



**HAL**  
open science

# Analyse comparative de la dynamique de deux éléments intégratifs conjugatifs de streptococcus thermophilus

Nicolas Carraro

► **To cite this version:**

Nicolas Carraro. Analyse comparative de la dynamique de deux éléments intégratifs conjugatifs de streptococcus thermophilus. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2011. Français. NNT : 2011NAN10080 . tel-01746210

**HAL Id: tel-01746210**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746210v1>**

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARÉ

Mention : "Sciences de la Vie"

par **Nicolas CARRARO**

**Analyse comparative de la dynamique de deux  
éléments intégratifs conjugatifs de *Streptococcus thermophilus*.**

le 5 Décembre 2011

**Membres du jury :**

Rapporteurs :	<b>M. Eduardo ROCHA</b>	Directeur de recherches CNRS, Institut Pasteur, Paris
	<b>M. Jan Roelof VAN DER MEER</b>	Professeur, Université de Lausanne
Examineurs :	<b>Mme Christine CITTI</b>	Président du jury Directeur de recherches INRA, Toulouse
	<b>M. Pierre LEBLOND</b>	Professeur, Nancy Université
	<b>M. Gérard GUEDON</b>	Maître de conférences, HDR, Nancy Université
	<b>Mme Virginie LIBANTE</b>	Maître de conférences, Nancy Université
Membres invités:	<b>M. Bernard DECARIS</b>	Professeur, Nancy Université
	<b>M. Christophe MERLIN</b>	Maître de conférences, Nancy Université
	<b>Mme Florence BOURGOIN</b>	Maître de conférences, Nancy Université





## **Abréviations :**

aa : acide aminé

ADNc : ADN complémentaire résultant de la rétrotranscription d'un ARN

ADNg : ADN génomique

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

CIME : élément intégratif mobilisable en *cis* (Cis Mobilizable Element)

CRISPR : ensemble de répétitions palindromiques de petite taille régulièrement espacées (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)

GTA : agent de transfert de gènes (Gene Transfer Agent)

Hfr : haute fréquence de recombinaison (High frequency of recombination)

HTH : motif hélice-coude-hélice (Helix-turn-Helix)

ICE : élément intégratif et conjugatif (Integrative and Conjugative Element)

IME : élément intégratif mobilisable en *trans* (Integrative Mobilizable Element)

IS : séquence d'insertion (Inserting Sequence)

kb : kilobases

Mb : Mégabases

MCD : Milieu Chimiquement Défini

MGI : îlot génomique mobilisable (Mobilizable Genomic Island)

MMC : MitoMycine C

pb : paire de bases

RDF : facteur modulant le sens de la réaction de recombinaison (Recombination Direction Factor)

RM : Restriction Modification

TA : Toxine-Antitoxine

UFC : Unité Formant Colonie



## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>1</b>
<b>1 Transfert horizontal. ....</b>	<b>4</b>
1.1 Mécanismes de transfert de l'ADN.....	5
1.1.1 Transformation.....	5
1.1.2 Transduction.....	6
1.1.3 Conjugaison.....	6
1.1.4 Nanotubes intercellulaires.....	6
1.2 Maintien de l'ADN acquis.....	7
1.2.1 Intégration.....	7
1.2.2 Maintien sous forme extrachromosomique.....	8
1.2.2.1 Réplication.....	8
1.2.2.2 Ségrégation.....	9
<b>2 Eléments génétiques mobiles.....</b>	<b>10</b>
2.1 Eléments transposables.....	10
2.1.1 Séquences d'insertion.....	11
2.1.2 Transposons.....	11
2.2 Plasmides.....	12
2.3 Prophages.....	13
2.4 Structure des éléments génétiques mobiles et ses implications.....	14
2.4.1 Modularité.....	14
2.4.2 Modularité et classification.....	16
2.5 Ilots génomiques.....	16
<b>3 ICE : des îlots génomiques particuliers.....</b>	<b>17</b>
3.1 Transfert conjugatif des ICE.....	19
3.1.1 Excision et intégration des ICE.....	19
3.1.2 Transfert de l'ADN.....	21
3.1.2.1 Pore de conjugaison.....	21
3.1.2.2 Transfert de l'ADN simple brin.....	23
3.1.2.3 Transfert d'ADN double brin.....	25
3.2 Autres mécanismes de maintien après transfert.....	25
3.3 Barrières au transfert et au maintien.....	26
3.3.1 Systèmes d'exclusion.....	26
3.3.2 Dégradation de l'ADN entrant.....	27
3.3.2.1 Systèmes de restriction-modification.....	27
3.3.2.2 Loci CRISPR.....	27
3.3.3 Répression de l'activité de l'élément.....	29
3.3.4 Immunité de cible.....	29
3.4 Maintien à long terme dans la population.....	30
3.4.1 Fonctions égoïstes assurant la sélection au niveau de l'élément.....	30
3.4.2 Apport de fonctions avantageuses : sélection au niveau de l'hôte.....	31
<b>4 Régulation.....</b>	<b>33</b>
4.1 Agents endommageant l'ADN.....	33
4.1.1 Régulateurs de type cI.....	33
4.1.2 Régulateurs de type ImmR.....	34
4.2 Quorum sensing.....	35
4.3 Phase de croissance.....	37
4.4 Induction par les conditions dans lesquelles la possession de l'élément est avantageuse.....	38
4.5 Bistabilité et la stochasticité.....	40
<b>5 Interactions avec l'hôte.....</b>	<b>42</b>
5.1 Impact de l'hôte.....	42
5.1.1 Protéines associées au nucléoïde.....	42



5.1.2 Système protéasique ClpXP.....	43
5.2 Impact des ICE sur les éléments présents dans la cellule.....	44
5.2.1 Mobilisation en <i>trans</i> .....	44
5.2.2 Mobilisation en <i>cis</i> .....	45
5.3 Impact des ICE sur la cellule.....	47
5.3.1 Impact régulateur de l'élément.....	47
5.3.2 Activation du système SOS.....	47
5.3.3 Production de messagers intracellulaires.....	48
<b>6 <i>Streptococcus thermophilus</i>.....</b>	<b>48</b>
6.1 Evolution de <i>S. thermophilus</i> .....	49
6.2 Ilots génomiques de <i>S. thermophilus</i> .....	50
<b>Résultats.....</b>	<b>57</b>
<b>1 Conditions de cultures.....</b>	<b>60</b>
<b>2 Analyses transcriptionnelles.....</b>	<b>61</b>
2.1 Cartographie transcriptionnelle d'ICESt1 et ICESt3.....	62
2.1.1 Analyse <i>in silico</i> .....	62
2.1.2 Analyse par RT-PCR de la région core.....	62
2.1.3 Détermination des points +1 de transcription de la région core.....	65
2.1.4 Clivage du transcrit des modules de conjugaison et de recombinaison.....	67
2.2 Activité transcriptionnelle des ICE.....	72
2.2.1 Quantification du transcrit des modules de conjugaison et recombinaison.....	72
2.2.2 Quantification des transcrits du module de régulation.....	74
<b>3 Analyse fonctionnelle d'ICESt1 et ICESt3.....</b>	<b>74</b>
3.1. Quantification de l'excision.....	75
3.1.1 Effet de la phase de croissance.....	75
3.1.2 Effet des agents endommageant l'ADN.....	75
3.1.3 Effet du milieu de culture.....	76
3.2 Nombre de copies extrachromosomiques d'ICESt3.....	76
3.3 Nombre total de copies d'ICESt1 et ICESt3.....	77
3.4 Effet de souche sur l'activité des ICE.....	78
3.4.1 Activité d'ICESt3 chez LMG18311.....	79
3.4.2 Activité d'ICESt3 chez CNRZ368.....	82
<b>Article.....</b>	<b>83</b>
<b>Figures de l'article.....</b>	<b>107</b>
<b>4 Analyse de la région core d'ICESt3.....</b>	<b>116</b>
4.1 Construction de l'élément MiniICESt3spec.....	116
4.1.1 Obtention des vecteurs.....	118
4.1.2 Obtention de l'ICE composite CIMEVarcat-MiniICESt3spec.....	120
4.1.3 Dynamique de CIMEVarcat-MiniICESt3spec.....	121
4.1.4 Obtention de MiniICESt3spec.....	123
4.2 Stabilité des éléments.....	124
4.2.1 Stabilité de la structure CIMEVarcat-MiniICESt3spec.....	125
4.2.2 Stabilité de MiniICESt3spec.....	125
4.3 Dynamique de MiniICESt3.....	126
4.3.1 Excision.....	126
4.3.2 Réplication.....	126
4.3.3 Instabilité génétique de MiniICESt3spec.....	127
4.3.4 Nature des copies multiples de MiniICESt3spec.....	129
4.3.4.1 Détermination des formes présentes.....	129
4.3.4.2 Quantification des formes présentes.....	132
4.3.5 Régulation de MiniICESt3spec.....	133
4.3.5.1 Effet des dommages à l'ADN.....	133
4.3.5.2 Effet de la région variable.....	134
<b>5 Acteurs moléculaires de la régulation d'ICESt1 et ICESt3.....</b>	<b>136</b>
5.1 ICESt1 et ICESt3 : modèles d'une nouvelle famille d'ICE de Streptocoques.....	136

5.2 Analyse des régulateurs.....	137
5.2.1 Etude génétique.....	138
5.2.2 Etude protéique.....	139
5.2.2.1 Purification des régulateurs putatifs.....	139
5.2.2.2 Coexpression des régulateurs in vivo.....	140
<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>145</b>
<b>1 Organisation et activité des ICE de <i>S. thermophilus</i>.....</b>	<b>147</b>
1.1 Organisation transcriptionnelle.....	147
1.2 ORF conservées du module de régulation.....	148
1.2.1 Des régulateurs putatifs codés par des ORF essentielles ?.....	149
1.2.2 Analyse protéique des régulateurs.....	150
1.3 ORF spécifiques du module de régulation.....	150
1.4 Eléments apparentés à ICE <i>St1</i> et ICE <i>St3</i> .....	151
<b>2 Activité d'ICE<i>St1</i> et ICE<i>St3</i>.....</b>	<b>152</b>
2.1 Régulation transcriptionnelle.....	153
2.2 Régulation post-transcriptionnelle.....	153
2.3 Effet de souche au sein de l'espèce d'origine.....	155
2.4 Réplication d'ICE <i>St3</i> .....	155
<b>3 MiniICE<i>St3spec</i> : élément fonctionnel et modèle d'étude de la réplication.....</b>	<b>156</b>
3.1 Fonctionnalité de la région core d'ICE <i>St3</i> .....	157
3.2 Régulation de la réplication de la région core.....	157
3.3 Rôle de la réplication de MiniICE <i>St3spec</i> dans son maintien ?.....	158
3.4 MiniICE <i>St3spec</i> : modèle d'étude de la réplication des ICE chez <i>S. thermophilus</i> ?.....	159
<b>4 ICE et réplication intracellulaire.....</b>	<b>160</b>
4.1 Réplication intracellulaire chez les ICE : une caractéristique répandue ?.....	160
4.2 Mécanisme de réplication intracellulaire des ICE.....	161
4.3 Similarités et différences entre les plasmides conjugatifs et les ICE.....	161
4.3.1 Réplication.....	162
4.3.2 Ségrégation.....	162
<b>Références.....</b>	<b>165</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>191</b>
<b>Communications orales.....</b>	<b>193</b>
<b>Communications écrites.....</b>	<b>195</b>
<b>Vecteurs de clonage.....</b>	<b>198</b>
pSL1180.....	198
pET-15b.....	199
pCDFDuet-1.....	200
<b>Résumés.....</b>	<b>201</b>



# **INTRODUCTION**



L'étude des bactéries a montré très tôt que celles-ci pouvaient évoluer extrêmement rapidement face à des variations de l'environnement. Ainsi, Alexander Flemming a observé, en conditions de laboratoire, l'apparition de souches bactériennes résistantes à la pénicilline qui correspondaient à l'émergence et la sélection de résistants spontanés (102). Lors de son discours réalisé à l'occasion de la remise du prix Nobel, il pointait déjà ce qui allait devenir un problème majeur lié à l'adaptation rapide des organismes microbiens " *It is not difficult to make microbes resistant to penicillin [...] The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then, there is the danger that the ignorant man may easily under-dose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug educate them to resist penicillin*". En effet, l'utilisation des antibiotiques a également conduit à l'apparition très rapide de bactéries résistantes dans l'environnement naturel. On pensait que cette évolution était due à l'apparition de nouveaux allèles par mutation, la sélection naturelle assurant ensuite le maintien des allèles conférant une valeur adaptative accrue à l'organisme et augmentant leur fréquence au cours des générations.

Cependant, les données ultérieures ont montré que l'évolution rapide des bactéries, et particulièrement l'acquisition de résistances aux antibiotiques, était en grande partie due à l'apport de nouveaux gènes par transfert horizontal. Le transfert horizontal correspond à l'acquisition d'information génétique provenant d'un organisme sans en être le descendant direct, par opposition au transfert vertical qui correspond à l'héritage de l'ensemble de l'information génétique de la cellule mère. La comparaison des génomes de la même espèce bactérienne a généralement révélé un polymorphisme très important lié au transfert horizontal. Ainsi, l'analyse du génome de 17 souches d'*Escherichia coli* a révélé qu'à côté d'un ensemble de 2200 gènes conservés entre les souches (génome « core »), en moyenne 56 % des gènes totaux d'une souche étaient absents d'au moins une partie des autres souches (gènes « variables ») (252). L'ensemble des gènes variables de toutes les souches constitue un réservoir (« pool » flexible) de gènes qui sont échangés par transfert horizontal. Les gènes core et le pool flexible constituent le pangénome d'une espèce bactérienne, pangénome qui peut s'enrichir de gènes acquis par transfert horizontal à partir d'autres espèces. Habituellement, les génomes bactériens sont extrêmement dynamiques et sont modélés par l'acquisition mais également la perte de gènes (229). Toutefois, seuls des événements récents de transfert horizontal et/ou ayant eu un succès évolutif suffisant pour être conservés peuvent être détectés (289). De ce fait, bien que ces études révèlent de très nombreux transferts, elles sous-estiment les flux d'information génétique qui se produisent réellement dans les populations bactériennes.

# 1 Transfert horizontal.

Le transfert horizontal de l'ADN est un processus par lequel un organisme procaryote transfère de l'ADN à un autre organisme procaryote d'une espèce différente. Ce processus est observé chez les bactéries et les archées. Il existe trois mécanismes principaux de transfert horizontal de l'ADN : la conjugaison, la transformation et la transduction.

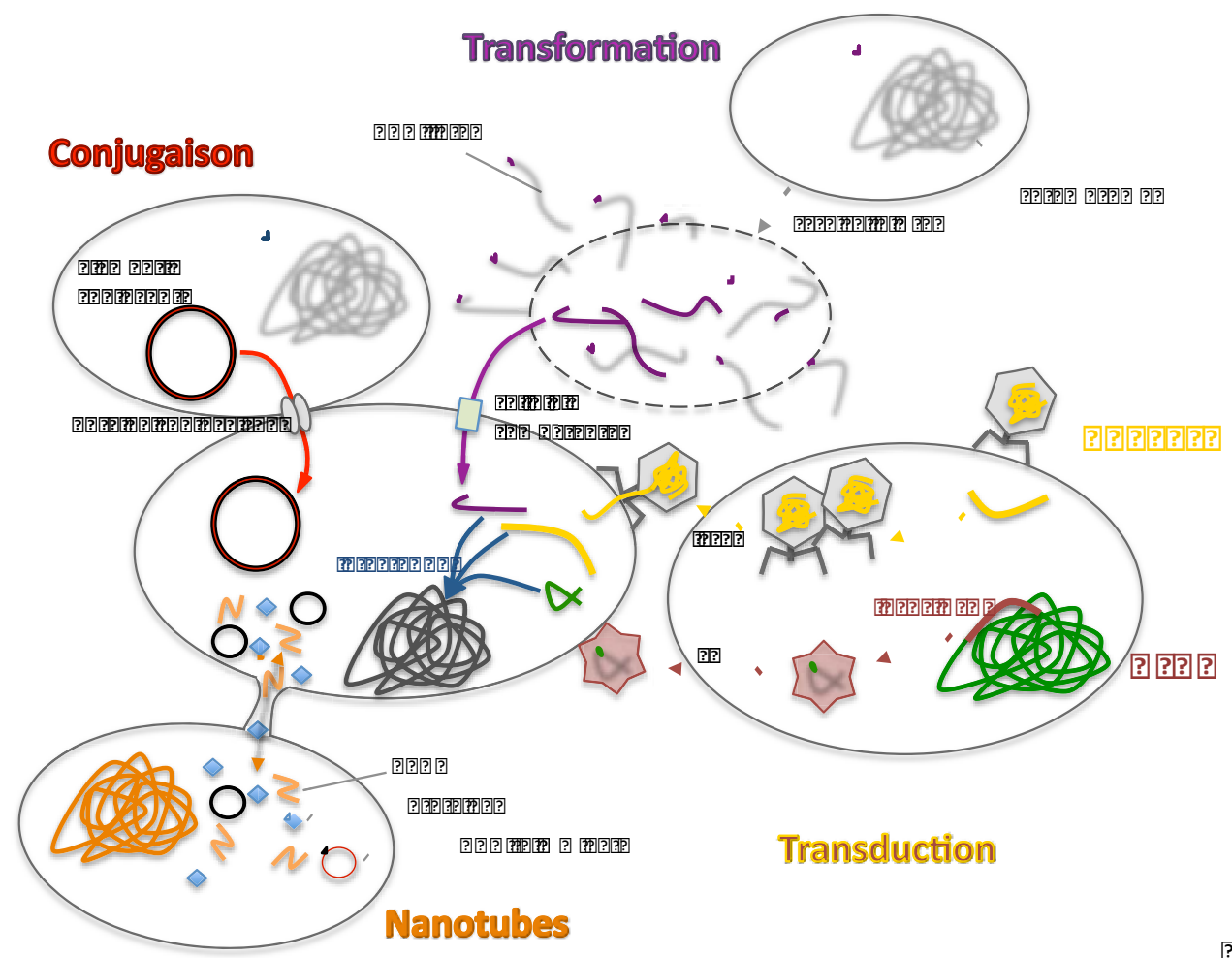
La conjugaison est un processus par lequel une bactérie donneuse transfère une copie d'un plasmide à une bactérie receveuse. Le plasmide est un petit cercle d'ADN qui peut se répliquer indépendamment du chromosome bactérien. La conjugaison est médiée par un pilus sexuel, une structure filamenteuse qui se forme entre les deux bactéries. Le plasmide est transféré à travers ce pilus.

La transformation est un processus par lequel une bactérie receveuse prend de l'ADN nu d'un environnement. L'ADN nu est libéré dans l'environnement par une bactérie donneuse morte ou en train de mourir. La bactérie receveuse prend cet ADN et l'intègre dans son génome.

La transduction est un processus par lequel un virus bactérien (phage) transfère de l'ADN d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse. Le phage injecte son ADN dans la bactérie receveuse, qui peut alors intégrer cet ADN dans son génome.

?

?



?

?

?

?

## Figure 1 : Représentation schématique des mécanismes impliqués dans le transfert d'ADN.

Les principales étapes des différents mécanismes impliqués dans le transfert de séquences d'ADN sont illustrées. La **transduction** correspond au transfert d'ADN d'une cellule à l'autre par une capsid codée par un bactériophage virulent, un bactériophage tempéré (qui peuvent être considérés comme faisant partie intégrante du génome de l'hôte) ou par les systèmes de type GTA (Gene Transfer Agent).

La **conjugaison** permet le passage d'une molécule d'ADN d'une cellule à une autre au travers d'un pore de conjugaison reliant deux cellules.

La **transformation** d'une cellule compétente implique l'internalisation active de fragments d'ADN libres.

Les **nanotubes** permettent le passage d'ARN et protéines mais également de molécules d'ADN comme les plasmides d'une cellule à une autre.

### 1.1 Mécanismes de transfert de l'ADN.

Dans la nature, les bactéries forment des communautés complexes, créant des conditions favorables aux interactions et en particulier au transfert horizontal (210). Les principaux mécanismes qui permettent les échanges de gènes sont la transformation, la conjugaison et la transduction (Figure 1). Un mécanisme de communication cellulaire impliquant des prolongements cytoplasmiques (nanotubes), récemment mis en évidence, pourrait également participer au transfert d'information génétique (95).

#### 1.1.1 Transformation.

La transformation correspond à l'acquisition d'ADN libre dans le milieu par une cellule (190). La libération dans le milieu d'ADN peut résulter de la lyse cellulaire ou d'une sécrétion active d'ADN (68, 133). Bien que ce mécanisme ne requiert pas de contact physique entre la cellule donatrice et la cellule réceptrice, cette dernière doit être en mesure d'internaliser l'ADN.

Certaines espèces bactériennes codent la mise en place d'un état physiologique particulier, la compétence, lors duquel elles peuvent importer de façon active l'ADN présent dans l'environnement (Figure 1) (69, 190). Par ailleurs, des conditions environnementales particulières mènent à la fragilisation de la paroi et de la membrane cellulaire (fréquemment obtenues en laboratoire) et peuvent de ce fait permettre le passage de l'ADN (190). Ce dernier type de transfert est donc accessible à la quasi-totalité des genres bactériens, bien que sa fréquence naturelle semble faible.



### **1.1.2 Transduction.**

Souvent décrit comme le transfert d'ADN *via* des phages (virus des bactéries), la transduction repose plus généralement sur le transfert d'information génétique par l'intermédiaire d'une capsidie protéique. L'empaquetage de l'ADN lui assure une protection ainsi qu'une efficacité de dispersion accrue (156). Ce mécanisme est extrêmement répandu au sein de tous les genres bactériens.

Les constituants de la capsidie sont généralement codés par le génome d'un phage mais peuvent également être codés par le chromosome (Figure 1) (156, 182). Le locus chromosomique GTA (Gene Transfer Agent), présent chez de nombreuses protéobactéries comme *Rhodobacter capsulatus*, code la formation d'une capsidie (175, 176, 301). Il permet l'encapsidation aléatoire de fragments du chromosome bactérien qui vont pouvoir être transférés vers d'autres cellules.

### **1.1.3 Conjugaison.**

La réplication de l'ADN ainsi que le transport de molécules au travers des membranes font partie des processus basiques de la vie d'une cellule. Le couplage de ces deux activités résulte en un mécanisme de sécrétion de l'ADN appelé conjugaison (Figure 1) (123, 189). Celle-ci repose généralement sur le passage du brin en cours de réplication par un mécanisme de cercle roulant au travers d'un transporteur membranaire vers une cellule réceptrice, aboutissant à une réplication intercellulaire de l'ADN. Le prérequis pour ce type de transfert est un contact physique prolongé entre la cellule donatrice porteuse d'une molécule d'ADN double brin circulaire à transférer et une cellule réceptrice. Alors que le contact initial se fait par l'intermédiaire d'un pilus chez les bactéries Gram négative, la conjugaison nécessite un contact aléatoire des surfaces cellulaires chez la majorité des cellules Gram positive (99, 120, 122, 137). Une structure trans-enveloppe appelée pore de conjugaison est mise en place lors d'un contact entre cellule donatrice et réceptrice. L'analyse de la distribution des systèmes de conjugaison a montré qu'ils étaient extrêmement répandus au sein des génomes bactériens (107, 126).

### **1.1.4 Nanotubes intercellulaires.**

Un mécanisme permettant l'échange de constituants entre cellules adjacentes, appartenant à la même espèce ou non, a été récemment mis en évidence (Figures 1 et 2) (95). Les ARN, protéines et même des fragments d'ADN (plasmides) peuvent ainsi passer d'une cellule à une autre. Ce transfert se fait par l'intermédiaire de structures tubulaires



Par opposition à la recombinaison homologue, la recombinaison dite illégitime correspond à des remaniements intra- ou inter-moléculaires entre des séquences sans aucune ressemblance ou présentant de courtes séquences identiques (171, 332). Cependant, l'intégration par recombinaison illégitime semble rare chez les procaryotes (266).

La transposition est un processus qui assure l'intégration d'une séquence, généralement de façon peu spécifique (242). Deux grands types de mécanismes de transposition existent, la transposition non répllicative et la transposition répllicative, et impliquent généralement une enzyme présentant un motif DDE (la transposase). Elles génèrent toutes les deux la duplication du site cible aux bornes de la séquence intégrée et impliquent donc une synthèse d'ADN.

La recombinaison site-spécifique est un ensemble de processus qui impliquent des échanges de brins entre des séquences définies et sans synthèse d'ADN (121). Elle ne nécessite pas de cofacteurs énergétiques comme l'ATP et n'entraîne pas de changements de la séquence du site cible (163). Elle repose sur l'action d'une recombinase qui reconnaît deux sites cibles, les clive et les religue. Elle peut conduire à l'intégration d'un ADN acquis, par exemple l'intégration du génome du bactériophage  $\lambda$  dans le génome d'*E. coli* (272).

## **1.2.2 Maintien sous forme extrachromosomique.**

### **1.2.2.1 Réplication.**

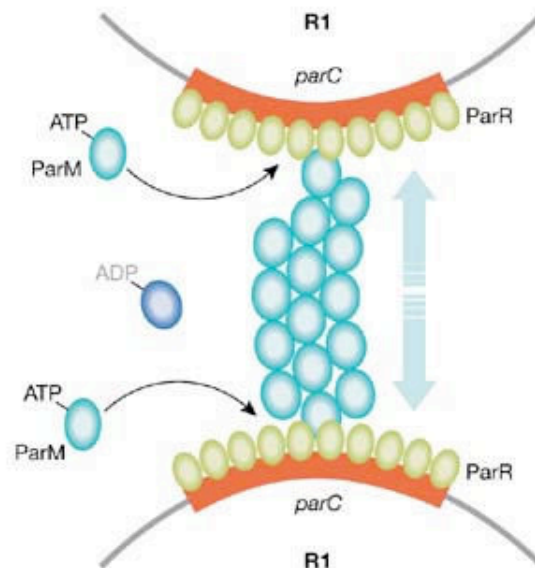
En dehors de leur intégration par recombinaison dans une molécule d'ADN répllicative, l'ADN acquis peut se maintenir sous forme extrachromosomique (réplicon autonome) et sont qualifiés de plasmides (décrits ultérieurement 2.2).

Bien que plusieurs mécanismes de réplication soient connus, ils sont toujours dépendants de facteurs de l'hôte, et en particulier de l'ADN polymérase III codée par le génome bactérien (82, 331). Les fonctions codées par le réplicon peuvent se limiter à la séquence nécessaire à l'initiation de la réplication (*oriC*) et tout ou partie des fonctions de régulation. La protéine d'initiation de la réplication (Rep) est codée par le réplicon. L'indépendance de l'amorçage de la réplication vis-à-vis de facteurs de l'hôte peut assurer son fonctionnement chez de nombreux hôtes différents, et ainsi favoriser le maintien et la dissémination du plasmide.

### 1.2.2.2 Ségrégation.

Après réplication, la ségrégation d'une copie du chromosome dans chacune des cellules filles avant la division cellulaire assure sa survie dans la population bactérienne. De façon similaire, les molécules à réplication extrachromosomique doivent assurer leur stabilité au cours des divisions cellulaires.

La répartition d'un réplicon à haut nombre de copies semble être aléatoire (338). Néanmoins, la plupart des gros plasmides possèdent un faible nombre de copies et codent un mécanisme de partition active (Figure 3) (78, 338). Celui-ci assure la bonne distribution des copies dans les cellules filles par un mécanisme similaire à celui utilisé pour la répartition des chromosomes bactériens (138).



**Figure 3 : Ségrégation du plasmide conjugatif R1 (78).**

Le complexe formé par la fixation de ParR (ellipse verte) sur la séquence *parC* (orange) stimule la croissance apicale et augmente la stabilité des filaments formés de protéines ParM (ellipse bleue turquoise) qui permettent la répartition des plasmides dans les cellules filles (larges flèches bleu/gris).

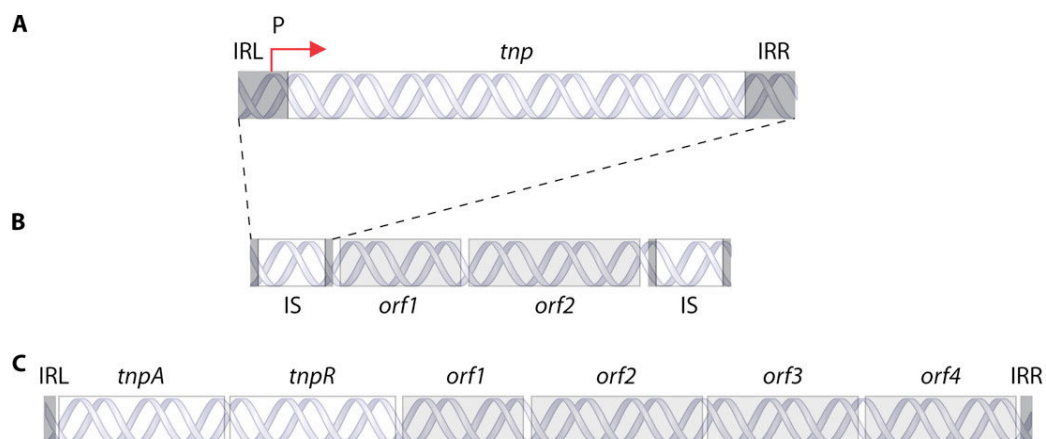
Certains mécanismes, comme la réplication dite  $\theta$ , peuvent conduire à la formation de multimères, ce qui réduit le nombre d'unités réparties dans les cellules filles. La résolution des cointégrats peut impliquer une recombinase qui participe donc également au maintien de l'élément dans la population (346).

## 2 Eléments génétiques mobiles.

Chez les bactéries, le transfert horizontal d'information génétique implique très souvent des éléments génétiques mobiles. Ces éléments sont capables de se transférer entre cellules (mobilité intercellulaire) et/ou de se maintenir après transfert (mobilité intracellulaire). Ceux-ci ont été traditionnellement répartis en 3 catégories : les éléments transposables, les plasmides et les prophages. Chacune de ces catégories se caractérise par sa capacité spécifique à se disséminer et/ou à se maintenir dans les cellules l'ayant acquis. De plus, bien que ces éléments ne soient généralement pas nécessaires à leur hôte, ils peuvent ou non conférer un avantage sélectif pouvant contribuer non seulement au succès évolutif de l'hôte, mais aussi à celui de l'élément.

### 2.1 Eléments transposables.

Les éléments transposables sont des entités génétiques qui assurent leur propre maintien par mouvement vers un ou plusieurs sites d'intégration de façon intramoléculaire (sur le même réplicon) ou intermoléculaire (réplicons différents), dans et entre les génomes (195, 262). Les gènes sauteurs ("jumping genes") ont été décrits chez le maïs par Barbara McClintock comme des séquences d'ADN capables de mouvements au sein du génome (206). Plus tard, des éléments similaires ont été mis en évidence chez les bactéries (269). Bien qu'une grande diversité existe au sein de ces éléments, les principaux éléments transposables bactériens sont les séquences d'insertion (IS) et les transposons (Tn) (Figure 4) (262).



#### **Figure 4: Représentation schématique de la structure des éléments transposables bactériens (173).**

**A** Organisation d'une séquence d'insertion (IS). Les répétitions terminales inversées sont grisées et annotées IRL (répétition inversée gauche) et IRR (répétition inversée droite). Une unique ORF codant une transposase Tnp, présentant un motif DDE, se situe entre les répétitions inversées. Le promoteur de la transposase (P) peut être partiellement compris dans IRL.

**B** Organisation d'un transposon composite. Une ou plusieurs ORF (en grisé et nommées *orf*) sont flanquées par deux IS identiques. La transposition de la portion d'ADN comprise entre les deux IS est médiée par la reconnaissance de l'IRL de l'IS de gauche et de l'IRR de l'IS de droite par la transposase codée par l'une ou l'autre des IS.

**C** Organisation d'un transposon unitaire de type Tn3. L'élément est flanqué de répétitions inversées IRL et IRR. Les gènes codant la transposase présentant un motif DDE et la recombinase sont représentés en blanc et nommés respectivement *tnpA* et *tnpR*. Les ORF non impliquées dans la transposition sont grisées et nommées *orf*.

##### **2.1.1 Séquences d'insertion.**

Les séquences d'insertion (IS) sont les éléments génétiques mobiles les plus simples capables de transposer de façon autonome (figure 4.A) (195, 196). Elles ont été identifiées dans la très grande majorité des génomes bactériens et présentent une grande diversité (286). Les IS ne codent, en effet, que des fonctions impliquées dans leur propre mobilité. La plupart des IS codent une transposase à motif DDE qui reconnaît les répétitions terminales inversées et catalyse leur insertion avec une faible spécificité, bien que des intégrations préférentielles ou spécifiques soient possibles (195, 232).

##### **2.1.2 Transposons.**

Les transposons codent d'autres fonctions que celles nécessaires à leur transposition et qui peuvent éventuellement conférer un avantage sélectif à l'hôte. Bien que de nombreux types de ces éléments se transposent par des mécanismes variés aient été identifiés, ceux-ci ont été traditionnellement répartis en deux grandes classes de transposons (Figure 4.B et C). Les transposons composites sont des séquences d'ADN flanquées d'IS apparentées et la transposase codée par ces IS peut permettre la transposition de l'ensemble (Figure 4.B) (262). La seconde classe correspond aux transposons unitaires (Figure 4.C). Ce sont des séquences d'ADN dont la plupart codent une transposase à DDE qui catalyse la transposition de l'élément par action au niveau des répétitions inversées qui le bordent (173). Certains transposons codent des fonctions utiles à l'hôte telles que des résistances aux antibiotiques, de nouvelles fonctions cataboliques ou des résistances aux métaux lourds (50, 79, 108, 152, 241).



**Figure 5: Représentation schématique du mécanisme de réplication par cercle roulant (161).**

L'amorçage de la réplication de la molécule d'ADN circulaire double brin se fait après la coupure d'un brin d'ADN au site de clivage (étoile rouge) et l'assemblage du complexe de réplication, le replisome, à l'extrémité 3'. Alors que la réplication procède de façon continue et unidirectionnelle à partir de l'extrémité 3'-OH, l'extrémité 5'-P déplacée est répliquée de façon discontinue.

Le triangle bleu sert de repère pour l'origine et le sens de réplication.

Les petits plasmides sont généralement présents en un grand nombre de copies et, en dehors de la réplication, ne codent pas de fonctions impliquées dans leur maintien dans la descendance de la cellule. Les gros plasmides sont généralement présents en un faible nombre de copies et ils codent tous d'autres fonctions impliquées dans leur maintien comme la partition active ou la résolution des multimères. Ils peuvent également coder des fonctions conférant potentiellement un avantage sélectif à l'hôte, comme une résistance aux antibiotiques ou des fonctions métaboliques. Les plus gros plasmides (> 100 kb) peuvent porter des gènes essentiels à la cellule hôte et coder des protéines essentielles, des ARNt ou encore des ARNr (101, 290).

En se basant sur leur mobilité intercellulaire, les plasmides ont été traditionnellement répartis en trois grands groupes. Beaucoup de gros plasmides, qualifiés de conjugatifs, codent les fonctions nécessaires à leur transfert par conjugaison (290). Ce mécanisme peut intervenir dans leur maintien dans la population en promouvant la réinfection d'une cellule l'ayant perdu (13, 15, 186). Les plasmides mobilisables, généralement plus petits, ne codent qu'une partie des fonctions impliquées dans leur transfert par conjugaison. Afin de se transférer, ils utilisent tout ou une partie des protéines codées par un élément conjugatif fonctionnel (mobilisation en *trans*) (256). Enfin, d'autres plasmides, généralement les plus petits, ne codent aucune fonction impliquée dans leur mobilité intercellulaire, et sont tributaires d'autres mécanismes comme la mobilisation en *cis* (290) et éventuellement la transformation (190), la transduction (4) ou peut-être les connections intercellulaires formées par les nanotubes (95).

### **2.3 Prophages.**

Les prophages sont définis comme les éléments qui codent leur propre transfert par l'intermédiaire d'une capsid. Après l'infection d'une bactérie lysogène par un phage dit tempéré, le génome de la plupart de ce type de phages peut s'intégrer dans le chromosome de l'hôte. L'élément est alors sous forme de prophage et transmis verticalement à la descendance lors des divisions cellulaires. En présence de stimuli spécifiques, le prophage intégré code son excision, sa réplication et l'encapsidation de son génome. Enfin, la lyse de la cellule assure le plus souvent sa dissémination. La quasi-totalité des prophages se



transfèrent sous forme double brin, bien que certains d'entre eux soient connus pour se transférer sous forme simple brin comme le phage CTX $\phi$ , codant la toxine cholérique chez *Vibrio cholerae* (75). Certains prophages dits satellites, comme P4 d'*E. coli* ou TLC-Kn $\phi$ 1 de *V. cholerae*, ne codent qu'une partie des fonctions nécessaires à leur transfert et utilisent les fonctions codées par d'autres phages tempérés alors qualifiés de phages « helper » (36, 136).

Les prophages peuvent coder quelques fonctions accessoires pouvant conférer un avantage sélectif à la cellule hôte comme la résistance à certains bactériophages non apparentés (41, 302). Les prophages permettent également le transfert d'information exogène autre que leur génome par des mécanismes de transduction généralisée et/ou spécialisée (314). La transduction généralisée repose sur l'encapsidation aléatoire de molécules d'ADN autres que le génome phagique tels que des fragments de chromosomes ou des plasmides. La transduction spécialisée permet la mobilisation d'une portion d'ADN à proximité du site d'insertion du phage lors de l'excision de l'élément (55).

## **2.4 Structure des éléments génétiques mobiles et ses implications.**

### **2.4.1 Modularité.**

Les éléments génétiques mobiles sont caractérisés par une organisation modulaire, les gènes et séquences impliqués dans une même fonction biologique étant regroupés dans une même région (317). Selon Lawrence et Roth (177), ce regroupement, bien qu'inutile pour l'organisme hôte, serait avantageux pour l'élément mobile. Il permet le transfert en bloc, ou l'échange entre éléments, d'une région conférant une fonction biologique. Celle-ci peut être avantageuse pour l'élément alors que le transfert ou l'échange d'un seul gène ne confère aucun avantage en l'absence des autres gènes nécessaires à cette fonction. Les différents modules d'un élément peuvent être impliqués soit dans le transfert, soit dans le maintien dans la descendance de la cellule, soit conférer un avantage sélectif à l'hôte, et par conséquent contribuer au maintien de l'élément dans la population.

Certains éléments ne sont composés que d'un seul module de maintien comme un module de transposition pour les IS ou un module de réplication pour certains petits plasmides. D'autres éléments sont composés d'assemblages de modules. Les transposons composites sont constitués de deux modules : un module de mobilité constitué des deux IS flanquant l'élément et un module d'adaptation pouvant apporter un avantage sélectif à l'hôte, comme une résistance à un antibiotique. Les plasmides conjugatifs sont généralement constitués d'assemblages de modules impliqués dans le maintien dans la descendance, le transfert intercellulaire et le maintien dans la population (78). Ainsi, le plasmide conjugatif R1 présente un module de maintien dans la descendance composé d'un



Bien que ces échanges de modules entre éléments, apparentés ou non, soient observés chez la majorité des éléments génétiques, les mécanismes impliqués dans ces échanges restent mal connus.

#### **2.4.2 Modularité et classification.**

La classification des éléments en éléments transposables, plasmides et prophages est incohérente. En effet, les éléments transposables et les plasmides sont définis sur leur module de maintien (transposition ou réplication) alors que les prophages sont définis par rapport à leur module de transfert (par l'intermédiaire d'une capsid).

Des éléments peuvent donc être à la fois des prophages et des plasmides. Ainsi, le phage Mu code des modules impliqués dans la formation de la capsid apparentés à plusieurs phages connus (tête du phage lambda et queue du phage T4), mettant en avant la notion d'échanges de modules entre éléments génétiques (213). De plus, il code un module de maintien comprenant une transposase à DDE et ses sites cibles, lui conférant ainsi les propriétés d'un transposon. Cet élément n'est néanmoins qu'un exemple de l'incohérence de la classification. En effet, d'autres éléments peuvent être à la fois des prophages et des plasmides comme N15 d'*E. coli*. Cet élément est à la fois un prophage codant les fonctions nécessaires à sa transmission par une capsid et un plasmide portant des modules de réplication et de partition active impliqués dans son maintien (255). Par ailleurs, les analyses plus récentes ont révélé de nombreux types d'éléments génétiques mobiles ne pouvant pas facilement trouver leur place dans la classification traditionnelle.

#### **2.5 Îlots génomiques.**

L'évolution par acquisition de modules par transfert horizontal et la perte de gènes a façonné les génomes bactériens et les éléments génétiques mobiles. L'étude des génomes a montré qu'une grande partie de ces séquences acquises par transfert sont groupées au niveau de régions chromosomiques particulières appelées îlots génomiques (89, 126, 129). Un îlot génomique est défini comme une région chromosomique de plus de 10 kb dont les propriétés suggèrent son acquisition par un ou plusieurs événements de transfert horizontal (128, 129).

Ainsi, un îlot génomique est généralement présent dans le génome de certaines souches d'une espèce et absente du génome d'autres souches de la même espèce (et/ou d'espèces proches), ce qui implique une acquisition récente par transfert horizontal ou une perte récente par délétion. Ils présentent généralement des caractéristiques de séquence

témoignant d'une acquisition par transfert horizontal, telles qu'un pourcentage en G+C ou une utilisation des codons différents de ceux du génome de l'organisme dans lequel ils se sont intégrés. Enfin, ils sont fréquemment insérés dans l'extrémité 3' de gènes codant un ARNt et flanqués de répétitions directes, ce qui suggère une intégration site-spécifique catalysée par une recombinase à tyrosine.

Bien que très peu de choses soient connues concernant l'origine des structures génétiques complexes que sont les îlots génomiques, l'évolution de ces éléments se ferait par réarrangements, acquisition et/ou perte de gènes/modules. Notamment, elle pourrait impliquer des réarrangements avec des éléments génétiques tels que les prophages et les plasmides avec qui ils peuvent partager des modules apparentés (234). En effet, les îlots génomiques contiennent souvent des gènes de « mobilité », comme des gènes potentiellement impliqués dans la conjugaison ou des recombinases site-spécifiques (45, 135, 200). Ces caractéristiques suggèrent fortement que certains de ces éléments ont été ou sont mobiles de façon autonome ou mobilisables par d'autres éléments.

Bien que ces éléments soient pour beaucoup probablement mobiles, ils sont généralement classés selon le type de fonctions avantageuses qu'ils confèrent à leur hôte. Ainsi, ils sont subdivisés en îlots de pathogénicité, îlots de symbiose, îlots métaboliques ou encore îlots de résistance, sans se préoccuper de la présence éventuelle de modules qui pourraient être impliqués dans la mobilité intercellulaire (conjugaison, prophage satellite, mobilisation) ou leur maintien (mobilité intracellulaire telles que la recombinaison site-spécifique ou la transposition) (143).

### 3 ICE : des îlots génomiques particuliers.

Des éléments chromosomiques capables de se transférer par conjugaison avaient reçu des dénominations hétérogènes telles que transposons conjugatifs, plasmides intégratifs, îlot de symbiose ou de pathogénicité. Tous ces éléments ont été par la suite regroupés sous le terme d'ICE pour Integrative and Conjugative Element, faisant référence à leur mécanisme de transfert et de maintien mais non à la classification traditionnelle qui semble peu appropriée (45, 46).

Les ICE sont des éléments qui se transfèrent par conjugaison, quel que soit le mécanisme, et se maintiennent par intégration dans un réplicon, quel que soit le mécanisme et la spécificité d'intégration (Figure 7). L'excision de la plupart des ICE implique une recombinase site-spécifique à tyrosine qui catalyse la recombinaison entre les séquences d'attachement *attL* et *attR* bordant l'élément, respectivement à gauche et à droite (Figure 7). Celle-ci génère une forme extrachromosomique circulaire de l'ICE portant un site d'attachement *attI* (également appelé *attP*), et un site d'attachement bactérien



au transfert et au maintien, ainsi qu'une ou plusieurs régions variables codant des fonctions accessoires pouvant conférer un avantage sélectif à l'hôte (324, 339). Ces éléments évolueraient par acquisition et échanges de modules avec d'autres ICE, mais également avec d'autres éléments génétiques comme les plasmides conjugatifs (45, 115). Ainsi, les protéines codées par les modules de conjugaison, de régulation et de résistance à la tétracycline de Tn916, un ICE d'*Enterococcus faecalis*, et de Tn5397 de *Clostridium difficile* 630, sont identiques à plus de 80 %. Néanmoins, ces deux éléments codent respectivement une recombinase à tyrosine et une recombinase à sérine (261). De plus, les modules de conjugaison et de régulation de ces ICE sont étroitement apparentés à ceux de trois autres ICE putatifs présents chez *C. difficile* 630 (280). Néanmoins, ces trois derniers éléments portent un module qui leur est propre à la place du gène de résistance à la tétracycline (transporteur ABC, transporteur de Mg<sup>2+</sup> ou module de fonction inconnue).

Des recherches de familles d'ICE particulières et/ou d'ICE dans des groupes de bactéries particuliers avaient suggéré que ces éléments sont extrêmement répandus (45, 166, 263, 298, 312, 322). Une analyse globale de génomes a montré que les modules de conjugaison chromosomiques sont plus répandus que les modules de conjugaison plasmidiques, suggérant donc que les ICE sont plus répandus que les plasmides conjugatifs (126). De plus, il était admis jusqu'à très récemment que les bactéries intracellulaires obligatoires n'évoluaient pas par transfert horizontal faute de contact avec d'autres microorganismes. Toutefois, des ICE putatifs ont été détectés chez diverses bactéries intracellulaires obligatoires telles que *Protochlamydia amoebophila* (119), *Mycoplasma agalactiae* (201), *Mycoplasma fermentans* (51) ou *Rickettsia massiliae* (25). L'exemple le plus spectaculaire provient du séquençage récent du génome de la bactérie intracellulaire obligatoire *Orientia tsutsugamushi Ikeda*. Celui-ci a mis en évidence 185 copies partiellement délétées d'ICE putatifs qui totalisent une longueur de presque 700 kb, soit plus du tiers du génome de la bactérie (227).

### **3.1 Transfert conjugatif des ICE.**

Le transfert conjugatif d'un ICE nécessite trois étapes : l'excision du chromosome, le transfert par conjugaison et l'intégration dans le chromosome des cellules réceptrice et donatrice (Figure 7).

#### **3.1.1 Excision et intégration des ICE.**

L'excision et l'intégration d'un ICE impliquent généralement une recombinaison site-spécifique médiée par une recombinase à tyrosine, famille de recombinase qui catalyse



Tn5397 de *C. difficile* est le seul ICE bien caractérisé qui code une recombinase appartenant à la famille des recombinases site-spécifique à sérine, également impliquées dans l'excision et l'intégration de certains prophages (328). De plus, trois ICE putatifs de *C. difficile* (CTn2, CTn5 et CTn7) et l'ICE putatif ICESe2 de *Streptococcus equi* codent également une recombinase à sérine (140, 280).

L'excision et l'intégration d'autres ICE sont catalysées par une transposase à DDE, ces enzymes étant connues pour catalyser la transposition de la plupart des IS et des Transposons (242). Ainsi, l'ICE TnGBS2 et l'ICE putatif TnGBS1 de *Streptococcus agalactiae* s'intègrent et s'excisent grâce à une transposase à DDE (39).

Si elle permet d'apprécier l'activité d'un élément, la dynamique d'intégration/excision des ICE est une caractéristique qui ne peut définir leur taux de transfert. En effet, un ICE qui s'excise n'entreprend pas forcément, ou avec succès, un transfert vers une cellule réceptrice. Des facteurs qui permettent une plus grande excision de l'élément n'augmentent donc pas forcément sa fréquence de transfert, cette dernière dépendant de la population de cellules réceptrices et/ou d'autres facteurs (20, 22, 47, 57).

### **3.1.2 Transfert de l'ADN.**

#### **3.1.2.1 Pore de conjugaison.**

L'étude du pore de conjugaison de divers plasmides conjugatifs de bactéries Gram négatives a montré que ceux-ci sont apparentés aux systèmes de sécrétion protéique de type IV (T4SS). Ces systèmes sont composés de nombreuses sous-unités protéiques s'associant pour former le pore de conjugaison (Figure 9) (67, 157, 184).





ICE $clc$  ou PAPI-1) appartiennent à une nouvelle classe de T4SS, jamais identifiée chez les plasmides (54, 67, 158, 215).

Les pores de conjugaison des plasmides, et à *fortiori* des ICE, sont mal connus. Néanmoins, les éléments de la famille Tn916/ICEBs1 possèdent des gènes homologues aux gènes impliqués dans le transfert de plasmides conjugatifs de bactéries Gram positive (76). De plus, 4 des gènes appartenant aux modules de conjugaison des ICE et des plasmides conjugatifs de Firmicutes sont homologues aux gènes codant les protéines VirB1, VirB4, VirB11 et VirD4 des T4SS de bactéries Gram négative (Figure 9) (45, 46, 122, 341). Ces quatre protéines constituent une part importante des protéines du T4SS ancrées dans la membrane interne des bactéries Gram négative. Notamment, la protéine de l'élément ICEBs1 similaire à l'ATPase VirB4 est localisée aux pôles cellulaires et est nécessaire au transfert conjuguatif d'ICEBs1 (24). Aucun des autres gènes de transfert des ICE de bactéries Gram positive n'est clairement apparenté aux gènes codant les T4SS.

### **3.1.2.2 Transfert de l'ADN simple brin.**

Le mécanisme de conjugaison de la plupart des éléments conjuguatifs repose sur une coordination entre la formation du pore de conjugaison et le transfert de l'ADN au travers de celui-ci *via* sa réplication par cercle roulant. L'étape de réplication passe par la mise en place d'un complexe nucléoprotéique appelé le relaxosome (Figure 10) (77). L'action de la relaxase dans l'étape d'initiation puis dans le transfert a été bien caractérisée chez les plasmides apparentés au plasmide F d'*E. coli*. Une relaxase est une transestérase catalysant une coupure site- et brin-spécifique permettant l'initiation de la réplication par cercle roulant nécessaire au transfert d'une molécule d'ADN sous forme simple-brin. Chez les relaxases caractérisées, l'acide aminé catalytique responsable de l'attaque nucléophile permettant la coupure simple-brin de l'ADN au niveau de l'origine de transfert (*oriT*) est un résidu tyrosine (Figure 10) (49, 191, 265). Cette réaction conduit à la formation d'une liaison covalente entre ce résidu tyrosine et l'extrémité 5' de l'ADN simple-brin. Le monomère de relaxase lié à l'ADN est reconnu par la protéine de couplage, permettant ainsi son transfert à travers le pore de conjugaison (Figure 10). Généralement, un second monomère de relaxase permet quant à lui, grâce à son activité hélicase, la réplication de l'élément par cercle roulant chez la cellule donatrice (189, 205).



conjugatif des protéines de couplage putatives identifiées chez les différents ICE n'a jamais été étudiée, bien qu'un gène codant une protéine de cette famille soit toujours présent au sein du module de conjugaison.

ICE*clc* est le seul ICE connu qui présente la particularité de posséder deux *oriT* fonctionnelles (214). Les deux séquences permettent le transfert de l'élément avec la même efficacité et sont toutes les deux dépendantes de l'unique relaxase codée par l'élément. Cependant, la délétion d'une des copies d'*oriT* entraîne une réduction du transfert de l'élément d'un facteur 4, suggérant que leur présence simultanée apporte un avantage sélectif à l'élément du point de vue de son efficacité de transfert. Bien que la fonctionnalité de ces deux *oriT* ait été observée dans une population cellulaire, cela ne signifie pas nécessairement que les deux séquences soient reconnues au niveau d'un même élément.

### **3.1.2.3 Transfert d'ADN double brin.**

Les éléments conjugatifs, ICE et plasmides, de l'actinobactérie *Streptomyces* et des genres voisins se transfèreraient sous forme double brin (243, 313). Ce type de transfert n'a cependant été démontré que pour l'ICE pSAM2 de *Streptomyces ambofaciens*. Lors d'un contact entre un mycélium donneur portant l'élément et un mycélium receveur, l'ICE s'excise par recombinaison site-spécifique et se réplique par cercle roulant grâce à une réplicase RepSA (130). La protéine TraSA est, à elle seule, nécessaire et suffisante pour le transfert intermycélien de l'élément et est apparentée aux protéines FtsK/SpoIIIE (122, 258, 313). Le transfert de pSAM2 est précédé de sa réplication dans la cellule donatrice et suivi de sa réplication dans la cellule réceptrice. Au final, la stabilité de l'ICE est assurée par l'intégration site-spécifique d'une copie de l'élément dans chaque chromosome de la cellule réceptrice.

## **3.2 Autres mécanismes de maintien après transfert.**

La recombinaison site-spécifique codée par l'ICE (précédemment développée) lui assure un maintien par intégration dans le chromosome de la cellule hôte (341). Néanmoins, d'autres mécanismes peuvent permettre son intégration *via* des systèmes codés par la cellule hôte. Bien qu'aucun cas ne faisant clairement référence à l'intégration d'un ICE par recombinaison illégitime n'ait été rapporté, une intégration par recombinaison homologue est possible dans certaines circonstances (179).

L'ICE SXT de *V. cholerae* code un système de recombinaison homologue, Exo-Bet (61, 116). SXT-Exo est une exonucléase alcaline ciblant l'ADN double brin et est dépourvue

d'activité de coupure endonucléotidique. Son activité est accrue en présence de protéines accessoires telles que SSB, notamment codées par SXT, et SSAP, toutes les deux impliquées dans la stabilisation des fragments d'ADN simple brin ainsi que dans l'augmentation de la processivité des ADN polymérase (58). SXT-Exo prend en charge la dégradation de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' des ADN linéaires résultant d'une cassure double brin. En association avec SXT-Bet, le système permet la recombinaison homologe chez *E. coli*, avec une efficacité néanmoins 50 fois inférieure au système Bet-Exo du bactériophage  $\lambda$ . Enfin, des études génétiques ont révélé que les protéines SXT-Bet et SXT-Exo participent à la recombinaison homologe entre deux éléments apparentés au sein d'une même cellule hôte. Cela mène à l'intégration de l'élément dans le génome, mais également à la formation d'ICE hybrides. Ainsi, ce mécanisme pourrait être un moteur de l'évolution modulaire de ce type d'éléments (116). De tels systèmes sont également portés par d'autres éléments apparentés tels que R391, ICEVChB33 ou encore ICEPdaSpal (28, 237, 311).

### **3.3 Barrières au transfert et au maintien.**

Certains systèmes peuvent compromettre le transfert et/ou le maintien d'un ICE lors de la formation du pore, lors du passage de l'ADN au travers de celui-ci ou après l'arrivée de l'élément dans la cellule réceptrice.

#### **3.3.1 Systèmes d'exclusion.**

Divers plasmides codent des protéines inhibant l'entrée de l'ADN à travers le pore. Ainsi, la protéine TraS est connue pour interagir avec la protéine TraG et inhiber l'entrée de l'ADN dans des cellules déjà porteuses du plasmide conjugatif F chez *E. coli*, impliquant une exclusion d'entrée (9). Chez les ICE de la famille SXT/R391, les protéines codées par les gènes *eex* (entry exclusion) sont responsables d'une exclusion d'entrée par leur interaction avec la protéine TraG codée par ces éléments (203, 204). L'analyse des couples d'allèles *Eex*/TraG a montré l'existence de deux groupes d'exclusion différents : S (SXT) et R (R391). Les ICE appartenant à un même groupe s'excluent alors que les ICE apparentés à SXT et R391 ne présentent pas d'immunité croisée.

Par ailleurs, l'ICE pSAM2 code une protéine, Pif, impliquée dans une immunité de surconjugaison (244). Le mode d'action de cette protéine n'est pas connu mais sa présence chez la bactérie réceptrice inhibe l'excision et l'initiation du transfert de pSAM2 chez la donatrice, réduisant d'un facteur 2000 la fréquence de transfert.

### **3.3.2 Dégradation de l'ADN entrant.**

Après son entrée dans la cellule réceptrice, l'ADN transféré peut être dégradé, empêchant que l'élément s'y établisse.

#### **3.3.2.1 Systèmes de restriction-modification.**

Un système de restriction-modification (RM) comprend le plus souvent deux à trois gènes codant une endonucléase qui clive l'ADN non méthylé au niveau de sites cibles (restriction) et une méthyltransférase qui méthyle ces mêmes sites chez la cellule hôte (modification), protégeant ainsi son ADN de la restriction. Ces systèmes sont très répandus chez les bactéries mais également chez les archées (60, 148). Les systèmes RM constituent des mécanismes de défense contre les ADN exogènes, même si ceux-ci peuvent être occasionnellement méthylés après leur entrée dans la cellule, les protégeant ainsi de la restriction (167, 169).

Différents mécanismes décrits chez de nombreux phages et plasmides conjugatifs peuvent leur permettre d'échapper aux systèmes RM (172). Certains ICE, comme Tn5252 de *S. pneumoniae*, codent une méthyltransférase ciblant de nombreux sites qui les protègent ainsi contre de nombreuses endonucléases (10, 271). D'autres ICE tels que Tn916, ICE*Msym*<sup>R7A</sup>, ICE*Kp1*, ICE*Ec1*, pRS01, TnGBS1 et TnGBS2 codent des protéines d'antirestriction de la famille ArdA ou ArdC, qui sont connues pour interagir avec les complexes protéiques formés par les systèmes RM et inactivant ainsi leur activité endonucléasique (23, 38, 63, 187, 201, 259, 263, 276, 283, 308, 336). Le gène codant ce type de protéines est généralement situé à proximité de l'origine de transfert et figure parmi les premiers gènes transférés. Son promoteur est situé dans une structure secondaire (tige-boucle) n'existant que lorsque l'ADN est sous forme simple-brin, ce qui permet de coupler son expression avec l'arrivée de l'ADN sous forme simple brin dans la cellule réceptrice (3).

#### **3.3.2.2 Loci CRISPR.**

Chez de nombreuses bactéries et archées, les loci CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) confèrent une résistance envers les phages, mais également les plasmides conjugatifs, par un mécanisme comparable à l'interférence ARN caractérisée chez les eucaryotes (168, 198, 202). Cependant, les cibles de ces systèmes sont principalement des molécules d'ADN entrantes (Figure 11) (86, 113).

Au sein du locus CRISPR, la région contenant les répétitions palindromiques de 21 à 48 pb et les espaceurs de 26 à 72 pb est transcrite sous la forme d'un grand ARNm (Figure 11). Ensuite, certaines des protéines Cas (CRISPR associated) codées par ce locus mûrent



### Figure 11 : Représentation schématique du mécanisme d'interférence CRISPR/Cas (86).

- 1 : Le promoteur permet la production d'un ARN comprenant les régions répétées et les espaceurs du locus CRISPR.
  - 2 : Le long transcrit est clivé en petits ARN (pré ARNcr) par des protéines de la famille Cas6.
  - 3 : La maturation de ces pré-ARN se poursuit par action des protéines Cas3. L'ARNcr maturé correspond alors à l'espaceur précédé d'une portion d'ARN répétée à son extrémité 5'. Il est utilisé par les protéines Cas pour la dégradation de l'acide nucléique complémentaire.
  - 4 : La formation du complexe d'interférence est achevée.
  - 5 et 6 : L'acide nucléique cible, ADN ou ARN, est reconnu et clivé.
- P : promoteur ; CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat ; Cas : CRISPR associated ; ARNcr : CRISPR RNA ; PAM : proto-spacer-associated motif.

Les systèmes CRISPR ciblent principalement des séquences portées par les phages et les plasmides, ce qui permettrait de compléter l'action des systèmes RM pour faire barrière à l'entrée d'éléments génétiques mobiles (202). Les phages et plasmides conjugatifs ne se transmettent donc généralement pas ou ne sont pas présents dans les souches portant des espaceurs les ciblant (202, 216). De plus, l'analyse de souches de *S. agalactiae* dépourvues des ICE TnGBS1 et TnGBS2 a montré qu'elles portaient des loci CRISPR qui ciblent ces éléments (216). Les CRISPR confèrent donc également une immunité contre les ICE.

#### 3.3.3 Répression de l'activité de l'élément.

De nombreuses études ont montré que les prophages codent un répresseur, *ci* chez le phage  $\lambda$ , qui en inhibant l'expression des gènes de phages étroitement apparentés, rend la souche lysogène immune envers ceux-ci (192, 235). De la même façon, un ICE doit être en mesure de s'exprimer à son arrivée dans la cellule réceptrice afin de s'intégrer. Bien que l'activité de l'ICE SXT de *Vibrio cholerae* soit contrôlée par un régulateur *ci*, un tel système d'immunité, bien que très probable, n'a pas été mis en évidence. Le système d'immunité d'ICEBs1 de *Bacillus subtilis* s'apparente à celui des systèmes codés par les bactériophages (7). Cet ICE code un régulateur transcriptionnel, ImmR, qui fonctionne comme un facteur d'immunité en plus de son rôle de régulateur central de l'activité de l'ICE. En effet, la surexpression d'ImmR dans une cellule réceptrice réprime l'expression de l'intégrase de l'ICE entrant et empêche ainsi son intégration.

#### 3.3.4 Immunité de cible.

Une inhibition partielle du transfert d'ICESt3 de *Streptococcus thermophilus* a été observée lorsque le site *attB* de la cellule réceptrice est occupé par un îlot flanqué de sites *attR* et *attL* et ne codant pas d'autres protéines que celle conférant la résistance au



chloramphénicol (21). Si la question de l'origine de cette immunité de cible reste posée, l'ensemble des données suggère que la fixation d'intégrase(s) et/ou d'un (de) cofacteur(s) sur le bras d'un site *attL* ou *attR* réduirait l'efficacité d'intégration d'un élément entrant. De même, une étude menée chez *ICEclc* a montré que cet élément s'intègre plus efficacement dans un site *attR* en partie tronqué que dans un site *attR* sauvage, suggérant la présence d'un mécanisme similaire d'immunité de l'intégration (282).

### **3.4 Maintien à long terme dans la population.**

L'excision d'un ICE du chromosome peut mener à sa perte par la cellule hôte. En effet, si le chromosome se réplique alors que l'ICE est excisé, celui-ci ne sera pas transmis aux deux cellules filles. Ces pertes pourraient être compensées par le transfert d'un élément vers une cellule l'ayant perdu. En effet, le transfert à haute fréquence des plasmides conjugatifs intervient dans leur stabilité au sein d'une population (13, 14). De même, le retransfert d'un ICE à partir du clone dans lequel il arrive est d'abord un moyen de se répandre puis de se maintenir dans la population malgré les mutations et la dérive génétique. Un ICE qui se transfère à haute fréquence pourrait ainsi éviter son élimination, même si sa contribution à la valeur adaptative est légèrement négative. Cette dissémination est favorisée par la dépression de l'élément à son arrivée dans la cellule réceptrice, ainsi que par la présence de nombreux contacts entre cellules dans une population cellulaire dense (11, 131, 243, 293). Néanmoins, en raison d'une fréquence de transfert trop faible, le maintien de la plupart des ICE dans une population repose sur d'autres mécanismes, comme des systèmes d'addiction (poison-antipoison) et/ou l'apport de fonctions avantageuses pour l'hôte.

#### **3.4.1 Fonctions égoïstes assurant la sélection au niveau de l'élément.**

De nombreux éléments mobiles codent des fonctions inutiles ou nuisibles à l'hôte qui peuvent contribuer au maintien de l'élément dans la population. Si la perte d'un élément conduit à la mort cellulaire, la population ne contiendra jamais de cellules viables curées. Ainsi, des systèmes assurent une réduction de la croissance ou la mort des cellules filles n'ayant pas reçu l'élément lors de la division cellulaire. Ces fonctions sont généralement codées par de petits modules génétiques codant 2 composants : une toxine et une antitoxine (346). Bien que le mécanisme moléculaire puisse varier, le système repose sur un différentiel de stabilité des deux acteurs, l'antitoxine étant labile et la toxine stable. Ainsi, une cellule perdant l'élément, et donc le système, subira l'action de la toxine dont l'inhibition est abolie. Alors que la toxine est toujours protéique, l'antitoxine peut être un

ARN ou une protéine (87, 220). Ces systèmes participent à la stabilité des plasmides par un mécanisme appelé addiction ou Post Segregational Killing (PSK) (15, 325, 326)

De tels systèmes participent à la stabilité de certains ICE. Ainsi, la délétion des gènes codant le système MosA-MosT chez l'ICE SXT entraîne une augmentation de la perte de l'élément. Ce système est induit lors de l'excision de l'élément, quand la forme circulaire extrachromosomique est vulnérable à la perte. Néanmoins, la perte de SXT reste faible même en absence du système toxine-antitoxine, ce qui suggère que l'élément code un autre système de maintien (340). En effet, une étude précédente avait caractérisé un autre système toxine-antitoxine de type Tad-Ata, homologue à celui du bactériophage N15 et du plasmide pAMI2 (97). L'expression de ce système chez *E. coli* a révélé qu'il était fonctionnel et capable de promouvoir la stabilité d'un plasmide à faible nombre de copies en conditions non sélectives.

Des systèmes RM (voir partie 3.3.2.1) sont portés par des ICE ou éléments dérivant d'ICE. Ainsi, le système RM de type II codé par ICEst1 de *Streptococcus thermophilus* lui confère la résistance au bactériophage ST84 (43). Cependant, les systèmes RM de type II codés par les plasmides agissent également comme des systèmes toxine-antitoxine, suggérant qu'il pourrait en être de même pour les ICE codant de tels systèmes RM. (167, 224). Le mécanisme repose sur le fait que tous les sites doivent être méthylés pour que l'ADN soit protégé, alors que la coupure de quelques sites par l'endonucléase peut conduire à la destruction de l'ADN. En absence de l'élément, la méthyltransférase et l'endonucléase sont diluées lors des divisions cellulaires ce qui conduit à une déméthylation progressive des sites chromosomiques qui pourront alors être reconnus et clivés par l'endonucléase, entraînant la destruction du chromosome.

### **3.4.2 Apport de fonctions avantageuses : sélection au niveau de l'hôte.**

L'émergence rapide de microorganismes résistants et/ou capables de métaboliser des composés produits par d'autres microorganismes, mais également des composés synthétiques, souligne leur force d'adaptation face à des conditions contre lesquelles rien ne les prépare (315, 321). Certaines bactéries sont capables de se développer dans des milieux considérés comme biologiquement hostiles contenant des composés polluants, des antibiotiques, des fongicides ou des pesticides. Cette capacité est bien souvent conférée par un ou plusieurs éléments génétiques (183, 323). En effet, la structure modulaire des éléments génétiques a mené à l'apparition de combinaisons de modules qui ont pu permettre l'utilisation de certains composés toxiques. Qu'ils soient simplement dégradés ou qu'ils constituent une source de carbone et/ou d'énergie, ils apportent un avantage sélectif certain à la bactérie porteuse de l'élément quand le composé est présent dans le milieu (155, 217, 221, 321, 323).

La bactérie *Pseudomonas knackmussii* sp. B13 est capable d'utiliser comme seules sources de carbone des polluants organiques chlorés tels que le 3-chlorobenzoate, 3-chlorocatéchol, 4-chlorocatéchol et l'aminophénol. Cette dégradation se fait *via* une voie métabolique alternative codée par l'élément ICE*clc* (254). Le transfert de cet ICE a été observé vers de nombreuses espèces de Beta et Gammaprotéobactéries dans de différentes conditions, notamment dans des biofilms au niveau de membranes de réacteurs impliqués dans le traitement des eaux polluées (299, 345). Il semble donc que l'avantage sélectif apporté à la bactérie dans ces environnements permette la dissémination de l'ICE et son maintien dans de nombreuses populations. De même, l'ICE Tn4371 confère la capacité de dégrader le chlorobiphényle à son hôte *Ralstonia oxalatica* (297, 318). Des éléments apparentés de façon très proche à Tn4371 ont également été identifiés après l'analyse des génomes séquencés de Beta et Gammaprotéobactéries, incluant *Cupriavidus metallidurans* CH34 et *Pseudomonas aeruginosa* (268, 298, 324). Ces éléments présentent une région core très conservée et un module d'adaptation hypervariable codant des fonctions utiles à l'hôte comme des fonctions métaboliques et de dégradation de certains composés toxiques comme le chlorobiphényle, mais également des mécanismes de résistances aux antibiotiques et aux métaux lourds. D'autres éléments codent également des fonctions de résistances aux antibiotiques et/ou aux métaux lourds comme ceux de la famille d'éléments SXT/R391 (17, 18), les ICE de la famille Tn916/Tn1545 (264) ou Tn1549 (114). La présence de ces éléments dans le génome de ces bactéries leur permet une survie et un succès évolutif accrus dans un environnement où l'agent stressant dont ils codent la dégradation est présent (341).

Les ICE peuvent également conduire à des évolutions majeures du mode de vie de l'hôte, telles que l'acquisition du caractère symbiotique ou pathogène (139, 160, 162, 187, 226, 228, 276, 277, 306, 307). L'association *Rhizobium*-légumineuse est un exemple de relation mutualiste syntrophique dans laquelle chacun des partenaires synthétise au moins un composé essentiel à l'autre. Ainsi, les acides organiques fournis par la plante sont une source d'électrons permettant au *Rhizobium* d'obtenir son énergie par réduction de l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O et de fixer l'azote par réduction du N<sub>2</sub> en NH<sub>3</sub>. L'ammoniac produit est cédé à la plante qui le convertit en acides aminés, une partie étant rétrocédée aux bactéries. L'îlot de symbiose ICE*MISym*<sup>R7A</sup> de la souche R7A de *Mesorhizobium loti* est un élément chromosomique de 502 kb qui confère le caractère symbiotique à la bactérie vis-à-vis de la plante *Lotus japonicus*. En effet, son transfert vers des souches non symbiotiques les convertit en symbiotes de la plante (305, 306). Cet ICE s'intègre de façon site-spécifique à l'extrémité du gène codant l'ARNt phénylalanine et code toutes les fonctions nécessaires à la nodulation et à la fixation de l'azote, mais également aux échanges entre la bactérie et la plante (159, 305).

## 4 Régulation.

Malgré la présence de systèmes de maintien efficaces, la dynamique d'excision et de transfert des ICE doit être strictement régulée, tendant vers une optimisation entre un moindre coût pour la cellule et une mobilité efficace de l'élément. De nombreuses études ont montré que des ICE dérégulés présentaient une grande instabilité menant à la perte de l'élément dans la population. Ainsi, bien que Tn916 se transfère chez *E. coli*, sa trop grande fréquence d'excision entraîne sa perte par dilution lors des divisions cellulaires successives (279). De même, l'expression constitutive de l'excisionase RdfS conduit à la perte d'ICEMISym<sup>R7A</sup> (251). Chez *S. thermophilus*, la surexpression de l'excisionase et de l'intégrase d'ICESt1 et ICESt3 conduit à la perte de l'élément dans une forte proportion de la population (22). Ainsi, la régulation de la dynamique de ces éléments joue un rôle clé dans leur maintien.

L'étude des déterminants menant au transfert des ICE peut permettre de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation des bactéries à des conditions particulières. La petite dizaine d'ICE chez qui la régulation du transfert a été étudiée présente des mécanismes variés. En général, les ICE répondent à certains stimuli ce qui conduit à une mobilité conditionnelle de ces éléments dans les populations bactériennes (5, 341).

### 4.1 Agents endommageant l'ADN.

Lorsque des rayonnements ultra-violet (UV) ou des antibiotiques (mitomycine C ou les quinolones) endommagent l'ADN, des fragments d'ADN simple brin s'accumulent lors de la réplication. La protéine RecA forme alors un complexe RecA-ATP-ADN simple brin. La protéine RecA alors activée (RecA\*) conduit à une dérégulation de nombreux prophages et de certains ICE (327, 341).

#### 4.1.1 Régulateurs de type ci.

Le maintien sous forme de prophage du phage  $\lambda$  chez *E. coli* ainsi que le déclenchement de la phase lytique sont sous le contrôle du système ci/Cro (90). Le régulateur transcriptionnel ci active sa propre transcription et réprime la transcription du gène *cro* codant l'activateur de l'élément, lequel demeure alors intégré dans le génome de l'hôte sous forme de prophage. En présence de dommages à l'ADN, la présence de RecA\* déclenche l'activité autoprotéolytique de ci. Le répresseur alors clivé est incapable de se lier à ses séquences cibles, dont la région promotrice du gène *cro* qui est transcrit de façon







TraI1, impliquée dans la synthèse de l'inducteur et dont l'expression est dépendante de l'activateur transcriptionnel du système de quorum sensing TraR également codé par l'élément (248). En effet, l'expression de TraR à partir de son propre promoteur sur un plasmide à bas nombre de copies induit de 1000 fois la production d'homosérine lactone. Il cause également l'excision d'ICE*MISym*<sup>R7A</sup> dans 100% des cellules et provoque une augmentation de 40 fois de sa fréquence de transfert (249).

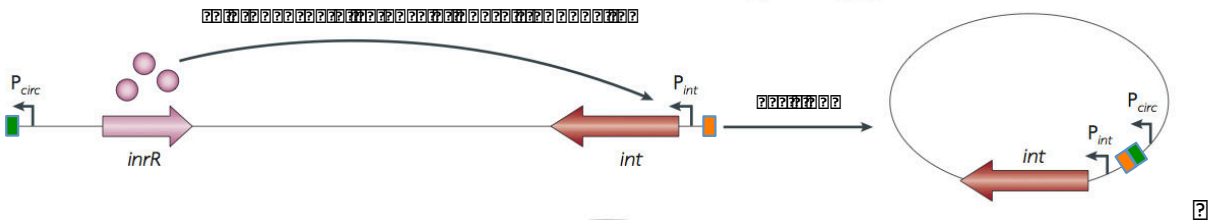
#### 4.3 Phase de croissance.

Bien que certains ICE soient induits en phase stationnaire par un système de quorum sensing en raison de la forte densité cellulaire, des systèmes régulateurs spécifiques de la phase stationnaire existent également. L'excision de l'élément se fera quand la réplication du chromosome sera réduite, prévenant ainsi la perte de la forme excisée lors de la division cellulaire.

L'excision et le transfert d'ICE*Bs1* sont déréprimés en phase stationnaire en l'absence de la protéine de l'hôte AbrB (8). AbrB est un régulateur de la phase de transition connu pour réprimer divers gènes en phase exponentielle chez *B. subtilis* (304). Cette protéine est inactivée en cas de carence nutritive ou de haute densité cellulaire. La protéine AbrB réprime la transcription du gène *rapI* (précédemment décrit) et donc l'excision et le transfert d'ICE*Bs1*. L'activité de l'élément augmente chez un mutant *abrB* mais également en phase exponentielle lorsque AbrB est inactive (8).

ICE*clc* est actif et se transfère de *Pseudomonas knackmussii* B13 vers *Pseudomonas putida* quasiment uniquement en phase stationnaire (109, 110, 212) (Figure 15). Bien que d'autres stimuli décrits plus tard puissent induire le transfert de cet élément, cette activation résulte de l'expression de l'activateur transcriptionnel de l'intégrase, laquelle est contrôlée par le facteur sigma alternatif spécifique de la phase stationnaire RpoS (109).





?

**Principles of Genetic Circuit Design: From Linear DNA to a Self-Replicating Plasmid**

The diagram illustrates the process of integrating a linear DNA construct into a self-replicating plasmid. The linear DNA contains a circular promoter ( $P_{circ}$ ) and an *inrR* gene. The *inrR* gene produces a protein that binds to the  $P_{int}$  promoter, which is located upstream of the *int* gene. This *int* gene is responsible for the integration of the linear DNA into the plasmid. The resulting plasmid contains the *int* gene and the  $P_{circ}$  promoter, allowing for the self-replication of the integrated construct.

?

**3.3.5 From Linear DNA to a Self-Replicating Plasmid**

The linear DNA construct is integrated into the plasmid. The *int* gene on the linear DNA binds to the  $P_{int}$  promoter on the plasmid, initiating the integration process. The resulting plasmid contains the *int* gene and the  $P_{circ}$  promoter, allowing for the self-replication of the integrated construct.

The integration process is mediated by the *int* gene. The *int* gene on the linear DNA binds to the  $P_{int}$  promoter on the plasmid, initiating the integration process. The resulting plasmid contains the *int* gene and the  $P_{circ}$  promoter, allowing for the self-replication of the integrated construct. This process is essential for the construction of self-replicating genetic circuits.

?







## 5 Interactions avec l'hôte.

En dehors des fonctions avantageuses pour l'hôte apportées par les ICE, ces éléments peuvent avoir un impact plus global sur l'activité cellulaire. Réciproquement, bien que les ICE codent toutes les fonctions nécessaires à leur transfert, leur activité est modulée par certains facteurs de l'hôte.

### 5.1 Impact de l'hôte.

Différentes études ont montré que l'activité de certains ICE était globalement affectée par la cellule hôte. Le transfert intra-espèce de SXT est bien plus efficace chez *E. coli* que chez *V. cholerae* (74, 208). De même, Tn916 est capable de se transférer d'*Enterococcus faecalis* vers *Lactococcus lactis* où il est alors incapable de s'exciser (37). Ces observations suggèrent que la cellule hôte code des facteurs qui peuvent être nécessaires à l'activité de l'élément, mais pourrait aussi inhiber son activité. Des études plus précises ont déterminé l'implication de protéines spécifiques de l'hôte dans la dynamique des ICE mais également d'autres éléments.

#### 5.1.1 Protéines associées au nucléoïde.

Les protéines associées au nucléoïde, IHF (Integration Host Factor) et Fis (Factor for inversion stimulation), sont connues pour influencer l'activité de certains plasmides et bactériophages. IHF aide à réguler les fonctions de conjugaison du plasmide F et stimule le clivage de l'origine de transfert de l'élément par la relaxase Tral (111, 231, 337). De plus, IHF est impliqué dans l'excision et l'intégration du bactériophage  $\lambda$ , et Fis stimule son excision (100, 236, 238).

Chez un mutant IHF de *V. cholerae*, SXT a une capacité réduite à se transférer, alors que son intégration et son excision ne sont pas affectées (208). Cet effet est dépendant de l'hôte, puisqu'un mutant IHF chez *E. coli* n'a pas de phénotype notable concernant le transfert de SXT. De plus, le transfert de SXT est dépendant de l'hôte, l'élément se transférant faiblement de *V. cholerae* vers *V. cholerae*, alors que le transfert est très efficace chez *E. coli* (208). IHF pourrait donc faciliter le transfert de nombreux éléments conjugatifs dont les ICE.

Le régulateur transcriptionnel Rok est un répresseur de la mise en place de la compétence chez *B. subtilis* (1). Une analyse plus globale a montré que ce répresseur



## 5.2 Impact des ICE sur les éléments présents dans la cellule.

### 5.2.1 Mobilisation en *trans*.

Certains plasmides ou îlots génomiques codent des fonctions et/ou portent des séquences qui leur permettent d'être mobilisé à distance par des éléments conjugatifs (mobilisation en *trans*) ; ils sont alors qualifiés d'éléments mobilisables (256, 270). L'analyse récente de plus de 1000 séquences de procaryotes a montré la présence de 335 ICE putatifs ainsi que plus de 400 séquences codant une relaxase putative et dépourvues de séquences codant un T4SS à proximité. Ces données ont révélé que la mobilisation en *trans* d'éléments chromosomiques pourrait être extrêmement fréquente (126). Ces éléments sont regroupés sous le nom d'éléments intégratifs mobilisables (IME) proposé par Burrus *et al.* (45). Les IME s'excisent de façon autonome sous une forme circulaire qui est mobilisée en *trans* par des éléments conjugatifs. Ces éléments codent une relaxase qui, liée à l'*oriT* de l'IME, emprunte alors le pore codé par l'élément mobilisateur. D'autres IME, qui ont été qualifiés d'îlots génomiques mobilisables (MGI), ne codent pas de relaxase ni aucune protéine impliquée dans la conjugaison (74).

Les MGI identifiés chez divers *Vibrio* possèdent une séquence *oriT* identique à environ 63% à celles des ICE de la famille SXT/R391 présente au sein de la même espèce (74). Cette séquence est reconnue par la relaxase codée par l'ICE co-résident qui va alors permettre son transfert. Le MGI peut s'exciser grâce à une recombinase à tyrosine qu'il code, mais dont l'expression est dépendante des activateurs transcriptionnels SetC et SetD codés par l'ICE co-résident et impliqués dans la mobilité de SXT (18). La relaxase peut également reconnaître l'*oriT* de l'élément intégré et conduire à la mobilisation en *cis* de séquences chromosomiques (mobilisation en *cis* décrite en 5.2.2).

Une étude menée sur CTnDOT et CTnERL, 2 ICE apparentés de *Bacteroides*, a montré leur capacité à promouvoir l'activation transcriptionnelle de régions chromosomiques. Cette régulation en *trans* implique le système capteur-effecteur RteA-RteB codé par l'ICE résident et permet la mobilisation en *trans* d'ICE putatifs nommés Ctn1-4bt. Néanmoins, l'intégration de ces éléments dans le chromosome de la cellule réceptrice se fait par recombinaison homologue, suggérant que ces éléments sont défectifs pour leur excision dans la cellule donatrice mais également pour leur intégration dans le chromosome de la réceptrice (218, 219). De même, l'îlot génomique SGI1 de *Salmonella enterica* est mobilisé en *trans* en présence du plasmide p55 appartenant à la famille IncA/C (93, 222, 291).

Ces expériences montrent l'importance des interconnexions entre les éléments co-résidents dans une cellule et l'impact majeur des ICE sur la plasticité des génomes.

### 5.2.2 Mobilisation en *cis*.

Contrairement aux séquences mobilisées en *trans*, les séquences d'ADN mobilisées en *cis* ne présentent généralement pas de caractéristiques particulières. Par exemple, l'intégration du plasmide F dans le chromosome d'*E. coli* par recombinaison homologue ou illégitime conduit à la mobilisation à haute fréquence de gènes adjacents au plasmide (mobilisation de type Hfr) (127, 257, 287). Cela implique la reconnaissance d'*oriT* par la relaxase au niveau d'un élément intégré. Le brin d'ADN transféré ne contient donc qu'un fragment correspondant à la région du plasmide situé en 5' de l'*oriT* et la région chromosomique qui lui est adjacente. Ce type de mobilisation implique une intégration de l'ADN transféré par recombinaison homologue ou illégitime dans la cellule réceptrice et pourrait être à l'origine de l'apparition d'éléments défectifs.

De la même manière, un certain nombre d'ICE peuvent mobiliser des séquences d'ADN en *cis*. En effet, cTnDOT de *Bacteroides*, mobilise les plasmides dans lesquels il s'est intégré (270). De plus, divers éléments, comme pRS01 de *L. lactis* ou des ICE de la famille SXT/R391, peuvent mobiliser de larges fragments d'ADN chromosomique adjacents à leur site d'insertion, ou au site d'insertion d'éléments mobilisables en *trans* (74, 145). Au contraire, d'autres ICE sont incapables de mobilisation de type Hfr. En effet, le module de conjugaison de Tn916 ne possède de promoteur que sous forme circulaire extrachromosomique (57).

Outre la mobilisation de fragments chromosomiques ne présentant pas de caractéristiques particulières, certains éléments génétiques défectifs pour leur mobilité, mais ayant gardé des sites d'attachement *att* flanquants, sont mobilisables en *cis*. Notamment, l'ensemble des données obtenues par Pavlovic *et al.* (240) et Bellanger *et al.* (21) suggèrent que les ICE et des éléments mobilisables en *cis* (CIME) de *S. thermophilus* évoluent selon un modèle d'accrétion-mobilisation (Figure 20) (240). Les CIME apparaissent par délétion totale ou partielle des modules de régulation, de conjugaison et de recombinaison des ICE. Une souche portant un CIME peut acquérir un ICE apparenté sous forme circulaire par conjugaison. Celui-ci peut alors s'intégrer par recombinaison site-spécifique entre le site *attI* de l'ICE et un site *att* flanquant l'élément intégré (Figure 20). Cette intégration conduit à l'accrétion d'un ICE et d'un CIME et à la formation d'un îlot génomique composite CIME-ICE résultant de l'intégration en tandem des deux éléments. Le CIME peut être mobilisé en *cis* par l'ICE et l'ensemble de l'îlot constitue un nouvel ICE qui peut alors s'exciser et se transférer par conjugaison (21). De plus, l'analyse de divers îlots génomiques de *Streptococcus agalactiae* a révélé de nombreuses structures correspondant à des sites *att* au sein de ces éléments (38). Ces sites résulteraient d'événements d'accrétion et éventuellement de la mobilisation en *cis* de CIME. L'accrétion et la mobilisation joueraient donc un rôle essentiel dans l'évolution des ICE et plus généralement des îlots génomiques.





### 5.3 Impact des ICE sur la cellule.

Bien que l'étude d'ICE $_{cl}$  ait montré qu'il n'avait qu'un effet réduit sur la valeur adaptative de l'hôte en absence de pression de sélection, peu d'études ont rapporté le rôle des ICE sur la régulation du génome de la souche hôte (109). Notamment, les ICE Tn5252 de *S. pneumoniae* et R391 codent tous deux un mécanisme permettant la réparation mutagène des dommages à l'ADN engendrés par les UV et pourraient avoir un impact plus global sur les activités cellulaires (209, 223).

#### 5.3.1 Impact régulateur de l'élément.

Si la grande majorité des ICE s'intègre de façon site-spécifique à l'extrémité 3' de gènes, les ICE TnGBS1 et TnGBS2 dont l'intégrase est une transposase à DDE, sont tous les deux intégrés à proximité d'un promoteur (39). TnGBS2 s'intègre dans respectivement 60 % et 20 % des cas dans deux sites préférentiels. Dans tous les cas, la répétition inversée droite de TnGBS2, ainsi que celle de TnGBS1, est située à 15 ou 16 pb de la boîte -35 d'un promoteur. L'analyse de leurs sites d'intégration suggère une spécificité d'intégration propre à ces éléments. Une étude transcriptionnelle des gènes sous le contrôle de ces promoteurs a mis en évidence que l'intégration des ICE augmente leur transcription. Bien que les gènes en aval de ces promoteurs soient impliqués dans le métabolisme des nucléotides, l'impact biologique éventuel de ces activations transcriptionnelles n'est pas connue.

Les ICE connus codent au moins un régulateur transcriptionnel impliqué dans l'activité de l'élément. Outre le fait que les régulateurs de certains ICE puissent moduler l'activité d'éléments apparentés ou non présents dans une même cellule, leur interaction avec des loci chromosomiques de la cellule hôte n'est pas à exclure (74). En effet, le répresseur central de l'activité de l'élément ICEBs1, ImmR, se fixe sur des régions du chromosome de *Bacillus subtilis* (7). De même, une étude menée sur cTnDOT dans le but de mettre en évidence son impact sur le génome de la cellule hôte *Bacteroides thetaiotaomicron* 5482 a montré que de nombreux gènes chromosomiques étaient la cible de l'effecteur du système à deux composants RetA-RetB de l'ICE (219).

#### 5.3.2 Activation du système SOS.

Lors du transfert d'un élément conjugatif, la forme simple brin qui arrive dans la cellule réceptrice peut constituer un substrat pour l'activation de la protéine RecA. Des expériences menées sur le transfert des plasmides conjugatifs RP4, R6Kdrd ou R388 et de

l'ICE SXT ont mis en évidence l'induction du système SOS d'*E. coli* et de *V. cholerae* (12). Cette induction nécessite l'arrivée d'un élément conjugatif dans la cellule réceptrice, aucune induction n'étant observée en absence d'élément. Ces mêmes expériences, menées dans un contexte mutant pour *recA*, ont confirmé que l'induction du système SOS était dépendante de RecA. Ces données suggèrent que le transfert conjugatif pourrait déclencher des réarrangements chromosomiques ainsi que des changements de d'activité transcriptionnelle liés à l'induction du système SOS chez la cellule réceptrice (52, 144). Plus généralement, ce phénomène pourrait participer à l'échange de modules par recombinaison entre séquences homologues portées par l'élément résident et l'élément entrant.

### 5.3.3 Production de messagers intracellulaires.

Chez *V. cholerae* et de nombreuses autres bactéries, la transition entre le style de vie libre où la bactérie est mobile et le mode de vie en biofilm est contrôlée par une molécule appelée dimère cyclique de guanosine monophosphate (di-c-GMP) (66, 153, 170, 267). Le taux intracellulaire de cette molécule est régulé par les activités antagonistes assurées par les diguanylate cyclases (DGC) et des phosphodiesterases (PDE) qui respectivement produisent et dégradent le composé.

Trois ICE de la famille SXT/R391 codent deux DGC nommées DgcK et DgcL (29). La surexpression de ces deux protéines, indépendamment l'une de l'autre, se traduit par une perte importante de la mobilité associée à la formation accrue de biofilm. Outre l'avantage pour la cellule hôte de croître en biofilm dans certaines conditions, le contact entre cellules favorise la dissémination de l'élément au sein de la population.

## 6 *Streptococcus thermophilus*.

*S. thermophilus* est une bactérie lactique homofermentaire anaérobie aérotolérante appartenant au phylum des Firmicutes. Elle possède un petit génome (1,7 à 1,9 Mb) composé d'un chromosome circulaire et, dans 20 à 25 % des souches, d'un ou deux plasmides. Tous ces plasmides ont une taille inférieure à 10 kb, se répliquent presque tous par cercle roulant et aucun ne peut être conjugatif (150, 319, 320). La seule niche écologique connue de cette bactérie est le milieu laitier. L'analyse MLST (MultiLocus Sequence Type) de 7 gènes de ménage de plusieurs souches de *S. thermophilus*, *Streptococcus salivarius* et *Streptococcus vestibularis* a révélé que l'espèce *S. thermophilus*

serait apparue il y a, au plus, quelques dizaines de milliers d'années. Elle dériverait d'une souche de bactérie buccale du groupe *Salivarius* (146). *S. thermophilus* résulterait donc de la domestication involontaire d'une bactérie commensale s'étant adaptée au milieu laitier.

Diverses actinobactéries (appartenant au genres *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* ou *Brevibacterium*) et de nombreuses bactéries lactiques (Firmicutes) appartenant aux genres *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* et *Weissella* sont utilisées dans la fermentation de produits agroalimentaires très variés incluant les produits laitiers (fromages, crèmes, beurres, yaourts), le vin, le pain traditionnel, le saucisson sec ou la choucroute.

*S. thermophilus* est ainsi utilisé en co-culture avec de nombreuses autres bactéries lactiques dont *L. lactis* pour la fabrication de divers fromages et avec *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pour l'élaboration des yaourts et des fromages à pâte cuite. Le groupe des bactéries lactiques contient également un grand nombre de bactéries pathogènes ou commensales de l'Homme. Ainsi, *Enterococcus faecalis* et *Enterococcus faecium* sont des bactéries intestinales et certaines souches sont des pathogènes opportunistes de l'Homme. Par ailleurs, tous les streptocoques, hormis *S. thermophilus* et *Streptococcus macedonicus*, semblent être des bactéries pathogènes et/ou commensales des animaux, particulièrement des vertébrés.

### **6.1 Evolution de *S. thermophilus*.**

L'émergence récente de l'espèce *S. thermophilus* et son adaptation au milieu laitier ont entraîné une évolution réductrice du génome menant à la perte des gènes devenus inutiles. De ce fait, les gènes impliqués dans l'interaction avec l'hôte ont subi un processus de pseudogénération et délétion (27, 146). De plus, le transfert horizontal semble avoir également largement contribué à son adaptation à sa niche écologique.

Des séquences quasiment identiques sont retrouvées chez deux espèces utilisées dans l'industrie laitière, *S. thermophilus* et *L. lactis*, comme *orfB* et *epsL* du locus de synthèse d'exopolysaccharides de *S. thermophilus* CNRZ368 (35), les séquences d'insertion IS1191, IS981 (125) et ISS1 (34) mais également les ORF *hsdR* et *hsdM* du système de restriction-modification du plasmide pER35 (295). De plus, des analyses *in silico* ont révélé des séquences proches dans les génomes de plusieurs souches de *S. thermophilus* et de *Lactobacillus helveticus*, suggérant des échanges avec cette espèce également impliquée dans l'élaboration de produits laitiers (188).

*S. thermophilus* a non seulement échangé des gènes avec d'autres bactéries utilisées dans l'industrie alimentaire mais aussi avec des bactéries commensales ou pathogènes, peut-être du fait de contaminations de produits alimentaires ou lors du transit digestif. Ainsi,

la souche *S. thermophilus* 4134 contient un module de résistance aux ions cadmium et zinc codant des protéines identiques à des protéines plasmidiques retrouvées non seulement chez *L. lactis* et *Listeria innocua*, mais également chez des bactéries pathogènes opportunistes telles que *Streptococcus dysgalactiae* et *Listeria monocytogenes* (274). De plus, une étude visant à caractériser des souches de *S. thermophilus* résistantes à la tétracycline lors des processus de fabrication de fromages italiens a révélé qu'ils étaient portés par des plasmides ou îlots génomiques de la famille Tn916-Tn1545, et suggère leur acquisition par conjugaison (260).

Plus largement, une analyse *in silico* suggère que les séquences acquises par transfert horizontal inter-espèce représentent environ 14 % des génomes séquencés de *S. thermophilus* (146). En outre, l'analyse par hybridation génomique comparative du génome de 47 souches de *S. thermophilus* a révélé que 8 % des 2200 gènes recherchés ne sont présents que dans 1 à 5 de ces souches, suggérant un polymorphisme intra-espèce assez important en dépit de l'origine clonale récente de cette espèce (253).

Néanmoins, les mécanismes à l'origine de ces échanges restent encore mal connus. En effet, la transformation naturelle de *S. thermophilus*, mise en évidence très récemment, ne se produit que dans un milieu chimiquement défini et chez un petit nombre de souches (104, 112). De ce fait, l'impact de ce mécanisme sur l'évolution du génome de *S. thermophilus* dans son milieu naturel reste encore largement méconnu. De plus, aucun plasmide identifié jusqu'alors chez *S. thermophilus* ne peut être conjugatif, puisque leur taille est inférieure à celle d'un module de conjugaison fonctionnel de type Tn916 qui fait près de 11 kb et est le plus petit caractérisé chez les Firmicutes (70). Toutefois, une étude récente a mis en évidence la transduction généralisée de plasmides de *S. thermophilus* vers *L. lactis*. Ce mécanisme de transfert pourrait constituer une alternative à la conjugaison pour le transfert des plasmides (4). Enfin, l'acquisition de séquences par transduction n'est que suggérée, en dépit des nombreuses études menées sur la grande diversité de phages lytiques et virulents caractérisés chez *S. thermophilus* et plus largement chez les bactéries lactiques (41, 42).

## **6.2 Îlots génomiques de *S. thermophilus*.**

Par ailleurs, la comparaison du locus *fda* codant une fructose-1,6-diphosphate aldolase putative de *S. thermophilus* a révélé la présence d'un élément appelé ICESt1 de 35 kb chez la souche CNRZ368, et son absence chez la souche apparentée A054 (Figure 21) (44). L'analyse de 25 souches de *S. thermophilus* a révélé d'autres éléments appartenant à la même famille, également intégrés dans l'extrémité 3' du gène *fda* (48, 240) (Figure 21). Ces îlots génomiques possèdent des modules étroitement apparentés et d'autres qui leur sont

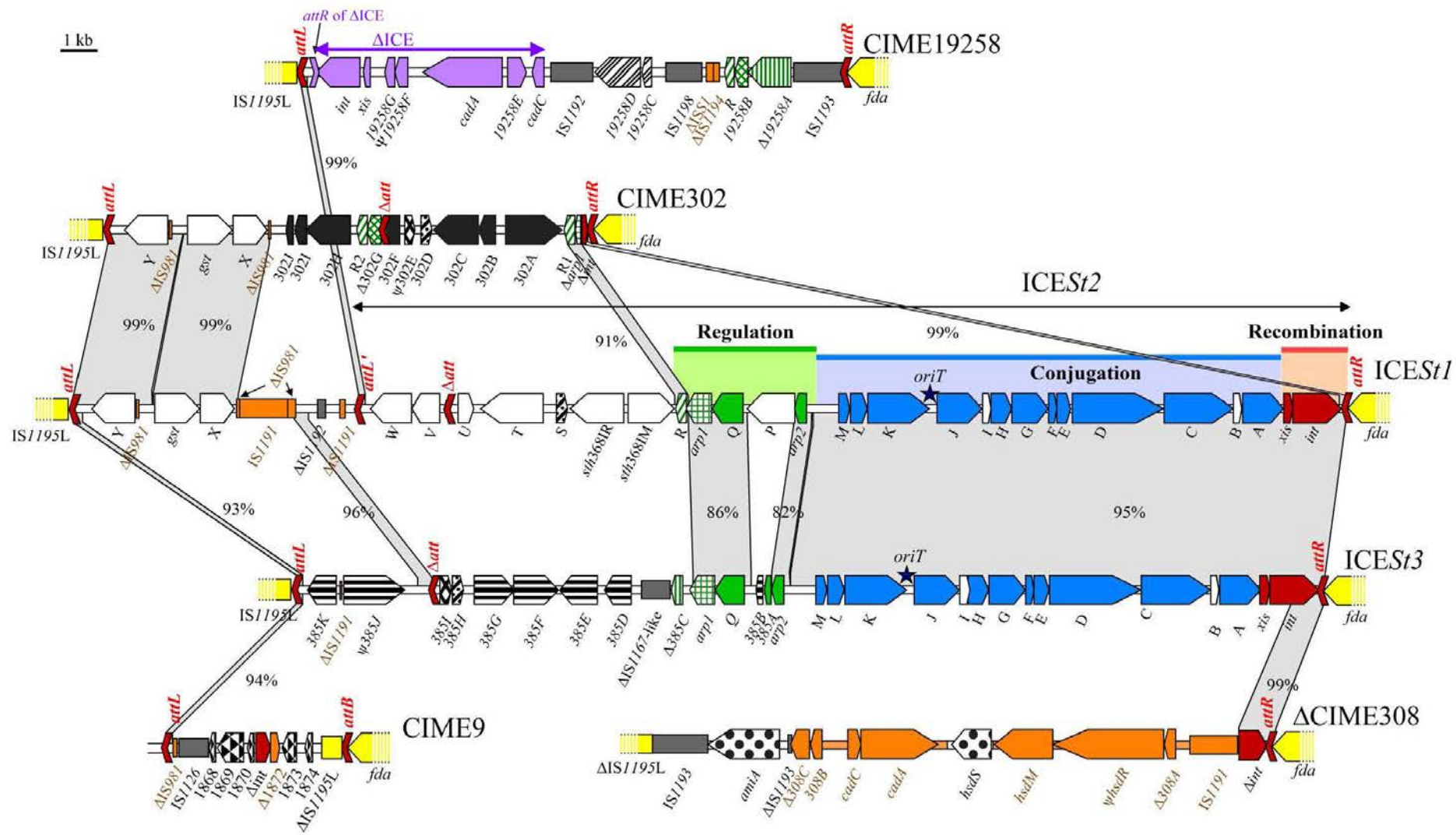
propres. Ils contiennent également des séquences presque identiques entre *S. thermophilus* et *L. lactis* impliquant des échanges récents (Figure 21, en orange).

Deux de ces éléments, ICE*St1* et ICE*St3*, sont intégratifs et conjugatifs (22, 44, 240) (Figure 21). Ils sont flanqués de sites *att* contenant une répétition directe de 27 pb et comportent une région core incluant des modules de recombinaison et de conjugaison quasiment identiques et des modules de régulation apparentés. L'analyse bioinformatique du module de régulation a mis en évidence la présence simultanée d'*arp1* et d'*arp2/orfQ*, respectivement homologues de *ci* et *ImmR/ImmA*, les principaux acteurs de la régulation de la plupart des prophages et de divers ICE. ICE*St1* et ICE*St3* sont les deux seuls éléments identifiés jusqu'alors qui portent les deux systèmes régulateurs putatifs (20, 44, 240). Par ailleurs, le module de régulation code également des protéines spécifiques de fonction inconnue : OrfP et OrfR chez ICE*St1* et Orf385A, Orf385B et Orf385C chez ICE*St3*. En plus de la région core, ces éléments présentent également une région variable qui porte des gènes de fonction inconnue et code des fonctions pouvant apporter un avantage sélectif à la cellule hôte, notamment la résistance aux bactériophages (43, 240)

L'intégrase à tyrosine et l'excisionase d'ICE*St1* et ICE*St3* sont codées respectivement par les gènes *int* et *xis* du module de recombinaison et catalysent la recombinaison site-spécifique entre les séquences de 27 pb des sites *attL* et *attR*. Cela conduit à la formation d'un élément circulaire portant un site *attI* et à la formation d'un site *attB* chromosomique (44, 65, 240). ICE*St1* possède un site *attL* interne fonctionnel appelé *attL'* (Figure 21). Lorsque l'ICE putatif ICE*St2* s'excise par recombinaison entre *attL'* et *attR*, un fragment d'ICE*St1* bordé par le site *attL* et le site *attB'* (résultant de l'excision) reste intégré dans le chromosome et constitue donc un CIME nommé CIME368 (44).

Les résultats de transfert conjugatif intra-espèce obtenus par Bellanger *et al.* (22) ont montré qu'ICE*St3* se transfère par conjugaison au sein de l'espèce *S. thermophilus* à des fréquences relativement élevées (environ  $10^{-6}$  UFC de transconjugant / UFC de donatrice), tandis qu'un seul transconjugant a été obtenu pour ICE*St1*. De plus, ICE*St3* est capable de se transférer vers d'autres espèces, notamment vers les bactéries commensales et/ou pathogènes opportunistes *Streptococcus pyogenes* et *Enterococcus faecalis* (22).

Les autres îlots génomiques de cette famille ne sont ni intégratifs ni conjugatifs et dérivent d'ICE par délétion partielle ou totale des différents modules, mais ont gardé les sites *att* flanquants (21, 240). La plupart seraient des éléments mobilisables en *cis* (CIME) (voir partie 5.2.2).



module de conjugaison	orf apparenté à <i>orf12</i> de Tn5252	orf apparenté à <i>orf5</i> d'ICES <sub>St1</sub>	orf spécifique à ICES <sub>St3</sub>
site de recombinaison <i>att</i>	orf apparenté à <i>orf13</i> de Tn5252	orf apparenté à <i>gbs043</i> de <i>S. agalactiae</i> NEM316	orf spécifique à ΔCIME308
module de recombinaison	orf apparenté à <i>orf14</i> de Tn5252	orf spécifique à CIME19258	orf spécifique à CIME9
orf apparenté à <i>orf11</i> de Tn5252	séquences étroitement apparentées à des séquences de <i>L. lactis</i> (>95% id nt)	orf spécifique à CIME302	orf spécifique à l'ICE tronqué intégré dans CIME19258

**Figure 21 : Comparaison des séquences des îlots génomiques intégrés dans le locus *fda* chez *S. thermophilus* (48, 240).**

La localisation et l'orientation des séquences IS1195L et *fda*, c'est-à-dire les séquences flanquant les îlots génomiques, sont respectivement représentées par un rectangle et un rectangle fléché jaunes. Le nom des ORF comportant "orf" a été abrégé par le nombre ou la lettre correspondante. La localisation et l'orientation des ORF, pseudogènes ( $\Psi$ ) et ORF tronquées ( $\Delta$ ) appartenant aux îlots génomiques sont représentées par des rectangles fléchés, les IS par des rectangles et les sites *att* complets ou tronqués par des chevrons rouges. La couleur traduit la fonction putative ou les liens de parenté de chaque ORF qui sont déduits d'analyses fonctionnelles ou de comparaisons de séquences. Les zones grises relient les séquences étroitement apparentées des îlots génomiques (> 80 % d'identité nucléotidique) ; le pourcentage d'identité est indiqué. Les relations de proche parenté entre les séquences courtes, les IS ou les séquences flanquant l'élément (*fda* et IS1195L) ne sont pas représentées. Les ORF ayant de 40 à 80 % d'identité nucléotidique sont représentées par des symboles et une couleur identiques. Les origines de transfert putatives d'ICESt1 et ICESt3 déduites des comparaisons de séquences avec les *oriT* connues de Tn916 et ICEBs1 sont indiquées par des étoiles noires.









---

## RÉSULTATS



Des études précédentes avaient montré qu'ICES $t1$  et ICES $t3$  s'excisent (44, 240), et qu'ICES $t3$  se transfère (22). Cependant, si ICES $t3$  est capable de se transférer de façon intra- et inter-espèce, un unique transconjugant intra-espèce d'ICES $t1$  avait été obtenu, ce qui ne permettait pas d'exclure son acquisition par transformation. Ces éléments se transfèrent donc à des fréquences différant d'au moins un facteur 1000.

Bien que ces éléments aient été précédemment étudiés pour leur évolution par accrétion-mobilisation (21, 240), très peu de choses étaient connues concernant leur régulation. Les analyses de séquences et les travaux réalisés avant le début de ce projet avaient montré qu'ICES $t1$  et ICES $t3$  étaient les deux seuls éléments codant des homologues des répresseurs de type *ci* et *ImmR*, familles de protéines impliquées dans la régulation du transfert de nombreux prophages et d'au moins certains ICE. Ceci suggèrait fortement que ces ICE présentaient un mécanisme de régulation original qui pouvait impliquer des interactions entre les deux types de régulateurs.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans un objectif à long terme qui vise à caractériser la régulation d'ICES $t1$  et ICES $t3$  et à comprendre les différences de comportement de ces éléments. Dans ce but, une cartographie transcriptionnelle complète (opérons et promoteurs) de la région « core » des deux éléments a été réalisée. Les différents ARNm détectés ont été dosés afin d'évaluer l'impact des conditions de culture et de la souche hôte sur l'activité transcriptionnelle d'ICES $t1$  et ICES $t3$ . Parallèlement, l'activité d'excision de ces éléments a été mesurée dans ces mêmes conditions. L'analyse de l'excision a révélé la réplication intracellulaire d'ICES $t3$  lors d'un traitement par un agent endommageant l'ADN, caractéristique ignorée des ICE. En effet, au début de ce travail, les ICE étaient encore considérés comme des éléments non répliatifs, excepté lors du transfert conjugatif.

Un élément modifié *MiniICES $t3$ spec* ne contenant que les séquences des modules de régulation, conjugaison et recombinaison d'ICES $t3$  a été obtenu. Son étude a révélé qu'il était capable de se répliquer de façon constitutive, ce qui pourrait assurer son maintien dans la population.

Au-delà de cette étude, les résultats pourront s'inscrire dans une étude plus globale comprenant des ICE de streptocoques apparentés à ICES $t1$  et ICES $t3$  identifiés *in silico* lors de ce travail. Ces éléments présentent une organisation identique à celle d'ICES $t1$  et ICES $t3$  ce qui suggère qu'ils partagent la même régulation et des comportements similaires. Cette étude s'est achevée par l'entreprise d'études génétique et protéique des régulateurs putatifs d'ICES $t1$  et ICES $t3$ , mais également des autres ICE apparentés.

Les analyses transcriptionnelles, d'excision et de réplication d'ICES $t1$  et ICES $t3$ , ainsi que les analyses bioinformatiques qui ont révélé la présence d'éléments apparentés au sein des génomes de streptocoques, ont fait l'objet d'un article scientifique (page 83).

## 1 Conditions de cultures

Cette étude a débuté par le choix des conditions de cultures utilisées pour étudier ICESt1 et ICESt3, respectivement portés par *S. thermophilus* CNRZ368 et CNRZ385. Les conditions de culture ont été standardisées afin de pouvoir confronter les résultats obtenus en faisant varier le moins de paramètres. Le milieu LM17 étant le seul ayant permis de mettre en évidence le transfert conjugatif des ICE de *S. thermophilus* (22), celui-ci a été utilisé comme milieu standard. La température optimale de croissance de *S. thermophilus* est de 42°C et a été utilisée comme température standard.

Après une culture de nuit dans le milieu désiré, la souche est remise en culture dans du milieu préchauffé pour mettre les cellules en phase exponentielle (Figure 22). A  $DO_{600nm}=0,7$ , elle est alors diluée à  $DO_{600nm}=0,05$  dans du milieu préchauffé et traitée dans les conditions désirées. Comme les éléments connus codant des régulateurs *ci* ou *ImmR* sont induits par les dommages à l'ADN, leur effet a également été testé sur ICESt1 et ICESt3 par traitement à la mitomycine C (MMC). D'autres conditions telles que la phase de croissance et/ou la densité cellulaire ainsi que le milieu de culture ont été testées. Les appellations utilisées lors de ce travail correspondent aux différents types d'échantillons prélevés dans les conditions de culture schématisées dans la figure 22:

**Expo0.2** : croissance en milieu LM17, phase exponentielle à  $DO_{600nm}=0,2$ .

**Expo0.6** : croissance en milieu LM17, phase exponentielle à  $DO_{600nm}=0,6$ .

**Stat** : croissance en milieu LM17, phase stationnaire à  $DO_{600nm}=1,6$ .

**MMC** : mise en phase exponentielle dans milieu LM17 ( $DO_{600nm}=0,05$ ), traitement par la mitomycine C à CMI/2 pendant 2h30 puis récupération des cellules à  $DO_{600nm}=0,6$ .

**statMMC** : mise en phase exponentielle dans milieu LM17 ( $DO_{600nm}=0,6$ ), traitement par la mitomycine C à CMI/2 pendant 2h30 puis récupération des cellules à  $DO_{600nm}=1,6$ .

Toutes les expériences ont été réalisées au moins sur trois clones isolés indépendamment et chaque expérience a été réalisée au moins deux fois de façon indépendante.





## 2.1 Cartographie transcriptionnelle d'ICEST1 et ICESt3.

### 2.1.1 Analyse *in silico*.

Des analyses *in silico* préliminaires avaient été menées par Xavier Bellanger afin de proposer une organisation transcriptionnelle à ICESt1 et ICESt3 (20). Une analyse supplémentaire a été réalisée au début de ce travail. En se basant sur la séquence consensus du promoteur défini pour les Firmicutes (TTGACA-17nt-TATAAT) (294), elle a confirmé la présence d'un seul promoteur putatif pour les modules de conjugaison et de recombinaison nommé P<sub>cr</sub> (Figure 1 de l'article). De même, elle suggère une organisation en deux opérons des modules de régulation des deux éléments : *arp2-orfP* et *orfQ-arp1-orfR* pour ICESt1 et *arp2-orf385A-orf385B* et *orfQ-arp1-Δorf385C* pour ICESt3. Chez les deux ICE, les opérons contenant *arp2* et *orfQ* seraient respectivement sous le contrôle des promoteurs putatifs P<sub>arp2</sub> et P<sub>orfQ</sub>.

Aucun promoteur correspondant à une boîte -10 étendue (TnTGnTATAAT) (141) n'a été identifié. De plus, *S. thermophilus* ne possède qu'un seul facteur sigma alternatif, ComX, dont le motif putatif de fixation à l'ADN déduit d'analyses bioinformatiques précédemment réalisées au laboratoire n'a pas été détecté chez ICESt1 et ICESt3 (Catherine Eng et Virginie Libante com. pers).

***L'analyse bioinformatique d'ICESt1 et ICESt3 suggère que leur organisation transcriptionnelle serait similaire. Les ORF des modules de conjugaison et de recombinaison seraient cotranscrites à partir d'un promoteur unique et de façon divergente par rapport au module de régulation constitué de 2 opérons (Figure 1 de l'article).***

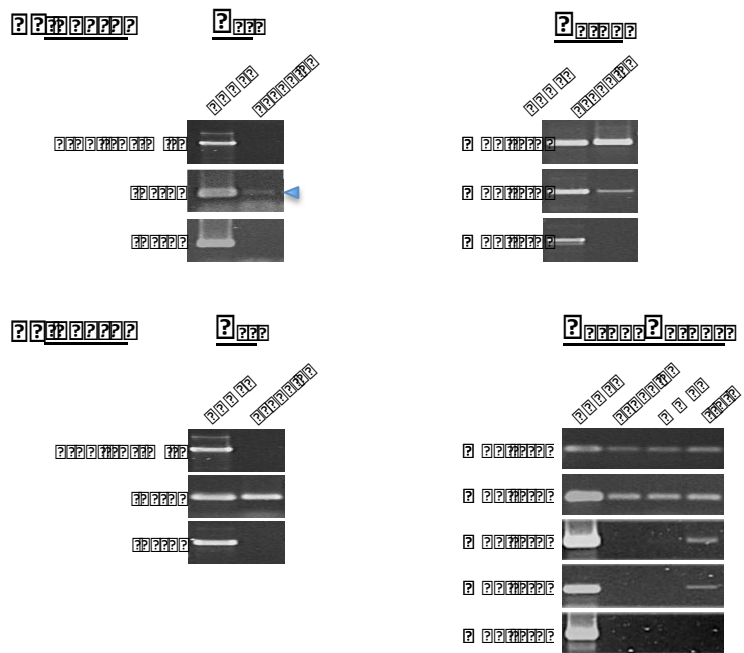
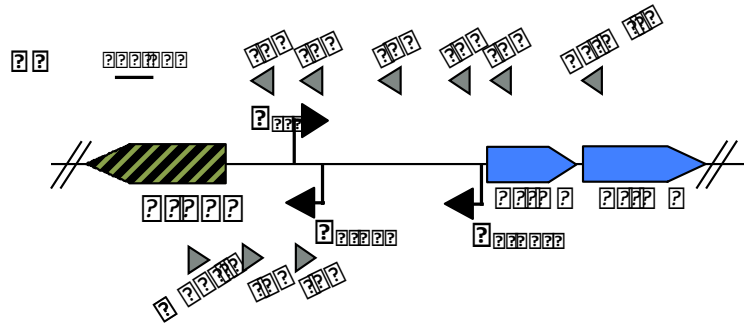
### 2.1.2 Analyse par RT-PCR de la région core.

L'analyse bioinformatique a été vérifiée expérimentalement par une approche de RT-PCR qui a permis de délimiter les régions promotrices et de déterminer les ORF cotranscrites. Pour cela, les ARN totaux ont été extraits et rétrotranscrits de façon non spécifique. Des oligonucléotides spécifiques ont été utilisés afin de déterminer quelles régions de l'élément appartenaient au même transcrit. Cette analyse a été réalisée dans différentes conditions (expo0.6, stat, MMC et statMMC) pour les deux ICE afin de déterminer l'impact de ces conditions sur la nature des ARNm (Figure S1 de l'article et Figure 23).

Pour les deux éléments dans les 4 conditions testées, toutes les ORF des modules de conjugaison et de recombinaison sont cotranscrites 2 à 2 ou 3 à 3 (Figure S1 de l'article). En

1. **Introduction**  
 2. **Materials and Methods**  
 3. **Results**  
 4. **Discussion**  
 5. **Conclusion**  
 6. **References**  
 7. **Appendix**  
 8. **Tables**  
 9. **Figures**  
 10. **Supplementary Information**  
 11. **Abstract**  
 12. **Keywords**  
 13. **Author Information**  
 14. **Correspondence**  
 15. **Conflict of Interest**  
 16. **Disclaimer**  
 17. **Disclaimer**  
 18. **Disclaimer**  
 19. **Disclaimer**  
 20. **Disclaimer**  
 21. **Disclaimer**  
 22. **Disclaimer**  
 23. **Disclaimer**  
 24. **Disclaimer**  
 25. **Disclaimer**  
 26. **Disclaimer**  
 27. **Disclaimer**  
 28. **Disclaimer**  
 29. **Disclaimer**  
 30. **Disclaimer**  
 31. **Disclaimer**  
 32. **Disclaimer**  
 33. **Disclaimer**  
 34. **Disclaimer**  
 35. **Disclaimer**  
 36. **Disclaimer**  
 37. **Disclaimer**  
 38. **Disclaimer**  
 39. **Disclaimer**  
 40. **Disclaimer**  
 41. **Disclaimer**  
 42. **Disclaimer**  
 43. **Disclaimer**  
 44. **Disclaimer**  
 45. **Disclaimer**  
 46. **Disclaimer**  
 47. **Disclaimer**  
 48. **Disclaimer**  
 49. **Disclaimer**  
 50. **Disclaimer**  
 51. **Disclaimer**  
 52. **Disclaimer**  
 53. **Disclaimer**  
 54. **Disclaimer**  
 55. **Disclaimer**  
 56. **Disclaimer**  
 57. **Disclaimer**  
 58. **Disclaimer**  
 59. **Disclaimer**  
 60. **Disclaimer**  
 61. **Disclaimer**  
 62. **Disclaimer**  
 63. **Disclaimer**  
 64. **Disclaimer**  
 65. **Disclaimer**  
 66. **Disclaimer**  
 67. **Disclaimer**  
 68. **Disclaimer**  
 69. **Disclaimer**  
 70. **Disclaimer**  
 71. **Disclaimer**  
 72. **Disclaimer**  
 73. **Disclaimer**  
 74. **Disclaimer**  
 75. **Disclaimer**  
 76. **Disclaimer**  
 77. **Disclaimer**  
 78. **Disclaimer**  
 79. **Disclaimer**  
 80. **Disclaimer**  
 81. **Disclaimer**  
 82. **Disclaimer**  
 83. **Disclaimer**  
 84. **Disclaimer**  
 85. **Disclaimer**  
 86. **Disclaimer**  
 87. **Disclaimer**  
 88. **Disclaimer**  
 89. **Disclaimer**  
 90. **Disclaimer**  
 91. **Disclaimer**  
 92. **Disclaimer**  
 93. **Disclaimer**  
 94. **Disclaimer**  
 95. **Disclaimer**  
 96. **Disclaimer**  
 97. **Disclaimer**  
 98. **Disclaimer**  
 99. **Disclaimer**  
 100. **Disclaimer**

1



2

1

1. **Introduction**  
 2. **Materials and Methods**  
 3. **Results**  
 4. **Discussion**  
 5. **Conclusion**  
 6. **References**  
 7. **Appendix**  
 8. **Tables**  
 9. **Figures**  
 10. **Supplementary Information**  
 11. **Abstract**  
 12. **Keywords**  
 13. **Author Information**  
 14. **Correspondence**  
 15. **Conflict of Interest**  
 16. **Disclaimer**  
 17. **Disclaimer**  
 18. **Disclaimer**  
 19. **Disclaimer**  
 20. **Disclaimer**  
 21. **Disclaimer**  
 22. **Disclaimer**  
 23. **Disclaimer**  
 24. **Disclaimer**  
 25. **Disclaimer**  
 26. **Disclaimer**  
 27. **Disclaimer**  
 28. **Disclaimer**  
 29. **Disclaimer**  
 30. **Disclaimer**  
 31. **Disclaimer**  
 32. **Disclaimer**  
 33. **Disclaimer**  
 34. **Disclaimer**  
 35. **Disclaimer**  
 36. **Disclaimer**  
 37. **Disclaimer**  
 38. **Disclaimer**  
 39. **Disclaimer**  
 40. **Disclaimer**  
 41. **Disclaimer**  
 42. **Disclaimer**  
 43. **Disclaimer**  
 44. **Disclaimer**  
 45. **Disclaimer**  
 46. **Disclaimer**  
 47. **Disclaimer**  
 48. **Disclaimer**  
 49. **Disclaimer**  
 50. **Disclaimer**  
 51. **Disclaimer**  
 52. **Disclaimer**  
 53. **Disclaimer**  
 54. **Disclaimer**  
 55. **Disclaimer**  
 56. **Disclaimer**  
 57. **Disclaimer**  
 58. **Disclaimer**  
 59. **Disclaimer**  
 60. **Disclaimer**  
 61. **Disclaimer**  
 62. **Disclaimer**  
 63. **Disclaimer**  
 64. **Disclaimer**  
 65. **Disclaimer**  
 66. **Disclaimer**  
 67. **Disclaimer**  
 68. **Disclaimer**  
 69. **Disclaimer**  
 70. **Disclaimer**  
 71. **Disclaimer**  
 72. **Disclaimer**  
 73. **Disclaimer**  
 74. **Disclaimer**  
 75. **Disclaimer**  
 76. **Disclaimer**  
 77. **Disclaimer**  
 78. **Disclaimer**  
 79. **Disclaimer**  
 80. **Disclaimer**  
 81. **Disclaimer**  
 82. **Disclaimer**  
 83. **Disclaimer**  
 84. **Disclaimer**  
 85. **Disclaimer**  
 86. **Disclaimer**  
 87. **Disclaimer**  
 88. **Disclaimer**  
 89. **Disclaimer**  
 90. **Disclaimer**  
 91. **Disclaimer**  
 92. **Disclaimer**  
 93. **Disclaimer**  
 94. **Disclaimer**  
 95. **Disclaimer**  
 96. **Disclaimer**  
 97. **Disclaimer**  
 98. **Disclaimer**  
 99. **Disclaimer**  
 100. **Disclaimer**

1

22

séquences, a été confirmée par co-migration avec un marqueur de taille. Le triangle bleu indique la présence d'un produit d'amplification de faible intensité dans la piste expo0.6. Des profils similaires ont été obtenus en phase stationnaire (stat) et après un traitement à la MMC (MMC).

C. Profil de migration des produits d'amplification obtenus à partir d'extraction d'ADNg ou ADNc correspondant aux ARN de la souche CNRZ385 portant ICESt3 extraits en phase exponentielle (expo0.6), après un traitement à la MMC (MMC) et en phase stationnaire (stat). Les couples d'amorces utilisés sont indiqués à gauche. La taille des produits de PCR, déduite des analyses de séquences, a été confirmée par co-migration avec un marqueur de taille. Pour les couples d'amorces arp2.f/orfM.r, f2/r3 et f3/r3; des profils similaires ont été obtenus en phase stationnaire (stat) et après un traitement à la MMC (MMC).

L'analyse par RT-PCR du module de régulation d'ICESt1 a montré que les ORF *arp2* et *orfP* sont cotranscrites, ainsi que *orfQ*, *arp1* et *orfR*. De plus, *orfP* et *orfQ* ne sont cotranscrites dans aucune des conditions testées, confirmant une organisation en deux opérons du module de régulation avec un terminateur transcriptionnel et un promoteur P<sub>orfQ</sub> localisés entre *orfP* et *orfQ*. Le promoteur P<sub>arp2</sub> a également été localisé dans la région prédite (Figure 23.B).

Pour ICESt3, les ORF *arp2*, *orf385A* et *orf385B* ainsi que *orfQ*, *arp1* et  $\Delta$ *orf385C* appartenant aux 2 opérons prédits sont cotranscrites. Cependant, contrairement à ce qui est observé chez ICESt1, les ORF *orf385B* et *orfQ* sont également cotranscrites, suggérant un opéron unique pour le module de régulation d'ICESt3, dans toutes les conditions testées.

La structure d'un terminateur transcriptionnel potentiel localisé entre *orf385B* et *orfQ* a été analysée à l'aide du logiciel RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). L'énergie libre prédite de la structure tige-boucle du terminateur putatif d'ICESt3 n'est que de 4,3 kcal.mol<sup>-1</sup> alors qu'elle est de 8,2 kcal.mol<sup>-1</sup> pour le terminateur d'ICESt1. Ceci suggère que la force du terminateur d'ICESt3 pourrait ne pas être suffisante pour bloquer la transcription provenant de l'opéron contenant *arp2*, du moins pas totalement, alors que le terminateur d'ICESt1 est capable d'arrêter la transcription.

Le promoteur P<sub>arp2</sub> a été localisé dans la région prédite en phase exponentielle de croissance (expo0.6 et MMC) alors qu'une activité promotrice a été détectée en amont de celui-ci en phase stationnaire (stat et statMMC) chez ICESt3 (figure 23.C). Ces résultats suggèrent l'activation d'un promoteur spécifique de la phase stationnaire en amont de P<sub>arp2</sub>. Ce promoteur, nommé P<sub>arp2s</sub>, a été localisé entre les amorces r4 et r5 (Figure 2 de l'article et figure 23.C).

***La structure opéronique unique des modules de conjugaison et de recombinaison des deux ICE est identique alors que celle du module de régulation est différente. La phase stationnaire et/ou la densité cellulaire induit l'activation d'un promoteur spécifique non prédit chez ICESt3.***

### 2.1.3 Détermination des points +1 de transcription de la région core.

La technique de 5' RACE PCR a été utilisée pour localiser les +1 des transcrits de la région core d'ICESt1 et ICESt3. Brièvement, cette technique repose sur la rétrotranscription spécifique et le marquage par une queue polyC de l'extrémité 5' d'un ARN. Le produit obtenu est amplifié par PCR et séquencé, le nucléotide +1 étant le dernier nucléotide situé avant la queue polyC. La délimitation des régions promotrices par RT-PCR a permis le choix d'oligonucléotides spécifiques proches du point d'initiation putatif de la transcription à déterminer. Les différences qualitatives en terme d'ADNc observées précédemment pour ICESt3 soulignaient un effet de la phase de croissance (présence de P<sub>arp2s</sub>). Les points + 1 de transcription ont donc été déterminés en phase exponentielle et en phase stationnaire pour les deux ICE.

Pour ICESt1, tous les points +1 de transcription sont identiques en phase exponentielle et en phase stationnaire. Pour les promoteurs P<sub>orfQ</sub>, P<sub>arp2</sub> et P<sub>cr</sub>, le point +1 de transcription déterminé expérimentalement correspond au nucléotide A situé 10 nt en aval de la boîte -10 associée au promoteur prédit *in silico* (Figure 24).



avait été détectée en amont. La séquence obtenue par 5'RACE PCR a révélé un signal peu résolutif situé dans une répétition homopolymérique de 6 nucléotides T (séquence du brin complémentaire). Le point +1 de transcription correspondant à  $P_{arp2s}$  a été associé au 10<sup>ème</sup> nucléotide A situé en aval de la boîte -10 d'un promoteur de séquence TTGTCA-15nt-TGTAAT. Par ailleurs, malgré l'absence d'activité transcriptionnelle associée à un promoteur  $P_{arp2s}$  chez *ICEST1*, la séquence d'un promoteur putatif identique à celle d'*ICEST3* a été identifiée (Figure S2 de l'article).

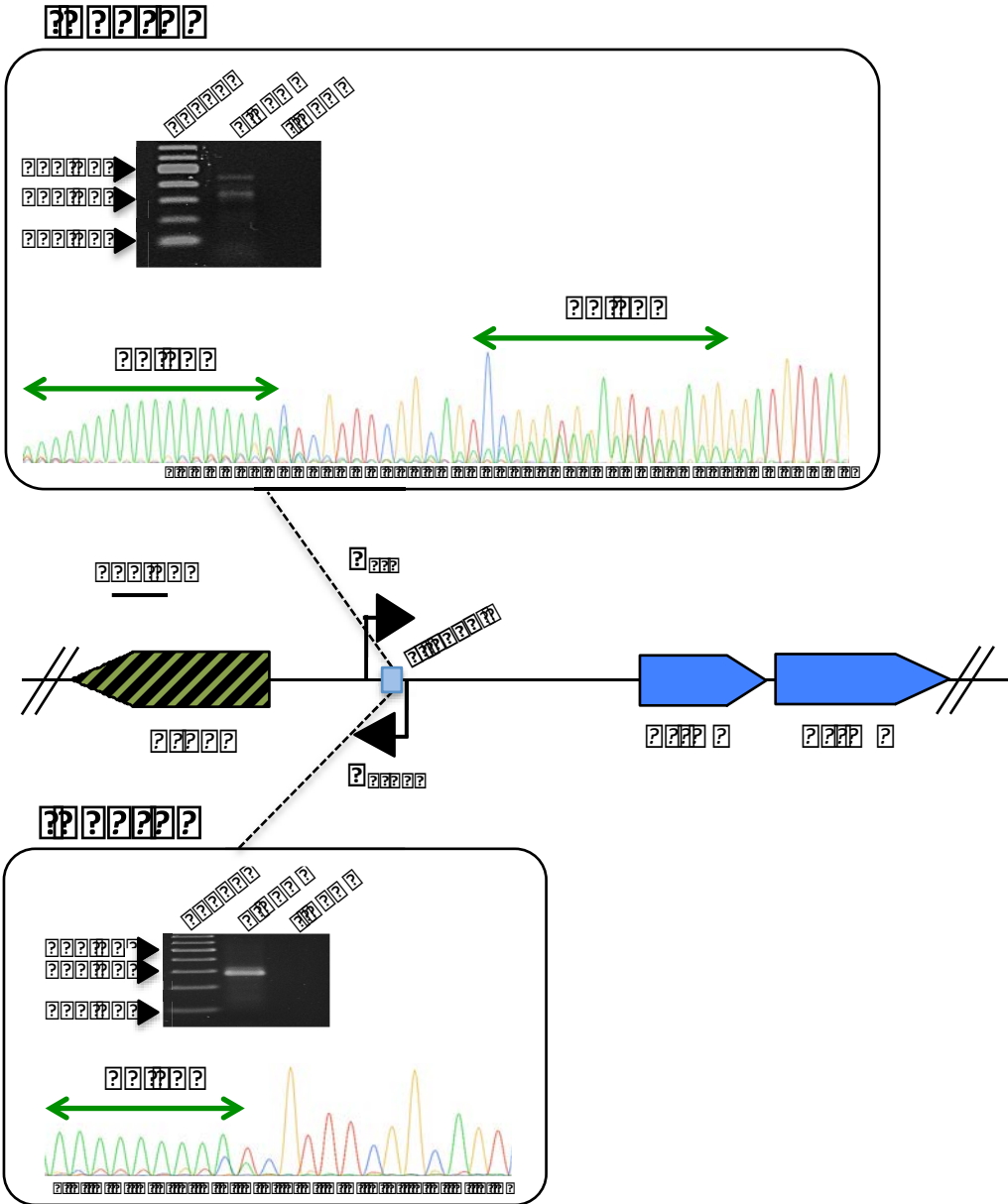
Le point +1 de transcription associé au promoteur  $P_{cr}$  d'*ICEST3* n'a pas pu être déterminé en raison d'un clivage de l'ARN décrit ultérieurement (partie 2.1.4). Des analyses complémentaires de RT-PCR ont permis de préciser sa localisation dans la région de 70 pb séparant les amorces f3 et f4 où seul le promoteur  $P_{cr}$  a été identifié (Figure 2 de l'article).

***Malgré une organisation prédite in silico similaire, ICES<sub>t</sub>1 et ICES<sub>t</sub>3 possèdent des organisations transcriptionnelles différentes. Notamment, les deux opérons du module de régulation d'ICES<sub>t</sub>3 sont cotranscrits et un promoteur spécifique de la phase stationnaire est situé en amont du module de régulation.***

La cartographie transcriptionnelle de la région core d'*ICES<sub>t</sub>1* et *ICES<sub>t</sub>3* est décrite en Figure 1 de l'article (page 83).

#### **2.1.4 Clivage du transcrit des modules de conjugaison et de recombinaison.**

Chez *ICES<sub>t</sub>1* en phase exponentielle, le produit d'amplification de 5'RACE-PCR de taille attendue pour  $P_{cr}$  est accompagné d'un produit de plus faible poids moléculaire (Figure 25). Le séquençage de ce produit a révélé qu'il correspond à un mélange d'extrémités 5' de l'ARN qui ne correspondent pas à l'extrémité 5' du transcrit, comme en témoigne la présence d'un signal polyC interne (Figure 25). Ceci suggère que l'extrémité du transcrit des modules de conjugaison et de recombinaison est la cible d'un clivage endonucléotidique, la région séparant ces extrémités 5' du point +1 de transcription ne présentant pas de signaux polyC.



?

Figure 1. Schematic representation of the gene structure and sequencing traces. The top panel shows the full-length transcript with a 5' cap and poly-A tail. The middle panel shows a schematic of the gene with exons as boxes and introns as lines with arrows. The bottom panel shows a shorter transcript and a sequencing trace with a shorter green arrow indicating a smaller deletion.

The gene structure is shown in the middle panel. The exons are represented by boxes, and the introns are represented by lines with arrows. The top panel shows the full-length transcript with a 5' cap and poly-A tail. The bottom panel shows a shorter transcript and a sequencing trace with a shorter green arrow indicating a smaller deletion.

The gene structure is shown in the middle panel. The exons are represented by boxes, and the introns are represented by lines with arrows. The top panel shows the full-length transcript with a 5' cap and poly-A tail. The bottom panel shows a shorter transcript and a sequencing trace with a shorter green arrow indicating a smaller deletion.

?

?

??









## 2.2 Activité transcriptionnelle des ICE.

Après avoir déterminé les unités transcriptionnelles de la région core d'ICESt1 et ICESt3, les différents transcrits ont été quantifiés par qPCR. Les amorces utilisées pour ces expériences présentent toutes les caractéristiques requises pour leur utilisation en qPCR, notamment une efficacité d'amplification supérieure à 85%. La quantité de transcrits du gène de ménage *gyrA* codant une sous-unité de l'ADN gyrase a été utilisée afin de normaliser les quantités des transcrits étudiés. La quantité du transcrit étudié est exprimée en nombre de copies de l'ADNc de l'ARN dosé par rapport au nombre de copies de l'ADNc correspondant au transcrit du gène *gyrA*. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant comme référence le gène de ménage *ldh* codant la lactate déshydrogénase (données non montrées).

### 2.2.1 Quantification du transcrit des modules de conjugaison et recombinaison.

La quantité du transcrit des modules de conjugaison et de recombinaison a été dosée en trois points par qPCR: au début (jonction entre *orfM* et *orfL*), au milieu (jonction entre *orfD* et *orfC*) et à la fin (dans le gène *int* codant l'intégrase) (Figure 29 et Figure 3 de l'article).

La quantité du transcrit d'ICESt1 est inférieure à celle d'ICESt3, d'au moins un facteur 13. Par ailleurs, en phase stationnaire, la quantité de ce transcrit augmente d'au moins un facteur 12 pour ICESt1 et 11 pour ICESt3 (Figure 29). De surcroît, un traitement endommageant l'ADN provoque une augmentation d'un facteur au moins 16 pour ICESt1 et d'au moins 80 pour ICESt3.

***La quantité du transcrit des modules de conjugaison et de recombinaison augmente en phase stationnaire et en présence de dommages à l'ADN chez les deux éléments. La quantité de ce transcrit est nettement inférieure chez ICESt1 comparé à ICESt3, quelles que soient les conditions.***



### 2.2.2 Quantification des transcrits du module de régulation.

Pour les deux éléments, les transcrits correspondant aux 2 opérons du module de régulation ont été quantifiés (Figure 29).

Chez ICESt1, la quantité du transcrit contenant *arp2* ne varie pas dans les conditions testées alors que celle du transcrit contenant *arp1* augmente d'un facteur 10 en présence de MMC. En phase stationnaire, la quantité des 2 transcrits du module de régulation ne varie pas par rapport à la phase exponentielle, ce qui suggère que l'augmentation de la quantité du transcrit des modules de conjugaison et de recombinaison pourrait être régulée à un niveau post-transcriptionnel en phase stationnaire.

Chez ICESt3, les deux opérons du module de régulation sont transcrits individuellement à partir des promoteurs  $P_{arp2}$  et  $P_{orfQ}$ , et cotranscrits à partir du promoteur  $P_{arp2}$  (et  $P_{arp2s}$  en phase stationnaire). Pour chaque condition, la quantité de transcrit des deux opérons est équivalente (Figure 29). De plus, la phase stationnaire et la MMC induisent une augmentation de la quantité de ces transcrits, respectivement d'un facteur 12 et 42. L'augmentation de la quantité du transcrit des modules de conjugaison et de recombinaison est corrélée à une augmentation de la quantité des transcrits du module de régulation.

***La phase stationnaire et les dommages à l'ADN induisent une augmentation globale des transcrits de la région core d'ICESt1 et ICESt3.***

Chez les ICE et prophages connus codant soit un régulateur de type *cl* soit un régulateur de type *ImmR*, l'activation transcriptionnelle des fonctions de transfert est associée à une diminution de la quantité du transcrit du module codant le régulateur.

***Chez ICESt1 et ICESt3, qui codent un régulateur de type *cl* et un régulateur de type *ImmR*, l'activation transcriptionnelle de la région core est globale, ce qui suggère que ces éléments pourraient avoir un mécanisme de régulation différent.***

## 3 Analyse fonctionnelle d'ICESt1 et ICESt3.

Une analyse fonctionnelle d'ICESt1 et ICESt3 a été entreprise afin de déterminer si leur activité transcriptionnelle était corrélée à leur excision et à leur transfert. Des résultats précédents avaient montré une induction du transfert d'ICESt3 par la MMC, agent endommageant l'ADN, mais l'impact de la phase de croissance n'avait pas été évalué (22).

En effet, la méthode de conjugaison sur filtre ne permet pas d'apprécier la dynamique de l'élément au cours de la croissance. Comme pour l'analyse transcriptionnelle, les cultures ont été réalisées en milieu liquide.

### **3.1. Quantification de l'excision**

L'impact de différentes conditions de cultures sur l'excision d'ICESt1 et ICESt3 a été testé. Des oligonucléotides spécifiques ont été utilisés en qPCR afin d'amplifier le site *attB* chromosomique résultant de l'excision de l'ICE (Figure 4.A de l'article). Le pourcentage d'excision correspond donc au nombre de sites *attB* rapporté au nombre de copies d'une région interne du gène *fda*. Des contrôles ont été effectués sur les souches CNRZ368ΔICESt1 et CNRZ385ΔICESt3. Dans ces souches, le nombre de copies d'*attB* et de *fda* sont identiques.

#### **3.1.1 Effet de la phase de croissance.**

L'impact de la phase de croissance sur le pourcentage d'excision d'ICESt1 et ICESt3 a été évalué à partir d'extractions d'ADNg de cultures cellulaires en début (expo0.2) et en milieu (expo0.6) de phase exponentielle de croissance ainsi qu'en phase stationnaire (stat) (Figure 4.B de l'article). Quelle que soit la phase de croissance, ICESt1 s'excise beaucoup moins qu'ICESt3 (d'au moins un facteur 5), ce qui est en accord avec les données transcriptionnelles. De plus, les pourcentages d'excision d'ICESt1 et ICESt3 augmentent respectivement d'un facteur 5 et 1,3 en phase stationnaire par rapport au début de phase exponentielle. Si l'augmentation observée pour ICESt3 est faible, elle est néanmoins significative.

***L'excision d'ICESt1 et ICESt3 est légèrement augmentée en phase stationnaire de croissance.***

#### **3.1.2 Effet des agents endommageant l'ADN.**

Bien qu'un événement putatif de transfert d'ICESt1 ait été obtenu en absence de MMC, le transfert de cet élément n'a jamais été observé en présence de dommages à l'ADN (22). Néanmoins, le pourcentage d'excision d'ICESt1 est induit quasiment d'un facteur 40 en présence de MMC, avec 4,3 % d'excision (Figure 4.C de l'article). Pour ICESt3, la fréquence d'excision d'ICESt3 est augmentée facteur 18 avec plus de 90 % de sites *attB* chromosomiques.

En phase stationnaire (stat), l'ajout de MMC (statMMC) ne modifie pas le pourcentage d'excision d'ICESt1 et ICESt3 par rapport à la phase stationnaire non traitée.

***Les dommages à l'ADN induisent une forte augmentation de l'excision d'ICESt1 et ICESt3 en phase exponentielle mais non en phase stationnaire.***

### 3.1.3 Effet du milieu de culture.

L'excision d'ICESt1 et ICESt3 a été dosée sur l'ADNg extrait de cellules cultivées en milieu riche HJGL et récupérées en phase stationnaire (HJGL). Si ICESt3 est capable de se transférer dans le milieu riche LM17, son transfert dans le milieu riche HJGL n'a jamais été observé, suggérant que certains composés du milieu pourraient affecter l'activité de ces éléments (22).

La fréquence d'excision d'ICESt1 dans ce milieu est réduite d'un facteur 185 par rapport au milieu LM17, laissant à penser que certains composés pourraient interférer avec des mécanismes intracellulaires modulant l'activité de cet ICE. Par ailleurs, l'excision d'ICESt3 n'est pas affectée, suggérant que l'absence de transfert de cet élément dans ce milieu ne serait pas due à la répression de son excision.

***Par rapport au milieu LM17, le milieu HJGL induit une répression de l'excision d'ICESt1 et n'affecte pas celle d'ICESt3, même s'il ne permet pas le transfert de ce dernier.***

### 3.2 Nombre de copies extrachromosomiques d'ICESt3.

Afin de confirmer les fréquences d'excision obtenues en dosant le nombre de sites chromosomiques *attB*, le nombre de sites *attI*, portés par la forme circulaire résultant de l'excision de l'élément, a également été dosé (Figure 4.A de l'article). Des limites expérimentales n'ont pas permis de doser le site *attI* d'ICESt1, les 4 couples d'amorces testés n'étaient pas utilisables en qPCR.

Pour ICESt3, le nombre de sites *attI* est quasiment identique au nombre de site *attB*, dans toutes les conditions testées, excepté en phase exponentielle traitée à la MMC. En effet, dans cette dernière condition, où l'activité de l'élément est élevée avec plus de 90% d'excision, environ 10 sites *attI* ont été dosés pour 1 site *attB* ( $attI/attB = 9,95 \pm 1,42$ ).

***Un état multicopie de la forme circulaire d'ICESt3 est observé en phase exponentielle en présence de MMC ce qui suggère une réplication de l'élément dans ces conditions.***





de l'élément ont été dosés. (Figure 30). La quantité de tous les loci n'est pas significativement différente, y compris pour ceux situés de part et d'autre de l'*oriT* (*M/L* et *J/I*). Ces résultats confirment cependant l'état multicopie d'*ICESt3* en présence de MMC.

***ICESt3 est dans un état multicopie dans des bactéries en phase exponentielle traitées par la MMC, suggérant une réplication de l'élément.***

### 3.4 Effet de souche sur l'activité des ICE.

La différence d'activité d'*ICESt1* et *ICESt3* pouvait être en partie, ou en totalité, due à un effet de la souche hôte au sein de l'espèce *S. thermophilus*. Des dosages du nombre de l'origine (*dnaA*) et du terminus (*xerS*) de réplication du chromosome ont montré que la souche CNRZ368 portant *ICESt1* est beaucoup moins affectée par un traitement à la MMC à CMI/2 comparée à la souche CNRZ385 portant *ICESt3* (tableau 1). Chez cette dernière, le nombre d'origine de réplication atteint 10 fois le nombre de terminus. Cette différence physiologique des souches, dans une condition influençant fortement l'activité d'*ICESt1* et *ICESt3*, suggère qu'elle pourrait avoir un impact sur l'activité de ces éléments.

	CNRZ368	CNRZ385
expo0.6	<b>2,01 ± 0,30</b>	<b>2,03 ± 0,18</b>
stat	<b>1,45 ± 0,02</b>	<b>1,69 ± 0,15</b>
MMC	<b>2,44 ± 0,09</b>	<b>9,63 ± 0,93</b>

**Tableau 1: Rapport entre le nombre d'origine et de terminus de réplication du chromosome de *S. thermophilus*.**

Le nombre de copies du gène *dnaA* situé au niveau de l'origine de réplication du chromosome a été dosé par qPCR sur ADNg et rapporté au nombre de copies du gène *xerS* situé au terminus de réplication du chromosome. Les valeurs correspondent à la moyenne et la déviation standard obtenues à partir de 3 clones indépendants de la souche indiquée et dans la condition indiquée.

Pour tenter de s'affranchir d'un effet de l'hôte, l'activité des éléments devait être comparée dans des souches différentes. En particulier, l'analyse du comportement d'*ICESt1* dans la souche hôte d'origine d'*ICESt3*, et réciproquement, devait permettre d'évaluer la part de l'effet de souche dans la différence de comportement de ces éléments.

Un seul transconjugant putatif d'*ICESt1* avait été obtenu précédemment et son transfert intra-espèce n'a pas été obtenu lors de ce travail. Une stratégie alternative à la

conjugaison a également été utilisée. Pour cela, des tests de transformation naturelle ont été réalisés à partir d'extractions d'ADNg de la souche CNRZ368 contenant l'élément ICES $t1cat$  marqué par le gène de résistance au chloramphénicol *cat* (22) pour introduire l'élément dans les souches CNRZ385 $\Delta$ ICES $t3$  et LMG18311 (dépourvues d'élément intégré au site *attB*). Les régions flanquant l'élément ICES $t1cat$  dans la souche CNRZ368 sont homologues à celles bordant le site *attB* dans le chromosome des souches CNRZ385 $\Delta$ ICES $t3$  et LMG18311. Un événement de double recombinaison homologue conduirait donc au remplacement du site *attB* par l'élément marqué et donc à l'acquisition de la résistance au chloramphénicol. Néanmoins, ces tentatives se sont révélées infructueuses et cela pourrait impliquer la taille d'ICES $t1$ . En effet, chez la plupart des bactéries chez qui la transformation a été étudiée, la majorité des fragments internalisés par transformation naturelle fait moins de 10 kb alors qu'ICES $t1$  fait plus de 35 kb (190). De ce fait, l'internalisation d'un fragment contenant l'intégralité de la séquence d'ICES $t1$  ainsi que ses régions flanquantes est fort peu probable. Il se pourrait également que les souches utilisées ne soient pas ou seulement peu transformables. En effet, si la transformation naturelle est efficace chez *S. thermophilus* LMD9, elle l'est beaucoup moins chez d'autres souches comme LMG18311 (104). De plus, des tests de transformation naturelle ont été réalisés chez ces différentes souches avec de l'ADN plasmidique et n'ont permis d'obtenir des transformants que pour la souche LMD9.

En revanche, ICES $t3$  a été transféré par conjugaison vers les souches LMG18311 et CNRZ368 $\Delta$ ICES $t1$  ce qui a permis de comparer l'activité de cet élément dans 3 souches, dont la souche hôte d'ICES $t1$ .

#### **3.4.1 Activité d'ICES $t3$ chez LMG18311.**

ICES $t3$  avait été marqué par insertion du gène de résistance au chloramphénicol *cat* dans le pseudogène  $\Psi_{orf385J}$  de la région variable (ICES $t3cat$ ) chez la souche CNRZ385 (CNRZ385 ICES $t3cat$ ). Cet élément avait ensuite été transféré vers la souche réceptrice LMG18311 portant le plasmide non-mobilisable conférant la résistance à l'érythromycine pMG36e (22).

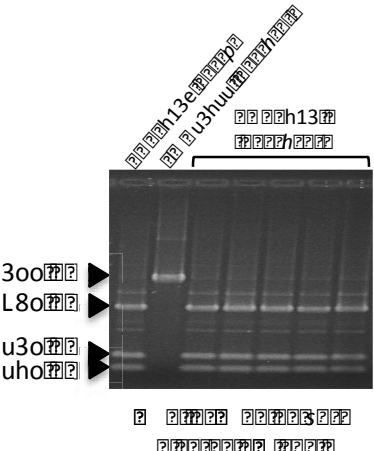
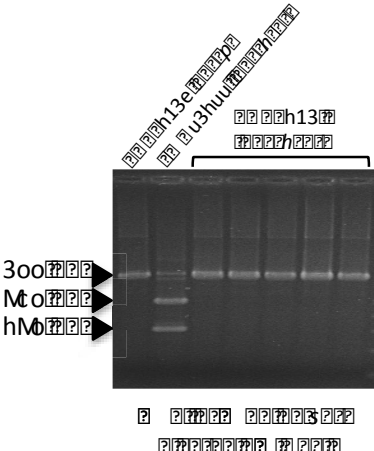
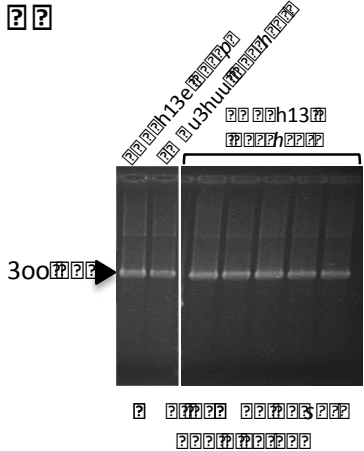
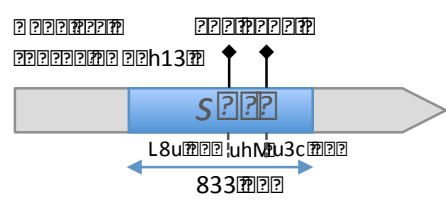
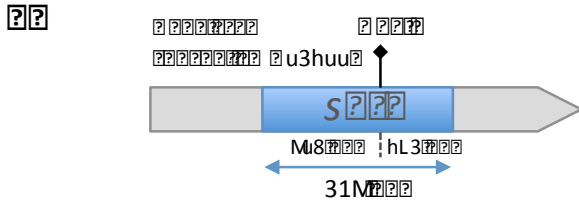
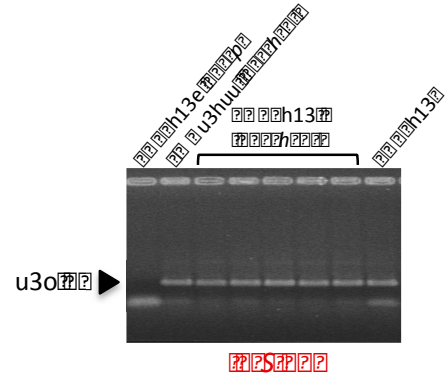
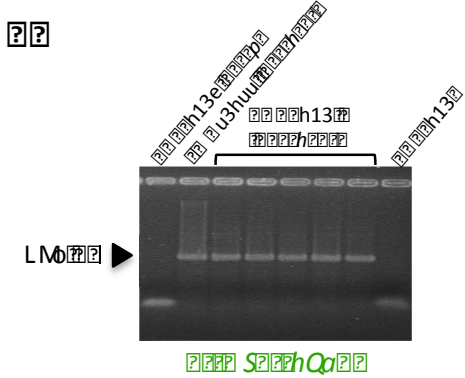
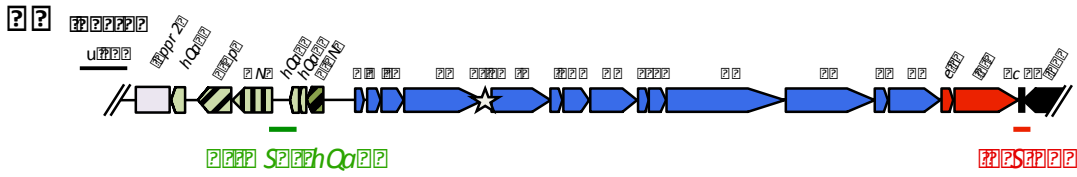
Chez LMG18311 ICES $t3cat$ , les pourcentages d'excision d'ICES $t3$  sont de 3,7 % en phase exponentielle, 5 % en phase stationnaire et 53 % en présence de MMC. Si ces valeurs sont légèrement moins élevées que chez la souche CNRZ385, la phase stationnaire et les dommages à l'ADN induisent l'excision de l'élément dans les mêmes proportions (Figure 5 de l'article). De plus, un traitement à la MMC induit également la répllication d'ICES $t3$  chez la souche LMG18311 avec environ 8 copies de l'élément ( $8,27 \pm 1,27$ ).

***Le pourcentage d'excision d'ICES $t3$  est légèrement réduit chez LMG18311 par rapport à CNRZ385. ICES $t3$  est toujours capable de se répliquer chez cette souche.***

Des tests de conjugaison ont été réalisés à partir de cette souche afin d'évaluer si l'élément était toujours capable de se transférer de façon intra-espèce. Pour cela, les souches LMG18311 ICESt3*cat* et un dérivé de la souche CNRZ368ΔICESt1 spontanément résistante à la streptomycine et à la rifampicine ont été respectivement utilisées comme souches donatrices et réceptrices lors de conjugaisons sur filtre (22).

La nature des transconjugants putatifs résistants à la rifampicine, à la streptomycine et au chloramphénicol a été vérifiée par PCR. Des PCR ont permis de vérifier la présence d'ICESt3 grâce à l'amplification d'un fragment correspondant à la jonction d'*orfQ* et *orf385B*, qui est spécifique du module de régulation de cet élément, ainsi que la jonction chromosomique *int/fda* (Figure 31.A et B). Des fragments de taille attendue ont été obtenus pour tous les clones étudiés, qui portent donc ICESt3 inséré au locus *fda*. D'autres PCR ont permis d'identifier la souche dont les transconjugants putatifs sont issus par l'amplification d'un fragment interne au gène *cse*. Ce gène est propre à *S. thermophilus* et possède une région centrale hautement variable en séquence et en longueur nommée *var* (30). Des allèles de *cse* très différents sont portés par les souches donatrices et réceptrices utilisées. Bien que la taille des fragments d'amplification soit trop proche pour être différenciables sur gel d'agarose, les différents allèles de *cse* sont facilement identifiables par digestion des produits de PCR purifiés (Figure 31.C et D). Les fragments de restriction obtenus ont une taille compatible avec les prédictions, les transconjugants sont donc bien des dérivés de CNRZ368 ayant acquis ICESt3.

***A partir de LMG18311, ICESt3 est toujours capable de se transférer de façon intra-espèce.***



?

**g: gur**

as

as

?

??

C. Représentation schématique du gène *cse*. La région variable est représentée par une boîte bleue. La taille de la région variable ainsi que celle des produits résultant de sa digestion sont déduites des analyses de séquences et sont indiquées.

D. Vérification par PCR des souches correspondant aux transconjugants. Les profils de migration correspondent aux produits d'amplification et de digestion obtenus à partir des ADNg extraits à partir des souches indiquées. La taille des produits de PCR et des fragments de restriction, déduite des analyses de séquences, a été confirmée par co-migration avec un marqueur de taille.

### 3.4.2 Activité d'ICESt3 chez CNRZ368.

L'obtention de la souche CNRZ368 ICESt3*cat* a permis d'étudier le comportement d'ICESt3 dans un environnement génétique identique à celui d'ICESt1. Néanmoins, les résistances spontanées portées par la cellule réceptrice utilisée et les transconjugants obtenus auraient pu les affecter dans leur métabolisme. Des vérifications ont cependant montré que ces souches avaient toutes la même morphologie, les mêmes paramètres de croissance et la même CMI pour la MMC.

L'activité d'excision d'ICESt3 chez cette souche est inférieure à celle mesurée chez CNRZ385 et LMG18311. En effet, le pourcentage d'excision d'ICESt3 est d'environ 0,7 % en phase exponentielle, 2,2 % en phase stationnaire et 10,7 % après un traitement à la MMC (Figure 5 de l'article). Néanmoins, ICESt3 reste plus actif qu'ICESt1 chez CNRZ368 (au moins d'un facteur 2,4). Enfin, le dosage du nombre de copies d'ICESt3 n'a pas révélé de réplication, même en présence de dommages à l'ADN.

Des expériences de conjugaison ont été entreprises afin de tester si ICESt3 est toujours capable de se transférer à partir de la souche CNRZ368. Pour cela, les souches CNRZ368 ICESt3*cat* spontanément résistante à la streptomycine et à la rifampicine et LMG18311 pMG36e (portant une résistance à l'érythromycine) ont été respectivement utilisées comme souches donatrices et réceptrices lors de conjugaison sur filtre. La nature des 4 transconjugants putatifs résistants à l'érythromycine et au chloramphénicol a été vérifiée par PCR comme précédemment. Ils se sont révélés être tous les 4 porteurs d'un allèle *cse* correspondant à la souche LMG18311 et pourvus de l'élément ICESt3.

***La souche CNRZ368 provoque une répression partielle des activités d'excision et de transfert d'ICESt3 et ne permet pas la réplication de cet élément.***

***L'absence de transfert d'ICESt1 semble inhérente à l'élément, même si la souche CNRZ368 n'est pas propice à une activité élevée des ICE.***

**ARTICLE**



**Differential regulation of two closely related integrative and conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*.**

5 Carraro Nicolas<sup>1,2</sup>, Libante Virginie<sup>1,2\*</sup>, Morel Catherine<sup>1,2</sup>, Decaris Bernard<sup>1,2</sup>, Charron-Bourgoin Florence<sup>1,2</sup>, Leblond Pierre<sup>1,2</sup> and Guédon Gérard<sup>1,2</sup>.

1 Nancy-Université, UMR1128, Génétique et Microbiologie, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

2 INRA, UMR1128, Génétique et Microbiologie, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

10 \* Corresponding author

Email addresses:

Carraro Nicolas [Nicolas.Carraro@scbiol.uhp-nancy.fr](mailto:Nicolas.Carraro@scbiol.uhp-nancy.fr)

Virginie Libante [Virginie.Libante@scbiol.uhp-nancy.fr](mailto:Virginie.Libante@scbiol.uhp-nancy.fr)

Catherine Morel [catherine.morel@scbiol.uhp-nancy.fr](mailto:catherine.morel@scbiol.uhp-nancy.fr)

15 Bernard Decaris [decaris@nancy.inra.fr](mailto:decaris@nancy.inra.fr)

Florence Charron Bourgoin [Florence.Charron-Bourgoin@scbiol.uhp-nancy.fr](mailto:Florence.Charron-Bourgoin@scbiol.uhp-nancy.fr)

Pierre Leblond [leblond@nancy.inra.fr](mailto:leblond@nancy.inra.fr)

Gerard Guédon [guedon@nancy.inra.fr](mailto:guedon@nancy.inra.fr)



20 **Abstract:**

**Background:** Two closely related ICEs, *ICESt1* and *ICESt3*, have been identified in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. While their conjugation and recombination modules are almost identical (95 % nucleotide identity) and their regulation modules related, previous work has demonstrated that transconjugants carrying *ICESt3* were generated at rate  
25 exceeding by a 1000 factor that of *ICESt1*.

**Results:** The functional regulation of *ICESt1* and *ICESt3* transcription, excision and replication were investigated under different conditions (exponential growth or stationary phase, DNA damage by exposition to mitomycin C). Analysis revealed an identical transcriptional organization of their recombination and conjugation modules (long unique  
30 transcript) whereas the transcriptional organization of their regulation modules were found to be different (two operons in *ICESt1* but only one in *ICESt3*) and to depend on the conditions (promoter specific of stationary phase in *ICESt3*). For both elements, stationary phase and DNA damage lead to the rise of transcript levels of the conjugation-recombination and regulation modules.. Whatever the growth culture conditions, excision of *ICESt1* was found to  
35 be lower than that of *ICESt3*, which is consistent with weaker transfer frequencies. Furthermore, for both elements, excision increases in stationary phase (8.9-fold for *ICESt1* and 1.31-fold for *ICESt3*) and is strongly enhanced by DNA damage (38-fold for *ICESt1* and 18-fold for *ICESt3*). Although ICEs are generally not described as replicative elements, the copy number of *ICESt3* exhibited a sharp increase (9.6-fold) after mitomycin C exposure of  
40 its harboring strain CNRZ385. This result was not observed when *ICESt3* was introduced in a strain deriving *ICESt1* host strain CNRZ368, deleted for this element. This finding suggests an impact of the host cell on ICE behavior.

**Conclusions:** All together, these results suggest a novel mechanism of regulation shared by *ICESt1*, *ICESt3* and closely related ICEs, which we identified by analysis of recently  
45 sequenced genomes of firmicutes. This is the first report of a partial shutdown of the activity of an ICE executed by a strain belonging to its primary host species. The sharp increase of *ICESt3* copy number suggests an induction of replication; such conditional intracellular replication may be common among ICEs.

## Background

50 Acquisition of genomic islands (GIs) plays a key role in bacterial evolution [1, 2]. *In silico* analyses revealed that numerous GIs probably belong to Integrative and Conjugative Elements (ICEs) or are ICE-deriving elements [3, 4]. ICEs, including conjugative transposons, were defined as autonomous mobile elements that encode the functions needed for their excision, conjugative transfer and integration [3].

55 Cis-acting sequences and genes involved in a same biological process (for example conjugation) are generally grouped in a module, such as *oriT* and genes encoding relaxosome and conjugation pore. The recombination, conjugation and regulation modules are frequently grouped to form the core region of the ICEs. Although ICEs replicate during their conjugative transfer, it was originally assumed that they are incapable of autonomous  
60 intracellular replication and that their maintenance during cell growth and division only relies on their integration in the chromosome. Besides one or few core regions, they also harbor highly variable regions that encode functions potentially useful for the bacterial host [5]. Comparison of the organization of related ICEs, such as Tn916 and its close relatives, revealed that they evolve by deletion, acquisition and/or exchange of modules. The  
65 conjugation, tetracycline resistance and regulation modules of Tn916 and Tn5397 are closely related whereas their recombination modules are unrelated [6]. Likewise, the Tn1549 recombination module is closely related to the one of Tn916, but their conjugation and resistance modules are unrelated [7].

The closely related ICEs of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*,  
70 ICESt1 and ICESt3, are integrated within the 3' end of the *fda* gene encoding a putative fructose 1,6-diphosphate aldolase [8, 9]. They carry recombination and conjugation modules that are almost identical (95 % nucleotide identity), related regulation modules (three homologous genes showing about 85 % identity; to two or three unrelated genes) and various modules that could be advantageous for their hosts (including phage resistance). Their  
75 conjugation modules are very distantly related to modules of a large group of ICEs found in firmicutes, including Tn916 and ICEBs1 [8]. As the conjugative transfer of ICESt1 occurs at a frequency one thousand times lower than that of ICESt3, their divergent regulation modules might be involved in these very different transfer activities [10].

The activity of almost all prophages and at least some ICEs is controlled by a central  
80 repressor that can belong to two unrelated families, either cI or ImmR (also known as cI-like, although they are not homologous to cI repressor). Both types of repressor carry a HTH XRE domain that allows their binding to promoter sequences upstream from their target genes. Transfer of the element requires the inactivation of the corresponding regulator, as shown during the RecA-dependent SOS response [11-13] of many cI-encoding prophages and two  
85 ICEs, SXT from *Vibrio cholerae* [14] and ICEBs1 from *Bacillus subtilis* [12], which encode respectively a cI and an ImmR repressor. Derepression of the ICE is due to the cleavage of the transcriptional regulator catalyzed by either the cI autopeptidase function [15] or a metalloprotease encoded by a gene adjacent to the gene encoding ImmR [12, 16]. Previous studies showed that various stimuli can activate ICEs, such as antibiotic treatment, cell  
90 density, stationary phase, DNA damage or presence of chlorocatechol [5, 11, 15].

Within the regulation module of ICE*St1* and ICE*St3*, genes encoding homologs of cI (named *arp1*) and ImmR (*arp2*) and its associated protease (*orfQ*) were identified. ICE*St1* and ICE*St3* are the only two characterized elements which encode both cI and ImmR repressors, suggesting a novel and complex regulatory mechanism.

95            In order to explain the differences of transfer frequency previously observed for  
ICE*St1* and ICE*St3* of *S. thermophilus*, a transcriptional mapping of these elements was  
undertaken. Furthermore their excision/replication rates were investigated in different  
conditions (growth medium, exponential growth, stationary phase, after exposure to DNA  
damaging agent). Finally the influence of the host background was also explored. These  
100 experiments revealed that the two ICEs harbor closely related core regions, differ in their  
transcriptional organization and regulation. They provide further evidence of ICE replication.  
Our results also pointed out an impact of host cell on the ICE behavior.

## Results

### 105 **Transcriptional organization and promoter analyses of the ICES*t1* and ICES*t3* core region.**

110 Previous sequences analyses suggested that the thirteen ORFs belonging to the conjugation module and the genes encoding the excisionase and integrase (recombination module) of ICES*t1/3* could be transcribed as a unique polycistronic mRNA while the regulation module could have a two-operon organization [11]. Gene organization, position of predicted promoters and rho-independent transcription terminators of the ICES*t1/3* core region are schematically presented on the figure 1. As some ICE activities were reported to be affected by growth phase and/or cell density [17, 18], CNRZ368 and CNRZ385, strains carrying ICES*t1* and ICES*t3* respectively, were harvested in exponential growth phase as well as in stationary phase for total RNA extraction and subsequent transcriptional organization studies.

120 To determine which genes were co-transcribed, RT-PCR amplification of core region was performed by grouping ORFs two by two or three by three. For ICES*t1*, amplifications of *orfR/arp1/orfQ* and *orfP/arp2*, respectively, were positive while that of the *orfQ/orfP* junction was negative (see additional file 1: S1B). These data comfort the hypothesis of a two-operon organization for ICES*t1* (see additional file 1: S1A) with a functional rho-independent transcription terminator located between the two operons. By contrast, for ICES*t3*, all the RT-PCR amplifications of the regulation module were positive (see additional file 1: S1D) indicating a co-transcription of all the regulation genes (see additional file 1: S1C). The free energy of the transcriptional terminator detected between *orf385B* and *orfQ* genes in ICES*t3* (Fig. 1) was calculated with mFold software [20]. It is different from the one for ICES*t1* ( $\Delta G = -4.3 \text{ kcal.mol}^{-1}$  for ICES*t3* and  $\Delta G = -8.2 \text{ kcal.mol}^{-1}$  for ICES*t1*). This difference could explain why all genes of the regulation module of ICES*t3* can be co-transcribed while two independent transcriptional units were found in ICES*t1*.

130 We then examined the activity of the promoter located upstream from the *orfQ* gene by Rapid Amplification of cDNA ends (5' RACE). For both elements, the start point (A nucleotide) was located seven nucleotides downstream from a -10 box separated by 17 nt from a -35 box, which overlapped the rho-independent transcription terminator (Fig. 1A). This result is consistent with the *S. thermophilus* promoter consensus sequence (TTGACA – 17 nt – TATAAT) [19]. Therefore, both ICES possess a functional P<sub>orfQ</sub> promoter. However, it was previously showed that ICES*t3* differs from ICES*t1* by a -1 frameshift in the 5' end of its *orfQ* gene (*orfQ1*) [11]. A second RBS, that could enable the translation from an initiation codon located downstream, was identified *in silico* (Fig. 1A). All together, these data suggest that the *orfQ2* gene of ICES*t3* is truncated of 54 nucleotides at its 5' end compared to the *orfQ* gene of ICES*t1*.

140 All RT-PCR amplifications targeting co-transcription of the sixteen conjugation-recombination genes of ICES*t1* and ICES*t3* gave amplicons (see additional file 1: S1B and S1D). Therefore, these genes are transcribed as a single polycistronic mRNA of about 14.6

kb (see additional file 1: S1A and S1C). To map more precisely the 5' end of these transcripts, other sets of primers were designed in the *arp2/orfN* intergenic region. For ICES*t1*, these results (data not shown) combined with 5' RACE experiments confirmed the predicted conjugation-recombination promoter, P<sub>cr</sub>, with a -10 box (TATAAT) located seven nucleotides upstream from the transcription start point (A) nucleotide (Fig. 1B). RT-PCR experiments also localized the ICES*t3* P<sub>cr</sub> promoter in the same region, between the *f4* and *f3* primers (Fig. 2A and 2B). The ICES*t3* precise start point could not be deduced from 5' RACE experiments because all the obtained products ended in a region located 100 bp downstream from the corresponding start point of ICES*t1*. For ICES*t1*, several 5' RACE products also ended in this region. mFold software analysis [20] revealed a conserved putative stem loop structure ( $\Delta G = -6.7 \text{ kcal.mol}^{-1}$  for ICES*t1* and  $\Delta G = -6.4 \text{ kcal.mol}^{-1}$  for ICES*t3*), which could affect RNA stability. Although it could not be experimentally demonstrated, we propose, based on sequence conservation (Fig. 1B), a same location of the P<sub>cr</sub> promoter for ICES*t3* and ICES*t1*.

For both elements, the functionality of the predicted *arp2* promoter P<sub>arp2</sub> was established with a (T) start site located seven nucleotides downstream from a -10 box (TACAAT) (Fig. 1B). For both ICES, transcriptional analyses showed that all the promoters (P<sub>cr</sub>, P<sub>orfQ</sub> and P<sub>arp2</sub>), which are active during the stationary phase, are also active during exponential the growth phase (data not shown). However, an additional promoter was identified in ICES*t3* upstream from the P<sub>arp2</sub> promoter during stationary phase. Amplicons were obtained using *arp2.flr3* and *arp2.flr4* primers (Fig. 2C). 5' RACE experiments revealed a start site located within a (T)<sub>6</sub> stretch in this region (between the *r4* and *r5* primers, Fig. 2C). Therefore, an alternative transcript originating from a distal *arp2* promoter in ICES*t3* (called "P<sub>arp2s</sub>") is expressed during the stationary phase (Fig. 1C). This promoter does not match the classical promoter consensus as its -35 (TTATCA) and -10 (TGTAAT) boxes are separated by only 15 nucleotides (Fig. 1C). The functionality of this promoter was highlighted only during stationary phase (Fig. 2C) and only in ICES*t3* (data not shown), although its sequence is strictly identical in ICES*t1* (Fig. 1C). Sequence analyses failed to detect any ORF in the 389 nucleotides between the P<sub>arp2s</sub> and P<sub>arp2</sub> promoters.

Taken together, these data demonstrate that ICES*t1* and ICES*t3* do not share the same transcriptional organization of their regulation module: ICES*t1* is organized as two operons, while in ICES*t3* the whole module can be co-transcribed. Furthermore, ICES*t3* possesses an additional distal promoter upstream the module, which is activated during stationary phase.

### **Growth phase and MMC exposure modulate the transcription of the ICES*t1* and ICES*t3* core genes.**

Previous analyses showed a derepression of conjugative transfer of ICES*t3* but not of ICES*t1* after exposure to mitomycin C (MMC) [10]. In order to explain this difference, we quantified by real-time RT-PCR, three regions (*orfM/orfL* junction, *orfD/orfC* junction and integrase gene) of the conjugation-recombination transcript of ICES*t1* and ICES*t3*.

185 Quantification was done from cells harvested in exponential growth phase treated or not with  
MMC at the half of the minimal inhibitory concentration (MIC/2) as well as in stationary  
phase (Fig. 3). Of note, in preliminary experiments, MMC exposure did not affect the  
transcriptional organization (in particular no activity of ICES*t3* P<sub>arp2s</sub>), cell morphology or  
chain length but, as expected for a DNA damaging agent, it delayed growth, reduced DNA  
190 quantity and increased *recA* transcript levels (data not shown). Transcription of the ICES*t1*  
conjugation-recombination modules was found up-regulated upon DNA damage (16-fold for  
the *int* gene) and in stationary phase (13-fold for the *int* gene) compared to exponential  
growth phase without MMC treatment (Fig. 3A). The same observation was made for ICES*t3*  
with a 84-fold and 11-fold increase of *int* transcript levels after MMC treatment and  
stationary phase, respectively (Fig. 3B), indicating a probable transcriptional regulation of  
195 ICE excision. Whatever the considered region of the conjugation-recombination transcript,  
higher amounts were found for ICES*t3* than for ICES*t1* (for example, 16 to 100-fold  
difference in *int* gene transcript level depending on the tested condition).

For both elements, quantitative RT-PCR was also performed on three loci of the  
regulation module (Fig. 3). In ICES*t1*, the amount of *arp2-orfP* transcripts was similar  
whatever the conditions considered, while the amount of *arp1* transcripts increased 10-fold  
200 after MMC treatment (Fig. 3A). Regardless of conditions, no amplification was detected at  
the junction between the two operons (*orfQ/orfP* junction), which corroborates the lack of  
cotranscription of these genes. For ICES*t3*, the level of *arp1* and *orf385A/arp2* transcripts  
increased after MMC treatment (40-fold) and in stationary phase (about 10-fold) (Fig. 3B).  
Co-transcription of the two operons was quantified by considering the *orfQ/orf385B* junction.  
205 During exponential growth phase and MMC exposure, co-transcription represented 20 and  
38 % of transcripts respectively, indicating that the terminator and the promoter P<sub>orfQ</sub> were  
active. However, in stationary phase, the amount of this junction was similar to that of the  
two operons, probably reflecting an activity of the P<sub>arp2s</sub> promoter.

210 After MMC exposure during stationary phase, transcript quantities were found to be  
similar to the ones observed in stationary phase without MMC. Therefore, MMC has an  
impact on DNA metabolism (lower level of DNA) during stationary phase but does not affect  
levels or organization of transcripts (data not shown).

### **Growth phase and mitomycin C affect ICES*t1* and ICES*t3* excision.**

215 Excision is the first step of ICE transfer from host chromosome to a recipient cell,  
leading to a circular intermediate and an empty chromosomal integration site, *attB* (Fig. 4A).  
The influence of the growth phase (early, mid exponential growth phase or stationary phase)  
and MMC treatment on ICE excision was analyzed by quantitative PCR on genomic DNA.  
The excision percentage was calculated as the copy number of *attB* sites per *fda* copy  
220 (adjacent chromosomal locus). As a control, the amount of *attB* sites was determined in strain  
CNRZ368ΔICES*t1* and in CNRZ385ΔICES*t3* and was found equal to the amount of *fda*.

The excision percentage of ICES*t3* was found seven-fold higher than the one of

225 ICES*t1* in exponential growth phase (Fig. 4B), consistent with the higher level of ICES*t3*  
conjugation-recombination transcript (described above), and its higher transfer frequency  
[10]. For both ICEs, excision frequency was higher in stationary phase compared to  
exponential growth phase (Fig. 4B). For these experiments, cells were grown in LM17 rich  
medium, in which transfer has been demonstrated [10]. A similar excision rate of ICES*t3* was  
measured in another rich medium (HJGL medium) that do not support the transfer of the two  
ICES (data not shown). Therefore, the lack of ICES*t3* transfer in this medium can not be due  
230 to a low excision level.

Transcriptional analyses have shown an increase of core transcript level for ICES*t3*  
and ICES*t1* after MMC treatment during exponential growth. This DNA damaging agent  
leads to an increase of excision percentage up to 90 % for ICES*t3*, but only 4.3 % for ICES*t1*  
(Fig. 4C). However, the increase is higher for ICES*t1* (38-fold) compare to ICES*t3* (18-fold).  
235 Therefore, under all tested conditions, ICES*t3* is more active in excision than ICES*t1*.

### DNA damage induces replication of ICES*t3*.

Quantitative PCR was performed to measure the amounts of excised and integrated  
ICES at different growth phases and after MMC treatment. According to the previously  
240 proposed ICE model (Fig. 4A) *attI* and *attB* were expected to have the same copy number  
after ICE excision. This was found for both ICEs whatever the tested conditions, except for  
ICES*t3* DNA extracted from strain CNRZ385 exposed to MMC (with a *attI/attB* value of  
 $9.95 \pm 1.42$ ). To confirm this data, the *orfM/orfL* junction localized in the conjugation  
module was quantified and normalized to levels of different chromosomal loci: *fda*, *dnaA* and  
245 *xerS* (data not shown). The same result was obtained with an amount of *M/L* reaching about  
nine-fold the one of *fda* ( $9.60 \pm 1.04$ ). As *fda* is adjacent to integrated ICES*t3* and replicates  
prior to the ICE during host chromosome replication, ICES*t3* could be able to replicate  
autonomously under this condition. Different loci along ICEs (from *J/I* to *M/L*) were  
quantified at similar levels (data not shown) and thus did not allow us to propose a replicative  
250 mechanism (theta *v/s* rolling-circle).

### ICES*t3* excision and replication depend on the host strain.

To test the ICES*t3* behavior in different *S. thermophilus* strain background, its  
excision percentage (*attB/fda*) $\times 100$  and copy number (*ML/fda*) were quantified. ICES*t3* was  
255 transferred by conjugation to LMG18311, a strain initially devoid of ICE and in  
CNRZ368 $\Delta$ ICES*t1*, the strain which originally carries ICES*t1* but has been deleted of it .  
ICES*t3* excision percentage was lower in strain LMG18311 and much lower in  
CNRZ368 $\Delta$ ICES*t1* compared to that observed in CNRZ385 strain but MMC treatment  
increased its excision percentage in all strains (Fig. 5). In CNRZ368, excision rates of ICES*t3*  
260 were higher than those of ICES*t1* (Fig. 5). Furthermore, the quantification showed a single  
copy of ICES*t3* ( $1.08 \pm 0.11$ ) per chromosome even after MMC exposure (compared to 9.60

$\pm 1.04$  copies in strain CNRZ385). This indicates a preponderant effect of the host strain on the ICE replication.

## 265 **A family of streptococcal ICEs shares related regulation and conjugation modules.**

Protein and nucleic acid sequences from the regulation, conjugation and recombination modules of ICE*St1* and ICE*St3* were compared with sequences from firmicutes. Closely related conjugation modules (>80 % nucleotide identity all along the conjugation module) were found in the putative ICE*Spn8140* from *S. pneumoniae* 8140 [21] and in the partially or completely sequenced genomes of *S. parasanguinis* ATCC15912 and F0405, *S. infantis* ATCC 700779 and *S. australis* ATCC700641 (Fig. 6). All these conjugation modules are adjacent to putative recombination modules that are unrelated or very distantly related to the ones of ICE*St1/3* (data not shown). Nevertheless, they could be cotranscribed with the conjugation module from a P<sub>cr</sub> promoter similar to the one identified above since it is present at the same position as in ICE*St1/3* with high sequence conservation (see additional file 2: S2A). Therefore, these conjugation-recombination modules probably belong to non identified ICEs.

All these putative elements harbor closely related regulation modules that would be transcribed divergently from the conjugation and recombination modules. All these modules possess a similar organization and encode putative cI repressors, ImmR repressors and metalloproteases related to the ones of ICE*St1/3* (64-90 % protein sequence identity) and one to four unrelated proteins (Fig. 6). Sequence comparison of the intergenic core regions of the closely related streptococci ICEs revealed similar regulatory signals at the same positions as in ICE*St1/3* with high sequence conservation (see additional file 2: S2B, S2C and S2D), suggesting a similar regulation.

More distantly related conjugation modules (35-70 % identity for at least seven proteins with similar organization) are found not only in previously described elements – RD2 from *S. pyogenes* [22] and four elements integrated in a tRNA<sup>Lys</sup> gene from four *S. agalactiae* strains [4] – but also in novel putative ICEs that we found in various *Streptococci* including *S. agalactiae* ATCC13813 (incompletely sequenced), *S. dysgalactiae* ATCC12394 (two elements), *S. downei* F0415, *Streptococcus* sp. 2\_1\_36FAA and *S. gallolyticus* UCN34. Only the elements found in *S. dysgalactiae* encode a putative cI repressor, ImmR repressor and metalloprotease.



295 **Discussion**

This study of *ICES<sub>St1</sub>* and *ICES<sub>St3</sub>*, showed that their respective transcriptional organization and their mobility behaviors differ. As previously proposed from sequence analyses, all genes included in the conjugation and recombination modules of the two elements were found to be transcriptionally linked and controlled by a single promoter. This organization allows a coordinated regulation of genes involved in conjugation and recombination, which are functionally associated during ICE transfer.

For *ICES<sub>St1</sub>* and *ICES<sub>St3</sub>* regulation module, the cI-like encoding gene and one to two genes located downstream are expressed from the convergent promoter P<sub>arp2</sub> or from a distal conditional promoter P<sub>arp2s</sub>. The genes encoding metalloprotease (*orfQ*) and cI homologs belong to a different operon expressed from another promoter P<sub>orfQ</sub>. These two operons are separated by a rho-independent transcription terminator. The *ICES<sub>St1</sub>* regulation module includes two independent transcriptional units. By contrast, co-transcription of all the ORFs belonging to the regulation module was observed for *ICES<sub>St3</sub>*. This is probably enabled by a weaker transcriptional terminator and perhaps a higher transcription level and the activation of the stationary phase promoter P<sub>arp2s</sub>. These differences probably induce *ICES<sub>St3</sub>* and *ICES<sub>St1</sub>* differential regulations.

The mechanisms of ICE regulation based on cI or ImmR repressors, previously described for SXT and *ICEBs1*, are characterized by a decrease of transcript level of the cI or *immR* gene and an activation of the conjugation-recombination module transcription [5]. By contrast, in *ICES<sub>St3</sub>* from *S. thermophilus*, a transcriptional derepression was observed for the two operons of the regulation module, whereas in *ICES<sub>St1</sub>*, only the transcript level of the operon containing *arp1* was affected. Under all tested conditions, *ICES<sub>St3</sub>* is more transcriptionally active than *ICES<sub>St1</sub>*. The partial derepression of transcription of the regulation module may explain the lower activation of *ICES<sub>St1</sub>* (conjugation-recombination transcript level, excision, replication) compared to *ICES<sub>St3</sub>*. So far, *ICES<sub>St1</sub>* and *ICES<sub>St3</sub>* were the only known elements (ICEs and prophages) encoding homologs of both cI and ImmR repressors. The gene encoding a putative metalloprotease is generally cotranscribed and located immediately downstream from the gene encoding the ImmR repressor [12, 16]. However, in *ICES<sub>St1</sub>* and *ICES<sub>St3</sub>*, the metalloprotease gene (*orfQ*) is adjacent to the cI gene (*arp1*) but not to the cI-like gene (*arp2*), suggesting that the regulation involving both cI and cI-like regulators fundamentally differs from those identified in ICEs and related elements encoding only one regulator. Genomic analyses revealed, in various streptococci, ICEs that harbor conjugation module related to the *ICES<sub>St1/3</sub>* ones. These elements carry a regulation module related to the *ICES<sub>St1/3</sub>* ones, suggesting that they could share a similar regulation.

After MMC treatment, the transcript levels of the recombination module increases 16-fold for *ICES<sub>St1</sub>* and 84-fold for *ICES<sub>St3</sub>*. The 10-fold increase in *ICES<sub>St3</sub>* copy number, after MMC treatment, could contribute to this increase of transcript levels but is not sufficient to explain its range. MMC exposure could induce an overinitiation of DNA replication with an apparent increase in origin-proximal gene expression for a short distance (~50 kb) [23], but *ICES<sub>St1</sub>* and *ICES<sub>St3</sub>* are out of this area on the chromosome. MMC thus stimulates ICE

transfer [10, 15, 24], but also increases transcription of both *ICES<sub>t3</sub>* and *ICES<sub>t1</sub>*.

As copy number of *ICES<sub>t3</sub>* increases after MMC treatment, the quantification of the empty chromosomal integration site underestimates the level of extrachromosomal ICEs. It is worth noticing that the increase of excision after MMC exposure does not lead to an increase of *ICES<sub>t1</sub>* transfer. Additionally, a similar excision level was obtained for *ICES<sub>t3</sub>* in HJGL medium, although this medium does not support ICE transfer. It shows that, besides excision, additional factors affect transfer of these elements. Similarly, although prior excision is required to observe the conjugative transfer of Tn916, which is an ICE that harbors a conjugation module very distantly related to the one of *ICES<sub>t1/3</sub>*, the transfer frequency of this ICE is not correlated with excision [25].

Some preliminary results favor the hypothesis of multiple extrachromosomal copies of *ICES<sub>t3</sub>* (data not shown). ICEs, as their name implies, are able to excise from their host chromosome. Then the circular extrachromosomal ICE transfers to recipient cell per conjugation and simultaneously replicates by rolling-circle mechanism. The site-specific recombination leads to integration in donor and recipient chromosomes. During division, ICE transmission to the daughter cells is thought to depend on the replication and partition of the host chromosome. However, it has been recently reported that at least some ICEs can replicate independently of their conjugative transfer. In particular, the amount of excised forms of *ICEBs<sub>1</sub>* increases two- to five-fold under inducing conditions [26]. *ICEBs<sub>1</sub>* replication is initiated within *oriT* and is unidirectional [26]. This replication is involved in the stability of *ICEBs<sub>1</sub>* and required the relaxase encoded by the element. *In silico* analysis of the putative relaxases of *ICES<sub>t1/3</sub>* and of *ICEBs<sub>1</sub>* indicated that they are distantly related (27.4 % amino acid identity for relaxase), suggesting that replication could have similar role for the two ICEs.

Furthermore, the ICE RD2 from *S. pyogenes* related to *ICES<sub>t1/3</sub>* [22] and the putative ICE pKLC102 from *Pseudomonas aeruginosa* [27] were reported to be simultaneously integrated and at extrachromosomal multiple copies while pP36 from *Legionella pneumophila* is present as a multiple extrachromosomal copies in some conditions [28]. Whereas, in firmicutes, none of the known ICEs was found to encode a partitioning system; in proteobacteria, the ICEs belonging to pKLC102-*ICE<sub>clc</sub>* family encode a putative partition system [29, 30].

In its host strain CNRZ368, *ICES<sub>t1</sub>* exhibits a stable copy number, even after a stimulation of its excision and core region transcription by MMC exposure. In this strain, *ICES<sub>t3</sub>* excision percentage is reduced 3-fold in stationary phase and nine-fold after MMC treatment and *ICES<sub>t3</sub>* copy number is not increased compared to the one observed in the strain CNRZ385. Additional factor(s) could explain these differences (excision percentage and copy number) of *ICES<sub>t3</sub>* in different *S. thermophilus* strains. Some host factors are likely involved in key steps of the ICE behavior, like *B. subtilis* PolC, DnaN and PcrA for *ICEBs<sub>1</sub>* replication [26] and IHF for SXT excision in *V. cholerae* [31]. To our knowledge, our work is the first report of partial shutdown of ICE activity by a strain belonging to the primary host species.

Analysis of recently available sequences led us to identify a set of closely related putative ICEs among various streptococcal species. All of them exhibit closely related conjugation modules but highly variable recombination modules. This suggests that these elements can transfer between various streptococcal species and exchange modules between one another. However, these regulation modules all share *arp2*, *orfQ* and *arp1* genes (Fig 6), suggesting a fundamental function of these 3 genes in governing transfer of this ICE family. Further investigations will be required to characterize these genes and of their functional interactions with host regulators.

380

## 385 **Conclusions**

In conclusion, the transcriptional organization of the conjugation and recombination modules of two closely related ICEs from *S. thermophilus*, ICE*St1* and ICE*St3*, is identical, while that of their regulation module is somewhat different. Transcripts of core region and excision levels are higher for ICE*St3*, which is consistent with its higher transfer frequency. Despite these differences, the excision of both ICEs is stimulated by exposure to a DNA damaging agent and stationary phase. Data generated by the transcriptional study suggest a new mechanism of regulation of ICE*St1/3*. This behavior could be due to the atypical regulation module of these elements that encode homologues of both cI and ImmR repressors. Analyses of sequenced genomes revealed, among streptococci, a family of ICEs that encode cI and ImmR homologs and therefore could share similar regulation.

390

395

Furthermore, our results suggest that DNA damage induces not only the excision and transfer of ICE*St3* but also its intracellular replication. This characteristic, not considered in the initial ICE model, may be shared by other ICEs. This study also revealed that ICE*St3* has very different behaviors depending on its primary host species, suggesting a major role of host factor(s) in its excision and replication.

400

## Methods

### Strains and media.

The *Escherichia coli* and *S. thermophilus* strains used are listed (Table 1). *E. coli* DH5 $\alpha$  (Gibco Life Technologies, Gaithersburg, Md, USA.) used for plasmid propagation and cloning experiments was routinely grown in LB medium at 37°C in aerobiosis [32].  
405 *S. thermophilus* strains were grown in M17 broth (Oxoid, Dardilly, France) supplemented with 0.5 % lactose (LM17) and 1 % glucose (GLM17) or Hogg-Jago broth [33] supplemented with 1 % glucose and 1 % lactose (HJGL), at 42°C under anaerobic conditions (GENbox Anaer atmosphere generators and incubation jars from bioMérieux, Craponne, France). Agar  
410 plates were prepared by adding 2 % (wt/vol) agar to the media.

### Strain CNRZ368 ICESt3cat construction.

To test the ICESt3 behavior in different *S. thermophilus* strain background, a filter mating was done as described previously [10] using the donor strain CNRZ385, carrying ICESt3 tagged with the *cat* gene conferring the chloramphenicol resistance [10] and the recipient  
415 strain CNRZ368 $\Delta$ ICESt1, spontaneous rifampicin and streptomycin-resistant mutant (X. Bellanger unpublished data). Triple-resistant clones were isolated and mapped for *cse* gene polymorphism [35] to confirm that they are transconjugants harboring CNRZ368 ICESt3cat. Three independent CNRZ368 ICESt3cat clones, which have similar growth parameters,  
420 mitomycin C (MMC) minimal inhibitory concentration (MIC) and *dnaA/xerS* rates (exponential growth phase with and without MMC treatment and stationary phase) than strains CNRZ368 and CNRZ368 cured of ICESt1 were used for each experiments.

### Growth conditions.

*S. thermophilus* strains were grown at 42°C in 30 mL of LM17 medium to an optical density at 600 nm of about 0.7. Measures of OD<sub>600nm</sub> were performed with the Genesys 20 spectrophotometer (Thermo scientific, Illkirch, France). Cells were diluted until  
425 OD<sub>600nm</sub> = 0.05 into 50 mL of preheated medium (42°C) and harvested at early (OD<sub>600nm</sub> = 0.2), mid exponential growth phase (OD<sub>600nm</sub> = 0.6) or stationary phase (after 1.5 hours at  
430 OD<sub>600nm</sub> = 1.5) with or without MMC exposure during 2.5 hours at the half of the minimal inhibitory concentration (MIC/2 = 0.1  $\mu$ g/mL, for all the *S. thermophilus* strains used in this study) for genomic DNA or RNA extractions. Cultures were centrifuged at 13,000 g during 15 min at 42°C and cell pellets were stored at -80°C.

### DNA manipulation.

DNA quantity along the MMC exposure was investigated by colorimetric DNA dosage [36]. Genomic DNA of *S. thermophilus* was extracted as described previously [37]. Plasmid DNA isolation was performed using Genelute Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Lyon, France). DNA fragment recovery was performed using the High Pure PCR Product purification kit (Roche, [Neuilly-sur-Seine](#), France). DNA cloning, ligation and restriction enzyme digestion were all carried out according to standard procedures [32] or according to specific recommendations of the supplier (New England Biolabs, Evry, France). PCR primers  
440

were designed with the PrimerQuest software (<http://www.idtdna.com/scitools/applications/primerquest/>) and synthesized by Eurogentec (Angers, France) at 100  $\mu$ M. PCR and high fidelity PCR were carried out according to the instructions of the ThermoPol PCR kit (New England Biolabs, Evry, France) and of the Triple Master PCR System (Eppendorf, Le Pecq, France), respectively. Sequencing reactions on RACE PCR amplifications were performed by Cogenics (Beckman Coulter genomics, Villepinte, France).

450

#### **Reverse transcription PCR (RT-PCR).**

Cell pellets were resuspended in 1 mL of Kirby mix (1 % w/v of N-Lauroylsarcosine, 6 % w/v p-aminosalicylic acid sodium salt, 0.1M Tris HCl pH=8, 6 % v/v phenol pH=8). Then total RNAs were extracted as described previously [38]. The cDNAs were obtained by reverse transcription of 1  $\mu$ g of DNase I-treated (Euromedex, Souffelweyersheim, FRANCE) total RNA with M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) and random hexamer primers (Applied Biosystems, Villebon sur Yvette, France). PCR amplification of *gyrA* (40 cycles) was performed using *gyrAR1* and *gyrAR2* primers (see additional file 3: table S1) on retrotranscribed RNA and non retrotranscribed RNA, and used as positive and negative control, respectively. The quality of generated cDNA was controlled by amplifying a 1000-bp fragment by the *J/I.f* and *G/H.r* primers (see additional file 3: table S1). Transcriptional mapping was done using primers amplifying less than 1000-bp with a standard PCR program: 30 s at 95°C for denaturation, annealing 30 s at 50°C and extension 1 min at 72°C for 30 cycles. Primers are listed in the additional file 4, table S1 in part and available upon request for the rest.

465

#### **Mapping of 5' extremity of RNA.**

5' ends of transcripts were mapped by Rapid Amplification of cDNA Ends using the 5'RACE PCR kit (Invitrogen, Villebon sur Yvette, France). PCR products were directly sequenced to determine the 5' ends. When they can not be precisely determined by direct sequencing, PCR products were subsequently cloned in pSL1180 (Table 1); 15 and 12 clones were sequenced for *ICES1* and *ICES3* respectively. Primers used are listed in the additional file 4 table S1.

#### **Quantitative PCR.**

Quantitative PCR (qPCR) was performed with 2 fg–200 ng DNA or cDNA, 5  $\mu$ l qPCR Mastermix (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France) and 450 pM primers (see additional file 3: table S1) in 10  $\mu$ l final volume. After activation of the hot start polymerase (30 s at 98°C), 40 cycles were performed: denaturation 10 s at 95°C and annealing/extension 45 s at 50°C for cDNA or denaturation 30 s at 95°C, annealing 30 s at 50°C and extension 1 min at 72°C for gDNA. The melting curve of the PCR product was analyzed with CFX manager software (Bio-rad, Marnes-la-Coquette, France) to verify PCR specificity. It was acquired each 0.5°C for 1 s by heating the PCR product from 60°C to 95°C. For each run, a standard dilution of the DNA fragment (preliminary obtained by PCR) was used to check the relative efficiency and quality of primers. A negative control (ultra-pure water obtained by the Direct8 Milli-Q system, Millipore, Molsheim, France) was included in all assays. Each reaction was

485

performed at least in duplicate. Real-time PCR was carried out on a C1000 Thermocycler coupled by a CFX96 real-time PCR detection system (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Strains depleted for their resident ICE, CNRZ368 $\Delta$ ICES $St1$  and CNRZ385 $\Delta$ ICES $St3$ , which  
490 have equal amount of *attB* and *fda*, were used as controls. cDNA quantities of studied genes were normalized to the amount of cDNA of the *gyrA* gene, whose transcription is considered as constitutive [39]. Similar results were obtained when the *ldh* gene, encoding the lactate dehydrogenase, was used for normalization [40]. Data are expressed as mean  $\pm$  SD. Statistical analysis was performed with Student's E test. A *p* value < 0.05 was considered  
495 statistically different.

### Sequence analysis.

Protein and nucleic acid sequences from the recombination, regulation and conjugation modules of ICES $St1$  and ICES $St3$  were compared with sequences from Firmicutes on the NCBI  
500 server ([http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) using BLASTP, BLASTN and/or tBLASTN. Identified sequences are from ICES $Spn8140$  of *S. pneumoniae* [GenBank:FR671412 [21]] and from the partially or completely sequenced genomes of *S. parasanguinis* F0405 [GenBank:NZ\_AEKM000000000] and ATCC15912 [GeneBank:NZ\_ADVN000000000],  
505 *S. australis* ATCC700641 [GeneBank:NZ\_AEQR000000000] *S. infantis* ATCC700779 [GeneBank:NZ\_AEVD000000000], *S. agalactiae* ATCC13813 [GenBank:AEQQ01000089], *S. dysgalactiae* ATCC12394 [GenBank:CP002215], *S. downei* F0415 [GenBank:NZ\_AEKN01000010], *Streptococcus* sp. 2\_1\_36FAA [GenBank:NZ\_GG704942] and *S. gallolyticus* UCN34 [GenBank:NC\_013798].

510 **Additional material**

**Additional file 1: Figure S1:** Determination of transcriptional units of the ICE core region in stationary phase.

**Additional file 2: Figure S2:** Multiple alignment of the four promoter regions of the seven closely related streptococcal ICEs.

515 **Additional file 3: Table S1.** Main primers used in this study.

### **Authors' contributions**

Conceived and designed the experiments: NC VL FC PL GG. Performed the experiments: NC VL CM. Analyzed the data: NC VL FC PL BD GG. Wrote the paper: NC VL FC GG.

520

### **Acknowledgements**

We thank S. Payot-Lacroix and J.B. Vincourt for critical reading of the manuscript. NC is supported by MNERT fellowship from the Ministère de l'Éducation et de la Recherche. The authors are grateful to X. Bellanger for CNRZ368 $\Delta$ *StI* and M. Mourou for help with the CNRZ368 ICE*St3cat*.

525

### **Authors Details**

Carraro Nicolas<sup>1,2</sup>, Libante Virginie<sup>1,2\*</sup>, Morel Catherine<sup>1,2</sup>, Decaris Bernard<sup>1,2</sup>, Charron Florence<sup>1,2</sup>, Leblond Pierre<sup>1,2</sup> and Guédon Gérard<sup>1,2</sup>.

530 1 Nancy-Université, UMR1128, Génétique et Microbiologie, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

2 INRA, UMR1128, Génétique et Microbiologie, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

### **Corresponding author**

Virginie Libante

535 UMR INRA-UHP 1128 Génétique et Microbiologie, IFR110, Faculté des Sciences et Technologies, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France.

Tel: (33) 3 83 68 42 09

Fax: (33) 3 83 68 44 99

E-mail: [Virginie.Libante@scbiol.uhp-nancy.fr](mailto:Virginie.Libante@scbiol.uhp-nancy.fr)

540



## References

1. Dobrindt U, Hochhut B, Hentschel U, Hacker J: **Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms.** *Nat. Rev. Microbiol* 2004, **2**:414-424.
2. Hacker J, Carniel E: **Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes.** *EMBO Rep* 2001, **2**:376-381.  
545
3. Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G: **Conjugative transposons: the tip of the iceberg.** *Mol. Microbiol* 2002, **46**:601-610.
4. Brochet M, Rusniok C, Couvé E, Dramsi S, Poyart C, Trieu-Cuot P, Kunst F, Glaser P: **Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of *Streptococcus agalactiae*.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2008, **105**:15961-15966.  
550
5. Wozniak RAF, Waldor MK: **Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow.** *Nat. Rev. Microbiol* 2010, **8**:552-563.  
555
6. Roberts AP, Johanesen PA, Lyras D, Mullany P, Rood JI: **Comparison of Tn5397 from *Clostridium difficile*, Tn916 from *Enterococcus faecalis* and the CW459tet(M) element from *Clostridium perfringens* shows that they have similar conjugation regions but different insertion and excision modules.** *Microbiology* 2001, **147**:1243-1251.  
560
7. Garnier F, Taourit S, Glaser P, Courvalin P, Galimand M: **Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp.** *Microbiology* 2000, **146 ( Pt 6)**:1481-1489.
8. Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G: **The ICESt1 element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration.** *Plasmid* 2002, **48**:77-97.  
565
9. Pavlovic G, Burrus V, Gintz B, Decaris B, Guédon G: **Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICESt1-related elements from *Streptococcus thermophilus*.** *Microbiology* 2004, **150**:759-774.  
570
10. Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guédon G: **Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*.** *J. Bacteriol* 2009, **191**:2764-2775.
11. Bellanger X, Morel C, Decaris B, Guédon G: **Derepression of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus* by DNA**  
575

- damage response: implication of a *ci*-related repressor. *J. Bacteriol* 2007, **189**:1478-1481.
12. Bose B, Auchtung JM, Lee CA, Grossman AD: **A conserved anti-repressor controls horizontal gene transfer by proteolysis.** *Mol. Microbiol* 2008, **70**:570-582.
- 580 13. Dodd IB, Shearwin KE, Egan JB: **Revisited gene regulation in bacteriophage lambda.** *Curr. Opin. Genet. Dev* 2005, **15**:145-152.
14. Beaber JW, Burrus V, Hochhut B, Waldor MK: **Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants.** *Cell. Mol. Life Sci* 2002, **59**:2065-2070.
- 585 15. Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK: **SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes.** *Nature* 2004, **427**:72-74.
16. Bose B, Grossman AD: **Regulation of horizontal gene transfer in *Bacillus subtilis* by activation of a conserved site-specific protease.** *J. Bacteriol* 2011, **193**:22-29.
17. Auchtung JM, Lee CA, Monson RE, Lehman AP, Grossman AD: **Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 2005, **102**:12554-12559.
- 590
18. Ramsay JP, Sullivan JT, Jambari N, Ortori CA, Heeb S, Williams P, Barrett DA, Lamont IL, Ronson CW: **A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes.** *Mol. Microbiol* 2009, **73**:1141-1155.
- 595
19. Solaiman DK, Somkuti GA: **Isolation and characterization of transcription signal sequences from *Streptococcus thermophilus*.** *Curr. Microbiol* 1997, **34**:216-219.
20. RNAfold web server [<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>].
21. Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, Quail MA, Burton J, van der Linden M, McGee L, von Gottberg A, Song JH, Ko KS, Pichon B, Baker S, Parry CM, Lambertsen LM, Shahinas D, Pillai DR, Mitchell TJ, Dougan G, Tomasz A, Klugman KP, Parkhill J, Hanage WP, Bentley SD: **Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions.** *Science* 2011, **331**:430-434.
- 600
22. Sitkiewicz I, Green NM, Guo N, Mereghetti L, Musser JM: **Lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins.** *BMC Microbiol* 2011, **11**:65.
- 605
23. Goranov AI, Kuester-Schoeck E, Wang JD, Grossman AD: **Characterization of the global transcriptional responses to different types of DNA damage and disruption of replication in *Bacillus subtilis*.** *J. Bacteriol* 2006, **188**:5595-5605.

- 610 24. Auchtung JM, Lee CA, Garrison KL, Grossman AD: **Identification and characterization of the immunity repressor (ImmR) that controls the mobile genetic element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*.** *Mol. Microbiol* 2007, **64**:1515-1528.
25. Celli J, Trieu-Cuot P: **Circularization of Tn916 is required for expression of the transposon-encoded transfer functions: characterization of long tetracycline-**  
615 **inducible transcripts reading through the attachment site.** *Mol. Microbiol* 1998, **28**:103-117.
26. Lee CA, Babic A, Grossman AD: **Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon.** *Mol. Microbiol* 2010, **75**:268-279.
27. Klockgether J, Würdemann D, Reva O, Wiehlmann L, Tümmler B: **Diversity of the**  
620 **abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*.** *J. Bacteriol* 2007, **189**:2443-2459.
28. Doléans-Jordheim A, Akermi M, Ginevra C, Cazalet C, Kay E, Schneider D, Buchrieser C, Atlan D, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S: **Growth-phase-dependent mobility of the lvh-encoding region in *Legionella pneumophila* strain Paris.** *Microbiology* 2006,  
625 **152**:3561-3568.
29. Juhas M, Power PM, Harding RM, Ferguson DJP, Dimopoulou ID, Elamin AR e, Mohd-Zain Z, Hood DW, Adegbola R, Erwin A, Smith A, Munson RS, Harrison A, Mansfield L, Bentley S, Crook DW: **Sequence and functional analyses of *Haemophilus* spp. genomic islands.** *Genome Biol* 2007, **8**:R237.
- 630 30. Mohd-Zain Z, Turner SL, Cerdeño-Tárraga AM, Lilley AK, Inzana TJ, Duncan AJ, Harding RM, Hood DW, Peto TE, Crook DW: **Transferable antibiotic resistance elements in *Haemophilus influenzae* share a common evolutionary origin with a diverse family of syntenic genomic islands.** *J. Bacteriol* 2004, **186**:8114-8122.
31. McLeod SM, Burrus V, Waldor MK: **Requirement for *Vibrio cholerae* integration host factor in conjugative DNA transfer.** *J. Bacteriol* 2006, **188**:5704-5711.  
635
32. Sambrook J, David WR: *Molecular cloning: a laboratory manual*. CSHL Press; 2001.
33. Stinglele F, Neeser JR, Mollet B: **Identification and characterization of the *eps* (Exopolysaccharide) gene cluster from *Streptococcus thermophilus* Sfi6.** *J. Bacteriol* 1996, **178**:1680-1690.
- 640 34. Bellanger X, Morel C, Gonot F, Puymège A, Decaris B, Guédon G: **Site-specific accretion of an Integrative Conjugative Element and a related genomic island leads to cis-mobilization and gene capture.** *Mol. Microbiol* 2011, in press.
35. Borges F, Layec S, Fernandez A, Decaris B, Leblond-Bourget N: **High genetic variability of the *Streptococcus thermophilus cse* central part, a repeat rich region**

645 **required for full cell segregation activity.** *Antonie Van Leeuwenhoek* 2006, **90**:245-255.

36. Gerhardt P: *Methods for general and molecular bacteriology*. Washington D.C.: American Society for Microbiology; 1994.

650 37. Colmin C, Pebay M, Simonet JM, Decaris B: **A species-specific DNA probe obtained from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* detects strain restriction polymorphism.** *FEMS Microbiol. Lett* 1991, **65**:123-128.

38. Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA: *Practical Streptomyces Genetics*. 2<sup>nd</sup> edition. Norwich, England: John Innes Foundation; 2000.

655 39. Duary RK, Batish VK, Grover S: **Expression of the *atpD* gene in probiotic *Lactobacillus plantarum* strains under in vitro acidic conditions using RT-qPCR.** *Res. Microbiol* 2010, **161**:399-405.

40. Fernandez A, Thibessard A, Borges F, Gintz B, Decaris B, Leblond-Bourget N: **Characterization of oxidative stress-resistant mutants of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368.** *Arch. Microbiol* 2004, **182**:364-372.

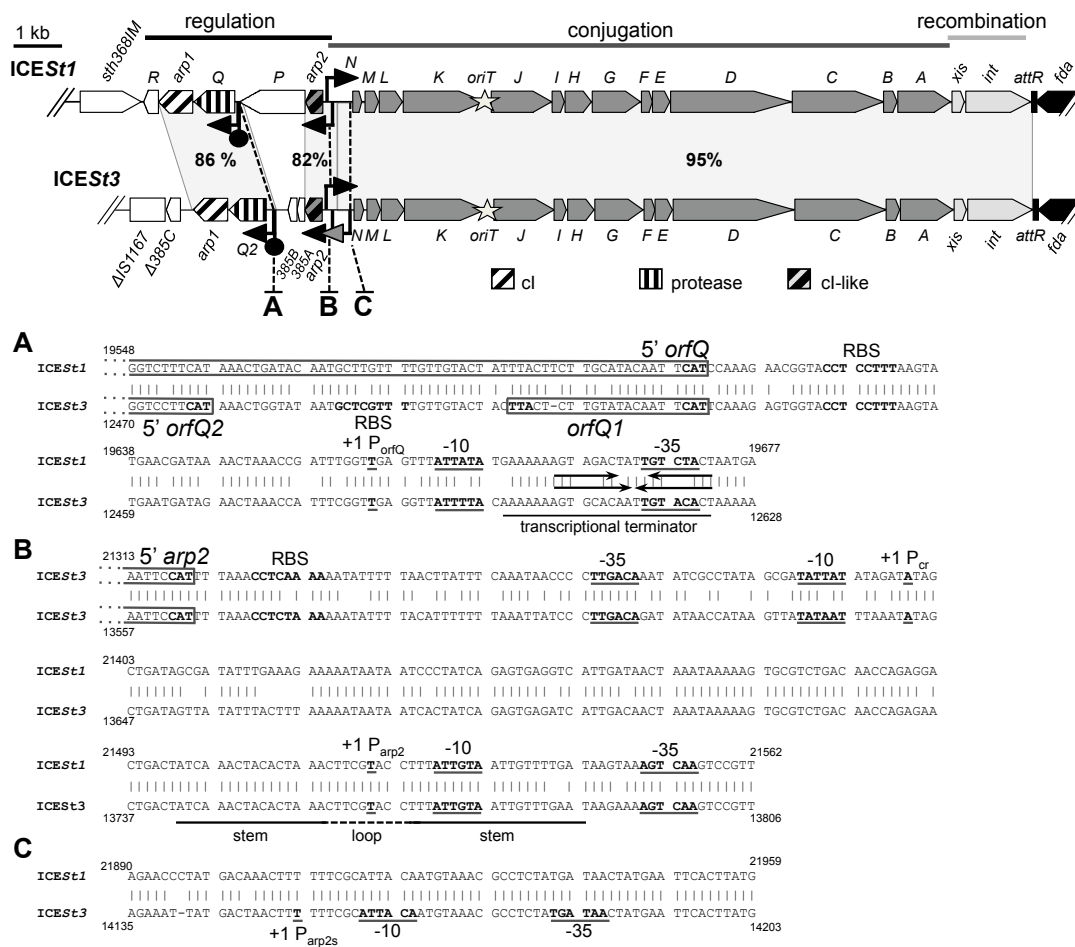
660

Strains or plasmids	Relevant phenotype or genotype	Reference
Strains		
<i>S. thermophilus</i>		
CNRZ368	Wild-type strain carrying ICES <i>St1</i>	INRA-CNRZ
CNRZ385	Wild-type strain carrying ICES <i>St3</i>	INRA-CNRZ
CNRZ368ΔICES <i>St1</i>	Wild-type strain cured from its ICES <i>St1</i> resident element	X. Bellanger pers. com.
LMG18311 ICES <i>St3cat</i>	Wild-type strain carrying ICES <i>St3</i> tagged with the <i>cat</i> gene inserted in the pseudogene <i>Ψorf385J</i> , Cm <sup>r</sup>	[10]
CNRZ368 ICES <i>St3cat</i>	CNRZ368ΔICES <i>St1</i> strain carrying ICES <i>St3cat</i> , Cm <sup>r</sup>	This work
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 lacU169 (f80 lacZ M15) hsdR17 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	[32]
Plasmid		
pSL1180	3,4 kb, replication origin from pBR322, Amp <sup>r</sup>	Amersham

Abbreviations: Cm<sup>r</sup>, chloramphenicol resistance, Amp<sup>r</sup>: ampicillin resistance.

**Table 1: Strains and plasmid used in this study.**

## **FIGURES DE L'ARTICLE**



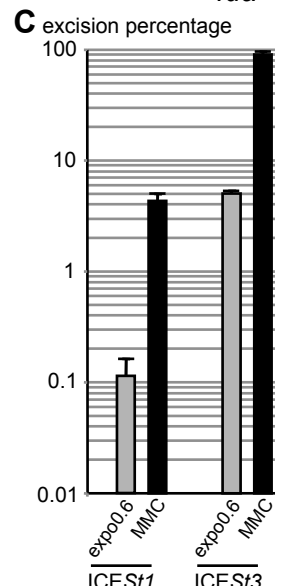
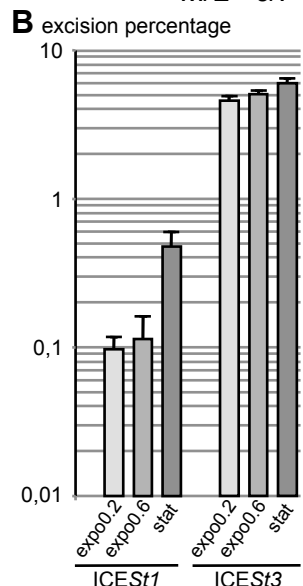
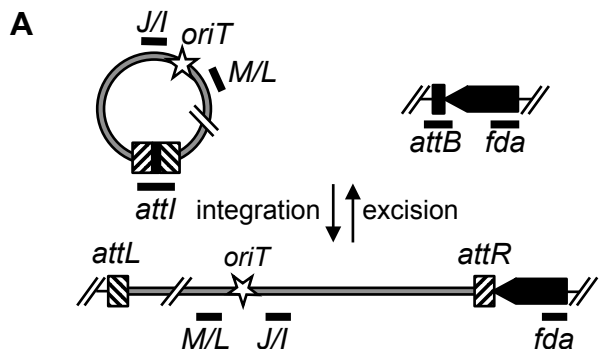
**Figure 1: Comparison of ICES1 and ICES3 regulation, conjugation and recombination modules.** Location and orientation of ORFs and a truncated IS are indicated by arrowed boxes and a rectangle, respectively. ORF names beginning with “orf” are abbreviated with the corresponding letters or numbers. The pattern of the arrowed boxes depicts the relationships of each ORF deduced from functional analyses or from BLAST comparisons. White arrowed boxes correspond to unrelated ORFs of the two elements. Black arrowed box is the chromosomal *fda* gene. The grey areas indicate closely related sequences with the nucleotide identity percentage value. The angled arrows and the lollipops indicate the experimentally demonstrated promoters and rho-independent transcription terminators predicted from *in silico* analysis (black) or unpredicted (grey). The star corresponds to the putative transfer origin. Horizontal lines delimitate functional modules with their names above. Dashed lines indicate the A, B and C intergenic regions of both ICEs; their nucleotide sequence alignments are detailed below.

(A) Region upstream from the *orfQ* gene, (B) Region upstream from the *arp2* gene, (C)  $P_{arp2s}$  region. The position of the ribosome binding sites (RBS), initiation and stop codons are annotated in bold. Coding regions are boxed. The -10 and -35 boxes of the promoters and transcriptional start sites (+1) determined by 5'RACE PCR are in boldface and underlined. Numbers indicate the nucleotide position on the ICE sequence [GenBank:AJ278471 for ICES1 and GenBank:AJ586568 for ICES3]. For region upstream from the *orfQ* gene (A) arrows indicate the rho-independent transcription terminator inverted repeats. For region upstream from the *arp2* gene (B), horizontal lines below the sequences delimitate the putative stems regions and dashed lines indicate the loop part.





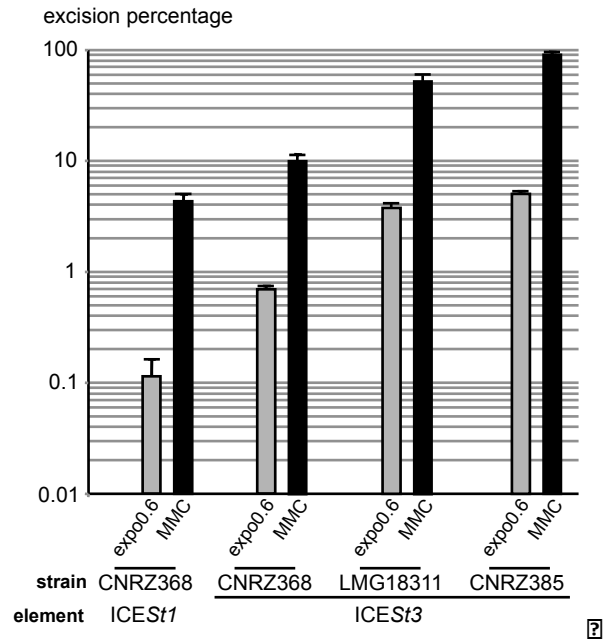




?

The text in this block is heavily distorted and appears to be a corrupted version of a document. It contains numerous illegible characters and symbols, making it impossible to transcribe accurately.

?

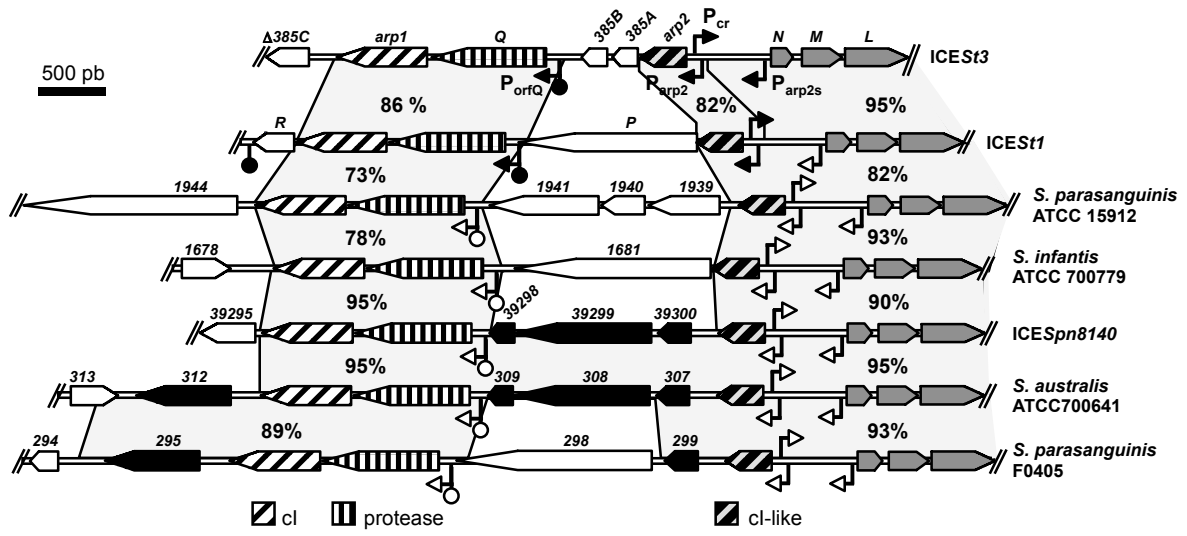


?

This figure shows the excision percentage of different elements in various strains. The y-axis represents the excision percentage on a logarithmic scale from 0.01 to 100. The x-axis lists the strains and the elements being tested. For each element, two conditions are compared: 'expo0.6' (light grey bars) and 'MMC' (black bars). Error bars are present for the 'expo0.6' bars. The data indicates that the excision percentage is generally higher for the 'MMC' condition and for the 'ICES3' element across all strains, with CNRZ385 showing 100% excision for ICES3 under MMC.

?

?



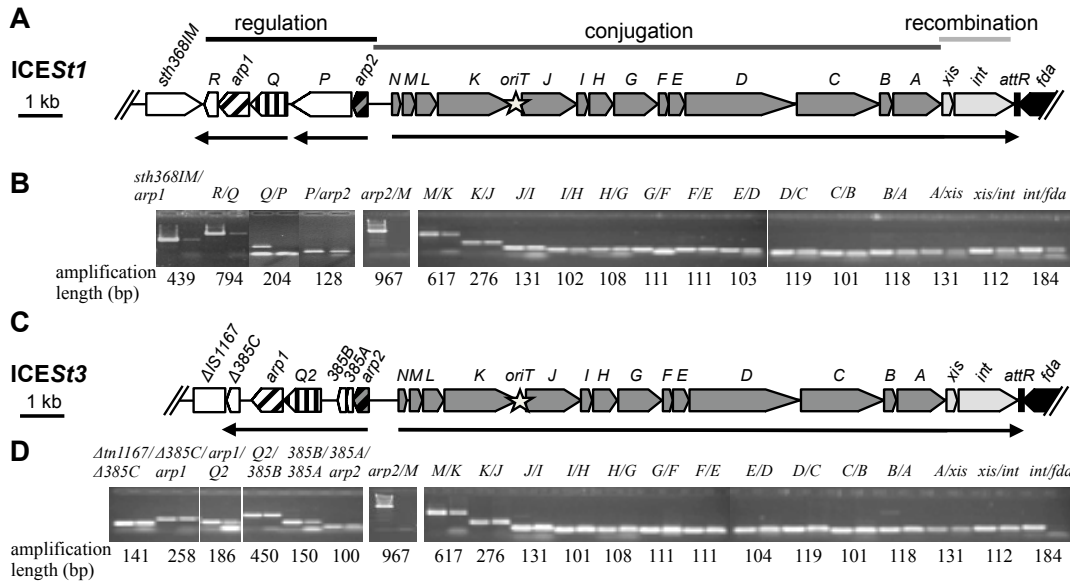
?

?

[unreadable text]

?

???



?

?

[A large block of illegible, garbled text consisting of various symbols and characters, likely a corrupted or placeholder image.]

?

?

???



## 4 Analyse de la région core d'ICESt3.

Les résultats obtenus ont montré que la différence d'activité entre ICESt1 et ICESt3 est en partie due à l'élément.

Bien que ces deux ICE présentent des différences notables au niveau de leurs modules de régulation, leur principale différence réside dans leur région variable. Afin d'étudier l'effet de la région variable sur leurs activités, la construction de dérivés d'ICESt1 (MiniICESt1) et ICESt3 (MiniICESt3), dépourvus de leur région variable mais comprenant la totalité de la région core (sites *attL* et *attR*, modules de régulation, conjugaison et recombinaison), a été entreprise selon une démarche similaire. De tels éléments devraient également permettre d'étudier la fonctionnalité de la région core de ces ICE. L'obtention de MiniICESt1 n'ayant pas été menée à son terme, seule la stratégie utilisée pour l'obtention de MiniICESt3 sera décrite par la suite.

### 4.1 Construction de l'élément MiniICESt3spec.

La région variable d'ICESt1 code un système de restriction-modification de type II dont la fonctionnalité est démontrée (43) et celle d'ICESt3 code un autre système RM de type II putatif (240). De tels systèmes sont connus pour agir comme des systèmes poison-antipoison (167). De ce fait, la délétion de la région variable implique la perte du système de restriction-modification et entraînerait la mort cellulaire. De façon à éviter ce phénomène, la stratégie élaborée lors de ce travail reposait sur l'obtention d'un ICE composite (CIMEVarcat-MiniICESt3 $ab^R$ ) présentant une insertion du site *attL* d'ICESt3 (*attLn*) et d'un gène de résistance à un antibiotique ( $ab^R$ ) à la jonction entre la région variable et la région core de l'élément dans un premier temps, et le transfert conjugatif de MiniICESt3 $ab^R$  vers une cellule portant un site *attB* dépourvu d'élément dans un second temps (figure 32).





#### 4.1.1 Obtention des vecteurs.

La stratégie de clonage utilisée pour construire des éléments composites à partir d'ICEST1 et ICEST3 reposait sur des étapes successives. Le plasmide pSL1180 a été utilisé pour toutes les étapes de clonage (carte du vecteur en annexe).

Pour construire le plasmide utilisé pour l'obtention de MiniICEST1, les deux fragments de 750 pb correspondant aux régions flaquant le site d'intégration chez ICEST1 ont été amplifiés (Figure 33.A) et clonés séquentiellement dans le vecteur pSL1180 (Figure 33.B). Un troisième fragment contenant le site *attL* d'ICEST3 (*attLn*) a été introduit entre les deux fragments précédemment clonés. La séquence du site *attL* n'ayant pas été définie précisément, une région d'environ 550 pb a été amplifiée par PCR et comprend avec une quasi-certitude la totalité de la séquence nécessaire à la recombinaison site-spécifique.

Afin de pouvoir suivre la dynamique de transfert de la région core, celle-ci devait être marquée par un gène de résistance à un antibiotique (Figure 33.B). La région correspondant au gène de résistance à la kanamycine (*kan<sup>R</sup>*), l'érythromycine (*ery<sup>R</sup>*) ou la spectinomycine (*spec<sup>R</sup>*) et leur promoteur a été amplifiée par PCR. L'utilisation d'une amorce contenant un terminateur transcriptionnel bidirectionnel dans sa séquence a introduit ce terminateur à l'extrémité 3' du gène de résistance dans l'amplicon. Ce terminateur évitera un effet polaire de la transcription du gène de résistance sur les régions adjacentes, et réciproquement. Ce fragment contenant le gène de résistance, son promoteur et le terminateur bidirectionnel a été cloné entre le site *attLn* et le fragment correspondant à la région droite bordant le site d'intégration (Figure 33.B).

La digestion des vecteurs destinés à l'obtention d'éléments MiniICEST1 par les enzymes de restriction *SpeI* et *NheI* a permis de récupérer le fragment contenant le site *attLn* et le gène de résistance à l'antibiotique associé pour les trois constructions (Figure 33.B). Ce fragment a été inséré dans un vecteur recombinant où avaient été préalablement clonés deux amplicons de 750 pb correspondant aux régions flanquant le site d'intégration chez ICEST3 (Figure 33.A et B).

Chaque étape de clonage a été vérifiée par séquençage afin de ne pas introduire de mutations, même silencieuses, dans le vecteur et par la suite dans l'élément. Les 6 vecteurs obtenus présentaient la séquence désirée.



amplification et digestion. Le terminateur transcriptionnel bidirectionnel introduit lors de la PCR est représenté par une double sucette.

Le fragment contenant le site *attLn* et le gène de résistance ont été isolés par digestion des vecteurs obtenus pour MiniICESt1 puis clonés dans le vecteur pSL1180 où avaient été préalablement introduites les régions flanquant le site d'intégration chez ICESt3.

Les vecteurs et produits d'amplification ont été digérés par les enzymes de restrictions indiquées et les sites de restriction sont représentés par une barre surmontée d'un losange.

#### 4.1.2 Obtention de l'ICE composite CIMEVarcat-MiniICESt3spec.

La construction de MiniICESt3ab<sup>R</sup> nécessitait l'obtention de l'élément composite CIMEVarcat-MiniICESt3ab<sup>R</sup> par intégration de l'insert des vecteurs précédemment décrits à la jonction entre la région variable et la région core d'ICESt3cat.

Les tests d'activité d'ICESt3 avaient révélé qu'il s'excise et se réplique de façon similaire chez les souches CNRZ385 et LMG18311, mais non chez CNRZ368. Afin de s'affranchir d'un effet de souche lors de la construction du MiniICE, seules les souches CNRZ385 et LMG18311 portant ICESt3 marqué par le gène de résistance au chloramphénicol ICESt3cat ont été utilisées afin d'obtenir l'ICE composite.

La stratégie reposait sur la transformation de cellules compétentes de *S. thermophilus* avec un fragment linéaire correspondant à l'insert d'intérêt. Les ADN plasmidiques ont été digérés par l'enzyme de restriction *BsrBI* qui permet non seulement la libération de l'insert, mais également la digestion du vecteur en deux autres sites (Figure 33.B). Cette digestion assure de ne pas introduire de plasmide circulaire qui pourrait alors s'intégrer par un simple événement de recombinaison homologue dans le chromosome de la souche transformée.

Un protocole de transformation naturelle dérivé de celui de Fontaine *et al.* (105) et adapté selon celui utilisé chez *Streptococcus salivarius* (Séverine Layec, com. pers.) a été utilisé. Succinctement, 100 µL d'une culture de 50 mL réalisée en milieu MCD à 42°C ont été prélevés aux DO<sub>600nm</sub> = 0,15/0,2/0,25/0,3 et 0,35. Le peptide inducteur PYFAGCL a alors été ajouté à une concentration finale de 1 µM, ainsi que l'ADN purifié à 250 ng/µL. Le mélange a été placé pendant 2 h au bain-marie à 42°C. Un volume de 400 µL de MCD préchauffé à 42°C a été ajouté avant étalement sur milieu LM17 supplémenté en antibiotiques. L'incubation a été réalisée à 42°C sur la nuit en anaérobiose.

Seuls des clones résistants à la spectinomycine ont été obtenus, les expériences utilisant les vecteurs portant les gènes de résistance à l'érythromycine et à la kanamycine n'ayant pas permis l'obtention de clones résistants à ces antibiotiques. La nature des transformants putatifs a été vérifiée par PCR en utilisant le couple d'amorces Tn/orf385c.f / Tn/orf385c.r qui bordent le site d'insertion entre la région variable et la région core (Figure 34). Le produit d'amplification obtenu chez ces clones est d'environ 2 kb, ce qui est compatible avec la taille d'amplification attendue en cas d'intégration de l'insert à ce locus.

Chez la souche LMG18311 ICESt3cat, le produit d'amplification a une taille compatible avec les 141 pb attendues. De plus, l'utilisation du couple attL.f / Tn/orf385c.r a confirmé l'insertion du site *attLn* à ce locus (Figure 34).

#### 4.1.3 Dynamique de CIMEVarcacat-MiniICESt3spec.

L'obtention d'un produit d'environ 180 pb avec le couple d'amorces int/fda.f / int/fda.r a permis de vérifier que CIMEVarcacat-MiniICESt3spec était inséré de façon site-spécifique au locus *fda* (Figure 34).

Les différents types d'excision/intégration possibles à partir de la structure composite CIMEVarcacat-MiniICESt3spec ont été analysés par PCR et qPCR.

La détection d'un produit d'amplification avec les couples 131.2 / 132.3 et 0131.5 / excVar ont respectivement mis en évidence des sites *attB* chromosomiques ainsi que des sites *attI* spécifiques correspondant à l'excision de l'ICE composite (Figure 34). Cet élément est donc fonctionnel en excision/intégration. Des dosages réalisés par qPCR (*attB/fda*) ont montré que CIMEVarcacat-MiniICESt3spec s'excise dans environ 1,9 % des chromosomes en phase exponentielle et 1,5 % en phase stationnaire.

***L'ensemble de l'élément composite CIMEVarcacat-MiniICESt3spec est donc capable de s'exciser.***

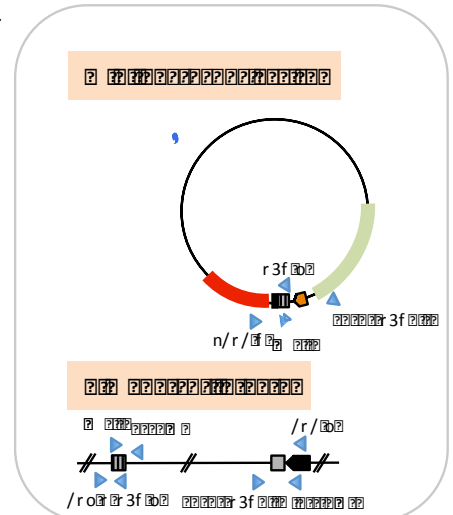
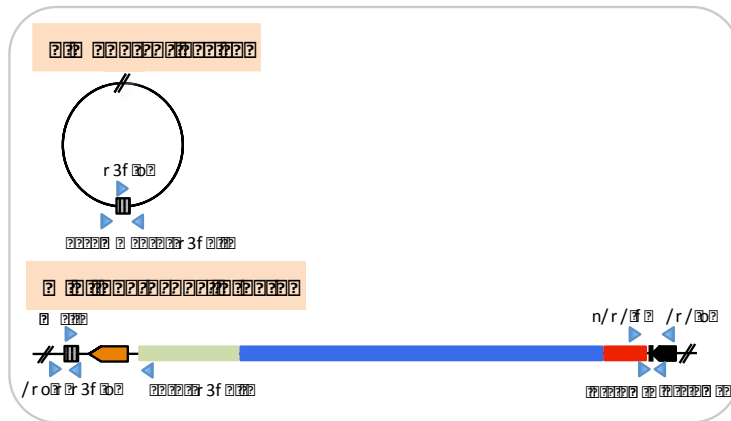
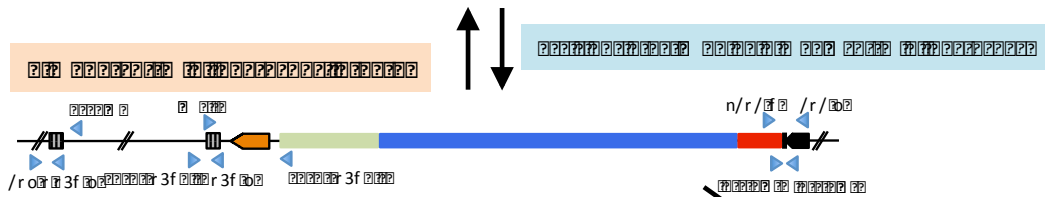
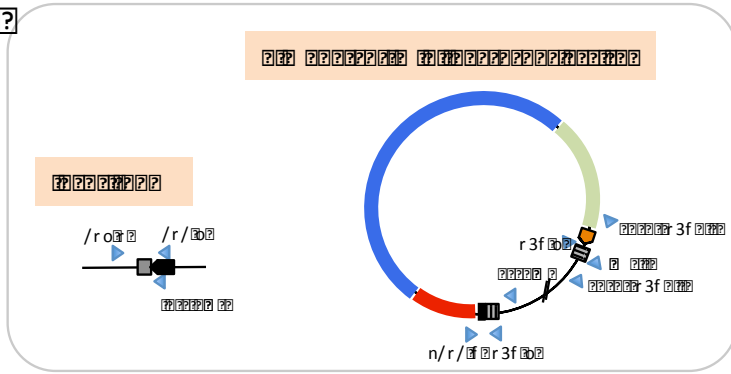
L'amplification d'un produit d'environ 1,9 kb à l'aide du couple 132.3 / Tn/orf385c.r a révélé la jonction entre la borne gauche du module de régulation et le chromosome, suggérant que MiniICESt3spec est intégré seul dans le chromosome (Figure 34). La présence d'une forme circulaire de CIMEVarcacat a été détectée à l'aide du couple excVar / Tn/orf385c.f.

***CIMEVarcacat est capable de s'exciser à partir de la structure CIMEVarcacat-MiniICESt3spec.***

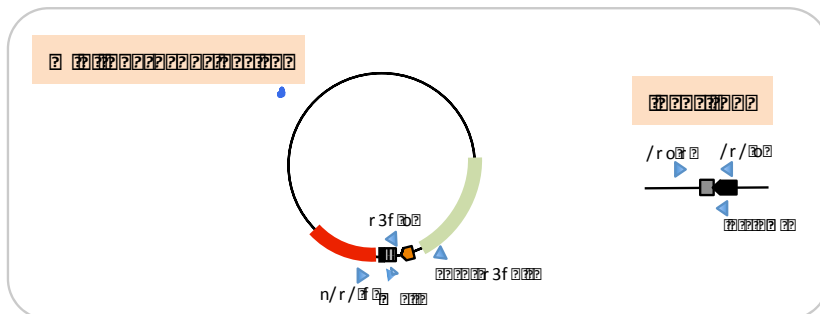
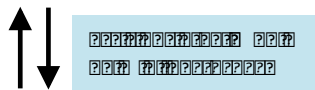
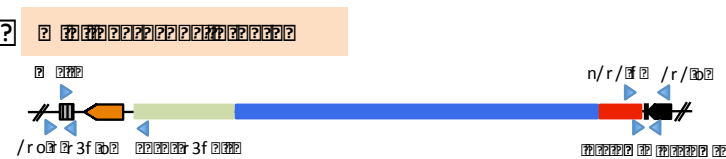
Enfin, des produits d'amplification ont été obtenus aux tailles attendues à l'aide des couples Tn/orf385c.f / int/fda.r et Tn/orf385c.r / O131.5 permettant respectivement la détection de la jonction chromosomique résultant de l'excision de MiniICESt3spec et de la forme excisée de MiniICESt3spec (Figure 34). Le pourcentage d'excision de MiniICESt3spec est de 0,48 % et 0,27 %, respectivement en phase exponentielle et en phase stationnaire.

***MiniICESt3spec est capable de s'exciser seul à partir de CIMEVarcacat-MiniICESt3spec et devrait être capable de se transférer.***

??



??



?

?

???



présentaient une sensibilité au chloramphénicol. L'analyse PCR de ces clones à l'aide des couples précédemment utilisés pour caractériser la dynamique intracellulaire de l'ICE composite a montré qu'ils présentaient uniquement *MiniICESt3spec*. De plus, l'utilisation du couple Tn/orf385c.r / O131.5 a permis la détection d'une forme circulaire de cet élément, démontrant qu'il s'excise, suggérant qu'il pouvait se transférer (Figure 34).

Des tests de conjugaison intra-espèce ont été entrepris afin de tester la capacité de *MiniICESt3spec* à se retransférer seul. Les souches LMG18311 pG9IS1195kan *MiniICESt3spec* et LMG18311 pMG36e (*ery<sup>R</sup>*) ont été utilisées respectivement comme cellules donatrices et réceptrices pour des expériences de conjugaison sur filtre. Les transconjugants ont été sélectionnés sur milieu supplémenté en érythromycine et spectinomycine. La vérification des transconjugants a montré qu'ils présentaient tous l'élément *MiniICESt3spec* inséré au locus *fda* (données non montrées). Cet élément se transfère à une fréquence proche de celle d'ICESt3 de la souche LMG18311 vers cette même souche, soit  $1,0 \times 10^{-5} \pm 2,2 \times 10^{-6}$  UFC transconjugant/UFC donatrice pour *MiniICESt3spec* contre  $8,4 \times 10^{-6} \pm 3,0 \times 10^{-6}$  pour *ICESt3cat* (22).

***MiniICESt3spec portant les sites attL et attR ainsi que les modules de régulation, conjugaison et recombinaison d'ICESt3 est capable de se transférer seul. La région core d'ICESt3 est donc suffisante pour son excision, son transfert et son intégration.***

#### 4.2 Stabilité des éléments.

Une étude précédente avait montré que, bien qu'ICESt3 seul soit stable, des structures résultant d'accrétion en tandem et portant un site *attI* interne, ICESt3-ICESt3 ou CIME<sub>L3</sub>catR<sub>3</sub>-ICESt3, sont instables (21). *MiniICESt3spec* est dépourvu du système de restriction-modification de type II putatif porté par CIMEV<sub>arcat</sub> qui pourrait être impliqué dans la stabilité d'ICESt3 seul. *MiniICESt3spec* seul aurait donc pu être perdu que ce soit dans une souche portant l'élément composite ou *MiniICESt3spec* seul, soit du fait de l'absence du système RM soit de la structure composite.

La stabilité a été mesurée selon une méthode similaire à celle utilisée par Bellanger *et al.* (21). Des cultures successives de la souche ont été effectuées sans pression de sélection afin de déterminer la fréquence de perte d'un élément marqué. A partir d'une préculture de la souche avec les antibiotiques appropriés, 4 mL de milieu liquide avec ou sans antibiotique(s) ont étéensemencés à la dilution  $10^{-6}$ . Lorsque les cellules ont atteint la phase stationnaire de croissance, la culture est utilisée afin d'ensemencer 4 mL de milieu supplémenté avec les mêmes antibiotiques que précédemment, ou sans antibiotique(s), à la dilution  $10^{-6}$ . Le procédé a ensuite été répété 4 fois. Ces cultures successives correspondent à un total de plus de 100 générations. La présence du gène de résistance à l'antibiotique, et

donc la présence de l'élément, a ensuite été testée chez 200 clones isolés par repiquage des clones sur milieux sélectifs. Si l'on considère que la perte de l'élément est irréversible (aucun transfert en milieu liquide), le dénombrement des clones ayant perdu un élément permet de calculer une fréquence de perte par génération selon la formule :

$$f = 1 - (N_s / N_{tot})^{1/g}$$

f étant la fréquence de perte,  $N_s$  le nombre de clones sensibles,  $N_{tot}$  le nombre total de clones étudiés et g le nombre de générations. Cette méthode ne permet néanmoins pas de mettre en évidence des fréquences de perte inférieures à  $1,0 \times 10^{-5}$  (par cellule/par génération).

#### **4.2.1 Stabilité de la structure CIMEVarcac-MiniICESt3spec.**

La stabilité de l'élément composite CIMEVarcac-MiniICESt3spec a été analysée. Après avoir cultivé pendant environ 100 générations la souche LMG18311 CIMEVarcac-MiniICESt3spec en milieu LM17 sans antibiotiques, aucun des 200 clones analysés n'était sensible au chloramphénicol et/ou à la spectinomycine. Ces résultats ont montré que les clones n'avaient perdu ni la structure totale CIMEVarcac-MiniICESt3spec, ni CIMEVarcac ou MiniICESt3spec.

Même si aucun transfert d'ICESt3 n'a pu être observé en culture liquide LM17, un transfert de MiniICESt3spec ne pouvait pas être totalement exclu. De ce fait, des tests de stabilité ont été menés en milieu HJGL dans lequel aucun transfert des ICE de *S. thermophilus* n'a été observé au laboratoire, ni en milieu liquide ni sur milieu solide. Comme dans le milieu LM17, aucune perte n'a pu être détectée (fréquence de perte  $< 10^{-5}$ ).

***CIMEVarcac et MiniICESt3spec sont stables au sein de l'élément composite CIMEVarcac-MiniICESt3spec.***

#### **4.2.2 Stabilité de MiniICESt3spec.**

La stabilité de MiniICESt3spec a été évaluée selon la même méthode et aucun des 200 clones analysés n'était sensible à la spectinomycine. Ainsi, que ce soit en milieu LM17 ou HJGL, les clones n'ont pas perdu l'élément MiniICESt3spec.

***MiniICESt3spec est capable d'assurer sa stabilité dans la population par un autre mécanisme qu'une haute fréquence de transfert.***



### 4.3 Dynamique de MiniICESt3.

La dynamique de MiniICESt3spec a été étudiée en utilisant 3 clones de la souche LMG18311 pG9IS1193kan MiniICESt3spec (nommés 2, 10 et 11) et 3 clones de la souche LMG18311 pMG36e MiniICESt3spec (nommés A, B et C). Quatre de ces clones (2, 10, B et C) présentent un comportement similaires et ont été utilisés pour constituer les moyennes lors des différentes expériences. Les clones 11 et A présentent des comportement différents par rapport aux autres mais également entre eux. Leur analyse fait l'objet d'un paragraphe spécifique (voir 4.3.3).

#### 4.3.1 Excision.

La stabilité de MiniICESt3spec pouvait résulter d'un pourcentage d'excision plus faible que celui d'ICESt3. En effet, un élément qui ne s'excise que très rarement a peu de chance de se trouver sous forme extrachromosomique lors de la division cellulaire et donc d'être perdu.

Une étude quantitative a montré que MiniICESt3spec est excisé (*attB/fda*) dans 3,1 % ( $\pm 0,8$ ) et 2,3 % ( $\pm 0,4$ ) des chromosomes, respectivement en phase exponentielle et phase stationnaire, valeurs similaires à celles d'ICESt3. Des résultats similaires ont été obtenus en milieu HJGL, suggérant que la stabilité de l'élément n'est pas due à une excision réduite.

***La stabilité de MiniICESt3spec n'est pas due à un pourcentage d'excision faible, celle-ci étant très supérieure à la fréquence de perte et n'étant pas significativement différente de celle d'ICESt3 au sein de la souche LMG18311.***

#### 4.3.2 Réplication.

Etant donné les résultats obtenus pour ICESt3, la stabilité de MiniICESt3spec pouvait être assurée par une réplication de la forme extrachromosomique de l'élément, même en absence de MMC. Le nombre de copies de MiniICESt3spec (clone 2, 10, B et C) a été dosé en quantifiant l'amplicon *M/L* par rapport à l'amplicon interne à *fda* (méthode décrite dans la partie 3.3). Celui-ci est présent à environ 8 copies par chromosome en phase exponentielle et phase stationnaire, que ce soit dans les milieux riches LM17 et HJGL ou le milieu chimiquement défini MCD (Figure 35).



(tableau 2). Le clone 11 présente, pour sa part, des pourcentages d'excision très faibles comparés aux 5 autres clones analysés (tableau 2). Ce clone ne semble également pas capable de se répliquer dans les conditions testées, même en présence de MMC.

		LM17			HJGL		MCD	
		expo0.6	stat	MMC	expo0.6	stat	expo0.6	stat
<b>MiniCESt3spec A</b>	excision	$3,3 \times 10^{-2}$	$2,8 \times 10^{-2}$	ND	$1,7 \times 10^{-2}$	$1,9 \times 10^{-2}$	$6,9 \times 10^{-2}$	$7,2 \times 10^{-2}$
	Nombre de copies	1,34	1,13	ND	1,11	0,93	1,27	1,60
<b>MiniCESt3spec 11</b>	excision	$7,8 \times 10^{-4}$	$2,4 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-2}$	ND	ND	ND	ND
	Nombre de copies	0,98	1,16	1,40	ND	ND	ND	ND
<b>MiniCESt3spec B, C, 2, 10</b>	excision	$3,1 \times 10^{-2}$ $\pm 7,7 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-2}$ $\pm 3,7 \times 10^{-3}$	ND	$1,0 \times 10^{-2}$ $\pm 2,4 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-2}$ $\pm 7,8 \times 10^{-3}$	$3,0 \times 10^{-2}$ $\pm 2,3 \times 10^{-2}$	$2,6 \times 10^{-2}$ $\pm 1,5 \times 10^{-2}$
	Nombre de copies	8,35 $\pm 1,34$	7,39 $\pm 0,99$	ND	8,19 $\pm 2,27$	7,54 $\pm 1,84$	9,57 $\pm 2,4$	8,80 $\pm 3,7$

**Tableau 2 : Fréquence d'excision et répllication des clones défectifs de MiniCESt3spec.**

La fréquence d'excision ainsi que le nombre de copies de MiniCESt3spec 11 et A sont indiqués pour les milieux et conditions précisés. Pour les clones B, C, 2 et 10, les valeurs correspondent à la moyenne et à la déviation standard obtenues à partir des 4 clones. ND : Non Dosé.

L'analyse par séquençage du clone 11 porteur de MiniCESt3spec a permis de déterminer que l'élément ne présente pas de mutations au sein du module de recombinaison, du site *attR* et du site *attLn* suggérant que cet élément est capable de s'exciser.

Par ailleurs, la région intergénique *arp2/orfM* ainsi que la région promotrice située en amont d'*orfQ* ne présentent pas de mutations, suggérant que les modules de régulation et les modules de conjugaison et de recombinaison sont transcrits correctement.

Le séquençage de l'ensemble du module de régulation de MiniCESt3spec clone 11 a révélé la présence de mutations ponctuelles au sein d'*orf385A* ( $G_{34} \rightarrow D_{34}$ ) et *orf385B* ( $L_{48} \rightarrow S_{48}$ ). Ceci suggère que ces mutations, qui sont situées dans des régions qui n'ont pas été touchées par la manipulation génétique, pourraient affecter l'activité des protéines codées par *orf385A* et/ou *orf385B*. Ces deux protéines de fonction inconnue pourraient être impliquées dans la régulation de l'excision de MiniCESt3spec.

***MiniICESt3spec* semble être sujet à une forte instabilité génétique comme en témoigne la présence de deux variants peu ou non actifs sur les 6 clones analysés.**

#### **4.3.4 Nature des copies multiples de *MiniICESt3spec*.**

La présence de 8 copies de *MiniICESt3spec* par cellule implique que l'on pouvait avoir plusieurs formes de l'élément pouvant coexister dans la population, mais également au sein de la cellule:

- en monomère intégré dans *fda*.
- en monomère excisé en copie unique ou multiples.
- en multimère intégré dans *fda*.
- en multimère excisé en copie unique ou multiples.

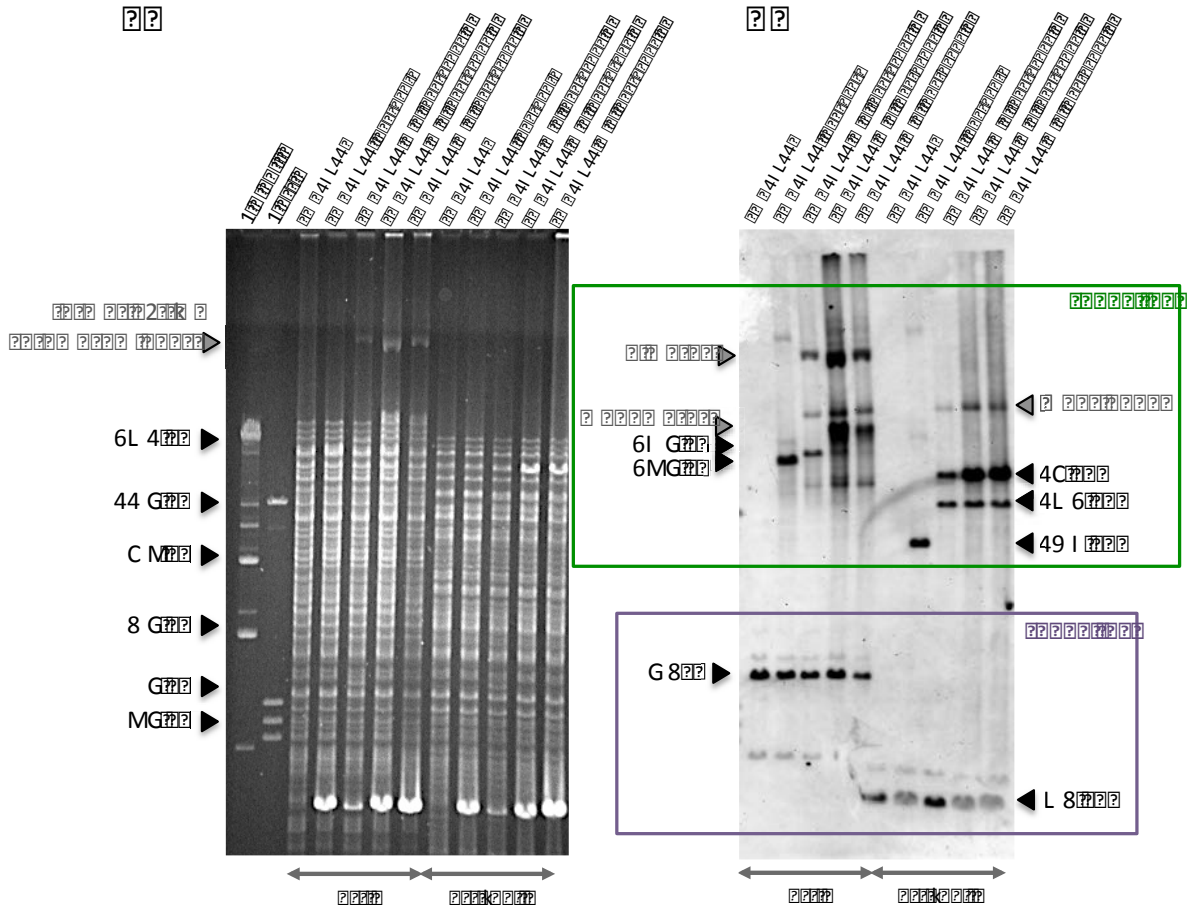
La nature des formes de *MiniICESt3spec* présentes dans la population a été révélée par hybridation de sondes ciblant le locus chromosomique *fda* et un fragment interne de l'ICE correspondant à la région intergénique *arp2/orfM*. L'hybridation séparée de ces sondes sur des profils de restriction d'ADNg des clones A, B et C de LMG18311 pMG36e *MiniICESt3spec* a montré qu'elles révélaient des fragments de poids moléculaires très différents (données non montrées). L'hybridation simultanée de ces sondes a ensuite été réalisée sur ces mêmes profils afin de mener une étude quantitative (figure 36). Les souches LMG18311 et LMG18311ICESt3cat ont été utilisées comme témoins.

##### **4.3.4.1 Détermination des formes présentes.**

Dans un premier temps, les ADNg extraits ont été digérés par l'enzyme de restriction *Pst*I. Cette enzyme ne reconnaît aucun site dans *MiniICESt3spec*, laissant alors apparaître la forme native de l'élément après migration sur gel d'agarose 0,6 %. Des formes surnuméraires situées clairement au dessus de l'ADN chromosomique sont visibles après migration uniquement au niveau des pistes correspondant à *MiniICESt3spec* (Figure 36.B) et sont révélées par hybridation d'une sonde spécifique d'ICESt3 (Figure 36.C), suggérant que ces formes correspondraient à des molécules circulaires extrachromosomiques. Elles ne sont plus visibles après digestion des extraits par l'enzyme *Bgl*II qui reconnaît un site de restriction dans *MiniICESt3spec*. Elles correspondraient donc à une forme native de cet élément, en monomère ou en multimère.



?



?

1. **Introduction**  
 2. **Materials and Methods**  
 3. **Results**  
 4. **Discussion**  
 5. **Conclusion**  
 6. **References**

The first part of the paper is an introduction to the study. It discusses the importance of the research and the objectives of the study. The second part is the materials and methods section, which describes the procedures used in the study. The third part is the results section, which presents the findings of the study. The fourth part is the discussion section, which interprets the results and compares them with previous studies. The fifth part is the conclusion section, which summarizes the main findings of the study. The sixth part is the references section, which lists the sources used in the study.

The first part of the paper is an introduction to the study. It discusses the importance of the research and the objectives of the study. The second part is the materials and methods section, which describes the procedures used in the study. The third part is the results section, which presents the findings of the study. The fourth part is the discussion section, which interprets the results and compares them with previous studies. The fifth part is the conclusion section, which summarizes the main findings of the study. The sixth part is the references section, which lists the sources used in the study.

The first part of the paper is an introduction to the study. It discusses the importance of the research and the objectives of the study. The second part is the materials and methods section, which describes the procedures used in the study. The third part is the results section, which presents the findings of the study. The fourth part is the discussion section, which interprets the results and compares them with previous studies. The fifth part is the conclusion section, which summarizes the main findings of the study. The sixth part is the references section, which lists the sources used in the study.

?

?

The first part of the paper is an introduction to the study. It discusses the importance of the research and the objectives of the study. The second part is the materials and methods section, which describes the procedures used in the study. The third part is the results section, which presents the findings of the study. The fourth part is the discussion section, which interprets the results and compares them with previous studies. The fifth part is the conclusion section, which summarizes the main findings of the study. The sixth part is the references section, which lists the sources used in the study.

?

???

seront ultérieurement utilisés pour quantifier les différentes formes car cette région est en monocopie dans le chromosome.

Des fragments de tailles compatibles avec les 24,5 kb et 10,8 kb attendus dans le cas d'un élément ICESt3 intégré sont obtenus respectivement sur les profils de restriction *PstI* et *PstI+BglI*. Ces fragments sont absents chez la souche LMG18311 dépourvue d'élément. Des fragments de tailles compatibles avec les 28,5 kb et 13,2 kb attendus sont respectivement observés sur les profils *PstI* et *PstI+BglI* dans le cas de MiniICESt3spec intégré (Figure 36.D). Ces résultats indiquent que MiniICESt3spec est intégré dans le locus *fda*, aucune intégration dans un autre site n'ayant été mise en évidence. De plus, aucune intégration en tandem n'a pu être détecté suggérant que la structure MiniICESt3spec-MiniICESt3spec est fortement instable et/ou indétectable dans les conditions de l'expérience.

***MiniICESt3spec est intégré en copie unique au locus fda.***

Pour les 3 clones de MiniICESt3spec testés, le profil de restriction *PstI* laisse apparaître l'hybridation de la sonde sur la forme native extrachromosomique de l'élément. L'analyse montre qu'à côté d'une forme monomérique native de poids moléculaire apparemment légèrement supérieur à 23 kb, une forme multimérique est présente (« bandes » surnuméraires de grande taille précédemment observées sur le gel d'agarose). La digestion par l'enzyme de restriction *BglI* provoque une disparition de ces bandes et l'apparition d'un fragment de 19 kb qui correspond à la linéarisation de la forme circulaire monomérique et/ou la fragmentation de la forme circulaire dimérique (Figure 36.D). La présence d'un « smir » associé à la forme monomérique native de l'élément chez les clones B et C où MiniICESt3spec est présent en copies multiples, et absent chez A où il est présent en copie unique, suggère fortement que MiniICESt3spec peut se répliquer par cercle roulant tout comme ICEBs1. Un fragment de haut poids moléculaire et de faible intensité est visible dans la piste correspondant à LMG18311 ICESt3 et pourrait correspondre à la forme native extrachromosomique de l'élément, probablement sous forme de dimère.

***MiniICESt3spec est présent à l'état extrachromosomique en copies multiples, ce qui suggère fortement une réplication par cercle roulant de la forme circulaire.***

#### **4.3.4.2 Quantification des formes présentes.**

La quantité relative de chaque forme par rapport au locus *fda* dans la population a été dosée (Figure 36.D). Les sondes utilisées pour les hybridations présentent les mêmes caractéristiques de taille et de pourcentage en bases A-T et donc les mêmes caractéristiques de fluorescence. En effet, le marquage est basé sur l'incorporation aléatoire de dUTP couplé à la digoxygénine (Dig) à la place de dTTP lors de la synthèse d'un brin complémentaire.

Des nombres de copies similaires à ceux obtenus par qPCR ont été obtenus, soit environ 0,8 copies d'ICESt3, 1,8 copies de MiniICESt3spec clone A, 10,2 copies pour MiniICESt3spec clone B et 10,4 copies MiniICESt3spec clone C. La quantité de MiniICESt3spec intégrée observée dans les clones B et C, où l'élément est en copies multiples, est identique à celle du clone A où il est présent en copie unique. Enfin, un signal bien plus intense est observé au niveau de la forme excisée des clones B et C de MiniICESt3spec comparé au clone A.

***La quantification des formes présentes par hybridation a confirmé la présence de MiniICESt3spec en copies multiples sous forme extrachromosomique monomérique et dimérique.***

#### **4.3.5 Régulation de MiniICESt3spec.**

##### ***4.3.5.1 Effet des dommages à l'ADN.***

L'effet de la MMC à une concentration égale à CMI/2 pendant 2 h 30 en milieu LM17 a été testé sur MiniICESt3spec clones 2, 10 et 11. Dans ces conditions, la fréquence d'excision de l'élément (*attB/fda*) est accrue d'environ un facteur 10, avec une fréquence d'excision de  $0,34 \pm 0,12$  contre  $0,031 \pm 0,008$  en phase exponentielle. De plus, la MMC provoque une répllication accrue d'un facteur environ 4 de MiniICESt3spec avec plus de 30 copies de l'élément (*M/L / fda*) par site d'intégration chromosomique ( $33,6 \pm 2,35$ ) (Figure 37). Cependant, la MMC n'a qu'un faible effet sur l'excision de MiniICESt3spec clone 11 et n'induit pas sa répllication (Figure 37).

***MiniICESt3 code les fonctions nécessaires à la régulation de l'excision et de la répllication.***







La seule différence entre ICE*St3* et l'élément composite CIME*Varcat-MiniICESt3spec* est la présence du site *attLn* (et du gène de résistance à la spectinomycine). La seule cause possible de la répllication constitutive de *MiniICESt3spec* dans la cellule portant cette structure est sa présence sous une forme circulaire qui ne possède pas les séquences correspondant à la région variable.

***L'inhibition de la répllication d'ICESt3 en absence de MMC se fait par l'action en cis de la région variable.***

## 5 Acteurs moléculaires de la régulation d'ICE*St1* et ICE*St3*.

Au début de cette étude, ICE*St1* et ICE*St3* constituaient les seuls éléments connus codant un régulateur de type *ci* (Arp1) et de type *ImmR* (Arp2). Ces observations pouvaient laisser penser qu'ICE*St1* et ICE*St3* constituaient des cas isolés présentant une régulation particulière. Cependant, des analyses de séquences menées au cours de cette thèse ont montré que les ICE de *S. thermophilus* pourraient faire partie d'une nouvelle famille d'ICE spécifique des streptocoques.

### 5.1 ICE*St1* et ICE*St3* : modèles d'une nouvelle famille d'ICE de Streptocoques.

Les séquences nucléiques et protéiques des modules de régulation, conjugaison et recombinaison d'ICE*St1* et ICE*St3* ont été comparées aux séquences de Firmicutes présentes dans les banques de données à l'aide des logiciels BLASTN, BLASTP et tBLASTN (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Ces analyses ont révélé des modules de conjugaison apparentés de façon proche (plus de 80 % d'identité nucléotidique sur toute la longueur) chez l'ICE putatif ICE*Spn8140* de *Streptococcus pneumoniae* (72) ainsi que dans des séquences de génomes partiellement ou totalement séquencés des streptocoques *S. parasanguinis* ATCC15912 et F0405, *S. infantis* ATCC700779 et *S. australis* ATCC700641 (Figure 6 de l'article). Ce module est toujours adjacent à un module de recombinaison putatif non apparenté, ou apparenté de façon lointaine, à celui des ICE de *S. thermophilus*. Dans tous les cas, les deux modules seraient transcrits à partir d'un promoteur unique P<sub>cr</sub> homologue de celui identifié chez ICE*St1* et ICE*St3* (Figure S2 de l'article).

De plus, tous ces éléments possèdent un module de régulation putatif adjacent à l'extrémité 5' du module de conjugaison. Ces modules possèdent une organisation similaire à celle d'ICE*St1* et ICE*St3* et codent, de gauche à droite, un régulateur putatif de type *ci* (Arp1), une métalloprotéase de type *ImmA* (OrfQ), 2 à 4 protéines non apparentées de

fonction inconnue, un régulateur de type ImmR (Arp2) (Figure 6 de l'article). Enfin, l'analyse bioinformatique suggère qu'ils présentent des organisations transcriptionnelles identiques car des promoteurs et terminateurs transcriptionnels homologues à ceux détectés expérimentalement chez ICE*St1* et ICE*St3* ont été mis en évidence lors des analyses de séquences (Figure S2 de l'article).

Des modules de conjugaison apparentés de façon plus lointaine ont été identifiés, non seulement chez des ICE déjà identifiés comme RD2 de *S. pyogenes* (118) et 4 éléments intégrés à l'extrémité du gène d'ARNt<sup>Lys</sup> chez 4 souches de *S. agalactiae* (40, 288), mais également chez différents streptocoques tels que *S. agalactiae* ATCC13813, *S. downei* F0415, *Streptococcus* sp. 2\_1\_36FAA et *S. gallolyticus* UCN34. Bien que ces éléments possèdent des modules de conjugaison apparentés, ils ne codent pas les deux systèmes régulateurs *cl* et ImmR. Deux éléments supplémentaires identifiés dans le génome de *S. dysgalactiae* ATCC12294 possèdent un module de conjugaison présentant un degré de ressemblance similaire à celui observé pour les autres éléments de cette famille ainsi qu'un module de régulation codant des homologues d'ImmR et *cl*.

***Des ICE apparentés à ICE*St1* et ICE*St3* présentent une organisation similaire et codent les deux systèmes régulateurs putatifs *cl* et ImmR/ImmA, ce qui suggère fortement qu'ils sont les principaux acteurs de la régulation des ICE de cette famille.***

## 5.2 Analyse des régulateurs.

Les analyses de séquences suggèrent fortement que les gènes *arp1*, *arp2* et *orfQ* codent les régulateurs de l'activité d'ICE*St1* et ICE*St3*. De plus, l'ORF *orf385A* d'ICE*St3* code une protéine putative portant un domaine de liaison à l'ADN HTH-XRE et pourrait constituer un régulateur putatif, au même titre que les régulateurs *cl* et ImmR respectivement codés par *arp1* et *arp2*. Le gène *orfQ* coderait la protéase associée au répresseur ImmR putatif codé par *arp2*. Chez ICE*St3*, un décalage de phase identifié dans la séquence d'*orfQ* conduirait à l'apparition d'un codon stop précoce. Cela entraînerait la production d'un peptide de 7 aminés, OrfQ1 (Figure 1 de l'article). La présence d'un RBS associé à un codon d'initiation ATG situé juste en aval de ce codon stop précoce pouvait cependant permettre la production d'une protéine OrfQ2 tronquée de 18 acides aminés à son extrémité N-terminale par rapport à la protéine OrfQ pleine taille d'ICE*St1*. Les protéines putatives OrfQ d'ICE*St1* et OrfQ2 d'ICE*St3* portent un domaine DUF955, dont le motif suggère fortement qu'elles pourraient être des métalloprotéases à zinc. Chez ICE*Bs1*, la protéase ImmA homologue d'OrfQ présente également un domaine DUF955. Elle clive le répresseur ImmR, homologue d'*arp2* d'ICE*St1* et ICE*St3* (31). Chez ICE*Bs1*, la protéase et son répresseur cible ImmR sont codés par le même opéron. Ainsi, une interaction d'OrfQ avec Arp1, codé par le même opéron, ne peut pas être exclue chez les ICE de *S. thermophilus*.

La fonction de ces gènes ou protéines a été testée selon 2 approches :

- une approche génétique a consisté à déléter le gène *arp1* chez ICESt1 et ICESt3.
- une étude protéique a visé à définir les interactions entre ces régulateurs mais également avec l'ADN.

### 5.2.1 Etude génétique.

Cette première approche avait déjà été précédemment testée et avait permis d'obtenir des clones mutants délétés d'*arp1* chez ICESt1 et ICESt3 (20, 22). Néanmoins, leur analyse a révélé que la souche CNRZ368ICESt1 $\Delta$ *arp1* présentait une mutation induisant un décalage du cadre de lecture. Cela conduit à la disparition du codon de terminaison de traduction d'*arp1* donnant lieu à la traduction d'une protéine chimérique dont le codon stop est situé dans la séquence codante du gène *orfR*. L'augmentation de l'excision de cet élément pouvait résulter non seulement de l'absence d'Arp1 et d'OrfR, mais également de la présence d'une protéine chimérique dont l'impact potentiel sur l'activité de l'élément n'est pas à exclure. De plus, lors de travaux précédemment réalisés par Xavier Bellanger, l'analyse de 3 clones putatifs CNRZ385 ICESt3 $\Delta$ *arp1* avait révélé une hétérogénéité phénotypique, suggérant fortement un effet plus ou moins délétère de la structure délétée et/ou la présence de mutation(s) compensatoire(s) dans le génome de la souche hôte et/ou dans l'élément (22).

Jusqu'à l'utilisation de la transformation naturelle chez *S. thermophilus*, la mutation d'un gène se faisait en deux étapes successives, l'intégration d'un vecteur par un premier événement de recombinaison intermoléculaire, et la délétion de la région ciblée par un second événement de recombinaison intramoléculaire (193, 194). La seconde étape de recombinaison pouvait mener non seulement à une délétion mais aussi à un retour au génotype sauvage. Ce retour possible à l'état initial rend difficile l'obtention de la structure délétée si elle est contre-sélectionnée. L'utilisation de la transformation naturelle et d'un fragment linéaire peut permettre le remplacement ou la délétion d'une séquence en une seule étape, un événement de simple recombinaison menant à la linéarisation du chromosome et à la mort cellulaire.

Succinctement, la stratégie repose sur celle décrite par Barnerjee et Biswas (16). Elle consiste à générer un fragment linéaire contenant un gène de résistance à la spectinomycine bordé par des régions flanquant le gène *arp1* (600 pb) selon la méthode décrite par Yu *et al.* (343). Un événement de double recombinaison conduit au remplacement d'*arp1* par le gène de résistance. Après sélection des mutants résistants à la spectinomycine, l'excision de la cassette est réalisée par recombinaison entre les sites Lox, introduits à ses extrémités, grâce à la recombinase Cre codée par un vecteur qui est

introduit par électroporation. Le site de recombinaison résultant permet de garder le cadre de lecture lors de la traduction, condition indispensable à la délétion d'*arp1* qui se situe dans une structure opéronique.

Les fragments nécessaires à la délétion d'*arp1* chez ICES*t1* et ICES*t3* ont été obtenus et présentaient la séquence désirée. Néanmoins leur intégration au locus *arp1* chez les souches CNRZ368 ICES*t1*, CNRZ385 ICES*t3* ou LMG18311 ICES*t3cat* n'a pas été obtenue malgré de nombreuses tentatives.

***Outre le fait que la transformation naturelle des souches utilisées dans ce travail ne soit pas des plus efficace, l'absence de clones mutants pour le gène arp1 ainsi que l'échec des tentatives passées suggèrent fortement que sa délétion est délétère pour la cellule.***

### **5.2.2 Etude protéique.**

Les tentatives de délétion du gène codant le régulateur putatif Arp1 ayant été infructueuses et le temps ayant manqué pour entreprendre la délétion des gènes *arp2* et *orfQ*, le travail sur les régulateurs putatifs d'ICES*t1* et ICES*t3* s'est poursuivie par une analyse protéique.

#### **5.2.2.1 Purification des régulateurs putatifs.**

Une première approche a consisté à purifier les protéines marquées d'un « tag » hexaHistidine à leur extrémité N-terminale. Pour cela, les gènes *arp1*, *arp2* et *orfQ* d'ICES*t1* et *arp1*, *arp2* et *orfQ2* d'ICES*t3* ont été amplifiés par PCR et clonés dans le vecteur d'expression pEt15b (carte du vecteur en annexe). Les séquences des inserts ainsi que des régions promotrices ont été vérifiées par séquençage. Ces vecteurs ont été insérés par électroporation dans la souche d'*E. coli* BI21(DE3). Cette souche contient une insertion chromosomique du gène de l'ARN polymérase T7 sous le contrôle de l'opérateur *lac*, laquelle contrôle l'expression du gène cloné dans le vecteur pEt15b. La production de la protéine est induite par ajout d'un inducteur non métabolisé, l'isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG).

Des mises au point ont permis de définir des conditions optimales d'expression des protéines à 37°C (ajout de 0,1  $\mu$ M d'IPTG, temps d'induction de 2 h). Dans ces conditions, les protéines Arp1 et Arp2 d'ICES*t1* et d'ICES*t3* sont solubles et donc purifiables, alors qu'OrfQ est systématiquement présente dans la fraction insoluble. Malgré des mises au point supplémentaires réalisées en faisant varier la température de croissance, le moment et le temps d'induction ou la quantité d'inducteur, nous ne sommes pas parvenus à solubiliser

OrfQ, même dans différents tampons dont certains étaient à très forte teneur en agent dénaturant, comme l'urée. Des résultats similaires avaient précédemment été obtenus pour la protéase ImmA d'ICEBs1 dont la purification a nécessité la purification des corps d'inclusion (31).

***La construction des vecteurs et la mise au point des conditions d'expression d'Arp1 et Arp2 permettra leur purification afin de définir leurs cibles sur l'élément mais également sur le chromosome de la souche hôte. L'obtention d'OrfQ va nécessiter la purification des corps d'inclusion afin de tester l'activité in vitro de cette protéine sur les régulateurs cl et ImmR. Tout comme ImmA, le fait qu'OrfQ d'ICEst1, mais également OrfQ2 d'ICEst3, soient présentes dans les corps d'inclusion implique une toxicité pour la cellule et suggère fortement qu'elles soient des protéases actives.***

#### **5.2.2.2 Coexpression des régulateurs in vivo.**

Une étude de l'activité d'OrfQ a été entreprise *in vitro* selon une approche similaire à celle utilisée pour caractériser ImmA chez ICEBs1 (31). Les gènes *orfQ* d'ICEst1 (*orfQ<sub>ICEst1</sub>*), *orfQ2* d'ICEst3 (*orfQ<sub>ICEst3</sub>*) et une version tronquée des 18 premiers codons d'*orfQ* d'ICEst1 (*orfQ2<sub>ICEst1</sub>*) ont été amplifiés et clonés dans le vecteur d'expression pCDFDuet-1 (carte du vecteur en annexe), de façon à surproduire une protéine non marquée. Les séquences des inserts ainsi que de leur région promotrice ont été vérifiées. Le vecteur pCDFDuet-1 présente une origine de réplication ainsi qu'un gène de résistance différent de pEt15b, rendant possible leur corésidence dans une cellule. De plus, les deux vecteurs présentent un nombre de copies par cellule moyen et le même système d'induction de la surexpression protéique, suggérant que la production des protéines se fait dans des quantités similaires pour les deux vecteurs.

Les 4 vecteurs dérivés de pEt15b ainsi que les 3 vecteurs dérivés de pCDFDuet-1 ont été séparément introduits dans *E. coli* BI21(DE3), de même que l'association de chaque vecteur dérivé de pEt15b et pCDFDuet-1. Les 19 souches obtenues ainsi que les 2 souches contenant les vecteurs dépourvus d'inserts ont été vérifiées et utilisées pour des expériences de coexpression protéique. La production des protéines OrfQ<sub>ICEst1</sub>, OrfQ2<sub>ICEst1</sub> et OrfQ2<sub>ICEst3</sub> a été testée dans les conditions définies précédemment (figure 39). La migration des extraits protéiques totaux sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes a permis de visualiser la bonne surproduction des protéines OrfQ et OrfQ2<sub>ICEst1</sub>. La fragmentation cellulaire en fraction soluble et fraction insoluble a été réalisée sans que l'absence de « tag » histidine ou la présence d'Arp2 n'augmente la solubilité d'OrfQ. La surproduction de la protéine OrfQ2<sub>ICEst3</sub> n'a pas été obtenue malgré des mises au point des





La simple surexpression des protéases putatives OrfQ<sub>ICEST1</sub>, et OrfQ2<sub>ICEST3</sub> avec les protéines Arp1 et Arp2 des deux éléments n'a pas permis d'apprécier de dégradation de ces régulateurs putatifs (figure 39). Néanmoins, l'activité de la protéase ImmA n'est induite que lors de l'ajout du peptide PhrI (31). La voie d'activation étant commune à celle de la réponse SOS, une induction par la MMC semblait être envisageable. La CMI de la MMC a été déterminé chez *E. coli* BL21(DE3) et les mêmes expériences que celles précédemment décrites ont été réalisées en présence de différentes concentrations en MMC (CMI/2, CMI/4, CMI/8 et CMI/16). Des mises au points ont fixé les conditions optimales d'ajout de l'inducteur de la production des protéines (IPTG) et de l'inducteur de l'activité de la protéase (MMC) en se basant sur la survie cellulaire et la quantité de protéines produite. Ainsi, l'IPTG a été ajouté à DO<sub>600nm</sub>= 0,4 et la MMC 30 min plus tard à une concentration égale à CMI/2 (noté IM) (Figure 39).

L'absence de différence dans la quantité d'Arp1<sub>ICEST1</sub> en présence ou non d'OrfQ<sub>ICEST1</sub> suggère que cette protéase putative n'a pas d'effet sur Arp1 (Figure 39.A), bien que les deux gènes appartiennent au même opéron. Au contraire, la diminution de la quantité d'Arp2<sub>ICEST1</sub> lors de sa coproduction avec OrfQ et en présence de MMC pourrait être due à sa dégradation (figure 39.B). Enfin, les coexpressions réalisées pour les protéines d'ICEST3 n'ont pas mis en évidence de dégradation pour Arp1<sub>ICEST3</sub> alors que le signal diminue pour Arp2<sub>ICEST3</sub>, même si la protéine OrfQ2<sub>ICEST3</sub> n'est pas visible (Figure 39.C).

Les dégradations putatives ont été vérifiées par « Western blotting » selon la méthode décrite par Bose *et al.* (31) (données non montrées). L'utilisation des mêmes extraits protéiques et une détection des protéines Arp1 et Arp2 à l'aide d'anticorps anti-Histidine a révélé l'absence de dégradation d'Arp1 dans les conditions testées. La présence d'un signal trop faible n'a pas permis de confirmer la dégradation putative d'Arp2 d'ICEST1 et ICEST3.

***Alors qu'Arp1 ne semble pas être une cible de la protéase putative OrfQ dans les conditions testées, il semblerait qu'Arp2 le soit. En effet, même si les résultats doivent être confirmés par Western blotting, une diminution de la quantité d'Arp2 est observée lors de sa coexpression avec OrfQ et en présence de MMC chez E. coli.***





## DISCUSSION ET PERSPECTIVES



L'objectif global du projet initié par ce travail était de comprendre l'origine de la différence de comportement de deux ICE étroitement apparentés de *S. thermophilus*, notamment en caractérisant leur dynamique et leur régulation.

Une analyse transcriptionnelle qualitative et quantitative d'ICEst1 et ICEst3 a permis de comparer l'organisation et l'activité de ces éléments. Des analyses génétiques et protéiques menées sur les régulateurs putatifs de ces ICE de *S. thermophilus* ont apporté certains éléments de réponse, même si leur rôle exact n'a pas été déterminé en raison de contraintes expérimentales.

A un niveau plus global, l'excision d'ICEst1 et ICEst3 a été dosée afin d'évaluer l'impact des conditions environnementales et/ou de la souche hôte sur l'activité de ces ICE. Deux caractéristiques inattendues chez les ICE en sont ressorties, d'une part la réplication d'ICEst3 en présence de dommages à l'ADN et d'autre part un effet de la souche au sein de l'espèce d'origine de cet ICE.

Enfin, les résultats obtenus pour ces deux ICE pourraient être étendus à une famille d'ICE apparentés de façon proche présents chez divers streptocoques.

## 1 Organisation et activité des ICE de *S. thermophilus*.

Alors qu'ICEst1 et ICEst3 présentent des modules de conjugaison et de recombinaison quasiment identiques, leurs fréquences de transfert sont très différentes. En effet, ICEst3 se transfère au sein de *S. thermophilus* à une fréquence de  $10^{-6}$  à  $10^{-5}$  UFC de transconjugants par UFC de cellules donatrices, alors qu'un seul transconjugant a été obtenu lors d'une expérience de transfert pour ICEst1 (fréquence de transfert inférieure à  $10^{-9}$  UFC de transconjugants par UFC de cellules donatrices) (22).

### 1.1 Organisation transcriptionnelle.

La cartographie transcriptionnelle d'ICEst1 et ICEst3 a révélé que toutes les ORF des modules de conjugaison et de recombinaison sont cotranscrites et appartiennent à un même transcrit de 14,6 kb. Ces données sont appuyées par des quantités similaires de 3 loci tout du long de ce transcrit, ou décroissante en partant de son promoteur  $P_{cr}$ . Cette organisation permettrait le couplage entre la mise en place du pore de conjugaison et l'excision de l'élément. Notamment, il assurerait à l'élément excisé de pouvoir entreprendre un transfert au travers d'un pore qui aura été mis en place préalablement ou de façon

concomitante. Des expériences de Northern Blot permettraient de révéler la présence de ce long transcrit mais également de terminateurs internes provoquant la formation de transcrits plus courts qui n'auraient pas pu être mis en évidence au cours de ce travail. De plus, la présence d'un ou plusieurs promoteurs internes non identifiés lors des analyses de séquences n'est pas à exclure. Cette hypothèse pourrait être vérifiée par introduction de terminateurs transcriptionnels à différents endroits dans la séquence de ce transcrit. La détection d'un transcrit en aval du terminateur introduit permettrait de démontrer la présence d'un ou plusieurs promoteurs autres que  $P_{cr}$  au sein du module de conjugaison et de recombinaison. En particulier, il serait intéressant de tester si le module de recombinaison peut être transcrit indépendamment du module de conjugaison à partir d'un promoteur non identifié.

Les modules de régulation d'*ICESt1* et *ICESt3* présentent une organisation similaire en deux opérons qui sont cotranscrits de façon partielle chez *ICESt3*. Cette différence pourrait être à l'origine de la quantité égale des transcrits des deux opérons du module de régulation d'*ICESt3* alors qu'elle est différente chez *ICESt1*. La cotranscription des opérons pourrait résulter de la différence de force du terminateur transcriptionnel situé en amont d'*orfQ* qui pourrait être insuffisante chez *ICESt3*. Elle pourrait également impliquer la plus faible activité transcriptionnelle d'*ICESt1* qui favoriserait l'arrêt de la transcription au niveau du terminateur. Enfin, un promoteur spécifique de la phase stationnaire  $P_{arp2s}$  a été identifié chez *ICESt3* mais non chez *ICESt1*, bien que la séquence soit également présente chez ce dernier. L'absence de détection d'activité du promoteur  $P_{arp2s}$  chez *ICESt1* pourrait être due à la trop faible activité transcriptionnelle de l'ensemble de la région core de cet élément. La force de ces promoteurs et terminateurs pourrait être évaluée par des expériences de gènes rapporteurs. La nature exacte des transcrits du module de régulation d'*ICESt3* présents en phase exponentielle et en phase stationnaire pourrait être révélée par Northern Blot.

## 1.2 ORF conservées du module de régulation.

Les modules de régulation d'*ICESt1* et *ICESt3* portent des ORF conservées qui coderaient un répresseur de type cl (*arp1*) ainsi qu'un répresseur de type ImmR (*arp2*) et sa protéase associée de type ImmA (*orfQ*). *ICESt1* et *ICESt3* étaient les seuls éléments identifiés, ICE et prophages, codant ces deux types de régulateurs, suggérant qu'ils sont impliqués dans une régulation originale où ils pourraient interagir.

L'organisation des ORF codant ces régulateurs est conservée au sein des modules de régulation d'*ICESt1* et *ICESt3*. Néanmoins, la répartition d'*orfQ* et *arp2* au sein de deux opérons distincts est des plus atypique. Chez tous les autres éléments connus avant ce travail, les ORF codant le répresseur de type ImmR et sa protéase associée, ImmA, sont cotranscrits au sein du même opéron (2, 31, 240). La cotranscription des deux opérons du

module de régulation d'ICESt3, non observée chez ICESt1, pourrait participer à la création d'un différentiel de quantité entre Arp2 et sa protéase putative OrfQ, et ainsi être à l'origine des différences de dynamique des deux éléments.

Enfin, les gènes *orfQ* et/ou les protéines codées par ces gènes pourraient présenter des différences d'activité notables entre ICESt1 et ICESt3. En effet, le décalage de phase identifié dans la séquence (ADN et ARN) d'*orfQ* d'ICESt3 conduirait à la production d'une protéine OrfQ<sub>ICESt3</sub> tronquée de 18 acides aminés à son extrémité N-terminale par rapport à la protéine OrfQ pleine taille d'ICESt1 (OrfQ<sub>ICESt1</sub>). Néanmoins, les protéines putatives OrfQ<sub>ICESt1</sub> et OrfQ<sub>ICESt3</sub> portent la totalité du domaine DUF955, domaine responsable de l'activité protéolytique d'ImmR d'ICEBs1 (31, 32).

### 1.2.1 Des régulateurs putatifs codés par des ORF essentielles ?

Des tentatives de délétion du gène *arp1* codant un répresseur putatif de type ci ont été entreprises au cours de ce travail. Tout comme Xavier Bellanger lors de sa thèse portant sur ICESt1 et ICESt3, ces tentatives se sont révélées infructueuses. En effet, malgré l'utilisation de diverses stratégies, les quelques ICE modifiés obtenus présentaient d'autres mutations et/ou un phénotype hétérogène. La délétion d'*arp2* codant le régulateur de type ImmR chez ICESt1 et ICESt3 n'a été initiée que de façon très partielle au cours de ce travail.

Le seul ICE bien caractérisé codant un régulateur de type ci est SXT de *V. cholerae*. Chez cet élément, la délétion du gène *setR* codant le régulateur ci n'est possible que par l'apport de SetR en *trans* à partir d'un plasmide, suggérant un effet délétère pour la cellule (19). Une approche alternative a permis la délétion de ce gène dans un contexte mutant pour les gènes *setC* et *setD*, codant les activateurs transcriptionnels de l'élément et dont la transcription est réprimée par SetR. Chez ICEBs1, la délétion du gène codant le répresseur ImmR entraîne une grande instabilité de l'élément qui est alors perdu à haute fréquence dans la population (7). Il semblerait donc que la délétion de ce type de régulateur puisse également être fortement contre-sélectionnée.

De façon alternative à l'analyse d'un mutant de délétion d'*arp1*, l'obtention d'un mutant Arp1 dépourvu d'activité autoprotéolytique pourrait être envisagée. Cette stratégie pourra impliquer la délétion ou l'inactivation du domaine d'autoprotéolyse ou du site de clivage de la protéine. Le régulateur Arp2 est quant à lui constitué en grande partie d'un domaine de fixation à l'ADN HTH XRE, ainsi que d'une région de fonction inconnue qui pourrait contenir le site cible d'OrfQ. Les données concernant ce type de régulateurs étant insuffisantes, une stratégie alternative à la délétion totale d'*arp2* est difficilement envisageable. Néanmoins, l'étude du régulateur Arp2 pourra se baser sur l'effet de la délétion et/ou de mutations réalisées au sein de sa protéase associée putative OrfQ. Notamment, l'inactivation du domaine protéolytique DUF955 par substitution des acides



aminés signatures de ce domaine catalytique chez OrfQ pourrait être entreprise (31, 32). Cela implique cependant qu'Arp2 soit la cible spécifique d'OrfQ. Finalement, l'effet de ces mutations sur l'activité des éléments pourra être apprécié dans les conditions inductrices définies lors de ce travail.

### **1.2.2 Analyse protéique des régulateurs.**

Afin d'obtenir des informations sur le contrôle de l'activité d'ICEST1 et ICEST3, une analyse des protéines Arp1, Arp2 et OrfQ d'ICEST1 et ICEST3 a été entreprise. La surexpression des protéines Arp1 et Arp2 a permis de les obtenir dans la fraction soluble des échantillons protéiques. A court terme, la purification par FPLC (Fast Protein Liquid Chromatography) de ces protéines sera entreprise afin d'identifier leurs sites de fixation au niveau de l'élément. Cela permettra de déterminer les cibles et les interconnexions qui pourraient avoir lieu entre les deux régulateurs. Leur analyse fournira également des informations sur les interactions entre l'élément et l'hôte en déterminant les sites cibles de fixation de ces protéines au niveau du chromosome.

Dans le but de tester l'activité protéolytique d'OrfQ sur sa cible présumée Arp2, mais également sur Arp1, cette protéine a également été surproduite. Néanmoins, elle n'a jamais été obtenue dans la fraction soluble, malgré les nombreuses conditions testées. L'homologue d'OrfQ chez ICEBs1, la protéase ImmA, est également présente dans la fraction insoluble (31). Les auteurs ont fait l'hypothèse que la surexpression de cette protéine chez *E. coli* serait toxique pour la cellule qui la séquestrerait dans les corps d'inclusion. Ces données suggèrent qu'OrfQ d'ICEST1 et ICEST3 pourraient être des protéases fonctionnelles, même si leur(s) cible(s) restent à déterminer. La purification des corps d'inclusion n'ayant pas été entreprise au cours de ce travail, une stratégie alternative similaire à celle utilisée par Bose *et al* (31) a été utilisée. Elle repose sur la coproduction de la protéase avec le régulateur Arp1 ou Arp2 chez *E. coli* afin de tester l'activité protéolytique d'OrfQ. Elle a montré qu'Arp2 pourrait être clivée par OrfQ alors qu'Arp1 ne le serait pas. Néanmoins, ces résultats préliminaires devront être complétés par des analyses par « Western blotting ».

### **1.3 ORF spécifiques du module de régulation.**

L'analyse des modules de régulation d'ICEST1 et ICEST3 a montré qu'ils portent non seulement les ORF conservées *arp1*, *arp2* et *orfQ*, mais également des ORF variables. La majorité de ces ORF variables codent des protéines de fonction inconnue sans homologues connus à ce jour. Cependant, certaines de ces ORF portent des domaines ou motifs connus comme *orf385A* d'ICEST3 qui code une protéine présentant un domaine de liaison à l'ADN

HTH XRE et pourrait constituer un régulateur, au même titre que les régulateurs de type cl et ImmR respectivement codés par *arp1* et *arp2*.

Au niveau expérimental, l'échange de l'intégralité, d'une partie ou de certaines ORF du module de régulation d'ICESt1 et ICESt3 pourra être réalisée. L'analyse de leur effet sur la dynamique de l'élément apportera des informations sur l'implication de tout ou partie du module de régulation sur la différence d'activité de ces ICE (transcription, excision/intégration, transfert).

#### **1.4 Eléments apparentés à ICESt1 et ICESt3.**

Les analyses bioinformatiques réalisées au cours de ce travail ont révélé de nombreux ICE apparentés de façon proche à ICESt1 et ICESt3 au sein des génomes de Firmicutes. Ces ICE appartiennent à une sous-famille d'éléments qui présentent une organisation similaire de leur région core. Ils portent des modules de conjugaison présentant plus de 80 % d'identité nucléotidique sur toute leur longueur. Ils possèdent également des modules de régulation apparentés partageant en particulier les gènes codant les régulateurs putatifs de types cl et ImmR ainsi qu'une protéase putative de type ImmA. Ces éléments présenteraient des organisations transcriptionnelles similaires de la région core, des séquences régulatrices homologues de celles détectées expérimentalement chez ICESt1 et ICESt3 ayant été mises en évidence lors des analyses de séquences. La force prédite du terminateur du module de régulation de ces ICE est similaire à celle d'ICESt1, ce qui impliquerait une organisation transcriptionnelle en deux opérons distincts du module de régulation. La conservation des ORF codant les régulateurs putatifs ainsi que celle des signaux de transcription suggère fortement une régulation similaire à celle d'ICESt1 et ICESt3 ainsi qu'une induction par la MMC.

Ces éléments peuvent différer par la présence de modules de recombinaison différents, ce qui implique des sites d'intégration différents. Leurs modules de régulation présentent également des différences de 2 à 4 gènes codant des protéines non apparentées dont certaines portent des domaines connus. Les ORF 299 de l'élément de *S. parasanguinis* F0405, 307 de l'élément de *S. australis* ATCC700641 et 39300 d'ICESpn8140 de *S. pneumoniae* pourraient coder une pyridoxamine 5'-phosphate oxydase. Ces enzymes sont connues pour intervenir dans le métabolisme de la vitamine B6 et sont liées à la réponse au stress oxydatif. Enfin, la protéine codée par l'ORF 1944 de l'ICE putatif de *S. parasanguinis* ATCC 15912 pourrait coder un transporteur ABC. A titre expérimental, l'introduction ou l'échange d'ORF spécifiques entre ICE de la sous-famille permettra d'évaluer la spécificité conférée par ces ORF à l'ICE qui les porte. Enfin, ces ICE putatifs possèdent une région variable qui peut s'étendre de l'extrémité du module de régulation jusqu'au site *attL*.

Par ailleurs, cette sous-famille appartient à une famille plus vaste d'éléments identifiés chez les streptocoques lors de ces travaux ainsi que des travaux précédents (118, 40, 288). L'organisation de leur région core est globalement similaire, incluant de gauche à droite un module de régulation, un module de conjugaison et un module de recombinaison, les deux derniers étant très probablement cotranscrits. Leurs modules de conjugaison sont apparentés (identité protéique allant de 30 % à 70 %) et présentent une organisation similaire mais leurs modules de régulation peuvent être très variables, ce qui suggère une régulation différente des ICE de cette famille. Néanmoins, deux de ces éléments partagent une organisation du module de régulation proche de celle des modules de régulation d'*ICESt1* et *ICESt3*, ce qui pourrait impliquer une régulation similaire.

Enfin, des études précédentes avaient déjà montré que ces éléments appartiennent à une superfamille dont la seule ressemblance est un module de conjugaison apparenté de façon lointaine (18 % à 40 % d'identité protéique selon les ORF) (45, 46). Ces éléments, qui incluent *ICEBs1* et les éléments de la famille *Tn916*, présentent une organisation très différente de leur région core. En particulier, les modules de recombinaison et de conjugaison ne sont pas cotranscrits. Néanmoins, le module de recombinaison de *Tn916* est situé en amont du site *attR* et son module de conjugaison en aval du site *attL*. De ce fait, la transcription du module de recombinaison peut s'étendre au module de conjugaison, uniquement chez la forme excisée (57). Chez *ICEBs1*, la transcription de ces deux modules est découplée, le gène codant l'excisionase étant cotranscrit avec les ORF codant la mise en place du pore de conjugaison alors que l'intégrase est cotranscrite avec les gènes de régulation dans le sens opposé (8).

## 2 Activité d'*ICESt1* et *ICESt3*.

Les analyses quantitatives ont montré qu'*ICESt1* est beaucoup moins actif transcriptionnellement qu'*ICESt3* dans toutes les conditions testées et quel que soit le module de la région core. Notamment, les résultats ont révélé que la quantité du transcrit des modules de conjugaison et de recombinaison est au minimum 15 fois moins importante chez *ICESt1* que chez *ICESt3* dans toutes les conditions testées. Dans la plupart des cas, la quantité des transcrits est corrélée à la fréquence d'excision des éléments. Ces différences d'activité pourraient impliquer les différences d'organisation de ces éléments ainsi que les ORF divergentes contenues dans le module de régulation et/ou la région variable.

## 2.1 Régulation transcriptionnelle.

Les dommages à l'ADN et/ou la phase stationnaire ainsi que la densité cellulaire sont connus pour induire l'activité d'éléments codant soit un répresseur de type *ci*, soit un répresseur de type *ImmR*, notamment les ICE *SXT* et *ICEBs1*. *ICESt1* et *ICESt3* répondent également tous les deux à ces stimuli, en particulier les dommages à l'ADN induits par un traitement à la MMC. L'activation transcriptionnelle des modules de conjugaison et de recombinaison est associée à une excision accrue des éléments dans ces conditions. De plus, le transfert d'*ICESt3* est stimulé d'un facteur 25 par les dommages à l'ADN (22).

Les régulateurs de type *ci* et *ImmR* sont connus pour réprimer les éléments qui les portent mais également pour induire leur propre transcription. L'activation d'éléments portant de tels régulateurs est donc associée à une diminution de la quantité de transcrits du module qui les code, et à une augmentation de la quantité des transcrits des modules impliqués dans la mobilité de l'élément. Cependant, chez *ICESt1* et *ICESt3*, l'augmentation de la quantité des transcrits de la région core est globale et concerne également le module de régulation contenant les deux types de régulateurs. Bien que des stimuli similaires soient à l'origine de l'activation de *SXT*, *ICEBs1*, *ICESt1* et *ICESt3*, la régulation d'un élément impliquant les deux systèmes régulateurs semble donc différente. De plus, il n'est pas exclu que, dans ce contexte particulier, *Arp1* et/ou *Arp2* puissent induire non seulement leur expression mais également induire les fonctions de mobilité des ICE de *S. thermophilus*.

L'analyse transcriptionnelle pourra être complétée par la caractérisation de la force des promoteurs d'*ICESt1* et *ICESt3* à l'aide d'un système rapporteur comme la luciférase. Cette étude pourra être réalisée dans différentes conditions de culture mais également dans des contextes impliquant des éléments délétés de certaines ORF du module de régulation.

## 2.2 Régulation post-transcriptionnelle.

Les analyses transcriptionnelles d'*ICESt1* et *ICESt3* ont révélé plusieurs extrémités 5' de l'ARN des modules de conjugaison et de recombinaison, qui ne correspondent pas à l'extrémité du transcrit. Bien que le site de clivage ne soit pas spécifique, les liaisons ciblées sont toutes localisées au sein de la tige d'une structure tige-boucle prédite conservée entre *ICESt1* et *ICESt3*, et chez les ICE de streptocoques de la même sous-famille. Ceci pourrait être dû à un clivage endonucléolytique par la RNase III, enzyme connue pour cliver les ARN au niveau de structures double brin intramoléculaires (225). L'effet biologique d'un tel clivage n'a pas été étudié lors de ce travail. Cependant, il pourrait influencer la stabilité du long transcrit de 14,6 kb généré et donc constituer un mécanisme de régulation post-transcriptionnel de la mise en place du pore de conjugaison et de l'excision de l'ICE. En effet, un certain nombre d'études ont montré l'implication de clivages dans la stabilité de

transcrits et leur implication dans la régulation d'activités biologiques (6, 124). Enfin, bien que la présence de tels clivages et leur implication dans l'activité d'autres ICE n'ait guère été étudiées, l'analyse du transcriptome d'*ICEclc* a révélé la présence de plusieurs extrémités 5' précoces de certains des transcrits de cet élément, par 5'RACE PCR mais aussi par Northern Blot (110).

La fréquence d'excision d'*ICEst1* en présence de MMC est comparable à celle d'*ICEst3* en absence de MMC, conditions dans lesquelles le transfert d'*ICEst3* est observé. Cependant, la fréquence d'excision dans les conditions réelles du transfert sur filtre est en fait inconnue, ces conditions étant différentes de celles testées (milieu liquide) et ne pouvant être connues de façon précise.

L'absence de transfert d'*ICEst1* pourrait être liée à des différences de la protéine OrfE codée par le module de conjugaison. En effet, chez *ICEst1* cette protéine est plus courte de 11 aa que la protéine OrfE d'*ICEst3*, du fait d'un décalage du cadre de lecture à l'extrémité 3' de cette ORF chez *ICEst1*. La comparaison de la séquence de la protéine OrfE d'*ICEst3* avec celle des protéines homologues codées par les ICE de la même sous-famille montrent un fort pourcentage d'identité jusqu'à la fin de la séquence. Ceci suggère que la protéine tronquée d'*ICEst1* pourrait ne pas être fonctionnelle ou présenter une activité modifiée. OrfE est constituée en grande majorité d'un domaine TcpE et appartient à une famille de protéines membranaires impliquées dans le transfert conjugatif d'ICE. Bien que la fonction d'aucune de ces protéines n'ait été démontrée, elle pourrait être importante pour la mise en place du pore de conjugaison. La forme tronquée pourrait ainsi compromettre la mise en place d'un pore de conjugaison pleinement fonctionnel nécessaire au transfert d'*ICEst1*. Cette hypothèse pourrait être testée en remplaçant *orfE* d'*ICEst1* par celui d'*ICEst3*, et réciproquement.

Bien que le transfert d'*ICEst3* n'ait pas été observé dans le milieu riche HJGL, la fréquence d'excision d'*ICEst3* dans ce milieu est identique à celle observée en milieu LM17. Ceci implique une expression identique du module de recombinaison dans ces deux milieux, et donc une expression identique du module de conjugaison présent en amont. Ceci suggère fortement que la présence de certains composés du milieu LM17 induisent ou sont nécessaires au transfert conjugatif d'*ICEst3*, ou que le milieu HJGL réprime ou empêche le transfert de cet ICE.

Globalement, les résultats obtenus impliquent que la fréquence de transfert d'*ICEst1* et *ICEst3* n'est pas directement liée à leur fréquence d'excision. Cette absence de liaison directe avait déjà été remarquée pour *Tn916*, un élément de la même superfamille (57).

### **2.3 Effet de souche au sein de l'espèce d'origine.**

Le transfert d'un ICE vers un nouvel hôte peut avoir une influence sur son activité. Par exemple, le transfert intra-espèce de SXT est bien plus efficace chez *E. coli* que chez *V. cholerae* (74, 208). De même, Tn916 est capable de se transférer d'*Enterococcus faecalis* vers *Lactococcus lactis* où il est alors incapable de s'exciser (37).

Alors qu'ICESt1 n'est pas capable de se transférer de façon intra-espèce dans les conditions testées au laboratoire, le transfert d'ICESt3 vers les souches LMG18311 et CNRZ368 a été obtenu. La caractérisation de la dynamique d'excision de cet élément a montré que, quelle que soit la souche, il est toujours fonctionnel et son excision est stimulée par la phase stationnaire et la MMC. Néanmoins, bien qu'ICESt3 présente toujours une activité globalement supérieure à celle d'ICESt1, elle est réduite chez les souches LMG18311 et CNRZ368 (souche hôte d'origine d'ICESt1) par rapport à sa souche d'origine CNRZ385. Cette étude est la première à avoir mis en évidence un effet négatif de l'hôte d'origine sur l'activité d'un ICE au sein de la même espèce.

ICESt3 se re-transfère à partir de la souche CNRZ368 ICESt3, sans traitement particulier de la souche donatrice. Cependant, l'excision d'ICESt3 dans cette condition est inférieure à celle d'ICESt1 au sein de la souche CNRZ368 traitée à la MMC, condition dans laquelle le transfert d'ICESt1 n'est pas observé. L'absence de transfert d'ICESt1 semble donc inhérente à l'élément et pourrait impliquer la région variable, les ORF spécifiques des modules de régulation et/ou la protéine OrfE du module de conjugaison.

### **2.4 Réplication d'ICESt3.**

Selon la définition originelle, les ICE n'étaient censés se répliquer que lors du transfert conjugatif et être incapables de se répliquer de façon intracellulaire en dehors du transfert (45). Ce travail a montré qu'un traitement endommageant l'ADN provoque une augmentation du nombre de copies extrachromosomiques d'ICESt3 qui est alors présent à environ 10 copies par cellule. Cette réplication intracellulaire est dépendante de la souche hôte, l'élément pouvant se répliquer dans sa souche d'origine CNRZ385 ainsi que dans la souche LMG18311 mais non chez CNRZ368. Cependant, elle ne semble pas nécessaire au transfert de l'élément, ICESt3 pouvant se transférer à partir de la souche CNRZ368. Cette réplication pourrait néanmoins favoriser le transfert et le maintien de l'élément dans la population.

La nécessité d'utiliser la MMC afin d'induire la réplication d'ICESt3 ne rend pas son étude aisée. En effet, son impact sur de nombreux processus physiologiques, dont la

réplication du chromosome, pourrait avoir des effets indésirables, non prévisibles et non reproductibles ce qui rend l'étude de la réplication de cet ICE complexe.

Afin de déterminer le sens et l'origine de cette réplication, des dosages d'ADN ont été effectués pour tester l'existence d'un différentiel de quantité d'ADN de part et d'autre d'une origine de réplication putative. Néanmoins, ceux-ci n'ont révélé aucune différence notable de la quantité d'ADN au niveau de différents loci d'ICESt3, dont deux loci flanquant l'*oriT*. Une stratégie identique à celle utilisée par Lee *et al.* (180) pour ICEBs1 pourrait cependant permettre de localiser l'origine et le sens de réplication d'ICESt3. Cette stratégie implique l'obtention d'un ICE délété de son site *attR* et en conséquence incapable de s'exciser. Lorsque la réplication de l'élément est induite, celle-ci est initiée au niveau de l'origine de réplication (*oriT*) et procède de façon unidirectionnelle. L'élément ne pouvant s'exciser, seule la région située en aval de l'origine de réplication ainsi que les loci chromosomiques adjacents seront répliqués. La quantité d'ADN de l'élément de part et d'autre de l'origine de réplication serait donc différente et cette différence serait quantifiable par qPCR.

### **3 MiniICESt3spec : élément fonctionnel et modèle d'étude de la réplication.**

La construction d'éléments minimaux comme le plasmide MiniF (98), le transposon MiniTn7 (64) et le phage/plasmide MiniMu (316) avaient facilité l'étude de(s) fonction(s) core des éléments d'origine. Cette étude est la première ayant permis l'obtention et la caractérisation d'un MinilCE fonctionnel, élément ne contenant que les fonctions impliquées dans la mobilité intra- et inter-cellulaire de l'élément (régulation, excision, conjugaison et intégration).

L'utilisation des autres vecteurs construits au cours de cette thèse pourrait permettre l'obtention de MiniICESt3ery et MiniICESt3kan mais également des éléments MiniICESt1 porteurs des gènes de résistance à l'érythromycine, la kanamycine ou la spectinomycine. L'utilisation de la même méthode que celle utilisée pour MiniICESt3spec permettra de déterminer si la région variable a un effet négatif sur la réplication et mobilité intra- et inter-cellulaire d'ICESt1, si MiniICESt1 peut s'exciser seul de l'élément composite CIMEVar-MiniICESt1 et se transférer.

### 3.1 Fonctionnalité de la région core d'ICESt3.

L'élément *MiniICESt3spec*, qui ne porte que les séquences de la région core d'ICESt3, peut s'exciser, se transférer et s'intégrer chez *S. thermophilus*. De plus, les fréquences d'excision et de transfert de *MiniICESt3spec* sont semblables à celles d'ICESt3. Cela implique que l'absence de région variable n'a pas d'impact significatif sur ces activités chez ICESt3 et donc que la région core est nécessaire et suffisante. De surcroît, la région core porte également au moins une partie des fonctions assurant la régulation de son excision, laquelle est induite en phase stationnaire et lors d'un traitement à la MMC, tout comme chez ICESt3. Le transfert inter-espèce d'ICESt3 avait été démontré par Bellanger *et al.* (22) et il serait donc intéressant de déterminer si *MiniICESt3spec* est également capable de se transférer vers d'autres espèces.

### 3.2 Régulation de la réplication de la région core.

Cette étude a également montré que *MiniICESt3spec* est capable de se répliquer et que cette réplication reste inductible par la MMC. Ceci implique donc que les fonctions nécessaires à cette réplication et cette induction sont codées par la région core d'ICESt3. Cette réplication accrue serait le résultat de l'augmentation de la production du transcrit codant la relaxase, protéine très probablement à l'origine de la réplication de la région core d'ICESt3.

La réplication *MiniICESt3spec* est cependant constitutive ce qui implique qu'une ou plusieurs séquences portées par la région variable inhibe(nt) cette réplication. L'étude de l'élément composite *CIMEVarcas-MiniICESt3spec* a montré que cette inhibition se fait en *cis*. L'action de la séquence en *cis* pourrait donc impliquer l'une des protéines de fonction inconnue, ou un ARN, codé par la région variable.

Des candidats potentiels à cette inhibition en *cis* auraient pu être une séquence de la région variable commune à ICESt1, ICESt3 et aux autres ICE de la sous-famille. Une séquence de 400 pb de la région variable est identique à 96 % entre les éléments mais elle n'a pas d'homologue dans les autres ICE de la sous-famille, suggérant qu'elle n'est pas impliquée dans l'inhibition de la réplication des ICE de *S. thermophilus*. Les ORF *orf5* d'ICESt1 et *orf385H* d'ICESt3 sont homologues entre elles et avec 3 autres séquences connues, toutes adjacentes à un système RM de type II, suggérant leur implication dans ce système et non dans la régulation de la réplication d'ICESt3. De plus, aucun homologue de ces ORF n'est présent dans les séquences des autres ICE de la sous-famille. Au niveau expérimental, l'impact de la délétion de diverses portions de la région variable permettra de déterminer quelle séquence est impliquée dans l'inhibition de la réplication de la région core.



L'insertion de cette séquence dans *MiniICEST3spec* devrait permettre le retour à un état simple copie intégré de l'élément.

L'inhibition de la réplication de l'ICE pourrait constituer un mécanisme de maintien de l'intégrité du chromosome de l'hôte. En effet, si la réplication extrachromosomique de l'ICE peut ne constituer qu'un surcoût énergétique pour la cellule, l'initiation de la réplication de la forme intégrée pourrait avoir un effet délétère pour la cellule par interférence avec la réplication du chromosome. Cela pourrait également altérer l'expression des loci adjacents au site d'intégration de l'ICE et donc sujets à la réplication qui aura débuté dans la forme intégrée de l'élément (180).

### **3.3 Rôle de la réplication de *MiniICEST3spec* dans son maintien ?**

La stabilité d'*ICEST3* et de *MiniICEST3spec*, malgré une fréquence d'excision élevée, suggère qu'un ou plusieurs mécanismes pourraient réduire la fréquence de perte de l'élément lors des divisions cellulaires, et/ou tuer les cellules qui auraient perdu l'élément. Pour *ICEST3*, un mécanisme possible qui pourrait être impliqué dans le maintien de l'élément est l'action du système RM de type II putatif codé par la région variable de cet élément. La fonctionnalité de ce système RM pourra être testée en estimant l'impact de l'absence de cette région sur la résistance aux phages de souches contenant *ICEST3* ou *MiniICEST3spec*. La délétion de l'endonucléase putative pourra également être entreprise et permettra de déterminer l'implication de ce système RM de type II dans la stabilité de l'élément, de tels systèmes étant connus pour agir comme poison-antipoison (167).

*MiniICEST3spec*, qui est dépourvu de la région variable d'*ICEST3*, est capable d'assurer son maintien dans la population par un autre mécanisme que l'action du système RM. Cette stabilité pourrait donc être conférée par sa réplication constitutive. De façon plus générale, cette propriété pourrait permettre à cet élément de se maintenir sous forme extrachromosomique, même chez un hôte dépourvu de site d'intégration et ainsi se disséminer dans de nouvelles populations. Le maintien de *MiniICEST3spec* après son transfert intra-espèce vers une souche chez qui le site *attB* aura été délété pourra être testé dans un premier temps. Dans un second temps, son transfert vers des espèces dépourvues de site d'intégration pourra être entreprise. Enfin, la dissémination de cet élément dans une population de bactéries de l'écosystème buccal, actuellement en étude au laboratoire, permettra d'évaluer la dynamique de transfert médiée par *MiniICEST3spec* et la comparer à celle d'*ICEST3*.

### 3.4 MiniICESt3spec : modèle d'étude de la réplication des ICE chez *S. thermophilus* ?

MiniICESt3spec constitue un bon modèle et une bonne alternative pour l'étude de la réplication d'ICESt3, l'utilisation de MMC n'étant pas nécessaire. Notamment, la délétion ou la mutation ciblée de l'ORF *orfJ* codant la relaxase putative permettra de mettre en avant son implication centrale dans la réplication de MiniICESt3spec, comme cela a été démontré chez ICEBs1 (180). Alternativement, la surexpression en *trans* ou en *cis* de la relaxase chez une souche de *S. thermophilus* porteuse d'un ICE permettra d'apprécier son impact sur la réplication de l'élément, une réplication accrue étant attendue. Néanmoins, cette expression devra très certainement être couplée à la surexpression de l'intégrase et de l'excisionase afin de stimuler la présence de la forme extrachromosomique de l'élément et qui constitue la forme répliquée de l'ICE. Si la surexpression de l'intégrase et de l'excisionase conduit à la perte d'ICESt1 et ICESt3, leur coexpression avec la relaxase et la réplication attendue de l'élément pourrait contribuer à sa stabilité.

Bien que l'excision de MiniICESt3spec puisse être bistable et induite dans une fraction de la population seulement, il se pourrait que la réplication de l'élément soit constitutive et que toutes les cellules d'une population contiennent plusieurs formes extrachromosomiques. L'analyse de l'expression d'un gène codant une protéine fluorescente porté par MiniICESt3spec permettra de déterminer si l'intensité du signal est homogène entre cellules au sein d'une population et ainsi d'évaluer le caractère bistable de la réplication de MiniICESt3spec. Cette étude pourra être couplée à l'analyse de l'induction de l'activité du promoteur du module de conjugaison et de recombinaison qui permettra de mettre en évidence le caractère bistable ou non de l'activation de MiniICESt3spec.

L'utilisation de MiniICESt3spec comme modèle pourrait cependant poser des problèmes. En effet, sa réplication pourrait constituer une barrière à l'obtention d'éléments mutants qui seraient contre-sélectionnés au niveau du clone (288). Ainsi, sur les multiples copies présentes dans la cellule, une copie mutée pourra être moins performante que les autres pour son maintien et sera perdue lors des divisions cellulaires. L'utilisation d'un milieu où MiniICESt3spec serait présent en copie unique serait intéressant afin d'y effectuer des mutations ciblées de l'élément. La dynamique de MiniICESt3spec a été analysée dans le milieu chimiquement défini (MCD), milieu utilisé pour rendre *S. thermophilus* compétent et dans lequel l'obtention de mutants serait la plus aisée (105, 112). Malheureusement, le dénombrement des copies de l'élément a mis en évidence qu'il était également présent en près de 10 copies.

## 4 ICE et réplication intracellulaire.

### 4.1 Réplication intracellulaire chez les ICE : une caractéristique répandue ?

Les ICE ont été initialement définis comme des éléments conjugatifs dont le maintien était exclusivement dû à l'intégration après transfert (45). Ces éléments n'étaient donc pas censés pouvoir se répliquer de façon intracellulaire en dehors de la réplication associée à la conjugaison, à l'instar des plasmides qui sont définis par leur capacité à se maintenir sous forme extrachromosomique par réplication et ségrégation. Néanmoins, des études menées avant l'initiation de ce travail suggéraient déjà que certains ICE étaient capables de réplication intracellulaire.

L'ICE pSAM2 de *Streptomyces ambofaciens* est présent uniquement sous forme intégrée dans la donatrice et s'excise puis se réplique avant de se transférer sous forme double brin vers la réceptrice (243, 313). La copie nouvellement transférée se réplique ensuite avant de se répandre dans le mycélium de la bactérie réceptrice puis de s'intégrer dans son génome. A la fin du transfert conjugatif, l'ICE ne subsiste que sous une forme intégrée en monocopie. La réplication de l'ICE après son transfert assure l'intégration des multiples copies de l'élément dans les multiples copies du chromosome présentes au sein d'une cellule, ainsi que l'envahissement du mycélium receveur. Cependant, cette caractéristique est liée aux particularités du transfert de cet élément (transfert double brin et absence de réplication intercellulaire) ainsi qu'à la biologie inhabituelle de *Streptomyces* pour une bactérie (présence de plusieurs génomes par cellule) et ne peut donc pas être étendue à des éléments se transférant sous forme simple brin ni à d'autres bactéries.

Par ailleurs, quelques études avaient suggéré une réplication intracellulaire d'autres ICE. Ainsi, des ICE de protéobactéries tels que pKLC102 et ICEHin1056 avaient été initialement décrits comme des plasmides puis des plasmides à intégration site-spécifique (88, 162). Notamment, ICEHin1056 est présent dans certains cas sous une unique forme intégrée et dans d'autres cas sous forme intégrée et de nombreuses copies libres par cellule. De plus, lorsqu'une cellule ne possédant qu'une forme intégrée d'ICEHin1056 est utilisée comme donatrice, les transconjugants obtenus possèdent non seulement la forme intégrée de l'élément mais également de nombreuses formes circulaires (88).

Plus récemment, l'analyse du nombre de copies a révélé un état multicopie de RD2, un ICE de *Streptococcus pyogenes* de la même famille qu'ICESt1 et ICESt3. Cet état est observé uniquement après un traitement à la MMC suggérant un mécanisme de réplication dépendant de l'activation de l'élément (288). Enfin, l'analyse de l'élément ICEBs1, apparenté de façon plus lointaine à ICESt1 et ICESt3, a révélé qu'un élément modifié ICEBs1 $\Delta$ immR, délété du gène codant le répresseur central de cet élément, était instable et perdu dans environ 10% de la population (7). L'élément modifié est néanmoins relativement

stable au sein de la population et les auteurs suggéraient déjà l'implication possible d'une réplication intracellulaire de l'élément pour son maintien dans la population. De plus, un traitement à la MMC laissait apparaître une augmentation significative du nombre de copies d'*ICEBs1* (180).

Cet état à haut nombre de copies n'est donc pas durable, et la présence de multiples formes circulaires de l'ICE semble donc être un événement lié à son activation et son transfert. La présence d'un haut nombre de copies libres de l'ICE pourrait participer à sa stabilité une fois excisé et favoriser son transfert ainsi que l'envahissement d'une population.

#### **4.2 Mécanisme de réplication intracellulaire des ICE.**

Bien que la réplication de quelques ICE ait été suggérée, le mécanisme ainsi que les acteurs moléculaires restaient inconnus. Les premières données concernant les ICE se transférant sous forme simple brin concernaient *ICEMISym<sup>R7A</sup>*. La relaxase est impliquée dans la maintien de cet ICE, ce qui suggérait l'implication d'une réplication par cercle roulant (180).

Une étude récente menée chez *ICEBs1* a démontré que lorsque l'élément est activé par les dommages à l'ADN ou son système de quorum sensing, *ICEBs1* est capable de se répliquer sous forme circulaire par un mécanisme de cercle roulant. La réplication est unidirectionnelle, initiée au niveau de l'origine de transfert *oriT* et requiert la relaxase *Nick* impliquée dans la conjugaison. La stabilité de l'élément implique, en plus de son intégration, sa réplication lorsqu'il est excisé (180).

Dans tous les cas connus, la réplication des ICE se fait par un mécanisme de cercle roulant et est due à l'action du module de mobilisation qui fait intrinsèquement partie du module de conjugaison. La réplication pourrait donc être une caractéristique répandue voire universelle chez les ICE, du fait de l'implication conjointe de la relaxase dans les processus de réplication et de transfert conjugatif. Néanmoins, la détection de cet événement peut s'avérer ardue en raison de la faible activité d'excision et de transfert de certains éléments, qui pourraient de ce fait se répliquer de façon transitoire/ponctuelle.

#### **4.3 Similarités et différences entre les plasmides conjugatifs et les ICE.**

Selon la définition initiale, les seules caractéristiques partagées par les ICE et les plasmides conjugatifs étaient la conjugaison et éventuellement les fonctions avantageuses

pour l'hôte. Néanmoins, les données disponibles actuellement montrent que ces éléments, bien que clairement distincts, peuvent partager certaines caractéristiques.

#### **4.3.1 Réplication.**

Bien que le mécanisme n'ait été étudié que très récemment et uniquement pour *ICEBs1*, de nombreux ICE pourraient se répliquer de façon intracellulaire tout comme les plasmides conjugatifs. Cependant, les mécanismes ainsi que les acteurs moléculaires de cette réplication divergent. En effet, bien que les petits plasmides puissent se répliquer par cercle roulant comme les ICE, les gros plasmides dont les plasmides conjugatifs se répliquent par un mécanisme de réplication thêta, tout comme le chromosome.

La réplication des plasmides conjugatifs, le principal mécanisme de maintien de ces séquences, est contrôlée par un module de réplication. Elle nécessite une séquence appelée origine de réplication qui est spécifiquement reconnue par une protéine d'initiation de la réplication (331). Cette protéine va amorcer la réplication en induisant une ouverture de la structure d'ADN et en recrutant les protéines de l'hôte impliquées dans la réplication de l'ADN. Le transfert conjugatif des plasmides est codé par un module de conjugaison entièrement distinct du module de réplication. L'origine de transfert, qui ne présente pas la moindre ressemblance avec l'origine de réplication, est reconnue par une protéine spécifique, la relaxase, qui induit une coupure simple brin. Au contraire, chez le seul ICE se transférant sous forme simple brin dont la réplication intracellulaire a été étudiée, *ICEBs1*, la relaxase est impliquée non seulement dans le transfert de l'élément mais également dans sa réplication, l'*oriT* jouant le double rôle d'origine de transfert et d'origine de réplication par cercle roulant (180).

Le maintien d'un ICE est assuré essentiellement par son intégration dans un réplicon et son transfert vertical à la descendance sous forme intégrée. La réplication de ces éléments pourrait néanmoins participer à leur stabilité dans la population en évitant qu'ils ne soient perdus quand ils sont excisés (180 ; ce travail).

#### **4.3.2 Ségrégation.**

La répartition des plasmides à haut nombre de copies peut reposer sur un mécanisme aléatoire. Néanmoins, la répartition des copies d'éléments à plus bas nombre de copies, théoriquement plus économe énergétiquement pour la cellule, nécessite la mise en place de systèmes de maintien actifs codés par l'élément tels que les systèmes de partition active ou les systèmes addictifs (78). Le mécanisme de partition active permet la distribution

contrôlée des copies plasmidiques à chaque division cellulaire. Le segregosome, un complexe nucléoprotéique, assure une répartition équilibrée des copies des plasmides lors de la division cellulaire, de manière analogue aux chromosomes lors de la division cellulaire. Dans la plupart des cas, ce mécanisme est codé par un locus plasmidique équivalent au locus *parMRC* du plasmide conjugatif R1 (voir partie 1.2.2.2 de l'introduction).

La réplication et la répartition d'ICE impliquent une forme intégrée et se fait par transfert vertical à la descendance en même temps que le chromosome, une copie extrachromosomique pouvant être perdue lors des divisions cellulaires. Il semblerait cependant que certains ICE partagent non seulement les caractéristiques de réplication des plasmides mais également la partition active. L'ICE PAPI-1 de *Pseudomonas aeruginosa* code un homologue du système de partition active putatif nommé *soj*. La délétion de *soj* conduit à la perte de l'élément à très haute fréquence (246). Bien que le mécanisme d'action ne soit pas connu, son expression est stimulée quand l'élément est excisé suggérant que le système puisse fonctionner dans les circonstances où l'élément est le plus sujet à la perte. Plus généralement, les ICE de protéobactéries de la famille pKLC102-ICE*clc*, comprenant ICE PAPI-1 et ICE*Hin1056*, codent un système de partition active (88, 158, 165, 215). De plus, l'ICE pNOB8 de *Sulfolobus* code des protéines ParA et ParB putatives dont les homologues sont notamment connus comme intervenant dans la partition des plasmides (284, 310).

Par ailleurs, les ICE et les plasmides conjugatifs codent également des systèmes d'addiction impliqués dans leur maintien par sélection au niveau de l'élément (voir partie 3.4.2 de l'introduction).

Globalement, les ICE et les plasmides conjugatifs constituent généralement des entités clairement distinctes, même si elles partagent certaines similitudes. Les ICE se maintiennent essentiellement sous forme intégrée tandis que les plasmides se maintiennent sous forme extrachromosomique. Cependant, certains ICE comme pNOB8 ou pKLC102 sont simultanément présents, à l'état non induit, sous forme intégrée et sous forme de copies excisées multiples (162, 275, 284, 285). De plus, des ICE modifiés génétiquement comme MiniICE*St3spec* correspondant aux séquences de la région core d'ICE*St3*, ou des dérivés de pSAM2 (293), peuvent se maintenir principalement par réplication. Ceci montre que la frontière entre ICE et plasmides conjugatifs n'est pas absolue et peut être franchie.



## RÉFÉRENCES





1. **Albano, M., W. K. Smits, L. T. Y. Ho, B. Kraigher, I. Mandic-Mulec, O. P. Kuipers, and D. Dubnau.** 2005. The Rok protein of *Bacillus subtilis* represses genes for cell surface and extracellular functions. *J. Bacteriol* **187**:2010-2019.
2. **Alsing, A., M. Pedersen, K. Sneppen, and K. Hammer.** 2011. Key players in the genetic switch of bacteriophage TP901-1. *Biophys. J* **100**:313-321.
3. **Althorpe, N. J., P. M. Chilley, A. T. Thomas, W. J. Brammar, and B. M. Wilkins.** 1999. Transient transcriptional activation of the Inc11 plasmid anti-restriction gene (*ardA*) and SOS inhibition gene (*psiB*) early in conjugating recipient bacteria. *Mol. Microbiol.* **31**:133-142.
4. **Ammann, A., H. Neve, A. Geis, and K. J. Heller.** 2008. Plasmid transfer *via* transduction from *Streptococcus thermophilus* to *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol* **190**:3083-3087.
5. **Arnold, D. L., R. W. Jackson, N. R. Waterfield, and J. W. Mansfield.** 2007. Evolution of microbial virulence: the benefits of stress. *Trends Genet* **23**:293-300.
6. **Arraiano, C. M., J. M. Andrade, S. Domingues, I. B. Guinote, M. Malecki, R. G. Matos, R. N. Moreira, V. Pobre, F. P. Reis, M. Saramago, I. J. Silva, and S. C. Viegas.** 2010. The critical role of RNA processing and degradation in the control of gene expression. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**:883-923.
7. **Auchtung, J. M., C. A. Lee, K. L. Garrison, and A. D. Grossman.** 2007. Identification and characterization of the immunity repressor (ImmR) that controls the mobile genetic element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol* **64**:1515-1528.
8. **Auchtung, J. M., C. A. Lee, R. E. Monson, A. P. Lehman, and A. D. Grossman.** 2005. Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **102**:12554-12559.
9. **Audette, G. F., J. Manchak, P. Beatty, W. A. Klimke, and L. S. Frost.** 2007. Entry exclusion in F-like plasmids requires intact TraG in the donor that recognizes its cognate TraS in the recipient. *Microbiology* **153**:442-451.
10. **Ayoubi, P., A. O. Kilic, and M. N. Vijayakumar.** 1991. Tn5253, the pneumococcal omega (*cat tet*) BM6001 element, is a composite structure of two conjugative transposons, Tn5251 and Tn5252. *J. Bacteriol* **173**:1617-1622.
11. **Babic, A., M. B. Berkmen, C. A. Lee, and A. D. Grossman.** 2011. Efficient gene transfer in bacterial cell chains. *MBio* **2**.
12. **Baharoglu, Z., D. Bikard, and D. Mazel.** 2010. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genet* **6**:e1001165.
13. **Bahl, M. I., L. H. Hansen, T. R. Licht, and S. J. Sørensen.** 2007. Conjugative transfer facilitates stable maintenance of IncP-1 plasmid pKJK5 in *Escherichia coli* cells colonizing the gastrointestinal tract of the germfree rat. *Appl. Environ. Microbiol* **73**:341-343.
14. **Bahl, M. I., L. H. Hansen, and S. J. Sørensen.** 2007. Impact of conjugal transfer on the stability of IncP-1 plasmid pKJK5 in bacterial populations. *FEMS Microbiol. Lett* **266**:250-256.
15. **Bahl, M. I., L. H. Hansen, and S. J. Sørensen.** 2009. Persistence mechanisms of conjugative plasmids. *Methods Mol. Biol* **532**:73-102.

16. **Banerjee, A., and I. Biswas.** 2008. Markerless multiple-gene-deletion system for *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol* **74**:2037-2042.
17. **Beaber, J. W., V. Burrus, B. Hochhut, and M. K. Waldor.** 2002. Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cell. Mol. Life Sci* **59**:2065-2070.
18. **Beaber, J. W., B. Hochhut, and M. K. Waldor.** 2002. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol* **184**:4259-4269.
19. **Beaber, J. W., B. Hochhut, and M. K. Waldor.** 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**:72-74.
20. **Bellanger, X., C. Morel, B. Decaris, and G. Guédon.** 2007. Derepression of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus* by DNA damage response: implication of a *ci*-related repressor. *J. Bacteriol* **189**:1478-1481.
21. **Bellanger, X., C. Morel, F. Gonot, A. Puymege, B. Decaris, and G. Guédon.** 2011. Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to *cis* mobilization and gene capture. *Mol Microbiol*.
22. **Bellanger, X., A. P. Roberts, C. Morel, F. Choulet, G. Pavlovic, P. Mullany, B. Decaris, and G. Guédon.** 2009. Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol* **191**:2764-2775.
23. **Belogurov, A. A., E. P. Delver, O. V. Agafonova, N. G. Belogurova, L. Y. Lee, and C. I. Kado.** 2000. Antirestriction protein Ard (Type C) encoded by IncW plasmid pSa has a high similarity to the "protein transport" domain of TraC1 primase of promiscuous plasmid RP4. *J. Mol. Biol* **296**:969-977.
24. **Berkmen, M. B., C. A. Lee, E.-K. Loveday, and A. D. Grossman.** 2010. Polar positioning of a conjugation protein from the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol* **192**:38-45.
25. **Blanc, G., H. Ogata, C. Robert, S. Audic, J.-M. Claverie, and D. Raoult.** 2007. Lateral gene transfer between obligate intracellular bacteria: evidence from the *Rickettsia massiliae* genome. *Genome Res* **17**:1657-1664.
26. **Blatny, J. M., L. Godager, M. Lunde, and I. F. Nes.** 2004. Complete genome sequence of the *Lactococcus lactis* temperate phage phiLC3: comparative analysis of phiLC3 and its relatives in lactococci and streptococci. *Virology* **318**:231-244.
27. **Bolotin, A., B. Quinquis, P. Renault, A. Sorokin, S. D. Ehrlich, S. Kulakauskas, A. Lapidus, E. Goltsman, M. Mazur, G. D. Pusch, M. Fonstein, R. Overbeek, N. Kyprides, B. Purnelle, D. Prozzi, K. Ngui, D. Masuy, F. Hancy, S. Burteau, M. Boutry, J. Delcour, A. Goffeau, and P. Hols.** 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol* **22**:1554-1558.
28. **Böltner, D., C. MacMahon, J. T. Pembroke, P. Strike, and A. M. Osborn.** 2002. R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *J. Bacteriol* **184**:5158-5169.
29. **Bordeleau, E., E. Brouillette, N. Robichaud, and V. Burrus.** 2010. Beyond antibiotic resistance: integrating conjugative elements of the SXT/R391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-di-GMP signalling in *Vibrio cholerae*. *Environ. Microbiol* **12**:510-523.

30. **Borges, F., S. Layec, A. Fernandez, B. Decaris, and N. Leblond-Bourget.** 2006. High genetic variability of the *Streptococcus thermophilus* *cse* central part, a repeat rich region required for full cell segregation activity. *Antonie Van Leeuwenhoek* **90**:245-255.
31. **Bose, B., J. M. Auchtung, C. A. Lee, and A. D. Grossman.** 2008. A conserved anti-repressor controls horizontal gene transfer by proteolysis. *Mol. Microbiol* **70**:570-582.
32. **Bose, B., and A. D. Grossman.** 2011. Regulation of horizontal gene transfer in *Bacillus subtilis* by activation of a conserved site-specific protease. *J. Bacteriol* **193**:22-29.
33. **Bouchard, J. D., and S. Moineau.** 2000. Homologous recombination between a lactococcal bacteriophage and the chromosome of its host strain. *Virology* **270**:65-75.
34. **Bourgoin, F., G. Guédon, M. Pébay, Y. Roussel, C. Panis, and B. Decaris.** 1996. Characterization of a mosaic *ISS1* element and evidence for the recent horizontal transfer of two different types of *ISS1* between *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Gene* **178**:15-23.
35. **Bourgoin, F., A. Pluvinet, B. Gintz, B. Decaris, and G. Guédon.** 1999. Are horizontal transfers involved in the evolution of the *Streptococcus thermophilus* exopolysaccharide synthesis loci? *Gene* **233**:151-161.
36. **Briani, F., G. Dehò, F. Forti, and D. Ghisotti.** 2001. The plasmid status of satellite bacteriophage P4. *Plasmid* **45**:1-17.
37. **Bringel, F., G. L. Van Alstine, and J. R. Scott.** 1991. A host factor absent from *Lactococcus lactis* subspecies *lactis* MG1363 is required for conjugative transposition. *Mol. Microbiol* **5**:2983-2993.
38. **Brochet, M., E. Couvé, P. Glaser, G. Guédon, and S. Payot.** 2008. Integrative conjugative elements and related elements are major contributors to the genome diversity of *Streptococcus agalactiae*. *J. Bacteriol* **190**:6913-6917.
39. **Brochet, M., V. Da Cunha, E. Couvé, C. Rusniok, P. Trieu-Cuot, and P. Glaser.** 2009. Atypical association of DDE transposition with conjugation specifies a new family of mobile elements. *Mol. Microbiol* **71**:948-959.
40. **Brochet, M., C. Rusniok, E. Couvé, S. Dramsi, C. Poyart, P. Trieu-Cuot, F. Kunst, and P. Glaser.** 2008. Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:15961-15966.
41. **Brussow, H.** 2001. Phages of dairy bacteria. *Annu. Rev. Microbiol* **55**:283-303.
42. **Brüssow, H., A. Bruttin, F. Desiere, S. Lucchini, and S. Foley.** 1998. Molecular ecology and evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages--a review. *Virus Genes* **16**:95-109.
43. **Burrus, V., C. Bontemps, B. Decaris, and G. Guédon.** 2001. Characterization of a novel type II restriction-modification system, *Sth368I*, encoded by the integrative element *ICESt1* of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *Appl. Environ. Microbiol* **67**:1522-1528.
44. **Burrus, V., Y. Roussel, B. Decaris, and G. Guédon.** 2000. Characterization of a novel integrative element, *ICESt1*, in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol* **66**:1749-1753.
45. **Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris, and G. Guédon.** 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol* **46**:601-610.

46. **Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris, and G. Guédon.** 2002. The ICESt1 element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. *Plasmid* **48**:77-97.
47. **Burrus, V., and M. K. Waldor.** 2003. Control of SXT integration and excision. *J. Bacteriol* **185**:5045-5054.
48. **Burrus, V., and M. K. Waldor.** 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol* **155**:376-386.
49. **Byrd, D. R., and S. W. Matson.** 1997. Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. *Mol. Microbiol* **25**:1011-1022.
50. **Cain, A. K., and R. M. Hall.** 2011. Transposon Tn5393e carrying the *aphA1*-containing transposon Tn6023 upstream of *strAB* does not confer resistance to streptomycin. *Microb Drug Resist.*
51. **Calcutt, M. J., M. S. Lewis, and K. S. Wise.** 2002. Molecular genetic analysis of ICEF, an integrative conjugal element that is present as a repetitive sequence in the chromosome of *Mycoplasma fermentans* PG18. *J. Bacteriol* **184**:6929-6941.
52. **Cambray, G., A.-M. Guerout,, and D. Mazel.** 2010. Integrons. *Annu. Rev. Genet.* **44**:141-166.
53. **Caparon, M. G., and J. R. Scott.** 1989. Excision and insertion of the conjugative transposon Tn916 involves a novel recombination mechanism. *Cell* **59**:1027-1034.
54. **Carter, M. Q., J. Chen, and S. Lory.** 2010. The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred *via* a novel type IV pilus. *J. Bacteriol* **192**:3249-3258.
55. **Cavenagh, M. M., and R. V. Miller.** 1986. Specialized transduction of *Pseudomonas aeruginosa* PAO by bacteriophage D3. *J. Bacteriol* **165**:448-452.
56. **Ceccarelli, D., A. Daccord, M. René, and V. Burrus.** 2008. Identification of the origin of transfer (*oriT*) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. *J. Bacteriol* **190**:5328-5338.
57. **Celli, J., and P. Trieu-Cuot.** 1998. Circularization of Tn916 is required for expression of the transposon-encoded transfer functions: characterization of long tetracycline-inducible transcripts reading through the attachment site. *Mol. Microbiol* **28**:103-117.
58. **Chase, J. W., and K. R. Williams.** 1986. Single-stranded DNA binding proteins required for DNA replication. *Annu. Rev. Biochem* **55**:103-136.
59. **Chattoraj, P., A. Banerjee, S. Biswas, and I. Biswas.** 2010. ClpP of *Streptococcus mutans* differentially regulates expression of genomic islands, mutacin production, and antibiotic tolerance. *J. Bacteriol* **192**:1312-1323.
60. **Chen, L., K. Brügger, M. Skovgaard, P. Redder, Q. She, E. Torarinsson, B. Greve, M. Awayez, A. Zibat, H.-P. Klenk, and R. A. Garrett.** 2005. The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the Crenarchaeota. *J. Bacteriol* **187**:4992-4999.
61. **Chen, W.-Y., J. W. Ho, J.-D. Huang, and R. M. Watt.** 2011. Functional characterization of an alkaline exonuclease and single strand annealing protein from the SXT genetic element of *Vibrio cholerae*. *BMC Mol. Biol* **12**:16.
62. **Cheng, Q., Y. Sutanto, N. B. Shoemaker, J. F. Gardner, and A. A. Salyers.** 2001. Identification of genes required for excision of CTnDOT, a *Bacteroides* conjugative transposon. *Mol. Microbiol* **41**:625-632.

63. **Chilley, P. M., and B. M. Wilkins.** 1995. Distribution of the *ardA* family of antirestriction genes on conjugative plasmids. *Microbiology* **141** ( Pt 9):2157-2164.
64. **Choi, K.-H., and H. P. Schweizer.** 2006. mini-Tn7 insertion in bacteria with single *attTn7* sites: example *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Protoc* **1**:153-161.
65. **Choulet, F., T. Wicker, C. Rustenholz, E. Paux, J. Salse, P. Leroy, S. Schlub, M.-C. Le Paslier, G. Magdelenat, C. Gonthier, A. Couloux, H. Budak, J. Breen, M. Pumphrey, S. Liu, X. Kong, J. Jia, M. Gut, D. Brunel, J. A. Anderson, B. S. Gill, R. Appels, B. Keller, and C. Feuillet.** 2010. Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces. *Plant Cell* **22**:1686-1701.
66. **Christen, M., B. Christen, M. G. Allan, M. Folcher, P. Jenö, S. Grzesiek, and U. Jenal.** 2007. DgrA is a member of a new family of cyclic diguanosine monophosphate receptors and controls flagellar motor function in *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **104**:4112-4117.
67. **Christie, P. J., and E. Cascales.** 2005. Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems. *Mol. Membr. Biol* **22**:51-61.
68. **Claverys, J.-P., and L. S. Håvarstein.** 2007. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat. Rev. Microbiol* **5**:219-229.
69. **Claverys, J.-P., B. Martin, and P. Polard.** 2009. The genetic transformation machinery: composition, localization, and mechanism. *FEMS Microbiol. Rev* **33**:643-656.
70. **Clewell, D. B., D. D. Jaworski, S. E. Flannagan, L. A. Zitzow, and Y. A. Su.** 1995. The conjugative transposon Tn916 of *Enterococcus faecalis*: structural analysis and some key factors involved in movement. *Dev. Biol. Stand* **85**:11-17.
71. **Cohn, M. T., P. Kjelgaard, D. Frees, J. R. Penadés, and H. Ingmer.** 2011. Clp-dependent proteolysis of the LexA N-terminal domain in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* **157**:677-684.
72. **Croucher, N. J., S. R. Harris, C. Fraser, M. A. Quail, J. Burton, M. van der Linden, L. McGee, A. von Gottberg, J. H. Song, K. S. Ko, B. Pichon, S. Baker, C. M. Parry, L. M. Lambertsen, D. Shahinas, D. R. Pillai, T. J. Mitchell, G. Dougan, A. Tomasz, K. P. Klugman, J. Parkhill, W. P. Hanage, and S. D. Bentley.** 2011. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* **331**:430-434.
73. **Crozat, E., and I. Grainge.** 2010. FtsK DNA translocase: the fast motor that knows where it's going. *Chembiochem* **11**:2232-2243.
74. **Daccord, A., D. Ceccarelli, and V. Burrus.** 2010. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands. *Mol. Microbiol* **78**:576-588.
75. **Davis, B. M., K. E. Moyer, E. F. Boyd, and M. K. Waldor.** 2000. CTX prophages in classical biotype *Vibrio cholerae*: functional phage genes but dysfunctional phage genomes. *J. Bacteriol* **182**:6992-6998.
76. **De Boever, E. H., D. B. Clewell, and C. M. Fraser.** 2000. *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pAM373: complete nucleotide sequence and genetic analyses of sex pheromone response. *Mol. Microbiol* **37**:1327-1341.
77. **de la Cruz, F., L. S. Frost, R. J. Meyer, and E. L. Zechner.** 2010. Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev* **34**:18-40.
78. **de la Cueva-Méndez, G., and B. Pimentel.** 2007. Gene and cell survival: lessons from prokaryotic plasmid R1. *EMBO Rep* **8**:458-464.

79. **de Lencastre, H., D. Oliveira, and A. Tomasz.** 2007. Antibiotic resistant *Staphylococcus aureus*: a paradigm of adaptive power. *Curr. Opin. Microbiol* **10**:428-435.
80. **de Paz, H. D., D. Larrea, S. Zunzunegui, C. Dehio, F. de la Cruz, and M. Llosa.** 2010. Functional dissection of the conjugative coupling protein TrwB. *J. Bacteriol* **192**:2655-2669.
81. **Deep, A., U. Chaudhary, and V. Gupta.** 2011. Quorum sensing and bacterial pathogenicity: from molecules to disease. *J Lab Physicians* **3**:4-11.
82. **del Solar, G., R. Giraldo, M. J. Ruiz-Echevarría, M. Espinosa, and R. Díaz-Orejas.** 1998. Replication and control of circular bacterial plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:434-464.
83. **Deltcheva, E., K. Chylinski, C. M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z. A. Pirzada, M. R. Eckert, J. Vogel, and E. Charpentier.** 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* **471**:602-607.
84. **Desiere, F., W. M. McShan, D. van Sinderen, J. J. Ferretti, and H. Brüssow.** 2001. Comparative genomics reveals close genetic relationships between phages from dairy bacteria and pathogenic *Streptococci*: evolutionary implications for prophage-host interactions. *Virology* **288**:325-341.
85. **Desiere, F., S. Lucchini, C. Canchaya, M. Ventura, and H. Brüssow.** 2002. Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**:73-91.
86. **Deveau, H., J. E. Garneau, and S. Moineau.** 2010. CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* **64**:475-493.
87. **Diago-Navarro, E., A. M. Hernandez-Arriaga, J. López-Villarejo, A. J. Muñoz-Gómez, M. B. Kamphuis, R. Boelens, M. Lemonnier, and R. Díaz-Orejas.** 2010. *parD* toxin-antitoxin system of plasmid R1--basic contributions, biotechnological applications and relationships with closely-related toxin-antitoxin systems. *FEBS J* **277**:3097-3117.
88. **Dimopoulou, I. D., J. E. Russell, Z. Mohd-Zain, R. Herbert, and D. W. Crook.** 2002. Site-specific recombination with the chromosomal *tRNA(Leu)* gene by the large conjugative Haemophilus resistance plasmid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:1602-1603.
89. **Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, and J. Hacker.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol* **2**:414-424.
90. **Dodd, I. B., K. E. Shearwin, and J. B. Egan.** 2005. Revisited gene regulation in bacteriophage lambda. *Curr. Opin. Genet. Dev* **15**:145-152.
91. **Dorman, C. J.** 2007. H-NS, the genome sentinel. *Nat. Rev. Microbiol* **5**:157-161.
92. **Dorman, C. J.** 2009. Nucleoid-associated proteins and bacterial physiology. *Adv. Appl. Microbiol* **67**:47-64.
93. **Douard, G., K. Praud, A. Cloeckert, and B. Doublet.** 2010. The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized in trans by the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *PLoS ONE* **5**:e15302.
94. **Duary, R. K., V. K. Batish, and S. Grover.** 2010. Expression of the *atpD* gene in probiotic *Lactobacillus plantarum* strains under *in vitro* acidic conditions using RT-qPCR. *Res. Microbiol* **161**:399-405.
95. **Dubey, G. P., and S. Ben-Yehuda.** 2011. Intercellular nanotubes mediate bacterial communication. *Cell* **144**:590-600.
96. **Dunlap, P. V.** 1999. Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol* **1**:5-12.

97. **Dziewit, L., M. Jazurek, L. Drewniak, J. Baj, and D. Bartosik.** 2007. The SXT conjugative element and linear prophage N15 encode toxin-antitoxin-stabilizing systems homologous to the *tad-ata* module of the *Paracoccus aminophilus* plasmid pAM12. *J. Bacteriol* **189**:1983-1997.
98. **Ely, S., and W. L. Staudenbauer.** 1981. Regulation of plasmid DNA synthesis: isolation and characterization of copy number mutants of miniR6-5 and miniF plasmids. *Mol. Gen. Genet.* **181**:29-35.
99. **Erauso, G., K. M. Stedman, H. J. G. van de Werken, W. Zillig, and J. van der Oost.** 2006. Two novel conjugative plasmids from a single strain of *Sulfolobus*. *Microbiology* **152**:1951-1968.
100. **Esposito, D., and G. F. Gerard.** 2003. The *Escherichia coli* Fis protein stimulates bacteriophage lambda integrative recombination in vitro. *J. Bacteriol* **185**:3076-3080.
101. **Fang, G., E. Rocha, and A. Danchin.** 2005. How essential are nonessential genes? *Mol. Biol. Evol* **22**:2147-2156.
102. **Flemming, C. W.** 1945. Treatment of burns: a plea for simplicity. *Br Med J* **2**:314-316.
103. **Flynn, J. M., S. B. Neher, Y. I. Kim, R. T. Sauer, and T. A. Baker.** 2003. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Mol. Cell* **11**:671-683.
104. **Fontaine, L., C. Boutry, M. H. de Frahan, B. Delplace, C. Fremaux, P. Horvath, P. Boyaval, and P. Hols.** 2010. A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J. Bacteriol* **192**:1444-1454.
105. **Fontaine, L., D. Dandoy, C. Boutry, B. Delplace, M. H. de Frahan, C. Fremaux, P. Horvath, P. Boyaval, and P. Hols.** 2010. Development of a versatile procedure based on natural transformation for marker-free targeted genetic modification in *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol* **76**:7870-7877.
106. **Frees, D., K. Savijoki, P. Varmanen, and H. Ingmer.** 2007. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol* **63**:1285-1295.
107. **Frost, L. S.** 1992. Bacterial conjugation: everybody's doin' it. *Can. J. Microbiol.* **38**:1091-1096.
108. **Furushita, M., H. Akagi, A. Kaneoka, K. Awamura, T. Maeda, M. Ohta, and T. Shiba.** 2011. Structural variation of Tn10 that carries *tetB* found in fish farm bacteria. *Microbes Environ* **26**:84-87.
109. **Gaillard, M., N. Pernet, C. Vogne, O. Hagenbüchle, and J. R. van der Meer.** 2008. Host and invader impact of transfer of the *clc* genomic island into *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **105**:7058-7063.
110. **Gaillard, M., N. Pradervand, M. Minoia, V. Sentchilo, D. R. Johnson, and J. R. van der Meer.** 2010. Transcriptome analysis of the mobile genome ICE*clc* in *Pseudomonas knackmussii* B13. *BMC Microbiol* **10**:153.
111. **Gamas, P., L. Caro, D. Galas, and M. Chandler.** 1987. Expression of F transfer functions depends on the *Escherichia coli* integration host factor. *Mol. Gen. Genet* **207**:302-305.
112. **Gardan, R., C. Besset, A. Guillot, C. Gitton, and V. Monnet.** 2009. The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J. Bacteriol* **191**:4647-4655.



113. **Garneau, J. E., M.-È. Dupuis, M. Villion, D. A. Romero, R. Barrangou, P. Boyaval, C. Fremaux, P. Horvath, A. H. Magadán, and S. Moineau.** 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* **468**:67-71.
114. **Garnier, F., S. Taourit, P. Glaser, P. Courvalin, and M. Galimand.** 2000. Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiology* **146 ( Pt 6)**:1481-1489.
115. **Garriss, G., M. K. Waldor, and V. Burrus.** 2009. Mobile antibiotic resistance encoding elements promote their own diversity. *PLoS Genet* **5**:e1000775.
116. **Garriss, G., M. K. Waldor, and V. Burrus.** 2009. Mobile antibiotic resistance encoding elements promote their own diversity. *PLoS Genet* **5**:e1000775.
117. **Grandoso, G., P. Avila, A. Cayón, M. A. Hernando, M. Llosa, and F. de la Cruz.** 2000. Two active-site tyrosyl residues of protein TrwC act sequentially at the origin of transfer during plasmid R388 conjugation. *J. Mol. Biol.* **295**:1163-1172.
118. **Green, N. M., S. Zhang, S. F. Porcella, M. J. Nagiec, K. D. Barbian, S. B. Beres, R. B. LeFebvre, and J. M. Musser.** 2005. Genome sequence of a serotype M28 strain of Group A *Streptococcus*: potential new insights into puerperal sepsis and bacterial disease specificity. *J. Infect. Dis* **192**:760-770.
119. **Greub, G., F. Collyn, L. Guy, and C.-A. Roten.** 2004. A genomic island present along the bacterial chromosome of the *Parachlamydiaceae* UWE25, an obligate amoebal endosymbiont, encodes a potentially functional F-like conjugative DNA transfer system. *BMC Microbiol* **4**:48.
120. **Greve, B., S. Jensen, K. Brügger, W. Zillig, and R. A. Garrett.** 2004. Genomic comparison of archaeal conjugative plasmids from *Sulfolobus*. *Archaea* **1**:231-239.
121. **Grindley, N. D. F., K. L. Whiteson, and P. A. Rice.** 2006. Mechanisms of site-specific recombination. *Annu. Rev. Biochem* **75**:567-605.
122. **Grohmann, E., G. Muth, and M. Espinosa.** 2003. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **67**:277-301, table of contents.
123. **Groth, A. C., and M. P. Calos.** 2004. Phage integrases: biology and applications. *J. Mol. Biol* **335**:667-678.
124. **Grunberg-Manago, M.** 1999. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. *Annu. Rev. Genet.* **33**:193-227.
125. **Guédon, G., F. Bourgoïn, M. Pébay, Y. Roussel, C. Colmin, J. M. Simonet, and B. Decaris.** 1995. Characterization and distribution of two insertion sequences, IS1191 and iso-IS981, in *Streptococcus thermophilus*: does intergeneric transfer of insertion sequences occur in lactic acid bacteria co-cultures? *Mol. Microbiol* **16**:69-78.
126. **Guglielmini, J., L. Quintais, M. P. Garcillán-Barcia, F. de la Cruz, and E. P. C. Rocha.** 2011. The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet* **7**:e1002222.
127. **Haas, D., J. Watson, R. Krieg, and T. Leisinger.** 1981. Isolation of an Hfr donor of *Pseudomonas aeruginosa* PAO by insertion of the plasmid RP1 into the tryptophan synthase gene. *Mol. Gen. Genet* **182**:240-244.
128. **Hacker, J., and E. Carniel.** 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* **2**:376-381.
129. **Hacker, J., and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol* **54**:641-679.

130. **Hagège, J., J. L. Pernodet, A. Friedmann, and M. Guérineau.** 1993. Mode and origin of replication of pSAM2, a conjugative integrating element of *Streptomyces ambofaciens*. *Mol. Microbiol* **10**:799-812.
131. **Hagège, J., J. L. Pernodet, G. Sezonov, C. Gerbaud, A. Friedmann, and M. Guérineau.** 1993. Transfer functions of the conjugative integrating element pSAM2 from *Streptomyces ambofaciens*: characterization of a *kil-kor* system associated with transfer. *J. Bacteriol* **175**:5529-5538.
132. **Hale, C., K. Kleppe, R. M. Terns, and M. P. Terns.** 2008. Prokaryotic silencing (psi)RNAs in *Pyrococcus furiosus*. *RNA* **14**:2572-2579.
133. **Hamilton, H. L., and J. P. Dillard.** 2006. Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol. Microbiol* **59**:376-385.
134. **Hansen, E. B., and M. B. Yarmolinsky.** 1986. Host participation in plasmid maintenance: dependence upon *dnaA* of replicons derived from P1 and F. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **83**:4423-4427.
135. **Hanssen, A.-M., and J. U. Ericson Sollid.** 2006. SCCmec in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol. Med. Microbiol* **46**:8-20.
136. **Hassan, F., M. Kamruzzaman, J. J. Mekalanos, and S. M. Faruque.** 2010. Satellite phage TLC $\phi$  enables toxigenic conversion by CTX phage through *dif* site alteration. *Nature* **467**:982-985.
137. **Hayes, C. S., S. K. Aoki, and D. A. Low.** 2010. Bacterial contact-dependent delivery systems. *Annu. Rev. Genet* **44**:71-90.
138. **Hayes, F., and D. Barillà.** 2006. Assembling the bacterial segrosome. *Trends Biochem. Sci.* **31**:247-250.
139. **He, J., R. L. Baldini, E. Déziel, M. Saucier, Q. Zhang, N. T. Liberati, D. Lee, J. Urbach, H. M. Goodman, and L. G. Rahme.** 2004. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**:2530-2535.
140. **Heather, Z., M. T. G. Holden, K. F. Steward, J. Parkhill, L. Song, G. L. Challis, C. Robinson, N. Davis-Poynter, and A. S. Waller.** 2008. A novel streptococcal integrative conjugative element involved in iron acquisition. *Mol. Microbiol* **70**:1274-1292.
141. **Helmann, J. D.** 1995. Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* sigma A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Res.* **23**:2351-2360.
142. **Henriquez, V., V. Milisavljevic, J. D. Kahn, and M. L. Gennaro.** 1993. Sequence and structure of *cmp*, the replication enhancer of the *Staphylococcus aureus* plasmid pT181. *Gene* **134**:93-98.
143. **Hentschel, U., and J. Hacker.** 2001. Pathogenicity islands: the tip of the iceberg. *Microbes Infect* **3**:545-548.
144. **Hochhut, B., J. W. Beaber, R. Woodgate, and M. K. Waldor.** 2001. Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative chromosomally integrating elements that share an attachment site. *J. Bacteriol* **183**:1124-1132.
145. **Hochhut, B., J. Marrero, and M. K. Waldor.** 2000. Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol* **182**:2043-2047.
146. **Hols, P., F. Hancy, L. Fontaine, B. Grossiord, D. Prozzi, N. Leblond-Bourget, B. Decaris, A. Bolotin, C. Delorme, S. Dusko Ehrlich, E. Guédon, V. Monnet, P.**

- Renault, and M. Kleerebezem.** 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol. Rev* **29**:435-463.
147. **Howard, J. L., S. Delmas, I. Ivancic-Bace, and E. L. Bolt.** 2011. Helicase dissociation and annealing of RNA-DNA hybrids by *Escherichia coli* Cas3 protein. *Biochem J.*
148. **Ishikawa, K., M. Watanabe, T. Kuroita, I. Uchiyama, J. M. Bujnicki, B. Kawakami, M. Tanokura, and I. Kobayashi.** 2005. Discovery of a novel restriction endonuclease by genome comparison and application of a wheat-germ-based cell-free translation assay: PabI (5'-GTA/C) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Nucleic Acids Res* **33**:e112.
149. **Iyer, L. M., K. S. Makarova, E. V. Koonin, and L. Aravind.** 2004. Comparative genomics of the FtsK-HerA superfamily of pumping ATPases: implications for the origins of chromosome segregation, cell division and viral capsid packaging. *Nucleic Acids Res* **32**:5260-5279.
150. **Janzen, T., J. Kleinschmidt, H. Neve, and A. Geis.** 1992. Sequencing and characterization of pST1, a cryptic plasmid from *Streptococcus thermophilus*. *FEMS Microbiol. Lett* **74**:175-180.
151. **Jaworski, D. D., and D. B. Clewell.** 1995. A functional origin of transfer (*oriT*) on the conjugative transposon Tn916. *J. Bacteriol* **177**:6644-6651.
152. **Jean, S.-S., and P.-R. Hsueh.** 2011. Antimicrobial drug resistance in Taiwan. *J. Formos. Med. Assoc* **110**:4-13.
153. **Jenal, U., and J. Malone.** 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet* **40**:385-407.
154. **Jeters, R. T., G.-R. Wang, K. Moon, N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 2009. Tetracycline-associated transcriptional regulation of transfer genes of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J. Bacteriol* **191**:6374-6382.
155. **Johnson, G. R., R. K. Jain, and J. C. Spain.** 2002. Origins of the 2,4-dinitrotoluene pathway. *J. Bacteriol* **184**:4219-4232.
156. **Johnson, J. E., and W. Chiu.** 2007. DNA packaging and delivery machines in tailed bacteriophages. *Curr. Opin. Struct. Biol* **17**:237-243.
157. **Juhas, M., D. W. Crook, and D. W. Hood.** 2008. Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell. Microbiol* **10**:2377-2386.
158. **Juhas, M., P. M. Power, R. M. Harding, D. J. P. Ferguson, I. D. Dimopoulou, A. R. e Elamin, Z. Mohd-Zain, D. W. Hood, R. Adegbola, A. Erwin, A. Smith, R. S. Munson, A. Harrison, L. Mansfield, S. Bentley, and D. W. Crook.** 2007. Sequence and functional analyses of *Haemophilus* spp. genomic islands. *Genome Biol* **8**:R237.
159. **Kaneko, T., Y. Nakamura, S. Sato, E. Asamizu, T. Kato, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, A. Ishikawa, K. Kawashima, T. Kimura, Y. Kishida, C. Kiyokawa, M. Kohara, M. Matsumoto, A. Matsuno, Y. Mochizuki, S. Nakayama, N. Nakazaki, S. Shimpo, M. Sugimoto, C. Takeuchi, M. Yamada, and S. Tabata.** 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res* **7**:331-338.
160. **Kers, J. A., K. D. Cameron, M. V. Joshi, R. A. Bukhalid, J. E. Morello, M. J. Wach, D. M. Gibson, and R. Loria.** 2005. A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol. Microbiol* **55**:1025-1033.
161. **Khan, S. A.** 1997. Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:442-455.

162. **Kiewitz, C., K. Larbig, J. Klockgether, C. Weinel, and B. Tümmler.** 2000. Monitoring genome evolution ex vivo: reversible chromosomal integration of a 106 kb plasmid at two *tRNA(Lys)* gene loci in sequential *Pseudomonas aeruginosa* airway isolates. *Microbiology* **146 ( Pt 10)**:2365-2373.
163. **Kikuchi, Y., and H. A. Nash.** 1979. Nicking-closing activity associated with bacteriophage lambda int gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **76**:3760-3764.
164. **Kinashi, H.** 2011. Giant linear plasmids in *Streptomyces*: a treasure trove of antibiotic biosynthetic clusters. *J. Antibiot* **64**:19-25.
165. **Klockgether, J., O. Reva, K. Larbig, and B. Tümmler.** 2004. Sequence Analysis of the Mobile Genome Island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *J Bacteriol* **186**:518-534.
166. **Klockgether, J., D. Würdemann, O. Reva, L. Wiehlmann, and B. Tümmler.** 2007. Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol* **189**:2443-2459.
167. **Kobayashi, I.** 2001. Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res* **29**:3742-3756.
168. **Koonin, E. V., and K. S. Makarova.** 2009. CRISPR-Cas: an adaptive immunity system in prokaryotes. *F1000 Biol Rep* **1**:95.
169. **Korona, R., B. Korona, and B. R. Levin.** 1993. Sensitivity of naturally occurring coliphages to type I and type II restriction and modification. *J. Gen. Microbiol* **139 Pt 6**:1283-1290.
170. **Kozlova, E. V., B. K. Khajanchi, J. Sha, and A. K. Chopra.** 2011. Quorum sensing and c-di-GMP-dependent alterations in gene transcripts and virulence-associated phenotypes in a clinical isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Microb. Pathog* **50**:213-223.
171. **Krejci, L., L. Chen, S. Van Komen, P. Sung, and A. Tomkinson.** 2003. Mending the break: two DNA double-strand break repair machines in eukaryotes. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol* **74**:159-201.
172. **Krüger, D. H., and T. A. Bickle.** 1983. Bacteriophage survival: multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. *Microbiol. Rev* **47**:345-360.
173. **Kung, V. L., E. A. Ozer, and A. R. Hauser.** 2010. The accessory genome of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **74**:621-641.
174. **Lacks, S. A., B. M. Mannarelli, S. S. Springhorn, and B. Greenberg.** 1986. Genetic basis of the complementary DpnI and DpnII restriction systems of *S. pneumoniae*: an intercellular cassette mechanism. *Cell* **46**:993-1000.
175. **Lang, A. S., and J. T. Beatty.** 2002. A bacterial signal transduction system controls genetic exchange and motility. *J. Bacteriol* **184**:913-918.
176. **Lang, A. S., and J. T. Beatty.** 2007. Importance of widespread gene transfer agent genes in alpha-proteobacteria. *Trends Microbiol* **15**:54-62.
177. **Lawrence, J. G., and J. R. Roth.** 1996. Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters. *Genetics* **143**:1843-1860.
178. **Lederberg, J.** 1998. Plasmid (1952-1997). *Plasmid* **39**:1-9.
179. **Lee, C. A., J. M. Auchtung, R. E. Monson, and A. D. Grossman.** 2007. Identification and characterization of *int* (integrase), *xis* (excisionase) and chromosomal attachment sites of the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol* **66**:1356-1369.

180. **Lee, C. A., A. Babic, and A. D. Grossman.** 2010. Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. *Mol. Microbiol* **75**:268-279.
181. **Lee, C. A., and A. D. Grossman.** 2007. Identification of the origin of transfer (*oriT*) and DNA relaxase required for conjugation of the integrative and conjugative element *ICEBs1* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol* **189**:7254-7261.
182. **Leung, M. M., S. M. Florizone, T. A. Taylor, A. S. Lang, and J. T. Beatty.** 2010. The gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus*. *Adv. Exp. Med. Biol* **675**:253-264.
183. **Li, H., L.-S. Zhou, Y.-F. Wang, E. M. Top, Y. Zhang, and H. Xu.** 2011. Degradative mobile genetic elements (MGEs) and their potential use in MGE-mediated biodegradation. *Ying Yong Sheng Tai Xue Bao* **22**:526-536.
184. **Li, J., S. G. Wolf, M. Elbaum, and T. Tzfira.** 2005. Exploring cargo transport mechanics in the type IV secretion systems. *Trends Microbiol* **13**:295-298.
185. **Li, L. Y., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 1995. Location and characteristics of the transfer region of a *Bacteroides* conjugative transposon and regulation of transfer genes. *J. Bacteriol* **177**:4992-4999.
186. **Lili, L. N., N. F. Britton, and E. J. Feil.** 2007. The persistence of parasitic plasmids. *Genetics* **177**:399-405.
187. **Lin, T.-L., C.-Z. Lee, P.-F. Hsieh, S.-F. Tsai, and J.-T. Wang.** 2008. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J. Bacteriol* **190**:515-526.
188. **Liu, M., R. J. Siezen, and A. Nauta.** 2009. *In silico* prediction of horizontal gene transfer events in *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* reveals protooperation in yogurt manufacturing. *Appl. Environ. Microbiol* **75**:4120-4129.
189. **Llosa, M., F. X. Gomis-Rüth, M. Coll, and F. de la Cruz Fd.** 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol* **45**:1-8.
190. **Lorenz, M. G., and W. Wackernagel.** 1994. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol. Rev* **58**:563-602.
191. **Lucas, M., B. González-Pérez, M. Cabezas, G. Moncalian, G. Rivas, and F. de la Cruz.** 2010. Relaxase DNA binding and cleavage are two distinguishable steps in conjugative DNA processing that involve different sequence elements of the *nic* site. *J. Biol. Chem* **285**:8918-8926.
192. **Madsen, P. L., A. H. Johansen, K. Hammer, and L. Brøndsted.** 1999. The genetic switch regulating activity of early promoters of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J. Bacteriol* **181**:7430-7438.
193. **Maguin, E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, and A. Gruss.** 1992. New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol* **174**:5633-5638.
194. **Maguin, E., H. Prévost, S. D. Ehrlich, and A. Gruss.** 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* **178**:931-935.
195. **Mahillon, J., and M. Chandler.** 1998. Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **62**:725-774.
196. **Mahillon, J., C. Léonard, and M. Chandler.** 1999. IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res. Microbiol* **150**:675-687.
197. **Majewski, J., P. Zawadzki, P. Pickerill, F. M. Cohan, and C. G. Dowson.** 2000. Barriers to genetic exchange between bacterial species: *Streptococcus pneumoniae* transformation. *J. Bacteriol* **182**:1016-1023.

198. **Makarova, K. S., Y. I. Wolf, J. van der Oost, and E. V. Koonin.** 2009. Prokaryotic homologs of Argonaute proteins are predicted to function as key components of a novel system of defense against mobile genetic elements. *Biol. Direct* **4**:29.
199. **Malanowska, K., A. A. Salyers, and J. F. Gardner.** 2006. Characterization of a conjugative transposon integrase, IntDOT. *Mol. Microbiol.* **60**:1228-1240.
200. **Manson, J. M., and M. S. Gilmore.** 2006. Pathogenicity island integrase cross-talk: a potential new tool for virulence modulation. *Mol. Microbiol.* **61**:555-559.
201. **Marenda, M., V. Barbe, G. Gourgues, S. Mangenot, E. Sagne, and C. Citti.** 2006. A new integrative conjugative element occurs in *Mycoplasma agalactiae* as chromosomal and free circular forms. *J. Bacteriol.* **188**:4137-4141.
202. **Marraffini, L. A., and E. J. Sontheimer.** 2010. CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. *Nat. Rev. Genet.* **11**:181-190.
203. **Marrero, J., and M. K. Waldor.** 2007. Determinants of entry exclusion within Eex and TraG are cytoplasmic. *J. Bacteriol.* **189**:6469-6473.
204. **Marrero, J., and M. K. Waldor.** 2007. The SXT/R391 family of integrative conjugative elements is composed of two exclusion groups. *J. Bacteriol.* **189**:3302-3305.
205. **Matson, S. W., J. K. Sampson, and D. R. Byrd.** 2001. F plasmid conjugative DNA transfer: the TraI helicase activity is essential for DNA strand transfer. *J. Biol. Chem.* **276**:2372-2379.
206. **McClintock, B.** 1956. Controlling elements and the gene. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **21**:197-216.
207. **McGrath, B. M., J. A. O'Halloran, and J. T. Pembroke.** 2005. Pre-exposure to UV irradiation increases the transfer frequency of the IncJ conjugative transposon-like elements R391, R392, R705, R706, R997 and pMERPH and is recA+ dependent. *FEMS Microbiol. Lett.* **243**:461-465.
208. **McLeod, S. M., V. Burrus, and M. K. Waldor.** 2006. Requirement for *Vibrio cholerae* integration host factor in conjugative DNA transfer. *J. Bacteriol.* **188**:5704-5711.
209. **Mead, S., A. Vaisman, M. Valjavec-Gratian, K. Karata, D. Vandewiele, and R. Woodgate.** 2007. Characterization of polVR391: a Y-family polymerase encoded by rumA'B from the IncJ conjugative transposon, R391. *Mol. Microbiol.* **63**:797-810.
210. **Medini, D., D. Serruto, J. Parkhill, D. A. Relman, C. Donati, R. Moxon, S. Falkow, and R. Rappuoli.** 2008. Microbiology in the post-genomic era. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:419-430.
211. **Mills, D. A., T. G. Phister, G. M. Dunny, and L. L. McKay.** 1998. An origin of transfer (*oriT*) on the conjugative element pRS01 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**:1541-1544.
212. **Minoia, M., M. Gaillard, F. Reinhard, M. Stojanov, V. Sentchilo, and J. R. van der Meer.** 2008. Stochasticity and bistability in horizontal transfer control of a genomic island in *Pseudomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**:20792-20797.
213. **Mit'kina, L. N.** 2003. [Transposition as a way of existence: phage Mu]. *Genetika* **39**:637-656.
214. **Miyazaki, R., and J. R. van der Meer.** 2011. A dual functional origin of transfer in the ICE<sub>clc</sub> genomic island of *Pseudomonas knackmussii* B13. *Mol. Microbiol.* **79**:743-758.
215. **Mohd-Zain, Z., S. L. Turner, A. M. Cerdeño-Tárraga, A. K. Lilley, T. J. Inzana, A. J. Duncan, R. M. Harding, D. W. Hood, T. E. Peto, and D. W. Crook.** 2004.

- Transferable antibiotic resistance elements in *Haemophilus influenzae* share a common evolutionary origin with a diverse family of syntenic genomic islands. *J. Bacteriol* **186**:8114-8122.
216. **Mojica, F. J. M., C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, and E. Soria.** 2005. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol* **60**:174-182.
  217. **Monti, M. R., A. M. Smania, G. Fabro, M. E. Alvarez, and C. E. Argaraña.** 2005. Engineering *Pseudomonas fluorescens* for biodegradation of 2,4-dinitrotoluene. *Appl. Environ. Microbiol* **71**:8864-8872.
  218. **Moon, K., N. B. Shoemaker, J. F. Gardner, and A. A. Salyers.** 2005. Regulation of excision genes of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J. Bacteriol* **187**:5732-5741.
  219. **Moon, K., J. Sonnenburg, and A. A. Salyers.** 2007. Unexpected effect of a *Bacteroides* conjugative transposon, CTnDOT, on chromosomal gene expression in its bacterial host. *Mol. Microbiol* **64**:1562-1571.
  220. **Mruk, I., Y. Liu, L. Ge, and I. Kobayashi.** 2011. Antisense RNA associated with biological regulation of a restriction-modification system. *Nucleic Acids Res.*
  221. **Müller, T. A., C. Werlen, J. Spain, and J. R. Van Der Meer.** 2003. Evolution of a chlorobenzene degradative pathway among bacteria in a contaminated groundwater mediated by a genomic island in *Ralstonia*. *Environ. Microbiol* **5**:163-173.
  222. **Mulvey, M. R., D. A. Boyd, A. B. Olson, B. Doublet, and A. Cloeckaert.** 2006. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect* **8**:1915-1922.
  223. **Munoz-Najar, U., and M. N. Vijayakumar.** 1999. An operon that confers UV resistance by evoking the SOS mutagenic response in streptococcal conjugative transposon Tn5252. *J. Bacteriol* **181**:2782-2788.
  224. **Murray, N. E.** 2000. Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle). *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **64**:412-434.
  225. **Naïmi, A., G. Beck, and C. Branlant.** 1997. Primary and secondary structures of rRNA spacer regions in enterococci. *Microbiology* **143 (Pt 3)**:823-834.
  226. **Nair, S., S. Alokam, S. Kothapalli, S. Porwollik, E. Proctor, C. Choy, M. McClelland, S.-L. Liu, and K. E. Sanderson.** 2004. *Salmonella enterica* serovar Typhi strains from which SPI7, a 134-kilobase island with genes for Vi exopolysaccharide and other functions, has been deleted. *J. Bacteriol* **186**:3214-3223.
  227. **Nakayama, K., A. Yamashita, K. Kurokawa, T. Morimoto, M. Ogawa, M. Fukuhara, H. Urakami, M. Ohnishi, I. Uchiyama, Y. Ogura, T. Ooka, K. Oshima, A. Tamura, M. Hattori, and T. Hayashi.** 2008. The Whole-genome sequencing of the obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* revealed massive gene amplification during reductive genome evolution. *DNA Res* **15**:185-199.
  228. **Nandasena, K. G., G. W. O'Hara, R. P. Tiwari, E. Sezmiş, and J. G. Howieson.** 2007. *In situ* lateral transfer of symbiosis islands results in rapid evolution of diverse competitive strains of mesorhizobia suboptimal in symbiotic nitrogen fixation on the pasture legume *Biserrula pelecinus* L. *Environ. Microbiol* **9**:2496-2511.
  229. **Narra, H. P., and H. Ochman.** 2006. Of what use is sex to bacteria? *Curr. Biol* **16**:R705-710.

230. **Neher, S. B., J. M. Flynn, R. T. Sauer, and T. A. Baker.** 2003. Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. *Genes Dev* **17**:1084-1089.
231. **Nelson, W. C., M. T. Howard, J. A. Sherman, and S. W. Matson.** 1995. The traY gene product and integration host factor stimulate *Escherichia coli* DNA helicase I-catalyzed nicking at the F plasmid *oriT*. *J. Biol. Chem* **270**:28374-28380.
232. **Nesmelova, I. V., and P. B. Hackett.** 2010. DDE transposases: Structural similarity and diversity. *Adv. Drug Deliv. Rev* **62**:1187-1195.
233. **Niu, G., T. Okinaga, F. Qi, and J. Merritt.** 2010. The *Streptococcus mutans* IrvR repressor is a cl-like regulator that functions through autocleavage and Clp-dependent proteolysis. *J. Bacteriol* **192**:1586-1595.
234. **Novick, R. P., G. E. Christie, and J. R. Penadés.** 2010. The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria. *Nat. Rev. Microbiol* **8**:541-551.
235. **Oppenheim, A. B., O. Kobiler, J. Stavans, D. L. Court, and S. Adhya.** 2005. Switches in bacteriophage lambda development. *Annu. Rev. Genet* **39**:409-429.
236. **Ortega, M. E., and C. E. Catalano.** 2006. Bacteriophage lambda gpNu1 and *Escherichia coli* IHF proteins cooperatively bind and bend viral DNA: implications for the assembly of a genome-packaging motor. *Biochemistry* **45**:5180-5189.
237. **Osorio, C. R., J. Marrero, R. A. F. Wozniak, M. L. Lemos, V. Burrus, and M. K. Waldor.** 2008. Genomic and functional analysis of ICEPdaSpa1, a fish-pathogen-derived SXT-related integrating conjugative element that can mobilize a virulence plasmid. *J. Bacteriol* **190**:3353-3361.
238. **Papagiannis, C. V., M. D. Sam, M. A. Abbani, D. Yoo, D. Cascio, R. T. Clubb, and R. C. Johnson.** 2007. Fis targets assembly of the Xis nucleoprotein filament to promote excisive recombination by phage lambda. *J. Mol. Biol* **367**:328-343.
239. **Park, J., and A. A. Salyers.** 2011. Characterization of the *Bacteroides* CTnDOT regulatory protein RteC. *J. Bacteriol* **193**:91-97.
240. **Pavlovic, G., V. Burrus, B. Gintz, B. Decaris, and G. Guédon.** 2004. Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICESt1-related elements from *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology* **150**:759-774.
241. **Pinyon, J. L., and R. M. Hall.** 2011. Evolution of IncP-1 $\alpha$  plasmids by acquisition of antibiotic and mercuric ion resistance transposons. *Microb Drug Resist.*
242. **Polard, P., and M. Chandler.** 1995. Bacterial transposases and retroviral integrases. *Mol. Microbiol* **15**:13-23.
243. **Possoz, C., C. Ribard, J. Gagnat, J. L. Pernodet, and M. Guérineau.** 2001. The integrative element pSAM2 from *Streptomyces*: kinetics and mode of conjugal transfer. *Mol. Microbiol* **42**:159-166.
244. **Possoz, C., J. Gagnat, G. Sezonov, M. Guérineau, and J.-L. Pernodet.** 2003. Conjugal immunity of *Streptomyces* strains carrying the integrative element pSAM2 is due to the *pif* gene (pSAM2 immunity factor). *Mol. Microbiol* **47**:1385-1393.
245. **Przybilski, R., C. Richter, T. Gristwood, J. S. Clulow, R. B. Vercoe, and P. C. Fineran.** 2011. Csy4 is responsible for CRISPR RNA processing in *Pectobacterium atrosepticum*. *RNA Biol* **8**.
246. **Qiu, X., A. U. Gurkar, and S. Lory.** 2006. Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **103**:19830-19835.



247. **Rajeev, L., K. Malanowska, and J. F. Gardner.** 2009. Challenging a paradigm: the role of DNA homology in tyrosine recombinase reactions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **73**:300-309.
248. **Ramsay, J. P., J. T. Sullivan, N. Jambari, C. A. Ortori, S. Heeb, P. Williams, D. A. Barrett, I. L. Lamont, and C. W. Ronson.** 2009. A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes. *Mol. Microbiol* **73**:1141-1155.
249. **Ramsay, J. P., J. T. Sullivan, N. Jambari, C. A. Ortori, S. Heeb, P. Williams, D. A. Barrett, I. L. Lamont, and C. W. Ronson.** 2009. A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes. *Mol. Microbiol* **73**:1141-1155.
250. **Ramsay, J. P., J. T. Sullivan, G. S. Stuart, I. L. Lamont, and C. W. Ronson.** 2006. Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. *Mol. Microbiol* **62**:723-734.
251. **Ramsay, J. P., J. T. Sullivan, G. S. Stuart, I. L. Lamont, and C. W. Ronson.** 2006. Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. *Mol. Microbiol* **62**:723-734.
252. **Rasko, D. A., M. J. Rosovitz, G. S. A. Myers, E. F. Mongodin, W. F. Fricke, P. Gajer, J. Crabtree, M. Sebahia, N. R. Thomson, R. Chaudhuri, I. R. Henderson, V. Sperandio, and J. Ravel.** 2008. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J. Bacteriol* **190**:6881-6893.
253. **Rasmussen, T. B., M. Danielsen, O. Valina, C. Garrigues, E. Johansen, and M. B. Pedersen.** 2008. *Streptococcus thermophilus* core genome: comparative genome hybridization study of 47 strains. *Appl. Environ. Microbiol* **74**:4703-4710.
254. **Ravatn, R., S. Studer, A. J. Zehnder, and J. R. van der Meer.** 1998. Int-B13, an unusual site-specific recombinase of the bacteriophage P4 integrase family, is responsible for chromosomal insertion of the 105-kilobase *clc* element of *Pseudomonas* sp. Strain B13. *J. Bacteriol* **180**:5505-5514.
255. **Ravin, N. V.** 2011. N15: The linear phage-plasmid. *Plasmid* **65**:102-109.
256. **Rawlings, D. E., and E. Tietze.** 2001. Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **65**:481-496, table of contents.
257. **Reimann, C., and D. Haas.** 1986. IS21 insertion in the *trfA* replication control gene of chromosomally integrated plasmid RP1: a property of stable *Pseudomonas aeruginosa* Hfr strains. *Mol. Gen. Genet* **203**:511-519.
258. **Reuther, J., C. Gekeler, Y. Tiffert, W. Wohlleben, and G. Muth.** 2006. Unique conjugation mechanism in mycelial streptomycetes: a DNA-binding ATPase translocates unprocessed plasmid DNA at the hyphal tip. *Mol. Microbiol* **61**:436-446.
259. **Rice, L. B., L. L. Carias, S. H. Marshall, R. Hutton-Thomas, and S. Rudin.** 2007. Characterization of Tn5386, a Tn916-related mobile element. *Plasmid* **58**:61-67.
260. **Rizzotti, L., F. La Gioia, F. Dellaglio, and S. Torriani.** 2009. Characterization of tetracycline-resistant *Streptococcus thermophilus* isolates from Italian soft cheeses. *Appl. Environ. Microbiol* **75**:4224-4229.

261. **Roberts, A. P., P. A. Johanesen, D. Lyras, P. Mullany, and J. I. Rood.** 2001. Comparison of Tn5397 from *Clostridium difficile*, Tn916 from *Enterococcus faecalis* and the CW459tet(M) element from *Clostridium perfringens* shows that they have similar conjugation regions but different insertion and excision modules. *Microbiology* **147**:1243-1251.
262. **Roberts, A. P., M. Chandler, P. Courvalin, G. Guédon, P. Mullany, T. Pembroke, J. I. Rood, C. J. Smith, A. O. Summers, M. Tsuda, and D. E. Berg.** 2008. Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* **60**:167-173.
263. **Roberts, A. P., and P. Mullany.** 2009. A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol* **17**:251-258.
264. **Roberts, A. P., and P. Mullany.** 2011. Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.*
265. **Rocco, J. M., and G. Churchward.** 2006. The integrase of the conjugative transposon Tn916 directs strand- and sequence-specific cleavage of the origin of conjugal transfer, *oriT*, by the endonuclease Orf20. *J. Bacteriol* **188**:2207-2213.
266. **Rocha, E. P. C., E. Cornet, and B. Michel.** 2005. Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. *PLoS Genet* **1**:e15.
267. **Römling, U., and R. Simm.** 2009. Prevailing concepts of c-di-GMP signaling. *Contrib Microbiol* **16**:161-181.
268. **Ryan, M., J. T. Pembroke, and C. Adley.** 2009. Novel Tn4371-ICE like element in *Ralstonia pickettii* and Genome mining for comparative elements. *BMC Microbiology* **9**:242.
269. **Saedler, H., and B. Heiss.** 1973. Multiple copies of the insertion-DNA sequences IS1 and IS2 in the chromosome of *E. coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* **122**:267-277.
270. **Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, A. M. Stevens, and L. Y. Li.** 1995. Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev* **59**:579-590.
271. **Sampath, J., and M. N. Vijayakumar.** 1998. Identification of a DNA cytosine methyltransferase gene in conjugative transposon Tn5252. *Plasmid* **39**:63-76.
272. **Sarkar, D., M. A. Azaro, H. Aihara, C. V. Papagiannis, R. Tirumalai, S. E. Nunes-Düby, R. C. Johnson, T. Ellenberger, and A. Landy.** 2002. Differential affinity and cooperativity functions of the amino-terminal 70 residues of lambda integrase. *J. Mol. Biol* **324**:775-789.
273. **Savijoki, K., H. Ingmer, D. Frees, F. K. Vogensen, A. Palva, and P. Varmanen.** 2003. Heat and DNA damage induction of the LexA-like regulator HdiR from *Lactococcus lactis* is mediated by RecA and ClpP. *Mol. Microbiol* **50**:609-621.
274. **Schirawski, J., W. Hagens, G. F. Fitzgerald, and D. Van Sinderen.** 2002. Molecular characterization of cadmium resistance in *Streptococcus thermophilus* strain 4134: an example of lateral gene transfer. *Appl. Environ. Microbiol* **68**:5508-5516.
275. **Schleper, C., I. Holz, D. Janekovic, J. Murphy, and W. Zillig.** 1995. A multicopy plasmid of the extremely thermophilic archaeon *Sulfolobus* effects its transfer to recipients by mating. *J Bacteriol* **177**:4417-4426.
276. **Schubert, S., S. Dufke, J. Sorsa, and J. Heesemann.** 2004. A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Mol. Microbiol* **51**:837-848.
277. **Schubert, S., A. Rakin, and J. Heesemann.** 2004. The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int. J. Med. Microbiol* **294**:83-94.

278. **Scott, J. R., F. Bringel, D. Marra, G. Van Alstine, and C. K. Rudy.** 1994. Conjugative transposition of Tn916: preferred targets and evidence for conjugative transfer of a single strand and for a double-stranded circular intermediate. *Mol. Microbiol* **11**:1099-1108.
279. **Scott, J. R., P. A. Kirchman, and M. G. Caparon.** 1988. An intermediate in transposition of the conjugative transposon Tn916. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **85**:4809-4813.
280. **Sebahia, M., B. W. Wren, P. Mullany, N. F. Fairweather, N. Minton, R. Stabler, N. R. Thomson, A. P. Roberts, A. M. Cerdeño-Tárraga, H. Wang, M. T. G. Holden, A. Wright, C. Churcher, M. A. Quail, S. Baker, N. Bason, K. Brooks, T. Chillingworth, A. Cronin, P. Davis, L. Dowd, A. Fraser, T. Feltwell, Z. Hance, S. Holroyd, K. Jagels, S. Moule, K. Mungall, C. Price, E. Rabinowitsch, S. Sharp, M. Simmonds, K. Stevens, L. Unwin, S. Whithead, B. Dupuy, G. Dougan, B. Barrell, and J. Parkhill.** 2006. The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat. Genet* **38**:779-786.
281. **Sentchilo, V., R. Ravatn, C. Werlen, A. J. B. Zehnder, and J. R. van der Meer.** 2003. Unusual integrase gene expression on the *clc* genomic island in *Pseudomonas* sp. strain B13. *J. Bacteriol* **185**:4530-4538.
282. **Sentchilo, V., K. Czechowska, N. Pradervand, M. Minoia, R. Miyazaki, and J. R. van der Meer.** 2009. Intracellular excision and reintegration dynamics of the ICE<sub>clc</sub> genomic island of *Pseudomonas knackmussii* sp. strain B13. *Mol. Microbiol* **72**:1293-1306.
283. **Serfiotis-Mitsa, D., G. A. Roberts, L. P. Cooper, J. H. White, M. Nutley, A. Cooper, G. W. Blakely, and D. T. F. Dryden.** 2008. The Orf18 gene product from conjugative transposon Tn916 is an ArdA antirestriction protein that inhibits type I DNA restriction-modification systems. *J. Mol. Biol* **383**:970-981.
284. **She, Q., H. Phan, R. A. Garrett, S. V. Albers, K. M. Stedman, and W. Zillig.** 1998. Genetic profile of pNOB8 from *Sulfolobus*: the first conjugative plasmid from an archaeon. *Extremophiles* **2**:417-425.
285. **She, Q., B. Shen, and L. Chen.** 2004. Archaeal integrases and mechanisms of gene capture. *Biochem. Soc. Trans* **32**:222-226.
286. **Siguier, P., J. Perochon, L. Lestrade, J. Mahillon, and M. Chandler.** 2006. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. *Nucleic Acids Res* **34**:D32-36.
287. **Singer, M., T. A. Baker, G. Schnitzler, S. M. Deischel, M. Goel, W. Dove, K. J. Jaacks, A. D. Grossman, J. W. Erickson, and C. A. Gross.** 1989. A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev* **53**:1-24.
288. **Sitkiewicz, I., N. M. Green, N. Guo, L. Mereghetti, and J. M. Musser.** 2011. Lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins. *BMC Microbiol* **11**:65.
289. **Smets, B. F., and T. Barkay.** 2005. Horizontal gene transfer: perspectives at a crossroads of scientific disciplines. *Nat. Rev. Microbiol* **3**:675-678.
290. **Smillie, C., M. P. Garcillán-Barcia, M. V. Francia, E. P. C. Rocha, and F. de la Cruz.** 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev* **74**:434-452.
291. **Smith, C. J., A. C. Parker, and M. Bacic.** 2001. Analysis of a *Bacteroides* conjugative transposon using a novel "targeted capture" model system. *Plasmid* **46**:47-56.

292. **Smits, W. K., and A. D. Grossman.** 2010. The transcriptional regulator Rok binds A+T-rich DNA and is involved in repression of a mobile genetic element in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **6**:e1001207.
293. **Smokvina, T., F. Bocard, Pernodet J-L, A. Friedmann, and M. Guérineau.** 1991. Functional analysis of the *Streptomyces ambofaciens* element pSAM2. *Plasmid* **25**:40-52.
294. **Solaiman, D. K., and G. A. Somkuti.** 1997. Isolation and characterization of transcription signal sequences from *Streptococcus thermophilus*. *Curr. Microbiol* **34**:216-219.
295. **Solow, B. T., and G. A. Somkuti.** 2001. Molecular properties of *Streptococcus thermophilus* plasmid pER35 encoding a restriction modification system. *Curr. Microbiol* **42**:122-128.
296. **Song, B., N. B. Shoemaker, J. F. Gardner, and A. A. Salyers.** 2007. Integration site selection by the *Bacteroides* conjugative transposon CTnBST. *J. Bacteriol.* **189**:6594-6601.
297. **Springael, D., S. Kreps, and M. Mergeay.** 1993. Identification of a catabolic transposon, Tn4371, carrying biphenyl and 4-chlorobiphenyl degradation genes in *Alcaligenes eutrophus* A5. *J. Bacteriol* **175**:1674-1681.
298. **Springael, D., A. Ryngaert, C. Merlin, A. Toussaint, and M. Mergeay.** 2001. Occurrence of Tn4371-related mobile elements and sequences in (chloro)biphenyl-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol* **67**:42-50.
299. **Springael, D., K. Peys, A. Ryngaert, S. Van Roy, L. Hooyberghs, R. Ravatn, M. Heyndrickx, J.-R. van der Meer, C. Vandecasteele, M. Mergeay, and L. Diels.** 2002. Community shifts in a seeded 3-chlorobenzoate degrading membrane biofilm reactor: indications for involvement of in situ horizontal transfer of the *clc*-element from inoculum to contaminant bacteria. *Environ. Microbiol* **4**:70-80.
300. **Srinivas, P., A. O. Kiliç, and M. N. Vijayakumar.** 1997. Site-specific nicking *in vitro* at *oriT* by the DNA relaxase of Tn5252. *Plasmid* **37**:42-50.
301. **Stanton, T. B.** 2007. Prophage-like gene transfer agents-novel mechanisms of gene exchange for *Methanococcus*, *Desulfovibrio*, *Brachyspira*, and *Rhodobacter* species. *Anaerobe* **13**:43-49.
302. **Sturino, J. M., and T. R. Klaenhammer.** 2006. Engineered bacteriophage-defence systems in bioprocessing. *Nat. Rev. Microbiol* **4**:395-404.
303. **Su, Y. A., P. He, and D. B. Clewell.** 1992. Characterization of the *tet*(M) determinant of Tn916: evidence for regulation by transcription attenuation. *Antimicrob. Agents Chemother* **36**:769-778.
304. **Sullivan, D. M., B. G. Bobay, D. J. Kojetin, R. J. Thompson, M. Rance, M. A. Strauch, and J. Cavanagh.** 2008. Insights into the nature of DNA binding of AbrB-like transcription factors. *Structure* **16**:1702-1713.
305. **Sullivan, J. T., S. D. Brown, R. R. Yocum, and C. W. Ronson.** 2001. The *bio* operon on the acquired symbiosis island of *Mesorhizobium* sp. strain R7A includes a novel gene involved in pimeloyl-CoA synthesis. *Microbiology* **147**:1315-1322.
306. **Sullivan, J. T., and C. W. Ronson.** 1998. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a *phe-tRNA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**:5145-5149.
307. **Sullivan, J. T., J. R. Trzebiatowski, R. W. Cruickshank, J. Gouzy, S. D. Brown, R. M. Elliot, D. J. Fleetwood, N. G. McCallum, U. Rossbach, G. S. Stuart, J. E. Weaver, R. J. Webby, F. J. De Bruijn, and C. W. Ronson.** 2002. Comparative

- sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J. Bacteriol* **184**:3086-3095.
308. **Sullivan, J. T., J. R. Trzebiatowski, R. W. Cruickshank, J. Gouzy, S. D. Brown, R. M. Elliot, D. J. Fleetwood, N. G. McCallum, U. Rossbach, G. S. Stuart, J. E. Weaver, R. J. Webby, F. J. de Bruijn, and C. W. Ronson.** 2002. Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J. Bacteriol* **184**:3086-3095.
  309. **Sung, P., and H. Klein.** 2006. Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol* **7**:739-750.
  310. **Surtees, J. A., and B. E. Funnell.** 2003. Plasmid and chromosome traffic control: how ParA and ParB drive partition. *Curr. Top. Dev. Biol.* **56**:145-180.
  311. **Taviani, E., C. J. Grim, J. Chun, A. Huq, and R. R. Colwell.** 2009. Genomic analysis of a novel integrative conjugative element in *Vibrio cholerae*. *FEBS Lett* **583**:3630-3636.
  312. **te Poele, E. M., H. Bolhuis, and L. Dijkhuizen.** 2008. *Actinomyces* integrative and conjugative elements. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**:127-143.
  313. **te Poele, E. M., H. Bolhuis, and L. Dijkhuizen.** 2008. *Actinomyces* integrative and conjugative elements. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**:127-143.
  314. **Thierauf, A., G. Perez, and A. S. Maloy.** 2009. Generalized transduction. *Methods Mol. Biol* **501**:267-286.
  315. **Top, E. M., D. Springael, and N. Boon.** 2002. Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters. *FEMS Microbiol. Ecol* **42**:199-208.
  316. **Toussaint, A., M. Faelen, and A. Résibois.** 1981. Chromosomal rearrangements induced by mini-Mu and mini-D108: mini review and new data. *Gene* **14**:115-119.
  317. **Toussaint, A., and C. Merlin.** 2002. Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid* **47**:26-35.
  318. **Toussaint, A., C. Merlin, S. Monchy, M. A. Benotmane, R. Leplae, M. Mergeay, and D. Springael.** 2003. The biphenyl- and 4-chlorobiphenyl-catabolic transposon Tn4371, a member of a new family of genomic islands related to IncP and Ti plasmids. *Appl. Environ. Microbiol* **69**:4837-4845.
  319. **Turgeon, N., and S. Moineau.** 2001. Isolation and characterization of a *Streptococcus thermophilus* plasmid closely related to the pMV158 family. *Plasmid* **45**:171-183.
  320. **Turgeon, N., M. Frenette, and S. Moineau.** 2004. Characterization of a theta-replicating plasmid from *Streptococcus thermophilus*. *Plasmid* **51**:24-36.
  321. **van der Meer, J. R.** 1997. Evolution of novel metabolic pathways for the degradation of chloroaromatic compounds. *Antonie Van Leeuwenhoek* **71**:159-178.
  322. **van der Meer, J. R., R. Ravatn, and V. Sentchilo.** 2001. The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Arch. Microbiol* **175**:79-85.
  323. **van der Meer, J. R., and V. Sentchilo.** 2003. Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. *Curr. Opin. Biotechnol* **14**:248-254.
  324. **Van Houdt, R., A. Toussaint, M. P. Ryan, J. T. Pembroke, M. Mergeay, and C. C. Adley.** 2011. The Tn4371 ICE family of bacterial mobile genetic elements, p. 1-22. *in* *Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements*; Landes Bioscience. Adam P. Roberts.

325. **Van Melderren, L.** 2010. Toxin-antitoxin systems: why so many, what for? *Current Opinion in Microbiology* **13**:781-785.
326. **Van Melderren, L., and M. Saavedra De Bast.** 2009. Bacterial Toxin–Antitoxin Systems: More Than Selfish Entities? *PLoS Genet* **5**.
327. **Walker, G. C.** 1995. SOS-regulated proteins in translesion DNA synthesis and mutagenesis. *Trends Biochem. Sci* **20**:416-420.
328. **Wang, H., and P. Mullany.** 2000. The large resolvase TndX is required and sufficient for integration and excision of derivatives of the novel conjugative transposon Tn5397. *J. Bacteriol* **182**:6577-6583.
329. **Wang, Y., E. R. Rotman, N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 2005. Translational control of tetracycline resistance and conjugation in the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J. Bacteriol* **187**:2673-2680.
330. **Wang, Y., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 2004. Regulation of a *Bacteroides* operon that controls excision and transfer of the conjugative transposon CTnDOT. *J. Bacteriol* **186**:2548-2557.
331. **Weigel, C., and H. Seitz.** 2006. Bacteriophage replication modules. *FEMS Microbiol. Rev.* **30**:321-381.
332. **Weller, G. R., B. Kysela, R. Roy, L. M. Tonkin, E. Scanlan, M. Della, S. K. Devine, J. P. Day, A. Wilkinson, F. d'Adda di Fagagna, K. M. Devine, R. P. Bowater, P. A. Jeggo, S. P. Jackson, and A. J. Doherty.** 2002. Identification of a DNA nonhomologous end-joining complex in bacteria. *Science* **297**:1686-1689.
333. **Whitehead, N. A., A. M. Barnard, H. Slater, N. J. Simpson, and G. P. Salmond.** 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev* **25**:365-404.
334. **Whittle, G., N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 2002. The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Cell. Mol. Life Sci* **59**:2044-2054.
335. **Wilkins, B. M., and A. T. Thomas.** 2000. DNA-independent transport of plasmid primase protein between bacteria by the I1 conjugation system. *Mol. Microbiol* **38**:650-657.
336. **Wilkins, B. M.** 2002. Plasmid promiscuity: meeting the challenge of DNA immigration control. *Environ. Microbiol* **4**:495-500.
337. **Will, W. R., and L. S. Frost.** 2006. Characterization of the opposing roles of H-NS and TraJ in transcriptional regulation of the F-plasmid tra operon. *J. Bacteriol* **188**:507-514.
338. **Williams, D. R., and C. M. Thomas.** 1992. Active partitioning of bacterial plasmids. *J. Gen. Microbiol.* **138**:1-16.
339. **Wozniak, R. A. F., D. E. Fouts, M. Spagnoletti, M. M. Colombo, D. Ceccarelli, G. Garriss, C. Déry, V. Burrus, and M. K. Waldor.** 2009. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet* **5**:e1000786.
340. **Wozniak, R. A. F., and M. K. Waldor.** 2009. A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet* **5**:e1000439.
341. **Wozniak, R. A. F., and M. K. Waldor.** 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol* **8**:552-563.
342. **Wu, L. J., P. J. Lewis, R. Allmansberger, P. M. Hauser, and J. Errington.** 1995. A conjugation-like mechanism for prespore chromosome partitioning during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **9**:1316-1326.

343. **Yu, J.-H., Z. Hamari, K.-H. Han, J.-A. Seo, Y. Reyes-Domínguez, and C. Scazzocchio.** 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genet. Biol* **41**:973-981.
344. **Zheng, X.-D., X.-Q. Yang, and Y. Tao.** 2011. Bistability, probability transition rate and first-passage time in an autoactivating positive-feedback loop. *PLoS ONE* **6**:e17104.
345. **Zhou, J. Z., and J. M. Tiedje.** 1995. Gene transfer from a bacterium injected into an aquifer to an indigenous bacterium. *Mol. Ecol* **4**:613-618.
346. **Zielenkiewicz, U., and P. Cegłowski.** 2001. Mechanisms of plasmid stable maintenance with special focus on plasmid addiction systems. *Acta Biochim. Pol* **48**:1003-1023.







## ANNEXES



## Communications orales

**Carraro Nicolas**, Libante Virginie, Morel Catherine, Decaris Bernard, Charron Florence, Leblond Pierre and Guédon Gérard, Analyse comparative de la dynamique de deux éléments intégratifs et conjugatifs apparentés de *Streptococcus thermophilus*, séminaire réalisé au laboratoire du docteur Vincent Burrus au Centre d'étude et de valorisation de la diversité microbienne à la faculté des sciences de l'Université de Sherbrooke (Canada).

**Carraro Nicolas**, Libante Virginie, Morel Catherine, Decaris Bernard, Charron Florence, Leblond Pierre and Guédon Gérard, Regulation of *Streptococcus thermophilus* Genomic ICElands, au 4<sup>ème</sup> congrès des microbiologistes européens FEMS (Genève, 2011).

Genomic islands play an important role in horizontal gene transfer and therefore in the evolution of bacterial species. Bacterial genomes analyses suggest that numbers of these islands are Integrative and Conjugative Elements (ICE). They characteristically share a modular organization as genes and sequences involved in the same biological process are located in the same region.

Two closely related integrative and conjugative elements, ICESt1 and ICESt3, have been identified in the Gram positive bacteria *Streptococcus thermophilus*. While conjugation and recombination modules (core region) of these elements are almost identical (95% of nucleotide identity), their respective conjugative transfers occur at very different frequencies.

Quantification of the single conjugation and recombination transcript (14.6 kb) shows that excision and probably transfer are regulated at the transcriptional level. Unlike in other characterized elements, the transcript levels of the regulation module of ICEs from *S. thermophilus* rises by stationary phase and DNA damage. These results strongly suggest an original mechanism of *S. thermophilus* ICEs regulation; which would implicate complex interactions of various regulators. As homologs of the regulation modules from ICESt1 and ICESt3 were identified on several other ICEs, this regulation strategy may be conserved. Although ICEs are not known as replicative elements, exposure to DNA damaging agents resulted in increased number of ICESt3 copies, suggesting its amplification. Therefore, ICESt3 is able of replicating with higher spreading efficiency in bacteria population. On this basis, we propose to update the nomenclature of ICEs with a novel class of elements: RICE for Replicative, Integrative and Conjugative Elements.

**Carraro Nicolas**, Libante Virginie, Morel Catherine, Decaris Bernard, Charron Florence, Leblond Pierre and Guédon Gérard, Regulation of ICESt1 and ICESt3, two closely related Integrative and conjugative elements of *Streptococcus thermophilus*, au groupement de recherche sur les éléments transposables (CNRS, Institut Pasteur de Paris, 2010).

L'analyse des génomes bactériens suggère que de nombreux îlots seraient des éléments intégratifs conjugatifs (ICE), qui s'excisent, se transfèrent par conjugaison et s'intègrent dans un réplicon de la cellule réceptrice. Ils présentent une organisation modulaire, les gènes et séquences impliqués dans une même fonction étant regroupés.

Les ICE de *Streptococcus thermophilus*, ICESt1 et ICESt3, possèdent des modules de conjugaison et de recombinaison qui présentent 95% d'identité nucléotidique et des modules de régulation apparentés (5). Néanmoins, ICESt3 s'excise et se transfère beaucoup plus efficacement (facteur 1000) qu'ICESt1 (3). Ces différences pourraient être dues aux gènes spécifiques et/ou aux divergences de séquences des modules de régulation comprenant plusieurs régulateurs putatifs.

La phase stationnaire et la mitomycine C (agent endommageant l'ADN) sont connus pour provoquer l'activation d'ICE déjà étudiés comme SXT de *Vibrio cholerae* (4) et ICEBs1 de *Bacillus subtilis* (1, 2). L'activation transcriptionnelle des modules de conjugaison et de recombinaison résulte alors de la répression du module

de régulation codant le répresseur unique du transfert. Chez les ICE de *S. thermophilus*, ces mêmes stimuli induisent une augmentation globale des quantités de transcrits de la région core codant les fonctions de régulation, conjugaison et recombinaison. L'activation transcriptionnelle de la région core est corrélée avec l'augmentation de la fréquence d'excision des éléments. Les niveaux de transcrits et d'excision d'ICESt1 restent néanmoins bien inférieurs (facteur 20) à ceux d'ICESt3 en accord avec leurs fréquences de transfert.

La cartographie transcriptionnelle basée sur l'analyse RT-PCR et 5'RACE PCR a révélé que les modules de régulation des deux éléments présentent des organisations opéroniques différentes. De plus, ICESt3 possède un promoteur spécifique de la phase stationnaire en amont du module de régulation. Chez les deux éléments, les ORF des modules de conjugaison et de recombinaison sont cotranscrites deux à deux, en accord avec le transcrit unique de 14,6 kb prédit *in silico*. L'analyse fine des résultats de 5'RACE PCR obtenus pour ce transcrit a permis de mettre en évidence une maturation par clivage au niveau d'une structure secondaire putative située à son extrémité 5'.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude suggèrent un mécanisme de régulation original des ICE de *S. thermophilus* qui impliquerait des interactions entre plusieurs régulateurs.

**Carraro Nicolas, Morel Catherine, Decaris Bernard, Leblond Pierre, Guédon Gérard, Charron Florence and Libante Virginie, Regulation of ICESt1 and ICESt3, two closely related Integrative and conjugative elements of *Streptococcus thermophilus*, au 17<sup>ème</sup> symposium des bactéries lactiques CBL (Nancy, 2010).**

L'analyse des génomes bactériens suggère que de nombreux îlots seraient des éléments intégratifs conjuguatifs (ICE), éléments qui s'excisent, se transfèrent par conjugaison et s'intègrent dans un réplicon de la cellule réceptrice. Ils présentent une organisation modulaire, les gènes et séquences impliqués dans une même fonction étant regroupés.

Les ICE de *Streptococcus thermophilus*, ICESt1 et ICESt3, présentent des modules de conjugaison et de recombinaison identiques à 95% et des modules de régulation apparentés. Ces deux ICE sont les seuls éléments connus, parmi les prophages ou ICE, qui posséderaient simultanément les deux types de répresseurs : ci autoprotéolytique (*arp1*) et ci-like (*arp2*) clivable par une protéase associée (*orfQ*).

Les quantités de transcrit des modules de conjugaison et de recombinaison des deux éléments augmentent en phase stationnaire et en présence de mitomycine C, agent endommageant l'ADN, ce qui est en accord avec l'augmentation de la fréquence d'excision des deux éléments et de transfert d'ICESt3 (10 à 25 fois). Ces stimuli sont connus pour provoquer la levée de la répression chez les ICE déjà étudiés, SXT codant un ci et ICEBs1 codant un ci-like. Dans ces cas, la dérégulation est associée à une réduction de la transcription du module de régulation. De façon originale, ICESt1 et ICESt3 présentent une augmentation globale des transcrits de la région cœur des éléments, y compris le module de régulation.

ICESt3 s'excise et se transfère beaucoup plus efficacement (facteur 1000) (3) qu'ICESt1 qui présente un niveau global des transcrits très inférieur et des unités transcriptionnelles différentes. Ainsi, les gènes d'ICESt1 qui coderaient le répresseur ci-like et la protéase associée ne sont pas cotranscrits, contrairement à ceux de tous les éléments connus présentant ce type de répresseur. De plus, en 5' du module de régulation d'ICESt1, un second transcrit spécifique de la phase stationnaire identifié chez ICESt3 est absent. Ces différences entre ICESt1 et ICESt3 pourraient être dues aux gènes spécifiques et/ou aux divergences de séquences de la partie commune des modules de régulation.

L'ensemble des résultats suggère un mécanisme de régulation original où répresseurs de types ci et ci-like pourraient interagir.

## Communications écrites

**Carraro Nicolas**, Rossi Emmanuel, Persoons Antoine, Morel Catherine, Decaris Bernard, Leblond Pierre, Guédon Gérard, Charron Florence and Libante Virginie, Dynamics and maintenance of ICEs of *Streptococcus thermophilus*, au 4<sup>ème</sup> congrès des microbiologistes européens FEMS (Genève, 2011).

Comparative analysis of bacterial genomes suggests that the transfer of Integrative and Conjugative Elements (ICEs) play a key role in their evolution. These elements excise from donor cell chromosomes by site-specific recombination, transfer through conjugation to recipient cell and integrate into specific genomic sites.

Previous analysis demonstrated that ICESt3, an ICE from *Streptococcus thermophilus*, is activated during stationary phase and upon DNA damage. Its activation results from transcriptional activation of the core region, which encodes functions involved in transfer. While ICEs are not thought to be replicative, ICESt3 was recently found to replicate under DNA damaging conditions reaching from one copy to 10 copies per chromosome, while its excision rose by 90%.

Sequences analyses within the ICESt3 family lead us to specify a variable region. It includes a restriction modification system, which is postulated to regulate maintenance of the element. In order to investigate the involvement of the variable region in the behavior of ICESt3, a MiniICESt3 lacking this region has been genetically engineered. Surprisingly, this element is stable among generations.

Normalized copy number quantification of MiniICESt3 shows a threefold replication rate in all growth conditions compared to ICESt3. Therefore, the core region is sufficient for ICE replication and element maintenance. Large interest region could be substituted to variable region and stably maintain without selective pressure. This engineered new element may provide a new class of conjugative vector with a wide range of recipient cells.

**Carraro Nicolas**, Libante Virginie, Morel Catherine, Decaris Bernard, Charron Florence, Leblond Pierre and Guédon Gérard, Genomic ICElands of *Streptococcus thermophilus*, à la journée des doctorants de l'école doctorale BioSE (Nancy, 2010)

Le transfert horizontal de gènes est un moteur de l'évolution bactérienne générant une importante variabilité. Les îlots génomiques portent de nombreux gènes et leur transfert peut permettre l'acquisition rapide de nouvelles fonctions biologiques. L'analyse des génomes bactériens suggère que de nombreux îlots génomiques sont des éléments intégratifs conjuguatifs (ICE). Ces éléments s'excisent, se transfèrent par conjugaison et s'intègrent dans un réplicon de la cellule réceptrice. Ils présentent une organisation modulaire : les gènes et séquences impliqués dans une même fonction sont regroupés.

Les ICE de *Streptococcus thermophilus*, ICESt1 et ICESt3, possèdent des modules de conjugaison et de recombinaison qui présentent 95% d'identité nucléotidique et des modules de régulation apparentés. Néanmoins, ICESt3 s'excise et se transfère beaucoup plus efficacement (facteur 1000) qu'ICESt1. Ces différences pourraient être dues au module de régulation qui porte des gènes spécifiques et présentent des caractéristiques transcriptionnelles différentes.

La phase stationnaire et la mitomycine C (agent endommageant l'ADN) sont connus pour provoquer l'activation d'ICE déjà étudiés comme SXT de *Vibrio cholerae* et ICEBs1 de *Bacillus subtilis*. Chez ces éléments, l'activation transcriptionnelle des modules de conjugaison et de recombinaison résulte de la répression du module de régulation codant le répresseur unique du transfert. Chez les ICE de *S. thermophilus*, ces mêmes stimuli induisent une augmentation globale des quantités de transcrits, y compris du module de régulation. Cette activation est corrélée à l'augmentation de la fréquence d'excision des éléments. Les niveaux de transcrits d'ICESt1 restent néanmoins bien inférieurs (facteur 20) à ceux d'ICESt3, en accord avec leurs fréquences d'excision et de transfert.

Alors que les ICE sont connus pour ne pas être répliatifs, des études quantitatives ont permis de mettre en évidence qu'ICES<sub>t3</sub> se réplique en présence de dommages à l'ADN. La nomenclature des ICE pourrait ainsi se voir complétée par une nouvelle classe d'éléments intégratifs conjugatifs et répliatifs : les RICE.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette étude suggère un mécanisme de régulation original des ICE de *S. thermophilus* qui impliquerait des interactions complexes entre plusieurs régulateurs.

**Carraro Nicolas, Morel Catherine, Decaris Bernard, Leblond Pierre, Guédon Gérard, Charron Florence and Libante Virginie, Etude de la régulation du transfert d'éléments intégratifs conjugatifs de *Streptococcus thermophilus*, aux journées des microbiologistes de l'INRA (Poitiers, 2010).**

Le transfert horizontal des îlots génomiques joue un rôle clé dans l'évolution bactérienne. L'analyse des génomes bactériens suggère que de nombreux îlots seraient des éléments intégratifs conjugatifs (ICE). Lors de leur dissémination, ces éléments s'excisent, se transfèrent par conjugaison et s'intègrent dans un réplicon de la cellule réceptrice. Ils présentent une organisation en modules, les gènes et séquences impliqués dans une même fonction étant regroupés.

Deux souches de la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus* sont porteuses d'ICES<sub>t1</sub> et ICES<sub>t3</sub>, ICE présentant des modules de conjugaison et de recombinaison identiques à 95%. Cependant, ICES<sub>t3</sub> se transfère bien plus efficacement (facteur 1000), probablement en raison de la présence de gènes de régulation spécifiques à un élément et/ou d'une divergence de 15% des gènes de régulation communs. Par ailleurs, ce sont les seuls éléments connus possédant les deux types de répresseurs de prophages *ci* et *ci-like*. Cette situation suggère un mécanisme de régulation original puisque de nombreux ICE putatifs de streptocoques codent soit un répresseur *ci* soit un répresseur *ci-like*.

Les profils transcriptionnels et des analyses quantitatives des transcrits révèlent des différences, d'une part entre ICES<sub>t1</sub> et ICES<sub>t3</sub> et d'autre part lors de stimuli connus pour induire d'autres éléments transférables (phase de croissance et/ou dommages à l'ADN). Les résultats montrent une induction en phase stationnaire et en présence de mitomycine C. Cette dernière est en accord avec l'augmentation de la fréquence d'excision et de transfert (10 à 25 fois) observée dans les mêmes conditions.

**Carraro Nicolas, Morel Catherine, Decaris Bernard, Leblond Pierre, Guédon Gérard, Charron Florence and Libante Virginie, Etude de la régulation du transfert d'éléments intégratifs conjugatifs de *Streptococcus thermophilus*, au 16<sup>ème</sup> symposium des bactéries lactiques CBL (Toulouse, 2009).**

L'analyse des génomes bactériens séquencés suggère que le transfert des éléments intégratifs conjugatifs (ICE), éléments encore mal connus, joue un rôle important dans l'évolution bactérienne. Ces îlots génomiques s'excisent du chromosome sous forme circulaire, se transfèrent par conjugaison puis s'intègrent dans le génome d'une cellule réceptrice.

Deux ICE apparentés, ICES<sub>t1</sub> et ICES<sub>t3</sub>, ont précédemment été caractérisés chez *Streptococcus thermophilus*. Ces éléments présentent une organisation modulaire, l'ensemble des gènes et des séquences impliqués dans une même fonction biologique étant localisé dans une même région. Un module de régulation, variable entre les éléments, code des homologues de protéines clés impliquées dans la régulation des prophages (*arp1*, *arp2* et *orfQ*). Le gène *arp1*, impliqué dans la répression de l'excision d'ICES<sub>t1</sub>, code une protéine homologue du répresseur *ci* du phage  $\lambda$  tandis qu'*arp2* code une protéine putative homologue des répresseurs de type *ci-like* d'autres prophages, les répresseurs *ci-like* étant toujours associés à des homologues d'*orfQ*. Chez ICEBs1 de *Bacillus subtilis*, l'homologue d'*OrfQ* clive le répresseur *ci-like*, dérégulant ainsi le transfert de l'élément. Chez divers prophages codant des régulateurs de type *ci*, la levée de la répression est due à l'autoclivage de ces protéines. ICES<sub>t1</sub> et ICES<sub>t3</sub> sont les seuls éléments connus associant des répresseurs de type *ci* et *ci-like* suggérant que ces ICE présentent une régulation originale.

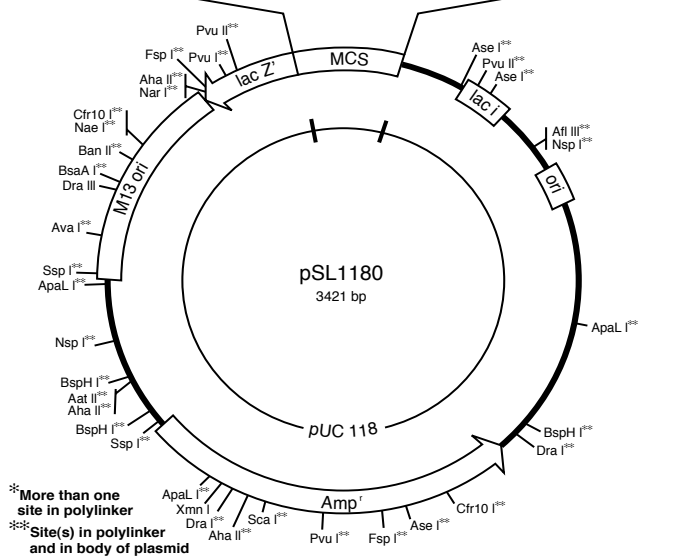
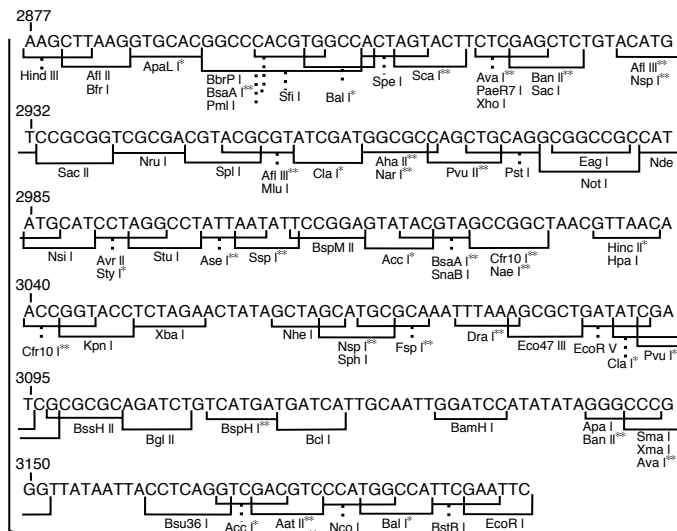
L'analyse *in silico* du module de régulation suggère l'existence d'un promoteur et d'un terminateur internes. Une étude transcriptionnelle a confirmé l'existence de 2 opérons distincts chez *ICES<sub>t1</sub>* mais n'a révélé qu'une seule unité transcriptionnelle chez *ICES<sub>t3</sub>*. Par ailleurs, les modules de conjugaison et de recombinaison constituent une unité transcriptionnelle unique chez *ICES<sub>t1</sub>* et *ICES<sub>t3</sub>*.

Un traitement endommageant l'ADN (mitomycine C) déréprime l'excision et le transfert des éléments contrôlés par des répresseurs de type *ci* ou *ci-like*. Des analyses par RT-qPCR ont montré que ce même traitement induit une augmentation de la quantité des transcrits des modules impliqués dans le transfert d'*ICES<sub>t3</sub>* et des modules de conjugaison et de recombinaison d'*ICES<sub>t1</sub>*. De même, une augmentation est observée chez un mutant *ICES<sub>t1</sub>Δarp1*, suggérant la présence d'au moins un autre système répresseur fonctionnel (probablement *ci-like*).



# Vecteurs de clonage

????????



?

?

?

?

???

# pET-15b

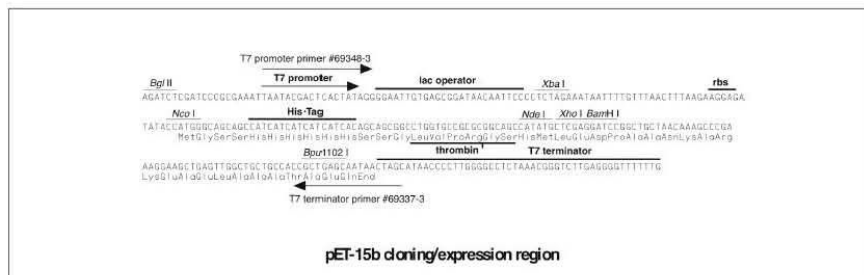
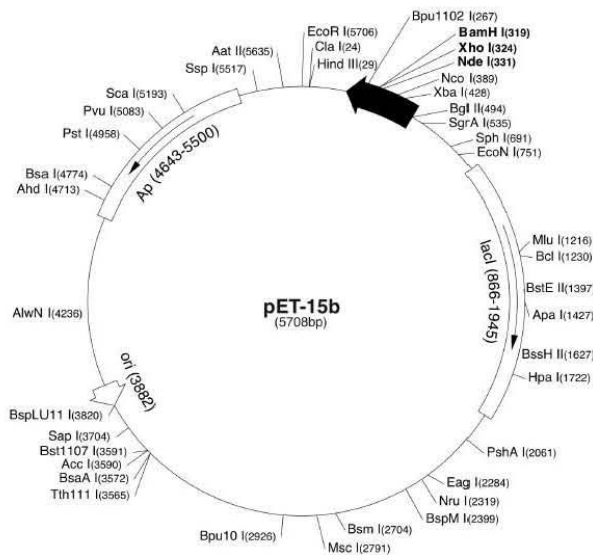


## pET-15b Vector

TB045 5/99

The pET-15b vector (Cat. No. 69661-3) carries an N-terminal His\*Tag<sup>®</sup> sequence followed by a thrombin site and three cloning sites. Unique sites are shown on the circle map. Note that the sequence is numbered by the pBR322 convention, so the T7 expression region is reversed on the circular map. The cloning/expression region of the coding strand transcribed by T7 RNA polymerase is shown below.

pET-15b sequence landmarks	
T7 promoter	463-479
T7 transcription start	452
His*Tag coding sequence	362-380
Multiple cloning sites ( <i>Nde</i> I - <i>Bam</i> H I)	319-335
T7 terminator	213-259
lacI coding sequence	(866-1945)
pBR322 origin	3882
<i>bla</i> coding sequence	4643-5500



Novagen · ORDERING 800-526-7319 · TECHNICAL SUPPORT 800-207-0144

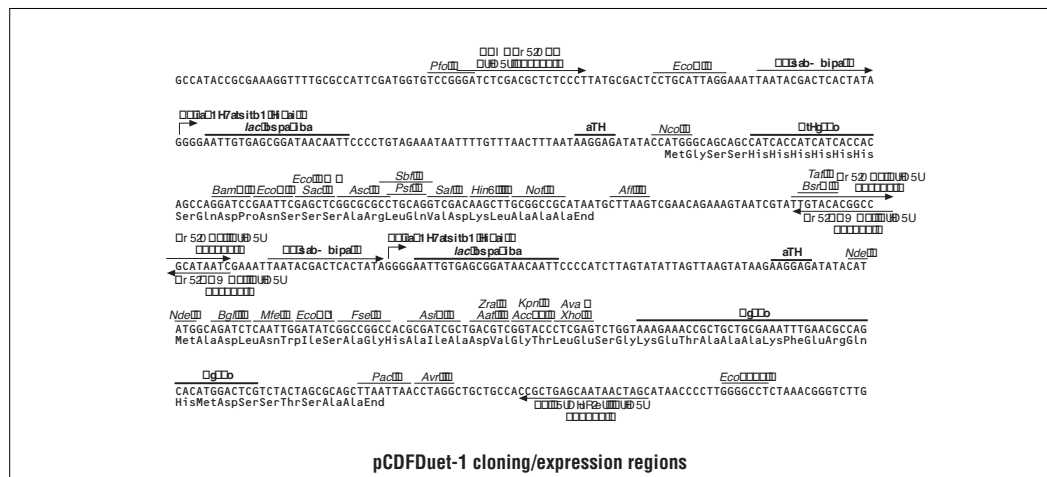
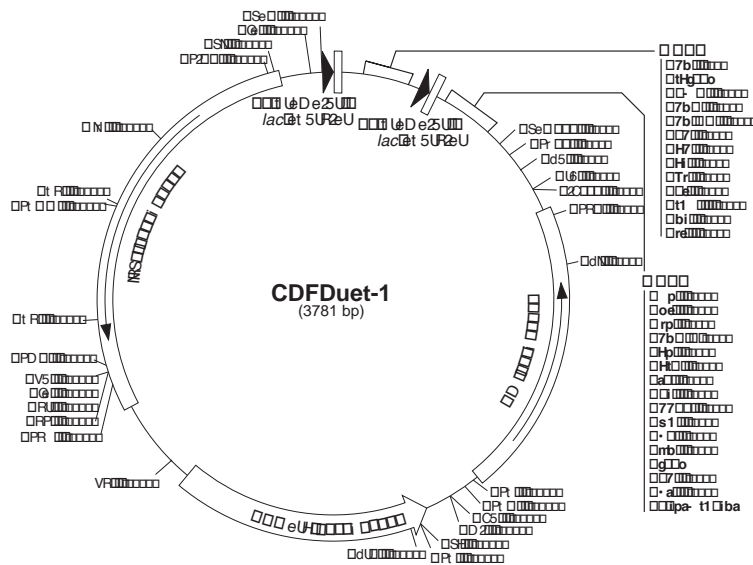


**pCDFDuet-1 Vector**

TB390 0903

	Cat. No.
pCDFDuet-1 DNA	71340-3
<b>pCDFDuet-1 sequence landmarks</b>	
T7 promoter-1	3765-3781
T7 transcription start-1	1
His•Tag <sup>®</sup> coding sequence	83-100
Multiple cloning sites-1 ( <i>Nco</i> I- <i>Afl</i> II)	69-168
T7 promoter-2	214-230
T7 transcription start-2	231
Multiple cloning sites-2 ( <i>Nde</i> I- <i>Avr</i> II)	297-438
S•Tag <sup>™</sup> coding sequence	366-410
T4 terminator	462-509
<i>aadA</i> (SmR) coding sequence	683-1471
CDF origin	1611-2349
<i>lacI</i> coding sequence	2562-3641

pCDFDuet<sup>™</sup>-1 is designed for the coexpression of two target ORFs. The vector contains two multiple cloning sites (MCS), each of which is preceded by a *T7lac* promoter and ribosome binding site (rbs). The vector also carries the CloDF13-derived CDF replicon, *lacI* gene and streptomycin/spectinomycin resistance gene (Sm<sup>R</sup>). This vector can be used in combination with pACYCDuet<sup>™</sup>-1 (Cat. No. 71147-3), pRSFDuet<sup>™</sup>-1 (Cat. No. 71341-3), and pETDuet<sup>™</sup>-1 (Cat. No. 71146-3) in an appropriate host strain for the coexpression of 4 to 8 target proteins. ORFs inserted into MCS1 can be sequenced using the ACYCDuetUP1 Primer (Cat. No. 71178-3) and DuetDOWN1 Primer (Cat. No. 71179-3). ORFs inserted into MCS2 can be sequenced using the DuetUP2 Primer (Cat. No. 71180-3) and T7 Terminator Primer (Cat. No. 69337-3). Unique sites are shown on the circle map.



## Résumés

Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) sont des îlots génomiques qui codent leur excision du chromosome, leur transfert par conjugaison et leur intégration. Ils présentent une organisation modulaire, chaque module incluant tous les gènes nécessaires pour conférer une fonction biologique. Les ICE sont généralement composés de deux régions : i) une région « core » codant les fonctions nécessaires au transfert et au maintien de l'élément (régulation, conjugaison et excision/intégration) ; ii) une région variable qui code des fonctions pouvant être avantageuses pour l'hôte.

Ce travail a porté sur l'étude de la régulation ainsi que les modalités de transfert et de maintien d'ICE $St1$  et ICE $St3$ , deux ICE de *Streptococcus thermophilus* présentant une région core étroitement apparentée et une région variable non apparentée. Les résultats obtenus ont montré que, bien qu'ICE $St3$  s'excise et se transfère à beaucoup plus haute fréquence qu'ICE $St1$ , l'excision des deux éléments est activée par des stimuli identiques (dommages à l'ADN, phase stationnaire et/ou densité cellulaire) et est dépendante de la souche hôte. Les analyses bioinformatiques et transcriptionnelles des modules de régulation d'ICE $St1$  et ICE $St3$  ont révélé plusieurs différences d'organisation (opéron, promoteur, ORF spécifiques). Cependant, chacun de ces ICE code des homologues de deux types de régulateurs différents, *ci* et *ImmR*, ce qui implique un mécanisme de régulation complexe et original. Cette régulation pourrait être conservée chez de nombreux ICE apparentés identifiés lors de l'analyse *in silico* de génomes séquencés de streptocoques commensaux ou pathogènes.

Selon la définition initiale, les ICE se maintiendraient uniquement sous forme intégrée et ne se répliqueraient pas de façon intracellulaire. Cependant, les dommages à l'ADN induisent non seulement l'excision et le transfert d'ICE $St3$ , mais aussi sa présence en copies multiples extrachromosomiques (8 copies par chromosome). Les résultats obtenus impliquent une répllication sous forme extrachromosomique, répllication codée par la région core et qui serait impliquée dans le maintien de l'élément.

La comparaison avec des données récentes parues sur d'autres ICE suggère qu'une telle répllication pourrait être impliquée dans le maintien de nombreux ICE en plus de leur intégration.

**Mots clés :** *Streptococcus thermophilus*, élément intégratif conjugatif, régulation, répllication.

Integrative and Conjugative Elements (ICEs) are genomic islands, which excise from the chromosome, self-transfer by conjugation and integrate. They harbor a modular organization: genes and sequences involved in the same biological process are grouped in the same region. Most of the ICEs contain 2 regions: i) a « core » region, which encodes functions involved in the mobility and the stability (regulation, conjugation and excision/integration) ; ii) a variable region encoding functions that can be useful for the host cell.

This work concerns the modality of transfer and maintenance of ICE*St1* and ICE*St3*, two ICEs of *Streptococcus thermophilus* that share closely related core region. ICE*St1* excises much less frequently than ICE*St3*. Nevertheless, excision of the two elements is activated by the same stimuli (DNA damage, stationary phase and/or cell density) and depends of the host strain. Bioinformatical and transcriptional analyses highlight several differences in their organization (operons, promoters, specific ORFs). However, each of these two ICEs would encode two different regulators, *ci* and *ImmR*, suggesting that a complex and original pathway govern to ICE*St1*' and ICE*St3*' regulation. This regulation would be shared with numerous ICEs that we identified in the genome of various commensal or pathogenic streptococci.

According to the original definition, ICE's maintenance would be exclusively due to their integration in the host chromosome, and ICEs would not be able of extracellular replication. However, in addition to the induction of ICE*St3*' excision and transfer, DNA damage cause replication of its extrachromosomal form. This unexpected property is encoded by the core region and would be implicated in the maintenance of the element.

Comparison with data recently published on other ICEs suggest that intracellular replication could be involved in the maintenance of numerous ICEs, besides their integration.

**Key words** *Streptococcus thermophilus*, Integrative and Conjugative Element, regulation, replication.





Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) sont des îlots génomiques qui codent leur excision du chromosome, leur transfert par conjugaison et leur intégration. Ils présentent une organisation modulaire, chaque module incluant tous les gènes nécessaires pour conférer une fonction biologique. Les ICE sont généralement composés de deux régions : i) une région « core » codant les fonctions nécessaires au transfert et au maintien de l'élément (régulation, conjugaison et excision/intégration) ; ii) une région variable qui code des fonctions pouvant être avantageuses pour l'hôte.

Ce travail a porté sur l'étude de la régulation ainsi que les modalités de transfert et de maintien d'ICES<sub>1</sub> et ICES<sub>3</sub>, deux ICE de *Streptococcus thermophilus* présentant une région core étroitement apparentée et une région variable non apparentée. Les résultats obtenus ont montré que, bien qu'ICES<sub>3</sub> s'excise et se transfère à beaucoup plus haute fréquence qu'ICES<sub>1</sub>, l'excision des deux éléments est activée par des stimuli identiques (dommages à l'ADN, phase stationnaire et/ou densité cellulaire) et est dépendante de la souche hôte. Les analyses bioinformatiques et transcriptionnelles des modules de régulation d'ICES<sub>1</sub> et ICES<sub>3</sub> ont révélé plusieurs différences d'organisation (opéron, promoteur, ORF spécifiques). Cependant, chacun de ces ICE code des homologues de deux types de régulateurs différents, *cl* et *ImmR*, ce qui implique un mécanisme de régulation complexe et original. Cette régulation pourrait être conservée chez de nombreux ICE apparentés identifiés lors de l'analyse *in silico* de génomes séquencés de streptocoques commensaux ou pathogènes.

Selon la définition initiale, les ICE se maintiendraient uniquement sous forme intégrée et ne se répliqueraient pas de façon intracellulaire. Cependant, les dommages à l'ADN induisent non seulement l'excision et le transfert d'ICES<sub>3</sub>, mais aussi sa présence en copies multiples extrachromosomiques (8 copies par chromosome). Les résultats obtenus impliquent une réplication sous forme extrachromosomique, réplication codée par la région core et qui serait impliquée dans le maintien de l'élément.

La comparaison avec des données récentes parues sur d'autres ICE suggère qu'une telle réplication pourrait être impliquée dans le maintien de nombreux ICE en plus de leur intégration.

**Mots clés :** *Streptococcus thermophilus*, élément intégratif conjugatif, régulation, réplication.

Integrative and Conjugative Elements (ICEs) are genomic islands, which excise from the chromosome, self-transfer by conjugation and integrate. They harbor a modular organization: genes and sequences involved in the same biological process are grouped in the same region. Most of the ICEs contain 2 regions: i) a « core » region, which encodes functions involved in the mobility and the stability (regulation, conjugation and excision/integration) ; ii) a variable region encoding functions that can be useful for the host cell.

This work concerns the modality of transfer and maintenance of ICES<sub>1</sub> and ICES<sub>3</sub>, two ICEs of *Streptococcus thermophilus* that share closely related core region. ICES<sub>1</sub> excises much less frequently than ICES<sub>3</sub>. Nevertheless, excision of the two elements is activated by the same stimuli (DNA damage, stationary phase and/or cell density) and depends of the host strain. Bioinformatical and transcriptional analyses highlight several differences in their organization (operons, promoters, specific ORFs). However, each of these two ICEs would encode two different regulators, *cl* and *ImmR*, suggesting that a complex and original pathway govern to ICES<sub>1</sub>' and ICES<sub>3</sub>' regulation. This regulation would be shared with numerous ICEs that we identified in the genome of various commensal or pathogenic streptococci.

According to the original definition, ICE's maintenance would be exclusively due to their integration in the host chromosome, and ICEs would not be able of extracellular replication. However, in addition to the induction of ICES<sub>3</sub>' excision and transfer, DNA damage cause replication of its extrachromosomal form. This unexpected property is encoded by the core region and would be implicated in the maintenance of the element.

Comparision with data recently published on other ICEs suggest that intracellular replication could be involved in the maintenance of numerous ICEs, besides their integration.

**Key words** *Streptococcus thermophilus*, Integrative and Conjugative Element, regulation, replication.