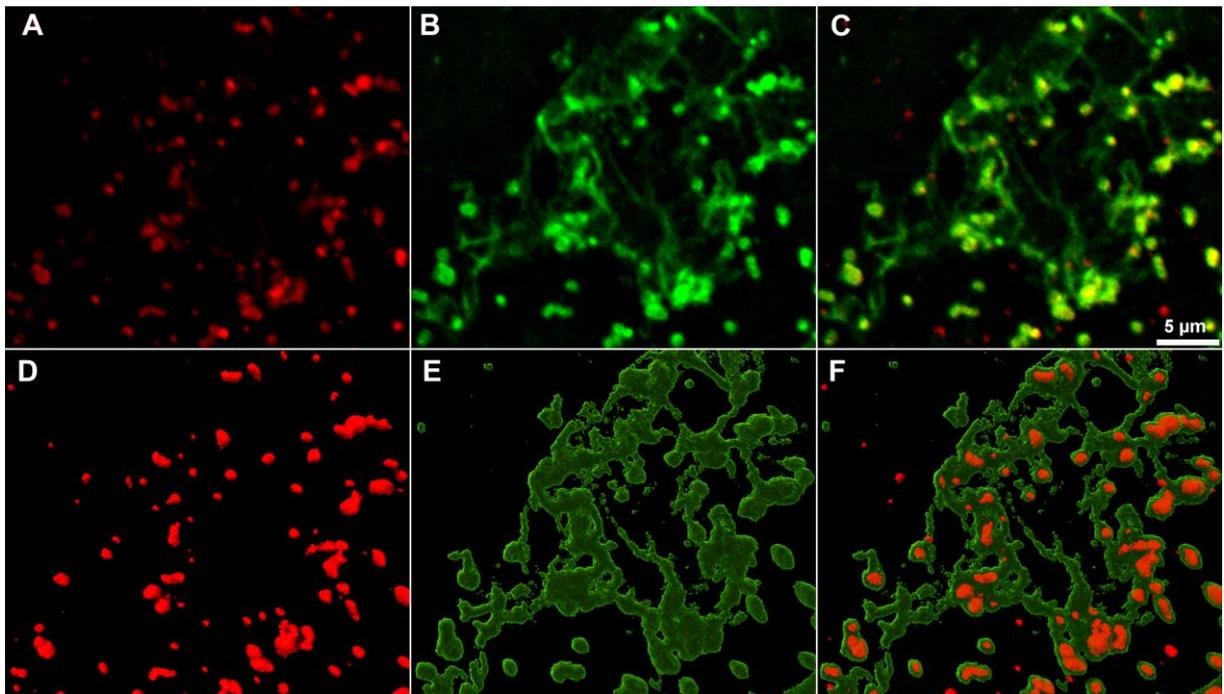


Fig. 6. *Confocal laser scanning microscopy images of *F. tularensis* LVS Δ fupA/B Biofilms-embedded bacteria stained with (A) FM[®]1-43FX (B) ConA-FITC (C) merge. (D-F) 3D reconstruction of A, B and C. Each channel of the raw data (i. e, xyz files) were deconvoluted using the "iterative Deconvolve 3D" plugin (ImageJ software. The UCSF ChimeraX software (Goddard, Huang et al., 2018) was used for 3D reconstruction of processed images.*

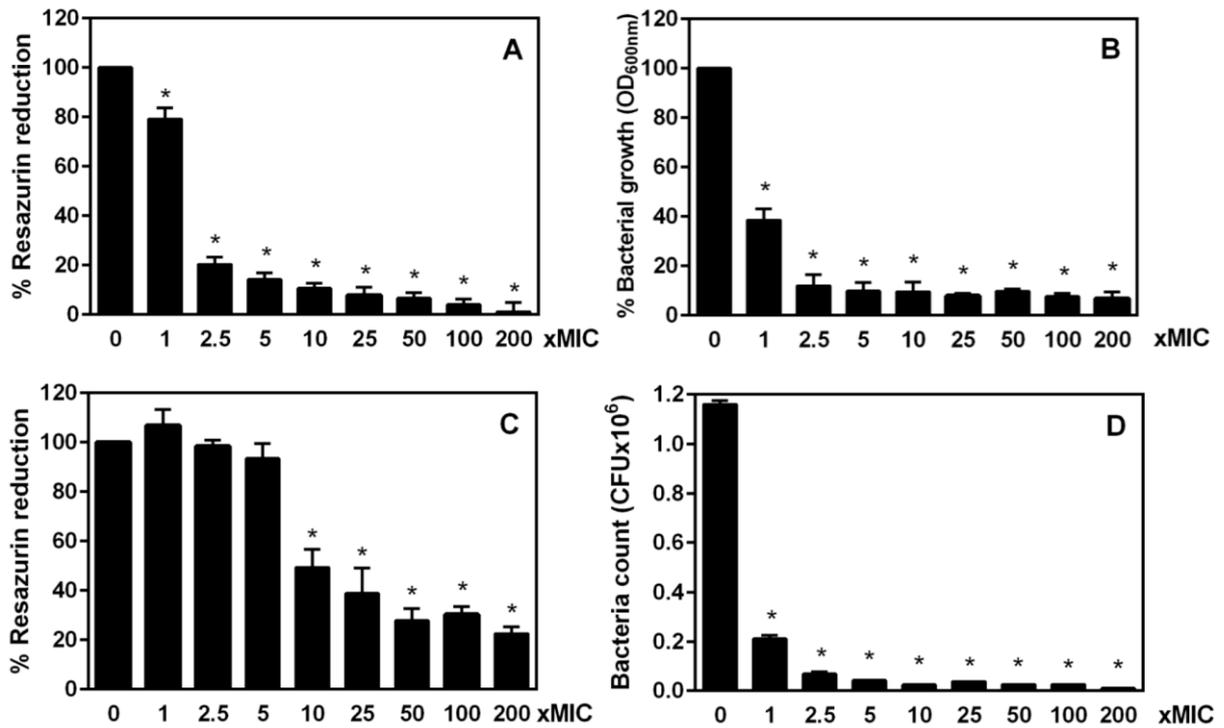


Fig.7. Comparative bactericidal effect of ciprofloxacin against planktonic and biofilm populations of *F. tularensis* LVS Δ fupA/B

The metabolic activity of planktonic (A) or biofilm bacteria (C) exposed for 24h to increasing concentrations of ciprofloxacin was assessed by resazurin-reduction assay. The bacterial replication was monitored by OD_{600nm} value for planktonic cells (B) and by CFU counting for biofilm (D). Data represent the mean \pm SEM of three different experiments performed in triplicate. (*) $P < 0.05$.

Supplementary Data

Table S1. Features of paralogous FupA proteins.

The genes encoding the FupA paralogous proteins in the different *Francisella* strains are indicated as well as the specific protein features identified through InterPro domain and ExPASy Prosite analysis. Identified prokaryotic membrane lipoprotein lipid attachment site profile (PROKAR_LIPOPROTEIN) correspond to the residue C18 on FupA and FupA/B. The cysteine protease inhibitors signature (CYSTATIN) is located between AA 506-519 of FupA.

Protein name	<i>F. tularensis</i> SCHU S4	<i>F. tularensis</i> LVS	<i>F. novicida</i>	DUF3573	Peptide signal	PROKAR Lipoprotein	CYSTATIN
FupA	FTT_0918	-	FTN_0444	x	x	x	x
FupB	FTT_0919	-	FTN_0445	x	x	-	-
FupA/B	-	FTL_0439	-	x	x	x	-
FmvA	FTT_0267	FTL_0147	FTN_0142	x	x	-	-
FmvB	FTT_0602c	FTL_0867	-	x	x	-	-
FslE	FTT_0025c	FTL_1836	FTN_1686	x	x	-	-

Table S2**Proteins identified from the LVS and LVS Δ fupA/B OMVs**

La liste des protéines figure dans la partie Annexes de ce manuscrit.

Table S3. List of primers used in this study

	5'-3' sequences	Specific features (bold)
<i>FupA/B cloning and expression</i>		
p1	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTAGAAAACCTGTACTTCCAGGG TGTGCGTAAATTTAAAAAACCTG	attB1 site
p2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTATTAGATACCGCCTTTTTGG TTAAAGACGCC	attB2 site
<i>Complementation plasmid construction</i>		
p3	GTGAAAAGGATCCCGCAATAATCACTATCCAGAAG	BamHI site
p4	CATTTTATCCGGACTACATGATAATGATAACGAATATC	BspEI site
p5	CAACAAGTCCGGATTTGGTTTGCCAATTTTTTATTAG	BspEI site
p6	CCTAAGAATTCCTCTAAATATGTCTAGATATAAACTG	EcoRI site
<i>Suicide plasmid construction</i>		
p7	AATTAAGCGGCCGCTAGTGCTGGTTGCGGTATCGC	NotI site
p8	TTAAATTGGCATATATGGTGCATACGTCGG	Overlap with p9
p9	TATGCCAATTTAATGGAGAATTTAATATCGATACCGC	Overlap with p8
p10	AATTAAGGATCCGATATAAACTGAAAGATCTAATG	BamHI site
<i>Plasmid screening</i>		
p11	GCTGCAAGTGGTATAGATC	
p12	GCTCGAAATTAACCCTCAC	
p13	TATTACCGCCTTTGAGTGAGC	
p14	TAATACTTCTTAACTAGTTACTTCC	
<i>qRT-PCR</i>		
gene	Forward (F) and reverse (R) primers	Amplicon (nt)
FTL_1931	FTL_1931_196F TTATTACAGCATCATCGTATGG FTL_1931_358R TACCAATCCCCTCGATAAGC	163
FTL_1836	FTL_1836_F GGTGGTGCACCTGCTATTACAACCC FTL_1836_R CCTTAAACCCTATTACAGTTGAGGC	130
FTL_1835	FTL_1835_54F TGGTTTTTAGGTAATATGGGCG FTL_1835_215R TAGATTTTCAGATAGTGGCCC	162
FTL_1842	FTL_1842_86F TTAAAGAGCAAGATAAGCGC FTL_1842_254R ACATCTTAGAGGCAGCCG	186
FTL_0146	FTL_0146_F CTATTAGGTAAGTCCGGCTCAGG FTL_0146_R GTAAAACCTGTTAACCATGGCATCAGTGC	172
FTL_0012	FTL_0012_78F AGGAGATCAAGAAGCTGC FTL_0012_242R TACCGCCTTGCTTTTGGC	182
FTL_1644	FTL_1644_F TGGAAATATGGGGTACTCAAAGTGG FTL_1644_R AACTACAACCTGTCTCGCGCTG	117
FTL_1850	FTL_1850_F TACAGCTGCGGAAATTCGTGCTAG FTL_1850_R CCAGTTTTAGCTGTAAATTGCTCCG	129
FTL_1274	FTL_1274_F CGGCTATTCAAATCAAGTTCGCC FTL_1274_R CCAACGGTTCAGATAAATCACGAACTC	125
FTL_0203	FTL_0203_F CACAAACTGCTATTGGTGATGCTATAGG FTL_0203_R TGCCTGTAGTGGCTGTAGTGTCCC	131
FTL_1724	FTL_1724_F GGCTTATGCTCTAGCGATTACTAATGGC FTL_1724_R GGAGCCAAAAATAACCGCGTTTG	109

FTL_1025	FTL_1025_F GTTTGCCGTTTCACTATAGAAGGTGTG FTL_1025_R CCAGTTACGCGACTTGGTACGATT	110
FTL_1045	FTL_1045_F GGCTCTACCTTTTGGTATAAAGCCAAA FTL_1045_R TTATGATCGCTGGGGAATTCCG	124
FTL_1407	FTL_1407_F GTGGTTCCTAAAGCTGAAGCAATTGAG FTL_1407_R GGGTATATATTTTCATCTGCTCATCAGC	106
FTL_0449	FTL_0449_F GCTCAGCGAGAGAGATCTTATTAATAATG FTL_0449_R CCCAAAACCTTTTTTCAGCATCTTGG	93
FTL_1591	FTL_1591_F GCAGTTTGTATAGGTCCTCCTGCTCC FTL_1591_R AACCATAACCTGGATGTATCGCATCAG	109
FTL_1899	FTL_1899_F GTTCAGATCCTGTGCCTCATCTTAGATC FTL_1899_R TCTCCTGTAGCTTGGTTTGTGAAGAAC	124
FTL_0738	FTL_0738_F GCATGCTTAATCACCCCTACTTTTTTCC FTL_0738_R TGGCATACCAAACCTTTGCATATATCC	114
FTL_1832	FTL_1832_F TTGGCAATGGTTAACTACAACGATGTC FTL_1832_R CCTATTTTGGTTTTTGAACCTGGGGTG	108
FTL_0003	FTL_0003_436_F AAGCCTCAAGGTTAATAGCC FTL_0003_593_R TTTCACATCTGACTTAACAAACC	158

Fig. S1. Multiple sequence alignment of FupA/B orthologs. The FupA/B sequence of *F. tularensis* LVS (WP_011457377.1) was aligned with the sequences of FupA (YP_169915.1), FupB (YP_169916.1), FmvA (YP_169319.1), FmvB (YP_169624.1) and Fs1E (YP_169101.1) from *F. tularensis* SCHU S4 using ClustalX (McWilliam, Li et al., 2013) and the figure was generated using Esprict3 (Robert & Gouet, 2014). Identical residues are colored in red and blue boxes represent homolog residues.

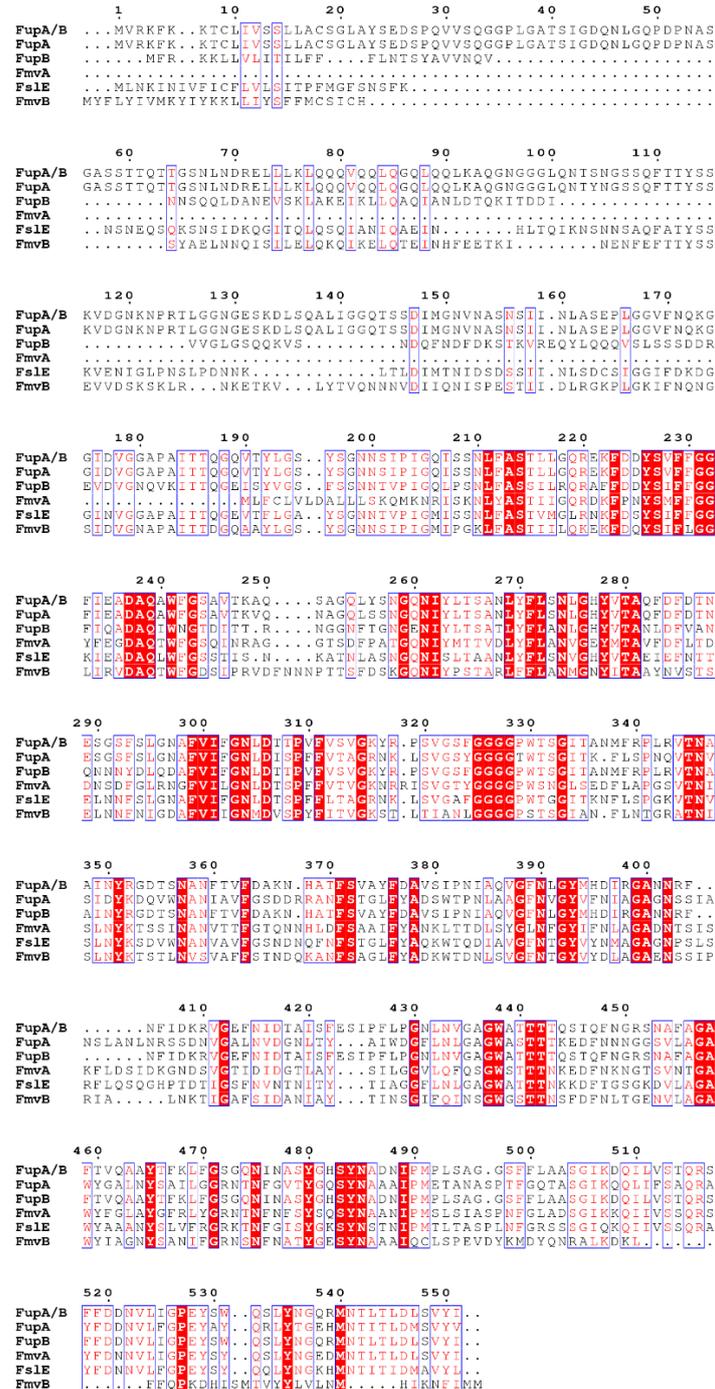


Fig. S2. Cloning and phenotypic analysis of *LVS* Δ *fupA/B*.

(A) *LVS* transformed with pMP812- Δ *fupA/B* and grown on chocolate agar plate supplemented with sucrose produce large (1, 2) and small (3, 4, 6) colonies. (B) PCR screening on selected colonies with primers flanking *fupA/B* and using *LVS* genomic DNA as control. The samples lacking *fupA/B* (3, 4, 6) correspond to the bacteria with small colony phenotype. (C) Confirmation of *fupA/B* deletion by western-blot analysis of whole bacterial extracts and using anti-IgIC as positive control. (D) Growth curves of *LVS* and *LVS* Δ *fupA/B* at 37°C under shaking in MHM supplemented with iron and glucose. (E) Iron concentration measured by ICP-AES.

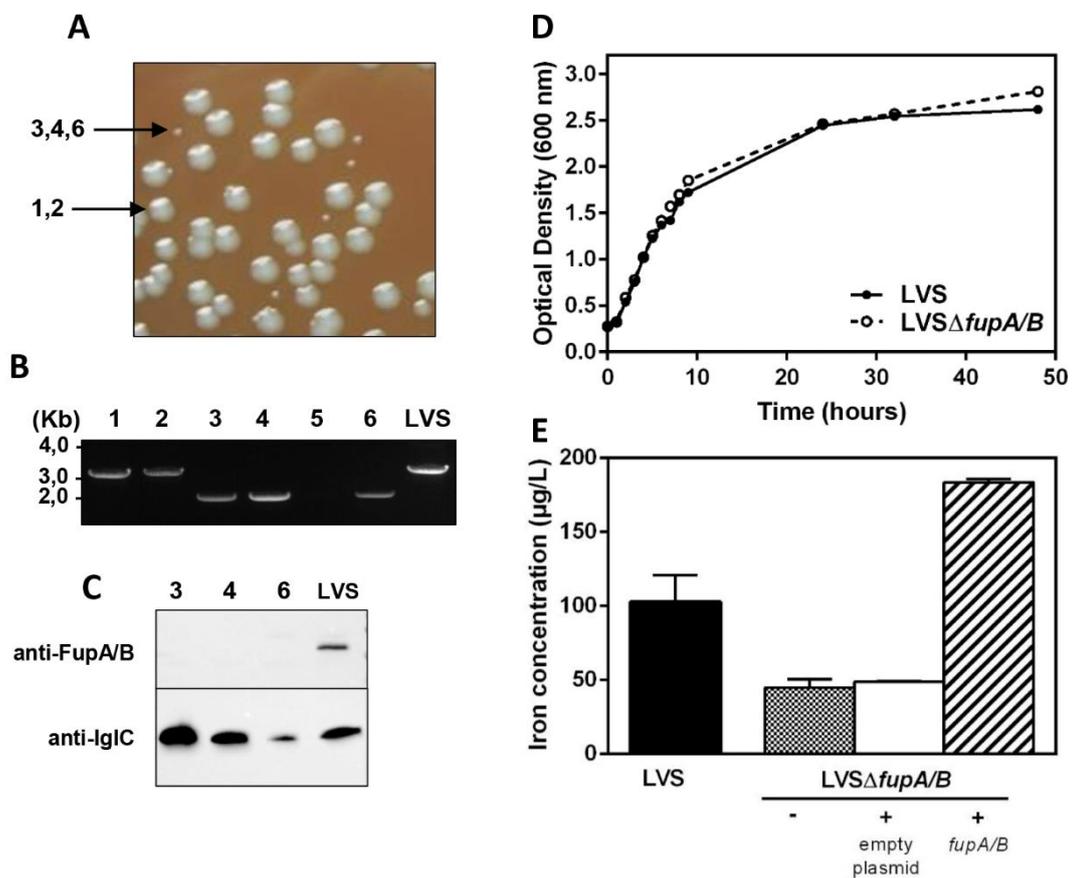
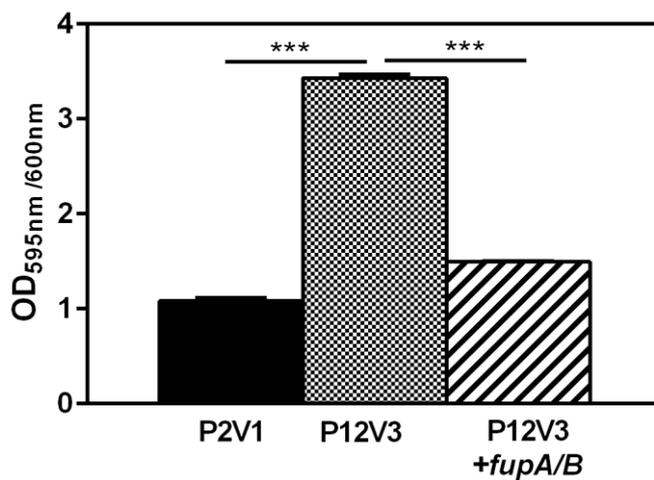


Fig. S3. Crystal violet measurement of the biofilm formed by LVS mutants obtained from the directed-evolution experiment (Sutera et al., 2014) showing that the mutant P12V3 lacking *fupA/B* produced more biofilm, an effect restored upon gene complementation. (***) $P < 0.005$.



Movie S1. Nanosight analysis of OMVs purified from *F. tularensis* LVS Δ *fupA/B*.

Movie S2. Three-dimensional visualization of LVS Δ *fupA/B* biofilm.

REFERENCES

- Allard KA, Viswanathan VK, Cianciotto NP (2006) lbtA and lbtB are required for production of the *Legionella pneumophila* siderophore legiobactin. *J Bacteriol* 188: 1351-63
- Baharoglu Z, Mazel D (2014) SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* 38: 1126-45
- Barry AL, Craig, W.A., Nadler, H., Reller, L.B., Sanders, C.C., Swenson, J.M. (1999) Methods for Determining Bactericidal Activity of Antimicrobial Agents; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, USA
- Boisset S, Caspar Y, Sutera V, Maurin M (2014) New therapeutic approaches for treatment of tularaemia: a review. *Front Cell Infect Microbiol* 4: 40
- Bonnington KE, Kuehn MJ (2014) Protein selection and export via outer membrane vesicles. *Biochim Biophys Acta* 1843: 1612-9
- Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ (2016) Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. *Nat Rev Microbiol* 14: 320-30
- Brauner A, Shores N, Fridman O, Balaban NQ (2017) An Experimental Framework for Quantifying Bacterial Tolerance. *Biophys J* 112: 2664-2671
- Brown NL, Stoyanov JV, Kidd SP, Hobman JL (2003) The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiol Rev* 27: 145-63
- Brudal E, Lampe EO, Reubsæet L, Roos N, Hegna IK, Thrane IM, Koppang EO, Winther-Larsen HC (2015) Vaccination with outer membrane vesicles from *Francisella noatunensis* reduces development of francisellosis in a zebrafish model. *Fish Shellfish Immunol* 42: 50-7
- Casabona MG, Vandenbrouck Y, Attree I, Coute Y (2013) Proteomic characterization of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 inner membrane. *Proteomics* 13: 2419-23
- Caspar Y, Siebert C, Sutera V, Villers C, Aubry A, Mayer C, Maurin M, Renesto P (2017) Functional Characterization of the DNA Gyrase in Fluoroquinolone-Resistant Mutants of *Francisella novicida*. *Antimicrob Agents Chemother* 61
- Chance T, Chua J, Toothman RG, Ladner JT, Nuss JE, Raymond JL, Biot FV, Demons S, Miller L, Halasohoris S, Mou S, Koroleva G, Lovett S, Palacios G, Vietri NJ, Worsham PL, Cote CK, Kijek TM, Bozue JA (2017) A spontaneous mutation in *kdsD*, a biosynthesis gene for 3 Deoxy-D-manno-Octulosonic Acid, occurred in a ciprofloxacin resistant strain of *Francisella tularensis* and caused a high level of attenuation in murine models of tularemia. *PLoS One* 12: e0174106
- Chandler JC, Sutherland MD, Harton MR, Molins CR, Anderson RV, Heaslip DG, Bosio CM, Belisle JT (2015) *Francisella tularensis* LVS surface and membrane proteins as targets of effective post-exposure immunization for tularemia. *J Proteome Res* 14: 664-75
- Chattopadhyay MK, Jaganandham MV (2015) Vesicles-mediated resistance to antibiotics in bacteria. *Frontiers in microbiology* 6: 758
- Chen F, Cui G, Wang S, Nair MKM, He L, Qi X, Han X, Zhang H, Zhang JR, Su J (2017) Outer membrane vesicle-associated lipase FtlA enhances cellular invasion and virulence in *Francisella tularensis* LVS. *Emerg Microbes Infect* 6: e66
- Cox J, Mann M (2008) MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26: 1367-72
- Dean SN, Chung MC, van Hoek ML (2015) *Burkholderia* Diffusible Signal Factor Signals to *Francisella novicida* To Disperse Biofilm and Increase Siderophore Production. *Appl Environ Microbiol* 81: 7057-66
- Dorr T, Lewis K, Vulic M (2009) SOS response induces persistence to fluoroquinolones in *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 5: e1000760
- Ezraty B, Barras F (2016) The 'liaisons dangereuses' between iron and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev* 40: 418-35
- Fabrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J (2009) Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol* 2: 40-61
- Gesbert G, Ramond E, Rigard M, Frapy E, Dupuis M, Dubail I, Barel M, Henry T, Meibom K, Charbit A (2014) Asparagine assimilation is critical for intracellular replication and dissemination of *Francisella*. *Cell Microbiol* 16: 434-49

Goddard TD, Huang CC, Meng EC, Pettersen EF, Couch GS, Morris JH, Ferrin TE (2018) UCSF ChimeraX: Meeting modern challenges in visualization and analysis. *Protein Sci* 27: 14-25

Haurat MF, Aduse-Opoku J, Rangarajan M, Dorobantu L, Gray MR, Curtis MA, Feldman MF (2011) Selective sorting of cargo proteins into bacterial membrane vesicles. *J Biol Chem* 286: 1269-76

Huntley JF, Conley PG, Hagman KE, Norgard MV (2007) Characterization of *Francisella tularensis* outer membrane proteins. *J Bacteriol* 189: 561-74

Jaing CJ, McLoughlin KS, Thissen JB, Zemla A, Gardner SN, Vergez LM, Bourguet F, Mabery S, Fofanov VY, Koshinsky H, Jackson PJ (2016) Identification of Genome-Wide Mutations in Ciprofloxacin-Resistant *F. tularensis* LVS Using Whole Genome Tiling Arrays and Next Generation Sequencing. *PLoS One* 11: e0163458

Jan AT (2017) Outer Membrane Vesicles (OMVs) of Gram-negative Bacteria: A Perspective Update. *Frontiers in microbiology* 8: 1053

Juncker AS, Willenbrock H, Von Heijne G, Brunak S, Nielsen H, Krogh A (2003) Prediction of lipoprotein signal peptides in Gram-negative bacteria. *Protein Sci* 12: 1652-62

Larsson P, Oyston PC, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius HH, Garcia E, Halltorp G, Johansson D, Isherwood KE, Karp PD, Larsson E, Liu Y, Michell S, Prior J, Prior R, Malfatti S, Sjostedt A, Svensson K, Thompson N et al. (2005) The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat Genet* 37: 153-9

Lindgren H, Honn M, Golovlev I, Kadzhaev K, Conlan W, Sjostedt A (2009) The 58-kilodalton major virulence factor of *Francisella tularensis* is required for efficient utilization of iron. *Infect Immun* 77: 4429-36

Loveless BM, Yermakova A, Christensen DR, Kondig JP, Heine HS, 3rd, Wasieloski LP, Kulesh DA (2010) Identification of ciprofloxacin resistance by SimpleProbe, High Resolution Melt and Pyrosequencing nucleic acid analysis in biothreat agents: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*. *Mol Cell Probes* 24: 154-60

LoVullo ED, Molins-Schneekloth CR, Schweizer HP, Pavelka MS, Jr. (2009a) Single-copy chromosomal integration systems for *Francisella tularensis*. *Microbiology* 155: 1152-63

LoVullo ED, Sherrill LA, Pavelka MS, Jr. (2009b) Improved shuttle vectors for *Francisella tularensis* genetics. *FEMS Microbiol Lett* 291: 95-102

Martinez JL, Rojo F (2011) Metabolic regulation of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35: 768-89

Maurin M, Gyuranecz M (2016) Tularaemia: clinical aspects in Europe. *Lancet Infect Dis* 16: 113-24

McCaug WD, Koller A, Thanassi DG (2013) Production of outer membrane vesicles and outer membrane tubes by *Francisella novicida*. *J Bacteriol* 195: 1120-32

McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, Cowley AP, Lopez R (2013) Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res* 41: W597-600

Medigue C, Calteau A, Cruveiller S, Gachet M, Gautreau G, Josso A, Lajus A, Langlois J, Pereira H, Planel R, Roche D, Rollin J, Rouy Z, Vallenet D (2017) MicroScope-an integrated resource for community expertise of gene functions and comparative analysis of microbial genomic and metabolic data. *Brief Bioinform*

Medvedeva ES, Baranova NB, Mouzykantov AA, Grigorieva TY, Davydova MN, Trushin MV, Chernova OA, Chernov VM (2014) Adaptation of mycoplasmas to antimicrobial agents: *Acholeplasma laidlawii* extracellular vesicles mediate the export of ciprofloxacin and a mutant gene related to the antibiotic target. *ScientificWorldJournal* 2014: 150615

Nallaparaju KC, Yu JJ, Rodriguez SA, Zogaj X, Manam S, Guentzel MN, Seshu J, Murthy AK, Chambers JP, Klose KE, Arulanandam BP (2011) Evasion of IFN-gamma signaling by *Francisella novicida* is dependent upon *Francisella* outer membrane protein C. *PLoS One* 6: e18201

Oyston PC, Sjostedt A, Titball RW (2004) Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol* 2: 967-78

Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F (2013) Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J Antimicrob Chemother* 68: 1812-7

Perard J, Coves J, Castellan M, Solard C, Savard M, Miras R, Galop S, Signor L, Crouzy S, Michaud-Soret I, de Rosny E (2016) Quaternary Structure of Fur Proteins, a New Subfamily of Tetrameric Proteins. *Biochemistry* 55: 1503-15

Pierson T, Matrakas D, Taylor YU, Manyam G, Morozov VN, Zhou W, van Hoek ML (2011) Proteomic characterization and functional analysis of outer membrane vesicles of *Francisella novicida* suggests possible role in virulence and use as a vaccine. *J Proteome Res* 10: 954-67

Post DMB, Slutter B, Schilling B, Chande AT, Rasmussen JA, Jones BD, D'Souza AK, Reinders LM, Harty JT, Gibson BW, Apicella MA (2017) Characterization of Inner and Outer Membrane Proteins from *Francisella tularensis* Strains LVS and Schu S4 and Identification of Potential Subunit Vaccine Candidates. *MBio* 8

Ramakrishnan G (2017) Iron and Virulence in *Francisella tularensis*. *Front Cell Infect Microbiol* 7: 107

Ramakrishnan G, Meeker A, Dragulev B (2008) *ftsE* is necessary for siderophore-mediated iron acquisition in *Francisella tularensis* Schu S4. *J Bacteriol* 190: 5353-61

Ramakrishnan G, Sen B (2014) The *FupA/B* protein uniquely facilitates transport of ferrous iron and siderophore-associated ferric iron across the outer membrane of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbiology* 160: 446-57

Ramakrishnan G, Sen B, Johnson R (2012) Paralogous outer membrane proteins mediate uptake of different forms of iron and synergistically govern virulence in *Francisella tularensis* *tularensis*. *J Biol Chem* 287: 25191-202

Robert X, Gouet P (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res* 42: W320-4

Rohmer L, Brittnacher M, Svensson K, Buckley D, Haugen E, Zhou Y, Chang J, Levy R, Hayden H, Forsman M, Olson M, Johansson A, Kaul R, Miller SI (2006) Potential source of *Francisella tularensis* live vaccine strain attenuation determined by genome comparison. *Infect Immun* 74: 6895-906

Roier S, Zingl FG, Cakar F, Durakovic S, Kohl P, Eichmann TO, Klug L, Gadermaier B, Weinzerl K, Prassl R, Lass A, Daum G, Reidl J, Feldman MF, Schild S (2016) A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nature communications* 7: 10515

Sampath V, McCaig WD, Thanassi DG (2017) Amino acid deprivation and central carbon metabolism regulate the production of outer membrane vesicles and tubes by *Francisella*. *Mol Microbiol*

Schwechheimer C, Kuehn MJ (2015) Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* 13: 605-19

Sen B, Meeker A, Ramakrishnan G (2010) The *ftsE* homolog, *FTL_0439* (*fupA/B*), mediates siderophore-dependent iron uptake in *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun* 78: 4276-85

Sutera V, Levert M, Burmeister WP, Schneider D, Maurin M (2014) Evolution toward high-level fluoroquinolone resistance in *Francisella* species. *J Antimicrob Chemother* 69: 101-10

Twine S, Bystrom M, Chen W, Forsman M, Golovliov I, Johansson A, Kelly J, Lindgren H, Svensson K, Zingmark C, Conlan W, Sjostedt A (2005) A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine. *Infect Immun* 73: 8345-52

van Hoek ML (2013) Biofilms: an advancement in our understanding of *Francisella* species. *Virulence* 4: 833-46

Vizcaino JA, Csordas A, del-Toro N, Dianes JA, Griss J, Lavidas I, Mayer G, Perez-Riverol Y, Reisinger F, Ternent T, Xu QW, Wang R, Hermjakob H (2016) 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res* 44: D447-56

Wieczorek S, Combes F, Lazar C, Gai Gianetto Q, Gatto L, Dorffer A, Hesse AM, Coute Y, Ferro M, Bruley C, Burger T (2017) DAPAR & ProStaR: software to perform statistical analyses in quantitative discovery proteomics. *Bioinformatics* 33: 135-136

Wilson MM, Bernstein HD (2016) Surface-Exposed Lipoproteins: An Emerging Secretion Phenomenon in Gram-Negative Bacteria. *Trends Microbiol* 24: 198-208

Wu X, Ren G, Gunning WT, 3rd, Weaver DA, Kalinoski AL, Khuder SA, Huntley JF (2016) *FmvB*: A *Francisella tularensis* Magnesium-Responsive Outer Membrane Protein that Plays a Role in Virulence. *PLoS One* 11: e0160977

Yu NY, Wagner JR, Laird MR, Melli G, Rey S, Lo R, Dao P, Sahinalp SC, Ester M, Foster LJ, Brinkman FS (2010) PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics* 26: 1608-15

RESULTATS ET DISCUSSION

Dans cet article, nous avons démontré que la délétion du gène hybride *fupA/B* était à l'origine d'une diminution de la sensibilité de *F. tularensis* LVS aux FQ. Cette augmentation de résistance aux FQ a également été observée suite à la délétion du gène *fupA* et non *fupB*, chez la souche hautement virulente SCHU S4. Alors que le rôle des protéines FupA et FupA/B dans l'acquisition du fer et la virulence a été démontré depuis maintenant une dizaine d'années, notre étude met en évidence de façon originale un lien entre l'expression de ces protéines et la sensibilité aux FQ.

L'effet observé résulte sans doute d'une déstabilisation membranaire faisant suite à la délétion de la lipoprotéine FupA/B qui pourrait jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité de la membrane externe. Concrètement, nous avons observé que la souche LVS_Δ*fupA/B* sécrétait significativement plus d'« outer membrane vesicles » (OMVs) que la souche sauvage. L'analyse protéomique de ces OMVs par nanoLC-MS/MS, réalisée en collaboration avec Yohann Couté et Sabrina Ferré (EDyP, CEA, Grenoble), a permis d'identifier de manière reproductible 801 protéines chez les 2 souches. Une analyse statistique fine tenant compte de l'abondance des peptides et de la reproductibilité des mesures a mis en évidence 22 protéines surexprimées dans les OMVs de la souche LVS_Δ*fupA/B*. A notre connaissance, aucune analyse comparative d'OMVs issues de souches résistantes ou sensibles n'a été rapportée à ce jour. Par des mesures de qRT-PCR nous avons montré que le contenu des OMVs était le reflet du contenu bactérien. Notre attention s'est plus particulièrement portée sur la surexpression de RecA, protéine impliquée dans les mécanismes de réparation SOS de l'ADN et décrite comme acteur essentiel de la tolérance aux antibiotiques. Le profil des courbes « time-kill » qui visent à déterminer le temps nécessaire pour tuer 99% des bactéries exposées à des concentrations d'antibiotiques très élevées (25x la CMI) ont confirmé que la souche LVS_Δ*fupA/B* était plus tolérante aux FQ que la souche sauvage. Cet effet a également été observé avec la gentamicine qui est un autre antibiotique à activité bactéricide. En revanche, aucun phénomène de tolérance n'a été observé avec la doxycycline, ce qui est cohérent avec le fait qu'il s'agit d'un antibiotique bactériostatique, n'induisant pas d'effet de tolérance.

Outre les modifications de la composition protéique qui reflète une adaptation des bactéries au stress antibiotique, nous avons mis en évidence que la souche LVS_Δ*fupA/B* produisait plus de biofilm que *F. tularensis* LVS. Comme nous l'avons démontré par addition de vésicules purifiées à une suspension bactérienne, l'hypersécrétion d'OMVs contribue directement à cette augmentation. Au sein du biofilm, les bactéries sont dans un

environnement pauvre en nutriments qui favorise un état stationnaire et rendent inefficaces de nombreux antibiotiques. Ceci suggère qu'une délétion de FupA/B pourrait, en favorisant la formation de biofilms, avoir des conséquences directes sur la résistance aux antibiotiques. L'analyse comparative que nous avons réalisée sur la souche LVS_ΔfupA/B a confirmé que les bactéries présentes dans le biofilm étaient moins sensibles aux FQ que les bactéries planctoniques. Un point intéressant que nous avons mis en évidence est un écart significatif, dans les biofilms exposés à de fortes concentrations de ciprofloxacine, entre la proportion de bactéries métaboliquement actives (test enzymatique) et les bactéries capables de se répliquer sur gélose (numération des CFU), suggérant un état « viable mais non cultivable » (VBNC), déjà observé chez d'autres pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* (168). Ces résultats originaux sont à mettre en parallèle avec la forme arrondie des bactéries dans les biofilms.

L'essentiel de ce travail a été réalisé à partir de la souche *F. tularensis* LVS. Hormis le fait qu'il s'agisse d'une souche plus facilement manipulable, il nous semblait déontologiquement plus raisonnable de travailler avec une souche de virulence atténuée pour l'étude de mutants résistants. La souche LVS a la particularité de coder la protéine FupA/B qui est une protéine de fusion entre la partie N-terminale de FupA et la partie C-terminale de FupB, qui sont présentes, entre autres, chez les isolats cliniques. Une question d'intérêt était de savoir si, sur les souches cliniques, l'effet était porté par FupA ou FupB ou s'il était spécifique de FupA/B. Pour tenter de répondre à cette question et pour s'assurer de la pertinence clinique de nos observations, nous avons engagé une collaboration avec le groupe d'Anders Sjöstedt (Umea, Suède). Cette équipe, à l'origine de l'appellation « Fup » de la protéine, dispose en effet de la souche hautement virulente SCHU S4 et des mutants de SCHU S4 ΔfupA, ΔfupB et ΔfupAΔfupB initialement produits pour l'étude de l'acquisition de fer et la virulence bactérienne. L'évaluation des CMI à la ciprofloxacine de ces souches, dont la manipulation est extrêmement réglementée, a permis de mettre en évidence que, contrairement au gène *fupB*, la délétion du gène *fupA* était à l'origine d'une augmentation de la résistance aux FQ ce qui renforce la pertinence clinique de nos observations. Pour information, nous avons aussi utilisé des mutants ΔfupA- et ΔfupB-*F. novicida* issus de la banque de transposons de *F. novicida* (BEI Resources, USA) que Thomas Henry (CIRI, Lyon) nous a transmis et avons obtenus des résultats comparables concernant la modification de la sensibilité aux FQ (résultats non présentés). Un dernier point que je souhaiterais mentionner et qui renforce le fait que la résistance aux antibiotiques (ou stabilisation membranaire) soit porté par FupA

plutôt que par FupB, est que certains mutants de *F. novicida* et SCHU S4 résistants aux FQ présentent des mutations sur FupA (128).

Il est important de souligner le fait qu'aucune donnée n'est actuellement disponible concernant la structure des protéines FupA, FupB et FupA/B. Seules des analyses bioinformatiques permettent d'obtenir des indices concernant leur structure. L'analyse de FupA/B suggère la présence d'une séquence signal et d'un motif lipoprotéique en N-terminal ainsi que d'une structure porine dans la région homologue à la protéine FupB en C-terminal évoquant une localisation membranaire des protéines. Concernant FupB, elle est prédite comme possédant un segment transmembranaire évoquant une porine. De façon intéressante, la base de données STRING prédit un lien fonctionnel de FupA avec FupB et réciproquement (Figure 17) (communication Céline Brochier-Armanet, LBBE, Lyon) .

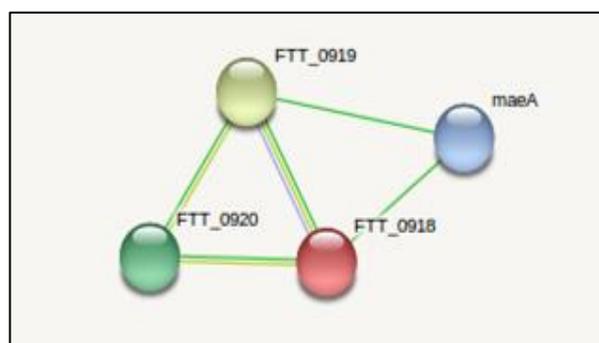


Figure 17. Etude du lien fonctionnel entre les protéines FupA et FupB à partir de la base de données STRING

FTT_0918 FupA ; FTT_0919 FupB ; FTT_0920 Unknown function ; maeA malate déshydrogénase

Quels sont les rôles respectifs de FupA et de FupB ? Comment ces protéines interagissent-elles ? Existe-t-il un lien entre une moindre concentration en fer des bactéries déletées de FupA ou FupA/B et leur capacité à mieux résister à un stress antibiotique ? Il est clair que des informations structurales pourraient contribuer à mieux comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents aux phénomènes observés.

Au cours de ma première année de Thèse de Sciences et dans la continuité de mon Master 2 Recherche, j'ai tenté de purifier la protéine FupA/B entière pour générer des anticorps mais aussi dans l'optique d'une analyse structurale par cristallographie. Nous avons ainsi réalisé plusieurs constructions (protéine entière ou tronquée, tags -HIS, -MBP, -GST), testé plusieurs conditions d'expression (variations de durée et de température d'induction, de concentration en IPTG, de souches bactériennes) et de purifications (variations de pH, de détergents, de concentration en sels). Ces très nombreuses tentatives ne nous ont pas permis de purifier la

protéine entière soluble après clivage de son étiquette ce qui nous a amené à générer des anticorps contre la partie N-terminale de la protéine, plus facile à produire. Plus récemment, et toujours dans la perspective d'établir un lien entre la structure et la fonction de cette protéine dans l'acquisition de fer et/ou dans la résistance aux FQ nous avons entrepris, en collaboration avec Béatrice Schaack (TIMC-IMAG, Grenoble), des expériences d'inclusion de la protéine recombinante étiquetée (HIS)₆-MBP (polyHistidine, Maltose binding protein) dans des liposomes. Les résultats très préliminaires des tests fonctionnels avec les protéoliposomes ainsi obtenus seront exposés dans le paragraphe suivant.

RESULTATS COMPLEMENTAIRES

I- Introduction

Comme évoqué précédemment, peu de données sont disponibles concernant la structure et la fonction de FupA/B. Il a été démontré que cette protéine de 58 kDa jouait un rôle dans l'acquisition du fer sidérophore dépendant et indépendant, mais le mécanisme sous-jacent reste inconnu (166,167). A ce jour, seules des analyses bio-informatiques nous permettent de déduire des prédictions de structure de cette protéine pour laquelle aucune donnée structurale n'est disponible dans les Protein Data Bank (PDB). L'utilisation des logiciels SignalP, Interpro et ExPASy prosite indiquent la présence d'une séquence signal et d'un motif lipoprotéique au niveau de la région N-terminale de FupA/B. Le programme PRED-TMBB basé sur le modèle de Markov caché prédit qu'une région de FupA/B se replie pour former une structure en tonneau β à 14 brins dans la membrane externe (résidus 226 à 551) avec un domaine périplasmique de 225 résidus (Figure 18). Cette configuration membranaire évoque une structure porine.

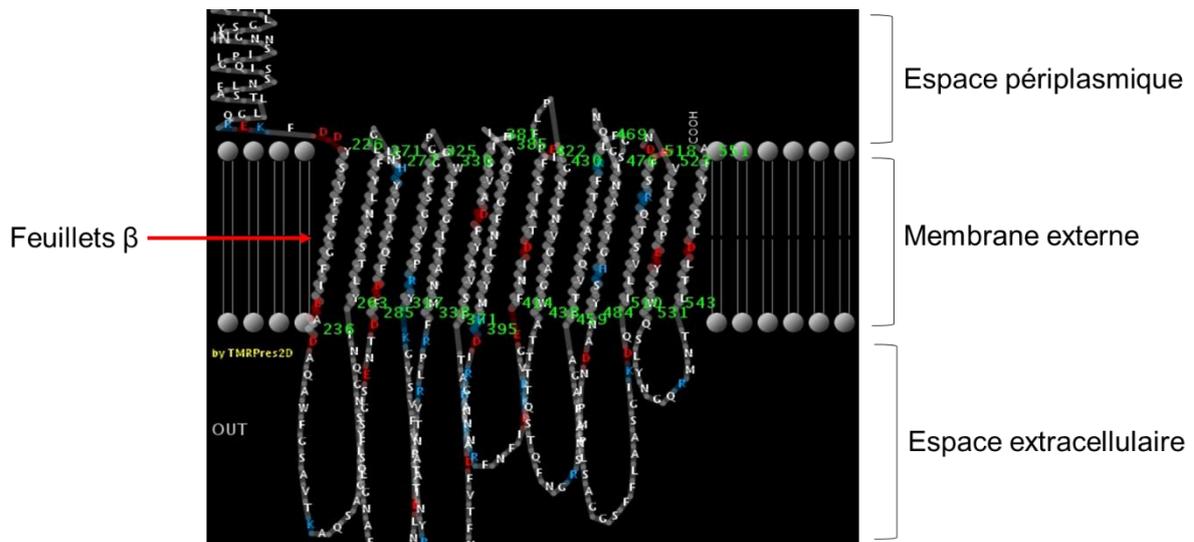


Figure 18. Représentation schématique en 2D de la protéine FupA/B au sein de la membrane externe à partir du programme PRED-TMBB

L'utilisation du logiciel bio-informatique Phyre² nous a permis d'obtenir la modélisation de la structure 3D des résidus 225 à 551 de FupA/B. Cette représentation schématique confirme que ce segment transmembranaire forme un tonneau β de type porine (Figure 19).

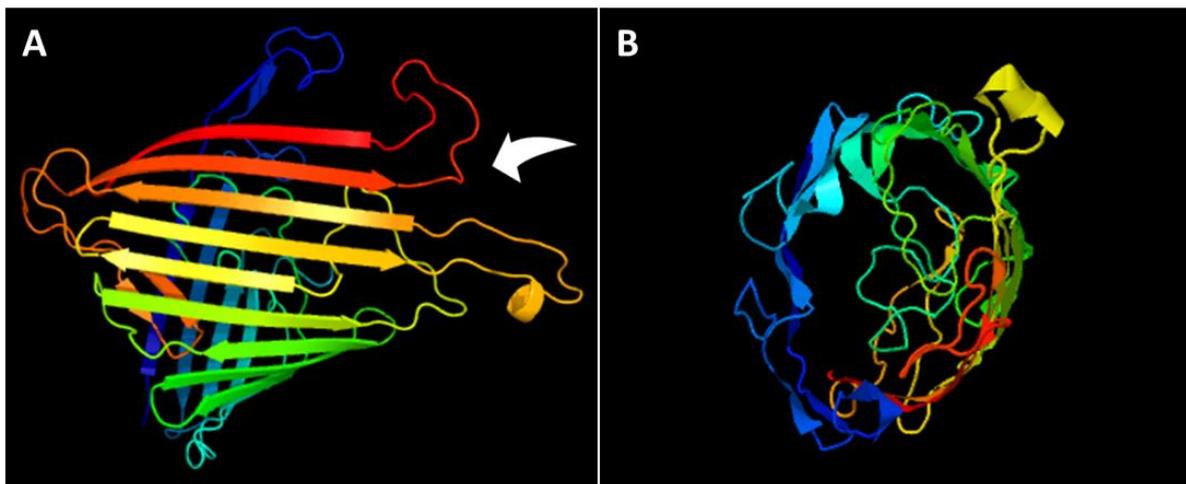


Figure 19. Modélisation 3D de la structure de FupA/B réalisée à partir du logiciel Phyre²
A. Vue de profil de la structure en tonneau β de FupA/B
B. Vue de dessus indiquée par la flèche blanche

Compte tenu des difficultés rencontrées pour purifier FupA/B sous forme soluble, une analyse structurale par cristallographie demanderait un investissement très important qu'il n'était pas envisageable de mettre en œuvre au cours de cette thèse. Toutefois, et dans le but de mieux comprendre le rôle fonctionnel de cette protéine membranaire, nous avons entrepris d'enchâsser la protéine dans des liposomes. Cette démarche a été motivée par l'arrivée récente, au sein de notre équipe de recherche, de Béatrice Schaack, qui maîtrise très bien ce modèle.

Les liposomes sont des vésicules lipidiques closes qui se forment spontanément quand les lipides sont dispersés en milieu aqueux et qui sont couramment utilisées en tant que modèle membranaire. Leur composition lipidique est proche de celle retrouvée dans les membranes biologiques des cellules eucaryotes et procaryotes. Une variété de phospholipides naturels et synthétiques est disponible pour la préparation de liposomes. Ils peuvent être classés selon leur nombre de bicouches (uni-lamellaire ou multi-lamellaire) ou selon leur taille. Pour être unilamellaire, ils sont de petite taille, généralement autour de 100 nm. Les liposomes sont d'un grand intérêt notamment dans l'étude de la fonctionnalité des protéines. Les protéines membranaires purifiées sont insérées dans les liposomes formant ainsi des protéoliposomes (PL).

Les résultats d'inclusion de la protéine dans les liposomes et des premiers tests fonctionnels présentés ci-après doivent être interprétés avec prudence car ils nécessitent d'être reproduits

et complétés. Toutefois et bien que très préliminaires, ils semblent confirmer que FupA/B forme bien une porine et offrent de nouvelles perspectives de recherche.

II- Procédures

La production de préotéoliposomes (PL) peut se faire de différentes manières. Le fait d'incorporer les protéines dans des liposomes préformés permet d'orienter les protéines de manière unidirectionnelle alors que son orientation est plus aléatoire dans le cas où l'inclusion se fait simultanément à la formation des vésicules (169). C'est cette première technique que nous avons choisi d'appliquer. Les différentes étapes de la production détaillée ci-dessous sont schématisées Figure 20.

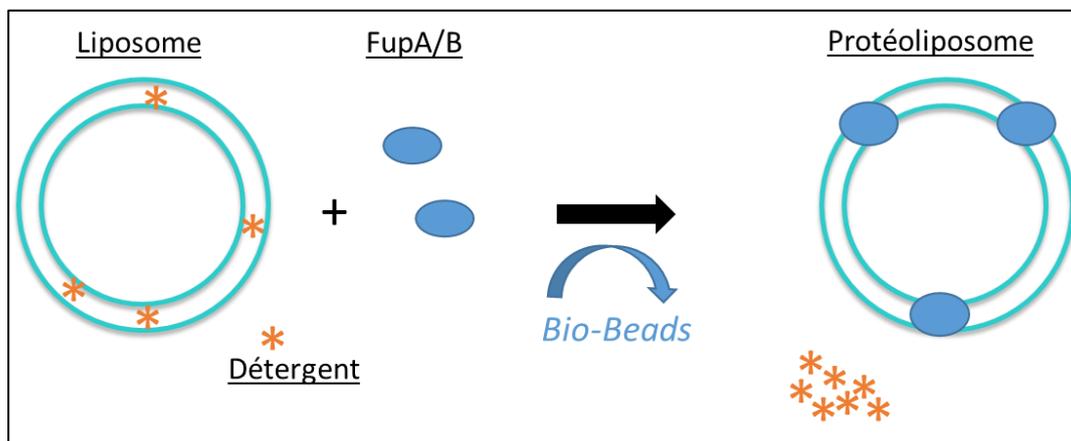


Figure 20. Etapes de production des protéoliposomes

Les liposomes sont incubés avec la protéine recombinante en présence de détergent qui est éliminé par un système de Bio-Beads.

○ Expression et purification de FupA/B-(HIS)₆-MBP

Compte tenu des résultats obtenus lors de nos précédentes tentatives de purification de la protéine, notre choix s'est porté sur la construction FupA/B entière étiquetée (HIS)₆-MBP en N-terminal. Les bactéries *E. coli* BL21 (DE3) transformées ont été cultivées jusqu'à une densité optique à 600nm (DO₆₀₀) comprise entre 0.4 et 0.6. L'expression de la protéine a été induite par addition d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 0.5 mM pendant 15h à 18°C sous agitation. Les bactéries ont ensuite été récupérées par centrifugation, reprises dans un tampon de lyse (Tris 50mM pH 8,8 - NaCl 200mM - CHAPS 1% - cComplete™ 1 pastille) et soniquées. Après élimination des débris par centrifugation et filtration, le surnageant a été déposé sur colonne d'amylose préalablement équilibrée. Après lavages, la protéine d'intérêt

a été éluée puis dialysée dans un tampon Tris 50mM pH 8.8 NaCl 200mM. La concentration finale a été estimée à 0.2 mg/ml (dosage Bradford).

○ **Production des liposomes**

Les liposomes ont été produits par la technique de « transfert spontané ». La composition lipidique des vésicules a été déterminée afin de se rapprocher de celle des membranes des bactéries à Gram négatif. Les caractéristiques des liposomes générés sont les suivantes :

- Composition lipidique:

40% PE (phosphatidyléthanolamine), 40% PG (phosphatidylglycérol) et 20% CL (cardiolipine)

- Taille: 80 nm de rayon en moyenne, contrôlée par Dynamic Light Scattering (DLS)

- Système uni-lamellaire

- Concentration: 20 mg/ml, (tampon Tris 50mM pH 8.8 NaCl 200mM)

○ **Fabrication des protéoliposomes**

Dans le but de déterminer le ratio adéquat entre détergent et phospholipides, des volumes croissants de Triton X-100 10% ont été ajoutés aux liposomes et une courbe de titration a été produite à partir du suivi des valeurs de DO à 550 nm. Dès lors que le point d'inflexion a été atteint, la protéine purifiée a été ajoutée aux liposomes déstabilisés pour obtenir le bon ratio lipides/protéines.

○ **Elimination du détergent**

Après incubation, le détergent a été retiré par addition de billes de résines hydrophobes adsorbantes préalablement activées (Bio-Beads).

○ **Purification des protéoliposomes**

Les PL produits ont ensuite été purifiés sur gradient de sucrose (10, 20, 30, 40%). Cette étape permet d'isoler les PL selon leur densité et de les séparer des protéines non intégrées qui précipitent. Après ultra-centrifugation (16h, 280,000g), les différentes fractions du gradient ont été collectées et la présence de FupA/B détectée par western blot (WB) avec un anticorps anti-FupA/B (Figure 21).

○ **Evaluation de la concentration en lipides des fractions de PL**

Afin d'évaluer la quantité de liposomes ayant intégré les protéines par rapport à la quantité de lipides engagée au départ, nous avons utilisé le composé 8-anilino-1-naphthalenesulfonic acid (ANS). Ce produit a la particularité d'émettre de la fluorescence une fois lié aux lipides. Ainsi, après avoir réalisé une courbe d'étalonnage de la fluorescence en fonction de la concentration lipidique, nous avons pu déterminer la quantité de lipides présente dans les fractions de PL.

○ **Tests d'activité**

Dans le but d'étudier l'activité porine de la protéine FupA/B, nous avons utilisé deux approches distinctes basées d'une part sur l'utilisation d'un fluorochrome et d'autre part sur le dosage de Fer par ICP-AES (Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectroscopy).

Le composé ANTS fluorescent (8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid sodium salt) a été mis en contact pendant 30 minutes avec les PL, puis l'excès non incorporé éliminé par chromatographie d'exclusion sur colonne. Après destabilisation des PL par ajout de détergent, la fluorescence émise par le composé incorporé à l'intérieur des PL a été mesurée ($\lambda_{ex} = 405\text{nm}$, $\lambda_{em} = 535\text{ nm}$).

Les PL ont par ailleurs été incubés en présence de fer FePPi 0,025% (w/v) pendant 30 min, avant d'être lavés sur colonne comme précédemment. La quantité de fer incorporée dans les PL a été évaluée après minéralisation et en collaboration avec Julien Perard (LCBM, CEA Grenoble).

Ces tests ont été réalisés en parallèle à partir de liposomes vides utilisés comme contrôles négatifs.

III- Résultats

○ **Inclusion de FupA/B dans les liposomes**

Deux ratios lipides/protéines ont été testés en parallèle pour la production des PL :

-Ratio 1: 2 mg de liposomes + 24 μ g de protéine FupA/B soit 21 protéines/liposome théorique

-Ratio 2: 10 mg de liposomes + 24 μ g de protéine FupA/B soit 105 protéines/liposome théorique.

Après purification des PL sur gradient de sucrose un WB anti-FupA/B a été réalisé sur les différentes fractions collectées. Dans le cas du ratio 2, les résultats du WB ne nous ont pas permis de conclure car trop peu de protéines ont été détectées. En revanche, dans le cas du ratio 1 (Figure 21), un signal maximal est observé dans la fraction n°2 qui correspond aux PL purifiés. Les résultats du dosage lipidique par émission de fluorescence du composé ANS indiquent que la quantité de lipides retrouvée dans la fraction n°2 correspondant aux PL purs est de 1,6 mg vs 2 mg engagé initialement. Les tests d'activité ont été réalisés à partir de cette fraction.

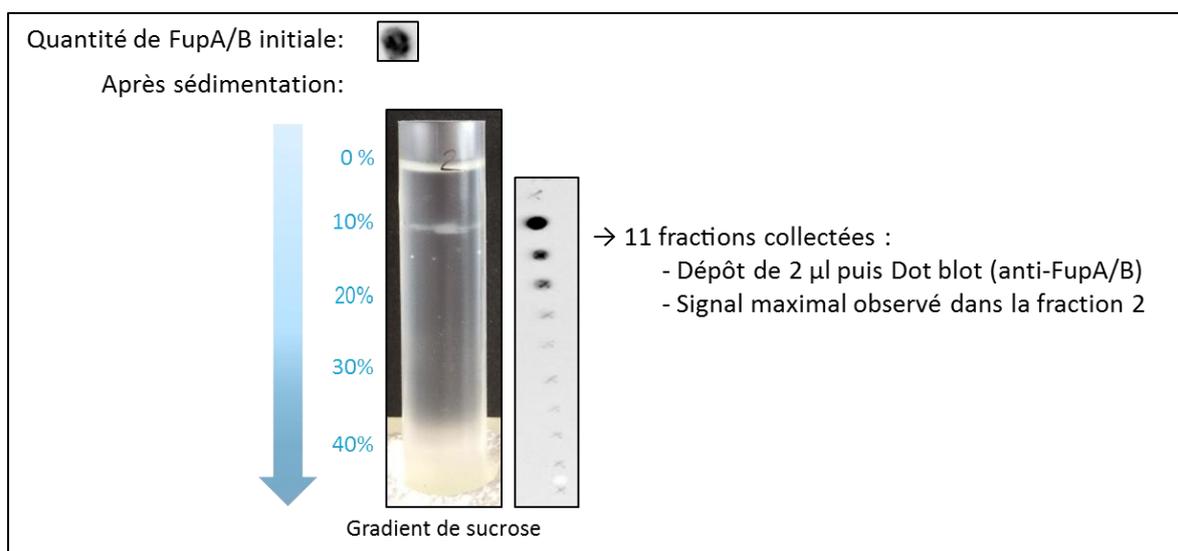


Figure 21. Purification des protéoliposomes sur gradient de sucrose

○ Tests d'activité

Comme l'illustre la figure ci-après, nous avons observé une augmentation significative de la fluorescence de l'ANTS à l'intérieur des PL par rapport aux liposomes vides, ce qui suggère une activité porine de FupA/B (Figure 22A). De plus, les résultats de dosage de Fer par ICP-AES, montrent que la concentration en fer est deux fois plus élevée dans le cas des PL (2080 µg/L) vs liposomes vides (1020 µg/L) (Figure 22B).

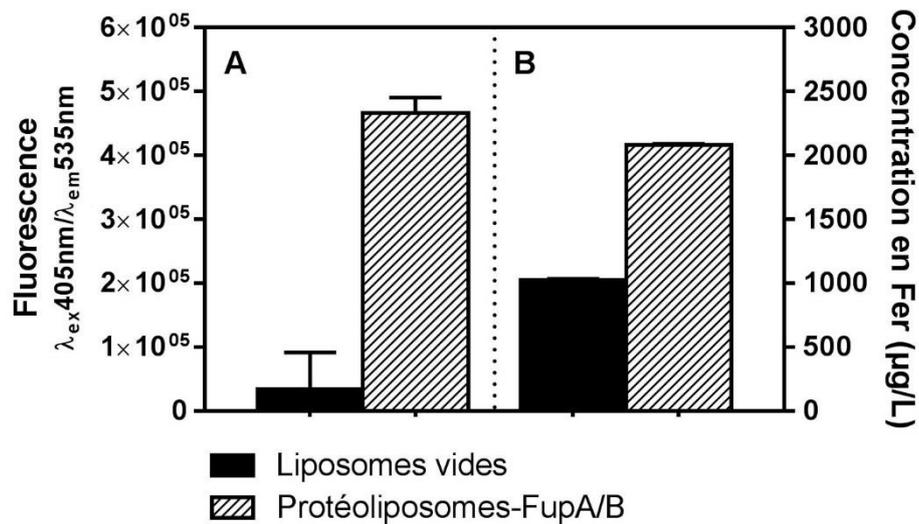


Figure 22. Evaluation de l'activité porine de FupA/B

A. Moyenne +/- SD de 2 mesures à partir d'un échantillon.

B. Moyenne +/- SD de 3 mesures à partir d'un échantillon

Au cours de ces expériences préliminaires, nous avons intégré avec succès la protéine FupA/B dans les modèles membranaires de liposomes *in vitro*. La détection du composé fluorescent ANTS et la quantification du Fer par ICP-AES dans les PL valident l'hypothèse d'une activité porine de la protéine. Ainsi que nous l'avons montré dans l'Article 2, le rôle de FupA/B dans la sensibilité aux FQ s'explique vraisemblablement par un mécanisme de déstabilisation membranaire. Nous ne pouvons toutefois pas exclure que la porine formée puisse contribuer à l'élimination des FQ. La capacité des PL-FupA/B à assurer le transfert de FQ sera évaluée et comparée à l'activité des PL formés avec soit FupA, soit FupB. L'analyse des données obtenues en comparaison avec les phénotypes des différents mutants bactériens pourra apporter un éclairage quant à leur fonction.

CONCLUSION GENERALE

Francisella tularensis est un agent potentiel de bioterrorisme de catégorie A à l'origine de la tularémie et contre lequel aucun vaccin n'est actuellement disponible et peu d'antibiotiques sont efficaces. Les FQ représentent la meilleure alternative dans le traitement de cette pathologie, mais leur utilisation excessive est à l'origine d'une augmentation de la prévalence de bactéries résistantes. De plus, et malgré un traitement adapté, on observe un nombre important de rechutes et d'échecs thérapeutiques. Ces observations soulèvent l'hypothèse de l'émergence de bactéries résistantes suite à l'administration de FQ.

Au cours de ma Thèse de Sciences, je me suis intéressée à la compréhension des mécanismes d'acquisition des résistances de *F. tularensis* aux FQ. L'un de mes objectifs a été de clarifier l'impact des mutations de l'ADN gyrase sur la résistance aux FQ des bactéries du genre *Francisella*, qu'il s'agisse de mutations au niveau ou en dehors du QRDR. Un autre objectif majeur, a été d'étudier le rôle potentiel de la protéine FupA/B dans la résistance aux FQ. Les mécanismes de résistance/tolérance/dormance bactérienne *in vivo* sont complexes et vraisemblablement multifactoriels. L'ensemble des données acquises dans ce travail de thèse confirme que la résistance de *F. tularensis* aux FQ n'est pas uniquement due aux mutations sur l'ADN gyrase et démontre l'implication de la protéine FupA/B.

Dans le premier article, nous avons analysé les conséquences fonctionnelles des mutations de l'ADN gyrase observées sur des lignées d'évolution de *F. novicida* résistantes aux FQ et générées *in vitro* (119). Nous avons démontré que le résidu acide aspartique en position 87 de GyrA était un « hot spot » de mutation associée à la résistance aux FQ pour les souches de *Francisella*, comme c'est le cas pour de nombreux autres pathogènes. Nous avons également mis en avant les conséquences de la substitution P43H de GyrA jamais décrite jusqu'alors. La modélisation structurale du cœur catalytique de l'enzyme de *F. novicida* a montré que la localisation de ce résidu était tout à fait compatible avec l'effet observé. Une chronologie inhabituelle d'apparition de mutations sur les gyrases a également été mise en évidence. Les mutations sur GyrB apparaissent antérieurement aux mutations sur GyrA et peuvent être associées de manière directe ou indirecte à la résistance aux FQ. Par exemple, l'insertion +P466 sur GyrB est corrélée avec une augmentation de la CMI. En revanche, la mutation D487E-ΔK488 qui n'a pas d'effet direct, amplifie les conséquences fonctionnelles des mutations de GyrA, effet confirmé par des expériences de complémentation. Ce travail a également montré que certaines mutations observées sur les DNA gyrases d'isolats hautement

résistants aux FQ, n'affectait pas la sensibilité aux FQ comme c'est le cas de la délétion $\Delta E524-\Delta S525$, située en position C-terminale de GyrA,

En résumé, ces travaux ont donc permis de souligner l'importance des mutations GyrB dans la résistance aux FQ des souches *Francisella* et démontrent clairement que les mutations de GyrA et de GyrB ne rendent pas compte à elles seules de la résistance aux FQ.

Dans un second article nous avons étudié le rôle de la protéine FupA/B comme autre acteur potentiel de la résistance aux FQ des bactéries du genre *Francisella*. Nous avons démontré que la délétion de la protéine hybride FupA/B était à l'origine d'une diminution de la sensibilité de *F. tularensis* LVS aux FQ. Cet effet a également été observé suite à la délétion de FupA et non FupB chez la souche virulente *F. tularensis* SCHU S4. La délétion de cette lipoprotéine à l'origine d'une déstabilisation membranaire associée à une hypersécrétion de vésicules explique sans doute ce phénomène. L'analyse protéomique des OMVs a mis en évidence une surexpression de la protéine RecA qui fait suite à la délétion de FupA/B et qui s'accompagne d'un phénomène de tolérance aux antibiotiques jamais décrit antérieurement pour ces bactéries. Enfin, outre la modification de composition protéique, nous avons montré que la souche LVS- $\Delta fupA/B$ produisait plus de biofilm que la souche sauvage avec, là encore des conséquences directes sur la modification de la sensibilité aux FQ que nous avons quantifiées. Un des aspects très intéressants que nous avons mis en évidence à travers cette analyse est l'existence de bactéries viables mais non cultivables (VBNC).

Force est de constater que ce phénomène de tolérance aux antibiotiques peut échapper à l'évaluation de la sensibilité aux antibiotiques par la détermination des CMI qui est un test classiquement réalisé en clinique. Dans cette étude en particulier, nous avons en effet observé une tolérance accrue de LVS- $\Delta fupA/B$ à la gentamycine alors que sa CMI est comparable à celle de la souche sauvage. Une meilleure appréciation de ces paramètres pourrait contribuer à un traitement plus approprié des patients infectés. De plus, la résistance exacerbée des bactéries du genre *Francisella* dans les biofilms et la notion de VBNC n'avait jamais été rapportée. Ce sont des éléments qui pourraient rendre compte des phénomènes de rechutes et qu'il faudrait prendre en considération.

Dans ce travail, nous avons comparé la sécrétion des OMVs de la souche sauvage vs la souche mutée, en l'absence d'antibiotiques. Les données de la littérature indiquent que l'exposition aux FQ augmente la production d'OMVs pour de nombreuses espèces

bactériennes (170,171). Nous souhaitons à présent étudier si ce phénomène s'observe chez les bactéries du genre *Francisella*. Si tel est le cas, l'exposition des souches cliniques aux FQ pourrait entraîner une hypervésiculation et par conséquent une production accrue de biofilm impliquée dans la résistance aux antibiotiques. En particulier, il serait intéressant de réaliser cette analyse en présence d'antibiotiques de la classe des aminosides et tétracyclines, indiqués dans le traitement de la maladie de la tularémie.

En tenant compte de la formation potentielle de biofilm par les souches cliniques difficilement cultivables, il serait aussi pertinent d'analyser la composition des biofilms. Ceci permettrait de mettre en place une stratégie efficace de dispersion afin de faciliter l'isolement de la bactérie ou de favoriser l'accès des antibiotiques à leur cible (172). Le marquage ConA-FITC, ciblant le D-mannose et le D-glucose apporte une première réponse indiquant la présence de ces sucres au sein des biofilms. Parmi les composés que nous allons tester nous pouvons citer la DNase (173), la dispersine B (174), la L-arginine (175) ou encore l'EDTA (175). La combinaison de composés dispersants avec des antibiotiques sera également évaluée. Ainsi, les résultats d'une étude menée par Lebeaux *et al.* sur des bactéries à Gram négatif et positif, montrent que l'association de la gentamicine avec l'EDTA qui favorise la dispersion du biofilm en chélatant les cations (175), améliore l'efficacité du traitement.

En conclusion, nos travaux ont permis de démontrer que la délétion de la protéine FupA/B, était un facteur favorisant l'augmentation de la résistance aux FQ chez *F. tularensis*. Nos données suggèrent que cet effet résulte d'une déstabilisation membranaire à l'origine d'une augmentation de la sécrétion d'OMVs qui à leur tour contribuent à la formation de biofilm. Il s'agirait donc plutôt d'un phénomène mécanique. Compte tenu de la fonction décrite des protéines FupA et FupA/B (164,166), y a-t-il un lien entre la captation du Fer et la résistance aux FQ ? Les protéines seraient-elles impliquées dans la captation ou l'élimination des FQ ? Enfin, ce mécanisme observé chez *Francisella* ne pourrait-il pas s'appliquer à d'autres bactéries ?

Pour tenter de répondre à ces questions et comprendre par quels mécanismes moléculaires les protéines gouvernent cet effet, deux stratégies ont été mises en place. D'une part, nous avons amorcé l'analyse fonctionnelle de FupA/B *via* la production de protéoliposomes. Les résultats sont encourageants et suggèrent que la protéine possède une activité porine. Des PL contenant FupA et FupB seront également produits afin d'étudier l'activité de chacune de ces protéines. D'autre part, certains éléments de réponse pourraient émerger de l'analyse

phylogénétique de FupA et FupB que nous avons initié en collaboration avec Céline Brochier-Armanet (LBBE, Lyon).

La première recherche sur InterPro a montré que les gènes *fupA* et *fupB* appartiennent à la famille protéique de fonction inconnue DUF3573 qui compte 126 membres. Cette famille est composée de cinq sous-groupes : *fupA*, *fupB*, *fmvA*, *fmvB* et *fslE*. L'ensemble de ces 126 séquences appartiennent à la classe des *Gammaproteobacteria* et sont affiliées aux familles des *Francisellaceae* et des *Piscirickettsiaceae* de l'ordre des *Thiotrichales*. Bien que leur distribution soit majoritaire dans les *Francisellaceae*, cette analyse a révélé la présence d'homologues de *fupA* et *fupB* à l'extérieur du genre *Francisella* élargissant la distribution taxonomique connue de ces gènes.

Ces données ont motivé une analyse plus fine à partir de 384 protéomes de *Thiotrichales* disponibles sur NCBI qui a abouti à l'identification de 1216 gènes homologues dont la distribution taxonomique est assez large. Ils sont trouvés au sein des genres *Allofrancisella*, *Beggiatoa*, *Caedibacter*, '*Candidatus* Thiomargartita', *Fangia*, *Francisella*, *Piscirickettsia*, *Thioploca*, *Thiotrix*. De façon intéressante, le nombre d'homologues par souche est très variable. Ainsi, le genre *Caedibacter* présente en général un seul homologue, alors que les *Piscirickettsia* en ont deux, les *Allofrancisella* trois, les *Fangia* quatre et les *Francisella* cinq. Une analyse phylogénétique par la méthode du maximum de vraisemblance sur l'ARNr16S a ensuite été réalisée pour modéliser les relations de parentés entre les différentes souches de *Thiotrichales*. Il s'avère que *Caedibacter taeniospiralis* et *Fangia hongkongensis* ont une position intéressante, car elles se positionnent entre le genre *Francisella* et le genre *Piscirickettsia*. Plus précisément, elles représentent la lignée soeur (les plus proches parents) du genre *Francisella* et pourront donc être précieuses pour comprendre l'histoire évolutive des gènes *fupA* et *fupB* et de leurs homologues chez les *Francisella*. L'intérêt d'utiliser ces approches phylogénétiques est de pouvoir construire l'arbre des séquences homologues à *fupA* et *fupB*, afin de retracer l'histoire évolutive de la famille DUF3573.

L'exploration du voisinage génomique est une autre approche qui permet d'obtenir des informations fonctionnelles. En effet, la conservation de contextes génomiques sur de longues périodes reflète souvent l'existence de liens fonctionnels entre les gènes. Dans le cas présent, cette analyse a montré que, contrairement aux gènes homologues *fmvA*, *fmvB* et *fslE* qui sont localisés dans des régions très variables, le contexte génétique de *fupA* et *fupB* est extrêmement conservé. Les gènes *fupA* et *fupB* sont situés l'un à la suite de l'autre et à côté des gènes codant l'Isoleucine ARNt ligase (*ileS*), la FAD synthétase (*ribF*), la peptidase signal

II (IspA) et une malate dehydrogenase (MaeA). Le fait qu'un contexte génétique soit conservé signifie qu'il y a une contrainte pour en assurer la conservation et signe le plus souvent l'existence d'un lien fonctionnel entre ces gènes. La recherche de partenaires fonctionnels a également été réalisée en interrogeant la banque de données STRING. Les résultats obtenus montrent que *fupA* et *fupB* sont des partenaires fonctionnels, ce qui rend peut-être compte de l'activité de la protéine de fusion FupA/B. Un autre élément qui ressort de cette analyse est que le gène *maeA* est prédit comme un partenaire fonctionnel de *fupA* et *fupB*, renforçant ainsi l'hypothèse émise sur la base de l'analyse des contextes génomiques.

En conclusion, les analyses rapportées ci-dessus montrent que la distribution taxonomique des homologues de *fupA* et *fupB* est plus large que ne l'indiquent les données de la littérature. Il apparaît que la famille DUF3573 est spécifique de l'ordre *Thiotrichales* mais que leur taxonomie n'est pas exclusive aux bactéries du genre *Francisella*. Compte tenu du lien que nous avons établi entre FupA/B et la résistance aux FQ, l'analyse des autres genres bactériens chez lesquels des homologues ont été identifiés mérite attention. Enfin, l'existence de liens fonctionnels possibles entre *fupA* et *fupB* et les gènes retrouvés de manière récurrente dans leur voisinage reste à explorer.

ANNEXES

ARTICLE

DOI: 10.1038/s42003-018-0095-6

OPEN

Structural and functional studies of the metalloregulator Fur identify a promoter-binding mechanism and role in *Francisella tularensis* virulence

J. Pérard¹, S. Nader¹, M. Levert², L. Arnaud¹, P. Carpentier¹, C. Siebert², F. Blanquet², C. Cavazza¹, P. Renesto², D. Schneider², M. Maurin², J. Coves³, S. Crouzy¹ & I. Michaud-Soret¹

Q2 *Francisella tularensis* is a Gram-negative bacterium causing tularaemia. Classified as possible bioterrorism agent, it may be transmitted to humans via animal infection or inhalation leading to severe pneumonia. Its virulence is related to iron homeostasis involving siderophore biosynthesis directly controlled at the transcription level by the ferric uptake regulator Fur, as presented here together with the first crystal structure of the tetrameric *F. tularensis* Fur in the presence of its physiological cofactor, Fe²⁺. Through structural, biophysical, biochemical and modelling studies, we show that promoter sequences of *F. tularensis* containing Fur boxes **Q1** enables this tetrameric protein to bind them by splitting it into two dimers. Furthermore, the critical role of *F. tularensis* Fur in virulence and pathogenesis is demonstrated with a *fur*-deleted mutant showing an attenuated virulence in macrophage-like cells and mice. Together, our study suggests that Fur is an attractive target of new antibiotics that attenuate the virulence of *F. tularensis*.

¹CNRS, CEA, Laboratory of Chemistry and Biology of Metals (LCBM)/Biosciences and Biotechnology Institute of Grenoble (BIG), Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France. ²CNRS, CHU Grenoble Alpes, Laboratoire TIMC-IMAG, Grenoble INP (Institute of Engineering), Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France. ³CNRS, CEA, Institut de Biologie Structurale, Univ. Grenoble Alpes, 38000 Grenoble, France. Correspondence and requests for materials should be addressed to J.P.(email: julien.perard@cea.fr) or to S.C. (email: serge.crouzy@cea.fr) or to I.M-S.(email: isabelle.michaud-soret@cea.fr)

F *Francisella tularensis* is a small, highly infectious Gram-negative bacterium, causing the zoonotic disease tularaemia¹. This species is currently divided into three subspecies, including subsp. *tularensis* (type A strains), subsp. *holarctica* (type B strains) and subsp. *mediasiatica*². Only type A and type B strains of *F. tularensis* are known to cause tularaemia in humans. A large number of animal species can be infected with this pathogen, but lagomorphs and small rodents are considered the primary sources of human infections. The disease may also be transmitted through arthropod bites, mainly *Ixodidae* ticks and mosquitoes. *Francisella tularensis* also survive for prolonged periods in the environment, and humans can be infected through contact with contaminated soil or water. Because a few bacteria inhaled through aerosols may induce an acute severe pneumonia, with a mortality rate of 30% or more, *F. tularensis* has been classified as a potential category A bioterror agent by the Center for Disease Control and Prevention³. No effective vaccine is currently licenced for human or animal use, and a few antibiotic compounds are used as first-line drugs in tularaemia patients. Alternative treatments are urgently needed both to improve the prognosis of patients with severe diseases, and also to improve our preparedness to the intentional release of resistant strains of this pathogen in the context of bioterrorism^{4,5}. Although numerous genes have been shown to be important for the pathogenesis and virulence of *F. tularensis*, there is still a blatant lack of knowledge about central biological functions such as iron homeostasis^{6,7} and metalloregulators^{8,9}. As a facultative intracellular bacterial pathogen, *F. tularensis* multiplication and virulence depends on the host cell iron pool¹⁰. Indeed, a major defence strategy used by infected eukaryotic organisms is to withhold this metal by sequestering free iron. In reaction to iron starvation, *F. tularensis* is able to secrete an iron chelator structurally similar to the polycarboxylate siderophore rhizoferrin^{11,12}. The *figA* gene (also called *fslA*), involved in the siderophore synthesis, but also the *figE* gene (*fslE*), responsible for its uptake, have been characterized to play an important role in the virulence and/or intracellular replication of this pathogen^{9,12,13}. These

genes belong to the locus *figABCDEF* (*fig* for *Francisella* iron-regulated genes)^{14,15} (Fig. 1). The *fig* operon is regulated by the ferric uptake regulator Fur, which is supposed to bind to the *fur-figA* intergenic region that contains a specific sequence called a FurBox (Fig. 1a), although such direct interaction has not yet been demonstrated. The Fur protein is a global transcriptional regulator that senses iron status and controls the expression of genes involved in iron homeostasis, virulence and oxidative stresses^{16–18}.

In the present study, to go further in the in vitro and in vivo characterization of the properties of the *F. tularensis* Fur (FtFur) protein, we used a virulent *F. tularensis* subsp. *holarctica* strain, a Type B biovar I, referred to as CHUGA-Ft6. This strain was isolated from a blood sample from a French patient suffering from a typhoidal form of tularaemia¹⁹. Interestingly, comparing FtFur to Fur from *Escherichia coli* (EcFur), *Pseudomonas aeruginosa* (PaFur), *Legionella pneumophila* (the agent of legionellosis, LpFur) and *Yersinia pestis* (the agent of plague, YpFur), we have evidenced that these proteins can be discriminated by their quaternary structure in solution²⁰. EcFur and YpFur belong to the group of the commonly accepted dimers, while FtFur, PaFur and LpFur belong to a group of tetramers. A structural zinc in a cysteine-rich site (site 1) has been characterized in many Fur proteins including FtFur^{16,21,22}. In addition, the Fur proteins need metallic dications such as Co²⁺, Mn²⁺ or Fe²⁺ in a regulatory site (site 2) to be activated for the binding to DNA²⁰.

Here, we present, to our knowledge, the first crystal structure of a tetrameric Fur protein in the presence of its physiological cofactor, the ferrous ion. This structure sheds light on the metal-binding sites and corresponds to two intertwined pre-activated dimers. We demonstrate the direct interaction of the protein with the promoter region controlling expression of the genes involved in siderophore synthesis and identify essential residues in this interaction. In addition, owing to the coupling of computer models and free energy calculations with cross-link experimental studies, we bring evidence for a DNA-driven tetramer splitting mechanism mediated by specific promoter sequences, and leading

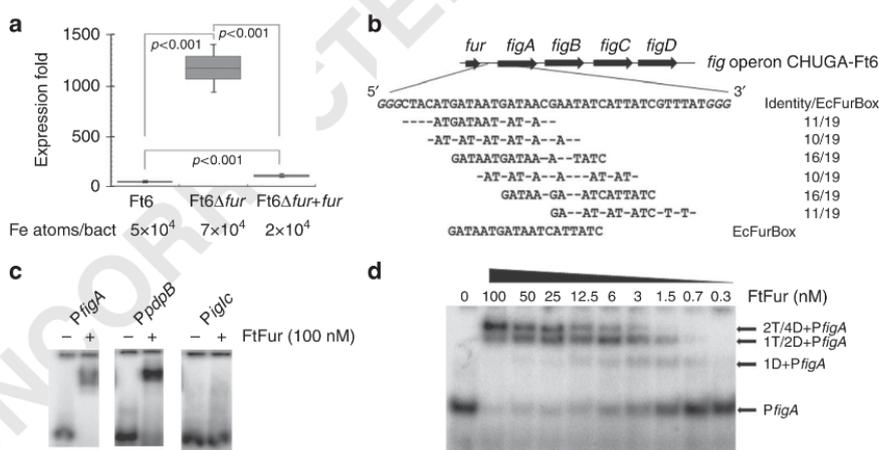


Fig. 1 FtFur regulates *fig* operon by recognition of DNA FurBox. **a** qRT-PCR showing the absence of *fur* transcripts in the CHUGA-Ft6 Δfur strain, with a 16S RNA standard as a control, Fur (Ft6 and Ft6 $\Delta fur + fur$) repressed the transcription of *figA*. This repression is abolished in the absence of Fur (Ft6 Δfur). The data correspond to two independent experiments made in triplicate. *P* values were calculated using the Student's *t* test. Iron concentration was measured by ICP-AES (error under 1%) from 2 mL bacterial culture (see Methods section) and number of Fe atoms per bacteria has been deduced. **b** Organization of the *fig* operon and sequence of the *fur-figA* intergenic region (P*figA*). The identical bases between P*figA* and EcFurBox are indicated underneath showing overlapping FtFur binding sites. **c** Evaluation of the ability of FtFur to bind identified or predicted Fur boxes and estimation of the apparent K_ds (for DNA seq of each promoter see Supplementary Fig. 1). **d** EMSA of FtFur in the presence of the 43 bp P*figA* sequence. The proposed stoichiometry is written on the figure: D corresponding to dimer and T to tetramer

to the formation of two Fur dimer–DNA complexes. Finally, the critical role of FtFur in bacterial virulence and pathogenesis is demonstrated using a *fur*-deleted CHUGA-Ft6 mutant (Ft6 Δ *fur*), which shows an attenuated virulence, both in murine macrophage-like cells and in mice, reinforcing that FtFur can be thus defined as a crucial anti-virulence target.

Results

Fur is directly involved in *F. tularensis* iron homeostasis. A Δ *fur* mutant was already generated in the virulent Schu S4 strain (subsp. *tularensis*) to demonstrate that siderophore production is regulated by FtFur in *F. tularensis*⁹. However, the direct involvement of FtFur in virulence has never been reported to our knowledge. We have constructed the CHUGA-Ft6 Δ *fur* strain by the allelic exchange method and deletion was confirmed by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and sequencing as we did not detect any *fur* transcript in Ft6 Δ *fur* Supplementary Fig. 1). Using this approach, we demonstrated that the siderophore synthesis is under the direct control of FtFur in CHUGA-Ft6 strain. CHUGA-Ft6 Δ *fur* shows an approximately 25-fold higher level of *figA* transcript when cultured in iron-replete conditions compared to the wild-type (WT) strain. The WT phenotype, that is, Fur transcriptional repression of the *fig* operon genes, is recovered when the WT *fur* is expressed in trans to complement the *fur* deletion (CHUGA-Ft6 Δ *fur* + *fur*) (Fig. 1a). This means that siderophore production is repressed by FtFur in the presence of iron and derepressed in the absence of the protein. Inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) quantification of the bacterial iron concentration showed that, under our culture conditions, the CHUGA-Ft6 Δ *fur* strain accumulates 1.6-fold more iron than the WT (Fig. 1a). These data strongly suggest that FtFur can bind the *fur-figA* intergenic region that contains sequences closely related to the EcFurBox identified in *E. coli* (Fig. 1b). Only a few Fur boxes were identified in *Francisella* genome, compared to *E. coli*, in the promoter of *figA*, *pdpB* (coding for the pathogenicity determinant protein PdpB) and *iglC* (coding for the pathogenicity island protein IglC) both in Schu S4¹⁴ and CHUGA-Ft6. Then, electrophoretic mobility shift assay (EMSA) with manganese-activated FtFur have been performed on consensus EcFurBox and on *PfigA*, *PpbbB* and *PiglC* sequences (Fig. 1c and Supplementary Fig. 2).

FtFur binds with a very high affinity to EcFurBox when activated with Co(II) ($K_{dapp} = 9$ nM²⁰) and to the *PfigA* promoter (estimated $K_{dapp} = 5$ nM) and with a low affinity to *PpbbB* (averaged estimated $K_{dapp} = 100$ nM; Fig. 1c and Supplementary Fig. 2C). In contrast, and while *iglC* gene expression is also found up-regulated under iron-restricted conditions in *F. tularensis*¹⁴, no binding is detected indicating the absence of direct regulation by Fur. The migration on EMSA gel of the FtFur/*PfigA* complex shows a composite pattern with three successive bands assigned to the binding of one to two tetramers (or one to four dimers) (Fig. 1d and Supplementary Fig. 2B) which appear as the protein concentration is increased. This suggests that FtFur could bind to several predicted Fur boxes in the sequence (Fig. 1b). Indeed, using a shorter version (*PfigAS*) of *PfigAL*, the main species detected corresponds to one dimer bound to DNA (Supplementary Fig. 2B).

Western blot experiments suggest that the estimated 3000 protein subunits/bacteria may be mainly present as a tetramer in vivo (see Supplementary Fig. 2F, G) and that hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment (1 mM for 4 h) does not impact this amount. This is not surprising considering the high stability of the tetramer in solution. This copy number is in the same range as described in *E. coli* or *Vibrio cholerae* (5000 and

2500 subunits/bacteria estimated, respectively, in normal growth conditions)^{23,24}. Considering the number of 50,000 total iron atoms/bacteria quantified by ICP-AES (Fig. 1a) and the volume of CHUGA-Ft6 around 10⁻¹⁵ L, 5 μ M of FtFur subunit and 80 μ M total iron are expected. Assuming micromolar range K_d for (Fe-FtFur) as found in the literature for *E. coli* (1–10 μ M for Fe-EcFur²⁵), we can expect that a pool of metallated Fur tetramer exists in the cell prior to association with the few DNA target present in *F. tularensis*.

Fe-FtFur and Mn-FtFur contain intertwined pre-activated dimers. Recombinant FtFur was purified as a tetramer containing one equivalent of Zn(II) per subunit²⁰. FtFur was crystallized in the presence of Mn(II) as MnCl₂ or Fe(II) as (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, the latter under anaerobic conditions. The structure of Mn-bound FtFur was obtained from purified protein metallated with Mn (II) and was determined ab initio at 1.7 Å resolution by the single-wavelength anomalous diffraction (SAD) method. This structure was used to determine that of Fe(II)-bound FtFur at 1.8 Å resolution by molecular replacement (see X-ray data in Supplementary Fig. 3 and Supplementary Tables 1 and 2). Both Mn(II)-bound and Fe(II)-bound proteins have similar overall structures appearing as a compact tetramer made of a dimer of dimers per asymmetric unit (α -carbon root mean square deviation (r.m.s.d.) of 0.271 Å between the two structures). The main differences come from disordered N-terminal and C-terminal residues. Thus, the structure of Fur containing the physiological activator metal, namely Fe(II)-bound FtFur, the first one described to date, will be used for a detailed description (Fig. 2a). Among the total 140 residues of the protein, 131 to 133 were resolved per chain. Each subunit presents secondary structure elements similar to those found in other Fur structures. It consists of a N-terminal DNA-binding domain (residues 7–82) composed of a winged helix–turn–helix motif in which α 4 is the DNA recognition helix. A short hinge connects the DNA-binding domain to the C-terminal dimerization domain (residues 89–138). The dimerization domain consists of three antiparallel β -strands (β 3 to β 4) and two α -helices (α 5 to α 6), α 5 intersecting between β 4 and β 5 (Fig. 2a and Supplementary Fig. 4). The dimeric interface is mediated by β 5 from each subunit forming an antiparallel β -sheet, part of a six-stranded β -sheet in the dimer (Fig. 2b).

The two dimers in the tetramer structure are nearly identical (α -carbons r.m.s.d. = 0.318 Å between the two dimers) with an almost perfect superposition of the secondary structure elements. The interaction between the two dimers through their DNA-binding domains is stabilized by H-bonds involving atoms of the DNA recognition helices (α 4) of chains AB and CD (for chains A and C: Gln61_C He/Ser64_A O; Ser64_C Hy/Ser64_A Oy; Ser64_C O/Gln61_A He and Arg57_C Hh/Glu63_A Oe salt bridge, and equivalently for chains B and D). The two salt bridges between Arg57 and Glu63 constitute the most important interactions (Fig. 2c). These interactions combined with an interface area of 2830 Å² between the dimers AD and BC (PISA²⁶) explain the high stability of the tetramer in solution (Fig. 2d). For comparison, in a previous work, we demonstrated that PaFur, initially described as a crystallographic dimer²⁷, was tetrameric in a solution²⁰ with a substantially lower predicted interface area of 2120 Å².

Each dimer is in a closed conformation with the wing in 'inside' positions corresponding to the 'active' form in which the DNA-binding domains are prepared to bind target DNA²⁰. However, the dimer–dimer interactions naturally prevent any kind of interaction with DNA through the recognition helices. Indeed, Tyr56 and Arg57 (the one involved in the salt bridge stabilizing

Q3

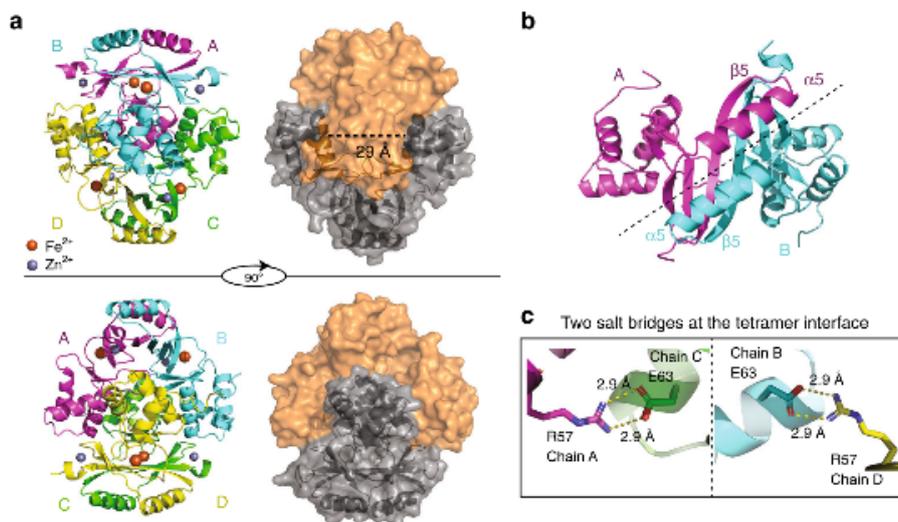


Fig. 2 Structure of FtFur at 1.8 Å in the presence of physiological iron Fe^{2+} . **a** Fe-FtFur structure solved by SAD at 1.8 Å in anaerobic conditions in the presence of Fe^{2+} . The cartoon model presents the four chains, labelled A–B–C–D. Surface representation indicates the dimer/dimer interface and the distance between two recognition helices (29 Å). **b** Symmetry at the dimer/dimer interface between two monomers involving helix $\alpha 5$ and strand $\beta 5$. **c** One of the most important interactions suggested by the structure is a salt bridge between Arg57 and Glu63

the tetramer), both present in the recognition helix, are highly conserved residues known to have base-specific interaction with DNA^{28–30}. We thus hypothesize that the metallated FtFur tetramer structure is a pre-activated form of the protein. The mechanism of pre-activated tetramer disruption driven by DNA is conceptually of interest.

First structural description of an iron substituted Fur. X-ray fluorescence spectra indicated that Fur crystals contain two metal species: one is the expected Zn and the second is the metal added during crystallization, that is, Mn(II) or Fe(II) (Supplementary Fig. 3A). The structures of Mn-FtFur and Fe-FtFur are similar and confirm the presence of one Zn^{2+} and one Mn^{2+} or Fe^{2+} per subunit. Zn^{2+} in structural site S1 is coordinated by four sulphur atoms from two pairs of cysteines in CX_2C motifs (Cys93–Cys96 and Cys133–Cys136) (Table 1). It connects the short C-terminal helix $\alpha 5$ to the β -sheet of the dimerization domain (Supplementary Fig. 4). The presence of S1 in Fe-FtFur but not in PaFur demonstrates that zinc is not a prerequisite for tetramer formation. The second site S2 binds either Mn^{2+} or Fe^{2+} . The metal ion adopts a distorted octahedral geometry with a 3N–3O coordination sphere (Fig. 3). S2 connects the DNA-binding domain (His33 and Glu81 (bidentate) and the dimerization domain which provides three ligands (His88, His90 and Glu101). It is described as the essential ‘regulatory’ site, present in all known activated Fur structures. H33A–H90A double mutations in FtFur S2 provoke a total inactivation of the protein *in vitro* (Supplementary Fig. 5C). The Fur structures containing an S2 site filled with Zn^{2+} show some variation in the coordination sphere. This flexibility may be explained by the preference of Zn^{2+} for a tetrahedral geometry compared to Fe^{2+} , found physiologically in S2, which favours a hexacoordinated octahedral environment with N/O ligands. *Ab initio* quantum chemical geometry optimizations of models of the S2 site using DFT with B3LYP hybrid functional and 6–31 G(d) basis set have been performed with bound Mn^{2+} or Fe^{2+} . The similar optimized geometries, with a larger coordination sphere for Mn^{2+} than for Fe^{2+} , validate the X-ray structures (Fig. 3, Supplementary Fig. 4A–D and Supplementary Table 3).

Table 1 Metal coordination from X-ray and DFT calculations

Atoms	Distance	Å
Site S1	Zn	Zn
Cys93/96/133/136S	2.3	2.3
Site S2	Fe	Mn
	X-ray/DFT	X-ray/DFT
His33 NE2	2.3/2.20	2.3/2.26
Glu81 OE1	2.2/2.25	2.3/2.43
Glu81 OE2	2.3/2.36	2.3/2.32
His88 NE2	2.3/2.22	2.3/2.25
His90 NE2	2.2/2.18	2.3/2.22
Glu101 OE1	2.0/2.05	2.3/2.10

Bond distances for sites S1 and S2 ligands deduced from the X-ray structures and calculated by DFT

Some structures of Fur or Fur-like proteins (such as HpFur and PaFur) revealed the presence of a third metal-binding site (S3) involving four conserved 2 His, 1 Asp and 1 Glu^{22,27}. In FtFur, Tyr125 is found in place of one very conserved His. The structure shows that the phenol group H-bonds with the other putative ligands preventing metal binding in the position where a metal ion was expected. Accordingly, the structures of FtFur do not display any S3 site (Fig. 3 and Supplementary Fig. 4).

In summary, the crystal structures of FtFur highlighted the presence of two metal ions per subunit: one structural Zn^{2+} , already present in the non-activated protein as purified, and either one Mn^{2+} or one Fe^{2+} , its physiological activator, with identical ligands in the regulatory site of similar geometry. Metallated FtFur behaves as a dimer of pre-activated dimers with the DNA-binding domains forming a kind of crown with interacting recognition helices through two salt bridges between Arg57 and Glu63 together with other weaker interactions.

Quaternary structure of FtFur in the presence of the FurBox. Size-exclusion chromatography coupled to multi-angle laser light scattering with online refractometer (SEC-MALLS-RI) was used

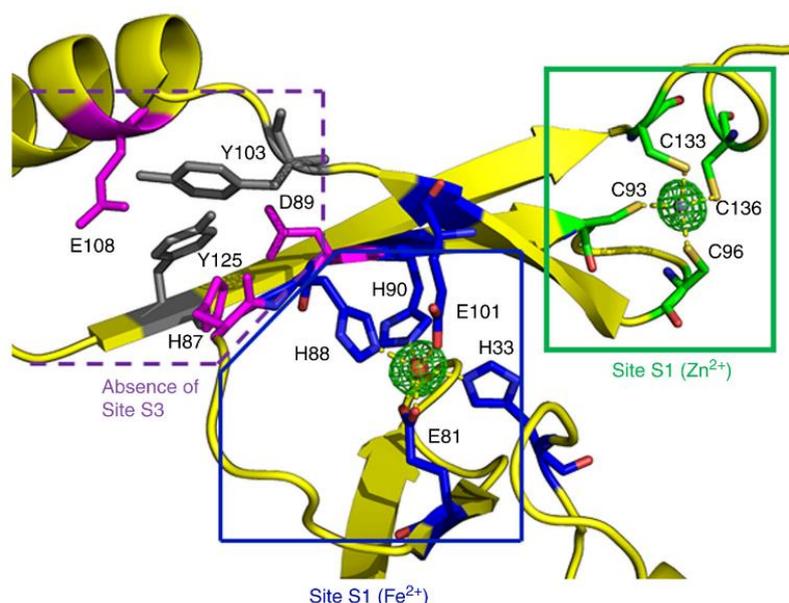


Fig. 3 Metal binding site in Fe-FtFur. Focus on one monomer extract on Fe-FtFur showing S1 and S2 sites simultaneously together with the unfilled S3 site

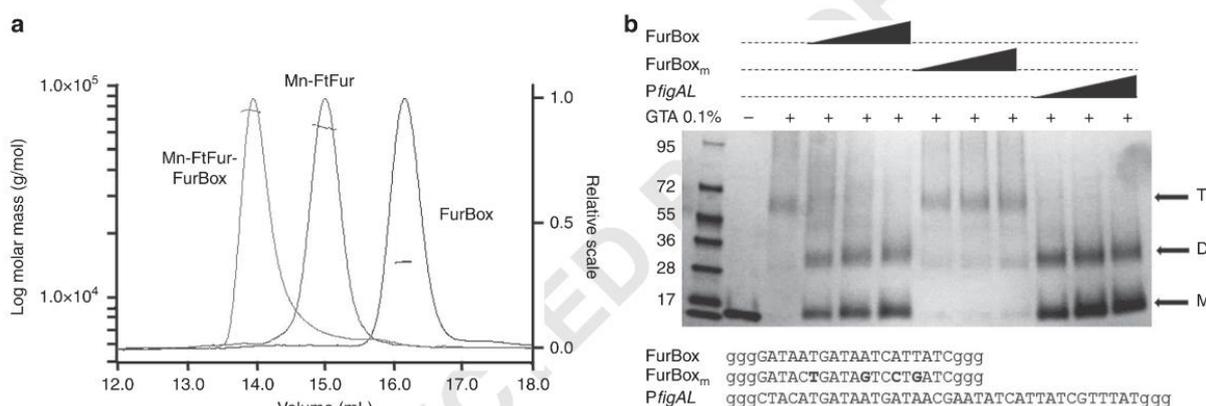


Fig. 4 Quaternary structure of Mn-FtFur in the presence of FurBox analysed by SEC-MALLS-RI and cross-link assay. **a** SEC-MALLS-RI data of Mn-FtFur and the FurBox analysed alone or as a complex in the presence of 1 mM MnCl₂. Data are normalized by RI scale with sample concentrations ranging between 4 to 6 mg mL⁻¹. FtFur/FurBox gives a MW of 78 ± 2 kDa, Mn-FtFur gives a MW of 64 ± 1 kDa and FurBox gives a MW of 15 ± 0.5 kDa. **b** Cross-link assay with GTA on SDS-PAGE 4–20% acrylamide in TGS buffer. A dimer (D) was trapped in the presence of specific Fur boxes (FurBox and PfigAL), while FtFur exists as a tetramer (T) in the absence of DNA or in the presence of mutated FurBox_m

to investigate the behaviour of FtFur in the presence of DNA. As shown in Fig. 4a, in the presence of FurBox the protein eluted at a lower volume than the protein alone or the FurBox alone. The deduced molecular weight of the green peak is 74 ± 2 kDa, fitting with a complex between tetrameric FtFur (64 kDa) and the FurBox duplex (15 kDa). This can be interpreted as the binding of FtFur to DNA as a tetramer or as two dimers.

The evolution of the purified tetrameric FtFur in the presence of DNA was then analysed by cross-linking experiments using 0.1% glutaraldehyde (GTA). Under denaturing conditions, in the absence of DNA (Fig. 4b), the main detected band corresponds to a species with a molecular weight of approximately 62 kDa, in very good agreement with the size of a covalently bound FtFur tetramer. After cross-linking in the presence of the EcFurBox, only two bands were detected corresponding to the monomer and to a dimeric form of

the protein, respectively. Mutations of the FurBox (FurBox_m, see Supplementary Fig. 2) targeting four bases previously shown to be crucial for the specific Fur/DNA interactions³¹, three of them being involved in interactions with Tyr56^{28,29}, resulted in the conservation of the tetramer without apparition of dimers.

The monomer (M)/dimer pattern was also obtained with PfigA. These results demonstrate that tetrameric FtFur splits into dimers in the presence of specific DNA contrary to the dissociation of PaFur previously observed with non-specific DNA²⁰. Besides, they strongly suggest that FtFur binds the FurBox as dimers in vitro.

MALLS and SAXS data validate a two-dimer/DNA complex. The activated Mn-bound FtFur form and the Mn-bound FtFur/EcFurBox complex were examined by small-angle X-ray scattering (SAXS). In both cases, at three different concentrations

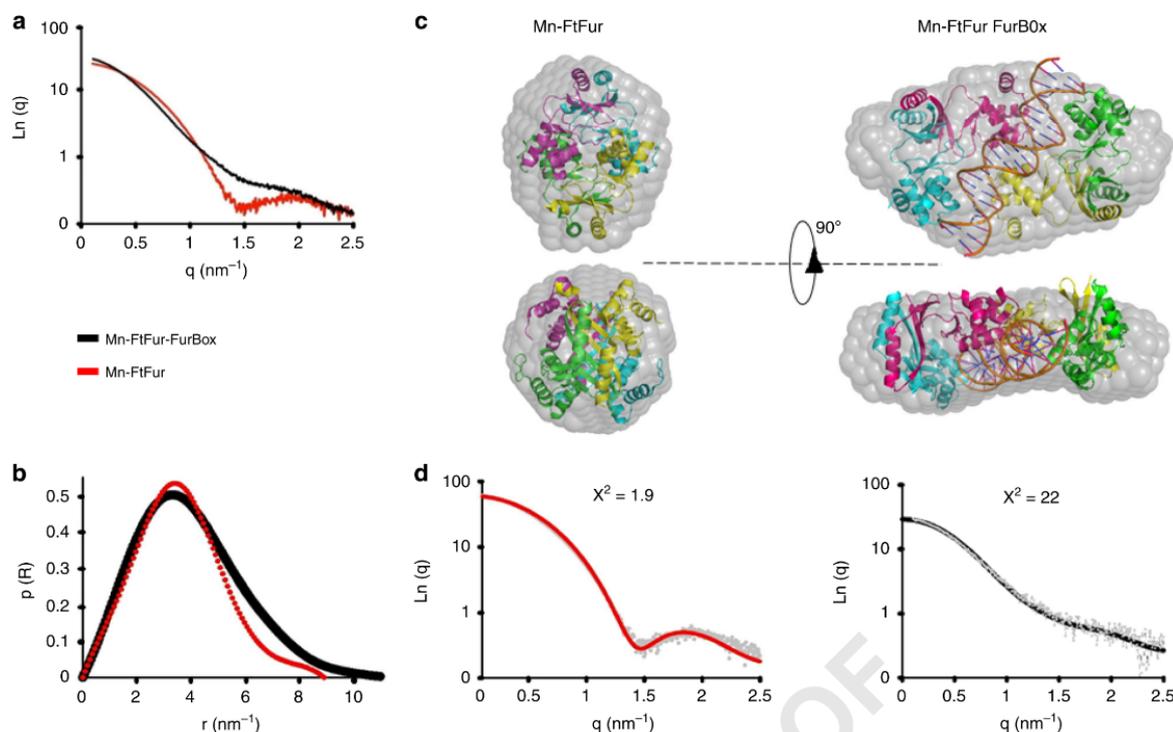


Fig. 5 Comparison of small-angle X-ray scattering curves of Mn-FtFur and Mn-FtFur/FurBox complex in solution. **a** Average scattering curves of Mn-FtFur and Mn-FtFur/FurBox complex in solution by small-angle X-ray scattering. **b** Pair distance distribution functions, $p(r)$: Mn-FtFur-FurBox (MW = 81 kDa) and Mn-FtFur (MW = 64 kDa). **c** Molecular models of Mn-FtFur structure (left) and of Mn-FtFur/FurBox (right) fitted in the SAXS envelope. The model of the Mn-FtFur-FurBox complex is obtained, in the absence of X-ray structure, by superposition of Mn-FtFur on the Mn-MgFur-FurBox complex (see Supplementary information). **d** Fits of the scattering curves

(1–10 mg mL⁻¹), the linearity of the Guinier plots indicates monodisperse samples. Average scattering curves of Mn-FtFur (red) and Mn-FtFur/FurBox complex (black) in solution were recorded (Fig. 5a). Pair distance distribution functions (Fig. 5b) point out an elongation of the protein/DNA system ($D_{\max} = 112 \text{ \AA}$ for DNA/protein complex against 83 \AA for the protein alone) and dramatic changes in the shape of the structure (Porod volume = 130 nm^3 , against 100 nm^3 , and radius of gyration = 32.5 \AA , against 27.4 \AA). Bead molecular models of Mn-FtFur alone and in complex with DNA complex, built by DAMMIF³², show a globular Mn-FtFur and a thick pancake shape for the DNA complex (Fig. 5c). The X-ray structure of the protein determined in this study docks very well in the calculated envelope with a χ^2 of 1.9 (Fig. 5d). In the absence of high-resolution structure of the Mn-FtFur-DNA complex, a model was built based on Mn-MgFur/EcFurBox ternary complex²⁹ and fits well with the calculated envelope with a χ^2 of 2.2. These results are in agreement with the conclusions of the cross-linking experiments and support the DNA-driven split of the FtFur tetramer in two dimers sandwiching the FurBox. To better understand the mechanism of dimer-dimer and dimer-DNA dissociation, theoretical calculations were performed.

Dimer/dimer and dimer/DNA dissociation free energy profiles.

The aim of this modelling was to evaluate precisely the difference in binding affinity between the FtFur dimers within the FtFur tetramers and between the FtFur dimers and DNA. Free energy (potential of mean force) profiles for the extraction (by translation along a fixed direction: Ox) of one FtFur dimer from the tetramer (dimer of dimers) and of FtFur from DNA

were computed: the meticulous translation protocol is shown in Supplementary Fig. 6. The simulations include a 'moving' subsystem (FtFur dimer, chains A and D) and a 'fixed' subsystem (FtFur dimer, chains B and C, DNA) as shown in Supplementary Fig. 7. The profiles were built using the 'umbrella sampling' technique and result from the overlapping of 26 computation windows, one for each translation distance, and corresponding to 15 ns molecular dynamics simulation each. The results of the calculations are shown in Fig. 6a. Binding free energies are $\Delta G = 18.8, 10.5$ and $8.8 \text{ kcal mol}^{-1}$ for dimer from FurBox, dimer from tetramer and dimer from mutated DNA (mutDNA containing FurBox_m), respectively. These binding free energies correspond to dissociation constants of 17 fM, 20 nM and $0.4 \text{ }\mu\text{M}$, respectively, allowing a thermodynamically easy separation of the tetramer into two dimers in the close proximity of DNA, deduced from the experiments. Statistical errors were estimated to be $<1.5 \text{ kcal mol}^{-1}$ with bootstrap analysis using the 'Bayesian bootstrap' method (b-hist option in *g_wham*).

According to Fig. 6b and Supplementary Fig. 8A, the residues mainly contributing to the stability of the tetramer are: E76, E63, N60, R57, D37 and K14, in agreement with the experimental results where the mutation of residues E76 and E63 into alanine leads to easier dissociation of the Ft tetramer into two dimers. Close inspection shows that R57 interacts with E63, E76 with N60 and D37 with S35. For both A and D moving chains, these residues contribute to around 30% of the total interaction energy.

The residues with the strongest contribution to the FtFur/wtDNA complex stability are R57, Y56, T54, R19, T16 and K14, contributing more than 50% of the total interaction energy (Fig. 6c and Supplementary Fig. 8D). By homology with the

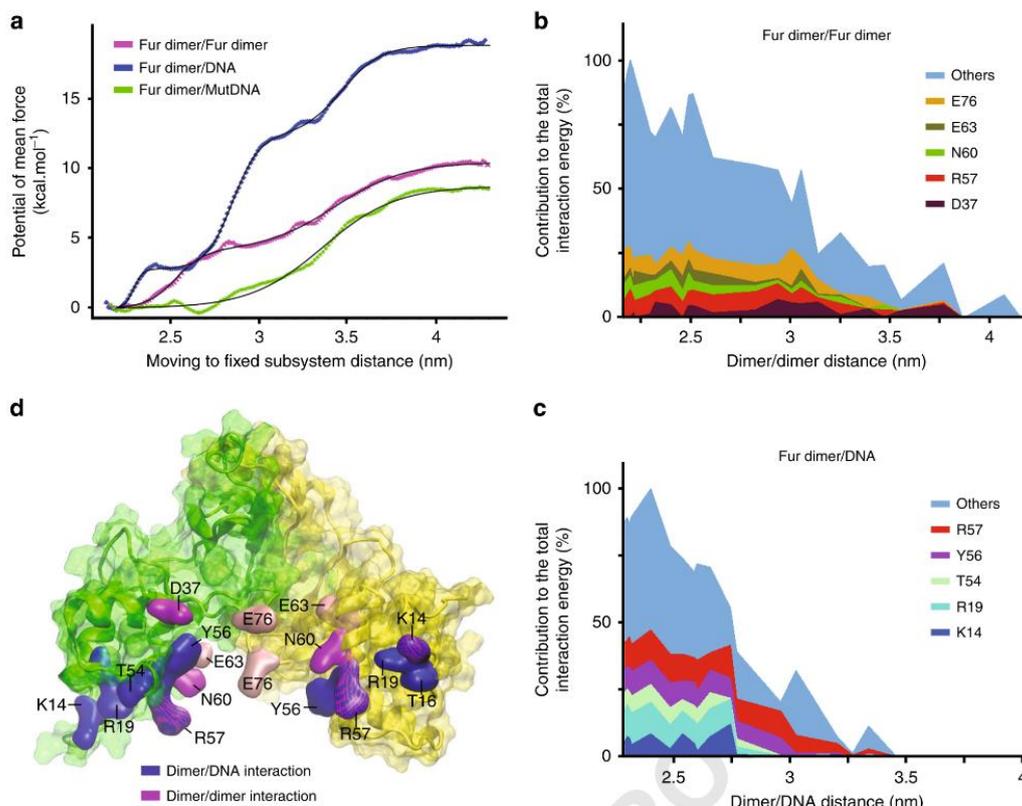


Fig. 6 Computation of free energy profiles for dimer/dimer and dimer/DNA dissociation. **a** Potentials of mean force for the extraction of FtFur dimer from the tetramer or from DNA. The x-axis, reaction coordinate, corresponds to the average centre of mass/centre of mass distance between the 'fixed' and the 'moving' subsystems. Data points corresponding to the outputs of Wham are fitted with 1, 2 or 3 sigmoid functions with R⁵⁵. Statistical errors were estimated using the bootstrap method. **b** Major contributors to the average interaction energy between Fur chain D and the 'fixed' dimer in the tetramer simulation. On average, five residues contribute to around 30% of the total interaction energy. **c** Major contributors to the average interaction energy between Fur chain D and DNA in the FtFur/wild-type DNA simulation. The x-axis corresponds to the average centre of mass/centre of mass distance between Fur and DNA. On average, five residues contribute to 54.5% of the total interaction energy. **d** Structure of FtFur dimer showing chain A (yellow) and chain D (green). Residues shown in blue surface are the major contributors to the average interaction energy between FtFur and DNA in the FtFur/wild-type DNA simulation. Residues in magenta and pink surfaces are the major contributors to the interaction energy between the 'moving' dimer and the 'fixed' dimer in the FtFur tetramer simulation. The mutated residues E63 and E76 are in pink colour

Magnetospirillum gryphiswaldense (Mg) Fur–DNA structure²⁹, R57, Y56 and K14 are expected to make base-specific contacts, whereas T54, R19 and T16 interact with phosphates. Average interaction energy profiles between the 'moving' and 'fixed' subsystems are shown in Supplementary information. According to these profiles, the dissociation of the FtFur dimers from DNA would occur in two steps: slight unbinding of subunit D followed by unbinding of subunit A (Supplementary Fig. 8B, up and down). Noticeably, the mutations in the DNA FurBox drastically impede the binding of Fur to DNA with a 10 kcal mol⁻¹ binding free energy decrease, explaining the selectivity of the binding of Fur to its FurBox sequence. More precisely, three of the four mutations face Fur chain D and their impact on the complex dissociation is visible in Supplementary Figure 8B where the initial average interaction energy of FtFur chain D with mutated DNA (–100 kcal mol⁻¹) is around half that with WT DNA (–200 kcal mol⁻¹). Below 2.8 nm the interaction of chain D with WT DNA remains stronger than with mutated DNA. (Supplementary Fig. 8C).

A summary of the FtFur dimer structure and the residues involved in its interactions with the other dimer within the tetramer or with DNA is shown in Fig. 6d.

New FtFur regulation mechanism from models and mutation data. Structural analysis suggests that the Arg57–Glu63 interaction plays a key role in the tetramer stabilization. Two of the four Arg57 (1 per dimer) are involved in such salt bridges and the two other are accessible to the solvent or to the DNA. Arg57 is predicted to be one of the most important residues for the interaction between Fur and bases in the specific DNA FurBox (Figs. 6, 7). This residue is highly conserved and its importance is in accordance with the Fur–DNA X-ray structure in *M. gryphiswaldense* where only few residues form base-specific interactions: Arg57–G7, Lys15–A24' and Tyr56–T15'/T16'²⁹. Similarly, Arg65 in EcZur, a Fur-like protein, interacts with a purine DNA base³⁰. In FtFur, both the four Lys14 (eq. Lys15 in MgFur) and two Arg57 are accessible for DNA interaction. Interestingly, the electrostatic potential around the tetramer shows a clear positive crown in the region of these residues (Fig. 7a) where the negatively charged DNA would be expected to first interact. We hypothesize that the specificity of the DNA-dependent tetramer dissociation could result from the interaction of DNA with Lys14 and the accessible Arg57, which would destabilize the tetramer by a progressive loss of the interaction of the two other Arg57 with

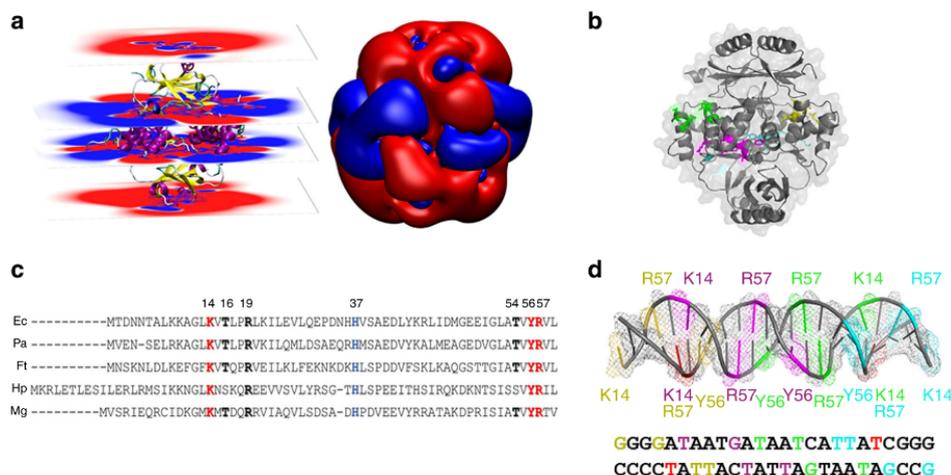


Fig. 7 DNA-driven FtFur tetramer dissociation mechanism. **a** Electrostatic potential around FtFur calculated on parallel planes (left) and on equipotential surfaces at -0.1 (red) and 0.1 V (blue) (right). **b** Mn-FtFur structure with its solvent accessibility surface. The residues predicted to be involved in the DNA interaction are coloured. **c** Sequence alignment of the DNA-binding domains of five Fur proteins with known structure EcFur (DNA-binding domain X-ray structures only)⁵⁶; PaFur²⁷; FtFur (this work); HpFur (*Helicobacter pylori*)²² and MgFur²⁹. The highly conserved amino acids implicated, in site S2 (blue) and in the interactions with DNA are in bold, coloured in red for those forming base-specific interactions and black for those having interactions with the phosphates (as evidenced in the structure of MgFur in complex with DNA). **d** Sketch of the DNA FurBox double-strand highlighting interactions with four Fur subunits (forming two dimers). Each of them is shown in a specific colour: yellow, purple, green and cyan, corresponding to the residues shown in **b**. Interactions between DNA bases and Fur residues are deduced from our results and the structures of the MgFur-DNA complex (T highlighted in red interact with two subunits)

Glu63. Mutations of Glu63 and/or Glu76 to Ala confirmed the importance of these residues in the stability of the tetramer since dimeric forms were obtained, partially for the single mutant and completely for the double mutants at high salt concentrations (Supplementary Fig. 5A, B). Both single mutants were still able to bind DNA in the presence of metal ions contrarily to the double mutant. Moreover, the Arg57–Glu63 salt bridge disruption should leave room to interactions of the crucial Tyr56 with DNA.

Fur is involved in *F. tularensis* virulence and pathogenicity.

The critical role of Fur in pathogenicity and virulence of several pathogens is known^{16,33}. To investigate the putative role of FtFur as a virulence factor we compared the phenotypes of CHUGA-Ft6 and CHUGA-Ft6 Δfur using *in vitro* or *in vivo* infection models. Three types of experiments were conducted: bacterial multiplication in J774-A1 murine macrophage-like cells, H₂O₂ sensitivity assay and *in vivo* virulence assays in mice.

A growth defect of the CHUGA-Ft6 mutant lacking *fur* in liquid medium was evidenced as shown by a longer lag time, a longer generation time and a lower optical density at the stationary phase as compared to the WT parental strain (Supplementary Fig. 1B). A similar phenotype was observed on solid medium with a delayed onset of visible colonies and a smaller size of colonies for CHUGA-Ft6 Δfur (Supplementary Fig. 1C). The ability of CHUGA-Ft6, CHUGA-Ft6 Δfur and CHUGA-Ft6 Δfur + *fur* to replicate within macrophages was then evaluated by infecting J774-A1 murine macrophage-like cells. One hour after infection, the host cells contained the same number of intracellular bacteria regardless of the infecting strain meaning that Fur is not required for macrophage infection. After 24 h incubation (Fig. 8a), the number of intracellular bacteria was markedly different as the WT cells were eight-fold more abundant compared to the CHUGA-Ft6 Δfur . The *fur*-complemented strain showed an intermediate level of intracellular macrophage multiplication. The ability of these bacterial strains to resist an oxidative stress corresponding to the respiratory burst

set up by infected macrophages was also checked by growing bacteria previously exposed to 1 mM H₂O₂ during 4 h (Fig. 8b). CHUGA-Ft6 and CHUGA-Ft6 Δfur + *fur* displayed a similar percentage of survival while Ft6 Δfur was much more sensitive to the oxidative stress with about 50% of surviving cells.

The involvement of *fur* in the infectious process *in vivo* was then evaluated by using mice infected with *F. tularensis* by intranasal (IN) or intraperitoneal (IP) administration (Fig. 8c, d). The survival curves of the animals showed that regardless of the administration route, CHUGA-Ft6 and CHUGA-Ft6 Δfur + *fur* caused the mice death in approximately the same delay, which is 95 h post-infection for IP and 150 to 168 h for IN inoculation. On the other hand, mice infected with CHUGA-Ft6 Δfur survived a significantly longer time ($p < 0.001$ compared to CHUGA-Ft6 and CHUGA-Ft6 Δfur + *fur* whatever the route of infection), that is, 140 h and more than 200 h for the last animal infected by IP and by IN routes, respectively. These results define *fur* as an important virulence-associated gene in *F. tularensis* and are a further example that deletion of this gene leads to an attenuated phenotype in terms of virulence.

Discussion

Altogether, the involvement of Fur in the iron homeostasis and the virulence of *F. tularensis* have been demonstrated here as well as its direct interaction with the *figA* promoter region. FtFur belongs to the new family of tetrameric Fur proteins. It contains the structural zinc site S1 and the regulatory site S2 and lacks the third site S3, usually found in Fur proteins. S1 is not present in tetrameric PaFur and S3 is absent in FtFur, which still forms a tetramer upon deletion of S2, indicating that the tetrameric state of the protein does not rely on such sites. To our knowledge, the first published structure of FtFur containing the physiologically relevant ferrous iron is presented here with a ferrous ion in an octahedral geometry. Metalled FtFur behaves as a pre-activated tetramer with the DNA-binding domains forming a positively charged crown where the recognition

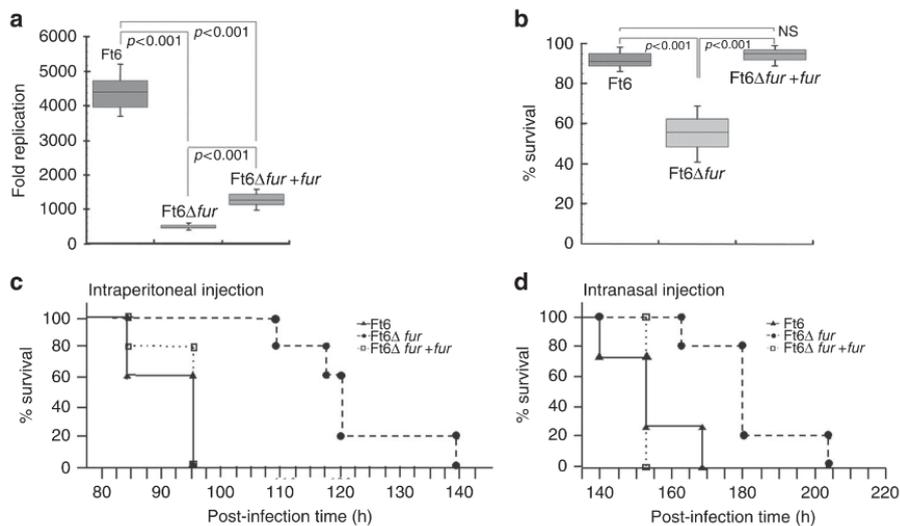


Fig. 8 Fur is directly involved in *F. tularensis* virulence and pathogenicity. **a** Bacterial multiplication in J774-A1 murine macrophage-like cells. The data correspond to two independent experiments made in triplicate. P values were calculated using the Student's t test. **b** Hydrogen peroxide sensitivity assay expressed as the percent survival of each strain exposed 4 h to 1 mM H_2O_2 . Bacterial suspensions were incubated 4 h with 1 mM H_2O_2 before enumeration on the CFU onto chocolate agar plates. Data are expressed as mean \pm SEM of three distinct experiments. The data correspond to two independent experiments made in triplicate. P values were calculated using the Student's t test. **c, d** In vivo virulence assay in mice inoculated IP with 5×10^2 CFU in 500 μ L of physiological serum or IN with 2×10^3 CFU in 50 μ L of physiological serum. Five mice were used for each condition and experiments were performed twice. Survival curves were compared using the Kaplan-Meier test. P values were < 0.001 for CHUGA-Ft6 and CHUGA-Ft6 Δ fur + fur vs. CHUGA-Ft6 Δ fur, for both the IP and IN routes. No significant difference was found between CHUGA-Ft6 and CHUGA-Ft6 Δ fur + fur

helices interact through two stabilizing salt bridges between two Arg57 (out of four) and two Glu63. The tetramer dissociation is driven by an interaction of the protein with a specific DNA sequence, suggesting the involvement of the two free Arg57 and Lys14, known to form base-specific contacts with DNA. We postulate that the two H-bound Arg57 would progressively lose their interaction with Glu63 replaced by interactions with DNA, leading to the breaking of the salt bridge, crucial for the stability of the tetramer and its dissociation into two dimers specifically bound to the FurBox. In vivo studies reveal that FtFur is important for the virulence of *F. tularensis*. Because there is no efficient vaccine and only few poorly efficient antibiotics available to fight tularaemia, this work shows that Fur is an attractive anti-virulence target for new inhibitors, whose design, starting from already known inhibitors against other Fur proteins³⁴, will be facilitated by the detailed structure and mechanism of interaction with DNA.

Methods

Bacterial strains and culture media. The biovar 1 strain of *F. tularensis* subsp. *holarctica* used in the virulence assay, referred as CHUGA-Ft6, was isolated at Verdun Hospital (France) from a blood sample collected during routine care of a patient with typhoidal tularaemia. Identification at the species and subspecies level was obtained by PCR amplification and sequencing of the intergenic region between the 16S rRNA and 23S rRNA encoding genes³⁵. Bacterial cultures were performed either on chocolate agar plates supplemented with Poly-Vitex (CPV, Biomérieux, Lyon, France) or in liquid brain heart infusion medium supplemented with 2% PolyViteX (BHI-2%PV). When necessary, kanamycin (10 μ g mL⁻¹) or sucrose (5% (w/v)) was added. Cultures were incubated at 37 °C, in a 5% CO₂-enriched atmosphere. Intracellular iron concentration was measured on stationary phase bacteria grown over 15 h in modified Mueller–Hinton medium into a shaking incubator (200 rpm at 37 °C). Briefly, the cells have been washed several times with phosphate-buffered saline-ethylenediaminetetraacetic acid (PBS-EDTA) 10 mM before hydrolysis with HNO₃ at 65% ON at 95 °C and measurements by ICP-AES (Shimadzu ICP 9000 instrument with Mini plasma Torch in axial reading mode²⁰).

Construction and complementation of the FT6 Δ fur mutant. A phase deletion of the *fur* gene was carried out in the CHUGA-Ft6 virulent isolate, by the method of allelic exchange (Supplementary Fig. 1), through the use of a suicide plasmid containing the *sacB* gene, pMP812³⁶. Approximately 1000 bp adjacent regions of the FT6 *fur* gene were amplified using the two primers LeftfurF-LeftfurR and RightfurF-RightfurR (Supplementary Table 4). The obtained PCR products were mixed and further submitted to a second PCR using the forward primer LeftfurF and the reverse primer RightfurR, generating a PCR fragment containing the two adjacent regions of *fur* flanked with the *Bam*HI and *Eco*RV restriction sites. This fragment was digested with the two corresponding restriction enzymes and cloned into the plasmid pMP812³⁶ previously digested with the same enzymes. After electroporation, several selection (kanamycin, then sucrose) steps were performed to obtain a delta *fur* mutant devoid of antibiotic resistance. In order to complement the strain FT6 Δ fur, the *fur* gene and its promoter region were amplified using CompfurL and CompfurR primers and cloned the shuttle vector pMP828. The plasmid pMP828 containing the *fur* gene was then electropored into CHUGA-Ft6 Δ fur and complemented colonies selected on agar plates supplemented with kanamycin. The *fur* expression in resulting transformants was checked using a specific qRT-PCR.

Evaluation of the gene expression by qRT-PCR. Gene expression was measured from strains grown for 16 h in BHI-2%PV. Approximately 10^7 cells were collected for total RNA extraction that was achieved using 1 mL TRIzol[®] reagent (Invitrogen) and following the manufacturer's instructions. Contaminating DNA was removed using the TURBO DNA-free[™] Kit (Ambion, Life Technology). The first-strand complementary DNA (cDNA) synthesis reaction was carried out starting from 500 ng of purified RNA and using the SuperScript[™] II Reverse Transcriptase Kit (Invitrogen, Life Technology). The resulting cDNA library was used as a template in combination with the specific primers for qRT-PCR, which was conducted using a Fast SYBR Green MasterMix in a StepOnePlus Real Time PCR Systems (Applied Biosystems). Cycling was 20 s at 95 °C; 3 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, repeated for 40 cycles. The expression level of each target gene was calculated from three independent experiments and expressed as a ratio taking the expression of the housekeeping gene 16S rRNA as the denominator. Primer sequences are indicated in Supplementary Table 5.

DNA sample preparation. DNA oligonucleotides were synthesized by MWG at high purity scale. DNA duplexes were first annealed in water at concentration of 20 mg mL⁻¹ by heating the mixture at 95 °C for 5 min and rapid cooling on ice in buffer A (50 mM Tris-HCl, pH 8.8, 150 mM NaCl) and then stored at 4 °C. The

formation and concentration of DNA duplexes were determined by SEC-MALLS-RI in binding buffer. DNA was used extemporarily for biochemical experiment.

Q4 Protein expression and purification

Apo-FtFurWT. Recombinant FtFur of *F. tularensis* FSC198 ref: NC-008245.1, 100% identical in sequence to the CHUGA-Ft6 protein, was purified as a tetramer containing one equivalent of Zn per subunit, as previously described²⁰. It was over-produced in BL21 DE3 R2 *E. coli* strain in Luria–Bertani (LB) medium after an overnight induction with 1 mM isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) at 18 °C. Cell were resuspended in buffer A, lysed by sonication and purified successively on several columns (GE Healthcare): (1) ion-exchange chromatography on DEAE Sepharose with linear gradient between buffer A and buffer A supplemented with 1 M NaCl, (2) hydrophobic interaction chromatography on Butyl fast flow Sepharose with linear gradient between buffer A containing 1 M of ammonium sulphate and buffer A and (3) size-exclusion chromatography Superdex-200 (10/60) equilibrated with buffer A.

Apo-FtFur mutants. E63A, E76A and E63A-E76A mutants were cloned in pET-TEV (based on pET28a) vector to produce N-terminal 6xHisTag cleavable TEV fusion proteins. PCR was done in the presence of appropriate primer with Phusion polymerase-HF at recommended T_m . PCR samples were incubated with a reaction buffer containing 2 UI of *DpnI*, 10 UI of T4 DNA ligase, 1 mM of ATP and 2 UI polynucleotide kinase (PNK) in PNK buffer from NEB for 15 min at room temperature (RT) before transformation in Top10 ultracompetent cells. Each mutant has been DNA-sequenced before expression and purification as described. H33A-H90A double mutant (FtFur Δ S2) was obtained from pET30b-FtFurWT before cloning in pET-TEV, over-produced and purified like FtFurWT. The other mutants were over-produced in in BL21 (DE3) R2 *E. coli* strain LB medium after induction with 1 mM IPTG at 37 °C for 4 h. Purification was done by using Ni-NTA resin (Qiagen) in batch mode in buffer A with 10 mM imidazole and 10% glycerol. Pure protein fractions were pooled and mixed with homemade HisTag-TEV protease (1% of the protein concentration to purify) together with 1 mM dithiothreitol (DTT) and 1 mM EDTA. The solution was then dialysed using a 3 kDa cut-off membrane against 2 L buffer A containing 1 mM DTT and 1 mM EDTA at 4 °C overnight, followed by a second 2 L dialysis against buffer A to remove DTT and EDTA. The protein sample was then passed through the Ni-NTA column in order to separate the pure protein from the HisTag-TEV protein and the HisTag itself. A final step of purification was performed by using Superdex-200 in buffer A supplemented with 500 mM NaCl at 4 °C. Collected fractions were concentrated on a 50 kDa cut-off Vivaspinn from 20 to 40 mg mL⁻¹ and used or frozen in liquid nitrogen in the presence of 10% of glycerol before storage at –80 °C.

Purification of the Mn-FtFur/Fur Box complex. The purification was done in buffer B (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂) at 20 °C. Molar equivalents (1.2) of FurBox Duplex (see DNA sample preparation) were incubated with Mn-FtFur before loading on a Superdex-200 increase 10/30 GE Healthcare column equilibrated with buffer B. Pooled fractions were analysed in SEC-MALLS-RI in the same buffer to check the integrity of the complex.

EMSA and nuclease activity assay. EMSA experiments were performed as previously described²⁰. The formation of small-scale (under 1 μ g) DNA duplexes was confirmed by native gel electrophoresis²⁰ on 10% acrylamide gel in 1x TAE buffer (40 mM Tris-acetate, pH 8.2, 1 mM EDTA). DNA radiolabelling was performed by incubating 20 nM DNA for 30 min at 37 °C in the presence of 1 U of T4 polynucleotide kinase (NEB) and 1 μ L of γ -ATP at 1 mCi mmol⁻¹. Labelled DNA was diluted 10 times in buffer A, desalted on G25 Mini Spin Column and stored at –20 °C. EMSA were performed with 250 pM of freshly prepared radiolabelled DNA incubated 30 min at 25 °C with different concentrations of protein in a binding buffer (20 mM Bis-Tris propane, pH 8.5, 100 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 μ M MnCl₂, 5% (v/v) glycerol and 0.01% Triton X-100). After 30 min incubation at room temperature, 10 μ L of each sample were loaded on 10% polyacrylamide (29/1) gel. The gel was pre-run for 30 min at 100 V in TA buffer (40 mM Tris-acetate, pH 8.2) supplemented with 100 μ M of MnCl₂. Mobility shifts were revealed by exposing the gels on a storage phosphor screen (GE Healthcare) and quantified with a cyclone phosphorimager (Perkin Elmer). The nuclease activity assay was performed as previously described²⁰.

SEC-MALLS-RI experiments. Each sample was checked by size-exclusion chromatography coupled to multi-angle laser light scattering with online refractive index (SEC-MALLS-RI) as previously described²⁰ and using a standard procedure: 20 μ L of sample with a 2 to 10 mg mL⁻¹ concentration were loaded on an analytical Superdex-S200 increase pre-equilibrated at 0.5 mL min⁻¹ with appropriate buffer (Apo-FtFur in buffer A, Mn-FtFur and Mn-FtFur/FurBox in 50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM MgCl₂) and connected to an in-line DAWN HELEOS II spectrometer (Wyatt Instruments). An in-line refractive index detector (Optrex, Wyatt Instruments) was used to follow the differential refractive index relative to the solvent. After baseline subtraction of the buffer solution, all samples presented a single peak allowing the determination of absolute molecular masses with the Debye model using ASTRA6 software (Wyatt Instruments) and a

theoretical dn/dc value of 0.185 mL g⁻¹. The final values correspond to the average of three independent experiments.

Crystallization. Protein crystallization conditions were obtained by using crystallization screens (Hampton Research Grid ScreensTM and Qiagen protein crystallization suites) with the HTX Lab high-throughput robot screening (HTX Lab at EMBL-Grenoble). Diffracting crystals up to 8 Å were obtained in 50 mM MES, pH 5.6, 200 mM KCl, 5% (w/v) PEG 8000, 10 mM magnesium chloride hexahydrate. This crystallization condition was then manually optimized. Diffracting crystals up to 1.7 Å were obtained by 1 μ L of a 16 mg mL⁻¹ Mn-FtFur holoprotein solution with 1 μ L of 50 mM MES, pH 5.8, 20% (w/v) PEG 3350, 200 mM MgCl₂·6H₂O, 10 mM MnCl₂ reservoir solution, using the hanging drop vapour-diffusion method. Crystals of Fe-FtFur holoproteins were obtained in the same condition in the presence of 10 mM of (NH₄)₂Fe(SO₄)₂·6 H₂O under anaerobic condition in a glove box. Crystals appeared in a few days and were back-soaked three successive times in a mother liquor containing 50 mM MES, pH 5.8, 20% (w/v) PEG 3350, 200 mM MgCl₂·6H₂O, to remove the excess of free metal. All crystals were cryoprotected using a solution obtained by adding 25% (v/v) glycerol to the mother liquor containing 25% (w/v) PEG 3350 and flash-cooled in liquid nitrogen.

X-ray diffraction and structure resolution of Mn-FtFur and Fe-FtFur. Diffraction experiments were done on the beamline FIP-BM30-ESRF (European Synchrotron Radiation Facility, Grenoble, France).

For Mn-FtFur, a fluorescence spectrum was recorded to check the presence of Mn at 1.77 Å (right side of maximum F_d for manganese) and Zn at 0.97 Å cations (Supplementary Fig. 3A). A remote and an anomalous datasets were recorded at wavelengths 0.97 and 1.77 Å (right side of maximum F'' for manganese). Best dataset (0.97 Å) diffracted at 1.7 Å resolution. Diffraction data were integrated/scaled in the space group P2₁ using XDS Program Package version 15 October 2015³⁷. The structure was solved by the SAD method using Phenix 1.10.1-2155/AutoSol³⁸ and 86% of the model was built automatically. The model was rebuilt/corrected manually and refined using alternatively COOT³⁹ and REFMAC^{40,41}. Final refinement cycle was done in Phenix (Supplementary Table 1 and Supplementary Fig. 3B).

For Holo-Fe-FtFur, a fluorescence spectrum was recorded to check the presence of cations: Fe and Zn at 0.97 Å (Supplementary Fig. 3A). The datasets were collected at wavelengths 0.97 Å with a resolution of 1.8 Å, integrated/scale by XDS Program Package in the space group P2₁.

The structure was solved by molecular replacement using MOLREP⁴² with the previous structure (Mn-FtFur) as the starting model. Indeed, we were not able to obtain a Fe-FtFur structure in the same conditions using iron Mohr salt in place of manganese even in a glove box. When trying to obtain the crystal from SEC-purified Mn-FtFur–DNA complex, only the same Mn-FtFur crystals were seen, but adding iron in the crystallization conditions, we were able to get crystals of Fe-FtFur diffracting at 1.8 Å and to solve the structure by molecular replacement with Mn-FtFur. The anomalous dataset was used to confirm the presence of Fe in the structure. The model was built and refined using REFMAC and COOT alternatively (Supplementary Table 2 and Supplementary Fig. 3B).

Both Holo-Mn-FtFur and Holo-Fe-FtFur final structures were validated by molprobity⁴³. Protein Data Bank (PDB) redo⁴⁴ was used before deposition of the structures to the PDB. The PDB codes are 5NBC for Holo-Mn-FtFur and 5NHK for Holo-Fe-FtFur. King was also used to cross-validate the data.

SAXS experiments. Before each experiment, all samples were extemporaneously re-purified on SEC Superdex-200 increase (GE Healthcare) 10/300 equilibrated in an appropriate buffer. SAXS data were collected at the ESRF (Grenoble, France) on beamline BM29 BioSAXS. The scattering profiles were measured at several concentrations between 0.5 to more than 10 mg mL⁻¹. Data were processed using standard procedures with the ATSAS v2.5.1 suite of programs⁴⁵ as described²⁰. The ab initio determination of the molecular shape of the proteins was done as previously described²⁰. Briefly, radius of gyration (R_g), forward intensity at zero angle ($I(0)$), Porod volumes and Kratky plot were determined using the Guinier approximation and PRIMUS programs⁴⁶. In order to build ab initio models, several independent DAMMIF³² models were calculated in slow mode with pseudo-chain option and analysed using the program DAMAVER⁴⁷. Docking of the tetrameric X-ray structure into the measured SAXS envelope was generated by SUPCOMB⁴⁸. The model of the Mn-FtFur/FurBox complex was built from the Mn-MgFur/FurBox structure (PDB code 4RB1): after sequence alignment, the atom coordinates of the corresponding amino acids were directly copied from MgFur to FtFur and coordinates of missing side chain atoms were added from internal coordinates. The resulting model was energy minimized with CHARMM⁴⁹. The program CRYSOLO³² was used to generate the theoretical scattering curves from the tetrameric structure of FtFur.

Cross-linking experiments. Cross-linking experiments between FtFur and Fur boxes were performed using 0.1% GTA. With a short spacer arm of approx: 5 Å, and when used at a low concentration, this cross-linker agent is well suited for intramolecular cross-linking and to specifically cross-link individual species in close interactions. Two micrograms of Mn-FtFur were used in each tube, fresh

GTA was used at 0.1% and 25–50 and 100 ng of DNA oligonucleotides duplex was added sequentially. Incubation buffer are done with 1 mM of fresh MnCl_2 at RT before being cross-linked by GTA 30 min at RT and loaded onto sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis 4–20% acrylamide gradient.

Construction of the models. The X-ray structure of FtFur solved in this study (Asp7 to Arg137) was used as the initial model for the tetramer. The GROMACS program version 5.1.2⁵⁰ with the gromos4a7 united atom force field⁵¹ was used to perform long molecular dynamics simulations needed to compute free energy profiles. Fe^{2+} and Zn^{2+} were modelled as simple Lennard Jones hard spheres with charge +2 with Zn coordinated to charged deprotonated cysteines (see for details Supplementary Methods).

In the absence of FtFur + DNA structure (FtFur/wtDNA), the structure of *M. gryphiswaldense* (4RB1)²⁹ in the presence of DNA was used to model the wtDNA FurBox and correctly position FtFur dimer on wtDNA (by least-square fit matching of atom positions). The 5'-GCCGGATAATGATAATCATTATC-3' fragment (consensus FurBox in bold) and its complementary 3'-5' sequence was used to model double-stranded wtDNA.

The mutDNA (equivalent to FurBox_m) sequence GCCGGATACGTATAGTC CTGATC contains four mutations with respect to the FurBox (A9 to C, A15 to G, A18 to C and T20 to G) which were constructed by simple matching of corresponding heavy atoms in the WT DNA model and building of missing hydrogens. The three above vacuum systems were immersed in parallelpipedic SPC⁵² water boxes modelled with periodic boundary conditions after the addition of Na^+ and Cl^- counterions to ensure neutrality and a total ionic force of 0.1 mol L⁻¹. The solvated systems were energy minimized and equilibrated under NPT conditions at 310 K and 1 atm.

Computation of free energy profiles. Free energy profiles for the extraction (by translation along a fixed direction: Ox) of one FtFur dimer from the tetramer (dimer of dimers) and of FtFur from DNA were computed: the meticulous translation protocol is shown in Supplementary Fig. 6.

The simulations include a 'moving' subsystem (FtFur dimer, chains A and D) and a 'fixed' subsystem (FtFur dimer, chains B and C, wtDNA or mutDNA) as shown in Supplementary Fig. 7.

The profiles were built using the 'umbrella sampling' technique and result from the overlapping of 26 computation windows, one for each translation distance.

Each window consisted of 100 ps NPT equilibration and 10 to 15 ns NPT production simulations. Position restraints on the 'fixed' subsystem and distance restraints on the whole protein, in the form of NOE-type restraints between H-bonded H and O atoms to maintain its secondary structure, were applied. The 'moving' subsystem was subject to two harmonic biasing forces along the X direction only ('umbrella potential') applied between the centres of mass of the 2 Fur dimer subunits and the centre of mass of the 'fixed' subsystem.

After the dynamics runs, positions and forces were collected from the trajectories and the umbrella sampling harmonic potential was unbiased using the Wham algorithm⁵³ implemented in the g_wham program⁵⁴ to yield the free energy profiles.

Computation of average interaction energy profiles. Interaction energy profiles were computed by extracting nonbonded interactions (electrostatic + Lennard Jones potential energies) from all the trajectories of the simulations and averaging for each window. Interaction energies were calculated between each residue in the Fur 'moving' dimer (chains A and D) and the 'fixed' subsystem (DNA or 'fixed' FtFur dimer).

H₂O₂ sensitivity assay. Three independent overnight cultures of each strain (CHUGA-Ft6, CHUGA-Ft6 Δ fur and CHUGA-Ft6 Δ fur + fur) in BHI-2%PV medium were diluted in PBS to obtain 1 × 10⁷ colony-forming unit (CFU) mL⁻¹ inocula. These bacterial suspensions were incubated 4 h with 1 mM H₂O₂ at room temperature without shaking. Culture samples taken before and after H₂O₂ exposure were serially diluted and spread onto CPV plates and incubated for 3 days at 37 °C. Counting of CFUs allowed to determine the percentage of surviving bacteria after H₂O₂ exposure. Data were expressed as the mean of three independent experiments.

In vitro macrophage infection. J774-A1 murine macrophage-like cells were grown in 24-well microplate using Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) medium supplemented with 10% decomplemented fetal calf serum (FCS, Gibco) at 37 °C in 5% CO₂ enriched atmosphere. For infections assays, confluent J774-A1 monolayers were infected with a bacterium inoculum at a multiplicity of infection of 10:1 (approximately 5 × 10⁶ bacteria for 5 × 10⁵ cells), and reincubated for 1 h (37 °C, 5% CO₂). The cell monolayers were then washed with PBS (Gibco), and DMEM-10% FCS containing 5 µg mL⁻¹ of gentamycin was added for 1 h to kill non-phagocytized bacteria. The cell supernatant was then replaced with MEM-10% FCS, and cell cultures were incubated for 24 h (37 °C, 5% CO₂). To evaluate bacterial multiplication within J774-A1 macrophages, infected cell monolayers treated with 0.1 % saponin immediately after gentamycin treatment (T0) or after 24 h incubation (T24) were lysed and serially diluted in PBS and plated onto chocolate

agar plates enriched with PolyVitek for CFU numeration. Each point was performed in triplicate. Data obtained were compared using Student's *t* test and *P* values <0.05 were considered statistically significant.

In vivo virulence assay. Six-week- to eight-week-old BALB/c males were infected with overnight cultures of the strains CHUGA-Ft6, CHUGA-Ft6 Δ fur and CHUGA-Ft6 Δ fur + fur diluted in 0.9% NaCl. Experiments were performed in an animal biosafety level 3 laboratory. For each bacterial strain, groups of five mice were inoculated either intraperitoneally (500 CFUs in 500 µL) or intranasally (2000 CFUs in 50 µL) and infected animals were monitored several times a day, weighed every day, and euthanized when they had reached one of the following limit point: prostration, high piloerection, weight loss >15% of T0 weight and closed eyes. A group of uninfected mice was used as control. All murine experiments were approved by our local ethics committee (ComEth, Grenoble, France). During the experiments, mice were monitored several times a day, weighed every day and euthanized when we felt they had reached our estimated limit point (prostrate, high piloerection, weight loss >15% of T0 weight and eyes closed). All these experiments were performed in compliance with the laws and regulations regarding animal experimentation in France.

Data availability. The datasets generated during the current study are available from the corresponding authors on reasonable request. Coordinates and structure factors for Mn-FtFur and Fe-FtFur have been deposited in the RCSB Protein Data Bank under accession codes 5NBC and 5NHK, respectively.

Received: 9 January 2018 Accepted: 14 June 2018.

Published online: xx xxx 2018

References

- Maurin, M. & Gyuranecz, M. Tularemia: clinical aspects in Europe. *Lancet Infect. Dis.* **16**, 113–124 (2016).
- Meibom, K. L. & Charbit, A. The unraveling panoply of *Francisella tularensis* virulence attributes. *Curr. Opin. Microbiol.* **13**, 11–17 (2010).
- Conlan, J. W., Chen, W., Shen, H., Webb, A. & KuoLee, R. Experimental tularemia in mice challenged by aerosol or intradermally with virulent strains of *Francisella tularensis*: bacteriologic and histopathologic studies. *Microb. Pathog.* **34**, 239–248 (2003).
- Maurin, M. *Francisella tularensis* as a potential agent of bioterrorism? *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **13**, 141–144 (2015).
- Oyston, P. C., Sjostedt, A. & Titball, R. W. Tularemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**, 967–978 (2004).
- Perez, N. M. & Ramakrishnan, G. The reduced genome of the *Francisella tularensis* live vaccine strain (LVS) encodes two iron acquisition systems essential for optimal growth and virulence. *PLoS ONE* **9**, e93558 (2014).
- Ramakrishnan, G., Sen, B. & Johnson, R. Paralogous outer membrane proteins mediate uptake of different forms of iron and synergistically govern virulence in *Francisella tularensis* tularensis. *J. Biol. Chem.* **287**, 25191–25202 (2012).
- Lindgren, H. et al. Iron content differs between *Francisella tularensis* subspecies tularensis and subspecies holarctica strains and correlates to their susceptibility to H(2)O(2)-induced killing. *Infect. Immun.* **79**, 1218–1224 (2011).
- Ramakrishnan, G., Meeker, A. & Dragulev, B. fslE is necessary for siderophore-mediated iron acquisition in *Francisella tularensis* Schu S4. *J. Bacteriol.* **190**, 5353–5361 (2008).
- Pan, X., Tamilselvam, B., Hansen, E. J. & Daefler, S. Modulation of iron homeostasis in macrophages by bacterial intracellular pathogens. *BMC Microbiol.* **10**, 64 (2010).
- Carrano, C. J. et al. Coordination chemistry of the carboxylate type siderophore rhizoferrin: the iron(III) complex and its metal analogs. *Inorg. Chem.* **35**, 6429–6436 (1996).
- Sullivan, J. T., Jeffery, E. F., Shannon, J. D. & Ramakrishnan, G. Characterization of the siderophore of *Francisella tularensis* and role of fslA in siderophore production. *J. Bacteriol.* **188**, 3785–3795 (2006).
- Wehrly, T. D. et al. Intracellular biology and virulence determinants of *Francisella tularensis* revealed by transcriptional profiling inside macrophages. *Cell Microbiol.* **11**, 1128–1150 (2009).
- Deng, K., Blick, R. J., Liu, W. & Hansen, E. J. Identification of *Francisella tularensis* genes affected by iron limitation. *Infect. Immun.* **74**, 4224–4236 (2006).
- Kiss, K., Liu, W., Huntley, J. F., Norgard, M. V. & Hansen, E. J. Characterization of fig operon mutants of *Francisella novicida* U112. *FEMS Microbiol. Lett.* **285**, 270–277 (2008).
- Fillat, M. F. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch. Biochem. Biophys.* **546**, 41–52 (2014).

17. Seo, S. W. et al. Deciphering Fur transcriptional regulatory network highlights its complex role beyond iron metabolism in *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* **5**, 4910 (2014).
18. Touati, D. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* **373**, 1–6 (2000).
19. Ughetto, E. et al. An original case of *Francisella tularensis* subsp. holarctica bacteremia after a near-drowning accident. *Infect. Dis. (Lond.)* **47**, 588–590 (2015).
20. Perard, J. et al. Quaternary structure of Fur proteins, a new subfamily of tetrameric proteins. *Biochemistry* **55**, 1503–1515 (2016).
21. Vitale, S. et al. A ZnS(4) structural zinc site in the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator. *Biochemistry* **48**, 5582–5591 (2009).
22. Dian, C. et al. The structure of the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator Fur reveals three functional metal binding sites. *Mol. Microbiol.* **79**, 1260–1275 (2011).
23. Watnick, P. I., Eto, T., Takahashi, H. & Calderwood, S. B. Purification of *Vibrio cholerae* fur and estimation of its intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Bacteriol.* **179**, 243–247 (1997).
24. Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D. & Storz, G. OxyR and SoxRS regulation of fur. *J. Bacteriol.* **181**, 4639–4643 (1999).
25. Mills, S. A. & Marletta, M. A. Metal binding characteristics and role of iron oxidation in the ferric uptake regulator from *Escherichia coli*. *Biochemistry* **44**, 13553–13559 (2005).
26. Krissinel, E. & Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797 (2007).
27. Pohl, E. et al. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.* **47**, 903–915 (2003).
28. Tiss, A., Barre, O., Michaud-Soret, I. & Forest, E. Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from *Escherichia coli* by UV cross-linking and mass spectrometry. *FEBS Lett.* **579**, 5454–5460 (2005).
29. Deng, Z. et al. Mechanistic insights into metal ion activation and operator recognition by the ferric uptake regulator. *Nat. Commun.* **6**, 7642 (2015).
30. Gilston, B. A. et al. Structural and mechanistic basis of zinc regulation across the *E. coli* Zur regulon. *PLoS Biol.* **12**, e1001987 (2014).
31. Stojilkovic, I., Baumler, A. J. & Hantke, K. Fur regulon in Gram-negative bacteria—identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur Titration Assay (Vol 236, Pg 531, 1994). *J. Mol. Biol.* **240**, 271–271 (1994).
32. Franke, D. & Svergun, D. I. DAMMIF, a program for rapid ab-initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **42**, 342–346 (2009).
33. Porcheron, G. & Dozois, C. M. Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Vet. Microbiol.* **179**, 2–14 (2015).
34. Mathieu, S. et al. From peptide aptamers to inhibitors of FUR, bacterial transcriptional regulator of iron homeostasis and virulence. *ACS Chem. Biol.* **11**, 2519–2528 (2016).
35. Maurin, M., Pelloux, I., Brion, J. P., Del Bano, J. N. & Picard, A. Human tularemia in France, 2006–2010. *Clin. Infect. Dis.* **53**, e133–e141 (2011).
36. LoVullo, E. D., Molins-Schneekloth, C. R., Schweizer, H. P. & Pavelka, M. S. Jr. Single-copy chromosomal integration systems for *Francisella tularensis*. *Microbiology* **155**, 1152–1163 (2009).
37. Kabsch, W. Xds. *Acta Crystallogr D* **66**, 125–132 (2010).
38. Adams, P. D. et al. PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D* **66**, 213–221 (2010).
39. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G. & Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D* **66**, 486–501 (2010).
40. Vagin, A. A. et al. REFMAC5 dictionary: organization of prior chemical knowledge and guidelines for its use. *Acta Crystallogr D* **60**, 2184–2195 (2004).
41. Winn, M. D. et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr D* **67**, 235–242 (2011).
42. Vagin, A. & Teplyakov, A. MOLREP: an automated program for molecular replacement. *J. Appl. Crystallogr.* **30**, 1022–1025 (1997).
43. Chen, V. B. et al. MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D* **66**, 12–21 (2010).
44. Joosten, R. P., Long, F., Murshudov, G. N. & Perrakis, A. The PDB_REDO server for macromolecular structure model optimization. *IUCr* **1**, 213–220 (2014).
45. Petoukhov, M. V. et al. New developments in the program package for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **45**, 342–350 (2012).
46. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J. & Svergun, D. I. PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 1277–1282 (2003).
47. Volkov, V. V. & Svergun, D. I. Uniqueness of ab initio shape determination in small-angle scattering. *J. Appl. Crystallogr.* **36**, 860–864 (2003).
48. Kozin, M. B. & Svergun, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. *J. Appl. Crystallogr.* **34**, 33–41 (2001).
49. Brooks, B. R. et al. CHARMM: a program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. *J. Comp. Chem.* **4**, 187–217 (1983).
50. Abraham, M. J. et al. GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX* **1**, 19–25 (2015).
51. Schmid, N. et al. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur. Biophys. J.* **40**, 843–856 (2011).
52. Berendsen, H. J. C., Postma, J. P. M., van Gunsteren, W. F. & Hermans, J. in *Interaction Models for Water in Relation to Protein Hydration* (ed. Pullman, i.B.) 331–342 (Reidel, Dordrecht, 1981).
53. Kumar, S., Rosenberg, J.M., Bouzida, D., Swendsen, R.H. & Kollman, P.A. The weighted histogram analysis method for free energy calculations on biomolecules. I. The method. *J. Comput. Chem.* **13**, 1011–1021 (1992).
54. Hub, J. S., de Groot, B. L. & van der Spoel, D. GROMACS g_wham: A free weighted histogram analysis implementation including robust error and autocorrelation estimates. *J. Chem. Theory Comput.* **6**, 3713 (2010).
55. R-Development-Core-Team. in *R: A Language and Environment for Statistical Computing* (ed. Computing, R.F.f.S) (R-Development-Core-Team, Vienna, Austria, 2008).
56. Pecqueur, L. et al. Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* **281**, 21286–21295 (2006).

Acknowledgements

We acknowledge the use of resources of INEXT 2217 and the support of members of the HTX Lab (EMBL, Grenoble, France). We also thank the European Synchrotron Radiation Facility for access to beamlines FIP BM30A and ID30A-1. This work was funded by the CEA, the Laboratory of Excellence GRAL (grant ANR-11-LABX-49-01) and the LabEx ARCANÉ (grant ANR-11-LABX-0003-01). S.N. was supported by the Region Rhône-Alpes (ARC santé).

Author contributions

J.P., S.C., M.M., P.R., J.C. and I.M.-S. designed research; J.P., S.N., C.C., P.C. and L.A. carried out the biochemical and structural experiments, J.P., P.C. and C.C. resolved the structures; M.L., C.S., D.S., F.B. and P.R. carried out the in vivo experiments, S.N. and S.C. did the theoretical work; J.P., J.C., M.M., S.C. and I.M.-S. analysed data; J.P., S.C., J.C. and I.M.-S. wrote the paper.

Additional information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s42003-018-0095-6>.

Competing interests: The authors declare no competing interests.

Reprints and permission information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



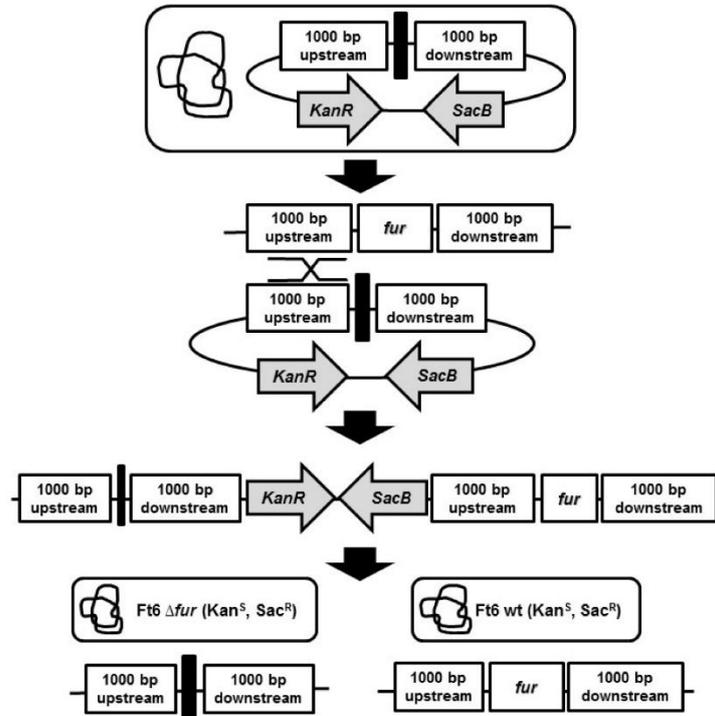
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018

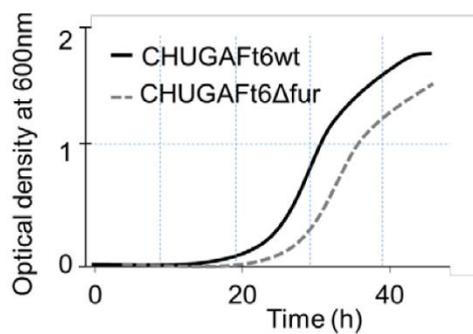
Supplementary information

Supplementary Figures

A



B



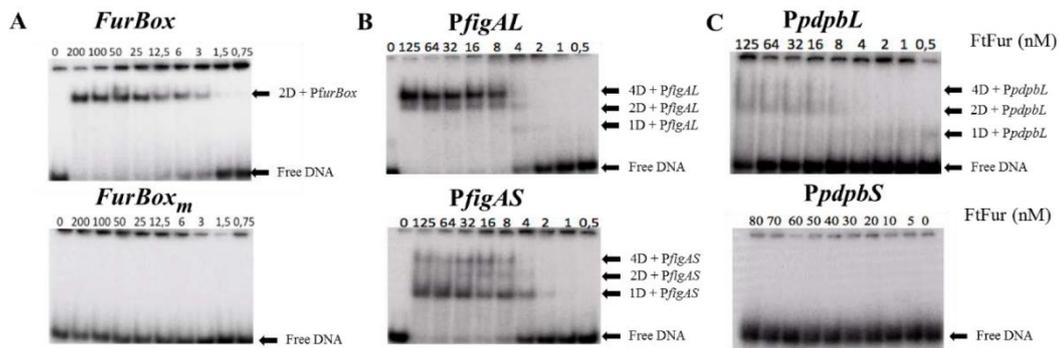
C



Supplementary Figure 1. Construction procedure of CHUGAFt6Δfur and growth comparison with CHUGAFt6wt.

Panel A. Schematic representation of allelic change procedure. **Panel B.** Growth curve comparison of CHUGAFt6wt and CHUGAFt6Δfur by monitoring the optical density at 600 nm as a function of time. **Panel C.** Colony morphology of CHUGAFt6wt and CHUGAFt6Δfur. Bacteria grown for 72 h on Chocolate-agar plates at 37°C with 5% CO₂ atmosphere.

1



D

Name	Sequence
<i>FurBox</i>	GGGATAATGATAATCATTATCGGG
<i>FurBoxM</i>	GGGATACTGATAGTCCTGATCGGG
<i>PfigAL</i>	GGGCTACATGATAATGATAACGAATATCATTATCGTTTATGGG
<i>PfigAS</i>	GGGATAATGATAACGAATATCATTATCGGG
<i>PpdpbL</i>	GGGCAAGTAAATGAAGATTGTGAGAATTCTTTTGGATAAATGATAAAAAAGGG
<i>PpdpbS</i>	GGGATTGTGAGAATTCTTTTGGG

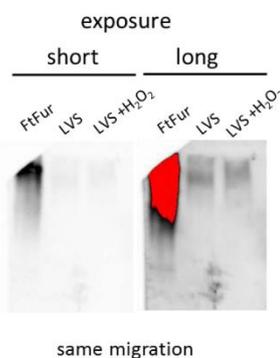
E

PdpbL CHUGA-Ft6
 5' GGGCAAGTAAATGAAGATTGTGAGAATTCTTTTGGATAAATGATAAAAAAGGG 3'
 G--AATGA--AT--T-A-- 10/19
 -AT-A-GAT--T-A-AT- 10/19
 GA--AT--T-A--ATT-T- 10/19
 GAT--TGA-AAT--TT-T- 12/19
 --T--TGATAA----TA-- 9/19

iglC Schu S4
 GGGGTACAAATAATAACTAAAGGG
 G-TA---ATAAT-A-TA-- 11/19

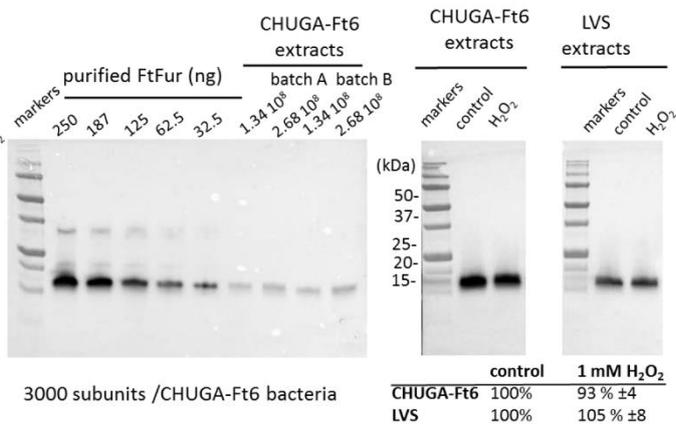
figA Schu S4
 5' ATACTTAAATAAACGATAATGATATTCGTTATCATTATCATGTAGGGATT 3'
 ---AA-GATAAT-AT--TC 12/19
 GATAATGATA-TC-TTATC 17/19
 GATA-T--T-ATCATTATC 15/19
 --T-AT-AT-ATCAT---- 10/19

F



same migration

G



Supplementary Figure 2. DNA binding experiment by EMSA of FurBox containing promoters identified in *Francisella tularensis* genome and Western blot assays.

Panel A. FurBox corresponding to consensus sequence and a mutated FurBox as control (FurBox_m) previously described⁴.

Panel B. PfigAL(long) and PfigAS (short) correspond to the genomic DNA sequence of CHUGA-Ft6 *Francisella tularensis*. The long version is already presented in Fig. 1 in the main text, the short version presents a different profile, with a major band corresponding to 1 dimer. DNA sequence analysis indicates the presence of 3 modifications compared to the FurBox, which could be important to the binding of FtFur on DNA.

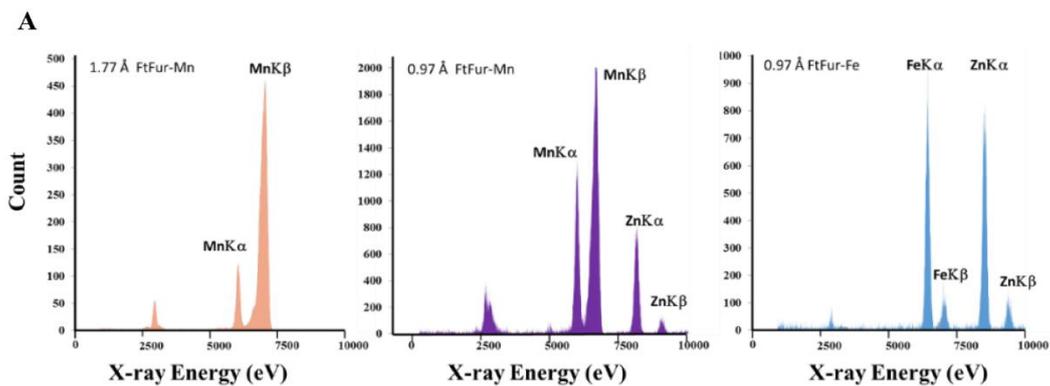
Panel C. Result obtained with PpdpbL and PpdpbS are presented and indicate the low affinity of FtFur for this box. DNA sequence analysis indicates the presence of 6 modifications in nucleotide sequence and validates the low affinity obtained with this promoter.

Panel D. Sequence of forward primer used for EMSA experiment. The nucleotides corresponding to the consensus FurBox are underlined.

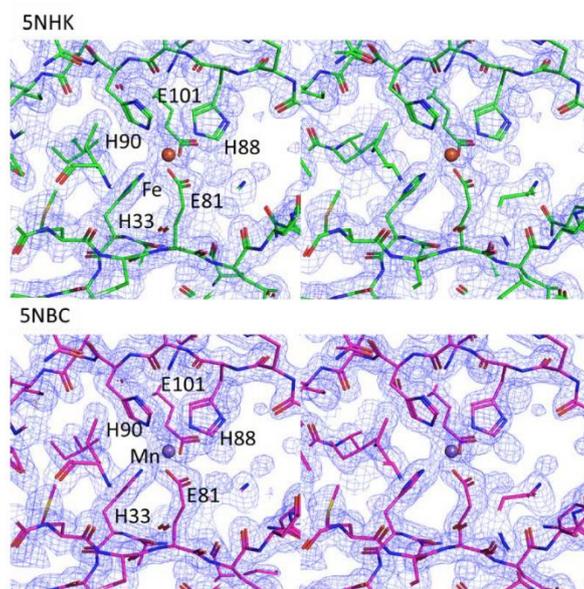
Panel E. promoters containing FurBox (with the homology with the consensus 19bp) are identified in *Francisella tularensis* genomes.

Panel F. Native Western blot on PAGE of *F. tularensis* live vaccine strain (LVS) extracts. For safety reasons, we are not allowed to manipulate the clinical CHUGA-Ft6 strain extracts outside the P3 laboratory without a previous denaturation step. We thus used LVS which contains an identical FtFur protein. Exponential growth phase bacteria were or not exposed for 4 h to 1 mM H₂O₂ at 37°C before lysis with BugBuster extraction reagent (Sigma). The recombinant purified FtFur (2.5 µg) and LVS extracts (10 µg) were loaded onto a 6% acrylamide gel and separated under non-denaturing conditions (100 V, 2 h). After transfer on nitrocellulose membrane, the samples were probed with anti-Ec Fur antibodies (1:15000) and Fur was detected with HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Jackson ImmunoResearch 1: 10000) and visualized by chemiluminescence with the Biorad ECL substrate and using the Biorad chemidoc MP imaging system.

Panel G. **Left** panel: Quantification of the Fur proteins by the signal analysis obtained starting from various amount of recombinant protein and bacteria and leading to an average estimation of 3000 Fur subunits per CHUGA-Ft6 bacteria. **Right** panel: Western blot of whole bacterial extracts of bacteria LVS and CHUGA-Ft6 grown in Modified Mueller Hinton medium supplemented with 0.0025 % ferric pyrophosphate and treated or not with H₂O₂ (1 mM for 4 h). Bacterial pellets resuspended in Laemmli buffer were separated by SDS-PAGE (14% acrylamide) and then processed as above.



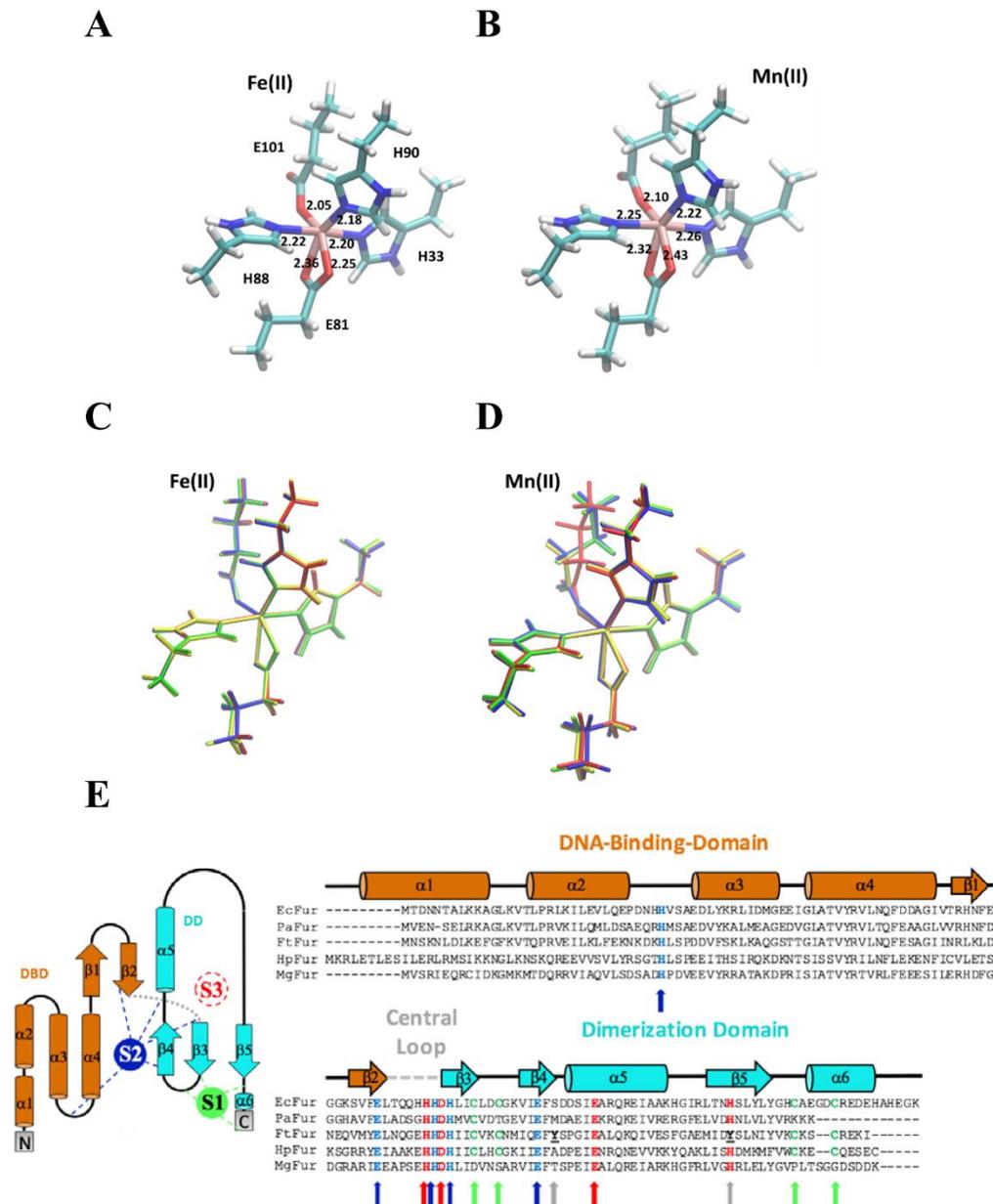
B



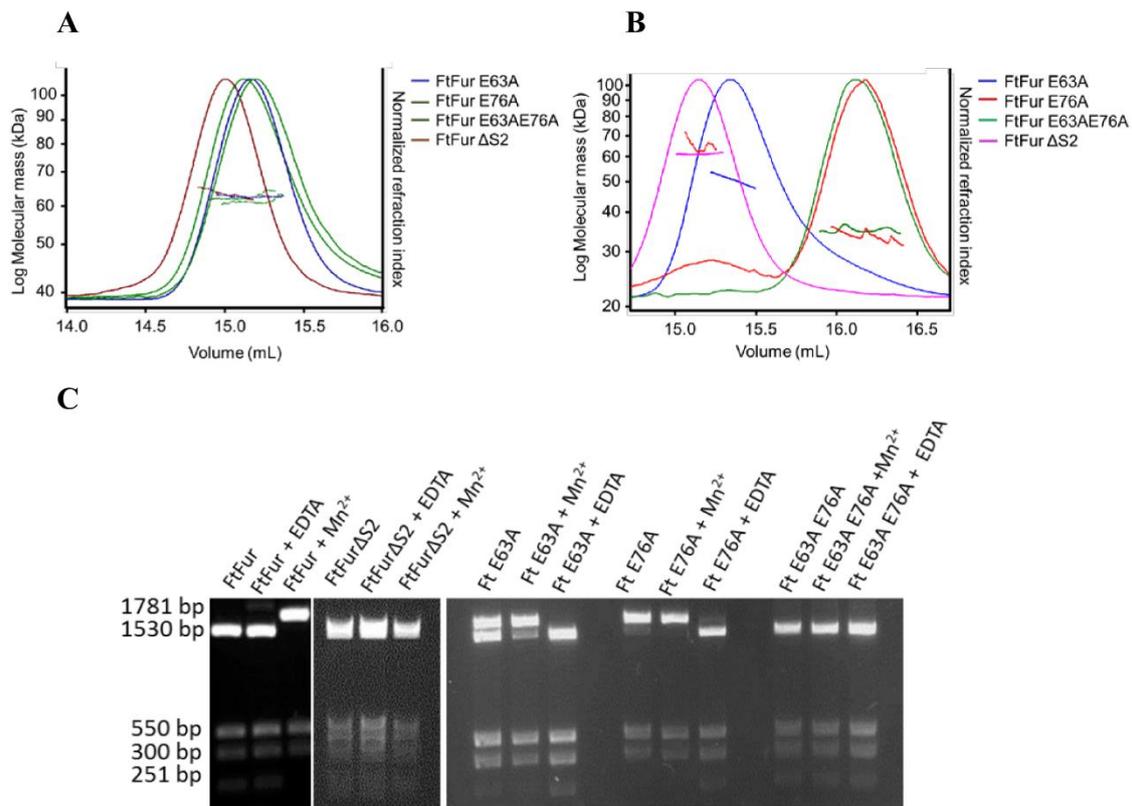
Supplementary Figure 3. Crystallographic data of FtFur structures and fluorescence spectra.

Panel A. Fluorescence spectra recorded at 1.77 Å and 0.97 Å to confirm the presence of Fe, Zn and Mn atom in protein crystals before X-ray diffraction.

Panel B. Stereo views of the Fe and Mn metal binding sites of the 5NHK and 5NBC structures, respectively. Stereo mode prepared with the Will Eye Stereo Program inside Pymol 2.1.0 (Sigma 1.5; Carve 2.0; mesh 0.1; Stereo shift -6; Stereo angle 2.1)



Supplementary Figure 4. Structures of metal binding sites and sequence alignments.
Panels A and B. FtFur Metal binding sites – DFT B3LYP Optimization under High spin for S2 sites filled with Fe(II) and Mn(II) respectively.
Panels C and D. Superimposition of DFT optimized structures of the metal sites in the 4 subunits, for S2 sites filled with Fe(II) and Mn(II) respectively.
Panel E. Sequence alignment of 5 Fur proteins of known structures and location of amino acids implicated in the S1 (Green), S2 (Blue) and S3 sites (red). Y103 and Y125 from FtFur are identified by grey arrows. Ec=*Escherichia coli* (DBD Xray structures only)⁵; Pa; *Pseudomonas aeruginosa*⁶; Ft; *Francisella tularensis* (this work); Hp; *Helicobacter pylori*⁷ and Mg; *Magnetospirillum gryphiswaldense*⁸.

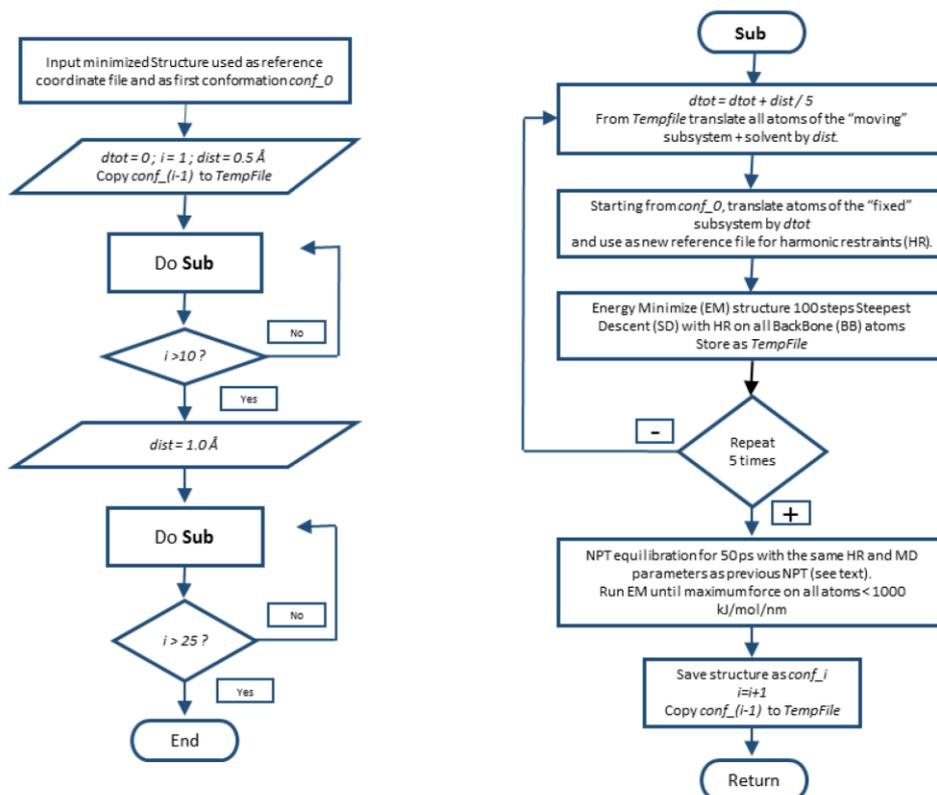


Supplementary Figure 5. Study of tetramer dissociation by SEC-MALLS-RI analysis on FtFur E63A, E76A and E63AE76A mutants and activity assays.

Panel A. SEC-MALLS analysis experiments are done in the presence of 150 mM NaCl, all constructs present the same MW (around 64 kDa) corresponding to a tetramer in solution.

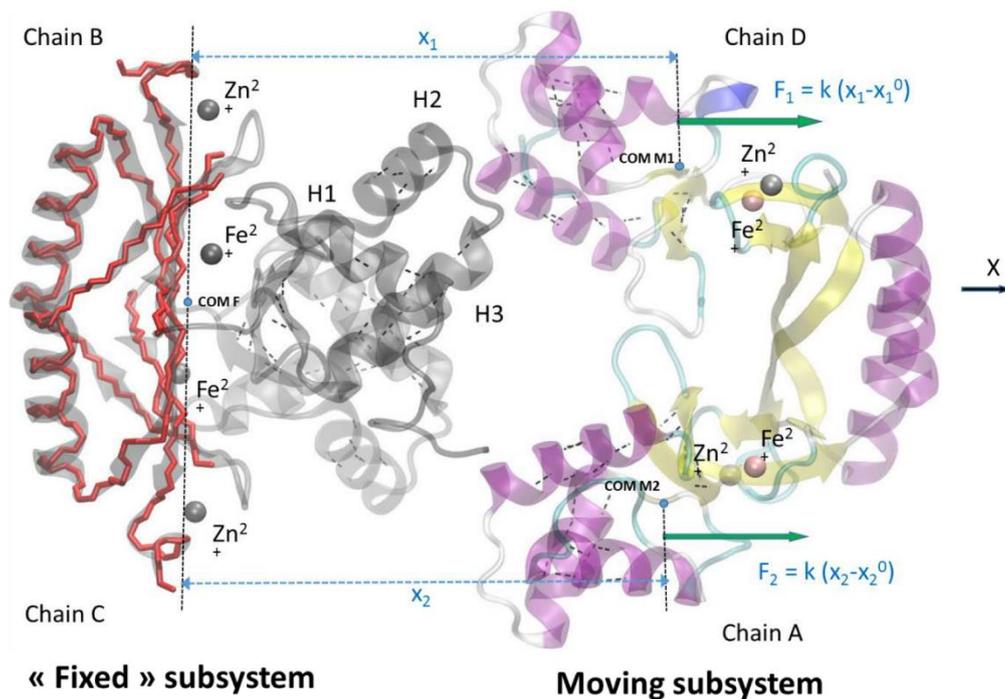
Panel B. SEC-MALLS analysis experiments are done in the presence of 500 mM NaCl. FtFur-WT presents a MW of 64 kDa corresponding to a tetramer in solution. E63A mutant shows a non-symmetric peak at 48 kDa MW corresponding to a mixture of tetramer and dimer. E76A present two peaks. The major peak corresponds to a MW of 32 kDa for a dimer in solution, the minor peak presents a MW of 64kDa corresponding to a tetramer. Finally, the double mutant E63AE76A presents one single symmetric peak at 32 kDa corresponding to a stable dimer in solution. This experiment has been repeated three times and validates the major role of these two amino acids in the stabilization of the tetramer.

Panel C. Nuclease assay on FtFur, FtFurΔS2, FtFurE63A, FtFurE76A, FtFurE63AE76A performed as previously described⁴. The FtFurΔS2 and the FtFurE63AE76A mutants were not able to bind DNA contrarily to the WT, FtFurE63A and FtFurE76A mutants, in the conditions of the assay.



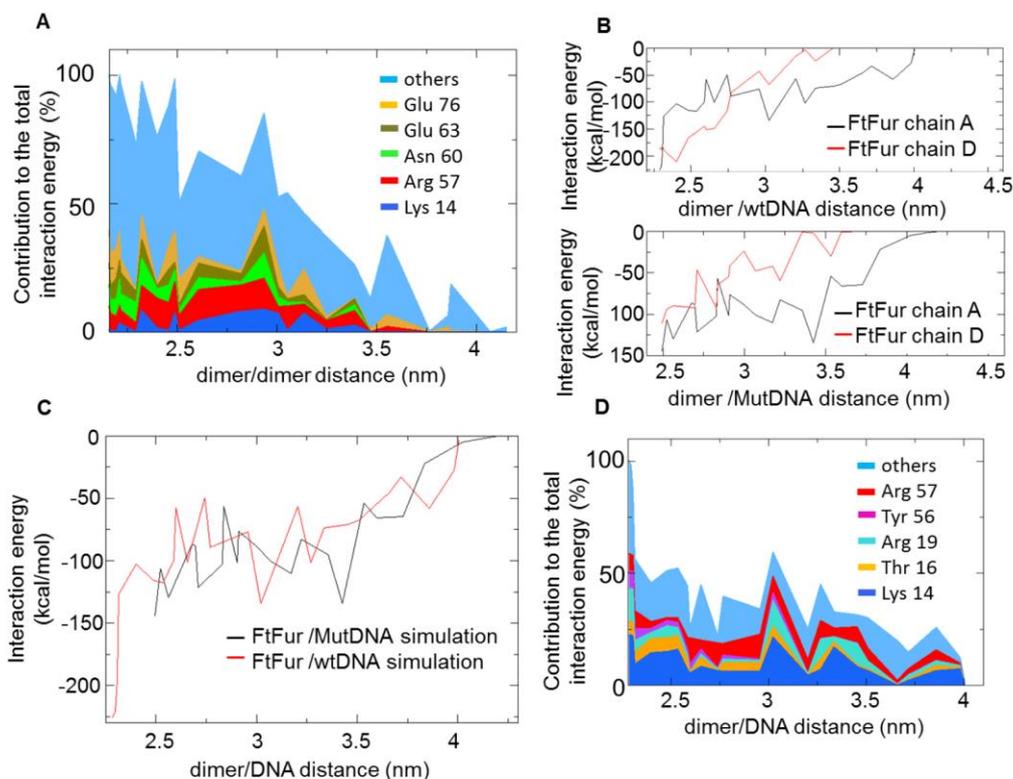
Supplementary Figure 6. Algorithm for the preparation of initial coordinates for the computation of free energy profiles.

The algorithm consists of a main subprogram doing the translations and pre-equilibrations, which is called twice: 1) 10 first windows corresponding to 0.5 Å translations followed by 2) 15 windows of 1 Å translations. Three variables are defined “dtot”, the total translation distance for the “moving” subsystem, “i”, the conformation counter and “dist”, the current translation distance in Å.



Supplementary Figure 7. Structure of the FtFur tetramer corresponding to the last conformation in the pulling process.

The moving subsystem (Chains A and D) has been translated ($10 \times 0.5 + 15 \times 1.0$) = 20 Å from the initial tetramer along the X direction. Centers of mass of the “fixed” subsystem and the two subunits of the moving Ft dimer are indicated. The moving subsystem is constituted of two Ft subunits: 1 and 2. Forces are applied on their centers of mass to pull them away or maintain them at a fixed distance of the “fixed” subsystem. Part of the backbone of the “fixed” system highlighted in red is subject to position restraints during the pulling process. Black dashed lines show hydrogen bonds in the secondary structures which are maintained using NOE type distance restraints. 8 metal cations are shown as spheres. Water and counter ions surrounding the system (in a $105.3 \times 80.3 \times 65.4$ Å³ periodic box) are not shown for clarity.



Supplementary Figure 8. Important residues in the interactions and their comparative energy contribution.

Panel A. The five major contributors to the interaction energy between chain A and the “fixed” dimer in the FtFur tetramer simulation. Same legend as in Fig. 2. On average, 5 residues contribute to around 30% of the total interaction energy (with a maximum of 56% at 2.93 nm). The maximum total interaction energy for all residues over all 26 windows is calculated first, then the contribution of each residue is normalized with respect to this maximum. The plot shows the corresponding percentage of the maximum interaction energy for selected residues. The blue surface corresponds to the sum of the contributions of all residues others than those selected.

Panel B. Up: Comparison of average interaction energies between Fur chains A and D and wtDNA during the translation of Fur away from DNA. Chain D loses its interaction with DNA faster than chain A. Down: Comparison of average interaction energies between Fur chains A and D and mutDNA during the translation of Fur away from DNA. Chain D loses its interaction with DNA very fast. (Averages were calculated over 15000 points).

Panel C. Comparison of average interaction energies between Fur chain A and DNA in the Fur/wtDNA and Fur/mutDNA simulations. Interaction energies between Fur chain A and wt or mut DNA are similar.

Panel D. The five major contributors to the average interaction energy between Fur chain A and DNA in the FtFur/wtDNA simulation. Same legend as in Fig. 2. On average, 5 residues contribute to 59% of the total interaction energy (with a maximum of 86% at 2.74 nm).

Supplementary Tables

Supplementary Table 1. Data collection, phasing and refinement statistics for the structure of Mn-FtFur.

		Mn-FtFur (5NBC)
Data collection		
Space group	P21	P21
Cell dimensions		
<i>a, b, c</i> (Å)	53.15, 89.93, 63.84	53.15, 90.0, 63.95
α, β, γ (°)	90.00, 93.59, 90.00	90.00, 93.48, 90.00
	<i>Peak</i>	<i>Remote</i>
Wavelength (Å)	1.7761	0.9797
Resolution (Å) ^a	50.0 - 2.1 (2.14 - 2.1)	50.0 - 1.7 (1.74 - 1.7)
R_{meas} ^{a, b}	17.6 (135.0)	8.9 (99.2)
$I/\sigma(I)$ ^a	10.2 (1.60)	11.6 (1.31)
$CC_{1/2}$ ^a	99.5 (57.8)	99.6 (64.4)
Completeness (%) ^a	99.3 (92.3)	99.7 (48.8)
Redundancy ^a	7.2 (6.4)	3.5 (2.4)
Refinement		
Resolution (Å)	N.A. ^c	42.1 - 1.7
No. reflections		64585
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$		21.7/24.4
No. atoms		
Protein		4138
Ligand/ion		8 (4 Zn atoms and 4 Mn atoms)
Water		402
<i>B</i> factors		
Protein (Å ²)		24.1
Ligand/ion (Å ²)		20.9
Water (Å ²)		31.3
R.m.s deviations (Å ²)		
Bond lengths (Å)		0.007
Bond angles (°)		0.88

^aValues in parentheses are for highest-resolution shell.

^b R_{meas} , redundancy-independent merging R-factor

^cStructure of Mn-FtFur has been solved by the MAD method using 1 crystal, and refined with the remote diffraction data only

Supplementary Table 2. Data collection and refinement statistics for the structure of Fe-FtFur.

	Fe-FtFur (PDB code 5NHK)
Data collection	
Space group	P21
Cell dimensions	
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	53.35, 90.04, 64.05
α , β , γ (°)	90.00, 93.53, 90.00
Resolution (Å) ^a	50.0 - 1.8 (1.9 - 1.8)
<i>R</i> _{meas} ^{a,b}	9.6 (75.2)
<i>I</i> / σ (<i>I</i>) ^a	10.8 (2.1)
<i>CC</i> _{1/2} ^a	99.6 (64.4)
Completeness (%) ^a	99.2 (99.6)
Redundancy ^a	3.0 (3.0)
Refinement	
Resolution (Å)	42.2 - 1.8
No. reflections	55477
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	20.4/24.3
No. atoms	
Protein	4237
Ligand/ion	8 (4 Zn atoms and 4 Fe atoms)
Water	507
B factors	
Protein (Å ²)	22.2
Ligand/ion (Å ²)	20.0
Water (Å ²)	29.4
R.m.s. deviations	
Bond lengths (Å)	0.008
Bond angles (°)	0.89

^aValues in parentheses are for highest-resolution shell.

^b*R*_{meas}, redundancy-independent merging R-factor

Supplementary Table 3. Comparison of metal-ligand distances between FtFur-Mn and FtFur-Fe. Distances are calculated from the X-ray structures with Coot 0.8.2

Mn-FtFur / Fe- FtFur				
Site 1				
	Zn in dimer 1		Zn in dimer 2	
	Chain A	Chain D	Chain B	Chain C
C93	2.30/2.31	2.36/2.37	2.33/2.34	2.35/2.35
C96	2.31/2.32	2.30/2.32	2.31/2.26	2.32/2.31
C133	2.33/2.30	2.32/2.30	2.36/2.31	2.28/2.29
C136	2.32/2.30	2.37/2.30	2.31/2.31	2.30/2.30
Site 2				
	Mn/Fe in dimer 1		Mn/Fe in dimer 2	
	Chain A	Chain D	Chain B	Chain C
H33 (N _ε 2)	2.31/2.26	2.26/2.26	2.29/2.27	2.28/2.26
E81(O _ε 1)	2.32/2.19	2.30/2.20	2.27/2.10	2.35/2.21
(O _ε 2)	2.32/2.31	2.34/2.34	2.30/2.25	2.29/2.31
H88 (N _ε 2)	2.31/2.29	2.36/2.26	2.31/2.30	2.32/2.27
H90 (N _ε 2)	2.23/2.22	2.26/2.21	2.30/2.26	2.31/2.24
E101 (O _ε 2)	2.35/2.03	2.20/2.00	2.32/2.11	2.16/1.97

Table S2
Proteins identified from the LVS and LVS Δ fupA/B OMVs

Gene ID	Protein name	Gene name	Razor + unique peptides	Mol weight kDa	Differential proteomic analysis		
					Significant	P Value	logFC
FTL_1931	hypoxanthine-guaninephosphoribosyltransferase		4	20,31	1	3,64E-06	7,95
FTL_1836	hypotheticalprotein		8	54,864	1	8,33E-06	7,67
FTL_1835	hypotheticalprotein		4	43,813	1	4,29E-05	4,75
FTL_0738	hypotheticalprotein		2	14,728	1	9,38E-03	3,88
FTL_1899	glutaminesynthetase		7	38,256	1	8,60E-03	3,81
FTL_0449	hypotheticalprotein		2	13,321	1	6,37E-03	3,48
FTL_0012	recombinaseA	recA	5	38,833	1	1,25E-03	3,39
FTL_1842	aspartyl/glutamyl-tRNAamidotransferasesubunitA	gatA	7	52,395	1	7,14E-04	3,30
FTL_1644	glycerolkinase		3	55,817	1	1,30E-03	3,20
FTL_1850	adenylosuccinatelase		8	49,437	1	2,84E-03	2,94
FTL_1832	hypotheticalprotein		8	74,144	1	9,14E-03	2,73
FRATH_1496	conservedexportedproteinofunknownfunction		1	8,0151	1	1,82E-03	2,72
FTL_0146	ABCtransporterATP-bindingprotein		8	49,453	1	1,01E-03	2,65
FTL_1365	hypotheticalprotein		1	16,484	1	4,51E-03	2,56
FTL_1045	lipoprotein		8	23,407	1	5,30E-03	2,37
FTL_0203	hypotheticalprotein		6	37,161	1	4,95E-03	2,29
FTL_1968	ribonucleaseG		1	57,522	1	4,30E-03	2,29
FTL_1724	lipoprotein		13	49,673	1	4,95E-03	2,20
FTL_1274	biotinsynthesisproteinBioC		4	28,691	1	3,06E-03	2,09
FTL_1407	threonyl-tRNA synthetase	thrS	8	72,381	1	5,34E-03	2,08
FTL_1025	30S ribosomal protein S18	rpsR	2	8,3787	1	5,05E-03	2,04
FTL_1591	Acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit		16	50,05	1	8,55E-03	2,02
FTL_0439	hypotheticalprotein		5	58,413	1	5,62E-05	-7,52

FTL_1157	intracellulargrowthlocus,subunitA		8	20,891	0	5,80E-01	0,67
FTL_1158	intracellulargrowthlocus,subunitB		26	57,917	0	2,83E-01	1,20
FTL_1159	intracellulargrowthlocus,subunitC		11	22,133	0	1,76E-01	1,07
FTL_1160	intracellulargrowthlocus,subunitD		10	46,401	0	1,36E-01	0,83
FTL_1161	hypotheticalprotein		8	22,184	0	6,46E-01	0,41
FTL_1162	hypotheticalprotein		6	155,91	0	2,73E-01	-1,20
FTL_1163	hypotheticalprotein		4	30,435	0	5,19E-02	1,70
FTL_1164	hypotheticalprotein		7	44,64	0	1,83E-01	1,65
FTL_1165	hypotheticalprotein		10	24,59	0	9,47E-01	-0,06
FTL_1166	hypotheticalprotein		12	55,362	0	5,24E-01	0,45
FTL_1170	hypotheticalprotein		10	14,468	0	2,56E-01	0,65
FTL_1171	hypotheticalprotein		39	127,54	0	2,20E-01	-1,31
FTL_1172	hypotheticalprotein		7	95,338	0	1,25E-01	1,24
FRATH_04 99	conservedexportedproteinofunknownfunction		1	6,3246	0	6,26E-02	1,88
FRATH_13 74	proteinofunknownfunction		1	5,9096	0	7,61E-02	2,24
FRATH_16 54	conservedexportedproteinofunknownfunction		1	7,2285	0	6,39E-01	0,50
FTL_0001	chromosomalreplicationinitiationprotein	dnaA	8	55,839	0	3,35E-02	1,65
FTL_0002	DNApolymeraseIIsubunitbeta		16	41,674	0	4,34E-01	0,65
FTL_0008	peptidase		9	34,1	0	9,24E-01	0,06
FTL_0009	outermembraneprotein		8	19,477	0	9,12E-01	-0,06
FTL_0010	thiosulfatesulfurtransferase		7	15,878	0	4,99E-01	0,40
FTL_0011	preproteintranslocasesubunitSecB		4	16,9	0	7,00E-01	0,44
FTL_0014	single-strandbindingprotein		5	17,523	0	2,78E-01	1,18
FTL_0015	propionatekinase		5	42,189	0	2,47E-01	1,33
FTL_0016	phosphateacetyltransferase		4	77,167	0	6,81E-02	1,25
FTL_0020	aspartyl-tRNAsynthetase	aspS	25	66,804	0	2,56E-01	1,38

FTL_0024	serinetransporter		4	45,842	0	9,65E-01	-0,02
FTL_0028	aspartatecarbamoyltransferase		9	35,097	0	1,12E-01	3,21
FTL_0029	carbamoylphosphatesynthaselargesubunit	carB	17	120,72	0	8,02E-01	-0,38
FTL_0030	carbamoylphosphatesynthasesmallsubunit		13	43,264	0	2,15E-01	1,81
FTL_0031	acidphosphatase		4	39,528	0	2,38E-01	1,60
FTL_0033	dihydroorotase		10	50,302	0	1,39E-01	2,56
FTL_0038	HlyDfamilysecretionprotein		8	37,238	0	9,55E-01	0,04
FTL_0039	hypotheticalprotein		7	15,326	0	4,70E-02	1,35
FTL_0043	chorismatemutase		3	20,873	0	8,67E-01	0,26
FTL_0045	orotidine5'-phosphatedecarboxylase		7	23,399	0	4,97E-01	0,73
FTL_0046	diyoorotatedehydrogenase		2	27,917	0	6,34E-01	-0,24
FTL_0059	16SrRNAmethyltransferaseGidB	gidB	4	23,559	0	3,93E-01	0,92
FTL_0067			4	18,968	0	1,80E-01	-0,97
FTL_0068	phosphoheptoseisomerase		2	21,034	0	5,51E-01	0,83
FTL_0069	outermembranelipoprotein		6	13,413	0	1,32E-01	1,04
FTL_0073	hypotheticalprotein		23	37,517	0	1,43E-01	0,82
FTL_0074	peptidedeformylase		3	19,578	0	6,61E-01	-0,45
FTL_0075	riboflavinsynthasebetasubunit(6,7-dimethyl-8-ribityllumazinesynthase)		5	16,294	0	7,26E-02	2,42
FTL_0076	riboflavinbiosynthesisproteinribA/GTP-cyclohydrolaselI		4	44,613	0	3,54E-01	0,83
FTL_0078	riboflavinbiosynthesisproteinribD		6	39,569	0	5,52E-01	0,56
FTL_0085	pH-dependentsodium/protonantiporter	nhaA	1	41,757	0	2,34E-01	0,87
FTL_0086	hypotheticalprotein		1	28,092	0	3,47E-01	0,86
FTL_0087	acetyltransferaseprotein		7	27,857	0	2,97E-01	0,62
FTL_0088	acetyltransferaseprotein		6	28,838	0	5,01E-01	0,42
FTL_0093	chitinase		10	78,976	0	1,24E-02	1,91
FTL_0094	ClpBprotein		29	96,046	0	9,28E-01	0,07
FTL_0098	tryptophansynthasesubunitalpha	trpA	10	29,077	0	1,37E-01	1,97
FTL_0100	carboxypeptidase,fragment		9	58,576	0	1,67E-01	2,10

FTL_0104	hypotheticalprotein		5	14,596	0	2,48E-01	0,64
FTL_0105	hypotheticalprotein		10	13,729	0	6,94E-01	0,22
FTL_0131	branched-chainaminoacidaminotransferase		5	33,163	0	5,55E-02	2,11
FTL_0132	pyruvatephosphatedikinase		3	97,652	0	2,94E-01	1,14
FTL_0133	ferrousirontransportprotein		11	81,459	0	3,83E-01	1,21
FTL_0137	lipopolysaccharideprotein		13	38,744	0	4,64E-01	-0,42
FTL_0139	carboxylesterase/phospholipasefamilyprotein		1	24,602	0	3,54E-01	1,24
FTL_0142	hypotheticalprotein		5	15,298	0	6,48E-02	1,26
FTL_0145	ABCtransportermembraneprotein		4	67,337	0	5,24E-01	0,37
FTL_0147	hypotheticalprotein		2	56,095	0	1,20E-01	1,35
FTL_0148	Sodium/hydrogenexchanger(antiporter)familyprotein		4	68,772	0	9,78E-01	0,02
FTL_0149	carbonicanhydrase		1	19,415	0	3,41E-01	0,70
FTL_0150	lipoproteinreleasingsystem,subunitB,outermembranelipoprotein		4	25,091	0	2,69E-01	0,64
FTL_0151	4-diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritolkinase	ipk	2	31,533	0	1,14E-01	-1,34
FTL_0157	hypotheticalprotein		11	25,388	0	1,72E-01	1,01
FTL_0166	universalstressprotein		8	30,22	0	1,32E-01	1,09
FTL_0169	hypotheticalprotein		3	21,671	0	8,25E-01	-0,12
FTL_0173	shikimate5-dehydrogenase		7	28,202	0	1,13E-01	2,05
FTL_0174	hypotheticalprotein		5	16,718	0	3,52E-01	0,47
FTL_0178	inner-membraneprotein		19	61,952	0	2,88E-01	0,66
FTL_0179	acyltransferase		4	35,16	0	2,31E-01	0,91
FTL_0180	acyltransferase		8	36,126	0	5,15E-01	-0,36
FTL_0182	elongationfactorP		2	20,902	0	3,72E-01	1,10
FTL_0187	cyclohexadienyldehydratase		10	27,938	0	5,12E-01	0,70
FTL_0189	cytochromedterminaloxidase,polypeptidesubunitI		17	64,275	0	9,93E-01	0,00
FTL_0190	majorfacilitatortransporter		3	50,527	0	3,37E-01	0,68
FTL_0191	cytochromeOubiquinoloxidasesubunitII		7	34,539	0	2,12E-01	0,76
FTL_0192	cytochromeOubiquinoloxidasesubunitI		12	76,199	0	8,75E-01	0,08

FTL_0194	cytochromeOubiquinoloxidasesubunitIV		1	12,186	0	7,59E-02	3,06
FTL_0195	protohemeIXfarnesyltransferase		1	31,543	0	4,70E-02	2,19
FTL_0199	hypotheticalprotein		4	15,64	0	2,60E-01	0,62
FTL_0200	methanoldehydrogenaseregulatoryprotein		5	35,558	0	8,17E-01	-0,14
FTL_0206	hypotheticalprotein		3	60,907	0	1,26E-01	1,13
FTL_0207	pyrrolidone-carboxylatepeptidase		13	24,215	0	1,30E-01	0,97
FTL_0208	putativecytochromec-typebiogenesisprotein		1	18,072	0	4,55E-01	0,41
FTL_0209	DNApolymeraseIIsubunitchi		2	16,791	0	1,32E-01	1,32
FTL_0214	L-lactatedehydrogenase		3	43,063	0	1,67E-02	2,01
FTL_0217	fumaratehydratase	fumC	3	50,698	0	1,34E-01	1,13
FTL_0218	glutamyl-tRNAsynthetase	gltX	13	53,007	0	1,48E-01	2,32
FTL_0224	30SribosomalproteinS2	rpsB	13	26,421	0	6,11E-02	1,18
FTL_0225	elongationfactorTs	tsf	9	30,959	0	5,38E-01	-0,46
FTL_0226	uridylatekinase	pyrH	3	26,689	0	9,92E-02	1,07
FTL_0227	ribosomerecyclingfactor	frr	3	20,552	0	1,82E-01	0,95
FTL_0228	undecaprenylpyrophosphatesynthase		2	27,621	0	2,60E-01	1,08
FTL_0229	phosphatidatecytidyltransferase		2	29,328	0	4,43E-01	0,48
FTL_0231	phosphatidylglycerophosphatesynthetase		2	22,699	0	5,18E-01	0,65
FTL_0233	30SribosomalproteinS7		6	17,807	0	1,58E-01	1,21
FTL_0234	elongationfactorG		23	77,73	0	3,51E-01	0,58
FTL_0235	30SribosomalproteinS10	rpsJ	3	11,896	0	1,01E-01	2,16
FTL_0236	50SribosomalproteinL3	rplC	7	22,307	0	4,95E-02	2,44
FTL_0237	50SribosomalproteinL4	rplD	3	22,521	0	1,77E-02	2,38
FTL_0238	50SribosomalproteinL23	rplW	3	11,136	0	8,83E-01	0,08
FTL_0239	50SribosomalproteinL2	rplB	3	30,401	0	2,55E-01	1,55
FTL_0242	30SribosomalproteinS3	rpsC	4	24,877	0	7,36E-02	0,98
FTL_0243	50SribosomalproteinL16	rplP	5	15,71	0	2,58E-01	0,96
FTL_0244	50SribosomalproteinL29		3	7,8011	0	2,03E-01	1,63

FTL_0245	30SribosomalproteinS17	rpsQ	2	9,8514	0	1,91E-01	2,26
FTL_0246	50SribosomalproteinL14	rplN	4	13,235	0	1,93E-01	0,97
FTL_0247	50SribosomalproteinL24	rplX	4	11,476	0	2,01E-01	1,75
FTL_0248	50SribosomalproteinL5	rplE	9	19,996	0	4,81E-01	0,42
FTL_0249	30SribosomalproteinS14	rpsN	1	11,718	0	1,03E-01	2,10
FTL_0250	30SribosomalproteinS8	rpsH	8	14,411	0	1,13E-01	1,16
FTL_0251	50SribosomalproteinL6	rplF	4	19,075	0	2,24E-01	0,78
FTL_0252	50SribosomalproteinL18	rplR	2	13,036	0	5,01E-01	0,45
FTL_0253	30SribosomalproteinS5	rpsE	5	17,527	0	1,81E-01	1,12
FTL_0254	50SribosomalproteinL30	rpmD	2	6,871	0	3,06E-01	1,92
FTL_0255	50SribosomalproteinL15	rplO	2	15,095	0	4,24E-02	3,86
FTL_0256	preproteintranslocasesubunitSecY	secY	6	48,464	0	4,71E-01	0,39
FTL_0258	30SribosomalproteinS13	rpsM	5	13,378	0	1,16E-01	2,51
FTL_0259	30SribosomalproteinS11		4	13,762	0	9,01E-02	2,69
FTL_0260	30SribosomalproteinS4	rpsD	7	23,237	0	2,26E-01	0,85
FTL_0261	DNA-directedRNAPolymerasesubunitalpha		9	35,325	0	2,44E-02	2,54
FTL_0262	50SribosomalproteinL17	rplQ	7	16,784	0	9,58E-01	0,05
FTL_1892	hypotheticalprotein		10	39,225	0	3,46E-01	0,99
FTL_0267	heatshockprotein90		25	72,371	0	1,15E-01	1,01
FTL_0269	glutamatedehydrogenase		37	49,157	0	2,59E-01	1,47
FTL_0277	mercuricreductaseprotein		3	51,534	0	2,47E-01	0,94
FTL_0281	heatshockprotein,hsp40		3	33,669	0	1,26E-01	1,59
FTL_0285	GTPpyrophosphokinase		3	74,083	0	3,41E-01	-0,61
FTL_0291	aromaticaminoacidHAAPtransporter		2	43,965	0	9,12E-02	1,49
FTL_0293	preproteintranslocasesubunitSecB		2	16,699	0	7,28E-01	0,23
FTL_0295	acetyl-CoAcarboxylasecarboxyltransferasesubunitalpha		22	35,436	0	8,66E-01	-0,24
FTL_0297	hypotheticalprotein		4	37,761	0	6,62E-01	0,38
FTL_0304	Na+/H+antiporter		1	46,355	0	6,78E-01	0,24

FTL_0306	tryptophanyl-tRNA synthetase		6	37,966	0	6,48E-02	2,02
FTL_0307	dephospho-CoA kinase	coaE	4	23,434	0	3,25E-01	1,32
FTL_0309	pyruvate dehydrogenase subunit E1	aceE	40	100,27	0	8,10E-01	0,18
FTL_0310	dihydrolipoamide acetyltransferase		28	56,798	0	1,07E-01	1,78
FTL_0311	dihydrolipoamide dehydrogenase		19	50,527	0	1,28E-01	1,93
FTL_0317	hypothetical protein		13	12,214	0	5,00E-02	1,10
FTL_0318	lipoprotein		2	8,7085	0	2,57E-02	4,46
FTL_0319	hypothetical protein		3	47,462	0	6,71E-01	0,50
FTL_0325	OmpA family protein		28	46,754	0	3,43E-01	0,66
FTL_0327	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase	ispH	3	35,129	0	6,32E-02	1,21
FTL_0329	CDP-alcohol phosphatidyltransferase		6	30,119	0	1,88E-01	0,92
FTL_0331	TolQ protein		9	26,247	0	9,05E-01	-0,08
FTL_0332	TolR protein		3	15,901	0	5,20E-01	0,67
FTL_0333	hypothetical protein		9	34,654	0	1,18E-01	0,92
FTL_0334	TolB protein precursor		26	48,452	0	1,47E-01	0,95
FTL_0335	lipoprotein		2	8,3812	0	1,75E-01	1,71
FTL_0336	peptidoglycan-associated lipoprotein		30	23,291	0	8,07E-02	1,10
FTL_0345	bile acid symporter family protein		1	33,703	0	9,74E-02	-2,12
FTL_0348			6	21,533	0	8,64E-01	0,17
FTL_0354	hypothetical protein		2	14,036	0	2,59E-01	0,82
FTL_0357	ribonuclease PH	rph	7	25,44	0	3,08E-01	1,48
FTL_0359	Type IV pilus fiber building block protein		3	33,72	0	6,53E-02	2,10
FTL_0360	heat shock protein HtpX		6	41,004	0	5,55E-01	0,29
FTL_0361	LemA-like protein		13	21,986	0	3,38E-01	-0,58
FTL_0371	hypothetical protein		1	24,895	0	5,31E-01	0,40
FTL_0372	NAD(P)H-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase	gpsA	8	36,677	0	1,50E-01	2,42
FTL_0373	hypothetical protein		3	19,786	0	5,80E-02	-4,18
FTL_0374	DNA repair protein RadA		1	50,269	0	6,61E-02	1,71

FTL_0377	chorismatesynthase		6	38,068	0	1,31E-01	2,09
FTL_0379	methioninesulfoxidereductaseB		5	19,632	0	3,90E-01	0,71
FTL_0380	superoxidedismuete(Cu-Zn)precursor		5	19,887	0	4,67E-02	1,21
FTL_0387	aspartateaminotransferase		20	44,382	0	3,56E-01	0,85
FTL_0388	cationtransporter		2	33,755	0	8,93E-01	0,22
FTL_0393	hypotheticalprotein		2	27,489	0	4,02E-01	0,75
FTL_0394	bifunctional5,10-methylene-tetrahydrofolatedehydrogenase/5,10-methylene-tetrahydrofolatecyclohydrolase		4	30,482	0	2,76E-01	1,05
FTL_0396	fusionproteinPurC/PurD		3	86,525	0	9,56E-01	0,03
FTL_0398	phosphoribosylaminoimidazolecarboxylase,catalyticsubunit		7	17,165	0	2,34E-01	1,75
FTL_0399	phosphoribosylaminoimidazolecarboxylaseATPasesubunit		14	40,285	0	6,74E-02	2,53
FTL_0403	hypotheticalprotein		2	9,2585	0	6,89E-01	-0,27
FTL_0404	glucosekinase		10	37,56	0	9,80E-02	1,85
FTL_0405	menaquinonebiosynthesismethyltransferase		3	28,004	0	5,01E-01	0,77
FTL_0406	hypotheticalprotein		2	22,143	0	8,11E-01	0,18
FTL_0407	2-polyprenylphenol6-hydroxylase		13	63,814	0	1,13E-01	1,06
FTL_0408	histidinetriad(HIT)familyprotein		1	12,5	0	2,17E-01	1,37
FTL_0410	hypotheticalprotein		4	32,374	0	4,61E-01	1,45
FTL_0411	hypotheticalprotein		9	33,057	0	2,14E-01	0,91
FTL_0412	UDP-N-acetylenolpyruvoylglucosaminereductase		4	32,079	0	8,85E-01	0,21
FTL_0413	UDP-N-acetylglucosamine1-carboxyvinyltransferase		8	48,485	0	1,53E-01	2,21
FTL_0419	oligopeptidaseA		19	76,569	0	3,64E-01	0,78
FTL_0421	lipoprotein		20	15,772	0	4,50E-01	0,40
FTL_0423	hypotheticalprotein		9	19,303	0	6,95E-02	1,12
FTL_0424	lipoprotein		7	17,239	0	1,29E-02	2,02
FTL_0425	TypeIVpilglycosylationprotein		1	51,277	0	1,41E-01	0,98
FTL_0426	DNAtopoisomerasel		7	87,25	0	9,36E-01	0,09
FTL_0430	hypotheticalprotein		8	33,41	0	1,24E-01	1,00
FTL_0434	hypotheticalprotein		9	17,923	0	9,22E-02	0,98

FTL_0436	isoleucyl-tRNA synthetase	ileS	2	106,97	0	8,95E-01	-0,10
FTL_0437	riboflavin biosynthesis protein RibF		2	34,968	0	2,25E-02	2,17
FTL_0438	malate dehydrogenase		25	67,344	0	1,31E-01	2,25
FTL_0444	methionyl-tRNA synthetase	metG	4	76,59	0	3,76E-01	0,52
FTL_0448	hypothetical protein		1	24,219	0	7,10E-02	1,30
FTL_0450	phosphatidylserine decarboxylase	psd	8	32,127	0	3,85E-01	0,46
FTL_0451	hypothetical protein		21	36,385	0	6,68E-02	1,08
FTL_0452	bifunctional nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase/ADP-ribose pyrophosphatase		2	40,379	0	9,13E-01	-0,09
FTL_0453	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase/glucosamine-1-phosphate N-acetyltransferase		16	49,655	0	1,67E-01	3,03
FTL_0454	glucosamine--fructose-6-phosphate aminotransferase		6	67,471	0	1,75E-01	1,14
FTL_0462	DNA topoisomerase IV subunit A		1	83,93	0	2,11E-01	-1,04
FTL_0463	5'-methylthioadenosine/S-adenosylhomocysteine nucleosidase		3	24,916	0	3,72E-01	0,86
FTL_0465	BNR/Asp-box repeat-containing protein		7	42,563	0	9,08E-01	-0,07
FTL_0466	soluble lytic murein transglycosylase		34	76,898	0	3,55E-01	0,71
FTL_0473	peptide deformylase		4	24,261	0	3,87E-01	0,66
FTL_0474	lipoprotein releasing system, subunit C, putative membrane protein		9	48,229	0	4,30E-01	0,45
FTL_0475	lipoprotein releasing system, subunit D, ABC transporter ATP-binding protein		3	25,726	0	6,46E-01	0,45
FTL_0476	lysine decarboxylase, inducible		10	81,934	0	1,45E-01	1,47
FTL_0477	glycine cleavage system aminomethyltransferase T	gcvT	10	39,516	0	2,35E-01	1,11
FTL_0478	glycine cleavage system H protein		2	13,911	0	1,01E-01	1,55
FTL_0479	glycine dehydrogenase subunit 1		7	49,666	0	1,47E-01	2,57
FTL_0480	glycine dehydrogenase subunit 2		30	52,781	0	1,20E-01	2,96
FTL_0481	shikimate 5-dehydrogenase		4	31,42	0	3,53E-01	1,12
FTL_0483	glycogen branching protein		1	74,922	0	7,89E-01	-0,14
FTL_0484	phosphoglucomutase		7	59,742	0	1,94E-02	1,52
FTL_0485	glucose-1-phosphate adenylyltransferase	glgC	19	47,54	0	2,12E-01	1,95
FTL_0486	glycogen synthase	glgA	4	53,546	0	7,53E-01	0,25

FTL_0487	maltodextrinphosphorylase		9	86,447	0	1,63E-01	1,72
FTL_0489	glycyl-tRNAsynthetasesubunitalpha	glyQ	7	34,31	0	3,18E-01	1,01
FTL_0491	outermembranelipoprotein		2	14,176	0	5,69E-01	0,36
FTL_0492	UDP-N--acetylmuramoylalanyl-D-glutamyl-2,6-diaminopimelate-D-alanyl-D-alanyliligase		7	50,164	0	2,43E-01	0,87
FTL_0493	hypotheticalprotein		7	29,606	0	5,14E-02	1,37
FTL_0506	UDP-2,3-diacylglucosaminehydrolase		3	28,331	0	1,00E-01	1,57
FTL_0507	orotatephosphoribosyltransferase	pyrE	6	23,373	0	4,94E-01	0,72
FTL_0513	hypotheticalprotein		3	11,385	0	2,91E-01	1,16
FTL_0514	hypotheticalprotein		10	25,258	0	4,47E-01	0,50
FTL_0515	ABCtransportersubstrate-bindingprotein		2	19,052	0	8,87E-01	-0,07
FTL_0517	ABCtransporterATP-bindingprotein		6	30,049	0	2,49E-01	0,70
FTL_0518	celldivisiontopologicalspecificityfactorMinE		6	10,184	0	4,67E-01	-0,79
FTL_0519	septumsite-determiningproteinMinD		19	30,12	0	8,06E-01	-0,18
FTL_0520	septumsite-determiningproteinMinC		3	24,874	0	4,71E-01	-0,79
FTL_0522	50SribosomalproteinL28	rpmB	2	8,9393	0	1,46E-01	1,19
FTL_0523	hypotheticalprotein		2	12,225	0	1,83E-02	1,71
FTL_0525	fumeratehydratase		6	55,064	0	1,13E-01	1,48
FTL_0529	uracil-DNAglycosylase		5	25,426	0	6,45E-01	0,81
FTL_0533	DNAgyrasesubunitA		12	97,102	0	9,12E-02	2,14
FTL_0535	outermembraneprotein		16	87,631	0	9,44E-02	1,65
FTL_0536	outermembraneproteinOmpH		8	18,782	0	8,01E-01	-0,21
FTL_0537	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl]glucosamineN-acyltransferase	lpxD	4	35,442	0	3,76E-02	3,31
FTL_0538	(3R)-hydroxymyristoyl-ACPdehydratase	fabZ	11	18,15	0	1,95E-01	1,82
FTL_0539	UDP-N-acetylglucosamineacyltransferase		11	28,092	0	8,40E-01	-0,14
FTL_0540	lipid-A-disaccharidesynthase	lpxB	14	43,087	0	1,49E-01	0,82
FTL_0541	hypotheticalprotein		6	22,436	0	5,86E-01	0,31
FTL_0547	3-deoxy-D-manno-octulosonic-acidtransferase		11	49,828	0	1,39E-01	0,91
FTL_0549	pyrroline-5-carboxylatereductase		2	30,081	0	4,30E-01	0,87

FTL_0552	two-componentresponseregulator		5	25,519	0	2,23E-01	2,09
FTL_0553	signalpeptidaseI		14	32,866	0	3,35E-01	0,51
FTL_0556	ribonucleaseR		19	85,962	0	8,28E-02	3,01
FTL_0569	hypotheticalprotein		11	19,785	0	7,25E-01	0,30
FTL_0571	hypotheticalprotein		15	22,451	0	6,99E-02	1,00
FTL_0572	hypotheticalprotein		33	51,977	0	6,34E-02	1,23
FTL_0573	hypotheticalprotein		8	35,78	0	1,43E-01	1,13
FTL_0574	hypotheticalprotein		13	52,2	0	6,61E-01	0,46
FTL_0583	acetyl-CoAcetyltransferase		18	41,723	0	3,18E-01	1,17
FTL_0584	bifunctional3-hydroxacyl-CoAdehydrogenase/acyl-CoA-bindingprotein		41	100,62	0	8,06E-01	0,26
FTL_0585	acyl-CoAdehydrogenase	fadE	28	83,333	0	1,86E-01	0,81
FTL_0586	longchainfattyacidCoAligase		14	63,064	0	5,56E-02	1,50
FTL_0588	isocitratedehydrogenase		9	82,382	0	9,46E-01	0,06
FTL_0589	hypotheticalprotein		13	33,263	0	4,53E-01	0,40
FTL_0592	dTDP-glucose4,6-dehydratase		17	65,709	0	8,72E-01	0,13
FTL_0593	galactosyltransferase		9	23,778	0	9,59E-01	0,05
FTL_0594	UDP-glucose4-epimerase		8	29,955	0	7,95E-01	0,18
FTL_0595	galacturonosyltransferase		11	41,599	0	9,44E-01	0,05
FTL_0596	UDP-glucose/GDP-mannosedehydrogenase		21	48,862	0	2,87E-01	0,74
FTL_0597	NADdependentepimerase		8	36,418	0	4,68E-01	0,48
FTL_0599	glycosyltransferasefamilyprotein		8	42,248	0	1,18E-01	0,98
FTL_0600	asparaginesynthase		10	71,808	0	7,46E-01	-0,22
FTL_0601	sugartransamine/perosaminesynthetase		10	40,683	0	3,24E-01	1,29
FTL_0602	hypotheticalprotein		10	27,863	0	2,80E-01	0,71
FTL_0603	O-antigenflippase		2	56,228	0	1,30E-01	1,61
FTL_0604	glycosyltransferase		11	32,976	0	6,24E-01	0,31
FTL_0605	glucose-1-phosphatethymidyltransferase		11	32,456	0	2,87E-01	1,60
FTL_0606	dTDP-D-glucose4,6-dehydratase		14	38,786	0	1,30E-01	2,86

FTL_0609	phosphomannomutase		3	54,705	0	8,64E-02	-1,23
FTL_0610	transcriptionterminationfactorRho	rho	7	47,128	0	2,76E-01	1,08
FTL_0611	thioredoxin		2	12,023	0	6,35E-01	-0,40
FTL_0612	exopolyphosphatase		2	34,334	0	2,69E-01	0,99
FTL_0616	DNA-directedRNAPolymerasesubunitalpha		8	35,074	0	1,77E-02	2,28
FTL_0617	hypotheticalprotein		14	16,809	0	3,81E-01	1,24
FTL_0620	deoxyribonuclease		2	28,998	0	5,77E-01	0,39
FTL_0623	ABCtransporterATP-bindingprotein		4	34,827	0	1,29E-02	2,02
FTL_0625	glycosyltransferasefamilyprotein		7	35,582	0	5,72E-01	0,33
FTL_0627	threonineeffluxprotein		3	23,769	0	5,25E-02	2,08
FTL_0637	hypotheticalprotein		7	25,566	0	2,23E-01	2,07
FTL_0644	carbon-nitrogenhydrolase		5	29,585	0	2,26E-01	1,93
FTL_0645	lipoprotein		9	14,883	0	5,96E-01	0,30
FTL_0655	hypotheticalprotein		20	40,009	0	1,74E-01	0,76
FTL_0656	hypotheticalprotein		14	44,513	0	1,49E-01	0,88
FTL_0657	hydroxyacylglutathionehydrolase		5	28,833	0	1,89E-01	1,20
FTL_0659	celldivisionprotein		11	26,953	0	6,26E-01	0,26
FTL_0661	hypotheticalprotein		18	59,928	0	2,09E-01	0,85
FTL_0665	hypotheticalprotein		8	58,333	0	1,69E-01	1,03
FTL_0671	pantothenatekinase		10	27,922	0	3,67E-01	1,27
FTL_0673	pantoate-beta-alanineligase		10	29,685	0	2,10E-01	1,09
FTL_0674	3-methyl-2-oxobutanoatehydroxymethyltransferase	panB	12	31,173	0	2,06E-01	1,71
FTL_0675	hypotheticalprotein		9	27,475	0	1,41E-01	1,53
FTL_0680	polyaminetransporter,subunitH,ABCtransporter,membraneprotein		2	33,272	0	1,18E-01	1,72
FTL_0681	polyaminetransporter,ABCtransporter,ATP-bindingprotein		10	42,296	0	5,55E-01	0,76
FTL_0684	hypotheticalprotein		4	16,013	0	4,47E-01	0,67
FTL_0686	outermembraneeffluxprotein		8	54,535	0	6,22E-01	0,47
FTL_0687	HlyDfamilysecretionprotein		9	37,853	0	9,61E-01	-0,06

FTL_0691	proton-dependent oligopeptide transport (POT) family protein		4	54,907	0	2,59E-01	0,73
FTL_0694	hypothetical protein		2	27,132	0	5,33E-01	0,46
FTL_0695	cell entry (mce) related family protein		10	26,945	0	5,62E-01	0,40
FTL_0696	ABC transporter ATP-binding protein		10	28,918	0	5,26E-01	0,54
FTL_0697	ABC transporter membrane protein		4	40,407	0	1,25E-01	1,94
FTL_0698	hypothetical protein		5	32,093	0	5,41E-01	0,33
FTL_0700	lipoprotein		10	32,068	0	7,03E-02	1,60
FTL_0703	serine hydroxymethyltransferase	glyA	12	45,282	0	2,26E-01	1,41
FTL_0705	hypothetical protein		5	49,973	0	2,06E-01	0,83
FTL_0707	glycosyltransferase family protein		8	35,285	0	7,43E-01	0,23
FTL_0708	hypothetical protein		5	42,239	0	1,08E-01	1,32
FTL_0709	glycosyltransferase group 1 family protein		15	40,637	0	4,52E-02	1,28
FTL_0716	prolipoprotein diacylglycerol transferase		3	30,549	0	3,58E-01	0,63
FTL_0717	ribonuclease E		20	95,947	0	8,66E-01	0,11
FTL_0721	DedA family protein		2	24,018	0	6,83E-01	-0,26
FTL_0723	hypothetical protein		2	10,148	0	9,90E-02	2,37
FTL_0730	haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein		2	29,814	0	9,25E-01	-0,11
FTL_0736	ribose-5-phosphate isomerase A		3	24,466	0	8,14E-01	0,30
FTL_0737	hypothetical protein		5	52,393	0	8,55E-01	0,12
FTL_0739	tRNA uridine 5-carboxymethylaminomethyl modification protein GidA		2	69,764	0	6,15E-01	0,36
FTL_0743	oxidoreductase, short-chain dehydrogenase family protein		14	25,988	0	2,33E-01	1,39
FTL_0746	hypothetical protein		6	30,656	0	4,05E-01	0,53
FTL_0747	glutamate racemase		2	29,416	0	3,13E-01	1,15
FTL_0754	exo-deoxyribonuclease VIII large subunit	xseA	4	52,245	0	7,06E-02	1,30
FTL_0765	VacJ lipoprotein		5	34,237	0	2,98E-01	0,95
FTL_0766	gamma-glutamyl transpeptidase		19	65,148	0	2,89E-02	1,64
FTL_0767	hypothetical protein		10	29,331	0	2,07E-01	2,65
FTL_0784	lipoprotein		7	67,353	0	8,09E-01	0,14

FTL_0786	N-acetylglucosamine-6-phosphatideacetylase		4	40,589	0	2,77E-01	1,42
FTL_0788	glutamineamidotransferasesclass-IIfamilyprotein		3	30,328	0	5,64E-01	0,63
FTL_0789	aspartateaminotransferase		13	44,196	0	1,93E-01	1,46
FTL_0795	adenylatekinase	adk	5	24,39	0	6,82E-01	0,29
FTL_0796	hypotheticalprotein		3	38,512	0	1,48E-02	1,73
FTL_0797	TypeIVpiliasociatedprotein		6	21,597	0	8,12E-01	0,17
FTL_0798	TypeIVpiligliycolylationprotein		4	22,251	0	7,52E-01	-0,29
FTL_0800	TypeIVpilimultimericoutermembraneprotein		15	64,493	0	1,19E-01	1,17
FTL_0801	shikimatekinasel	aroK	3	19,753	0	2,18E-01	1,32
FTL_0806	aminoacidtransporterfamilyprotein		4	54,952	0	6,61E-01	0,23
FTL_0807	majorfacilitatortransporter		3	45,103	0	7,24E-01	0,19
FTL_0808	bifunctional4'-phosphopantothenoilcysteinedecarboxylase,phosphopantothenoilcysteinesynthetase		11	43,092	0	1,19E-01	2,73
FTL_0814	hypotheticalprotein		2	15,643	0	1,73E-01	1,03
FTL_0821	ferrochelataze	hemH	4	39,061	0	5,82E-02	1,57
FTL_0822	hypotheticalprotein		2	9,5596	0	5,24E-02	2,66
FTL_0823	hypotheticalprotein		8	15,19	0	8,55E-02	1,07
FTL_0827	TypeIVpilipolytopicinnermembraneprotein		4	45,324	0	8,13E-01	0,15
FTL_0828	TypeIVpilinucleotidebindingprotein,ABCtransporterATP-bindingprotein		4	67,091	0	2,16E-01	0,76
FTL_0830	molybdopterinbindingfamilyprotein,fragment		4	28,337	0	3,03E-01	1,36
FTL_0832	hypotheticalprotein		4	63,112	0	3,72E-01	0,69
FTL_0833	2-C-methyl-D-erythritol2,4-cyclodiphosphatesynthase	ispF	3	17,665	0	4,65E-01	0,92
FTL_0834	rhodanese-likefamilyprotein		13	27,864	0	4,30E-01	0,94
FTL_0837	D-methioninebindingtransportprotein,ABCtransporter,membraneandperiplasmicprotein		12	53,442	0	3,46E-01	0,49
FTL_0838	D-methioninetransportprotein,ABCtransporter,ATP-bindingunit		17	39,193	0	2,63E-01	0,56
FTL_0839	hypotheticalprotein		2	21,766	0	3,58E-01	-0,50

FTL_0846	isochorismatasehydrolasefamilyprotein		2	21,332	0	2,57E-02	1,98
FTL_0847	preproteintranslocasefamilyprotein		4	12,881	0	3,04E-01	-0,57
FTL_0848	preproteintranslocasesubunitSecD	secD	17	69,654	0	8,81E-01	0,08
FTL_0849	preproteintranslocasesubunitSecF	secF	8	34,484	0	6,87E-01	-0,22
FTL_0850	hypotheticalprotein		6	20,453	0	2,91E-01	0,61
FTL_0852	3-phosphoshikimate1-carboxyvinyltransferase		5	46,78	0	1,42E-01	1,76
FTL_0855	L-asparaginase		4	38,205	0	1,88E-01	1,42
FTL_0856	carbonicanhydrase		10	25,438	0	2,42E-01	1,44
FTL_0863	Sodium-dicarboxylatesymporterfamilyprotein		2	45,787	0	1,12E-01	1,20
FTL_0864	SISdomain-containingprotein		7	37,243	0	1,63E-01	2,01
FTL_0865	majorfacilitatortransporter		3	49,728	0	9,32E-01	0,04
FTL_0875	4-hydroxy-3-methylbut-2-en-1-ylidiphosphatesynthase	ispG	3	43,5	0	4,92E-01	0,40
FTL_0876	hypotheticalprotein		3	26,843	0	2,79E-01	1,46
FTL_0877	peptidase,M24familyprotein		21	68,758	0	4,09E-01	0,69
FTL_0878	DNA/RNAendonucleasefamilyprotein		12	40,933	0	9,13E-01	0,13
FTL_0879	beta-lactamase		19	31,964	0	4,96E-01	0,59
FTL_0885	phoH-likeprotein		6	36,679	0	1,62E-01	2,29
FTL_0886	(dimethylallyl)adenosinetRNAmethylthiotransferase		4	50,164	0	1,70E-02	1,62
FTL_0891	triggerfactor	tig	7	49,57	0	3,65E-02	1,55
FTL_0892	ATP-dependentClpproteaseproteolyticsubunit	clpP	5	22,15	0	9,38E-01	0,11
FTL_0893	ATP-dependentproteaseATP-bindingsubunitClpX	clpX	7	46,319	0	5,42E-01	-0,39
FTL_0895	histone-likeproteinHUformB		5	9,4738	0	3,17E-01	1,38
FTL_0896	hypotheticalprotein		22	54,764	0	1,63E-01	0,79
FTL_0898	hostfactorIforbacteriophageQbetareplication		5	12,484	0	5,89E-01	0,47
FTL_0901	monooxygenasefamilyprotein		1	22,212	0	6,23E-02	1,39
FTL_0903	hypotheticalprotein		19	40,421	0	7,48E-01	0,18
FTL_0904	hypotheticalprotein		16	34,589	0	4,57E-01	0,39
FTL_0906	ribosomebiogenesisGTP-bindingproteinYsxC	engB	4	22,303	0	1,72E-02	1,93

FTL_0916	ketol-acidreductoisomerase		7	37,878	0	3,61E-01	0,85
FTL_0918	hypotheticalprotein		1	24,712	0	7,10E-01	0,27
FTL_0919	hypotheticalprotein		2	48,2	0	3,90E-01	1,00
FTL_0923	glutaredoxin		6	25,151	0	5,04E-01	0,45
FTL_0926	Ferritin-likeprotein		7	19,073	0	2,95E-01	1,52
FTL_0928	isoprenoidbiosynthesisproteinwithamidotransferase-likedomain		3	23,692	0	6,37E-01	-0,46
FTL_0929	hypotheticalprotein		1	26,875	0	1,01E-01	1,03
FTL_0932	HollidayjunctionDNAhelicaseRuvA	ruvA	6	23,45	0	4,70E-02	4,82
FTL_0933	DNArecombinationproteinRmuCfamilyprotein		12	54,495	0	1,73E-01	0,79
FTL_0937	hypotheticalprotein		4	32,085	0	7,22E-01	0,62
FTL_0939	aldolase/adducinclassIIfamilyprotein		8	26,48	0	1,10E-01	2,19
FTL_0941	hypotheticalprotein		2	19,081	0	1,65E-01	1,41
FTL_0943	Sodium/hydrogenexchangerfamilyprotein		1	42,759	0	7,00E-01	0,22
FTL_0949	ribose-phosphatepyrophosphokinase		10	34,909	0	3,96E-01	0,51
FTL_0950	50SribosomalproteinL25		2	10,904	0	3,80E-01	1,62
FTL_0951	hypotheticalprotein		9	46,804	0	4,22E-01	0,63
FTL_0957	Beta-lactamaseclassA		4	33,216	0	4,04E-01	1,08
FTL_0958	hypotheticalprotein		8	31,608	0	8,14E-02	1,34
FTL_0959	TypeIVpilileaderpeptidaseandmethylase.		2	31,235	0	4,72E-01	-0,83
FTL_0960	solublepyridinenucleotidetranshydrogenase		15	52,298	0	3,70E-01	1,06
FTL_0964	ATP-dependentproteaseATP-bindingsubunitHslU	hslU	9	51,237	0	9,07E-01	-0,06
FTL_0965	ATP-dependentproteasepeptidasesubunit		8	19,803	0	3,99E-01	1,23
FTL_0966	hypotheticalprotein		3	27,796	0	8,92E-02	2,08
FTL_0967	lipoate-proteinligaseA		2	35,389	0	1,72E-01	0,95
FTL_0968	tyrosyl-tRNAsynthetase		3	44,593	0	7,11E-01	-0,50
FTL_0970	L-lactatedehydrogenase		1	43,194	0	7,70E-01	0,28
FTL_0984	bifunctionalglutaredoxin/ribonucleoside-diphosphatereductasesubunitbeta		8	47,323	0	1,41E-01	1,02
FTL_0986	ribonucleotide-diphosphatereductasesubunitalpha		6	66,564	0	1,80E-01	1,20

FTL_0987	malatedehydrogenase		16	34,076	0	3,46E-01	1,09
FTL_0994	hypotheticalprotein		11	56,039	0	2,30E-01	1,14
FTL_0995	haloaciddehalogenase		2	21,938	0	6,16E-01	0,40
FTL_1003	DNApolymeraseIIIsubunitepsilon		1	27,192	0	6,96E-01	0,24
FTL_1005	hypotheticalprotein		22	53,483	0	1,56E-02	1,62
FTL_1013	hypotheticalprotein		5	27,667	0	3,47E-01	0,53
FTL_1015	AhpC/TSAfamilyprotein		7	19,668	0	5,09E-01	0,52
FTL_1016	shortchaindehydrogenase		9	21,657	0	4,13E-01	0,88
FTL_1017	cytidylatekinase		5	24,811	0	7,72E-01	-0,40
FTL_1018	phosphoserineaminotransferase		4	39,285	0	1,93E-02	1,91
FTL_1021	hypotheticalprotein		4	39,722	0	2,23E-01	-0,94
FTL_1022	coproporphyrinogenIIIoxidase		5	35,876	0	3,19E-01	1,26
FTL_1024	30SribosomalproteinS6	rpsF	2	13,054	0	6,62E-02	-1,17
FTL_1026	50SribosomalproteinL9	rplI	11	16,087	0	5,36E-01	1,15
FTL_1029	TypeIVpililipoprotein		11	34,693	0	3,37E-01	0,85
FTL_1030	ribosomallargesubunitpseudouridinesynthaseB		1	31,171	0	1,02E-01	1,01
FTL_1040	hypotheticalprotein		4	16,134	0	5,29E-01	1,25
FTL_1041	octaprenyl-diphosphatesynthase		2	36,435	0	9,00E-01	-0,14
FTL_1042	FKBP-typepeptidyl-prolylcis-transisomerasefamilyprotein		19	29,357	0	1,53E-01	0,79
FTL_1044	hypotheticalprotein		4	16,077	0	5,01E-01	0,85
FTL_1046	D-alanyl-D-alaninecarboxypeptidase		17	51,321	0	8,77E-01	0,12
FTL_1050	RNApolymerasesigma-70factor		4	67,646	0	9,55E-01	-0,14
FTL_1058	lipoate-proteinligaseB	lipB	3	23,339	0	1,64E-01	1,78
FTL_1060	D-alanyl-D-alaninecarboxypeptidase		26	48,033	0	5,37E-01	0,48
FTL_1061	inorganicpyrophosphatase		5	19,588	0	2,55E-01	1,57
FTL_1062	3-deoxy-D-manno-octulosonate8-phosphatephosphatase		8	20,073	0	1,62E-01	2,65
FTL_1063	hypotheticalprotein		4	23,9	0	9,24E-01	0,07
FTL_1064	hypotheticalprotein		8	31,675	0	2,26E-01	0,72

FTL_1065	ABCtransporterATP-bindingprotein		5	27,191	0	6,70E-01	0,30
FTL_1066	fumarylacetoacetatehydrolasefamilyprotein		2	22,277	0	8,53E-01	0,18
FTL_1067	hypotheticalprotein		10	69,415	0	9,84E-03	1,85
FTL_1068	tRNApseudouridinesynthaseA	truA	3	29,594	0	3,17E-01	0,90
FTL_1071	GMPsynthase	guaA	5	57,698	0	1,70E-02	2,05
FTL_1072	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphatesynthase		3	67,385	0	1,15E-01	2,46
FTL_1073	hypotheticalprotein		1	12,698	0	5,44E-01	0,70
FTL_1075	hypotheticalprotein		8	22,424	0	3,57E-01	1,56
FTL_1089	choloylglycinehydrolasefamilyprotein		4	28,581	0	8,22E-01	0,20
FTL_1090	rRNAmethyltransferase		2	28,143	0	3,50E-01	0,63
FTL_1093	bifunctionalmethioninesulfoxidereductaseB/Aprotein		3	32,571	0	1,83E-01	1,48
FTL_1096	lipoprotein		17	39,545	0	2,86E-01	0,56
FTL_1097	hypotheticalprotein		1	10,524	0	4,64E-02	2,38
FTL_1101	hypotheticalprotein		1	13,114	0	7,85E-01	0,23
FTL_1105	hypotheticalprotein		4	16,868	0	4,33E-01	0,49
FTL_1106	alanyl-tRNAsynthetase	alaS	4	96,05	0	4,03E-01	-1,03
FTL_1107	hypotheticalprotein		10	52,114	0	1,62E-02	1,95
FTL_1108	cytosolaminopeptidase		19	51,356	0	2,27E-01	1,81
FTL_1109	transaldolaseB		12	35,684	0	6,37E-01	0,42
FTL_1110	hypotheticalprotein		4	17,124	0	7,94E-01	0,17
FTL_1115	hypotheticalprotein		7	28,215	0	4,20E-01	0,80
FTL_1129	acetyltransferase		3	18,945	0	4,33E-01	0,50
FTL_1132	inositol-1-monophosphatase		7	28,868	0	3,19E-02	2,82
FTL_1135			2	26,756	0	7,45E-01	0,27
FTL_1137	3-oxoacyl-ACPSynthase		13	44,02	0	4,05E-01	0,55
FTL_1138	acylcarrierprotein	acpP	3	10,66	0	8,81E-02	-1,60
FTL_1139	3-oxoacyl-(acyl-carrier-protein)reductase		9	26,357	0	1,61E-01	1,48
FTL_1140	malonylCoA-acylcarrierproteintransacylase		8	33,501	0	6,24E-01	0,50

FTL_1141	3-oxoacyl-ACPSynthase		6	35,21	0	1,63E-02	1,75
FTL_1142	putativeglycerol-3-phosphateacyltransferasePlsX		13	37,84	0	2,49E-01	0,80
FTL_1143	50SribosomalproteinL32	rpmF	2	6,8786	0	2,32E-01	1,74
FTL_1145	transketolase		8	73,346	0	6,94E-01	0,21
FTL_1146	glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase		15	35,413	0	1,69E-01	1,38
FTL_1147	phosphoglyceratekinase	pgk	11	42,01	0	3,52E-01	0,98
FTL_1148	pyruvatekinase		24	51,776	0	2,43E-01	1,63
FTL_1149	fructose-1,6-bisphosphatealdolase		15	38,159	0	6,55E-02	1,63
FTL_1173	hypotheticalprotein		3	21,611	0	6,97E-01	-0,25
FTL_1174	cystathioninebeta-synthase(cysteinsynthase)		7	34,433	0	2,39E-01	1,86
FTL_1178	hypotheticalprotein		2	9,5732	0	2,65E-01	-0,87
FTL_1180	PEP-dependentsugarPTSsystemfamilyprotein		2	17,666	0	6,74E-01	-0,46
FTL_1185	macrophagegrowthlocussubunitA		2	21,666	0	1,25E-01	1,95
FTL_1186	30SribosomalproteinS9	rpsI	2	14,736	0	1,87E-02	2,56
FTL_1187	50SribosomalproteinL13	rplM	3	15,937	0	1,09E-01	1,22
FTL_1189	membrane-boundlyticmureintransglycosylaseA(MLT)familyprotein		14	44,134	0	4,80E-01	0,52
FTL_1190	heatshockproteinGrpE		4	22,036	0	6,33E-01	-0,72
FTL_1191	molecularchaperoneDnaK	dnaK	39	69,181	0	9,10E-01	0,09
FTL_1192	chaperoneproteinDnaJ		7	41,48	0	5,80E-01	0,61
FTL_1197	phenylalanyl-tRNAsynthetasesubunitalpha	pheS	4	38,505	0	2,07E-01	0,77
FTL_1198	phenylalanyl-tRNAsynthetasesubunitbeta	pheT	4	88,164	0	2,50E-01	0,96
FTL_1202	hypotheticalprotein		5	36,896	0	1,71E-02	2,08
FTL_1203	cardiolipinsynthetase		7	54,862	0	9,84E-01	-0,02
FTL_1207	MRPlikeprotein		1	31,263	0	6,45E-01	-0,27
FTL_1208	deoxycytidinetriphosphatedeaminase	dcd	6	21,092	0	3,41E-01	1,70
FTL_1211	lipoprotein		7	21,033	0	9,44E-02	1,07
FTL_1212	leucyl-tRNAsynthetase	leuS	6	93,405	0	1,18E-01	1,18
FTL_1213	hypotheticalprotein		13	73,307	0	2,36E-01	1,45

FTL_1219	hypotheticalprotein		6	47,072	0	4,59E-01	0,49
FTL_1224	thioredoxin		3	12,202	0	6,14E-01	0,71
FTL_1225	hypotheticalprotein		17	25,7	0	7,05E-02	1,25
FTL_1228	hypotheticalprotein		2	43,271	0	9,72E-02	1,33
FTL_1230	cysteinedesulfuraseactivatorcomplexsubunitSufB		3	53,507	0	3,61E-01	0,96
FTL_1231	hypotheticalprotein		7	14,844	0	5,68E-01	0,60
FTL_1232	potassiumtransporterperipheralmembraneprotein	trkA	3	51,588	0	1,13E-01	1,42
FTL_1233	aminoacidantiporter		3	52,826	0	7,41E-01	0,25
FTL_1237	hypotheticalprotein		1	29,215	0	5,65E-01	-0,30
FTL_1239	signalrecognitionparticleprotein,Ffh		13	50,31	0	3,25E-01	1,49
FTL_1240	phospho-2-dehydro-3-deoxyheptonatealdolase		12	40,878	0	1,56E-01	2,86
FTL_1247	hypotheticalprotein		13	27,626	0	5,64E-02	1,33
FTL_1248	glutathionereductase		10	49,547	0	3,87E-01	0,93
FTL_1249	hypotheticalprotein		4	11,289	0	5,07E-01	0,77
FTL_1251	proton-dependentoligopeptidetransport(POT)familyprotein		1	56,292	0	1,02E-01	1,83
FTL_1253	GTPcyclohydrolasel	folE	7	23,55	0	2,65E-01	1,49
FTL_1256			3	16,366	0	5,87E-01	-0,49
FTL_1262	chorismatebindingfamilyprotein		1	68,293	0	9,59E-02	1,02
FTL_1265	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyldihydropteridinepyrophosphokinase		5	48,214	0	5,34E-02	1,52
FTL_1266	lipase/esterase		7	35,509	0	1,36E-01	1,37
FTL_1267	hypotheticalprotein		2	19,006	0	6,48E-02	1,33
FTL_1271	adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoateaminotransferase		8	49,489	0	2,76E-01	1,68
FTL_1272	biotinsynthase		13	34,906	0	7,48E-01	-0,30
FTL_1273	8-amino-7-oxononanoatesynthase		4	42,595	0	8,82E-01	0,13
FTL_1275	dethiobiotinsynthetase		10	24,502	0	5,52E-01	-0,35
FTL_1278	majorfacilitatortransporter		1	46,257	0	4,49E-01	0,62
FTL_1283	glutamate-1-semialdehydeaminotransferase		8	47,064	0	9,18E-01	0,13
FTL_1284	glutathionesynthetase		15	37,16	0	1,40E-01	1,14

FTL_1286	hypotheticalprotein		3	15,059	0	8,62E-01	0,12
FTL_1287	23SrRNAm(2)G2445methyltransferase	rlmL	7	83,48	0	5,82E-01	0,57
FTL_1294	short-chaindehydrogenase		7	30,8	0	1,28E-01	1,57
FTL_1299	hypotheticalprotein		5	16,876	0	1,45E-01	1,18
FTL_1302	phenolhydroxylase		4	27,761	0	2,87E-01	1,01
FTL_1304	glutamate--cysteineligase		13	56,962	0	2,05E-01	1,79
FTL_1306	hypotheticalprotein		18	39,945	0	1,78E-01	0,96
FTL_1309	Acetyl-CoAcarboxylasebetasubunit		19	33,386	0	6,35E-01	-0,55
FTL_1310	nucleosidediphosphatekinase	ndk	5	15,427	0	7,42E-01	0,38
FTL_1311	CTPsynthetase	pyrG	7	61,041	0	9,17E-02	1,08
FTL_1328	outermembraneassociatedprotein		28	41,259	0	8,97E-02	1,15
FTL_1330	phosphopantetheineadenylyltransferase	coaD	4	18,517	0	2,91E-01	1,33
FTL_1332	hesBfamilyprotein		2	13,171	0	5,57E-01	0,64
FTL_1333	selenocysteinelyase		7	45,081	0	4,11E-01	1,17
FTL_1334	L-serinedehydratase1		9	50,009	0	2,37E-02	2,03
FTL_1336	prephenatedehydratase		4	31,708	0	3,06E-01	0,87
FTL_1338	alanineracemase		1	41,48	0	4,00E-01	-0,46
FTL_1341	hypotheticalprotein		1	15,407	0	2,34E-01	-1,08
FTL_1344	hypotheticalprotein		1	13,088	0	9,39E-01	-0,05
FTL_1350	glycyl-tRNAsynthetasesubunitbeta		3	78,021	0	2,31E-01	0,79
FTL_1354	hypotheticalprotein		1	33,778	0	6,70E-01	0,34
FTL_1357	UTP--glucose-1-phosphateuridylyltransferase		5	32,148	0	2,96E-01	1,28
FTL_1358	cation-effluxfamilyprotein		6	42,813	0	6,82E-01	0,27
FTL_1363	hypotheticalprotein		9	36,704	0	3,47E-01	0,64
FTL_1364	hypotheticalprotein		10	26,43	0	5,99E-01	0,54
FTL_1370	hypotheticalprotein		5	30,798	0	5,41E-02	-4,39
FTL_1383	glutathioneperoxidase		3	17,771	0	8,14E-01	0,25
FTL_1384	hypotheticalprotein		6	13,313	0	1,19E-01	0,92

FTL_1389	nicotinate-nucleotidepyrophosphorylase		4	31,472	0	2,00E-01	-2,13
FTL_1390	quinolinate synthetase		3	38,046	0	8,06E-01	-0,20
FTL_1392	cold-shock DEAD-box protein A		14	64,007	0	7,76E-03	2,00
FTL_1393	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase		4	10,24	0	4,98E-01	0,41
FTL_1394	major facilitator superfamily galactose-proton symporter		7	51,217	0	7,11E-01	0,20
FTL_1395	major facilitator superfamily galactose-proton symporter		7	50,837	0	9,00E-01	-0,06
FTL_1396	galactose-1-phosphate uridylyl transferase		10	39,677	0	1,73E-01	1,68
FTL_1399	3-deoxy-manno-octulosonate cytidylyl transferase		2	28,276	0	6,20E-01	0,48
FTL_1404	50S ribosomal protein L20	rplT	3	13,348	0	1,65E-01	0,93
FTL_1406	translation initiation factor IF-3		3	17,536	0	5,72E-01	0,43
FTL_1410	undecaprenyl diphospho-muramoyl pentapeptide beta-N-acetylglucosaminyl transferase	murG	2	40,828	0	6,71E-02	1,32
FTL_1414	hypothetical protein		13	44,264	0	9,84E-02	0,99
FTL_1416	capsule biosynthesis protein capB		13	44,561	0	1,69E-01	0,85
FTL_1418	asparaginase		9	30,9	0	4,98E-01	0,95
FTL_1419	cyanophycinase		9	29,303	0	1,57E-02	2,17
FTL_1420	carbohydrate/purine kinase pfkB family protein		18	40,314	0	1,28E-01	2,92
FTL_1426	hypothetical protein		7	26,495	0	6,51E-01	-0,40
FTL_1430	UDP-glucose 4-epimerase		5	37,846	0	5,05E-02	1,66
FTL_1431	sugar transferase		3	52,957	0	3,42E-01	0,69
FTL_1432	D-ribulose-phosphate 3-epimerase		3	24,015	0	1,86E-01	2,73
FTL_1442	enoyl-[acyl-carrier-protein] reductase (NADH)		15	27,775	0	1,78E-01	0,74
FTL_1443	hypothetical protein		7	26,501	0	5,04E-01	0,85
FTL_1453	50S ribosomal protein L21	rplU	3	11,561	0	2,96E-01	1,42
FTL_1458	preprotein translocase subunit SecA		13	103,59	0	6,68E-01	-0,61
FTL_1459	hypothetical protein		9	38,786	0	1,20E-01	0,89
FTL_1461	purine nucleoside phosphorylase		14	26,865	0	2,78E-01	1,03
FTL_1468	ATP-dependent metalloprotease		27	70,751	0	3,90E-01	0,47
FTL_1474	transcription elongation factor GreA	greA	5	17,703	0	8,59E-01	-0,14

FTL_1475	TypeIVpilifiberbuildingblockprotein		3	20,856	0	8,12E-01	0,13
FTL_1476	glucose-6-phosphateisomerase	pgi	15	61,104	0	2,21E-01	1,95
FTL_1478	inosine-5-monophosphatedehydrogenase		22	52,091	0	2,15E-01	2,07
FTL_1479	cytosolaminopeptidase		18	51,988	0	4,45E-01	-0,55
FTL_1480	YjgP/YjgQfamilypermease		1	40,593	0	6,23E-01	-0,33
FTL_1481	YjgP/YjgQfamilypermease		4	39,156	0	7,34E-01	0,43
FTL_1486	tRNA-(ms(2)io(6)a)-hydroxylase		5	23,768	0	3,52E-01	1,51
FTL_1487	uridinephosphorylase		6	29,648	0	1,38E-01	2,28
FTL_1489	FAD-bindingfamilyprotein		5	114,57	0	9,54E-01	0,04
FTL_1490	phosphoglyceromutase		12	57,627	0	4,82E-01	0,50
FTL_1491	seryl-tRNAsynthetase		19	48,57	0	1,76E-01	1,78
FTL_1492	fructokinase		9	32,786	0	2,15E-01	1,98
FTL_1494	hypotheticalprotein		6	18,158	0	3,79E-01	0,77
FTL_1495	cysteine/glutathioneABCtransportermembrane/ATP-bindingprotein		8	65,882	0	5,54E-01	0,35
FTL_1496	cysteine/glutathioneABCtransportermembrane/ATP-bindingprotein		12	62,103	0	1,51E-01	0,89
FTL_1498	translationinitiationinhibitor		4	13,753	0	1,06E-01	3,48
FTL_1503	deoxyguanosinetriphosphatetriphosphohydrolase		16	50,409	0	2,71E-01	1,17
FTL_1504	peroxidase/catalase		52	81,226	0	1,38E-01	1,04
FTL_1510	glycerol-3-phosphatetransporter		2	48,024	0	4,74E-01	0,41
FTL_1511	glycerophosphoryldiesterphosphodiesterasefamilyprotein		17	39,076	0	5,39E-01	0,60
FTL_1520	uracilphosphoribosyltransferase	upp	2	22,798	0	8,85E-02	1,20
FTL_1521	chitinasefamily18protein		20	83,594	0	7,17E-01	0,41
FTL_1522	2-amino-3-ketobutyratecoenzymeAligase		15	43,952	0	1,99E-01	1,33
FTL_1523	L-threonine3-dehydrogenase	tdh	6	38,399	0	1,66E-01	1,95
FTL_1525	2-C-methyl-D-erythritol4-phosphatecytidyltransferase		2	25,877	0	8,01E-02	1,10
FTL_1526	celldivisionprotein		3	11,113	0	2,63E-01	-1,51
FTL_1527	phosphopyruvatehydratase	eno	13	49,511	0	2,13E-01	0,68
FTL_1528	majorfacilitatortransporter		3	44,845	0	6,70E-01	0,29

FTL_1531	23SrRNA5-methyluridinemethyltransferase	rumA	2	50,863	0	7,61E-02	1,31
FTL_1532	hypotheticalprotein		7	20,965	0	5,00E-02	1,54
FTL_1534	uridinekinase		7	25,292	0	2,17E-01	1,62
FTL_1535	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonatealdolase		9	30,117	0	2,82E-01	1,78
FTL_1537	polynucleotidephosphorylase/polyadenylase		25	75,469	0	1,41E-01	0,79
FTL_1538	30SribosomalproteinS15	rpsO	4	10,359	0	2,20E-01	2,57
FTL_1539	penicillinbindingprotein(peptidoglycansynthetase)		11	62,733	0	7,56E-01	-0,25
FTL_1540	hypotheticalprotein		1	13,653	0	2,77E-01	1,14
FTL_1542	hypotheticalprotein		16	78,581	0	9,24E-01	-0,14
FTL_1545	glutamineamidotransferasesubunitPdxT		9	19,961	0	2,69E-01	1,13
FTL_1546	pyridoxalbiosynthesislyasePdxS		15	30,818	0	5,09E-01	0,71
FTL_1547	DNAgyrasesubunitB		5	89,74	0	2,21E-02	1,77
FTL_1548	hypotheticalprotein		6	30,656	0	7,16E-01	0,31
FTL_1550	lipoprotein		11	27,914	0	3,04E-02	1,29
FTL_1552	hypotheticalprotein		29	69,883	0	9,82E-01	0,01
FTL_1553	succinyl-CoAsynthetasesubunitbeta	sucC	20	41,541	0	1,64E-01	1,31
FTL_1554	succinyl-CoAsynthetase,alphasubunit		12	30,119	0	1,83E-01	1,11
FTL_1556	hypotheticalprotein		1	37,741	0	1,72E-01	1,30
FTL_1568	LysRfamilytranscriptionalregulator		4	35,541	0	6,36E-02	1,41
FTL_1570	phospholipaseD		9	46,478	0	1,66E-01	1,43
FTL_1571	thioredoxinreductase		6	33,971	0	2,58E-01	0,91
FTL_1579	hypotheticalprotein		9	25,703	0	1,87E-01	0,96
FTL_1580	hypotheticalprotein		2	33,235	0	3,55E-01	0,91
FTL_1581	lipoprotein		7	28,599	0	3,24E-01	0,68
FTL_1582	putrescine-bindingperiplasmicprotein		8	45,214	0	6,03E-02	1,21
FTL_1583	glutamate:gamma-aminobutyricacidantiporterfamilyprotein		1	51,611	0	5,97E-02	2,35
FTL_1584	PerMfamilyprotein		3	41,711	0	1,37E-01	1,23
FTL_1590	hypotheticalprotein		9	25,351	0	3,05E-01	0,55

FTL_1592	Acetyl-CoAcarboxylase,biotincarboxylcarrierproteinsubunit		7	16,404	0	2,07E-02	1,46
FTL_1593	3-dehydroquinatedehydratase		4	16,329	0	3,02E-01	1,36
FTL_1594	diadenosinetetraphosphatase	apaH	4	31,736	0	4,59E-02	-2,31
FTL_1596	peptidyl-prolylcis-transisomerase		9	53,344	0	6,44E-02	2,07
FTL_1597	organicsolventtoleranceprotein		11	98,609	0	2,67E-01	1,27
FTL_1598	arginyl-tRNA synthetase	argS	12	65,925	0	9,76E-01	0,02
FTL_1602	delta-aminolevulinicaciddehydratase		4	35,811	0	3,79E-02	1,66
FTL_1603	RNA-bindingprotein		2	10,392	0	3,68E-01	1,90
FTL_1605	putativeperiplasmicprotease		20	38,067	0	2,03E-01	0,85
FTL_1609	dolichyl-phosphate-mannose-proteinmannosyltransferasefamilyprotein		4	68,147	0	5,51E-01	0,54
FTL_1611	glycosyltransferasefamilyprotein		10	35,935	0	7,17E-01	0,18
FTL_1612	hypotheticalprotein		4	30,735	0	7,98E-01	0,27
FTL_1616	phosphoenolpyruvatecarboxykinase		3	60,476	0	1,89E-01	-0,93
FTL_1617	glutaminylyl-tRNA synthetase		2	63,594	0	1,90E-01	0,79
FTL_1621	ABCtransporterATP-binding		1	70,059	0	8,85E-02	1,16
FTL_1623	hypotheticalprotein		4	40,435	0	1,43E-01	0,82
FTL_1637	lipoprotein		12	38,091	0	2,55E-01	0,92
FTL_1639	hypotheticalprotein		6	29,381	0	5,79E-01	0,78
FTL_1640	aminoacidtransporterprotein,fragment		3	54,907	0	3,27E-01	0,80
FTL_1641	hypotheticalprotein		3	10,515	0	2,46E-01	0,86
FTL_1645	majorfacilitatortransporter		2	44,494	0	8,15E-01	0,16
FTL_1657	signalrecognitionparticlereceptorFtsY		6	36,054	0	2,65E-01	0,75
FTL_1658	hypotheticalprotein		15	49,321	0	7,93E-01	-0,14
FTL_1661	nucleosidepermeaseNUPfamilyprotein		3	44,314	0	4,32E-01	0,41
FTL_1662	nucleosidepermeaseNUPfamilyprotein		1	44,707	0	1,99E-01	0,92
FTL_1664	phosphopentomutase		5	45,755	0	1,56E-01	1,36
FTL_1668	lipidAtransportproteinABCtransporterATP-bindingprotein/permease		16	66,676	0	7,39E-01	0,21
FTL_1670	disulfidebondformationprotein		2	17,985	0	4,74E-01	0,73

FTL_1671	RNDeffluxtransporter		10	50,056	0	2,04E-01	0,82
FTL_1672	AcrB/AcrD/AcrFfamilytransporter		20	112,5	0	4,62E-01	0,44
FTL_1678	hypotheticalprotein		23	38,458	0	2,31E-02	2,25
FTL_1683	cysteinyl-tRNAsynthetase	cysS	5	53,075	0	2,97E-01	0,66
FTL_1684	N5-glutamineS-adenosyl-L-methionine-dependentmethyltransferase		5	35,807	0	1,56E-01	-0,84
FTL_1685	majorfacilitatortransporter		2	43,509	0	9,95E-01	-0,01
FTL_1699	hypotheticalprotein		5	61,398	0	6,80E-02	1,96
FTL_1700	Sodium/prolinepermease		4	53,213	0	5,01E-01	0,38
FTL_1701	fructose1,6-bisphosphatasell	glpX	6	34,841	0	1,08E-01	1,59
FTL_1703	aminoacidtransporter		3	53,451	0	9,18E-01	0,05
FTL_1704	hypotheticalprotein		1	25,546	0	1,36E-01	1,63
FTL_1705	celldivisionprotein		18	92,015	0	4,72E-01	-0,51
FTL_1706	lipoproteinreleasingsystemsunitA,outermembranelipoproteincarrier		7	23,435	0	4,61E-01	0,44
FTL_1708	potassiumuptakeprotein		2	53,593	0	1,07E-01	-1,86
FTL_1709	hypotheticalprotein		6	18,214	0	7,03E-02	1,12
FTL_1714	chaperoninGroEL	groEL	72	57,402	0	3,88E-01	0,96
FTL_1715	co-chaperoninGroES	groES	6	10,272	0	9,81E-01	0,02
FTL_1717	hypotheticalprotein		7	30,528	0	1,14E-01	3,11
FTL_1723	hypotheticalprotein		10	23,828	0	8,87E-01	0,08
FTL_1733	oxidoreductaseiron/ascorbatefamilyprotein		3	32,278	0	4,80E-01	-0,37
FTL_1735	50SribosomalproteinL19	rplS	2	13,307	0	6,82E-01	0,27
FTL_1738	30SribosomalproteinS16	rpsP	1	9,0716	0	2,45E-01	0,83
FTL_1739	S-adenosylmethioninesynthetase		3	42,103	0	5,65E-01	0,39
FTL_1740	fattyaciddesaturase		6	44,09	0	5,76E-01	0,47
FTL_1745	50SribosomalproteinL7/L12	rplL	2	12,848	0	1,20E-01	-2,48
FTL_1746	50SribosomalproteinL10	rplJ	10	18,731	0	6,13E-01	-0,32
FTL_1747	50SribosomalproteinL1	rplA	15	24,641	0	1,69E-01	1,42
FTL_1748	50SribosomalproteinL11	rplK	2	15,27	0	2,39E-01	0,65

FTL_1749	transcriptionantiterminationproteinnusG		4	19,982	0	2,50E-01	1,39
FTL_1751	elongationfactorTu		24	43,39	0	4,52E-01	0,49
FTL_1753	ionchannelprotein,fragment		2	17,816	0	6,25E-01	0,38
FTL_1756	anaerobicglycerol-3-phosphatedehydrogenase		16	57,774	0	4,57E-01	-0,64
FTL_1762	sensorhistidinekinase		9	54,752	0	2,05E-01	0,75
FTL_1772	aconitatehydratase		36	102,7	0	1,76E-01	-0,98
FTL_1773	hypotheticalprotein		6	30,042	0	1,72E-01	1,93
FTL_1775	oxygen-independentcoproporphyrinogenIIIoxidase		2	43,577	0	5,28E-01	0,43
FTL_1779	preproteintranslocasesubunitSecG	secG	3	12,094	0	6,14E-01	0,34
FTL_1780	triosephosphateisomerase		12	27,655	0	1,13E-01	1,75
FTL_1781	phosphoglucosaminemutase	glmM	5	48,206	0	6,60E-02	1,49
FTL_1782	adeninephosphoribosyltransferase		2	18,839	0	8,39E-01	-0,17
FTL_1783	dihydrolipoamidesuccinyltransferasecomponentof2-oxoglutaratedehydrogenasecomplex		20	52,717	0	8,02E-02	1,59
FTL_1784	2-oxoglutaratedehydrogenaseE1component	sucA	21	105,68	0	3,54E-01	0,53
FTL_1785	succinatedehydrogenaseiron-sulfuresubunit	sdhB	15	26,566	0	2,43E-01	0,60
FTL_1786	succinatedehydrogenase,catalyticandNAD/flavoproteinsubunit		19	65,86	0	6,57E-01	0,25
FTL_1787	succinatedehydrogenasehydrophobicmembraneanchorprotein		1	14,161	0	1,14E-01	2,68
FTL_1788	succinatedehydrogenase,cytochromeb556		3	14,405	0	8,90E-01	0,08
FTL_1789	citrate synthase		10	46,794	0	3,95E-01	0,92
FTL_1790	majorfacilitatorsuperfamilytransporter		10	47,155	0	7,84E-01	-0,19
FTL_1791	superoxidedismutase		9	21,939	0	8,51E-02	4,55
FTL_1792	glutaredoxin-likeprotein		3	12,311	0	2,66E-02	-3,44
FTL_1793	hypotheticalprotein		12	105,36	0	8,71E-01	-0,17
FTL_1794	FOF1ATPsynthasesubunitepsilon	atpC	5	15,737	0	5,33E-01	0,53
FTL_1795	FOF1ATPsynthasesubunitbeta		29	49,864	0	4,14E-01	0,50
FTL_1796	FOF1ATPsynthasesubunitgamma		15	33,235	0	6,09E-01	0,27
FTL_1797	FOF1ATPsynthasesubunitalpha		25	55,536	0	8,78E-01	0,09
FTL_1798	FOF1ATPsynthasesubunitdelta		12	19,202	0	6,78E-01	0,28

FTL_1799	FOF1ATPsynthasesubunitB		16	17,383	0	8,46E-01	-0,11
FTL_1800	FOF1ATPsynthasesubunitC		2	10,215	0	9,73E-01	-0,03
FTL_1803	majorfacilitatortransporter		3	47,726	0	8,52E-01	0,10
FTL_1807	histidyl-tRNA synthetase	hisS	7	48,169	0	7,99E-02	2,25
FTL_1810	transcriptionelongationfactorNusA	nusA	8	55,178	0	7,10E-02	1,22
FTL_1812	uroporphyrinogendecarboxylase	hemE	10	38,873	0	9,73E-01	-0,03
FTL_1818	NADHdehydrogenasesubunitM		2	58,23	0	6,10E-01	0,27
FTL_1822	NADHdehydrogenasesubunitI		6	18,862	0	5,43E-01	0,34
FTL_1823	NADHdehydrogenasesubunitH		5	37,641	0	8,08E-01	0,13
FTL_1824	NADHdehydrogenasesubunitG		21	87,308	0	8,65E-01	0,09
FTL_1825	NADHdehydrogenasesubunitF		12	46,282	0	4,07E-01	0,49
FTL_1826	NADHdehydrogenasesubunitE		3	18,171	0	1,58E-01	-0,76
FTL_1827	NADHdehydrogenasesubunitD		19	47,585	0	6,51E-01	0,25
FTL_1828	NADHdehydrogenasel		7	24,956	0	2,44E-01	0,72
FTL_1829	NADHdehydrogenasesubunitB		2	17,226	0	8,88E-01	0,09
FTL_1830	NADHdehydrogenasesubunitA		2	14,617	0	9,10E-01	0,10
FTL_1834	diaminopimelatedecarboxylase		11	47,425	0	3,43E-02	3,50
FTL_1840	hypotheticalprotein		3	16,199	0	6,93E-01	0,38
FTL_1841	aspartyl/glutamyl-tRNAamidotransferasesubunitB	gatB	7	52,531	0	1,73E-02	2,08
FTL_1852	hypotheticalprotein		4	14,629	0	4,36E-01	0,49
FTL_1861	amidophosphoribosyltransferase		5	55,417	0	5,14E-01	0,46
FTL_1865	outermembraneproteintoIC		23	57,243	0	5,76E-02	1,31
FTL_1866	protein-L-isoaspartateO-methyltransferase		8	23,204	0	1,18E-01	-1,07
FTL_1867	proteaseyegQ		6	50,281	0	4,12E-01	1,00
FTL_1869	Na+/H+antiporter		2	51,971	0	4,03E-01	0,53
FTL_1873	aminoacidtransporter		6	69,339	0	6,90E-01	0,21
FTL_1883	potassium-transportingATPasesubunitA		6	62,331	0	1,33E-01	1,06
FTL_1896	hypotheticalprotein		4	50,98	0	1,91E-02	1,87

FTL_1897	outermembranelipoprotein		9	19,574	0	1,25E-01	0,83
FTL_1900	L-glutaminase		9	57,211	0	6,63E-02	1,70
FTL_1902	hypotheticalprotein		4	20,319	0	8,15E-01	0,14
FTL_1903	lysyl-tRNA synthetase		9	64,572	0	9,22E-01	0,09
FTL_1905	DNA polymerase III subunit gamma and tau		2	61,072	0	6,83E-01	0,47
FTL_1906	UDP-3-O-[3-hydroxymyristoyl]N-acetylglucosamine deacetylase	lpxC	4	31,99	0	2,21E-01	1,42
FTL_1907	cell division protein FtsZ		16	39,745	0	2,07E-01	0,97
FTL_1908	cell division protein FtsA		8	44,804	0	8,27E-01	0,18
FTL_1909	cell division protein FtsQ		1	26,373	0	5,10E-01	0,42
FTL_1910	D-alanyl-alanine synthetase A		10	32,744	0	2,36E-01	1,40
FTL_1911	zinc-binding domain-containing protein		2	17,128	0	7,50E-01	0,45
FTL_1912	30S ribosomal protein S1	rpsA	24	61,669	0	2,99E-02	1,31
FTL_1914	hypothetical protein		4	21,08	0	6,88E-01	-0,21
FTL_1915	putative acyltransferase		4	34,318	0	2,96E-01	0,64
FTL_1922	YggT family protein		1	21,867	0	2,07E-01	1,07
FTL_1930	adenylosuccinate synthetase		13	46,879	0	2,42E-01	1,65
FTL_1935	ABC transporter ATP-binding protein		2	25,593	0	3,59E-01	0,66
FTL_1936	periplasmic solute binding family protein		13	33,814	0	2,02E-01	0,77
FTL_1939	outermembranelipoprotein		4	15,816	0	1,59E-01	0,79
FTL_1940	trp repressor binding protein		3	21,254	0	1,22E-01	2,97
FTL_1956	aminopeptidase N	pepN	15	98,043	0	1,94E-01	2,13
FTL_1957	heat shock protein		4	16,74	0	1,03E-01	1,18
FTL_1958	bifunctional indole-3-glycerol phosphate synthase/phosphoribosyl anthranilate isomerase		6	51,323	0	8,96E-02	1,16
FTL_1960	peptide methionine sulfoxide reductase MsrA		7	26,809	0	7,48E-02	1,22
FTL_1964			3	37,194	0	6,37E-02	2,09
FTL_1965			1	21,038	0	7,05E-01	0,30
FTL_1966	anthranilate synthase component I		8	58,066	0	5,88E-01	0,43
FTL_1967	trp operon repressor		2	10,932	0	3,05E-01	0,67

BIBLIOGRAPHIE

1. Sjöstedt A. Tularemia: History, Epidemiology, Pathogen Physiology, and Clinical Manifestations. *Ann N Y Acad Sci.* 1 juin 2007;1105(1):1-29.
2. Wherry WB, Lamb BH. Infection of man with *Bacterium tularensis*. 1914. *J Infect Dis.* 1 avr 2004;189(7):1321-9.
3. Francis E. Landmark article April 25, 1925: Tularemia. By Edward Francis. *JAMA.* 16 déc 1983;250(23):3216-24.
4. Ellis J, Oyston PCF, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clin Microbiol Rev.* oct 2002;15(4):631-46.
5. Ritter DB, Gerloff RK. Deoxyribonucleic acid hybridization among some species of the genus *Pasteurella*. *J Bacteriol.* déc 1966;92(6):1838-9.
6. Dorofe'ev KA. Classification of the causative agent of tularemia. In: Symposium Research Works Institute Epidemiology and Microbiology Chita. 1947. p. 170-180.
7. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juin 1990;87(12):4576-9.
8. Larson MA, Nalbantoglu U, Sayood K, Zentz EB, Cer RZ, Iwen PC, et al. Reclassification of *Wolbachia persica* as *Francisella persica* comb. nov. and emended description of the family Francisellaceae. *Int J Syst Evol Microbiol.* mars 2016;66(3):1200-5.
9. Forsman M, Sandström G, Sjöstedt A. Analysis of 16S ribosomal DNA sequences of *Francisella* strains and utilization for determination of the phylogeny of the genus and for identification of strains by PCR. *Int J Syst Bacteriol.* janv 1994;44(1):38-46.
10. Larsson P, Oyston PCF, Chain P, Chu MC, Duffield M, Fuxelius H-H, et al. The complete genome sequence of *Francisella tularensis*, the causative agent of tularemia. *Nat Genet.* févr 2005;37(2):153-9.
11. Challacombe JF, Petersen JM, Gallegos-Graves LV, Hodge D, Pillai S, Kuske CR. Whole-Genome Relationships among *Francisella* Bacteria of Diverse Origins Define New Species and Provide Specific Regions for Detection. *Appl Environ Microbiol.* 2 janv 2017;83(3):e02589-16.
12. Olsufiev NG, Emelyanova OS, Dunayeva TN. Comparative study of strains of *B. tularensis* in the old and new world and their taxonomy. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1959;3:138-49.
13. Chaudhuri RR, Ren C-P, Desmond L, A. Vincent G, Silman NJ, Brehm JK, et al. Genome Sequencing Shows that European Isolates of *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* Are Almost Identical to US Laboratory Strain Schu S4. *PLoS ONE.* 4 avr 2007;2(4).
14. Maurin M, Gyuranecz M. Tularaemia: clinical aspects in Europe. *Lancet Infect Dis.* janv 2016;16(1):113-24.

15. Keim P, Johansson A, Wagner DM. Molecular Epidemiology, Evolution, and Ecology of *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci*. 1 juin 2007;1105(1):30-66.
16. Eigelsbach HT, Downs CM. Prophylactic Effectiveness of Live and Killed Tularemia Vaccines. *J Immunol*. 1 oct 1961;87(4):415-25.
17. Burke DS. Immunization against tularemia: analysis of the effectiveness of live *Francisella tularensis* vaccine in prevention of laboratory-acquired tularemia. *J Infect Dis*. janv 1977;135(1):55-60.
18. Salomonsson E, Kuoppa K, Forslund A-L, Zingmark C, Golovliov I, Sjöstedt A, et al. Reintroduction of Two Deleted Virulence Loci Restores Full Virulence to the Live Vaccine Strain of *Francisella tularensis*. *Infect Immun*. août 2009;77(8):3424-31.
19. Rowe HM, Huntley JF. From the Outside-In: The *Francisella tularensis* Envelope and Virulence. *Front Cell Infect Microbiol*. 2015;5:94.
20. Jones BD, Faron M, Rasmussen JA, Fletcher JR. Uncovering the components of the *Francisella tularensis* virulence stealth strategy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4:32.
21. Elkins KL, Cowley SC, Bosio CM. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. *Ann N Y Acad Sci*. juin 2007;1105:284-324.
22. Larsson P, Elfsmark D, Svensson K, Wikström P, Forsman M, Brettin T, et al. Molecular Evolutionary Consequences of Niche Restriction in *Francisella tularensis*, a Facultative Intracellular Pathogen. *PLoS Pathog*. juin 2009;5(6).
23. Huber B, Escudero R, Busse H-J, Seibold E, Scholz HC, Anda P, et al. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis* subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int J Syst Evol Microbiol*. août 2010;60(Pt 8):1887-96.
24. Jensen WI, Owen CR, Jellison WL. *Yersinia philomiragia* sp. n., a New Member of the Pasteurella Group of Bacteria, Naturally Pathogenic for the Muskrat (*Ondatra zibethica*). *J Bacteriol*. déc 1969;100(3):1237-41.
25. Hollis DG, Weaver RE, Steigerwalt AG, Wenger JD, Moss CW, Brenner DJ. *Francisella philomiragia* comb. nov. (formerly *Yersinia philomiragia*) and *Francisella tularensis* biogroup *novicida* (formerly *Francisella novicida*) associated with human disease. *J Clin Microbiol*. juill 1989;27(7):1601-8.
26. Ottem KF, Nylund A, Karlsbakk E, Friis-Møller A, Kamaishi T. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *J Appl Microbiol*. avr 2009;106(4):1231-43.
27. Huber B, Escudero R, Busse H-J, Seibold E, Scholz HC, Anda P, et al. Description of *Francisella hispaniensis* sp. nov., isolated from human blood, reclassification of *Francisella novicida* (Larson et al. 1955) Olsufiev et al. 1959 as *Francisella tularensis*

- subsp. *novicida* comb. nov. and emended description of the genus *Francisella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* août 2010;60(Pt 8):1887-96.
28. Caipang CMA, Kulkarni A, Brinchmann MF, Korsnes K, Kiron V. Detection of *Francisella piscicida* in Atlantic cod (*Gadus morhua* L) by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction. *Vet J Lond Engl* 1997. juin 2010;184(3):357-61.
 29. Brevik OJ, Ottem KF, Kamaishi T, Watanabe K, Nylund A. *Francisella halioticida* sp. nov., a pathogen of farmed giant abalone (*Haliotis gigantea*) in Japan. *J Appl Microbiol.* nov 2011;111(5):1044-56.
 30. Qu P-H, Chen S-Y, Scholz HC, Busse H-J, Gu Q, Kämpfer P, et al. *Francisella guangzhouensis* sp. nov., isolated from air-conditioning systems. *Int J Syst Evol Microbiol.* oct 2013;63(Pt 10):3628-35.
 31. Petrosino JF, Xiang Q, Karpathy SE, Jiang H, Yerrapragada S, Liu Y, et al. Chromosome rearrangement and diversification of *Francisella tularensis* revealed by the type B (OSU18) genome sequence. *J Bacteriol.* oct 2006;188(19):6977-85.
 32. Rohmer L, Fong C, Abmayr S, Wasnick M, Larson Freeman TJ, Radey M, et al. Comparison of *Francisella tularensis* genomes reveals evolutionary events associated with the emergence of human pathogenic strains. *Genome Biol.* 2007;8(6):R102.
 33. Vogler AJ, Birdsell D, Price LB, Bowers JR, Beckstrom-Sternberg SM, Auerbach RK, et al. Phylogeography of *Francisella tularensis*: global expansion of a highly fit clone. *J Bacteriol.* avr 2009;191(8):2474-84.
 34. Wang Y, Peng Y, Hai R, Xia L, Li H, Zhang Z, et al. Diversity of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* lineages, China. *Emerg Infect Dis.* juill 2014;20(7):1191-4.
 35. Maurin M, Gyuranecz M. Tularaemia: clinical aspects in Europe. *Lancet Infect Dis.* janv 2016;16(1):113-24.
 36. Maurin M. *Francisella tularensis* as a potential agent of bioterrorism? *Expert Rev Anti Infect Ther.* févr 2015;13(2):141-4.
 37. Oyston PCF, Sjöstedt A, Titball RW. Tularaemia: bioterrorism defence renews interest in *Francisella tularensis*. *Nat Rev Microbiol.* déc 2004;2(12):967-78.
 38. Olsufiev NG, Emelyanova OS, Dunayeva TN. Comparative study of strains of *B. tularensis* in the old and new world and their taxonomy. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol.* 1959;3:138-49.
 39. Kingry LC, Petersen JM. Comparative review of *Francisella tularensis* and *Francisella novicida*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:35.
 40. Meunier E, Wallet P, Dreier RF, Costanzo S, Anton L, Rühl S, et al. Guanylate-binding proteins promote activation of the AIM2 inflammasome during infection with *Francisella novicida*. *Nat Immunol.* mai 2015;16(5):476-84.

41. Ziveri J, Tros F, Guerrera IC, Chhuon C, Audry M, Dupuis M, et al. The metabolic enzyme fructose-1,6-bisphosphate aldolase acts as a transcriptional regulator in pathogenic *Francisella*. *Nat Commun.* 11 2017;8(1):853.
42. Sjöstedt A. Intracellular survival mechanisms of *Francisella tularensis*, a stealth pathogen. *Microbes Infect.* févr 2006;8(2):561-7.
43. Wallet P, Lagrange B, Henry T. *Francisella* Inflammasomes: Integrated Responses to a Cytosolic Stealth Bacterium. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2016;397:229-56.
44. Ziveri J, Barel M, Charbit A. Importance of Metabolic Adaptations in *Francisella* Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:96.
45. Pizarro-Cerdá J, Charbit A, Enninga J, Lafont F, Cossart P. Manipulation of host membranes by the bacterial pathogens *Listeria*, *Francisella*, *Shigella* and *Yersinia*. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;60:155-67.
46. Moreau GB, Mann BJ. Adherence and uptake of *Francisella* into host cells. *Virulence.* 15 nov 2013;4(8):826-32.
47. Balagopal A, MacFarlane AS, Mohapatra N, Soni S, Gunn JS, Schlesinger LS. Characterization of the receptor-ligand pathways important for entry and survival of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Infect Immun.* sept 2006;74(9):5114-25.
48. Schulert GS, Allen L-AH. Differential infection of mononuclear phagocytes by *Francisella tularensis*: role of the macrophage mannose receptor. *J Leukoc Biol.* sept 2006;80(3):563-71.
49. Geier H, Celli J. Phagocytic receptors dictate phagosomal escape and intracellular proliferation of *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* juin 2011;79(6):2204-14.
50. Ben Nasr A, Haithcoat J, Masterson JE, Gunn JS, Eaves-Pyles T, Klimpel GR. Critical role for serum opsonins and complement receptors CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) in phagocytosis of *Francisella tularensis* by human dendritic cells (DC): uptake of *Francisella* leads to activation of immature DC and intracellular survival of the bacteria. *J Leukoc Biol.* oct 2006;80(4):774-86.
51. Pierini LM. Uptake of serum-opsonized *Francisella tularensis* by macrophages can be mediated by class A scavenger receptors. *Cell Microbiol.* août 2006;8(8):1361-70.
52. Santic M, Asare R, Skrobonja I, Jones S, Abu Kwaik Y. Acquisition of the vacuolar ATPase proton pump and phagosome acidification are essential for escape of *Francisella tularensis* into the macrophage cytosol. *Infect Immun.* juin 2008;76(6):2671-7.
53. Clemens DL, Lee B-Y, Horwitz MA. *Francisella tularensis* phagosomal escape does not require acidification of the phagosome. *Infect Immun.* mai 2009;77(5):1757-73.
54. Nano FE, Zhang N, Cowley SC, Klose KE, Cheung KKM, Roberts MJ, et al. A *Francisella tularensis* Pathogenicity Island Required for Intramacrophage Growth. *J Bacteriol.* oct 2004;186(19):6430-6.

55. Barker JR, Chong A, Wehrly TD, Yu J-J, Rodriguez SA, Liu J, et al. The Francisella tularensis Pathogenicity Island Encodes a Secretion System that is required for Phagosome Escape and Virulence. *Mol Microbiol.* déc 2009;74(6):1459-70.
56. Chong A, Celli J. The Francisella Intracellular Life Cycle: Toward Molecular Mechanisms of Intracellular Survival and Proliferation. *Front Microbiol.* 28 déc 2010;1.
57. Bourdonnay E, Henry T. Catch me if you can. *eLife.* [cité 28 juin 2018];5. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4786409/>
58. Steele S, Radlinski L, Taft-Benz S, Brunton J, Kawula TH. Trogocytosis-associated cell to cell spread of intracellular bacterial pathogens. *eLife.* 23 janv 2016;5.
59. Gallagher LA, Ramage E, Jacobs MA, Kaul R, Brittnacher M, Manoil C. A comprehensive transposon mutant library of Francisella novicida, a bioweapon surrogate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 janv 2007;104(3):1009-14.
60. Weiss DS, Brotcke A, Henry T, Margolis JJ, Chan K, Monack DM. In vivo negative selection screen identifies genes required for Francisella virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 3 avr 2007;104(14):6037-42.
61. Lindemann SR, Peng K, Long ME, Hunt JR, Apicella MA, Monack DM, et al. Francisella tularensis Schu S4 O-antigen and capsule biosynthesis gene mutants induce early cell death in human macrophages. *Infect Immun.* févr 2011;79(2):581-94.
62. Sandström G, Löfgren S, Tärnvik A. A capsule-deficient mutant of Francisella tularensis LVS exhibits enhanced sensitivity to killing by serum but diminished sensitivity to killing by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun.* mai 1988;56(5):1194-202.
63. Apicella MA, Post DMB, Fowler AC, Jones BD, Rasmussen JA, Hunt JR, et al. Identification, characterization and immunogenicity of an O-antigen capsular polysaccharide of Francisella tularensis. *PloS One.* 6 juill 2010;5(7):e11060.
64. Rasmussen JA, Fletcher JR, Long ME, Allen L-AH, Jones BD. Characterization of Francisella tularensis Schu S4 mutants identified from a transposon library screened for O-antigen and capsule deficiencies. *Front Microbiol.* 5 mai 2015;6.
65. Bandara AB, Champion AE, Wang X, Berg G, Apicella MA, McLendon M, et al. Isolation and mutagenesis of a capsule-like complex (CLC) from Francisella tularensis, and contribution of the CLC to F. tularensis virulence in mice. *PloS One.* 22 avr 2011;6(4):e19003.
66. Gunn JS, Ernst RK. The Structure and Function of Francisella Lipopolysaccharide. *Ann N Y Acad Sci.* juin 2007;1105:202-18.
67. Trent MS, Stead CM, Tran AX, Hankins JV. Invited review: Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis, Invited review: Diversity of endotoxin and its impact on pathogenesis. *J Endotoxin Res.* 1 août 2006;12(4):205-23.
68. Okan NA, Kasper DL. The atypical lipopolysaccharide of Francisella. *Carbohydr Res.* 30 août 2013;378:79-83.

69. Lagrange B, Benaoudia S, Wallet P, Magnotti F, Provost A, Michal F, et al. Human caspase-4 detects tetra-acylated LPS and cytosolic Francisella and functions differently from murine caspase-11. *Nat Commun.* 16 janv 2018;9.
70. Salomonsson EN, Forslund A-L, Forsberg A. Type IV Pili in Francisella - A Virulence Trait in an Intracellular Pathogen. *Front Microbiol.* 2011;2:29.
71. Forslund A-L, Kuoppa K, Svensson K, Salomonsson E, Johansson A, Byström M, et al. Direct repeat-mediated deletion of a type IV pilin gene results in major virulence attenuation of Francisella tularensis. *Mol Microbiol.* mars 2006;59(6):1818-30.
72. Eshraghi A, Kim J, Walls AC, Ledvina HE, Miller CN, Ramsey KM, et al. Secreted Effectors Encoded within and outside of the Francisella Pathogenicity Island Promote Intramacrophage Growth. *Cell Host Microbe.* 9 nov 2016;20(5):573-83.
73. Rigard M, Bröms JE, Mosnier A, Hologne M, Martin A, Lindgren L, et al. Francisella tularensis IglG Belongs to a Novel Family of PAAR-Like T6SS Proteins and Harbors a Unique N-terminal Extension Required for Virulence. *PLoS Pathog.* 7 sept 2016;12(9).
74. Ramakrishnan G. Iron and Virulence in Francisella tularensis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:107.
75. Nordstoga A, Handeland K, Johansen TB, Iversen L, Gavier-Widén D, Mattsson R, et al. Tularaemia in Norwegian dogs. *Vet Microbiol.* 10 oct 2014;173(3-4):318-22.
76. Larson MA, Fey PD, Hinrichs SH, Iwen PC. Francisella tularensis Bacteria Associated with Feline Tularemia in the United States. *Emerg Infect Dis.* déc 2014;20(12):2068-71.
77. Weinberg AN, Branda JA. Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 31-2010. A 29-year-old woman with fever after a cat bite. *N Engl J Med.* 14 oct 2010;363(16):1560-8.
78. Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME. Francisella tularensis: an arthropod-borne pathogen. *Vet Res.* avr 2009;40(2):7.
79. Thelaus J, Andersson A, Broman T, Bäckman S, Granberg M, Karlsson L, et al. Francisella tularensis subspecies holarctica occurs in Swedish mosquitoes, persists through the developmental stages of laboratory-infected mosquitoes and is transmissible during blood feeding. *Microb Ecol.* janv 2014;67(1):96-107.
80. Výrosteková V. [Transstadial transmission of Francisella tularensis by Ixodes ricinus ticks infected during the nymphal stage]. *Epidemiol Mikrobiol Imunol Cas Spolecnosti Epidemiol Mikrobiol Ceske Lek Spolecnosti JE Purkyne.* déc 1994;43(4):166-70.
81. Bäckman S, Näslund J, Forsman M, Thelaus J. Transmission of tularemia from a water source by transstadial maintenance in a mosquito vector. *Sci Rep.* 22 janv 2015;5:7793.
82. Broman T, Thelaus J, Andersson A-C, Bäckman S, Wikström P, Larsson E, et al. Molecular Detection of Persistent Francisella tularensis Subspecies holarctica in Natural Waters. *Int J Microbiol.* 2011;2011.

83. Kilic S, Birdsell DN, Karagöz A, Çelebi B, Bakkaloglu Z, Arikan M, et al. Water as Source of Francisella tularensis Infection in Humans, Turkey. *Emerg Infect Dis.* déc 2015;21(12):2213-6.
84. El-Etr SH, Margolis JJ, Monack D, Robison RA, Cohen M, Moore E, et al. Francisella tularensis type A strains cause the rapid encystment of Acanthamoeba castellanii and survive in amoebal cysts for three weeks postinfection. *Appl Environ Microbiol.* déc 2009;75(23):7488-500.
85. Maurin M, Pelloux I, Brion JP, Del Banõ J-N, Picard A. Human tularemia in France, 2006-2010. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* nov 2011;53(10):e133-141.
86. Lang S, Kleines M. Two at one blow: reemergence of tularemia in Upper Austria. *New Microbiol.* juill 2012;35(3):349-52.
87. Splettstoesser WD, Piechotowski I, Buckendahl A, Frangoulidis D, Kaysser P, Kratzer W, et al. Tularemia in Germany: the tip of the iceberg? *Epidemiol Infect.* mai 2009;137(5):736-43.
88. Reintjes R, Dedushaj I, Gjini A, Jorgensen TR, Cotter B, Lieftucht A, et al. Tularemia outbreak investigation in Kosovo: case control and environmental studies. *Emerg Infect Dis.* janv 2002;8(1):69-73.
89. Kantardjiev T, Ivanov I, Velinov T, Padeshki P, Popov B, Nenova R, et al. Tularemia outbreak, Bulgaria, 1997-2005. *Emerg Infect Dis.* avr 2006;12(4):678-80.
90. Rydén P, Björk R, Schäfer ML, Lundström JO, Petersén B, Lindblom A, et al. Outbreaks of tularemia in a boreal forest region depends on mosquito prevalence. *J Infect Dis.* 15 janv 2012;205(2):297-304.
91. Eden J-S, Rose K, Ng J, Shi M, Wang Q, Sintchenko V, et al. Francisella tularensis ssp. holarctica in Ringtail Possums, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2017;23(7):1198-201.
92. Hestvik G, Warns-Petit E, Smith LA, Fox NJ, Uhlhorn H, Artois M, et al. The status of tularemia in Europe in a one-health context: a review. *Epidemiol Infect.* juill 2015;143(10):2137-60.
93. Meshcheryakova IS, Mikhailova TV, Demidova TN, Kormilitsyna MI. [THE EPIZOOTIC AND EPIDEMIC ACTIVITY OF NATURAL TULAREMIA FOCI OF DIFFERENT LANDSCAPE EPIDEMIOLOGICAL TYPES IN 2009-2014]. *Med Parazitol (Mosk).* mars 2016;(1):42-6.
94. Pérez-Castrillón JL, Bachiller-Luque P, Martín-Luquero M, Mena-Martín FJ, Herreros V. Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am.* 15 août 2001;33(4):573-6.
95. Desvars A, Furberg M, Hjertqvist M, Vidman L, Sjöstedt A, Rydén P, et al. Epidemiology and ecology of tularemia in Sweden, 1984-2012. *Emerg Infect Dis.* janv 2015;21(1):32-9.

96. Faber M, Heuner K, Jacob D, Grunow R. Tularemia in Germany-A Re-emerging Zoonosis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:40.
97. Mailles A, Vaillant V. 10 years of surveillance of human tularaemia in France. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 13 nov 2014;19(45):20956.
98. Hepburn MJ, Simpson AJH. Tularemia: current diagnosis and treatment options. *Expert Rev Anti Infect Ther.* avr 2008;6(2):231-40.
99. Prudent E, La Scola B, Drancourt M, Angelakis E, Raoult D. Molecular strategy for the diagnosis of infectious lymphadenitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* juin 2018;37(6):1179-86.
100. Karatuna O, Celebi B, Can S, Akyar I, Kilic S. The use of Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in the identification of *Francisella tularensis*. *Bosn J Basic Med Sci.* 15 janv 2016;16(2):132-8.
101. Harik NS. Tularemia: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Pediatr Ann.* juill 2013;42(7):288-92.
102. Yanes H, Hennebique A, Pelloux I, Boisset S, Bicout DJ, Caspar Y, et al. Evaluation of In-House and Commercial Serological Tests for Diagnosis of Human Tularemia. *J Clin Microbiol.* janv 2018;56(1).
103. Thomas R, Johansson A, Neeson B, Isherwood K, Sjöstedt A, Ellis J, et al. Discrimination of human pathogenic subspecies of *Francisella tularensis* by using restriction fragment length polymorphism. *J Clin Microbiol.* janv 2003;41(1):50-7.
104. Skottman T, Piiparinen H, Hyytiäinen H, Myllys V, Skurnik M, Nikkari S. Simultaneous real-time PCR detection of *Bacillus anthracis*, *Francisella tularensis* and *Yersinia pestis*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* mars 2007;26(3):207-11.
105. Sjöstedt A, Sandström G, Tärnvik A, Jaurin B. Nucleotide sequence and T cell epitopes of a membrane protein of *Francisella tularensis*. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 juill 1990;145(1):311-7.
106. Fulop M, Leslie D, Titball R. A rapid, highly sensitive method for the detection of *Francisella tularensis* in clinical samples using the polymerase chain reaction. *Am J Trop Med Hyg.* avr 1996;54(4):364-6.
107. Thelaus J, Andersson A, Mathisen P, Forslund A-L, Noppa L, Forsman M. Influence of nutrient status and grazing pressure on the fate of *Francisella tularensis* in lake water. *FEMS Microbiol Ecol.* janv 2009;67(1):69-80.
108. Birdsell DN, Vogler AJ, Buchhagen J, Clare A, Kaufman E, Naumann A, et al. TaqMan real-time PCR assays for single-nucleotide polymorphisms which identify *Francisella tularensis* and its subspecies and subpopulations. *PloS One.* 2014;9(9):e107964.

109. Versage JL, Severin DDM, Chu MC, Petersen JM. Development of a multitarget real-time TaqMan PCR assay for enhanced detection of *Francisella tularensis* in complex specimens. *J Clin Microbiol.* déc 2003;41(12):5492-9.
110. Kugeler KJ, Pappert R, Zhou Y, Petersen JM. Real-time PCR for *Francisella tularensis* types A and B. *Emerg Infect Dis.* nov 2006;12(11):1799-801.
111. Tärnvik A, Chu MC. New Approaches to Diagnosis and Therapy of Tularemia. *Ann N Y Acad Sci.* 1 juin 2007;1105(1):378-404.
112. Dennis DT, Inglesby TV, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, et al. Tularemia as a biological weapon: medical and public health management. *JAMA.* 6 juin 2001;285(21):2763-73.
113. Dentan C, Pavese P, Pelloux I, Boisset S, Brion J-P, Stahl J-P, et al. Treatment of tularemia in pregnant woman, France. *Emerg Infect Dis.* juin 2013;19(6):996-8.
114. Urich SK, Petersen JM. In vitro susceptibility of isolates of *Francisella tularensis* types A and B from North America. *Antimicrob Agents Chemother.* juin 2008;52(6):2276-8.
115. Caspar Y, Hennebique A, Maurin M. Antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* strains isolated from tularaemia patients in France between 2006 and 2016. *J Antimicrob Chemother.* 14 déc 2017;
116. Wayne P. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing—Nineteenth Informational Supplement M100-S19. CLSI. 2009.
117. Ikäheimo I, Syrjälä H, Karhukorpi J, Schildt R, Koskela M. In vitro antibiotic susceptibility of *Francisella tularensis* isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother.* août 2000;46(2):287-90.
118. Valade E, Vaissaire J, Mérens A, Hernandez E, Gros C, Le Doujet C, et al. Susceptibility of 71 French isolates of *Francisella tularensis* subsp. *holarctica* to eight antibiotics and accuracy of the Etest method. *J Antimicrob Chemother.* juill 2008;62(1):208-10.
119. Sutera V, Levert M, Burmeister WP, Schneider D, Maurin M. Evolution toward high-level fluoroquinolone resistance in *Francisella* species. *J Antimicrob Chemother.* janv 2014;69(1):101-10.
120. Jaing CJ, McLoughlin KS, Thissen JB, Zemla A, Gardner SN, Vergez LM, et al. Identification of Genome-Wide Mutations in Ciprofloxacin-Resistant *F. tularensis* LVS Using Whole Genome Tiling Arrays and Next Generation Sequencing. *PloS One.* 2016;11(9):e0163458.
121. Loveless BM, Yermakova A, Christensen DR, Kondig JP, Heine HS, Wasieloski LP, et al. Identification of ciprofloxacin resistance by SimpleProbe, High Resolution Melt and Pyrosequencing nucleic acid analysis in biothreat agents: *Bacillus anthracis*, *Yersinia pestis* and *Francisella tularensis*. *Mol Cell Probes.* juin 2010;24(3):154-60.

122. Toth M, Frase H, Antunes NT, Vakulenko SB. Novel aminoglycoside 2''-phosphotransferase identified in a gram-negative pathogen. *Antimicrob Agents Chemother.* janv 2013;57(1):452-7.
123. Bina XR, Wang C, Miller MA, Bina JE. The Bla2 beta-lactamase from the live-vaccine strain of *Francisella tularensis* encodes a functional protein that is only active against penicillin-class beta-lactam antibiotics. *Arch Microbiol.* sept 2006;186(3):219-28.
124. Bina XR, Lavine CL, Miller MA, Bina JE. The AcrAB RND efflux system from the live vaccine strain of *Francisella tularensis* is a multiple drug efflux system that is required for virulence in mice. *FEMS Microbiol Lett.* févr 2008;279(2):226-33.
125. Karlsson E, Golovliov I, Lärkeryd A, Granberg M, Larsson E, Öhrman C, et al. Clonality of erythromycin resistance in *Francisella tularensis*. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(10):2815-23.
126. Tezer H, Ozkaya-Parlakay A, Aykan H, Erkocoglu M, Gülhan B, Demir A, et al. Tularemia in children, Turkey, September 2009-November 2012. *Emerg Infect Dis.* janv 2015;21(1):1-7.
127. Karlı A, Şensoy G, Paksu Ş, Korkmaz MF, Ertuğrul Ö, Karlı R. Treatment-failure tularemia in children. *Korean J Pediatr.* févr 2018;61(2):49-52.
128. Sutura V, Hoarau G, Renesto P, Caspar Y, Maurin M. In vitro and in vivo evaluation of fluoroquinolone resistance associated with DNA gyrase mutations in *Francisella tularensis*, including in tularaemia patients with treatment failure. *Int J Antimicrob Agents.* sept 2017;50(3):377-83.
129. Leshner GY, Froelich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage RP. 1,8-NAPHTHYRIDINE DERIVATIVES. A NEW CLASS OF CHEMOTHERAPEUTIC AGENTS. *J Med Pharm Chem.* sept 1962;91:1063-5.
130. MUYLAERT A, MAINIL JG. Quinolones et fluoroquinolones : des décennies de développement et d'utilisation Le point sur les molécules vétérinaires. *Ann. Méd. Vét.* 2014;73-87.
131. Capranico G, Marinello J, Chillemi G. Type I DNA Topoisomerases. *J Med Chem.* 23 mars 2017;60(6):2169-92.
132. Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, Serre M-C. Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie.* avr 2007;89(4):427-46.
133. Nagaraja V, Godbole AA, Henderson SR, Maxwell A. DNA topoisomerase I and DNA gyrase as targets for TB therapy. *Drug Discov Today.* 1 mars 2017;22(3):510-8.
134. Khan T, Sankhe K, Suvarna V, Sherje A, Patel K, Dravyakar B. DNA gyrase inhibitors: Progress and synthesis of potent compounds as antibacterial agents. *Biomed Pharmacother.* 1 juill 2018;103:923-38.

135. Berger JM. Type II DNA topoisomerases. *Curr Opin Struct Biol.* 1 févr 1998;8(1):26-32.
136. Piton J, Petrella S, Delarue M, André-Leroux G, Jarlier V, Aubry A, et al. Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase. *PloS One.* 18 août 2010;5(8):e12245.
137. Bush NG, Evans-Roberts K, Maxwell A. DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus.* 2015;6(2).
138. Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea MH, Nash HA. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* nov 1976;73(11):3872-6.
139. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:369-413.
140. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 18 mars 2014;53(10):1565-74.
141. Blower TR, Williamson BH, Kerns RJ, Berger JM. Crystal structure and stability of gyrase-fluoroquinolone cleaved complexes from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16 févr 2016;113(7):1706-13.
142. Piton J, Petrella S, Delarue M, André-Leroux G, Jarlier V, Aubry A, et al. Structural insights into the quinolone resistance mechanism of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase. *PloS One.* 18 août 2010;5(8):e12245.
143. Hooper DC, Jacoby GA. Topoisomerase Inhibitors: Fluoroquinolone Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1 sept 2016;6(9).
144. Redgrave LS, Sutton SB, Webber MA, Piddock LJV. Fluoroquinolone resistance: mechanisms, impact on bacteria, and role in evolutionary success. *Trends Microbiol.* août 2014;22(8):438-45.
145. La Scola B, Elkarkouri K, Li W, Wahab T, Fournous G, Rolain J-M, et al. Rapid comparative genomic analysis for clinical microbiology: the *Francisella tularensis* paradigm. *Genome Res.* mai 2008;18(5):742-50.
146. Correia S, Poeta P, Hébraud M, Capelo JL, Igrejas G. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol.* 2017;66(5):551-9.
147. Routh MD, Zalucki Y, Su C-C, Long F, Zhang Q, Shafer WM, et al. Efflux pumps of the resistance-nodulation-division family: A perspective of their structure, function and regulation in gram-negative bacteria. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 2011;77:109-46.
148. Wang H, Dzink-Fox JL, Chen M, Levy SB. Genetic Characterization of Highly Fluoroquinolone-Resistant Clinical *Escherichia coli* Strains from China: Role of *acrR* Mutations. *Antimicrob Agents Chemother.* mai 2001;45(5):1515-21.

149. Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, Macielag M, Abbanat D, Park CH, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nat Med.* janv 2006;12(1):83-8.
150. Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Arakawa Y. Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* avr 2008;52(4):1564-6.
151. Hansen LH, Johannesen E, Burmølle M, Sørensen AH, Sørensen SJ. Plasmid-Encoded Multidrug Efflux Pump Conferring Resistance to Olaquinox in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2004;48(9):3332-7.
152. Filloux A, Vallet I. [Biofilm: set-up and organization of a bacterial community]. *Med Sci MS.* janv 2003;19(1):77-83.
153. Roux A, Ghigo JM. Les biofilms bactériens. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*; 2006.
154. Lebeaux D, Ghigo JM. Les biofilms : d'intraitables adversaires. *BioFutur.* 2013;32/341:34-9.
155. Durham-Colleran MW, Verhoeven AB, van Hoek ML. *Francisella novicida* forms in vitro biofilms mediated by an orphan response regulator. *Microb Ecol.* avr 2010;59(3):457-65.
156. Abu Khweek A, Amer AO. Factors Mediating Environmental Biofilm Formation by *Legionella pneumophila*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:38.
157. Verhoeven AB, Durham-Colleran MW, Pierson T, Boswell WT, Van Hoek ML. *Francisella philomiragia* biofilm formation and interaction with the aquatic protist *Acanthamoeba castellanii*. *Biol Bull.* oct 2010;219(2):178-88.
158. Margolis JJ, El-Etr S, Joubert L-M, Moore E, Robison R, Rasley A, et al. Contributions of *Francisella tularensis* subsp. *novicida* chitinases and Sec secretion system to biofilm formation on chitin. *Appl Environ Microbiol.* janv 2010;76(2):596-608.
159. Lebeaux D, Ghigo J-M. [Management of biofilm-associated infections: what can we expect from recent research on biofilm lifestyles?]. *Med Sci MS.* sept 2012;28(8-9):727-39.
160. Matrat S, Aubry A, Mayer C, Jarlier V, Cambau E. Mutagenesis in the alpha3alpha4 GyrA helix and in the Toprim domain of GyrB refines the contribution of *Mycobacterium tuberculosis* DNA gyrase to intrinsic resistance to quinolones. *Antimicrob Agents Chemother.* août 2008;52(8):2909-14.
161. Mustaev A, Malik M, Zhao X, Kurepina N, Luan G, Opegard LM, et al. Fluoroquinolone-gyrase-DNA complexes: two modes of drug binding. *J Biol Chem.* 2 mai 2014;289(18):12300-12.

162. Twine S, Byström M, Chen W, Forsman M, Golovliov I, Johansson A, et al. A mutant of *Francisella tularensis* strain SCHU S4 lacking the ability to express a 58-kilodalton protein is attenuated for virulence and is an effective live vaccine. *Infect Immun.* déc 2005;73(12):8345-52.
163. Nallaparaju KC, Yu J-J, Rodriguez SA, Zogaj X, Manam S, Guentzel MN, et al. Evasion of IFN- γ signaling by *Francisella novicida* is dependent upon *Francisella* outer membrane protein C. *PLoS One.* 31 mars 2011;6(3):e18201.
164. Lindgren H, Honn M, Golovlev I, Kadzhaev K, Conlan W, Sjöstedt A. The 58-kilodalton major virulence factor of *Francisella tularensis* is required for efficient utilization of iron. *Infect Immun.* oct 2009;77(10):4429-36.
165. Salomonsson E, Kuoppa K, Forslund A-L, Zingmark C, Golovliov I, Sjöstedt A, et al. Reintroduction of two deleted virulence loci restores full virulence to the live vaccine strain of *Francisella tularensis*. *Infect Immun.* août 2009;77(8):3424-31.
166. Sen B, Meeker A, Ramakrishnan G. The *fsIE* homolog, *FTL_0439* (*fupA/B*), mediates siderophore-dependent iron uptake in *Francisella tularensis* LVS. *Infect Immun.* oct 2010;78(10):4276-85.
167. Ramakrishnan G, Sen B. The *FupA/B* protein uniquely facilitates transport of ferrous iron and siderophore-associated ferric iron across the outer membrane of *Francisella tularensis* live vaccine strain. *Microbiol Read Engl.* févr 2014;160(Pt 2):446-57.
168. Pasquaroli S, Zandri G, Vignaroli C, Vuotto C, Donelli G, Biavasco F. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J Antimicrob Chemother.* août 2013;68(8):1812-7.
169. Szoka F, Olson F, Heath T, Vail W, Mayhew E, Papahadjopoulos D. Preparation of unilamellar liposomes of intermediate size (0.1-0.2 μmol) by a combination of reverse phase evaporation and extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta.* 2 oct 1980;601(3):559-71.
170. Devos S, Van Putte W, Vitse J, Van Driessche G, Stremersch S, Van Den Broek W, et al. Membrane vesicle secretion and prophage induction in multidrug-resistant *Stenotrophomonas maltophilia* in response to ciprofloxacin stress. *Environ Microbiol.* oct 2017;19(10):3930-7.
171. Bauwens A, Kunsmann L, Karch H, Mellmann A, Bielaszewska M. Antibiotic-Mediated Modulations of Outer Membrane Vesicles in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 and O157:H7. *Antimicrob Agents Chemother.* sept 2017;61(9).
172. Fleming D, Rumbaugh KP. Approaches to Dispersing Medical Biofilms. *Microorganisms* [Internet]. 1 avr 2017 [cité 2 juill 2018];5(2). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5488086/>
173. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science.* 22 févr 2002;295(5559):1487-1487.

174. Waryah CB, Wells K, Ulluwishewa D, Chen-Tan N, Gogoi-Tiwari J, Ravensdale J, et al. In Vitro Antimicrobial Efficacy of Tobramycin Against *Staphylococcus aureus* Biofilms in Combination With or Without DNase I and/or Dispersin B: A Preliminary Investigation. *Microb Drug Resist Larchmt N. avr* 2017;23(3):384-90.
175. Lebeaux D, Leflon-Guibout V, Ghigo J-M, Beloin C. In vitro activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or l-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections. *J Antimicrob Chemother.* 2015;70(6):1704-12.