Transfert, accrétion et mobilisation des éléments intégratifs conjugatifs et des îlots génomiques apparentés de "Streptococcus termophilus" : Un mécanisme clef de l'évolution bactérienne ?

Xavier Bellanger

▶ **To cite this version:**

Xavier Bellanger. Transfert, accrétion et mobilisation des éléments intégratifs conjugatifs et des îlots génomiques apparentés de "Streptococcus termophilus" : Un mécanisme clef de l'évolution bactérienne ?. Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10125 . tel-01748335

HAL Id: tel-01748335
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748335

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

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

Nancy-Université
Université Henri Poincaré

Faculté des Sciences – UFR Sciences et Techniques Biologiques

Ecole Doctorale : Biologie, Santé, Environnement

Transfert, accrétion et mobilisation des éléments intégratifs conjugatifs et des îlots génomiques apparentés de *Streptococcus thermophilus* : un mécanisme clef de l'évolution bactérienne ?

Thèse

présentée pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré

en Génomique

par **Xavier BELLANGER**

Soutenance publique prévue le 6 octobre 2009 devant la commission d'examen :

Membres du jury :

Rapporteurs :	E. Carniel	Directeur de Recherche Institut Pasteur, Paris
	P. Renault	Directeur de Recherche INRA, Jouy-en-Josas
Examinateurs :	B. Doublet	Chargé de Recherche INRA, Nouzilly
	P. Leblond	Professeur, Université Henri Poincaré
	B. Decaris	Professeur, Université Henri Poincaré, Directeur de thèse
	G. Guédon	Maître de Conférences, HDR, Université Henri Poincaré, Co-Directeur de thèse

Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR INRA-UHP 1128
Faculté des Sciences – 54506 Vandœuvre-lès-Nancy

Je tiens à remercier Monsieur le professeur Bernard Decaris et Monsieur le professeur Pierre Leblond de m'avoir accueillit au sein du Laboratoire de Génétique et Microbiologie et pour la confiance qu'ils m'ont accordé.

J'adresse également ma reconnaissance à Monsieur le docteur Gérard Guédon pour son encadrement.

Je remercie aussi Monsieur le docteur Axel Cloeckart et Monsieur le docteur Pierre Renault pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Merci également à Madame le docteur Elisabeth Carniel et Monsieur le professeur Pierre Leblond pour avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci à Catherine Morel pour m'avoir mis le pied à l'étrier lors de mon arrivée et pour m'avoir ensuite apporté son soutien technique.

Je remercie Fabien Gonot et Aurore Puymège pour leur participation à l'étude des CIME.

Merci aux membres du laboratoire pour leur amitié et leur sympathie.

Merci à mes amis et à mes proches pour leur soutien de tous les moments.

SOMMAIRE

A. Introduction 11
1 Transfert horizontal 13
2 Ilots génomiques 15
2.1 Définition des îlots génomiques 15
2.2 Les ICE, des îlots génomiques particuliers 16
3 Transfert conjugatif des ICE 23
3.1 Spectre de transfert 23
3.2 Excision de l'ICE, première étape de la conjugaison 23
3.3 Mécanismes de transfert d'ADN 26
3.3.1 Transfert d'ADN simple-brin 27
3.3.2 Transfert d'ADN double-brin 31
4. Maintien des ICE à court terme 32
4.1 Dégradation de l'ADN exogène dans la cellule réceptrice 32
4.1.1 Systèmes de restriction-modification 32
4.1.2 Loci CRISPR 34
4.2 Mécanismes de maintien codés par l'ICE 36
4.2.1 Recombinases à tyrosine 36
4.2.2 Recombinases à sérine 39
4.2.3 Transposases à DDE 39
4.2.4 Réplication sous forme circulaire 40
4.3 Mécanismes de maintien codés par la réceptrice 41
4.3.1 Recombinaison homologue 41
4.3.2 Recombinaison illégitime 42
5 Régulation des ICE 43
5.1 Systèmes bistables et stochasticité 43
5.2 Induction par les conditions environnementales dans lesquelles la possession de l'ICE est avantageuse 44
5.3 Régulation par les agents endommageant l'ADN 44
5.4 Immunité de surconjugaison 48
5.4.1 Immunités de type plasmidique 48
5.4.2 Immunités de type phagique 49
5.4.3 Autres types d'immunités 50
5.5 Quorum sensing 50

6 Mobilisation 52
6.1 Mobilisation en *trans* 52
6.2 Mobilisation en *cis* 53
6.3 Rétrotransfert et rétromobilisation : repolarisation de la conjugaison 54
7. Fonctions intervenants dans le succès évolutif des ICE 55
7.1 Impact de la fonctionnalité des ICE sur leur maintien 56
7.2 Fonctions utiles à l'hôte 56
7.3 Systèmes toxine-antitoxine 57
8. *Streptococcus thermophilus* 59
8.1 Transfert horizontal et polymorphisme 60
8.2 Ilots génomiques de *S. thermophilus* 61
8.2.1 ICE*St1* et les îlots apparentés 61
8.2.2 Modèle d'évolution des ICE par accrétion et mobilisation 63
B. Résultats 69
1 Transfert conjugatif des ICE de *S. thermophilus* 72
1.1 Marquage des ICE 72
1.2 Transfert intra-espèce d'ICE*St1* et d'ICE*St3* 74
1.3 Transfert inter-espèce d'ICE*St3* 76
1.4 Transfert d'ICE*St3* à partir d'*En. faecalis* 77
1.5 Efficacité d'intégration de pNST260+ 78
2 Régulation de l'excision et du transfert conjugatif 81
2.1 Analyse *in silico* des modules de régulation 81
2.2 Impact de traitements à la mitomycine C 85
2.2.1 Impact sur les fréquences d'excision 86
2.2.2 Impact sur la fréquence de transfert d'ICE*St1* et d'ICE*St3* 88
2.3 Implication d'*arp1* dans la régulation de l'excision et du transfert 88
2.3.1 Rôle d'*arp1* dans la régulation de l'excision d'ICE*St1*/ICE*St2* 88
2.3.2 Rôle d'*arp1* dans la régulation de l'excision et du transfert d'ICE*St3* 92
3 Articles traitant de la régulation et du transfert d'ICE*St1* et d'ICE*St3* 95
3.1 Article 1 95
3.2 Article 2 97
4 Accrétion site-spécifique et immunité 99
4.1 Etude de la fonctionnalité des CIME 99

4.1.1 Etude de CIME19258 99
4.1.2 Etude de CIME9 100
4.1.3 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ 102
4.1.4 Excision des CIME en présence de plasmide pNST269+ 105
4.1.5 Localisation du site de coupure décalée au sein des sites *att* 107
4.2 Accrétion site-spécifique entre ICE*St3* et les îlots apparentés 109
4.2.1 Tandems formés de deux ICE 109
4.2.2 Tandems formes d'ICE*St3* et d'un CIME 113
4.3 Immunité de conjugaison et de cible 120
4.3.1 Mise en évidence de deux mécanismes d'immunité 120
4.3.2 CIME19258, CIME9 et immunité de cible 122
4.3.3 Immunité de surconjugaison codée par ICE*St1* 123
4.4 Dynamique des tandems ICE*St3*-CIME 124
4.4.1 Dynamique des tandems CIME19258*cat*-ICE*St3spc* 124
4.4.2 Dynamique des tandems ICE*St3spc*-CIME*L*$_3$*catR*$_3$ 126
4.4.2 Dynamique des tandems ICE*St3cat*-CIME9 127
4.5 Stabilité des tandems 130
4.5.1 Tandems ICE*St3spc*-ICE*St3cat* et ICE*St3spc*-CIME*L*$_3$*catR*$_3$ 130
4.5.1 Tandems CIME19258*cat*-ICE*St3spc* 131
5 Mobilisation conjugative par ICE*St3* 132
5.1 Cotransfert de deux copies d'ICE*St3* 132
5.2 Mobilisation de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ 133
5.2.1 Mobilisation conjugative de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ 133
5.2.2 Rétromobilisation de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ 134
5.3 Mobilisation de CIME19258*cat* et de CIME9 136
5.4 Article 3 traitant de l'accrétion site-spécifique et la mobilisation en *cis* de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ 139
C. Discussion 141
1 Transfert d'ICE*St1* et d'ICE*St3* 144
1.1 ICE*St3* est un élément conjugatif 144
1.2 ICE*St1* : un ICE fonctionnel? 144
1.3 Spectre de transfert 145
2 Régulation des ICE de *S. thermophilus* 148
2.1 *arp1* d'ICE*St1*/ICE*St2* : un répresseur de type cI 148
2.2 Arp1, répresseur de l'excision 150
2.3 *arp2* et *orfQ* : une seconde voie de régulation? 151

2.4 Un système de régulation bistable chez ICE*St3*? 153
2.5 Immunité de surconjugaison 155
3 Conséquences de l'accrétion site-spécifique 156
3.1 Immunité de cible 157
3.2 Dynamique des tandems 159
3.3 Stabilité des tandems 162
3.4 Mobilisation et rétromobilisation en *cis* 163
3.4.1 Transfert de CIMEL_3*catR*$_3$ seul 163
3.4.2 ICE et tandems CIME-ICE : origines des différences entre les fréquences de transfert 167
3.4.3 Rétromobilisation 168
4 Accrétion spécifique : mécanisme majeur d'évolution des îlots génomiques ? 169
4.1 Accrétion impliquant des recombinases à tyrosine 170
4.1.1 Etudes de la formation de tandems 170
4.1.2 Traces d'événements d'accrétion passés 174
4.2 Autres mécanismes d'accrétion spécifique 179
4.2.1 Intégrases site-spécifiques à sérine 180
4.2.3 Accrétions structure-spécifique 184
5 Nature et abondance des CIME 185
5.1 CIME : nouvelle classe d'élément génétique mobile non autonome 185
5.2 CIME, transposon site-spécifique ou IME ? 186
5.3 Répandus mais méconnus : le paradoxe des CIME 187
6 Perspectives 187
6.1 Mise en place du pore de conjugaison et spectre de transfert 187
6.2 Régulation des ICE de *S. thermophilus* 188
6.3 Spécificité d'intégration et immunité de cible 189
6.4 Relaxase, origine de transfert et recombinaison site-spécifique 190
6.5 Mobilisation en *cis* et stabilité 190
D. Références 194
E. Annexes 217

A. Introduction

1 TRANSFERT HORIZONTAL

Si Lamarck a démontré le phénomène d'évolution dès le début du XIX^{e} siècle, ce concept ne s'est imposé qu'avec Charles Darwin et son ouvrage *De l'origine des espèces*. Ce livre présente deux idées fondamentales : l'unité et la diversité du vivant s'explique par l'évolution, et le moteur de l'évolution est la sélection naturelle. Depuis la seconde moitié du XX^{e} siècle, la théorie synthétique de l'évolution regroupe notamment les concepts issus des idées de Darwin et des travaux de Mendel sur la génétique. Selon cette théorie, l'évolution serait causée, d'une part par l'apparition de variations aléatoires dans les allèles d'une population (mutations), et d'autre part par divers mécanismes qui vont modifier la fréquence relative de certains de ces allèles. Le plus important de ces mécanismes, la sélection, implique que les allèles qui favorisent la survie et la reproduction d'un organisme qui les porte voient leur fréquence s'accroître d'une génération à l'autre. Un second mécanisme important mis en jeu, la dérive génétique, correspond à la modification aléatoire de la fréquence d'un allèle au sein d'une population.

Un autre mécanisme jouant un rôle important dans l'évolution des espèces est le brassage génétique qui correspond au réassortiment des allèles existant au sein d'une population. Ce phénomène permet l'apparition de nouvelles combinaisons d'allèles au fil des générations. La reproduction sexuée est un mécanisme efficace de brassage génétique intra-espèce. Ce mécanisme primordial chez les eucaryotes n'existe pas chez les bactéries et les archées. Cependant, au début du XX^{e} siècle, des travaux menés chez *Streptococcus pneumoniae* ont décrit les premiers échanges de gènes entre bactéries (Griffith, 1928). Par la suite, de plus en plus d'échanges intra-espèces et inter-espèces de gènes ont été mis en évidence chez les bactéries et les archées. Ceci a conduit au développement du concept de transfert horizontal. Ce concept décrit tout processus dans lequel un organisme intègre du matériel génétique provenant d'un autre organisme sans en être le descendant.

A partir des années 1980, le transfert horizontal est progressivement apparu comme un mécanisme majeur de l'évolution des bactéries et des archées. Ainsi, la comparaison des génomes de 17 souches d'*Escherichia coli* a montré que seulement 44 % des 5000 gènes qui composent en moyenne un génome sont communs à toutes les souches (Rasko *et al.*, 2008). L'absence ou la présence des autres gènes, dits variables, s'explique par des événements de perte par délétion ou d'acquisition par transfert horizontal. Plus de 10 000 gènes variables différents ont été identifiés au sein de ces 17 génomes d'*Escherichia coli* (Rasko *et al.*, 2008). De plus, chaque souche contient en moyenne 175 gènes variables qui lui sont propres et ont été acquis par transfert horizontal après la séparation d'une souche de toutes les autres souches.

Les transferts horizontaux peuvent se produire entre organismes de la même espèce ou entre organismes très éloignés du point de vue phylogénétique (Mazodier and Davies, 1991). De plus, si ces transferts ont tout d'abord été pensés comme un mécanisme

d'évolution essentiellement procaryotique, de nombreux gènes bactériens issus de transferts inter-espèces ont récemment été mis en évidence au sein de génomes d'eucaryotes (Keeling and Palmer, 2008).

Un transfert horizontal implique trois étapes. Premièrement, un fragment ou une molécule d'ADN doit être transféré d'une cellule à une autre. Cela peut se produire grâce à trois types de mécanismes. Tout d'abord, la transformation, processus codé par les gènes de l'organisme récepteur, correspond à l'entrée dans la cellule d'un fragment d'ADN à l'état libre dans le milieu (Johnsborg *et al.*, 2007). Ensuite, le génome d'un phage tempéré ou des fragments d'ADN chromosomiques peuvent être transféré d'une cellule à une autre grâce à une capside codée par le phage, aboutissant respectivement à l'acquisition d'un prophage par la cellule et à une transduction (Miller, 2001). Enfin, le transfert d'ADN d'une cellule à une autre peut se produire au moyen d'une structure trans-enveloppe mise en place après contact physique entre deux cellules (conjugaison).

Deuxièmement, les gènes transférés doivent être transmis à la descendance de la cellule et de l'organisme qui les a reçus. Ainsi, les fragments d'ADN chromosomique acquis par transfert horizontal peuvent s'intégrer par recombinaison homologue ou recombinaison illégitime grâce à des fonctions codées par les cellules réceptrices. Par ailleurs, la majeure partie des gènes acquis par transfert horizontal est regroupée sur des molécules ou des fragments d'ADN qui portent les gènes nécessaires à leur transfert et leur maintien, appelés éléments génétiques mobiles. Ainsi, les plasmides se maintiennent en contrôlant leur réplication et leur répartition dans les cellules filles. D'autres éléments génétiques mobiles codent leur maintien par intégration ou transposition dans un réplicon selon divers mécanismes. Par exemple, beaucoup d'éléments transposables tels que les séquences d'insertion (IS), codent une transposase possédant un motif constitué de deux résidus aspartate et d'un résidu glutamate (motif DDE) (Polard and Chandler, 1995). D'autres éléments s'intègrent de manière site-spécifique grâce à des recombinases dont l'acide aminé catalytique est, soit une tyrosine, soit une sérine (Sadowski, 1986; Stark *et al.*, 1992).

Troisièmement, pour que les cellules ayant acquis de nouveaux gènes par transfert horizontal puissent être observées dans l'environnement, elles doivent rencontrer un succès évolutif, c'est-à-dire se multiplier de façon plus importante que les cellules n'ayant pas reçu ces gènes. Ceci se produira, par exemple, si les gènes transférés confèrent un avantage sélectif à l'organisme. L'acquisition d'ADN exogène par transfert horizontal peut de ce fait conduire à des évolutions majeures comme la colonisation d'une nouvelle niche écologique ou une modification importante du mode de vie des bactéries et des archées. *Yersinia pestis* est la bactérie responsable de la peste, maladie transmise par les puces de rat et provoquant une septicémie mortelle (Perry and Fetherston, 1997). Des études moléculaires ont montré que *Y. pestis* est issue de *Yersinia pseudotuberculosis*, bactérie pathogène provoquant des gastro-entérites, et que le dernier ancêtre commun des souches de *Y. pestis* est âgé de moins de 20 000 ans (Achtman *et al.*, 1999). L'acquisition de divers éléments par transfert horizontal aurait conduit au changement du mode de vie de cette bactérie. Celle-ci aurait

notamment acquis les deux plasmides pFra et pPst impliqués dans la propagation de la peste par les puces de rat (Perry and Fetherston, 1997).

2 ILOTS GENOMIQUES

2.1 DEFINITION DES ILOTS GENOMIQUES

Les gènes acquis par transfert horizontal ne sont pas distribués de manière homogène dans les génomes. Une grande partie de ces séquences sont groupées sur des plasmides et des régions chromosomiques particulières appelées îlots génomiques. Un îlot génomique a été défini comme une région chromosomique dont les propriétés suggèrent son acquisition par un ou plusieurs événements de transfert horizontal (Hacker and Kaper, 2000; Hacker and Carniel, 2001) :

- Un îlot génomique est une région présente dans le génome de certaines souches d'une espèce et absente du génome d'autres souches de la même espèce ou d'espèces proches, ce qui implique une acquisition récente par transfert horizontal ou une perte récente par délétion.
- La majorité des îlots génomiques présentent des caractéristiques telles qu'un pourcentage en G+C, un biais de GC (GC-skew) ou une utilisation des codons différents de celle du génome de l'organisme dans lequel ils se sont intégrés, suggérant que ces îlots génomiques seraient issus de transferts horizontaux.
- Les îlots génomiques sont fréquemment insérés dans l'extrémité 3' de gènes codant un ARN de transfert (ARNt) et flanqués de répétitions directes, suggérant qu'ils se sont intégrés dans le génome grâce à une recombinase site-spécifique à tyrosine.
- Les îlots génomiques contiennent souvent des gènes de « mobilité » comme des gènes impliqués dans la conjugaison ou des recombinases site-spécifiques (Burrus *et al.*, 2002a; Hanssen and Ericson Sollid, 2006; Manson and Gilmore, 2006). Ceci suggère que les îlots génomiques sont des éléments génétiques mobiles capables de se transférer et/ou de se maintenir par intégration ou des éléments en dérivant.

L'analyse des génomes de bactéries et d'archées a révélé qu'une très grande majorité d'entre eux portent des îlots génomiques acquis par transfert horizontal et que l'acquisition de ceux-ci joue un rôle essentiel dans l'évolution de ces organismes (Dobrindt *et al.*, 2004; Hacker *et al.*, 2004).

Par ailleurs, Hacker *et al.* font une distinction arbitraire entre les « genomic islands », ou îles génomiques, et les « genomic islets », ou îlots génomiques, dont les tailles sont respectivement supérieures et inférieures à 10 kb. Cette distinction n'est pas utilisée en français et le terme d'îlot génomique regroupe ces deux ensembles. Le terme d'îlot était

initialement réservé à des éléments codant des fonctions particulières pouvant être utiles à l'hôte, comme la pathogénicité, et dont le mécanisme de transfert n'était pas connu. Néanmoins, le terme d'îlot génomique pourrait être étendu à différents éléments transférables intégratifs dont le mécanisme de transfert est connu comme les prophages et les transposons conjugatifs puisqu'ils en ont les caractéristiques. En effet, le mode de transfert de l'ADN n'intervient pas dans la définition de ces îlots.

2.2 LES ICE, DES ILOTS GENOMIQUES PARTICULIERS

Certains éléments génétiques mobiles chromosomiques codent les fonctions nécessaires à leur excision sous forme circulaire libre chez l'organisme donneur, leur transfert par conjugaison puis leur intégration dans le génome du receveur. Burrus *et al.* (2002) ont proposé de regrouper l'ensemble des éléments ayant ces caractéristiques sous le nom d'éléments intégratifs conjugatifs ou ICE. La quasi-totalité des ICE code des fonctions qui n'interviennent pas dans leur mobilité et leur transfert mais qui peuvent conférer un avantage sélectif important à l'organisme porteur ou entraîner une modification du mode de vie de celui-ci. Ces fonctions très variées telles que la résistance aux antibiotiques, la résistance aux phages, la pathogénicité ou la symbiose participent à la diversité des ICE (Tableau 1). De plus, ces fonctions étant codées par un à des centaines de gènes, elles peuvent représenter un pourcentage important de la taille de ces éléments dont la longueur varie de 11 à près de 700 kb. Ainsi, les gènes identifiés comme potentiellement impliqués dans la mobilité et le transfert de l'ICE ICE*MlSym*^{R7A} conférant le caractère symbiotique à *Mezorhizobium loti* R7A ne constituent que moins de 15 % de la taille de cet élément de 502 kb (Sullivan *et al.*, 2002). Compte tenu de leurs caractéristiques, les ICE sont donc des îlots génomiques.

Bien que quelques dizaines d'éléments intégratifs conjugatifs seulement aient été décrits (Tableau 1), les rares analyses des génomes faites dans cette perspective ont révélé un nombre de plus en plus important d'ICE putatifs au sein des bactéries. Ces analyses suggèrent également que les ICE sont très répandus. Des ICE confirmés ou putatifs ont notamment été caractérisés dans quatre grandes divisions bactériennes regroupant la majorité des bactéries cultivées, les *Firmicutes* (Burrus *et al.*, 2002a, b), les *Protéobactéries* (Juhas *et al.*, 2007; Juhas *et al.*, 2009; Larbig *et al.*, 2002; Toussaint *et al.*, 2003; van der Meer and Sentchilo, 2003), les *Actinobactéries* (Bentley *et al.*, 2002), et les *Bacteroidetes* (Bacic *et al.*, 2005).

Tableau 1 : Exemples d'éléments intégratifs conjugatifs

ICE[a]	Espèce (super-règne ou division)[b]	Taille (kb)	Fonctions codées par l'élément[c]	Enzyme d'inté-gration[d]	Sites d'intégration[e]	Référence
pNOB8[f]	*Sulfolobus japonicus* (arc.)	33	aucune identifiée	Tyr	extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Glu}	Schleper *et al.*, 1995
pSOG1[f]	*Sulfolobus islandicus* (arc.)	29	aucune identifiée	Tyr	extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Glu}	Erauso *et al.*, 2006
îlot de pathogénicité	*Streptomyces turgidiscabies* (act.)	660	pathogénicité	ND	extrémité 3' du gène codant une lipide kinase putative	Kers *et al.*, 2005
pSAM2[f]	*Streptomyces ambofaciens* (act.)	11	aucune identifiée	Tyr	extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Pro}	Pernodet *et al.*, 1984
SLP1[f]	*Streptomyces coelicolor* (act.)	17	aucune identifiée	Tyr	extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Tyr}	Bibb *et al.*, 1981
BTF-37[f]	*Bacteroides fragilis* (bac.)	52	Tet^{R}	ND	ND	Vedatam and Hecht, 2002
CTn341[f]	*Bacteroides vulgatus* (bac.)	52	Tet^{R}	Tyr	Nombreux sites	Smith *et al.,* 2001
CTnDOT[f]	*Bacteroides sp.* (bac.)	65	Tet^{R} Em^{R}	Tyr	quelques sites (GTTNNTTTGG)	Cheng *et al.,* 2000
CTnPG1-a[f]	*Porphyromonas gingivalis* (bac.)	44	transporteur d'ions Na^{+}	Tyr	extrémité 3' du gène codant une aspartate kinase putative	Naito *et al.*, 2008
Pam100G	*Protochlamydia amoebophila* (chl.)	100	aucune identifiée	Tyr	extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Gly}	Greub *et al.*, 2004
CTn*5*[f]	*Clostridium difficile* (fir.)	31	transporteur ABC	Ser	site unique intergénique	Sebaihia *et al.*, 2006
EfaD2[f]	*Enterococcus faecalis* (fir.)	137	pathogénicité	Tyr	ND	Burrus *et al.*, 2002b
ICE*Bs1*	*Bacillus subtilis* (fir.)	21	aucune identifiée	Tyr	extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Leu}	Burrus *et al.*, 2002b
ICE*Lm1*[f]	*Listeria monocytogenes* (fir.)	21	résistance aux ions Cd^{2+}	Tyr	extrémité 3' d'un gène codant une GMP synthase	Burrus *et al.*, 2002b

Tableau 1 (suite)

ICE[a]	Espèce (super-règne ou division)[b]	Taille (kb)	Fonctions codées par l'élément[c]	Enzyme d'inté-gration[d]	Sites d'intégration[e]	Référence
ICE*St1*[f]	*Streptococcus thermophilus* (fir.)	35	système de restriction/modification *Sth*368I	Tyr	extrémité 3' d'un gène codant une fructose-1,6-diphosphate aldolase	Burrus *et al.*, 2002b
pRS01/facteur sexuel[g]	*Lactococcus lactis* (fir.)	48	résistance au tellure	ND	site unique intergénique	Gasson *et al.*, 1995
Tn*1549*[f]	*Enterococcus sp.* (fir.)	34	Van^R	Tyr	régions riches en A+T	Garnier *et al.*, 2000
Tn*5276*[f]	*Lactococcus lactis* (fir.)	70	utilisation du saccharose et synthèse d'une bactériocine (nisine)	Tyr	plusieurs sites dont un préférentiel	Rauch and de Vos, 1992
Tn*5397*[f]	*Clostridium difficile* (fir.)	21	Tet^R	Ser	site unique	Wang *et al.*, 2000a
Tn*916*[f]	*Enterococcus faecalis* (fir.) *Clostridium difficile* (fir.)	18	Tet^R	Tyr	régions riches en A+T un site préférentiel	Clewell *et al.*, 1995 Wang *et al.*, 2000b
Tn*GBS2*[f]	*Streptococcus agalactiae* (fir.)	34	aucune identifiée	DDE	plusieurs sites dont un préférentiel	Brochet *et al.*, 2008c
ICEF-I[f]	*Mycoplasma fermentans* (fir.)	23	aucune identifiée	ND	plusieurs sites	Calcutt *et al.*, 2002
cluster *tra*[f]	*Rickettsia massiliae* (α)	55	aucune identifiée	Tyr	extrémité 3' du gène codant un $ARNt^{Val}$	Blanc *et al.*, 2007
ICE*Ml*Sym^{R7A}[f]	*Mesorhizobium loti* (α)	502	fixation d'azote atmosphérique et nodulation (symbiose)	Tyr	extrémité 3' du gène codant un $ARNt^{Phe}$	Sullivan *et al.*, 2002
îlot de symbiose	*Azorhizobium caulinodans* (α)	88	nodulation (symbiose)	Tyr	extrémité 3' du gène codant un $ARNt^{Gly}$	Lee *et al.*, 2008
bph-sal	*Pseudomonas putida* (γ)	90	dégradation du salicylate et du biphényle	ND	ND	Nishi *et al.*, 2000
ICE*clc*[f]	*Pseudomonas knackmussii* (γ)	103	dégradation du chlorocatéchol	Tyr	extrémité 3' des gènes codant des $ARNt^{Gly}$	Ravatn *et al.*, 1998a

Tableau 1 (suite)

ICE[a]	Espèce (super-règne ou division)[b]	Taille (kb)	Fonctions codées par l'élément[c]	Enzyme d'inté-gration[d]	Sites d'intégration[e]	Référence
CTn*scr94*	*Salmonella enterica* (γ)	100	utilisation du saccharose	ND	extrémité 3' de deux gènes codant des ARNt^{Phe}	Hocchut *et al.*, 1997
ICE*Ec1*	*Escherichia coli* (γ)	70	prélèvement de fer par sidérophore (pathogénicité)	Tyr	extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Asn}	Schubert *et al.*, 2004
ICE*Hin1056*[f]	*Haemophilus influenzae* (γ)	35	Amp^R	ND	extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Leu}	Dimopoulou *et al.*, 1997
pKLC102[f]	*Pseudomonas aeruginosa* (γ)	104	Sul^R BEt^R Spc^R	Tyr	extrémité 3' de 2 gènes codant un ARNt^{Lys}	Kiewitz *et al.*, 2000
R391[f]	*Providencia rettgeri* (γ)	94	Kan^R Hg^R	Tyr	extrémité 5' du gène codant la protéine RF3	Murphy and Pembroke, 1999
SPI-7	*Salmonella enterica* (γ)	134	synthèse d'une capsule (pathogénicité)	Tyr	extrémité 3' d'un gène codant un ARNt^{Phe}	Pickard *et al.*, 2003
SXT[f]	*Vibrio cholerae* (γ)	100	Suf^R Trm^R Cam^R Str^R	Tyr	extrémité 5' du gène codant la protéine RF3	Waldor, 1996

[a] : L'activité de transfert et/ou d'intégration des éléments soulignés n'a pas été démontrée.

[b] : α, protéobactérie alpha ; γ, protéobactérie gamma ; act., actinobactérie ; arc., archée ; bac., bacteroidetes ; chl., clamydiaceae ; fir., firmicute. Les parasites intracellulaires obligatoires sont soulignés en pointillés.

[c] : Seules les fonctions identifiées pouvant être utiles à la bactérie porteuse de l'ICE sont citées. Amp, ampicilline ; BEt, bromure d'éthidium ; Cam, chloramphénicol ; Em, érythromycine ; Hg, mercure ; Kan, kanamycine ; ND, non déterminé ; Str, streptomycine ; Spc, spectinomycine ; Suf, sulfaméthoxazole ; Sul, sulfonamide ; Tet, tétracycline, Trm, triméthoprime ; Van, vancomycine.

[d] : DDE, transposase à DDE ; ND, non déterminé ; Ser, recombinase à sérine ; Tyr, recombinase à tyrosine.

[e] : ND, non déterminé .

[f] : Divers ICE étroitement apparentés ne sont pas indiqués dans ce tableau.

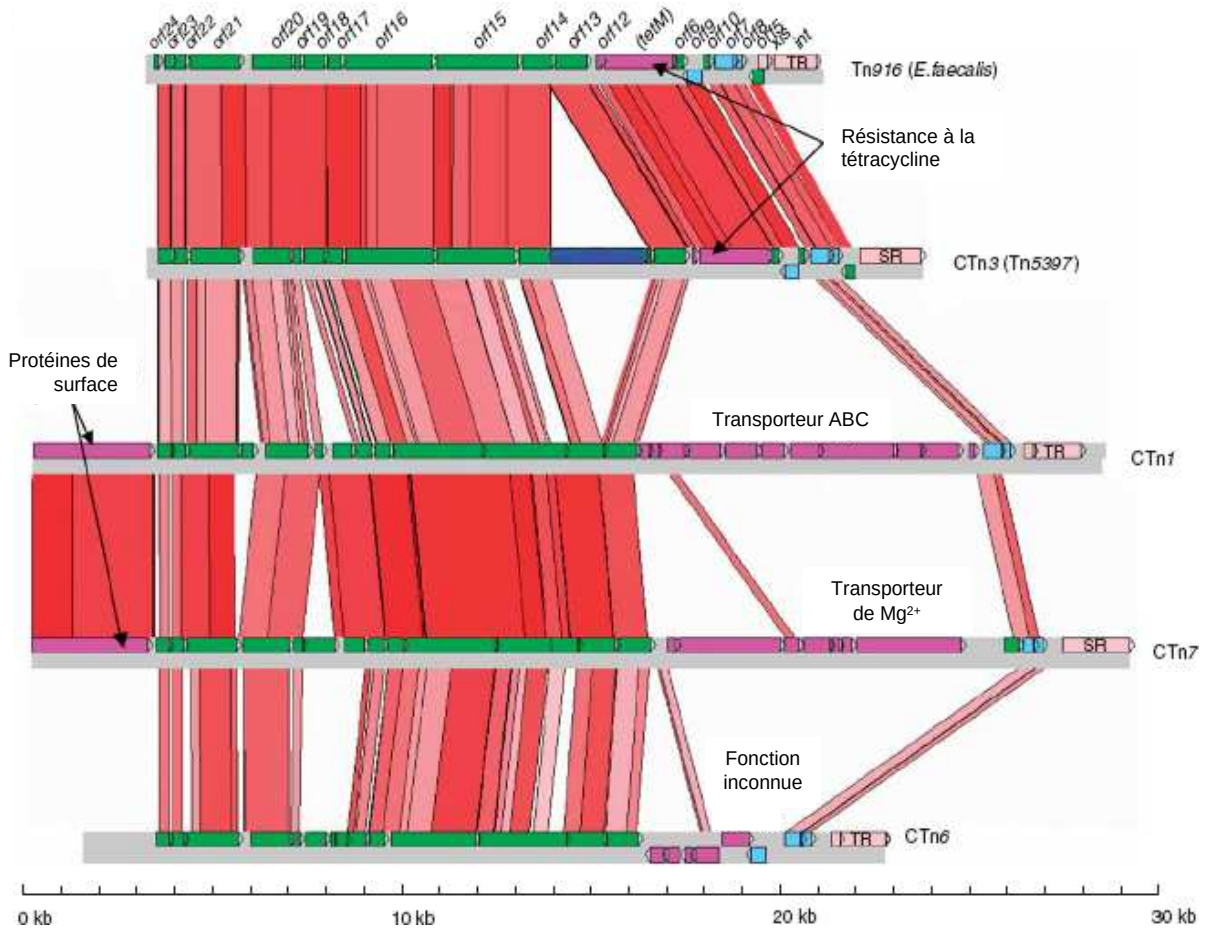
[g] : Les ICE pRS01 et « le facteur sexuel » sont deux éléments très probablement identiques isolés de deux souches dérivant de *L. lactis* NCDO712 par deux équipes différentes.

De plus, si l'on pensait jusqu'à très récemment que les bactéries intracellulaires obligatoires n'évoluaient pas par transfert horizontal, des ICE putatifs ont également été détectés chez *Protochlamydia amoebophila* (Greub *et al.*, 2004), *Mycoplasma fermentans* (Calcutt *et al.*, 2002) et *Rickettsia massiliae* (Blanc *et al.*, 2007). De surcroît, le séquençage récent du génome de la bactérie intracellulaire obligatoire *Orientia tsutsugamushi* Ikeda a mis en évidence 185 copies partiellement délétées d'ICE putatifs étroitement apparentés appelés OtAGE (*Orientia tsutsugamushi* Amplified Genetic Elements) (Nakayama *et al.*, 2008). Ces éléments tronqués totalisent une longueur de 694 kb, soit plus du tiers du génome de la bactérie.

Par ailleurs, bien qu'aucun élément n'ait été décrit comme un ICE chez les archées, divers "plasmides" conjugatifs présents au sein du genre *Sulfolobus* sont également intégratifs (Erauso *et al.*, 2006; Greve *et al.*, 2004; She *et al.*, 2004). Tandis que la plupart de ces éléments sont retrouvés en plusieurs copies libres et une copie intégrée au sein d'une cellule, au moins certains d'entres eux ne se maintiennent que sous une unique copie intégrée dans le chromosome. En conséquence, ces éléments sont des ICE.

Les comparaisons de séquences montrent clairement que les ICE présentent une structure et une évolution modulaires comme les autres éléments génétiques mobiles (Burrus *et al.*, 2002a, b; Toussaint and Merlin, 2002). Les modules sont des régions regroupant les gènes et les séquences intervenant dans une même fonction biologique comme la synthèse d'une capside ou la régulation d'un élément. Ces modules peuvent être échangés entre éléments de même nature ou de nature différente. Ainsi, bien que les protéines codées par les modules de conjugaison, de régulation et de résistance à la tétracycline de Tn*5397*, un ICE de *Clostridium difficile* 630, et Tn*916*, un ICE d'*Enterococcus faecalis*, soient identiques à plus de 80 %, ces deux éléments codent respectivement une recombinase à tyrosine et une recombinase à sérine (Figure 1) (Roberts *et al.*, 2001). 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 : CTn*1*, CTn*6* et CTn*7* (Sebaihia *et al.*, 2006). Ces trois derniers éléments portent également tous, à la place du gène de résistance à la tétracycline, un module qui leur est propre (transporteur ABC, transporteur de Mg^{2+} ou module de fonction inconnue) (Figure 1).

Les recherches d'ICE et d'îlots apparentés réalisées par analyse des génomes séquencés, par puce à ADN ou par étude d'un locus chez de nombreuses souches ont permis de mettre en évidence de nombreux ICE partageant tout ou partie de leurs modules (Bacic *et al.*, 2005; Brochet *et al.*, 2008a; Burrus *et al.*, 2006a; Burrus *et al.*, 2006b; Erauso *et al.*, 2006; Juhas *et al.*, 2007; Pavlovic *et al.*, 2004; Prangishvili *et al.*, 1998; Rice and Carias, 1998; Roberts and Mullany, 2009; te Poele *et al.*, 2008). Ainsi, quatre ICE putatifs apparentés, intégrés dans l'extrémité 3' du $tRNA^{Lys}$ de quatre souches de *Streptococcus agalactiae*, partagent la plupart de leur gènes (Figure 2) (Brochet *et al.*, 2008a). Le partage des modules de conjugaison et/ou des modules de recombinaison par des ICE permet d'inclure ceux-ci au

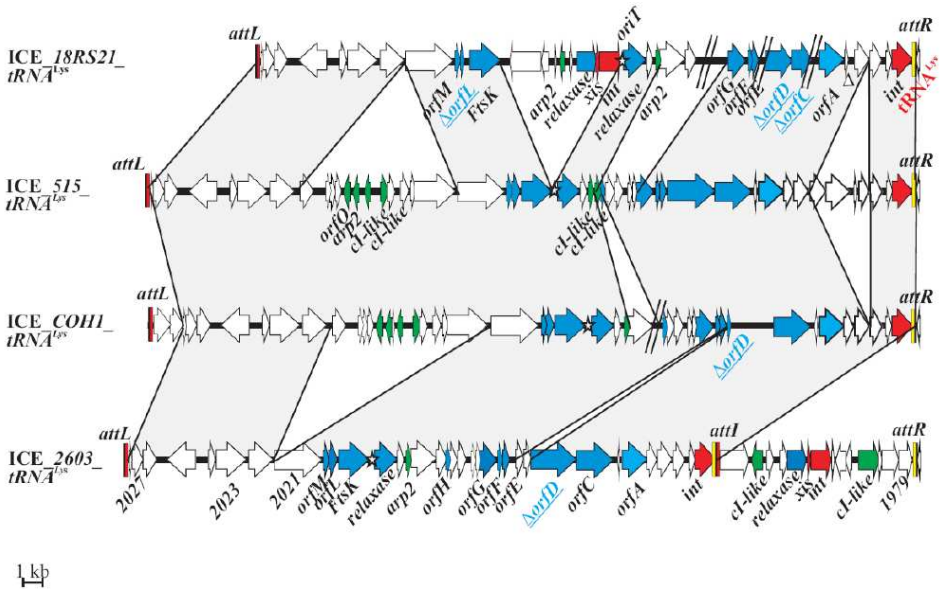


<u>Figure 1</u> : Comparaison de l'ICE Tn*5397* et des ICE putatifs CTn*1,* CTn*6* et CTn*7* de *C. difficile* 630 et de l'ICE Tn*916* d'*En. faecalis* (d'après Sebaihia *et al.*, 2006).

Les barres grises représentent respectivement les brins d'ADN + et - . Les zones rouges représentent les identités entre les protéines codées par les différents éléments. Les ORF appartenant à un même module sont représentés avec la même couleur : vert, conjugaison ; rose, recombinaison ; bleu clair, régulation ; violet, fonctions pouvant être utiles à l'hôte. La région bleue foncée dans Tn*5397* représente un intron de groupe II. Le nom des ORF de Tn*916* et Tn*5397* sont écrits au-dessus des ORF de Tn*916*. SR et TR signifient respectivement recombinase à sérine et recombinase à tyrosine.

sein d'une même famille d'éléments. Ainsi, Tn*916* et les éléments présentés dans la figure 1 appartiennent à une même famille, tandis que les quatre ICE putatifs de *S. agalactiae* appartiennent à une famille différente.

Les divers ICE et ICE putatifs ont été nommés lors de leur découverte en fonction de différents critères basés sur leurs propriétés alors connues de transfert, de maintien et/ou grâce aux fonctions accessoires qu'ils codent. En conséquence, certains termes employés pour désigner ces éléments tels plasmides conjugatifs, transposons conjugatifs ou îlots de pathogénicité sont confus et hétérogènes. La terminologie est parfois amenée à être modifiée au fur et à mesure que des données s'accumulent sur les éléments étudiés. Ainsi, l'îlot génomique de *Mezorhizobium loti* R7A, tout d'abord appelé îlot de symbiose a récemment été renommé ICE*Ml*Sym^{R7A} (Ramsay *et al.*, 2006; Sullivan *et al.*, 2002).



<u>Figure 2</u> : Comparaison des ICE putatifs intégrés dans l'extrémité 3 du tRNA^{Lys} chez quatre souches de *S. agalactiae* (d'après Brochet *et al.*, 2008).

Les noms de chaque élément incluent la nature putative de ceux-ci (ICE), le nom de la souche porteuse et leur site d'intégration. Les ORF des intégrases (*int*) et des excisionases (*xis*) constituant les modules de recombinaison sont indiquées en rouge. Les ORF des modules de conjugaison et de régulation sont respectivement indiquées en bleu et en vert. Les origines de transfert putatives (*oriT*) sont indiquées par une étoile. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles verticaux. Ainsi, les rectangles noirs représentent les séquences identiques présentes au sein des sites *attR*, *attL* et *attI* ; les rectangles jaunes représentent le bras des sites *attR* et les bras correspondant dans les sites *attI* ; les rectangles rouges représentent le bras des sites *attL* et les bras correspondant dans les sites *attI*. Les identités protéiques supérieures à 80 % sont représentées par des zones grises.

3 TRANSFERT CONJUGATIF DES ICE

3.1 SPECTRE DE TRANSFERT

Le spectre de transfert des éléments conjugatifs est extrêmement variable allant d'un transfert au sein de la même espèce à un transfert entre bactéries, archées et/ou eucaryotes.

Certains éléments comme les plasmides pMRC01 de *Lactococcus lactis* ou pMG1 d'*En. faecalis* ne se transfèrent qu'entre souches de la même espèce ou entre espèces proches (Coakley *et al.*, 1997; Ike *et al.*, 1998). De manière similaire, les plasmides conjugatifs à phéromones des entérocoques ne se transfèrent qu'au sein d'un genre (Clewell, 1990).

D'autres plasmides conjugatifs présentent des spectres de transfert très larges. Les plasmides conjugatifs pIP501 et pAMβ1, isolés respectivement chez les bactéries lactiques pathogènes *S. agalactiae* et *En. faecalis*, sont capables de se transférer au sein d'un large éventail de firmicutes (Clewell *et al.*, 1974; Horodniceanu *et al.*, 1976). Le plasmide Ti se transfère quant à lui de la protéobactérie *Agrobacterium tumefaciens* vers de nombreuses espèces de plantes chez lesquelles il va induire la formation d'une tumeur (Nester *et al.*, 2005).

De même chez les ICE, le spectre de transfert est très variable d'un élément à l'autre. Ainsi, si le transfert de l'ICE pRS01 de *L. lactis* n'a été obtenu qu'au sein de cette espèce (Gasson *et al.*, 1995), Tn*916* peut se transférer d'*En. faecalis* vers un grand nombre de firmicutes et diverses protéobactéries et s'y maintenir (Clewell *et al.*, 1995b). Cependant, un coïntégrat de pRS01 avec un plasmide peut se transférer vers *En. faecalis*, suggérant que l'ICE seul peut se transférer vers cette espèce mais qu'il ne peut s'y maintenir après transfert (Belhocine *et al.*, 2007). La plupart des éléments testés se transfèrent au minimum au sein du genre dans lequel ils ont été isolés et les genres proches (Auchtung *et al.*, 2005; Boccard *et al.*, 1989b; Burrus and Waldor, 2003; Burrus *et al.*, 2006a; Shoemaker *et al.*, 2001).

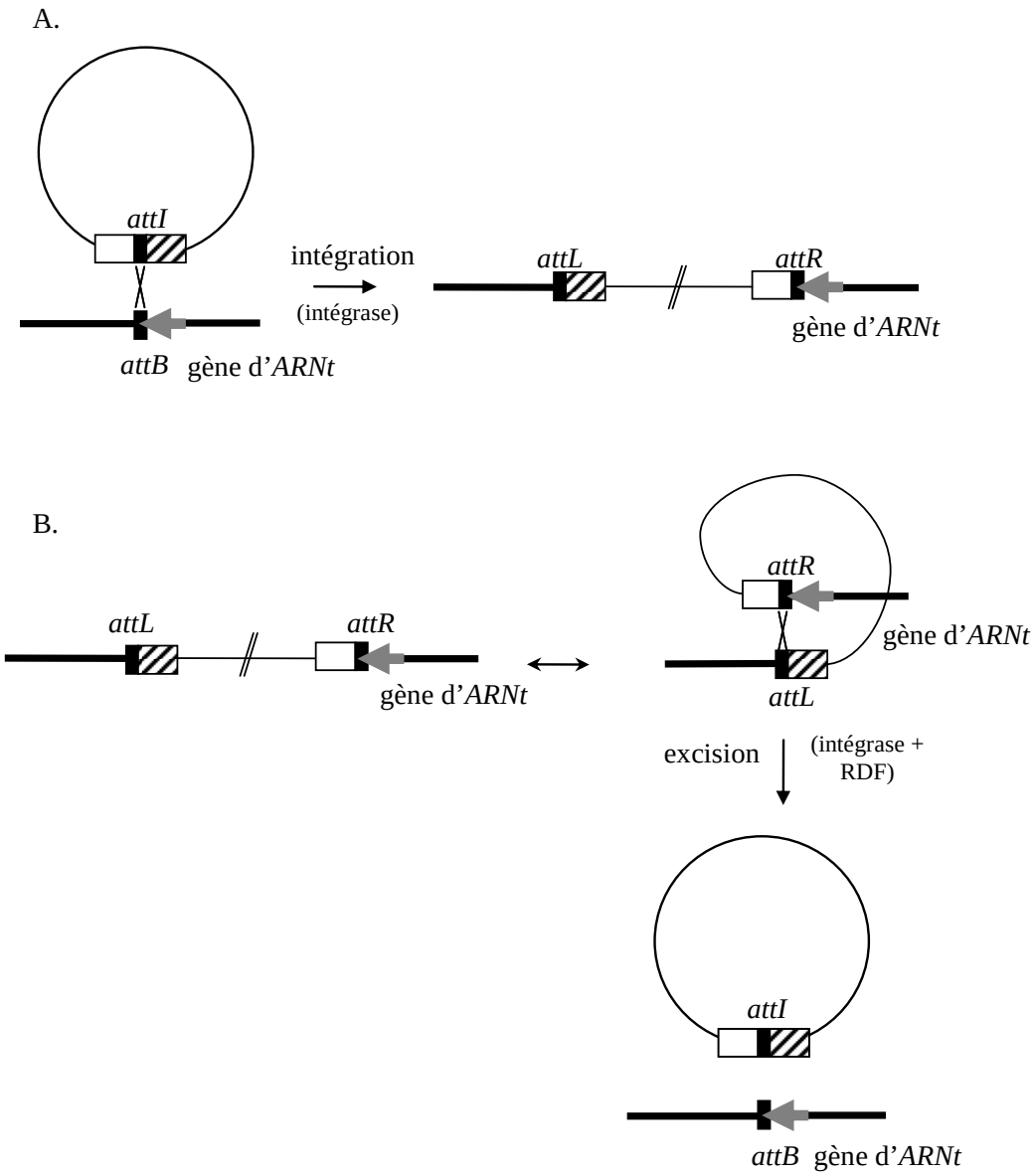
3.2 EXCISION DE L'ICE, PREMIERE ETAPE DE LA CONJUGAISON

La production d'une forme circulaire de l'ICE est catalysée par une enzyme codée par un gène porté par l'élément. Ainsi, la très grande majorité des ICE codent une recombinase site-spécifique à tyrosine. Toutefois quelques ICE codant une recombinase site-spécifique à sérine ou une transposase à DDE ont été identifiés (Tableau 1). Ces différentes enzymes catalysent l'échange de brins conduisant à la formation d'une forme circulaire d'un élément ou à l'intégration de celle-ci (Lewis and Hatfull, 2001; Nagy and Chandler, 2004).

Les recombinases site-spécifique à tyrosine, également appelées intégrases à tyrosine, catalysent l'excision de l'ICE par recombinaison entre deux sites d'attachement *attR* et *attL* qui flanquent l'élément (Figure 3). Cette recombinaison conduit à la formation d'un site *attB* chromosomique et d'un site *attI* (ICE) porté par la forme circulaire de l'élément. La recombinaison se produit habituellement entre deux séquences identiques, l'une portée par le site *attR* et l'autre par le site *attL*. Les deux sites *attB* et site *attI* produits par l'excision possèdent également cette séquence. Ainsi, lorsque les gènes codant les recombinases à tyrosine de CTnDOT, Tn*916,* ICE*Bs1* et ICE*Ml*Sym^{R7A} sont délétés, aucune forme libre de ces éléments n'est détectée confirmant que ces recombinases sont nécessaires pour qu'il y ait excision (Lee *et al.*, 2007; Mullany *et al.*, 2002; Ramsay *et al.*, 2006; Sutanto *et al.*, 2004).

Outre la séquence identique, les sites *attR* et *attL* se caractérisent par des séquences dénommées bras qui portent des répétitions directes et inversées imparfaites où la recombinase à tyrosine et certains cofacteurs protéiques codés par l'élément ou le génome de l'hôte viennent se fixer (Figure 3). Ces mêmes bras se retrouvent de part et d'autre de la séquence identique dans le site *attI* mais sont absents du site *attB*. Les cofacteurs codés par les éléments génétiques mobiles sont de petites protéines acides ou basiques généralement appelées excisionases. Ces cofacteurs contrôlent l'équilibre réactionnel qui, dans une population, détermine la proportion d'éléments sous forme intégrée ou sous forme libre. Ces protéines ont été regroupées sous le terme de « recombination directionality factors » ou RDF (Lewis and Hatfull, 2001). L'excision des phages codant une recombinase à tyrosine est toujours tributaire d'un RDF (Groth and Calos, 2004). Chez les ICE codant une recombinase à tyrosine et dont l'excision a été étudiée, la nécessité d'un RDF a également été mise en évidence (Burrus and Waldor, 2003; Cheng *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2007; Poyart-Salmeron *et al.*, 1989, 1990; Ramsay *et al.*, 2006; Rauch and de Vos, 1994; Storrs *et al.*, 1991; Su and Clewell, 1993; Sutanto *et al.*, 2004). De plus, l'autonomie réactionnelle des recombinases à tyrosine devant les facteurs d'hôte diffère d'un élément à l'autre. Ainsi, si l'excision du phage λ d'*E. coli* nécessite la présence de la protéine IHF, l'excision de l'ICE SXT de *Vibrio cholerae* n'est pas influencée par la présence ou l'absence de cette protéine (Groth and Calos, 2004; McLeod *et al.*, 2006).

Par ailleurs, l'ICE Tn*5397* de *Clostridium difficile* est le seul ICE étudié codant une recombinase à sérine (Wang and Mullany, 2000). Cette enzyme est capable à elle seule de catalyser les événements d'intégration et d'excision de cet élément. Cette indépendance vis-à-vis des facteurs d'hôte est généralement décrite chez les phages codant une recombinase à sérine (Groth and Calos, 2004). Cependant, l'excision du prophage TP901-1 codant une recombinase à sérine nécessite la présence d'un RDF codé par le prophage (Groth and Calos, 2004). D'autres ICE putatifs, tel CTn*5* de *C. difficile* et ICE*Se2* de *Streptococcus equi*, codent



<u>Figure 3</u> : Représentation schématique de l'intégration et de l'excision site-spécifique d'un ICE, catalysées par les recombinases à tyrosine.

A. Intégration. L'intégrase catalyse la recombinaison site-spécifique entre les séquences identiques (représentées par les rectangles noirs) des sites *attI* et *attB* de deux molécules circulaires conduisant à leur coïntégration et à la formation de sites *attL* et *attR*. La séquence identique contient généralement la fin d'un gène d'ARNt. De ce fait, l'intégration ne modifie pas la séquence de ce gène. Les rectangles blancs et hachurés représentent respectivement les bras des sites *attR* et *attL* et leurs équivalents dans le site *attI*.

B. Excision. En présence d'un RDF, l'intégrase catalyse la recombinaison site-spécifique entre les séquences identiques des sites *attI* et *attB* portés par la même molécule d'ADN et orientés dans le même sens. Ceci conduit à l'excision de la séquence contenue entre ces deux sites sous la forme d'une molécule circulaire porteuse d'un site *attI* et à la formation d'un site *attB* chromosomique.

également des recombinases à sérine (Heather *et al.*, 2008; Sebaihia *et al.*, 2006). Aucun RDF putatif n'a été identifié chez ces deux éléments.

En outre, la transposase à DDE codée par l'ICE Tn*GBS2* de *Streptococcus agalactiae* est la seule protéine codée par l'élément dont la présence est nécessaire à la production d'ICE sous forme circulaire (Brochet *et al.*, 2009; Glaser *et al.*, 2002). Néanmoins, chez les séquences d'insertion (IS) qui codent des transposases à DDE, différents facteurs d'hôtes comme les protéines histone-like (IHF, HU, HNS), le système de méthylation Dam, des protéases ou des chaperonines peuvent jouer un rôle important dans la régulation de la transposition (Nagy and Chandler, 2004). De plus, les ICE putatifs ICEF de *Mycoplasma fermentans* et les éléments apparentés ne codent pas de recombinases à tyrosine ou à sérine mais une protéine ayant une faible homologie avec une nouvelle famille de transposase à DDE récemment découverte (Calcutt *et al.*, 2002; Callanan *et al.*, 2008; Marenda *et al.*, 2006).

L'excision de plusieurs ICE codant une recombinase à tyrosine (Tn*1545*, Tn*916*, pSAM2, CTnDOT, SXT, ICE*MlSym*^{R7a}, ICE*Bs1*), une recombinase à sérine (Tn*5397*) ou une transposase à DDE (Tn*GBS2*) est un pré-requis à leur transfert conjugatif (Bringel *et al.*, 1992a; Brochet *et al.*, 2009; Burrus and Waldor, 2003; Cheng *et al.*, 2000; Flannagan and Clewell, 1991; Poyart-Salmeron *et al.*, 1989, 1990; Ramsay *et al.*, 2006; Raynal *et al.*, 1998; Storrs *et al.*, 1991; Wang and Mullany, 2000). De plus, chez Tn*916* et les ICE proches, le module de conjugaison et le promoteur contrôlant l'expression de ce module se situent de part et d'autre du site *attI* présent sur la forme circulaire de l'élément (Celli and Trieu-Cuot, 1998). De ce fait, les gènes codant la machinerie de transfert ne sont exprimés que lorsque ces ICE sont sous forme circulaire. L'excision des ICE apparaît donc comme la première étape nécessaire à leur transfert conjugatif.

3.3 Mecanismes de transfert d'ADN

Le transfert d'un élément génétique par conjugaison nécessite un contact physique prolongé entre une cellule donatrice porteuse de l'élément et une cellule réceptrice. Ce contact permet de finaliser la mise en place d'un pore assurant le transfert d'ADN à travers les membranes et les parois des deux cellules.

Bien que le mode de transfert de peu d'ICE ait été étudié, il semble que la plupart d'entre eux se transfèrent sous forme simple-brin par un mécanisme similaire à celui de la plupart des plasmides conjugatifs. Les ICE des *Streptomyces* et des genres proches se transfèreraient quant à eux sous forme double-brin (Grohmann *et al.*, 2003).

3.3.1 Transfert d'ADN simple-brin

3.3.1.1 Mise en place du pore de conjugaison

Les gènes codant les pores nécessaires au transfert des plasmides conjugatifs et des ICE chez les bactéries Gram négatives sont étroitement apparentés à ceux des systèmes de sécrétion protéique de type IV (T4SS) (Bacic *et al.*, 2005; Christie *et al.*, 2005; Juhas *et al.*, 2008; Lawley *et al.*, 2003; Schubert *et al.*, 2004a). Les T4SS sont impliqués dans l'exportation de protéines de bactéries Gram négatives. Ce sont des structures trans-enveloppe composées de nombreuses sous-unités protéiques s'associant pour former un pore de sécrétion et un pilus (Figure 4).

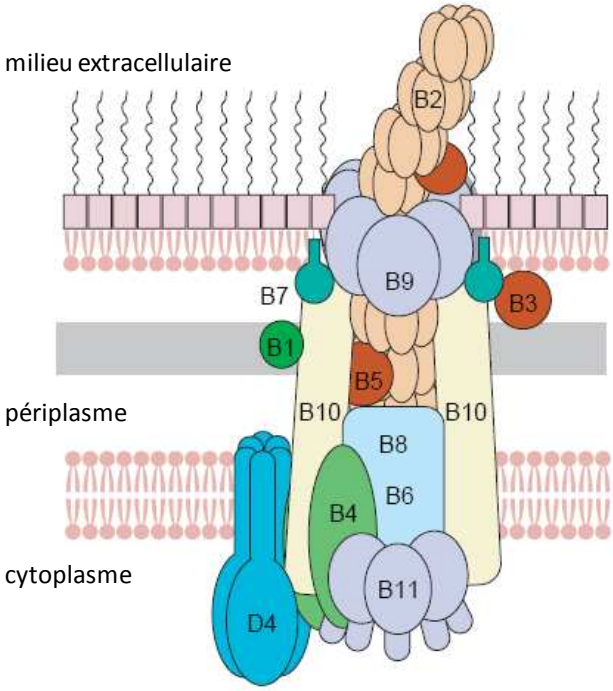


Figure 4 : Représentation du système de sécrétion de type IV (T4SS) de l'élément Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* (d'après Cascales and Christie, 2003 et Li *et al.*, 2005).

La protéine de couplage VirD4 et les ATPases VirB4 et VirB11 sont localisées sur la face cytoplasmique de la membrane interne. VirB6, une protéine très hydrophobe, traverse la membrane interne grâce à plusieurs segments transmembranaires. Les autres protéines constituant le T4SS sont recrutées par VirD4 grâce à leur peptide signal chargé positivement puis dirigées vers le système d'export. Les protéines VirB8 et VirB10 traversent la membrane interne et se localisent à la fois dans le cytoplasme et le périplasme. La protéine VirB1 est une hydrolase du peptidoglycane facilitant la mise en place des protéines du T4SS qui se localisent dans la membrane externe et le périplasme. Les protéines VirB2, VirB3 et VirB5 sont localisées dans le périplasme et les petites lipoprotéines VirB7 et VirB9 forme un complexe localisé dans la membrane externe. La protéine VirB2 est la composante majeure du pilus (piline), les protéines VirB5 et VirB7 jouant un rôle mineur.

La mise en place du pore de conjugaison nécessite un contact physique entre une cellule donatrice et une cellule réceptrice. Ce contact est permis le plus souvent par un pilus dont la base, ancrée dans la membrane interne, est le T4SS lui-même. Le pilus croît grâce à la polymérisation de sous-unités de pilines, se fixe à la cellule réceptrice puis se rétracte grâce à la dépolymérisation des pilines, diminuant ainsi la distance intercellulaire. La rétraction du pilus est supposée être une réponse à la fixation d'une cellule réceptrice à l'extrémité du pilus (Funnell, 2004). Plusieurs pili de T4SS impliqués dans des transferts conjugatifs reconnaissent et se fixent spécifiquement aux lipopolysaccharides des parois bactériennes (Anthony *et al.*, 1994; Ishiwa and Komano, 2004).

Le pilus codé par le plasmide F est une structure filamenteuse d'un diamètre de 8 nm possédant une lumière interne de 2 nm (Funnell, 2004). Des études très récentes ont démontré que cette lumière permet le transport d'ADN simple-brin et son entrée dans la cellule réceptrice dès que le pilus est entré en contact avec celle-ci (Babic *et al.*, 2008; Shu *et al.*, 2008). Une fois que les cellules donatrice et réceptrice ont été rapprochées par la dépolymérisation du pilus, un pore de conjugaison est mis en place. La partie du pore ancrée dans la paroi de la cellule donatrice est constituée par le T4SS. Des mutants de cellules réceptrices présentant une diminution de l'efficacité du transfert du plasmide F par conjugaison n'ont jamais été caractérisés (Funnell, 2004). Ceci suggère qu'aucune protéine codée dans la cellule réceptrice ne soit impliquée dans le transfert et que certaines protéines soient produites chez la cellule donatrice puis exportées vers la cellule réceptrice où elles permettraient de finaliser la mise en place du pore de conjugaison. La protéine de couplage codée par le plasmide F (TraD) est effectivement transférée dans la membrane de la cellule réceptrice lors de la conjugaison (Rees and Wilkins, 1990).

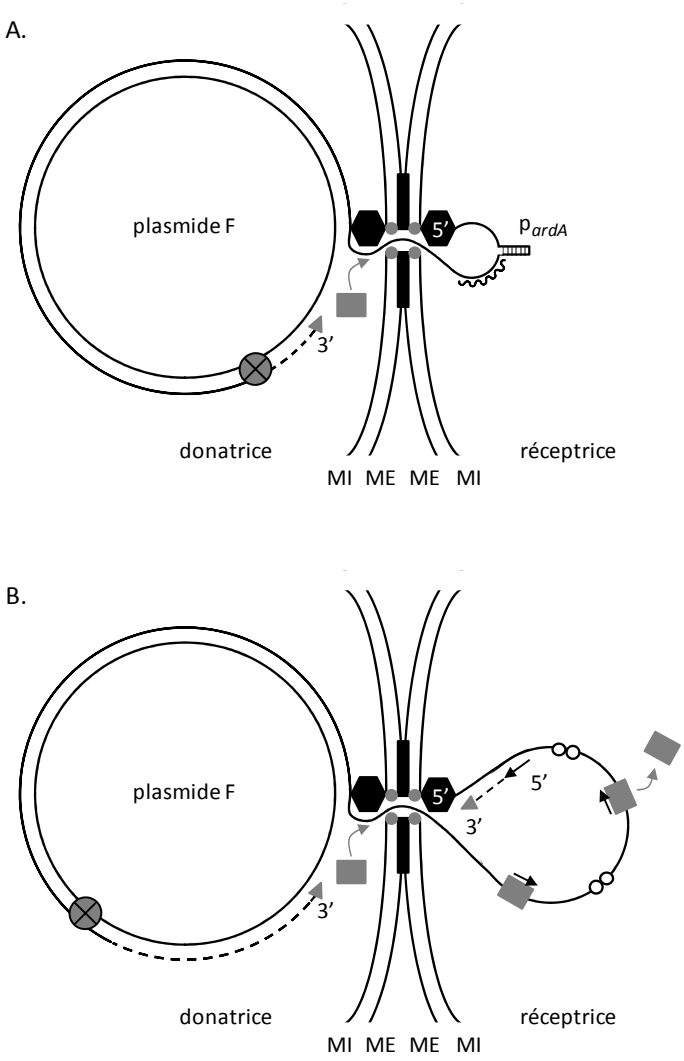
Les plasmides conjugatifs et les ICE de *Firmicutes* et d'Archées ne codent pas de pili directement impliqués dans le transfert conjugatif (Burrus *et al.*, 2002a; Erauso *et al.*, 2006; Greve *et al.*, 2004; Grohmann *et al.*, 2003). Le contact donatrice-réceptrice serait alors aléatoire. Cependant, certains éléments conjugatifs codent des facteurs d'agrégation pouvant améliorer et favoriser les contacts cellule-cellule (Anderson and McKay, 1984; Gasson *et al.*, 1995; Grohmann *et al.*, 2003).

De plus, 1 à 4 des gènes appartenant aux modules de conjugaison des ICE et des plasmides conjugatifs de *Firmicutes* sont homologues aux gènes *virB1*, *virB4*, *virB11* et *virD4* des T4SS de bactéries Gram négatives (Figure 4) (Burrus *et al.*, 2002a, b; Grohmann *et al.*, 2003; Sebaihia *et al.*, 2006). La protéine VirB1 est une hydrolase du peptidoglycane facilitant la mise en place des protéines du T4SS et se localisant dans la membrane externe et le périplasme. La protéine de couplage VirD4 et les ATPases VirB4 et VirB11 sont directement impliquées dans le transport des protéines substrats. Ces quatre protéines constituent une part importante des protéines du T4SS ancrées dans la membrane interne des bactéries Gram négatives. Par ailleurs, les ICE putatifs d'Archées ne possèdent qu'un seul gène homologue à un gène de T4SS, *virD4* (Erauso *et al.*, 2006; Greve *et al.*, 2004).

3.3.1.2 TRANSFERT DE L'ADN

Les bactéries Gram négatives portant des plasmides conjugatifs appartenant aux groupes IncF et IncP semblent capables de détecter la présence de cellules réceptrices par un mécanisme encore inconnu (Funnell, 2004; Kingsman and Willetts, 1978). Cette détection conduit à l'initiation du transfert de ces plasmides. L'action de la relaxase dans cette étape d'initiation puis dans le transfert a été bien caractérisée chez les plasmides apparentés au plasmide F, c'est-à-dire les plasmides appartenant au groupe IncF. Une relaxase est une transestérase catalysant une coupure site-spécifique et brin-spécifique permettant la réplication par cercle roulant nécessaire au transfert d'une molécule d'ADN sous forme simple-brin. Chez les plasmides IncF et IncP, l'action de la relaxase (TraI) nécessite non seulement la protéine histone-like IHF, mais également les petites protéines auxiliaires TraM et TraY codées par le plasmide (Figure 5) (Howard *et al.*, 1995; Karl *et al.*, 2001; Ragonese *et al.*, 2007). Bien que les modules de conjugaison des ICE de la famille de SXT soient apparentés à ceux des plasmides IncF, ils ne codent pas de protéines homologues à TraM et TraY (Beaber *et al.*, 2002b; Boltner *et al.*, 2002). Néanmoins, la présence de la protéine IHF est nécessaire pour que SXT se transfère efficacement à partir *V. cholerae* (McLeod *et al.*, 2006). SXT est le seul ICE chez qui, la protéine IHF a été décrite comme intervenant dans le transfert conjugatif.

Chez les différentes familles de relaxase, 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, ou serait, un résidu tyrosine (Byrd and Matson, 1997; Khan, 1997, 2000; Rocco and Churchward, 2006). Cette réaction conduit à la formation d'une liaison covalente entre le résidu tyrosine de la relaxase et l'extrémité 5' de l'ADN simple-brin. Le monomère de relaxase lié à l'ADN, serait reconnu par la protéine de couplage (TraD) permettant ainsi son transfert à travers le pore de conjugaison (Figure 5). Un second monomère de relaxase permettrait quant à lui, grâce à son activité hélicase, la réplication de l'élément par cercle roulant chez la cellule donatrice (Llosa *et al.*, 2002; Matson *et al.*, 2001). Les protéines de couplage assurent un double rôle dans le transfert d'ADN simple-brin par conjugaison : le couplage des deux machineries impliquées dans le transfert (T4SS et réplication par cercle roulant) et l'activité ATPasique fournissant l'énergie nécessaire au transfert de la molécule d'ADN (Llosa *et al.*, 2002). Ces protéines appartiennent à la famille des protéines SpoIIIE/FtsK qui sont des transporteurs d'ADN impliqués dans de nombreux processus de translocation d'ADN entre compartiments cellulaires (Iyer *et al.*, 2004). Après transfert d'une copie complète de l'élément sous forme simple-brin, un second résidu tyrosine de la relaxase catalyserait la re-circularisation de l'élément transféré (Grandoso *et al.*, 2000). Parallèlement au transfert, l'ADN simple-brin est répliqué soit grâce à une primase codée par le génome de la bactérie réceptrice, soit grâce à une primase codée par l'élément conjugatif chez la donatrice puis transférée vers la réceptrice (Figure 5) (Parker and Meyer, 2005; Rees and Wilkins, 1990; Wilkins and Thomas, 2000). Les primases sont les enzymes qui



<u>Figure 5</u> : Représentation schématique du transfert du plasmide F et de la régulation du gène *ardA* codant une protéine d'antirestriction (d'après Rees and Wilkins, 1990 ; Dreiseikelmann, 1994 ; Byrd and Watson, 1997 ; Wilkins, 2002 ; Llosa et *al*., 2002 ; Matson and Ragonese, 2005).

A. La relaxase TraI déroule la molécule d'ADN double-brin en hydrolysant l'ATP. L'ADN simple-brin est ensuite transféré à la suite de TraI à travers le pore membranaire en partie constitué de la protéine TraD. Le promoteur du gène *ardA* (p_{ardA}) est situé à l'intérieur d'une structure tige-boucle d'environ 300 nucléotides qui ne se forme que lorsque le plasmide est sous forme simple brin.

B. La primase est transférée vers la cellule réceptrice pour synthétiser les amorces ARN permettant la synthèse du brin complémentaire par l'ADN polymérase. La synthèse du brin complémentaire détruit la structure secondaire formant le promoteur du gène *ardA* qui n'est plus transcrit.

Les symbolismes suivant sont utilisés : hexagone noir, relaxase (TraI) ; cercle gris, protéine de couplage (TraD) ; rectangle noir, protéine TraN ; ligne sinusoïde, ARNm du gène *ardA* ; cercle blanc, protéine SSB (single-strand binding) ; rectangle gris, primase ; flèche noire, amorce d'ARN ; triangle gris, ADN polymérase III ; ADN synthétisé *de novo*, pointillés noirs ; rond gris découpé en quartiers, protéines TraM, TraY et IHF.

MI : membrane interne ; ME : membrane externe ; 5' : extrémité 5'-phosphate de l'ADN ; 3' : extrémité 3'-OH de l'ADN.

permettent l'initiation de la synthèse d'ADN en synthétisant une amorce d'ARN complémentaire à l'ADN simple-brin à répliquer.

Les *oriT* d'un petit nombre d'ICE ont été identifiées : Tn*916*, Tn*5252*, pRS01, ICE*Bs1*, CTnERL et les ICE apparentés à SXT (Ceccarelli *et al.*, 2008; Jaworski and Clewell, 1995; Lee and Grossman, 2007; Li *et al.*, 1995a; Mills *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 1994; Srinivas *et al.*, 1997). De plus, bien qu'un gène codant une relaxase putative soit présent chez tous ces ICE, les relaxases et les coupures simple-brin qu'elles catalysent au niveau de ces *oriT* n'ont été caractérisées que chez Tn*916*, Tn*5252* et ICE*Bs1* (Lee and Grossman, 2007; Rocco and Churchward, 2006; Srinivas *et al.*, 1997). Néanmoins, le transfert simple-brin n'a été réellement démontré que pour un seul ICE, Tn*916* (Jaworski and Clewell, 1995). L'implication dans le transfert conjugatif des protéines de couplages putatives identifiées chez les différents ICE n'a jamais été étudiée, bien qu'un gène codant une protéine de cette famille soit toujours présent.

Par ailleurs, bien que des primases putatives aient été identifiées chez l'ICE CTn*341* de *Bacteroides* et l'ICE putatif ICE-A de *Mycoplama agalactiae* se transférant très probablement sous forme simple-brin, leur implication dans la réplication de l'élément transféré n'a pas non plus été étudiée (Bacic *et al.*, 2005; Marenda *et al.*, 2006).

3.3.2 TRANSFERT D'ADN DOUBLE-BRIN

Les plasmides conjugatifs et les ICE des *Streptomyces* et de certaines actinobactéries proches se transféreraient sous forme double-brin (Grohmann *et al.*, 2003). Ce mode de transfert ne nécessite pas la mise en place d'un pore de conjugaison similaire à celui des T4SS. Toutefois, chez divers éléments conjugatifs d'autres actinobactéries, des systèmes de transfert simple-brin apparentés aux T4SS sont impliqués dans des événements de transfert de type Hfr et dans le transfert conjugatif de plasmides (Lee and O'Sullivan, 2006; Parsons *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 2007).

L'ICE pSAM2 de la bactérie filamenteuse *Streptomyces ambofaciens* est l'élément conjugatif se transférant sous forme double-brin dont le transfert est le mieux connu. Après son excision, cet ICE se réplique par cercle roulant dans le mycélium donneur puis se transfère sous forme double-brin. Ensuite, cet élément se réplique de nouveau par cercle roulant dans le mycélium receveur pour permettre l'envahissement de celui-ci (Grohmann *et al.*, 2003; Possoz *et al.*, 2001). Seul le gène *traSA* codant une protéine de la famille SpoIIIE/FtsK, famille incluant les protéines de couplage, est requis pour le transfert intermycélien de cet élément. Le transfert de pSAM2 serait donc comparable au transfert actif de l'ADN de la cellule mère vers la préspore par la protéine SpoIIIE lors de la sporulation de *Bacillus subtilis* (Barre, 2007). Si le transfert intermycélien ne nécessite que le gène *traSA*, la dissémination intramycélienne de l'élément acquis requière également les gènes *spdA*,

spdB, *spdC* et *spdD* (Hagège *et al.*, 1993; Smokvina *et al.*, 1991). Les protéines codées par ces quatre gènes permettraient de mettre en place un transporteur d'ADN au niveau des septa séparant les coenocytes d'un même mycélium.

Les ICE prouvés ou putatifs de *Streptomyces* et des genres proches codent une protéine de la famille SpoIIIE/FtsK de et 3 à 9 protéines potentiellement impliquées dans la dissémination intramycélienne (te Poele *et al.*, 2008). Ces éléments se transféreraient donc par un mécanisme similaire à celui de pSAM2.

4. MAINTIEN DES ICE A COURT TERME

Pour qu'un événement de transfert horizontal soit détectable, il faut que l'ADN nouvellement acquis se maintienne dans la descendance de la cellule réceptrice. Cette acquisition nécessite tout d'abord que l'ADN entrant ne soit pas dégradé et qu'ensuite il soit transmis aux cellules filles lors de la division. Cette transmission peut impliquer soit un mécanisme codé par l'ADN entrant, soit un mécanisme codé par la réceptrice.

4.1 DEGRADATION DE L'ADN EXOGENE DANS LA CELLULE RECEPTRICE

4.1.1 SYSTEMES DE RESTRICTION-MODIFICATION

Immédiatement après son entrée, l'ADN peut être la cible de systèmes de restriction-modification (RM) codés par le génome de la cellule réceptrice. Ces systèmes sont très répandus chez les bactéries et des archées (Chen *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2005; Milkman *et al.*, 1999; Wilson and Murray, 1991). Un système RM comprend le plus souvent deux à trois gènes codant une endonucléase qui clive l'ADN non méthylé au niveau d'un site cible (restriction) et une méthyltransférase qui méthyle ces mêmes sites chez la cellule hôte (modification), protégeant ainsi son ADN de la restriction. Les systèmes RM constituent des mécanismes de défense contre les phages qui identifient et clivent les ADN exogènes double-brin. Cependant, l'ADN étranger peut être occasionnellement méthylé après son entrée dans la cellule, le protégeant ainsi de la restriction (Korona *et al.*, 1993). La grande majorité des éléments conjugatifs se transfèrent sous forme simple brin, ce qui protège l'ADN entrant de la restriction. Cependant, l'ADN de l'élément est ensuite répliqué et peut alors être la cible de l'activité endonucléasique. Néanmoins, la réplication de l'ADN est suivie de sa méthylation, ce qui le rend résistant à la restriction.

Différents mécanismes répertoriés chez de nombreux plasmides conjugatifs et ICE peuvent leur permettre d'échapper aux systèmes RM. Ainsi, Tn*916* code une protéine d'antirestriction de la famille ArdA (Serfiotis-Mitsa *et al.*, 2008), tandis que plusieurs ICE de

S. agalactiae et les ICE étroitement apparentés à Tn*916* codent une protéine ArdA putative (Brochet *et al.*, 2008a; Chilley and Wilkins, 1995; Rice *et al.*, 2007; Roberts and Mullany, 2009). Un domaine de 14 acides aminés portés par ces protéines interagit avec les complexes protéiques formés par les systèmes RM de type I inactivant ainsi leur activité endonucléasique (Wilkins, 2002). Les gènes *ardA*, se situant à proximité des *oriT*, sont parmi les premiers gènes de l'élément transmis vers la cellule réceptrice. Ces gènes sont contrôlés par des promoteurs situés dans une structure secondaire n'existant que lorsque l'ADN est sous forme simple-brin (Figure 5) (Althorpe *et al.*, 1999; Bates *et al.*, 1998; Chilley and Wilkins, 1995; Jaworski and Clewell, 1995). La synthèse du brin complémentaire détruit cette structure empêchant ainsi la transcription des gènes *ardA* qui ne sont donc actifs que lorsque l'élément est sous forme simple-brin, c'est-à-dire lors du transfert conjugatif.

Les protéines ArdC codées par certains plasmides conjugatifs constituent un autre mécanisme d'échappement aux systèmes RM de type I. La seule parenté de ces protéines avec les protéines ArdA réside dans le domaine de 14 acides aminés conférant une activité d'antirestriction (Belogurov *et al.*, 2000). De plus, la protéine ArdC codée par le plasmide pSA le protège également des systèmes RM de type II actifs sur l'ADN simple brin (Belogurov *et al.*, 2000). En effet, certaines endonucléases appartenant à des systèmes RM de type II sont actives sur l'ADN simple-brin et limitent l'acquisition de plasmides se transférant sous cette forme (Horiuchi and Zinder, 1975; Lee *et al.*, 1992; Nishigaki *et al.*, 1985; Ohtani *et al.*, 2008). La protection de l'ADN simple-brin envers ces endonucléases de type II pourrait être une caractéristique générale des protéines ArdC.

Les protéines ArdC possèdent également une région N-terminale apparentée aux domaines des primases, ce qui leur permet de se fixer à l'ADN simple brin (Belogurov *et al.*, 2000). Les protéines ArdC sont probablement produites chez la cellule donatrice et, comme les primases de certains plasmides, transférées avec l'ADN simple-brin par le pore de conjugaison vers la cellule réceptrice où elles confèreraient une protection immédiate vis-à-vis des systèmes RM.

Des protéines ArdC putatives sont codées par de nombreux ICE et ICE putatifs. Les ICE apparentés ICE*KpI* et ICE*EcI* coderaient notamment tous deux une de ces protéines (Lin *et al.*, 2008; Schubert *et al.*, 2004a). De même, des gènes codant une protéine ArdC putative sont présents dans l'ICE ICE*Ml*Sym^{R7A} de *Mesorhizobium loti* et de nombreux ICE putatifs apparentés présents au sein du genre *Mesorhizobium* et des genres proches (Sullivan *et al.*, 2002). Enfin, une protéine apparentée aux protéines ArdC est codée par un ICE putatif de *Mycoplasma agalactiae*, ICEA (Marenda *et al.*, 2006).

D'autres ICE comme pRS01, Tn*GBS1* ou Tn*GBS2* codent également des protéines d'antirestriction putatives portant deux domaines apparentés de façon distante respectivement au domaine d'antirestriction des protéines Ard et au domaine de fixation à l'ADN simple-brin des primases (Brochet *et al.*, 2009; Glaser *et al.*, 2002; Wegmann *et al.*, 2007).

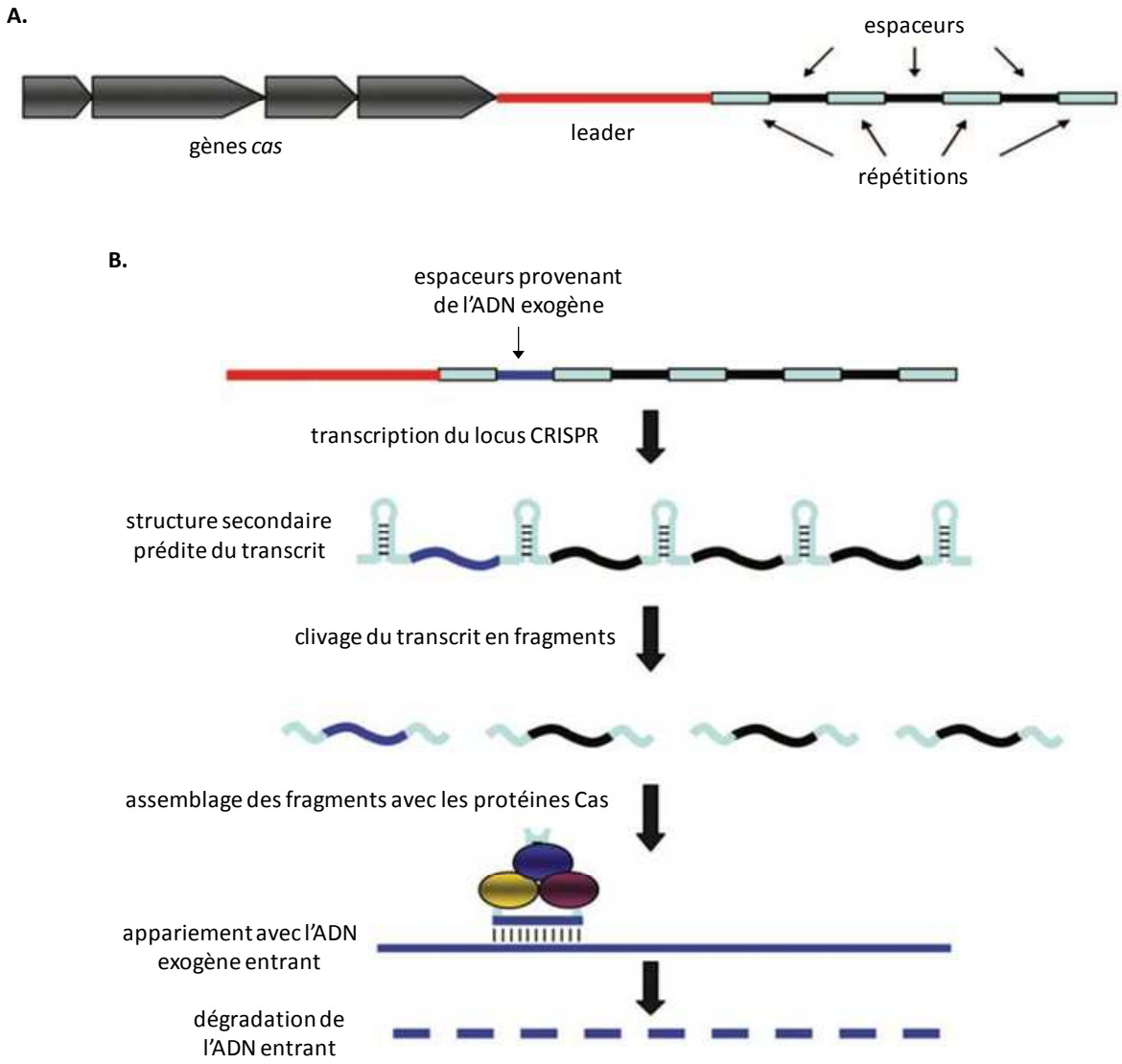
Par ailleurs, certains ICE comme Tn*5252* de *S. pneumoniae*, codent une méthyltransférase à large spectre méthylant de nombreux sites ce qui pourrait les protéger contre des endonucléases ayant différentes spécificités (Ayoubi *et al.*, 1991; Sampath and Vijayakumar, 1998).

4.1.2 Loci CRISPR

Des loci composés de courtes répétitions palindromiques régulièrement espacées (CRISPR) associées à des gènes *cas* (CRISPR associated) sont présents dans près de la moitié des génomes bactériens et dans la quasi-totalité des génomes d'archées (Horvath *et al.*, 2008a; Lillestol *et al.*, 2006; Sorek *et al.*, 2008). Ces loci sont composés de répétitions directes de 24 à 47 pb séparées par des séquences non répétitives de taille similaire appelées espaceurs (Figure 6). Les gènes *cas* confèrent une résistance envers les bactériophages dont le génome possède une séquence quasi-identique à un espaceur présent dans le locus CRISPR qui leur est associé (Barrangou *et al.*, 2007; Deveau *et al.*, 2008; Horvath *et al.*, 2008b). De plus, après une co-culture mettant en présence un bactériophage virulent et une bactérie hôte, des bactéries résistantes ayant acquis de nouveaux espaceurs dérivant du génome du bactériophage apparaissent (Barrangou *et al.*, 2007; Deveau *et al.*, 2008). L'analyse des loci CRISPR d'un organisme permettrait donc de déterminer la nature d'une partie des phages qu'il a rencontré au cours de son évolution.

Certains auteurs avaient proposé que les systèmes CRISPR confèrent une résistance envers les phages par un mécanisme comparable à l'interférence ARN caractérisée chez les eucaryotes (Makarova *et al.*, 2006). Cependant, des travaux très récents ont démontré que les cibles de ces systèmes sont les molécules d'ADN entrantes (Brouns *et al.*, 2008; Marraffini and Sontheimer, 2008) (Figure 6). La région contenant les répétitions palindromiques et les espaceurs serait transcrite sous la forme d'un grand ARNm. Ensuite, certaines protéines Cas matureraient cet ARN en petits fragments, tandis que d'autres s'y associeraient pour former un complexe nucléoprotéique. Enfin, l'appariement de ce complexe avec l'ADN exogène entrant entraînerait la dégradation de ce dernier. D'autres protéine Cas pourraient intervenir dans cette dégradation (Brouns *et al.*, 2008; Makarova *et al.*, 2006; Marraffini and Sontheimer, 2008).

Bien que les loci CRISPR soient généralement décrits comme un système de défense contre les virus, une fraction notable des espaceurs est identique à des séquences ne provenant pas de bactériophages. Ainsi, parmi les espaceurs de *Streptococcus thermophilus*, bien que 75 % soient presque identiques à une séquence de phage de streptocoque, environ 20 % correspondent à une séquence plasmidique de *S. thermophilus* ou *L. lactis* et près de10 % à des séquences chromosomiques (Bolotin *et al.*, 2005; Horvath *et al.*, 2008b). De



<u>Figure 6</u> : Structure (A.) et mode de fonctionnement (B.) des loci CRISPR (d'après Sorek *et al*., 2008 ; Brouns *et al*., 2008 ; Marraffini *et al*., 2008).

A. Structure typique d'un locus CRISPR.
B. Modèle putatif simplifié du mode d'action d'un système CRISPR. La région comportant les répétitions et les espaceurs est transcrite à partir de la région leader sous la forme d'un grand ARN qui adopte une structure secondaire en tige-boucle grâce aux répétitions palindromiques. Certaines des protéines Cas reconnaîtraient la structure/séquence du grand ARN et matureraient celui-ci en petit fragments par clivage. Chaque petit ARN produit contient un espaceur et deux demi-répétitions. Ces petits ARN se complexeraient avec d'autres protéines Cas, s'apparieraient avec l'ADN exogène, ce qui conduirait à sa dégradation, peut-être par d'autres protéines Cas.

même, de nombreux espaceurs identiques à des séquences de chromosomes bactériens, de plasmides, et de plasmides conjugatifs ont été décrits chez les *Actinobactéries*, les *Bacteroidetes*, les *Firmicutes*, les *Protéobactéries* et les archées (Horvath *et al.*, 2008a; Marraffini and Sontheimer, 2008; Mojica *et al.*, 2005). Par ailleurs, les phages, plasmides et plasmides conjugatifs ne se transmettent généralement pas ou ne sont pas présents dans les souches portant des espaceurs les ciblant (Marraffini and Sontheimer, 2008; Mojica *et al.*, 2005). Cela suggère donc fortement que les loci CRISPR confèrent une immunité contre ces éléments.

Une analyse des données publiées sur les espaceurs de type chromosomique de *S. agalactiae* a permis de montrer que 4 d'entres eux ciblent en réalité l'ICE Tn*GBS2* et un autre l'ICE Tn*GBS1*. De même, des espaceurs présents dans un locus CRISPR de *Sulfolobus solfataricus* ciblent l'ICE pNOB8 (Mojica *et al.*, 2005). Les différentes souches contenant ces espaceurs ne portent pas les éléments ciblés. Il est donc probable que le transfert conjugatif des ICE puisse être non seulement limité par les systèmes RM mais également par les systèmes CRISPR.

4.2 Mecanismes de maintien codes par l'ICE

Les ICE codent leur propre maintien par intégration dans un réplicon de la cellule réceptrice. Ces intégrations peuvent impliquer des enzymes appartenant à 3 familles distinctes : les recombinases à tyrosine, les recombinases à sérine et les transposases à DDE. Par ailleurs, certains ICE peuvent se maintenir à la fois sous forme circulaire réplicative et sous forme intégrée. Dans tous les cas, certains gènes de l'élément doivent s'exprimer pour que celui-ci se maintienne.

4.2.1 Recombinases a tyrosine

4.2.1.1 Specificite d'integration

Une très grande majorité des ICE et des ICE putatifs code des recombinases à tyrosine (Tableau 1). Bien que les mécanismes d'échange de brins lors des événements d'intégration et d'excision soient similaires, l'intégration grâce à une recombinase à tyrosine ne nécessite pas de RDF, contrairement à l'excision. Par ailleurs, tandis que la réaction catalysée est identique pour toutes ces enzymes, il existe, comme pour les réactions d'excision, des différences dans les mécanismes réactionnels d'intégration. Ainsi, si l'intégration des phages lambdoïdes et de l'ICE CTnDOT de *Bacteroides* codant tous une recombinase à tyrosine requière la présence du facteur d'hôte IHF, l'absence de ce facteur n'influence pas

l'efficacité d'intégration de l'ICE SXT de *V. cholerae* (Cheng *et al.*, 2002; Groth and Calos, 2004; McLeod *et al.*, 2006).

Les intégrases à tyrosine catalysent une recombinaison site-spécifique entre un site *attB* porté par un réplicon de la réceptrice et le site *attP* (ou *attI*) porté par une forme circulaire de l'élément provoquant ainsi l'intégration de l'élément (Figure 3). Cette intégration conduit à la formation de deux sites *attL* et *attR* flanquant l'élément intégré. Les coupures décalées permettant l'échange de brins et conduisant à l'intégration ou l'excision se produisent entre deux séquences identiques ou quasi-identiques de 6 à 8 pb portées par deux sites d'attachement (Rajeev *et al.*, 2009). Le site *attB* correspond généralement à l'extrémité 3' d'un gène codant un ARNt, et parfois, à celle d'un gène codant une protéine (Tableau 1). Toutefois, l'ICE SXT s'intègre dans l'extrémité 5' du gène *prfC*, qui code la protéine RF3 impliquée dans la terminaison de la traduction (Hochhut and Waldor, 1999). L'ICE pRS01 de *L. lactis* semble quant à lui, s'intégrer dans un site intergénique (Gasson *et al.*, 1995).

Dans la quasi-totalité des cas, l'intégration ne modifie pas la séquence du gène. Le site *attI* des éléments s'intégrant dans l'extrémité 3' d'un gène cible présente généralement une séquence identique à celle de la partie 3' du gène cible de telle sorte que l'insertion reconstitue un gène entier au niveau du site *attR.* Dans le cas de l'ICE SXT, l'intégration modifie la structure 5' du gène *prfC* chez *V. cholerae*. En effet, 9 des 17 acides aminés N-terminal de la protéine RF3 synthétisée sont modifiés à la suite de l'intégration de l'élément SXT. Toutefois, malgré ces substitutions, l'expression et le fonctionnement de la protéine RF3 ne semblent pas modifiés (Hochhut and Waldor, 1999).

Bien que les ICE puissent présenter des spécificités d'intégration très différentes, la grande majorité d'entres eux tels SXT, ICE*Bs1*, pSAM2 ou pNOB8 ne s'intègrent que dans un seul et unique site *attB* par génome (Tableau 1) (Dimopoulou *et al.*, 2002; Hochhut and Waldor, 1999; Lee *et al.*, 2007; Mazodier *et al.*, 1990; Murphy and Pembroke, 1999; Schubert *et al.*, 2004a; She *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2002). Néanmoins, lorsque leurs sites *attB* sont délétés, les ICE SXT et ICE*Bs1* sont capables de s'intégrer au niveau de sites secondaires dont les séquences sont apparentées à celle du site *attB*. (Burrus and Waldor, 2003; Lee *et al.*, 2007). Cependant, la fréquence de recombinaison dans ces sites secondaires est beaucoup plus faible, ce qui conduit également à l'obtention d'une fréquence de transfert réduite par rapport à celle obtenue vers une souche possédant le site *attB*.

Certains ICE présentent des spécificités d'intégration moindre. Ainsi, après son transfert conjugatif l'ICE CTnBST de *Bacteroides* s'intègre à plus de 50 % dans un site nommé *attB1* (Wesslund *et al.*, 2007). Les autres sites d'intégration de l'ICE sont très nombreux mais présentent 12 pb étroitement apparentées au site *attB1*. CTnBST est donc un ICE à intégration site-préférentiel. De plus, lorsque l'ICE Tn*5276* de *L. lactis* se transfère en copie

unique, il s'intègre toujours dans le même site (Rauch and de Vos, 1992b). Par contre, lors des acquisitions multiples de cet élément, si une des copies s'intègre dans le site évoqué ci-dessus, la seconde copie peut s'intégrer dans au moins cinq sites différents (Rauch and de Vos, 1992b). Tn*5276* présente donc également une intégration site préférentielle. En outre, les ICE CTnDOT et CTnERL peuvent s'intégrer quant à eux dans au moins sept sites chromosomique de séquences différentes de *Bacteroides thetaiotaomicron* sans réelle préférence pour l'un d'entre eux (Bedzyk *et al.*, 1992).

D'autres ICE codant une recombinase à tyrosine ont une spécificité d'intégration moindre puisque Tn*916*, Tn*1549* et les ICE apparentés s'intègrent dans un grand nombre de sites (Garnier *et al.*, 2000; Lu and Churchward, 1995). En effet, ces éléments se contentent de cibler les séquences d'ADN riches en A+T qui présentent une courbure naturelle. En conséquence, si les ICE à intégration site-spécifique n'interrompent pas de gène lorsqu'ils s'intègrent, les ICE n'ayant qu'une très faible spécificité d'intégration en interrompent fréquemment. Ainsi, Tn*916* a souvent été utilisé pour réaliser des mutagenèses insertionnelles aléatoires (Catanzano *et al.*, 1998; Hosking *et al.*, 1998; Stingele and Mollet, 1996; Whetzel *et al.*, 2003).

Par ailleurs, les ICE peuvent également avoir une spécificité d'intégration différente chez des réceptrices appartenant à des espèces différentes. En effet, Tn*916* qui s'intègre généralement dans un grand nombre de sites s'intègre dans un site fortement préférentiel chez *C. difficile* (Wang *et al.*, 2000).

4.2.1.2 INTEGRATION DES ICE EN TANDEM

Lors d'un événement de surconjugaison, c'est-à-dire le transfert d'un ICE vers une cellule réceptrice possédant déjà cet élément, l'ICE transféré peut se maintenir en s'intégrant dans un site secondaire ou en s'intégrant en tandem avec l'élément déjà présent. Cette intégration en tandem pourrait résulter d'une recombinaison homologue entre les deux copies de l'ICE ou d'une recombinaison spécifique entre le site *attR* ou *attL* de l'élément résident et le site *attI* de l'élément transféré. Ainsi, 20% des surconjugants obtenus avec l'ICE pSAM2 présentent une intégration en tandem mais cette structure est très instable (Possoz *et al.*, 2001). De même, le transfert de l'ICE SXT vers une cellule portant l'ICE apparenté R391 conduit préférentiellement à l'intégration de SXT et R391 en tandem (Hochhut *et al.*, 2001a). Par ailleurs, des clones de *Pseudomonas knackmussii* présentant des intégrations en tandem instables d'ICE*clc* ont été isolés en présence de chlorobenzène comme seule source carbonée (Ravatn *et al.*, 1998a).

4.2.2 RECOMBINASES A SERINE

Tn*5397* de *C. difficile* est le seul ICE connu s'excisant et s'intégrant grâce à une recombinase à sérine (Wang and Mullany, 2000). De plus, une coupure décalée de 2 pb entre des séquences d'attachement quasi-identiques, caractéristique associée aux recombinases à sérine, a été caractérisée chez cet élément (Smith and Thorpe, 2002; Wang and Mullany, 2000).

Par ailleurs, trois ICE putatifs de *C. difficile* (CTn*2*, CTn*5* et CTn*7*) et l'ICE putatif ICE*Se2* de *Streptococcus equi* codent une recombinase à sérine putative (Heather *et al.*, 2008; Sebaihia *et al.*, 2006). Parmi ces éléments, seul CTn*5* s'excise et ceci grâce à un échange de brin dans une répétition directe de 5 pb (Sebaihia *et al.*, 2006). L'intervention éventuelle de la recombinase à sérine putative codée par cet élément et la taille de la coupure décalée produite lors des événements de recombinaison ne sont pas connues.

4.2.3 TRANSPOSASES A DDE

L'ICE Tn*GBS2* et l'ICE putatif Tn*GBS1* de *S. agalactiae* caractérisés très récemment ne codent pas de recombinase site-spécifique mais s'intègrent et apparaissent sous forme circulaire grâce à un nouveau type de transposase à DDE (Brochet *et al.*, 2009; Glaser *et al.*, 2002). Comme tous les autres éléments génétiques mobiles codant une transposase à DDE, la forme chromosomique de ces éléments est flanquée de répétitions inversées et leur intégration provoque une duplication de la séquence cible (répétitions directes). Bien que les éléments génétiques mobiles codant des transposases à DDE s'intègrent généralement dans de très nombreux sites, certains présentent une spécificité d'intégration plus élevée (Polard and Chandler, 1995). Ainsi, Tn*GBS2* s'intègre dans respectivement 60 % et 20 % des cas dans deux sites préférentiels (Brochet *et al.*, 2009). Dans tous les cas, la répétition inversée droite de Tn*GBS2* est située à 15 ou 16 pb de la boîte -35 d'un promoteur. Une étude transcriptionnelle des gènes sous le contrôle de ces promoteurs a mis en évidence que l'intégration de Tn*GBS2* augmente leur transcription. Bien que les gènes en aval des deux sites préférentiels d'intégration soient impliqués dans le métabolisme des nucléotides, la fonction biologique éventuelle de ces activations transcriptionnelles n'est pas connue.

L'analyse des sites d'intégration de Tn*GBS1* et des IS apparentées a montrée que ces éléments s'intégraient comme Tn*GBS2* à 15 ou 16 pb de la boîte -35 d'un promoteur (Brochet *et al.*, 2009). Cela suggère donc une spécificité d'intégration propre à cette famille de transposases à DDE et un effet similaire de l'intégration de ces éléments sur la transcription des gènes flanquant leur répétition inversée droite.

4.2.4 REPLICATION SOUS FORME CIRCULAIRE

La majorité des ICE ne sont pas capables de se maintenir durablement sous forme circulaire et ne sont transmis à la descendance que sous une unique forme intégrée. Toutefois, le nombre de copies d'ICE*Hin1056* est très variable en fonction de la souche dans laquelle il a été isolé. En effet, ICE*Hin1056* peut être trouvé dans certains cas sous une unique forme intégrée et dans d'autres cas il peut être détecté sous forme intégrée et de nombreuses copies libres par cellule (Dimopoulou *et al.*, 1992). De plus, lorsqu'une cellule ne possédant qu'une forme intégrée d'ICE*Hin1056* est utilisée comme donatrice, les transconjugants obtenus possèdent non seulement la forme intégrée de l'élément mais également de nombreuses formes circulaires (Dimopoulou *et al.*, 1992; Dimopoulou *et al.*, 1997; Leaves *et al.*, 2000). La présence de formes circulaires de l'ICE en haut nombre de copies semble donc être un événement suivant de près son acquisition. Lorsque cet ICE est transféré vers une nouvelle cellule hôte, il est fort probable qu'il existe à proximité une population cellulaire également dépourvue de cet élément. La présence d'un haut nombre de copies libres de l'ICE pourrait favoriser son transfert et permettre l'envahissement de cette population.

Un comportement similaire a été décrit pour l'ICE pNOB8 de *Sulfolobus*. Cet élément est généralement présent sous 3 à 5 copies circulaires et, parfois, une copie supplémentaire sous forme intégrée (She *et al.*, 2004). Toutefois, pendant les quelques générations suivant son transfert, cet élément coexiste sous près de 30 formes circulaires en plus d'une éventuelle forme intégrée (She *et al.*, 2004). Cet état à fort nombre de copies n'est pas durable puisqu'après quelques divisions cellulaires l'élément n'est plus présent qu'en 3 à 5 copies.

Par ailleurs, les ICE apparentés à ICE*Hin1056* et pNOB8 ont la particularité commune de coder des protéines ParA et/ou ParB putatives dont les homologues sont notamment connus comme intervenant dans la partition des plasmides (Dimopoulou *et al.*, 2002; Klockgether *et al.*, 2004; She *et al.*, 1998; Surtees and Funnell, 2003).

La cinétique du transfert conjugatif de l'élément pSAM2 décrite par Possoz *et al* (2001) présente des similitudes avec celle d'ICE*Hin1056* et pNOB8. En effet, pSAM2, présent uniquement sous forme intégrée dans la donatrice s'excise puis se réplique avant de se transférer vers la réceptrice. 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 ici l'envahissement du mycélium receveur.

Ces différentes données suggèrent donc fortement que certains éléments peuvent se maintenir sous forme libre par autoréplication dans certaines conditions. Ces éléments conjugatifs sont donc à la fois des éléments intégratifs et des plasmides. Par ailleurs, le fait

que ces éléments présentent deux états stables pendant lesquels ils sont en fort ou faible nombre de copies suggère qu'ils sont régulés par un système bistable (voir § B.5.1).

4.3 MECANISMES DE MAINTIEN CODES PAR LA RECEPTRICE

Bien qu'un ICE code par définition son propre maintien, un élément transféré peut occasionnellement se maintenir grâce à des mécanismes codés par la cellule réceptrice, l'intégration par recombinaison homologue ou par recombinaison illégitime. Par ailleurs, d'autres mécanismes tels que la formation d'un coïntégrat ICE-plasmide résultant de la transposition réplicative d'une IS portée par l'ICE, un plasmide résident ou le chromosome sont envisageables. En effet, de tels coïntégrats ont déjà été observés (Belhocine *et al.*, 2007). Néanmoins, ceux-ci ont été formés chez des cellules donatrices, c'est-à-dire avant transfert conjugatif.

4.3.1 RECOMBINAISON HOMOLOGUE

La recombinaison homologue joue un rôle essentiel dans le maintien de l'ADN acquis lors de certains événements de conjugaison, comme la mobilisation de type Hfr. Elle nécessite l'intervention de la protéine RecA qui catalyse l'échange de brins, ainsi que la présence de séquences identiques ou quasi-identiques entre les deux molécules partenaires à recombiner. La taille de la région d'identité nécessaire varie en fonction des systèmes étudiés. Toutefois, la fréquence de recombinaison augmente avec la taille de la région homologue considérée. Chez le firmicute *B. subtilis*, des séquences strictement identiques d'au moins 70 pb seraient nécessaires pour observer un événement de recombinaison homologue (Khasanov *et al.*, 1992).

De plus, la recombinaison homologue intervient dans le maintien après transfert de plusieurs îlots génomiques apparentés aux ICE Tn*916*, CTnDOT et ICE*Ec1* (Lesic and Carniel, 2005; Moon *et al.*, 2007; Rice and Carias, 1998). Néanmoins, le fait que certains de ces îlots ne s'excisent pas sous forme circulaire et que le transfert simultané des séquences flanquant ces îlots soit fréquemment observé suggère que ceux-ci se transfèrent par un mécanisme de type Hfr.

Par ailleurs, un élément ICE*Bs1* dans lequel le gène de l'intégrase a été remplacé par le gène de résistance au chloramphénicol *cat* (ICE*Bs1*Δ*int*::*cat*) peut s'exciser lorsqu'un plasmide exprimant l'intégrase est introduit dans la cellule (Lee *et al.*, 2007). Cette même cellule peut alors servir de donatrice. Ainsi, lorsque la cellule réceptrice contient également le plasmide exprimant l'intégrase, l'élément ICE*Bs1*Δ*int*::*cat* se transfère à une fréquence similaire à celle de l'ICE sauvage et s'intègre dans le site *attB* (Lee *et al.*, 2007). Par contre, si

le gène de l'intégrase n'est pas exprimé dans la cellule réceptrice mais que celle-ci contient une copie chromosomique du gène *cat*, des transconjugants sont obtenus à faible fréquence. Chez ces transconjugants, ICE*Bs1*Δ*int*::*cat* ne s'est pas intégré dans le site *attB* par recombinaison site-spécifique mais dans la copie chromosomique du gène *cat* par un mécanisme RecA-dépendant, c'est-à-dire par recombinaison homologue. En effet, lorsque chez une autre cellule réceptrice, la copie chromosomique du gène *cat* interrompt le gène *recA*, aucun transconjugant n'est obtenu.

Aucun autre événement d'intégration d'ICE par recombinaison homologue n'est décrit dans la littérature. Toutefois, les résultats obtenus avec ICE*Bs1* suggèrent que ces événements pourraient être courants.

4.3.2 RECOMBINAISON ILLEGITIME

La recombinaison dite illégitime correspond à des remaniements intra- ou intermoléculaires entre des séquences sans aucune ressemblance ou présentant de courtes séquences identiques. Elle se distingue donc de la recombinaison homologue par cette exigence moindre ou par l'absence d'exigence au niveau de la longueur de la région d'identité entre les ADN partenaires à recombiner. Dans les cas où le mécanisme est clairement identifié, la recombinaison illégitime correspond le plus souvent à des événements résultant de la réparation de cassures d'origines diverses (Pitcher *et al.*, 2007; Shimizu *et al.*, 1997).

Bien que l'intégration de matériel génétique par recombinaison illégitime ait rarement été décrite, des intégrations par recombinaison illégitime d'ADN acquis par transformation ont été mises en évidence chez diverses bactéries (de Vries and Wackernagel, 2002; Desomer *et al.*, 1991; Richardson and Park, 1997). La coïntégration de deux plasmides circulaires et l'intégration d'un plasmide circulaire dans le chromosome par recombinaison illégitime ont également été observées chez *B. subtilis* (Bashkirov *et al.*, 1987; Bashkirov *et al.*, 1988). Cependant, les mécanismes qui provoquent ces événements d'intégration n'ont généralement pas été élucidés.

L'intégrase codée par Tn*916* catalyse les événements d'intégration et d'excision nécessaire au transfert normal de cet élément (Bringel *et al.*, 1992a; Rudy *et al.*, 1997; Storrs *et al.*, 1991). Néanmoins, lorsqu'un plasmide exprimant l'intégrase complémente une souche donatrice portant Tn*916* muté dans le gène codant cette protéine, un transfert à très faible fréquence vers une cellule réceptrice dépourvue d'une copie résidente de cet élément est tout de même observé (fréquence 10^4 fois plus faible que pour l'ICE sauvage) (Bringel *et al.*, 1992a). Bien que cela n'ait pas été testé, il est fort probable que dans la souche donatrice Tn*916* s'excise grâce à l'intégrase codée en *trans* et qu'il puisse ensuite se transférer. Toutefois, après ce transfert vers la cellule réceptrice ne possédant pas préalablement cet

élément, Tn*916* ne peut s'intégrer ni par recombinaison site-spécifique ni par recombinaison homologue. L'hypothèse la plus probable est donc que, dans les transconjugants obtenus, Tn*916* se soit intégré dans le génome par recombinaison illégitime.

Aucun cas ne faisant clairement référence à l'intégration d'un ICE par recombinaison illégitime n'a cependant été rapporté.

5 Regulation des ICE

Les mécanismes mis en jeu et les stimuli impliqués dans l'activation des gènes de régulation chez les divers prophages et plasmides conjugatifs étudiés sont très variés (Adamczyk and Jagura-Burdzy, 2003; Brondsted *et al.*, 2001; Dunny, 2007; Hattman, 1999; Molin and Tolker-Nielsen, 2003; Oppenheim *et al.*, 2005). Si de plus en plus d'ICE et d'ICE putatifs sont décrits, la régulation de l'excision et du transfert de très peu d'entre eux a été étudiée. Cependant, les mécanismes de régulation des ICE étudiés et les stimuli auxquels ceux-ci réagissent sont variés. De plus, un même ICE peut répondre à des stimuli de nature différente. Ainsi, ICE*Bs1* de *B. subtilis* peut être activé par les agents endommageant l'ADN, la phase stationnaire de croissance ou un mécanisme de quorum sensing capable de détecter un environnement contenant une faible proportion de cellules porteuses de l'élément (Auchtung *et al.*, 2005; Auchtung *et al.*, 2007; Bose *et al.*, 2008).

5.1 Systemes bistables et stochasticite

La régulation des phages tempérés, comme λ d'*E. coli* et TP901-1 de *L. lactis*, (Brüssow, 2001; Friedman and Court, 2001) oscille en permanence entre deux états stables (les cycles lysogène et lytique) ; ce type de régulation est donc qualifié de bistable. Chez des cellules isogéniques en conditions normales de croissance, la transition entre les cycles lysogène et lytique des phages λ ou TP901-1 est soumise à un phénomène stochastique(Pedersen and Hammer, 2008; Tian and Burrage, 2004). De même, les mécanismes de régulation de plusieurs types de plasmides conjugatifs constituent des systèmes bistables (Jagura-Burdzy and Thomas, 1994; Kozlowicz *et al.*, 2006).

Le gène régulateur *inR* et le gène de l'intégrase codés par ICE*clc* de *P. knackmussii* sont deux des acteurs d'un système bistable dont l'activation est due à un processus stochastique (Minoia *et al.*, 2008). Ce régulateur code la protéine activatrice contrôlant l'expression du gène de l'intégrase de l'ICE. ICE*clc* n'est activé en phase exponentielle de croissance que dans 3 à 5 % des cellules (Minoia *et al.*, 2008). Cette proportion d'élément actif est similaire à la fréquence de transfert maximale de l'élément (environ 4 x 10^{-2})

suggérant que toutes les cellules activées engagent avec succès un transfert conjugatif (Minoia *et al.*, 2008). Bien qu'ICE*clc* soit le seul ICE chez qui une régulation bistable ait été mise en évidence jusqu'alors, ce mode de régulation est probablement répandu. En effet, les phages λ et TP901-1 codent respectivement un répresseur cI et un répresseur cI-like (Campbell, 1994). Ces deux répresseurs constituent la base des systèmes bistables régulant ces phages. Un répresseur de type cI est retrouvé chez les ICE apparentés à SXT (Burrus *et al.*, 2006b) tandis qu'un répresseur de type cI-like contrôle ICE*Bs1* (Auchtung *et al.*, 2007). Ces différents éléments pourraient donc également être régulés par des systèmes bistables dont la transition serait due à des phénomènes stochastiques.

5.2 Induction par les conditions environnementales dans lesquelles la possession de l'ICE est avantageuse

Le transfert de plusieurs éléments étudiés est activé par les conditions environnementales dans lesquelles la possession de l'ICE confère un avantage sélectif à la cellule hôte. Ainsi, l'expression des gènes de transfert de Tn*916* est induite par la tétracycline, antibiotique envers lequel cet ICE code une résistance (Celli and Trieu-Cuot, 1998). En effet, la présence de tétracycline augmente la fréquence de transfert de Tn*916* d'un facteur 10 à 100 tandis qu'elle n'a aucune influence sur la fréquence d'excision (Celli *et al.*, 1997). De même, la fréquence de transfert de l'ICE CTnDOT de *Bacteroides* codant une résistance à la tétracycline est induite d'un facteur 10^4 par cet antibiotique (Wang *et al.*, 2005; Whittle *et al.*, 2002). En outre, ICE*clc* de *P. knackmussii* code le catabolisme de divers composés chlorés qui peuvent constituer la seule source carbonée utilisée par la bactérie (van der Meer *et al.*, 2001). Le chlorocatécol, un de ces composés, induit l'excision et le transfert conjugatif d'ICE*clc* d'un facteur 100 (Sentchilo *et al.*, 2003; van der Meer *et al.*, 2001).

5.3 Regulation par les agents endommageant l'ADN

Bien que le cycle lytique des deux phages λ et TP901-1 soit induit par les dommages à l'ADN, les voies de régulation de ces deux éléments sont respectivement contrôlées par un répresseur de type cI et un répresseur de type cI-like (Dodd *et al.*, 2004; Madsen *et al.*, 1999). Plusieurs ICE codent des répresseurs de l'un ou l'autre de ces types.

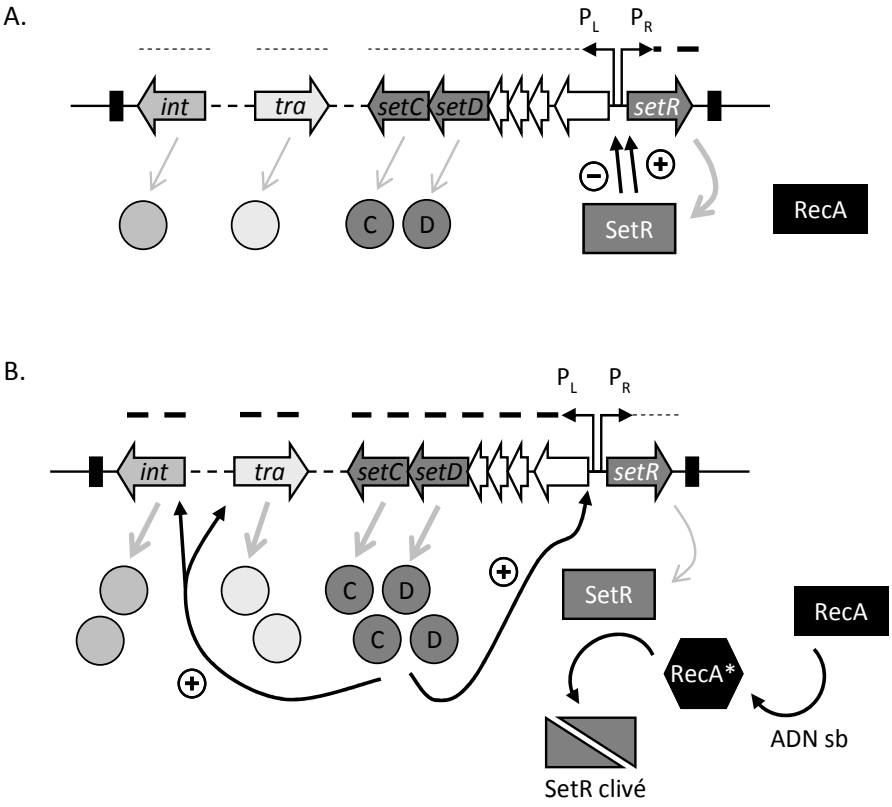
A l'état basal, le transfert de SXT est réprimé par la protéine SetR appartenant à la famille d'autopeptidases comprenant le répresseur LexA du système SOS et le répresseur cI du phage λ d'*E. coli* (Beaber and Waldor, 2004). Les répresseurs de cette famille activent leur propre transcription et inhibent l'expression des gènes activateurs de l'élément (Beaber *et*

al., 2004; Oppenheim *et al.*, 2005). Ainsi, SetR active la transcription de son propre gène et inhibe l'expression des gènes activateurs de l'excision et du transfert, *setC* et *setD* (Figure 7A). Lorsque des rayonnements ultraviolets (UV) ou des antibiotiques 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*) induit la fonction autopeptidase des répresseurs de la famille de cI, dont SetR (Beaber *et al.*, 2004). L'activation de cette fonction par RecA* entraîne la séparation du domaine HTH N-terminal et de la région C-terminale permettant l'oligomérisation des répresseurs (Dodd *et al.*, 2004). La séparation de ces domaines inactive les répresseurs de cette famille. Dès lors, la forme clivée de SetR ne réprime plus les gènes *setC* et *setD* ; et est incapable d'entretenir l'induction de son propre gène (Figure 7B). L'expression de *setC* et *setD* conduit alors à l'excision et au transfert de l'ICE à haute fréquence. Le répresseur *setR* de SXT est donc, comme le répresseur cI chez le phage λ, l'acteur central de la régulation (Beaber *et al.*, 2004).

En conséquence, l'irradiation aux UV d'une souche d'*E. coli* contenant ICE R391, élément apparenté à SXT et codant un répresseur de type cI, provoque une augmentation de la fréquence d'excision de cet élément d'un facteur 4500 (McGrath *et al.*, 2005). De plus, l'activation de SXT et R391 par la présence de mitomycine C ou une irradiation aux UV augmente leur fréquence de transfert d'un facteur 300 (Beaber *et al.*, 2004; McGrath *et al.*, 2005).

Par ailleurs, la protéine ImmR codée par ICE*Bs1* est apparentée aux répresseurs cI-like codés par des ICE divers putatifs et de nombreux prophages de *Firmicutes* tels que TP901-1 (Auchtung *et al.*, 2007; Brochet *et al.*, 2008a; Desiere *et al.*, 2002). Bien que ces protéines ne soient pas apparentées aux répresseurs cI, elles jouent chez les prophages qui les codent un rôle similaire de répresseur central dont l'action est levée en réponse aux dommages à l'ADN. Les mécanismes permettant la levée de répression des prophages ne sont pas connus. Néanmoins, comme les protéines de type cI, les protéines de type cI-like activent leur propre transcription et réprime les gènes activant les éléments (Auchtung *et al.*, 2007; Pedersen and Hammer, 2008). Ainsi, ImmR d'ICE*Bs1* active le promoteur p*immR* et inhibe le promoteur p*xis* (Figure 8A). La fixation d'ImmR sur ces promoteurs conduit à une forte transcription du gène de l'intégrase (*int*) et à une faible transcription du gène de l'excisionase (*xis*) et du module de conjugaison, c'est-à-dire au maintien de l'ICE sous forme intégré. Bien que les répresseurs de type cI et cI-like possèdent tous un domaine HTH de liaison à l'ADN, seuls les répresseurs cI possèdent un domaine autocatalytlique.

Les éléments génétiques mobiles inductibles par les dommages à l'ADN et codant un répresseur de type cI-like possèdent tous un gène codant une protéine à domaine DUF955 (Auchtung *et al.*, 2007; Brüssow and Bruttin, 1995; Madsen *et al.*, 1999). ICE*Bs1* est le seul élément codant un répresseur de type cI-like dont le mécanisme de levée de répression par les dommages à l'ADN a été résolu (Auchtung *et al.*, 2007). La protéine ImmA codée par cet



<u>Figure 7</u> : Modèle de régulation du transfert de SXT par RecA* (d'après Beaber *et al.*, 2002 ; Beaber and Waldor, 2004).

A. A l'état basal la protéine SXT active son propre promoteur et réprime le promoteur des gènes activateurs *setC* et *setD* qui sont faiblement transcrits.
B. En présence d'agents endommageant l'ADN, l'accumulation de fragments d'ADN simple-brin lors de la réplication active la protéine RecA activée (RecA*) qui elle-même induit l'autoprotéolyse de SetR. Cette protéine clivée n'est plus capable d'activer son promoteur et de réprimer les gènes *setC* et *setD*. Les protéines SetC et SetD vont alors activer la transcription de leurs propres gènes, du gène de l'intégrase et des gènes de transfert. Les promoteurs cibles de SetC et SetD ne sont toutefois pas connus.
Les pointillés plus ou moins épais représentent les taux de transcrits. Les flèches grises représentent la traduction des transcrits, les protéines produites étant symbolisées par des cercles. Les flèches noires représentent l'action ou le devenir des protéines. Les triangles gris symbolisent la protéine SetR clivée. Les signe + et – entourés symbolisent respectivement une activation ou une répression de la transcription. Les protéines RecA, SetR et RecA* sont respectivement représentées par deux rectangles et un hexagone. ADN sb symbolise l'ADN simple-brin produit par les agents endommageant l'ADN. *int* et *tra* symbolisent respectivement le gène de l'intégrase et le module de conjugaison.

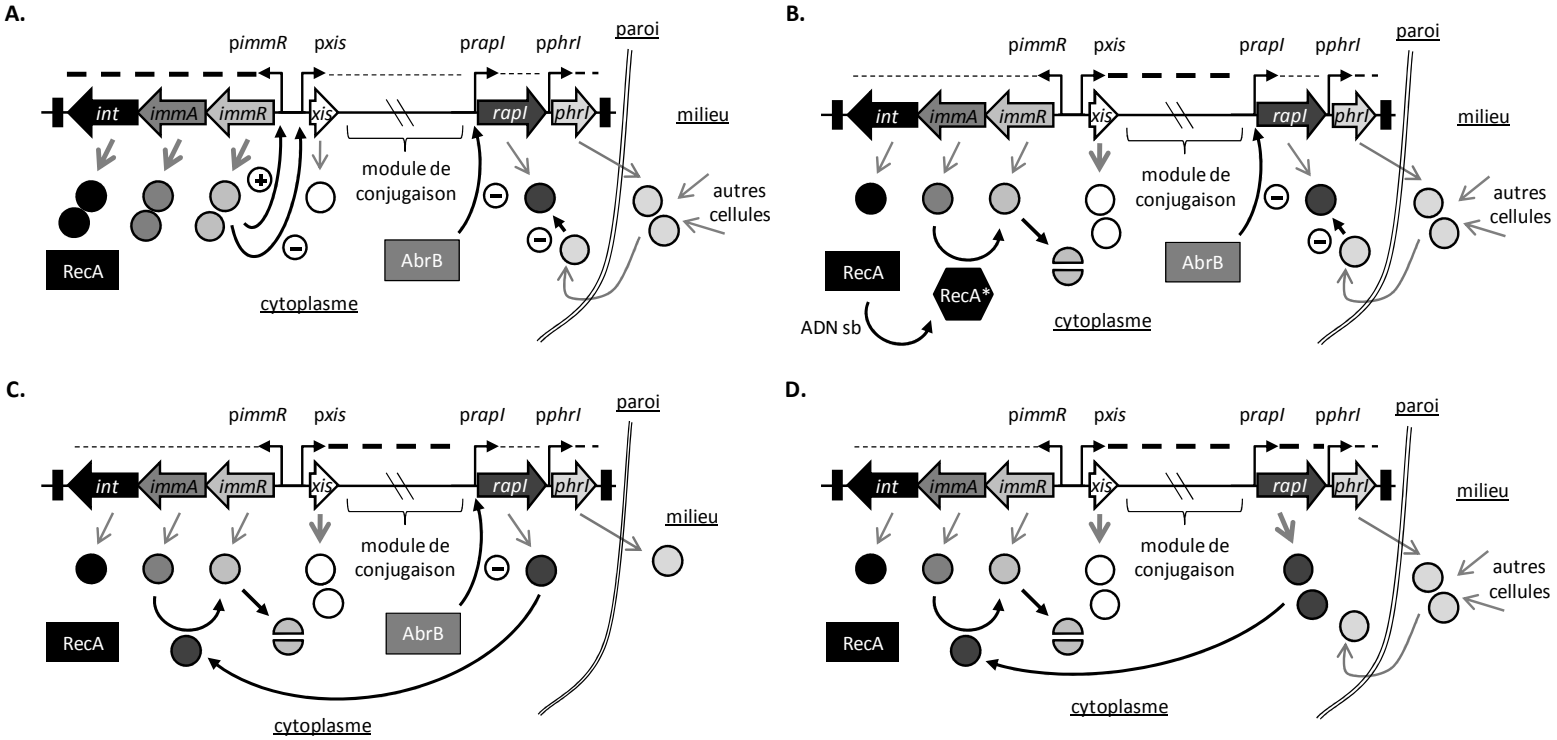


Figure 8 : Modèle de régulation d'ICE*Bs1* à l'état basal (A.) et dérépression par les dommages à l'ADN (B.), la croissance en présence de cellules dépourvues d'ICE*Bs1* (C.) et la phase stationnaire de croissance (D.) (d'après Auchtung *et al.*, 2005 ; Auchtung *et al.*, 2007 ; Bose *et al.*, 2008).

A l'état basal, la protéine ImmR active son propre promoteur et inhibe celui du gène de l'excisionase (*xis*) et du module de conjugaison (A.). Lorsque l'activité protéolytique de ImmA est activée par les dommages à l'ADN et RecA* (B.) ou le système de quorum sensing RapI-PhrI (C.), la protéine ImmR est clivée. Cette forme clivée n'étant plus fonctionnelle, la forte transcription du gène *xis* et du module de conjugaison entraîne le transfert d'ICE*Bs1*. Le gène *phrI* code pour un pentapeptide extracellulaire qui, lorsqu'il est en concentration suffisante, est importé dans le cytoplame où il inhibe le régulateur RapI (A et B). En phase stationnaire de croissance, la protéine AbrB est inactive ce qui permet une plus forte transcription du gène *rapI* et une activation d'ICE*Bs1* (D.).
Les pointillés plus ou moins épais représentent les taux de transcrits. Les flèches grises représentent la traduction des transcrits, les protéines produites étant symbolisées par des cercles. Les flèches noires représentent l'action ou le devenir des protéines. Les demi-cercles symbolisent la protéine ImmR clivée. Les signe + et – entourés symbolisent respectivement une activation ou une répression de la transcription. Les protéines RecA, AbrB et RecA* sont respectivement représentées par deux rectangles et un hexagone. ADN sb symbolise l'ADN simple-brin produit par les agents endommageant l'ADN.

élément ne possède qu'un seul domaine, DUF955. Bose *et al.* (2008) ont récemment démontré que cette protéine est une protéase qui, activée en réponse aux dommages à l'ADN et à la production de RecA*, clive le répresseur ImmR (Figure 8B). Cette protéolyse conduit à la levée de la répression des gènes de l'excisionase et du module de conjugaison d'ICE*Bs1* et au transfert conjugatif de cet élément.

5.4 IMMUNITE DE SURCONJUGAISON

L'immunité désigne l'ensemble des mécanismes codés par un élément génétique mobile et limitant l'acquisition par la cellule hôte d'un élément étroitement apparenté ou d'une seconde copie de cet élément. Les phénomènes ont été largement décrits chez les plasmides conjugatifs et les prophages. La présence d'une immunité n'a été étudiée que chez un très petit nombre d'ICE. L'ICE Tn*916* et les éléments apparentés présents chez de nombreux firmicute*s* ne présentent aucune immunité (Norgren and Scott, 1991). Il est donc fréquent de trouver des souches présentant plusieurs copies d'un même élément ou d'éléments apparentés (Bringel *et al.*, 1992b; Spigaglia *et al.*, 2006). Cependant la plupart des ICE testés code des systèmes d'immunités apparentés à ceux des plasmides conjugatifs ou à ceux des prophages.

5.4.1 IMMUNITES DE TYPE PLASMIDIQUE

Deux types d'immunité sont généralement décrits chez les plasmides conjugatifs : l'inhibition de la formation du pore entre cellules donatrices et réceptrices (exclusion de surface) et l'inhibition de l'entrée de l'ADN dans la cellule réceptrice (exclusion d'entrée).

Deux protéines codées par le plasmide F sont impliquées dans la prévention des échanges entre cellules donatrices. La protéine TraT, localisée dans la membrane externe, inhibe la stabilisation d'un pore de conjugaison entre cellules donatrices ce qui provoque une diminution de la fréquence de transfert du plasmide F d'un facteur 20 (Achtman *et al.*, 1977; Achtman *et al.*, 1980). Cette protéine est donc responsable d'une exclusion de surface. Toutefois, la nature des protéines du pore interagissant avec TraT est inconnue (Garcillan-Barcia and de la Cruz, 2008). L'action des protéines TraT envers le plasmide qui les codent est hautement spécifique. Ainsi, la protéine TraT purifiée du plasmide F inhibe le transfert de cet élément trois fois plus que la protéine TraT du plasmide R100 bien que ces protéines ne diffèrent que d'un seul acide aminé. Bien que certains gènes apparentés à la famille des gènes *traT* soient chromosomiques, aucun n'a été localisé au sein d'un ICE (Garcillan-Barcia and de la Cruz, 2008).

La protéine TraS codée par le plasmide F est localisée dans la membrane interne d'*E. coli* (Achtman *et al.*, 1977). Elle inhibe l'entrée de l'ADN dans des cellules donatrices déjà porteuses du plasmide en interagissant avec la protéine TraG également localisée dans la membrane interne (Anthony *et al.*, 1999; Audette *et al.*, 2007). Cela conduit donc à une exclusion d'entrée. Contrairement à *traT*, des gènes *traS* ont été identifiés au sein de certains ICE. En effet, chez SXT et les ICE apparentés, 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 (Marrero and Waldor, 2005, 2007b). Les deux ICE apparentés SXT et R391 ne présentent pas d'immunité croisée. Néanmoins, l'exclusion entre deux copies d'un même élément aboutit à une diminution de la fréquence de transfert d'un facteur 15 à 40 (Hochhut *et al.*, 2001b; Marrero and Waldor, 2005). L'analyse des couples d'allèles Eex/TraG de 21 ICE de la famille SXT/R391 a permis de démontrer l'existence de deux groupes d'exclusion différents : S (SXT) et R (R391). Les ICE appartenant à un même groupe vont s'exclure mais non ceux appartenant à l'autre groupe (Marrero and Waldor, 2007a).

5.4.2 Immunites de type phagique

Seuls certains types d'immunité associés aux phages ont été caractérisés chez les ICE. Plusieurs phénomènes conduisant à une immunité envers les phages tels que l'inhibition de l'adsorption ne sont pas transposables aux ICE. D'autres phénomènes d'immunité potentiellement transposables, comme l'inhibition de l'intégration de l'élément près d'un élément déjà intégré (immunité de cible) décrite chez certains transposons et phages codant des transposases à DDE, n'ont pas été caractérisés chez les ICE, quel que soit l'enzyme servant à leur intégration (Adzuma and Mizuuchi, 1988; Maxwell *et al.*, 1987; Skelding *et al.*, 2003; Stellwagen and Craig, 1997a, b).

Un autre type d'immunité associé aux prophages est lié aux répresseurs cI et cI-like. (Birge, 1994; Madsen *et al.*, 1999). Ces deux types de protéines sont responsables du maintien de la lysogénie des prophages. En effet, ils répriment directement ou indirectement la quasi-totalité des gènes du phage mais induisent leur propre transcription. Le génome d'un second phage entrant dans la cellule se verra donc réprimé et inactivé par le prophage résident. Néanmoins, ces systèmes présentent généralement une haute spécificité, un prophage ne conférant une immunité qu'envers un phage très proche. Ainsi, bien que les phages λ et 434 soient étroitement apparentés, l'infection par un de ces phages ne confère aucune immunité envers l'autre. De plus, un phage λ dont le module de régulation a été remplacé par celui du phage 434 infecte de la même manière les cellules qui

contiennent ou non un prophage λ (Birge, 1994). Ce phage recombinant subi par contre une immunité lorsque les cellules à infecter contiennent le prophage 434.

Bien que la famille d'ICE SXT/R391 code des répresseurs de type cI, la seule immunité codée par ces éléments provient du système d'exclusion Eex/TraG sans aucune intervention des répresseurs de type cI (Beaber *et al.*, 2002b; Marrero and Waldor, 2005, 2007a). Au contraire, le répresseur de type cI-like codé par ICE*Bs1* de *B. subtilis* (ImmR) est responsable d'une immunité de surconjugaison (Auchtung *et al.*, 2007). En effet, la fréquence de transfert d'ICE*Bs1* est réduite d'un facteur 10^3 si la réceptrice contient déjà une copie de cet élément ou du gène *immR*. Comme pour les phages, cette immunité découle de la répression de l'ICE entrant par l'ICE résident. Ainsi, la répression du gène codant l'intégrase de l'ICE entrant empêche son intégration et son maintien.

5.4.3 Autres types d'immunites

Des immunités non apparentées à celle des plasmides ou des phages ont également été décrites chez les ICE. Ainsi, l'ICE pSAM2 code une protéine, Pif, impliquée dans une immunité de surconjugaison (Possoz *et al.*, 2003). Cette protéine possédant un domaine nudix appartient à une famille d'hydrolases, mais son mode d'action réel est inconnu. Sa présence chez la bactérie réceptrice inhibe l'excision et l'initiation du transfert de pSAM2 chez la donatrice réduisant l'efficacité de transfert d'un facteur 2×10^3.

5.5 Quorum sensing

Le quorum sensing est un mécanisme de régulation qui contrôle certains gènes bactériens en synchronisant leur expression ou leur répression en fonction de la densité de la population bactérienne. Ce mécanisme repose sur la capacité de bactéries à communiquer entre elles grâce à des molécules signal.

Trois types de mécanismes de quorum sensing codés par certains éléments conjugatifs leur permettent de percevoir leur environnement. Le premier de ces types contrôle la régulation des plasmides conjugatifs d'entérocoques apparentés à pCF10 (Dunny, 2007). Ces plasmides ont la particularité de coder un système de quorum sensing reconnaissant spécifiquement la présence de cellules réceptrices grâce aux phéromones qu'elles produisent et d'être activés par celles-ci. Les plasmides conjugatifs tels p42a de *Rhizobium etli* codent quant à eux un second type de mécanisme leur permettant de détecter la forte concentration extracellulaire d'une molécule effectrice codée par l'élément

lui-même et d'être activés par celui-ci (Tun-Garrido *et al.*, 2003). Par ailleurs, bien que le plasmide pAW63 de *Bacillus thuringiensis* code également un système lui permettant de détecter la présence d'un effecteur qu'il code dans le milieu extracellulaire, la forte concentration de cette molécule va dans ce cas inhiber le transfert du plasmide (Van der Auwera and Mahillon, 2008).

Parmi les ICE prouvés ou putatifs, certains codent ou coderaient un mécanisme de quorum sensing. ICE*Mlsym*^{R7A} code un système similaire à celui du plasmide p42a. En phase exponentielle de croissance, la proportion de cellule contenant ICE*Mlsym*^{R7A} sous forme excisée est d'environ 0,02 % tandis qu'en phase stationnaire cette proportion s'élève à 10 % (Ramsay *et al.*, 2006). Les gènes *traR* et *traI2* codés par cet ICE sont homologues aux gènes *luxR* et *luxI* constituant un système de quorum sensing permettant, à haute densité cellulaire, d'induire la bioluminescence chez *Vibrio fischeri* (Dunlap, 1999). Lorsque les gènes *traR* et *traI2* sont exprimés de façon constitutive chez les cellules de *M. loti* contenant ICE*Mlsym*^{R7A}, une forte quantité de peptide inducteur TraI2 est produite dans le milieu extracellulaire ce qui conduit à l'excision de l'ICE dans 100 % des cellules (Ramsay *et al.*, 2006). Le système TraR-TraI2 régule donc l'excision d'ICE*Mlsym*^{R7A}. Ceci suggère que ce système pourrait également réguler le transfert de l'élément.

Par ailleurs, ICE*Bs1* code un système de quorum sensing de type Rap-Phr, nommé RapI-PhrI, qui peut conduire sous certaines conditions à la levée de la répression du transfert de cet élément. par quorum sensing (Auchtung *et al.*, 2005). Les systèmes de ce type n'ont été trouvés qu'au sein du genre *Bacillus*. Ils font partie intégrante de phosphorelais contrôlant la phase d'initiation de la sporulation, la compétence et la production d'antibiotiques (Perego and Brannigan, 2001). Le premier gène de ces systèmes, *rap*, code une aspartate phosphatase qui déphosphoryle certains régulateurs transcriptionnels, ce qui les inactive. Le second gène, *phr*, code pour un prépeptide exporté dans le milieu extracellulaire par le système Sec sous la forme d'un pentapeptide, puis réimporté dans le cytoplasme par des oligoperméases. Lorsque les pentapeptides Phr sont en concentration suffisante dans le cytoplasme, ils inhibent l'activité phosphatase des protéines Rap en se fixant sur celles-ci (Figure 8A). Les protéines Rap ne peuvent alors pas agir sur leurs protéines cibles. Au contraire, lorsque les pentapeptides Phr sont en faible concentration dans le cytoplasme, les protéines Rap ne sont plus inhibées et agissent sur leurs protéines cibles (Figure 8C). Un génome de *Bacillus* code plusieurs systèmes Rap-Phr. Chaque couple Rap-Phr interagit avec une très haute spécificité, ce qui empêche les interactions croisées entre les différents systèmes. Par ailleurs, la protéine AbrB est un régulateur inactif en phase stationnaire de croissance mais qui, en phase exponentielle, réprime de nombreux gènes de *Bacillus* dont les gènes *rap* (Phillips and Strauch, 2002).

Deux types d'événements peuvent conduire à une levée de la répression d'ICE*Bs1* par le système RapI-PhrI. Tout d'abord, lorsqu'une bactérie portant ICE*Bs1* croît parmi une population globalement dépourvue de cet élément, la concentration de pentapeptide PhrI

est faible. Cette faible concentration n'est pas suffisante pour inactiver la protéine RapI qui va induire l'activité protéolytique de ImmA (Auchtung *et al.*, 2005; Bose *et al.*, 2008) (Figure 8C). Il s'ensuit donc une dégradation du répresseur ImmR, une activation de la transcription du gène *xis* et du module de conjugaison et le transfert conjugatif d'ICE*Bs1*.

Par ailleurs, en phase stationnaire de croissance, la protéine AbrB est inactivée. Elle ne réprime donc plus le gène *rapI* qui est alors fortement transcrit (Auchtung *et al.*, 2005) (Figure 8D). La protéine RapI, ainsi en quantité suffisante, n'est plus inactivée par le pentapeptide PhrI et peut induire l'activité protéolytique de la protéine ImmA (Auchtung *et al.*, 2005; Bose *et al.*, 2008). La protéine ImmR clivée par ImmA ne réprime alors plus la transcription du gène *xis* et du module de conjugaison, ce qui conduit au transfert conjugatif d'ICE*Bs1*.

6 MOBILISATION

Les ICE peuvent, comme les plasmides conjugatifs, provoquer le transfert d'autres séquences d'ADN que la leur. Ces séquences sont alors mobilisées par ces éléments. L'ADN transféré peut contenir un(des) gène(s) et/ou une(des) séquence(s) nécessaire(s) à sa mobilisation par conjugaison. Cette mobilisation peut également être totalement indépendante des fonctions codées par la séquence d'ADN mobilisée qui sera passif dans le transfert. Par ailleurs, les événements de mobilisation sont classés en deux types suivant la nécessité ou non pour la molécule mobilisée d'être coïntégrée avec l'élément mobilisateur pour être transférée. Lorsque la coïntégration est un pré-requis au transfert la mobilisation est dite en *cis*, tandis que dans le cas contraire, elle est dite en *trans*.

6.1 MOBILISATION EN *TRANS*

Certains plasmides ou éléments intégratifs codent des fonctions et/ou portent des séquences leurs permettant d'être mobilisés à distance par des éléments conjugatifs (mobilisation en *trans*), ils sont alors qualifiés d'éléments mobilisables (Rawlings and Tietze, 2001; Salyers *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1998). La grande majorité des éléments mobilisables connus présentent une origine de transfert *oriT* différente de celle de l'élément mobilisateur et codent leur propre relaxase. Néanmoins, ils peuvent également ne présenter qu'une origine de transfert *oriT* plus ou moins similaire à celle de l'élément mobilisateur, la relaxase de ce dernier catalysant la coupure simple-brin dans l'élément mobilisé (Achard and Leclercq, 2007; Dunn *et al.*, 2005). L'ADN lié à la relaxase emprunte ensuite, après contact entre cellules donatrice et réceptrice, le pore codé par l'élément mobilisateur.

De plus, les éléments mobilisables connus, de taille très variable (entre 1,7 et 43 kb), codent généralement 1 à 4 protéines accessoires facilitant leur transfert mais n'intervenant pas dans la mise en place du pore de conjugaison (Achard and Leclercq, 2007; Li *et al.*, 1995b; Rawlings and Tietze, 2001).

Quelques éléments intégratifs de *Bacteroides* (Smith *et al.*, 1998), du firmicute *Clostridium* (Adams *et al.*, 2002) et de la protéobactérie *Salmonella* (Mulvey *et al.*, 2006) portent des séquences et codent des fonctions spécifiques qui leur permettent d'être mobilisés en *trans* par des ICE ou des plasmides conjugatifs. Ces éléments peuvent être regroupés sous le nom d'éléments intégratifs mobilisables (IME) proposé par Burrus *et al.* (2002b). Les IME s'excisent de façon autonome sous une forme circulaire. Celle-ci est alors mobilisée en *trans* par des plasmides conjugatifs ou des ICE, puis s'intègre dans le génome de la réceptrice. Bien que la définition initiale des IME impliquait que ceux-ci s'excisent par recombinaison site-spécifique, il serait logique de considérer MTnSag1, un élément de *S. agalactiae* mobilisable en trans par Tn*916* et qui s'intègre grâce à une recombinase à DDE, comme un IME (Achard and Leclercq, 2007). Cet élément de 1,7 kb présente également la particularité de ne coder aucune protéine impliquée directement dans son transfert mais présente une *oriT* interne au gène *lnu* conférant une résistance aux lincosamides.

6.2 Mobilisation en *cis*

Par opposition à la mobilisation en *trans*, la mobilisation en *cis* résulte de la coïntégration d'une séquence d'ADN avec un élément conjugatif ou un élément mobilisable en *trans*. Cette coïntégration peut résulter soit de l'insertion de l'élément mobilisé dans l'élément mobilisateur soit de l'événement inverse, c'est-à-dire l'insertion de l'élément mobilisateur dans l'élément mobilisé. Contrairement à la mobilisation en *trans* qui nécessite le plus souvent l'expression de gènes des éléments mobilisables et mobilisateurs, la mobilisation en *cis* nécessite uniquement l'expression du système de transfert de l'élément mobilisateur. Les séquences d'ADN mobilisées en *cis* ne présentent donc habituellement pas de caractéristiques particulières.

Un plasmide conjugatif fusionne généralement avec un autre plasmide par recombinaison homologue ou transposition réplicative d'une IS. Cependant, le plasmide conjugatif p42a de *R. etli* peut fusionner avec 5 autres plasmides non conjugatifs, comme le plasmide symbiotique pSym, par recombinaison site-spécifique (Brom *et al.*, 2004; Tun-Garrido *et al.*, 2003). Les coïntégrats obtenus constituent de nouveaux éléments qui peuvent se transférer par conjugaison. Ce processus aboutit à la mobilisation en *cis* d'un élément non conjugatif par un élément conjugatif.

Des séquences chromosomiques peuvent également être mobilisées en *cis* par un plasmide conjugatif après formation d'un coïntégrat. Ainsi, l'intégration du plasmide F dans le chromosome d'*E. coli* par recombinaison illégitime ou grâce à la copie d'IS*3* portée par cet élément conduit à la mobilisation à haute fréquence de gènes adjacents au plasmide (mobilisation de type Hfr) (Reimmann and Haas, 1993). Dans ce type de mobilisation, la relaxase initie normalement le transfert au niveau de *l'oriT*. Cependant, l'élément n'étant pas sous forme libre, le brin d'ADN transféré ne contient qu'un fragment du plasmide et la région chromosomique qui lui est contiguë. Les mobilisations de type Hfr ne peuvent permettre de transférer l'élément mobilisateur en entier que lorsqu'une copie entière du chromosome a déjà été transmise. Cet événement est donc rare.

De la même manière, divers ICE peuvent mobiliser des séquences d'ADN en *cis*. En effet, CTnDOT de *Bacteroides*, mobilise les plasmides dans lesquels il s'est intégré (Salyers *et al.*, 1995). De plus, divers éléments, comme pRS01 de *L. lactis* ou SXT de *V. cholerae*, peuvent mobiliser l'ADN chromosomique adjacent à leur site d'insertion (Hochhut *et al.*, 2000). Cependant, Tn*916* ne mobilise ni les chromosomes ni les plasmides dans lesquels il s'est intégré. Ceci est dû au fait que le module de conjugaison de cet élément ne possède de promoteur que lorsque celui-ci est sous forme circulaire (Celli and Trieu-Cuot, 1998).

Des éléments conjugatifs sont parfois insérés les uns dans les autres. Ainsi, l'ICE Tn*5253* de *Streptococcus pneumoniae*, étroitement apparenté à l'élément Tn*5252*, contient un ICE de type Tn*916*, Tn*5251*, et peut donc le mobiliser en *cis* (Ayoubi *et al.*, 1991). Les deux éléments concernés peuvent également être de nature différente. Ainsi, l'ICE putatif SPI-7 de *Salmonella enterica* contient le prophage SopE (Pickard *et al.*, 2003). De plus, l'ICE CTnDOT de *Bacteroides* et l'ICE putatif ICE*_18RS21_tRNA*^{Lys} de *S. agalactiae* contiennent tout deux un IME putatif (Brochet *et al.*, 2008a; Ghosh *et al.*, 2009; Whittle *et al.*, 2001). En outre, la plupart des éléments conjugatifs ou mobilisables portent des IS ou des transposons qui sont transférés en même temps qu'eux et donc mobilisés en *cis*.

6.3 Retrotransfert et retromobilisation : repolarisation de la conjugaison

Des expériences analysant le flux d'ADN pendant le transfert de plasmides conjugatifs de bactéries Gram négatives ont mis en évidence des transferts de plasmides mobilisables ou de marqueurs chromosomiques de la réceptrice vers la donatrice (Blanco, 1991; Mergeay *et al.*, 1987; Priefer *et al.*, 1985). Ces phénomènes ont été appelés rétromobilisation par opposition au rétrotransfert qui définit le transfert d'un plasmide d'une donatrice vers une réceptrice puis son retour vers la cellule donatrice. Bien que peu décrits dans la littérature, ces phénomènes pourraient être très fréquents chez les bactéries Gram négatives (Ankenbauer, 1997; Szpirer *et al.*, 1999). De plus, des événements de rétromobilisation et de

rétrotransfert ont été décrits très récemment chez quelques bactéries Gram positives appartenant au genre *Bacillus* (Lotareva *et al.*, 2006; Timmery *et al.*, 2009).

Le transfert du plasmide conjugatif vers la réceptrice et l'expression dans celle-ci d'au moins un des gènes de transfert du plasmide sont nécessaires pour que des événements de rétromobilisation soient observés (Heinemann and Ankenbauer, 1993; Heinemann *et al.*, 1996; Sia *et al.*, 1996). Ces événements ne sont observés qu'après un laps de temps de 30 à 150 minutes après le transfert du plasmide conjugatif (Heinemann *et al.*, 1996; Timmery *et al.*, 2009). Les auteurs de ces différentes études concluent généralement que le transfert d'ADN est unidirectionnel et que le rétrotransfert implique deux transferts conjugatifs indépendants successifs mettant en jeu deux pores différents (Szpirer *et al.*, 1999). Ainsi, le premier pore permettrait le transfert d'ADN de la donatrice vers la réceptrice tandis que le second permettrait le transfert de la réceptrice vers la donatrice. Une autre hypothèse évoquée est la possibilité qu'un seul pore de conjugaison soit utilisé pour les deux transferts. En effet, en arrivant dans la cellule réceptrice, le plasmide pourrait coder des protéines de transfert qui repolariseraient le pore de conjugaison ayant permis l'acquisition du plasmide. Ce pore serait alors utilisable pour le transfert d'ADN de la réceptrice vers la donatrice.

Aucun événement de rétrotransfert ou de rétromobilisation associé au transfert d'un ICE n'a jamais été décrit. De plus, les tentatives d'observation d'une rétromobilisation de plasmides de *B. subtilis* et *B. thuringiensis* par les ICE Tn*916* et Tn*925* n'ont pas abouti (Showsh and Andrews, 1996).

7. FONCTIONS INTERVENANTS DANS LE SUCCES EVOLUTIF DES ICE

Le maintien à long terme d'un élément génétique mobile dans la population implique la sélection naturelle. Dans cette perspective, la capacité d'un ICE à se transférer par conjugaison et à se maintenir dans la descendance du transconjugant confère un avantage sélectif à cet élément. Cependant, si cet élément réduit la valeur adaptative du transconjugant (sa capacité à avoir des descendants), les cellules contenant cet élément vont alors disparaître rapidement. Si cet élément ne confère ni avantage ni désavantage à l'organisme qui le porte, son élimination à terme dépendra uniquement de la pression de mutation et de la dérive génétique. Les mutations inactivant les fonctions codées par l'ADN nouvellement acquis ne seront pas contre-sélectionnées et l'élément pourra être perdu. Au contraire, si les nouvelles fonctions créées ou apportées par l'ICE sont bénéfiques pour le transconjugant dans des conditions environnementales données, ce transconjugant pourra se multiplier plus efficacement que les autres cellules et donc se répandre dans l'environnement.

En conséquence, les ICE portent non seulement des modules impliqués dans le transfert conjugatif ou dans le maintien à court terme après transfert mais aussi des

modules qui peuvent contribuer à la valeur adaptative de l'hôte. Ces modules peuvent soit lui conférer un avantage évolutif dans certaines conditions, soit être à l'origine de modifications plus radicales, pouvant aller jusqu'à un changement du mode de vie.

7.1 IMPACT DE LA FONCTIONNALITE DES ICE SUR LEUR MAINTIEN

Un ICE arrivant au sein d'une population ne se maintiendra que s'il est fonctionnel. Le retransfert de l'élément à partir du clone dans lequel il est arrivé est d'abord un moyen de se répandre puis de se maintenir dans la population malgré les mutations et la dérive génétique. Un ICE se transférant à haute fréquence pourrait ainsi éviter son élimination, même si sa contribution à la valeur adaptative est légèrement négative. Cependant, un ICE doit être correctement régulé pour être complètement fonctionnel. 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 (Scott *et al.*, 1988).

7.2 FONCTIONS UTILES A L'HOTE

Un autre moyen permettant à un ICE de se maintenir au sein d'une population est d'augmenter fortement dans certaines conditions la valeur adaptative de l'organisme hôte. Les fonctions codées par les ICE et contribuant à la valeur adaptative de l'hôte sont très variées. Ainsi, des gènes de résistances aux agressions chimiques, physiques et biologiques sont fréquemment retrouvés dans ces éléments (Tableau 1). Certains ICE apparentés à Tn*916* portent, outre le gène *tetM* conférant une résistance à la tétracycline, des gènes conférant une résistance à la kanamycine ou aux macrolides (Clewell *et al.*, 1995a; Roberts and Mullany, 2006, 2009). L'ICE R391 de *Providencia rettgeri* confère quant à lui une résistance aux ions mercure (Murphy and Pembroke, 1999).

Les ICE sont aussi capables de protéger leur hôte contre certaines agressions physiques. Ainsi, Tn*5252* de *S. pneumoniae* et R391 codent tous deux un mécanisme différent permettant la réparation mutagène des dommages à l'ADN engendrés par les UV (Mead *et al.*, 2007; Munoz-Najar and Vijayakumar, 1999).

Par ailleurs, les ICE peuvent également conférer une résistance envers des agents biologiques puisque les ICE putatifs ICE*St1* et ICE*St3* de *S. thermophilus* codent des systèmes RM prouvés ou potentiels protégeant la bactérie hôte contre des bactériophages (Burrus *et al.*, 2002b; Pavlovic *et al.*, 2004).

Les ICE peuvent également coder des fonctions métaboliques. Ainsi, les ICE Tn*5276* de *L. lactis* et CTn*scr94* de *Salmonella enterica* codent tous deux un système permettant l'importation active et l'utilisation du saccharose par la cellule (Hochhut *et al.*, 1997; Rauch and de Vos, 1992a). De même, les éléments *clc* et *bph-sal* de *Pseudomonas* codent respectivement des gènes de dégradation des chlorocathéchols et du biphényle permettant ainsi leur utilisation comme unique source de carbone (Nishi *et al.*, 2000; Ravatn *et al.*, 1998b).

Les ICE peuvent enfin conduire à des évolutions majeures du mode de vie de l'hôte. En effet, de nombreux ICE ou éléments dérivant d'ICE sont totalement ou partiellement responsables du caractère symbiotique ou pathogène des bactéries qui les portent (He *et al.*, 2004; Kers *et al.*, 2005; Kiewitz *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2008; Nair *et al.*, 2004; Nandasena *et al.*, 2007; Schubert *et al.*, 2004a; Schubert *et al.*, 2004b; Sullivan and Ronson, 1998; Sullivan *et al.*, 2002) (Tableau 1). En effet, chez les souches dépourvues de ces éléments, les caractères symbiotiques ou pathogènes sont absents ou fortement atténués. De plus, l'acquisition de deux de ces ICE est suffisante pour transformer des bactéries du sol en, respectivement, des bactéries symbiotiques nodulant les légumineuses et des bactéries pathogènes de plantes (Kers *et al.*, 2005; Nandasena *et al.*, 2007). Les ICE portés par ces organismes leur permettent donc d'avoir accès à de nouvelles niches écologiques pouvant devenir leur niche principale.

Les ICE peuvent coder de nombreuses fonctions utiles à l'hôte et participant positivement à la valeur adaptative, la perte de ces fonctions sera donc contre-sélectionnée. Néanmoins, les gènes de l'ICE inutiles pour l'hôte comme ceux des modules de conjugaison ou de recombinaison pourront être mutés sans impact sur la valeur adaptative de l'organisme. Leur maintien dans la souche sera alors indépendant de la sélection naturelle et dépendra uniquement de la pression de mutation et de la dérive génétique. Les fonctions utiles à l'hôte peuvent donc contribuer au maintien d'un ICE dans la population, mais elles ne peuvent pas assurer son intégrité et sa fonctionnalité. Les mutations et la dérive devraient donc conduire à la création d'îlots génomiques dérivant d'ICE et codant des fonctions utiles à l'organisme hôte mais n'ayant pas les capacités de s'exciser, se transférer et s'intégrer dans la cellule réceptrice.

7.3 SYSTEMES TOXINE-ANTITOXINE

Des modules codant des systèmes toxine-antitoxine sont portés par la plupart des plasmides conjugatifs. Ces modules constituent de bons exemples de gènes « égoïstes ». Un gène ou un élément « égoïste » se répand de façon sélective sans conférer aucun avantage sélectif à son hôte (Hurst and Werren, 2001). Les systèmes toxine-antitoxine ou systèmes

d'addiction codent deux composants : une toxine protéique qui reconnaît une cible cellulaire spécifique et une antitoxine, protéine ou ARN anti-sens, inhibant la synthèse ou l'activité de la toxine. Lorsque le plasmide est perdu au cours d'une division, l'antitoxine, instable, est rapidement dégradée tandis que la toxine, plus stable, provoque la mort cellulaire (Engelberg-Kulka and Glaser, 1999; Gerdes *et al.*, 1997). De ce fait, la fréquence des descendants ayant perdu un plasmide porteur d'un système toxine-antitoxine est très inférieure à celle des descendants ayant perdu un plasmide n'en portant pas. Ainsi, un système toxine-antitoxine récemment caractérisé chez l'ICE SXT et certains éléments apparentés participe au maintien de ces éléments au sein de la population (Dziewit *et al.*, 2007; Taviani *et al.*, 2008; Wozniak and Waldor, 2009).

L'élément ICE*St1* et les éléments apparentés codent des systèmes RM et des résistances abortives prouvés ou putatifs (Burrus *et al.*, 2002b; Pavlovic *et al.*, 2004). Les systèmes RM et les résistances abortives confèrent aux procaryotes une résistance envers les phages. Cependant, les systèmes RM de type II présentent également des propriétés « égoïstes ». En effet, ces systèmes RM peuvent être considérés comme une classe de systèmes toxine-antitoxine (Kobayashi, 2001). Pour assurer une protection vis-à-vis de l'enzyme de restriction d'un système RM, toutes les séquences reconnues doivent être méthylées. Au contraire, l'enzyme de restriction ne doit couper qu'un ou quelques sites pour provoquer la destruction d'une molécule d'ADN non méthylée. Si un module codant un système RM est perdu, la méthyltransférase et l'endonucléase de restriction du système vont être progressivement diluées lors des divisions cellulaires successives. L'ADN sera de moins en moins méthylé et l'enzyme de restriction provoquera des coupures irréversibles entraînant la mort de la cellule.

Par ailleurs, les systèmes de résistance abortive tuent les cellules en réponse à l'infection par les phages par des mécanismes rarement connus. Des études récentes ont montré qu'au moins deux systèmes toxine-antitoxine conféraient une résistance abortive aux phages, suggérant que résistance abortive et système toxine-antitoxine pourraient n'être que les deux faces d'un même système du moins dans certains cas (Hazan and Engelberg-Kulka, 2004; Pecota and Wood, 1996).

La présence chez les ICE de systèmes toxine-antitoxine, de systèmes RM et/ou de résistances abortives pourrait donc à la fois être désavantageux pour l'hôte (mort des descendant ayant perdu l'ICE) et avantageux pour celui-ci (protection contre les phages, …) ou les cellules sœurs de la même souche (résistances abortives : mort de la cellule infectée protégeant les cellules sœurs) selon les circonstances, mais serait toujours avantageux pour l'élément les codant.

8. *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS*

Streptococcus thermophilus appartient au phylum des *Firmicutes*. La seule niche écologique connue de cette bactérie lactique homofermentaire anaérobie aérotolérante est le lait et certains produits laitiers. La comparaison des séquences de 7 gènes de ménage chez 26 souches de *S. thermophilus*, 22 souches de *Streptococcus salivarius* et 8 souches de *Streptococcus vestibularis* indique que *S. thermophilus* serait serait une espèce clonale apparue il y a au plus quelques dizaines de milliers d'années. Elle dériverait d'une souche de bactérie buccale du groupe *salivarius* s'étant adaptée au milieu laitier créé par l'homme (Hols *et al.*, 2005). *S. thermophilus* résulte donc de la domestication d'une espèce bactérienne.

S. thermophilus 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 de petite taille se répliquant presque tous par cercle roulant (Turgeon and Moineau, 2001). Aucun des plasmides identifiés n'est conjugatif, cependant certains pourraient être mobilisables (Somkuti and Steinberg, 2007).

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 coculture avec de nombreuses autres bactéries lactiques dont *L. lactis* pour la fabrication de divers fromages et avec *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pour celle 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 ou des vertébrés. Ainsi, *En. 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 vertébrés. Ainsi, 5 à 20 % des individus sont des porteurs sains de *S. agalactiae*, *S. pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes* qui sont également rarement retrouvés dans des pathologies graves tels que des septicémies, des pneumonies ou des méningites. *S. salivarius* et *S. vestibularis* sont quant à elles des bactéries commensales de la bouche et/ou pathogènes opportunistes.

8.1 TRANSFERT HORIZONTAL ET POLYMORPHISME

Les analyses de séquences révèlent de nombreux événements récents de transfert horizontal inter-espèces chez les bactéries lactiques. Ainsi, des séquences quasi-identiques, comme les ORF *orfB* et *epsL* du locus de synthèse d'exopolysaccharide de *S. thermophilus* CNRZ368 (Bourgoin *et al.*, 1999), les séquences d'insertion IS*1191,* IS*981* (Guédon *et al.*, 1995) et IS*S1* (Bourgoin *et al.*, 1996) ou les ORF *hsdR et hsdM* du système RM de type I du plasmide pER35 (Solow and Somkuti, 2001), sont retrouvées chez *S. thermophilus* et *L. lactis*. La souche *S. thermophilus* 4134 contient un module de résistance aux ions cadmium et zinc codant des protéines identiques à des protéines plasmidiques de *L. lactis* et de *Listeria innocua* (Schirawski *et al.*, 2002). De même, l'analyse du génome de deux souches de *S. thermophilus* a révélé un îlot génomique codant notamment des protéines de choc froid et un module de synthèse de méthionine, composé de séquences échangées avec deux bactéries utilisées en coculture dans l'industrie agroalimentaire, *L. lactis* et *Lb. bulgaricus* (Bolotin *et al.*, 2004). Ceci suggère que de nombreux transferts horizontaux se sont produits récemment entre ces différentes espèces lors de cocultures en milieu laitier. Une analyse *in silico* suggère également que les séquences acquises par transfert horizontal inter-espèces représenterait environ 14 % des génomes séquencés de *S. thermophilus* (Hols *et al.*, 2005). En outre, l'analyse par hybridation génomique comparative de 47 génomes 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 intraspécifique assez important en dépit de l'origine clonale récente de cette espèce (Rasmussen *et al.*, 2008).

Ces transferts horizontaux posent la question des mécanismes impliqués dans ces échanges d'information génétique. La transformation de certaines souches de *S. thermophilus* très récemment a été observé dans un milieu minimum chimiquement défini (Gardan *et al.*, 2009). Néanmoins, l'efficacité de ce phénomène dans le milieu de croissance naturel de cette espèce n'est pas connue.

De nombreux phages virulents lytiques et quelques phages lysogènes ont été décrits chez *S. thermophilus* (Brüssow *et al.*, 1998). La présence de phages transducteurs généralisés suggère qu'ils pourraient être impliqués dans des transferts horizontaux (Brüssow *et al.*, 1998). Bien que les phages des bactéries lactiques soient très étudiés, aucun phage capable d'infecter *S. thermophilus* et *L. lactis* n'avait été caractérisé jusqu'à très récemment. Cependant, deux phages de *S. thermophilus* peuvent infecter *L. lactis* et y transférer par transduction un plasmide provenant de *S. thermophilus* (Ammann *et al.*, 2008).

Par ailleurs, aucun plasmide conjugatif n'a été identifié chez *S. thermophilus*. De plus, tous les plasmides de cette espèce sont de petite taille (<8 kb) alors que la taille d'un module conjugatif complet comme celui de Tn*916* (le plus petit décrit chez les *Firmicutes*) est de 11 kb (Clewell *et al.*, 1995a).

Les acteurs intervenant dans les phénomènes de transferts horizontaux chez *S. thermophilus* sont donc largement méconnus.

8.2 ILOTS GENOMIQUES DE *S. THERMOPHILUS*

8.2.1 ICE*St1* ET LES ILOTS APPARENTES

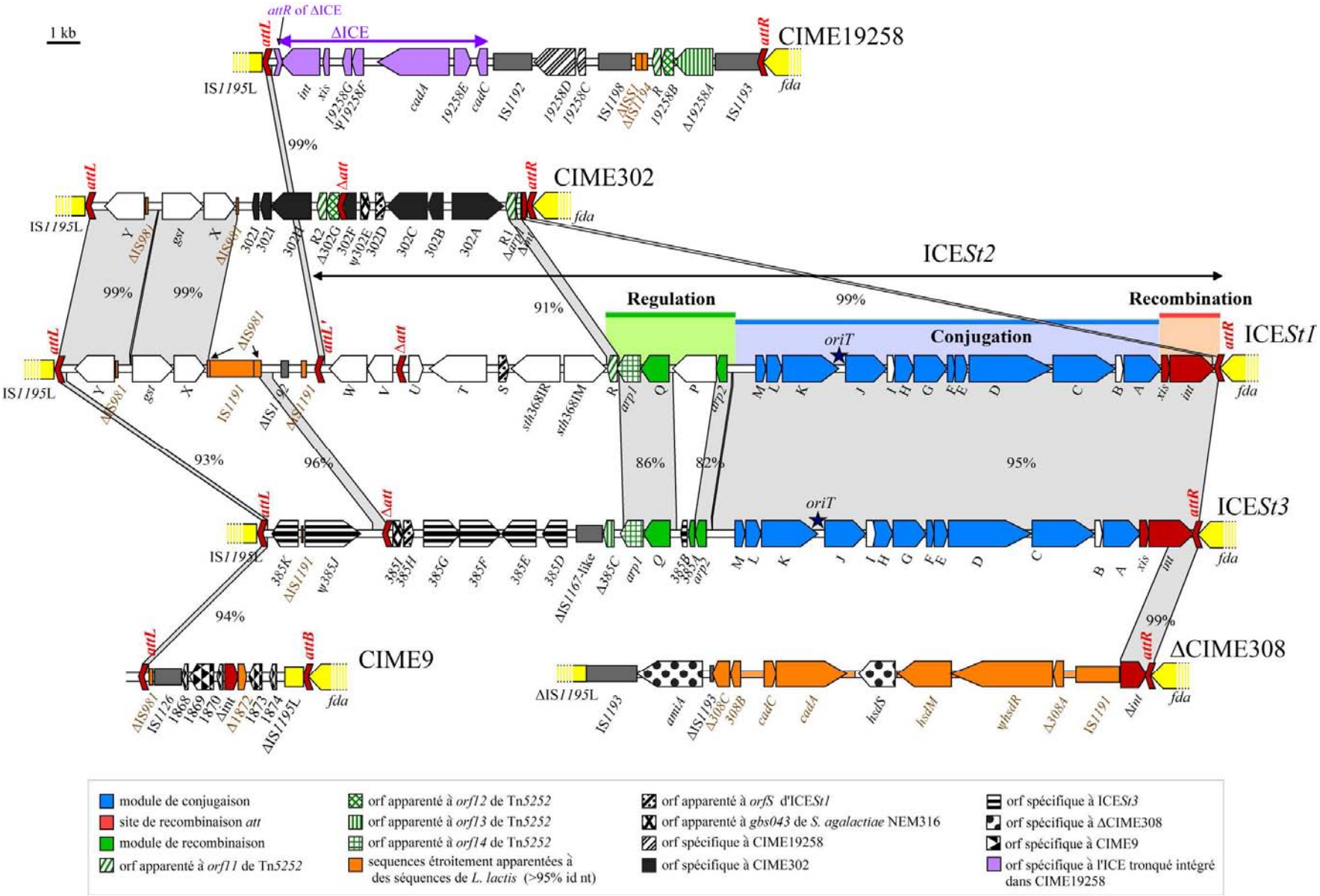
La comparaison du locus *fda* codant une fructose-1,6-diphosphate aldolase putative de deux souches étroitement apparentées de *S. thermophilus*, A054 et CNRZ368, a révélé la présence d'un élément appelé ICE*St1* de 35 kb chez CNRZ368 et son absence chez A054 (Burrus *et al.*, 2000) (Figure 9). Cet élément flanqué par deux copies d'une répétition directe de 27 pb est remplacé par une copie unique de cette séquence chez A054. L'extrémité 3' du gène *fda* est incluse dans la séquence de 27 pb droite d'ICE*St1* et dans la séquence unique chez A054.

L'analyse de 22 souches de *S. thermophilus* a permis de mettre en évidence, chez 8 d'entre elles, des éléments d'une même famille intégrés dans l'extrémité 3' du gène *fda* (Pavlovic *et al.*, 2004) (Figure 9). De plus, l'analyse des 3 génomes séquencés de *S. thermophilus* a permis de mettre en évidence un autre îlot de cette famille dans la souche LMD-9 (Burrus and Waldor, 2004b). 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* traduisant des transferts horizontaux récents (Figure 9).

Deux de ces éléments, ICE*St1* et ICE*St3*, sont intégratifs et potentiellement conjugatifs (ICE putatifs). Ils sont flanqués de sites *att* contenant la répétition directe de 27 pb précédemment décrite et comportent des modules de recombinaison, de conjugaison et de régulation apparentés. L'intégrase à tyrosine et l'excisionase, codées par les gènes *int* et *xis* du module de recombinaison, catalysent une recombinaison site-spécifique entre les séquences de 27 pb appartenant aux sites *attL* et *attR*, conduisant à la formation d'une forme circulaire portant un site *attI* et à la formation d'un site *attB* chromosomique (Burrus *et al.*, 2000; Choulet, 2002; Pavlovic *et al.*, 2004).

ICE*St1* possède également un site d'attachement interne apparenté à *attL* et nommé *attL'* (Figure 9) (Pavlovic *et al.*, 2004). La recombinaison site-spécifique entre les sites *attR* et *attL'* conduit à l'excision d'une molécule circulaire portant les modules de recombinaison, de conjugaison et de régulation d'ICE*St1* ainsi qu'un site *attI'*. Cette molécule est donc un ICE putatif plus petit qu'ICE*St1* nommé ICE*St2*.

ICE*St1* et ICE*St3* possèdent un module de conjugaison apparenté de façon lointaine à ceux de Tn*916* et d'ICE*Bs1*, mais leur transfert n'avait jamais été observé. Les autres îlots génomiques ne sont ni intégratifs ni conjugatifs et dérivent d'ICE par délétion partielle ou totale des modules de régulation de conjugaison et de recombinaison (Pavlovic *et al.*, 2004). Trois d'entre eux, les CIME (Cis Mobilisable Element), sont flanqués de sites *att* mais ne possèdent que des reliquats de modules de régulation et de recombinaison. Un autre îlot, ΔCIME308, résulterait de la délétion de la partie gauche d'un CIME.


attR of ΔICE
1 kb
ΔICE
attL
attR
CIME19258
IS1195L
int
xis
19258G
Ψ19258F
cadA
19258E
cadC
IS1192
19258D
19258C
IS1198
ΔIS1216A
ΔIS1216
R
19258B
Δ19258A
IS1193
fda
99%
CIME302
Δatt
Y
ΔIS981
gst
X
302J
302I
302H
R2
Δ302G
302F
ψ302E
302D
302C
302B
302A
R1
ΔorfM
ΔorfL
ICESt2
91%
Regulation
99%
Recombination
ICESt1
oriT
Conjugation
attL'
IS1191
ΔIS1192
ΔIS1191
W
V
U
T
S
sth3681R
sth3681M
R
orf1
Q
P
orf2
M
L
K
J
I
H
G
F
E
D
C
B
A
93%
96%
86%
82%
95%
ICESt3
385K
ΔIS1191
ψ385J
385I
385H
385G
385F
385E
385D
ΔIS1167-like
Δ385C
orf1
Q
385B
385A
orf2
94%
CIME9
IS1126
1868
1869
1870
Δint
Δ1872
1873
1874
ΔIS1195L
ΔCIME308
ΔIS1195L
IS1193
amiA
ΔIS1193
Δ308C
308B
cadC
cadA
hsdS
hsdM
ψhsdR
Δ308A
IS1191
Δint
module de conjugaison
site de recombinaison att
module de recombinaison
orf apparenté à orf11 de Tn5252
orf apparenté à orf12 de Tn5252
orf apparenté à orf13 de Tn5252
orf apparenté à orf14 de Tn5252
sequences étroitement apparentées à des séquences de L. lactis (>95% id nt)
orf apparenté à orfS d'ICESt1
orf apparenté à gbs043 de S. agalactiae NEM316
orf spécifique à CIME19258
orf spécifique à CIME302
orf spécifique à ICESt3
orf spécifique à ΔCIME308
orf spécifique à CIME9
orf spécifique à l'ICE tronqué intégré dans CIME19258

<u>Figure 9</u> : Comparaison des séquences des îlots génomiques intégrés dans le locus *fda* chez *S. thermophilus* (d'après Pavlovic *et al.*, 2004 ; Burrus and Waldor, 2004).

La localisation et l'orientation des séquences IS*1195*L 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 (Ψ) et ORF tronquées (Δ) 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 IS*1195*L) 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'ICE*St1* et ICE*St3* déduites des comparaisons de séquences avec les *oriT* connues de Tn*916* et IC*EBs1* sont indiquées par des étoiles bleues. ΔICE correspond à un ICE tronqué apparenté à Tn*916* et ICE*Lm1* intégré dans CIME19258.

8.2.2 MODELE D'EVOLUTION DES ICE PAR ACCRETION ET MOBILISATION

CIME19258 et CIME302 sont tous deux flanqués de sites *attR* et *attL* (Pavlovic *et al.*, 2004) (Figure 9). Les sites *attR* de CIME302 et CIME19258 sont respectivement identiques à 99 % et 76 % avec celui d'ICE*St1*. Le site *attL* de CIME302 est identique au site *attL* d'ICE*St1* à plus de 99 %. Le site *attL* de CIME19258 possède quant à lui plus de 99 % d'identité avec un site de recombinaison interne et fonctionnel d'ICE*St1* appelé *attL'* mais ne présente cependant que 56 % d'identité avec le site *attL* d'ICE*St1*. Le troisième CIME, CIME9, est quant à lui flanqué d'un site *attL* quasiment identique à celui d'ICE*St1* et d'un site *attB* identique à celui produit par l'excision d'ICE*St1* (Burrus *et al.*, 2000; Burrus and Waldor, 2004b). De plus, lorsque l'ICE putatif ICE*St2* s'excise, un fragment d'ICE*St1* bordé par le site *attL* et le site *attB'* résultant de l'excision reste intégré dans le chromosome (Figure 10). Ce fragment constitue donc un quatrième CIME nommé CIME368.

Des séquences internes pouvant correspondre à des sites *attL* ou *attI* tronqués (Δ*att*) sont également retrouvées dans trois des îlots de *S. thermophilus,* CIME302, ICE*St1* et ICE*St3* (Figure 9). Par ailleurs, des plasmides recombinants porteurs de la totalité ou d'une partie du module de recombinaison d'ICE*St1* s'intègrent dans le site *attR* de CIME19258 (Toulmay, 2003) mais non dans le site *attL*. La structure en tandem résultant de l'intégration de certains de ces plasmides recombinants dans CIME19258 s'excise par recombinaison site-spécifique.

L'ensemble de ces données suggère que les ICE et les CIME de *S. thermophilus* évoluent selon le modèle original décrit par Pavlovic *et al.* (2004) (Figure 11). Les CIME apparaîtraient par délétion des modules de régulation, de conjugaison et de recombinaison des ICE. Les souches portant un CIME ou un ICE pourraient acquérir un ICE apparenté sous forme circulaire par conjugaison. Celui-ci s'intégrerait par recombinaison site-spécifique entre le site *attI* de l'ICE exogène et un site *att* flanquant l'élément intégré. Cette intégration conduirait à l'accrétion de l'ICE exogène et de l'élément résident et à la formation d'un îlot génomique composite résultant de l'intégration en tandem des deux éléments. Les deux éléments intégrés seraient séparés par un site *attI'* de structure similaire à celle du site *attI* présent sur la forme circulaire d'un ICE. Une délétion du site *attI'* aboutirait alors à un site *attL'*, Δ*attL* ou à une perte totale du site de recombinaison. L'ensemble de l'îlot constituerait un nouvel ICE qui s'exciserait puis se transférerait par conjugaison. Le CIME serait donc mobilisé en *cis* par l'ICE acquis par conjugaison et l'ICE aurait acquis de nouveaux modules par accrétion du CIME.

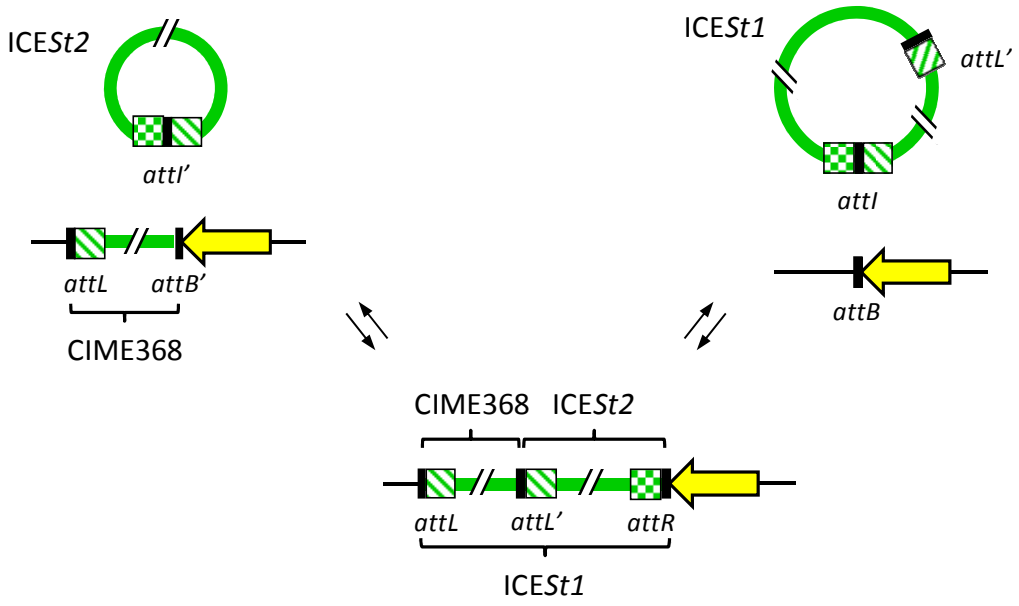


Figure 10 : **Représentation schématique de l'excision et l'intégration d'ICE*St1* et d'ICE*St2* chez la souche *S. thermophilus* CNRZ368** (d'après Pavlovic *et al.*, 2004).

La recombinaison site-spécifique entre les sites *attR* et *attL* conduit à la formation d'un site *attB* chromosomique et à l'excision d'ICE*St1* sous forme circulaire. La recombinaison site-spécifique entre les sites *attR* et *attL'* conduit à l'excision d'ICE*St2* sous forme circulaire tandis que CIME368 flanqué du site *attL* et d'un site *attB'* reste intégré dans le chromosome. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*.

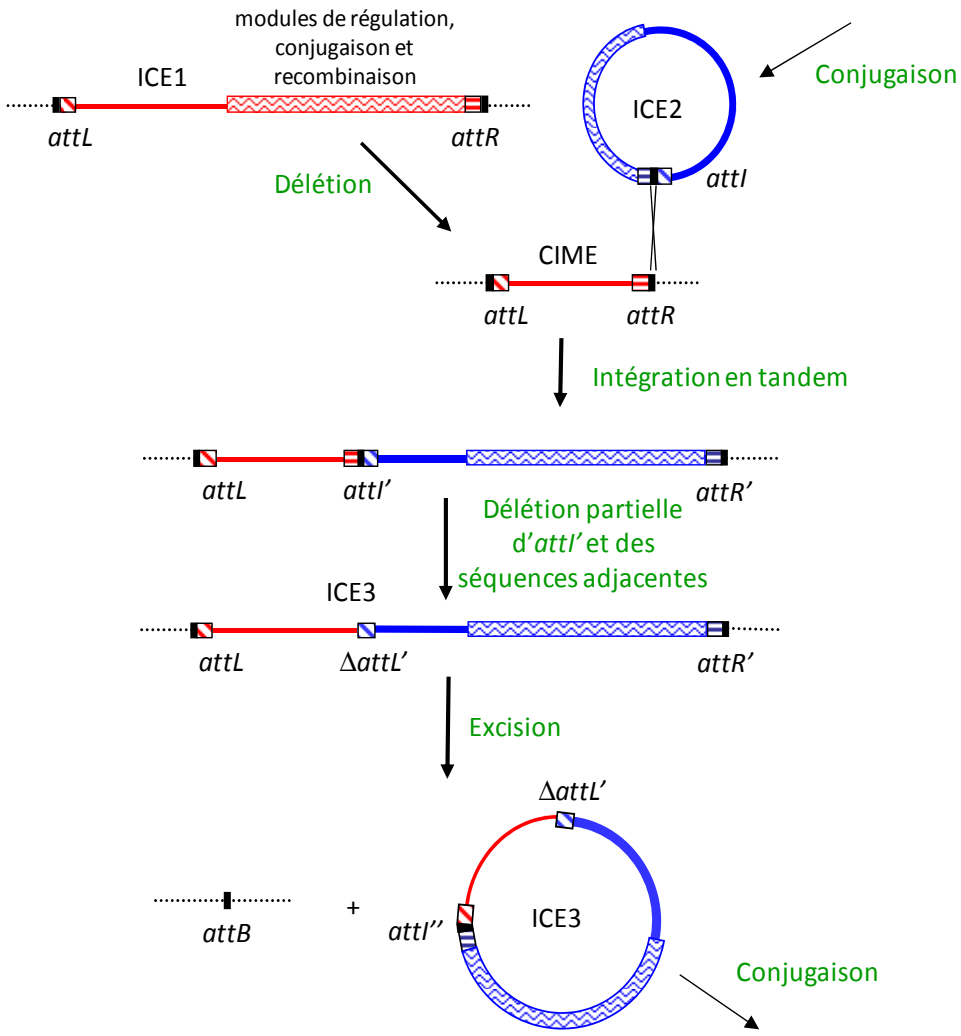


Figure 11 : **Modèle d'évolution des ICE et des CIME par accrétion site-spécifique, délétion et mobilisation en *cis*** (d'après Pavlovic *et al.*, 2004).

Les séquences d'ICE1 et d'ICE2 ainsi que les séquences qui en dérivent sont respectivement représentées en rouge et en bleu. La séquence de 27 pb est représentée en noir. Les séquences spécifiques aux sites *attR* et *attL* sont représentées par des carrés hachurés respectivement de manière horizontale et oblique. Un CIME apparaît par délétion totale ou partielle des modules de régulation, de conjugaison et de recombinaison d'un ICE (ICE1). Une cellule porteuse d'un CIME ou d'un ICE acquerrait la forme circulaire d'un second ICE (ICE2) par conjugaison. Celle-ci s'intégrerait par recombinaison site-spécifique dans un site *att* flanquant le CIME (ici *attR*). Les deux éléments intégrés en tandem seraient séparés par un site *attI'* de structure similaire à celle présente dans la forme circulaire d'un ICE. Ce site *attI'* serait partiellement ou totalement délété aboutissant soit à une disparition totale du site interne, soit à un site non fonctionnel ressemblant à un site *attL* tronqué (Δ*attL'*) (cas présenté dans la figure), soit à un site de type *attL'*. L'ensemble ainsi formé constitue un nouvel ICE (ICE3) qui s'exciserait par recombinaison site-spécifique entre *attR'* et *attL* et se transférerait par conjugaison.

Une analyse des séquences et des données bibliographiques suggère que d'autres ICE putatifs ou prouvés comme Tn*5276* de *L. lactis*, SPI-7 de *Sa. enterica*, pSAM2 de *Sm. ambofaciens* et un îlot de symbiose de *M. loti* pourraient avoir été impliqués dans des accrétions site-spécifique entre ICE et CIME (Pavlovic *et al.*, 2004). Les CIME pourraient donc être aussi répandus que les ICE et l'accrétion site-spécifique entre ICE et CIME pourrait jouer un rôle important dans l'évolution de ces éléments.

B. Résultats

Une partie des résultats présentés dans ce chapitre a d'ores et déjà fait l'objet de deux publications. Un article traitant de l'accrétion site-spécifique et de la mobilisation conjugative d'un CIME par un ICE apparenté a été soumis au journal Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.

Ce chapitre décrit brièvement les résultats exposés dans ces trois articles et détaille les donnés relatives non publiées. Les articles publiés ou soumis correspondants sont ensuite présentés. Un acte de congrès relatif à une communication orale au cours de laquelle ces résultats ont été en partie présentés a également été ajouté en annexe.

Article 1

Bellanger X, Morel C, Decaris B, Guédon G. Regulation of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*: role of the *arp1* repressor. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008; **14**: 16-21.

Article 2

Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guédon G. Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*. 2009; **191**: 2764-75.

Article 3

Bellanger X, Morel C, Decaris B, and Guédon G. Site-specific accretion of an Integrative Conjugative Element and a related genomic island leads to *cis*-mobilization and gene capture. Article soumis au journal *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Acte de congrès

Bellanger X, Morel C, Decaris B, Guédon G. Derepression of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus* by DNA damage response: implication of a cI-related repressor. *J Bacteriol*. 2007; **189**: 1478-81.

Les analyses de séquences et l'étude de la recombinaison site-spécifique initiée avant le début de ce travail avaient conduit à l'élaboration du modèle d'évolution des ICE et des îlots génomiques apparentés par accrétion site-spécifique et mobilisation conjugative en *cis* (Figure 11). Succinctement, les CIME apparaîtraient par délétion des modules de conjugaison et de recombinaison des ICE. Les souches portant un CIME pourraient acquérir un ICE apparenté par conjugaison. Celui-ci s'intégrerait par recombinaison site-spécifique dans le site *attR* flanquant le CIME conduisant à l'accrétion des deux éléments et à la formation d'un îlot composite. L'ensemble de l'îlot pourrait s'exciser puis se transférer par conjugaison. Ainsi, le CIME serait mobilisé en *cis* par l'ICE. L'objectif de ce travail était donc de démontrer ces phénomènes et d'étudier leurs modalités.

Les seuls CIME putatifs identifiés au début de ce travail étaient ceux intégrés dans le locus *fda* chez diverses souches de *Streptococcus thermophilus*. Ce travail a donc débuté par l'obtention et l'étude du transfert conjugatif des ICE putatifs apparentés ICE*St1* et ICE*St3*. La fréquence et le spectre de transfert de ces éléments ont été analysés. L'étude de la régulation de ces ICE a également permis de déterminer la nature des stimuli auxquels répondent leur excision et leur transfert.

Cette analyse s'est poursuivie par l'étude du phénomène d'accrétion site-spécifique d'un ICE avec un CIME apparenté. La formation de tandems par accrétion site-spécifique d'un ICE de *S. thermophilus* et d'un îlot apparenté a été examinée. Les divers phénomènes d'instabilité découlant de la formation de ces tandems ont aussi été analysés.

Ce travail s'est achevé par l'étude de la mobilisation conjugative en *cis* de CIME par un ICE apparenté. Les conditions dans lesquelles cet événement survient et sa fréquence ont été déterminées.

1 TRANSFERT CONJUGATIF DES ICE DE *S. THERMOPHILUS*

1.1 MARQUAGE DES ICE

Les ICE putatifs ICE*St1* et ICE*St3* ne portant aucun gène facilement sélectionnable, la première étape de l'étude du transfert de ces éléments a été leur marquage par un gène de résistance à la spectinomycine (*spc*) ou un gène de résistance au chloramphénicol (*cat*). Ces gènes ont été insérés dans une région non codante d'ICE*St1* flanquée d'une copie d'IS*1191* et de copies tronquées d'IS*981*, d'IS*1191* et d'IS*1192* (Figure 12). La région choisie pour le marquage d'ICE*St3* est un pseudogène, ψ*orf385J*, dont l'ORF comporte deux décalages de

phase de lecture. Le marquage d'ICE*St1* et d'ICE*St3* grâce au vecteur pG$^+$host9 est décrit de manière exhaustive dans l'article 2.

Le tableau 2 présente les souches sauvages de *S. thermophilus* utilisées dans ce travail et indique l'îlot qu'elles portent éventuellement au locus *fda*. Le nom des souches construites à partir de celles-ci comporte par le nom de la souche d'origine suivie par une indication de la modification qui lui a été apportée. Par exemple si la souche CNRZ368 porte naturellement ICE*St1*, la souche CNRZ368 ICE*St1cat* est une souche dérivant de CNRZ368 chez laquelle ICE*St1* est marqué par le gène de résistance au chloramphénicol *cat*. De même, si la souche sauvage CNRZ385 porte ICE*St3*, cet élément a été délété chez la souche CNRZ385 ΔICE*St3*. Enfin, une souche dérivant de LMG18311 vers laquelle ICE*St3cat* a été transféré sera nommée LMG18311 ICE*St3cat*.

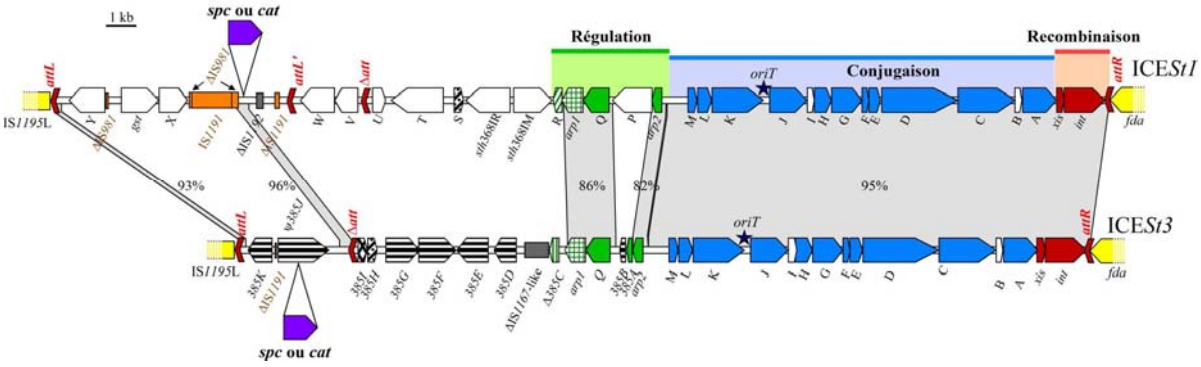


Figure 12 : Représentation des loci choisi pour le marquage des ICE putatifs ICE*St1* et ICE*St3* de *S. thermophilus*.

La légende utilisée est identique à celle de la figure 9. Les rectangles fléchés violets symbolisent les gènes de résistances à la spectinomycine (*spc*) ou au chloramphénicol (*cat*) utilisés pour marquer les ICE putatifs. Ces gènes ont été insérés dans une région non codante d'ICE*St1* flanquée d'une copie d'IS*1191* et de copies tronquées d'IS*981*, d'IS*1191* et d'IS*1192* ainsi que dans un pseudogène d'ICE*St3*, ψorf385J, dont l'ORF comporte deux décalages de phase de lecture.

Tableau 2 : Souches de *S. thermophilus* sauvages utilisées dans ce travail

Nom de la souche	Ilot intégré dans l'extrémité 3' du locus *fda*
CNRZ368	ICE*St1*/ICE*St2*
CNRZ385	ICE*St3*
ATCC 19258	CIME19258
CNRZ302	CIME302
LMD-9	CIME9
LMG18311	aucun îlot, site *attB* vide
A054	aucun îlot, site *attB* vide
LMG18311 CIMEL_3catR_3	CIMEL_3catR_3

1.2 TRANSFERT INTRA-ESPECE D'ICE*ST1* ET D'ICE*ST3*

La seconde étape de cette étude a été la mise au point d'un protocole expérimental de conjugaison. En effet, aucun élément conjugatif n'avait été jusqu'alors caractérisé chez *S. thermophilus*. Chez les *Firmicutes*, aucun transfert conjugatif n'a été obtenu en milieu liquide en dehors de certains plasmides et ICE qui codent un facteur d'agrégation. Puisqu'ICE*St1* et ICE*St3* ne codent pas un tel facteur, les expériences de conjugaison ont été réalisées sur des filtres de nitrocellulose. Des essais de transfert en milieu liquide réalisés par la suite n'ont pas permis d'obtenir de transconjugant.

S. thermophilus LMG18311 ne possède aucun élément intégré dans le locus *fda* et porte donc un site *attB* vide (Tableau 2). Le transfert conjugatif intra-espèce d'ICE*St3* marqué par le gène *cat* (ICE*St3cat*) de la souche donatrice CNRZ385 ICE*St3cat* vers la souche réceptrice LMG18311 portant le plasmide non mobilisable pMG36e (*ermB*) a été étudié. Le gène *ermB* porté par ce plasmide confère une résistance à l'érythromycine. La nature des transconjugants putatifs résistants à l'érythromycine et au chloramphénicol a été vérifiée par PCR. La première de ces PCR vérifie la présence d'ICE*St3* grâce à l'amplification d'un fragment spécifique au module de régulation de cet élément (Figure 13). La seconde PCR identifie la souche dont les transconjugants putatifs sont issus par l'amplification d'un fragment interne au gène *cse*. En effet, ce gène propre à *S. thermophilus* possède une région centrale hautement variable en séquence et longueur nommée *var* (Borges *et al.*, 2006). Des allèles *cse* très différents sont portés par les souches donatrice et réceptrice utilisées, respectivement CNRZ385 ICE*St3cat* et LMG18311 pMG36e (Figure 14), rendant ces souches facilement identifiables. Ces deux types de PCR ont confirmé que les clones résistant à l'érythromycine et au chloramphénicol possédaient ICE*St3cat*, dérivaient de la réceptrice (Figure 13) et correspondaient donc bien à des transconjugants. Dans la suite de ce manuscrit, la vérification de la nature des transconjugants intra-espèce par ces PCR ou des PCR similaires ne sera pas présentée bien qu'elle ait été réalisée. La fréquence de transfert d'ICE*St3cat* vers LMG18311 pMG36e est de $3,4 \times 10^{-6} \pm 0,5 \times 10^{-6}$ UFC de transconjugant/UFC de donatrice (± l'écart standard à la moyenne).

De plus, chez tous les transconjugants analysés, l'amplification de fragments portant les sites *attR* et *attL* ainsi que leurs régions flanquantes a montré qu'ICE*St3cat* s'est intégré dans l'extrémité 3' du gène *fda* (Figure 13). L'amplification des sites *attB* et *attI* à partir de l'ADN de ces clones a également démontré que l'ICE est toujours capable de s'exciser (Figure 13).

Par ailleurs, un seul transconjugant d'ICE*St1cat* vers LMG18311 pMG36e a été obtenu malgré de nombreuses tentatives. La nature de ce transconjugant a été vérifiée par des PCR similaires à celles effectuées sur les transconjugants intra-espèce d'ICE*St3.* La fréquence de transfert de cet élément, inférieure à 10^{-9}, est donc bien inférieure à celle d'ICE*St3*. Du fait de cette faible fréquence de transfert, seul le transfert inter-espèce d'ICE*St3* a été étudié.

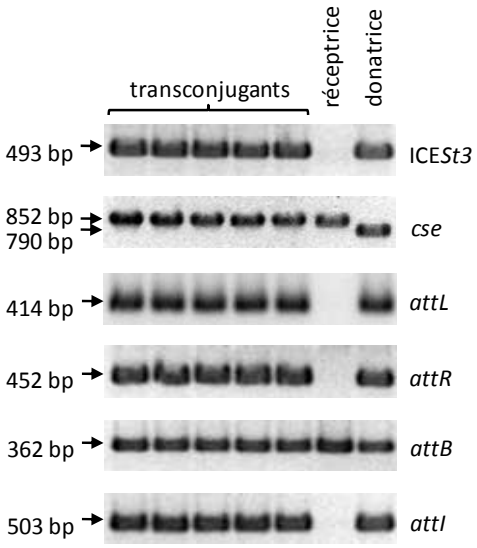


Figure 13 : Caractérisation de transconjugants intra-espèce d'ICE*St3cat.*

Les souches *S. thermophilus* CNRZ385 ICE*St3cat* et LMG18311 pMG36e ont respectivement été utilisées comme donatrice et réceptrice.
ICE*St3* : amplification d'un fragment du module de régulation d'ICE*St3* ; *cse* : amplification de la région centrale du gène *cse* ; *attL*, *attR*, *attB* et *attI* : amplification de fragments portant ces sites d'attachement.
La taille des produits de PCR, déduite des analyses de séquences, a été confirmée par comigration avec un marqueur de taille.

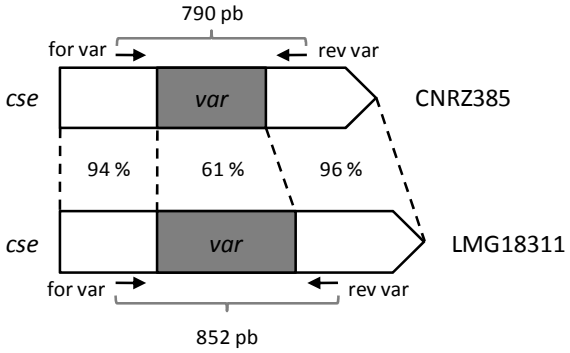


Figure 14 : Représentation schématique des ORF *cse* de *S. thermophilus* CNRZ385 et LMG18311 (d'après Borges *et al*., 2006**).**

Les rectangles fléchés représentent les ORF. Les régions conservées et la région centrale variable var sont respectivement représentées en blanc et en gris. Les pourcentages d'identité nucléotidiques entre les régions délimitées par des pointillés sont indiqués. Les flèches noires représentent les amorces utilisées pour l'amplification de la région *var*.

Ces résultats montrent qu'ICE*St3 *est un ICE fonctionnel et suggèrent qu'ICE*St1 *pourrait l'être. Ce sont les premiers éléments conjugatifs caractérisés chez* S. thermophilus*.

1.3 TRANSFERT INTER-ESPECE D'ICE*ST3*

Diverses firmicutes plus ou moins proches phylogénétiquement de *S. thermophilus* et une protéobactérie gamma, *E. coli*, ont été utilisées comme réceptrice lors de conjugaisons sur filtre afin d'étudier le spectre de transfert d'ICE*St3spc*. Les espèces réceptrices suivantes ont été testées: *S. pyogenes*, *S. agalactiae* (2 souches), *L. lactis* (2 souches), *En. faecalis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Lb. bulgaricus*, *B. subtilis* (2 souches), *Staphylococcus aureus*, *C. difficile* (2 souches) et *E. coli*. La souche donatrice utilisée lors de ces diverses expériences était *S. thermophilus* CNRZ385 ICE*St3spc*. Les résultats de l'étude du transfert inter-espèce d'ICE*St3*, décrits succinctement dans ce paragraphe, sont présentés de manière complète dans l'article 2.

Seules les expériences utilisant *S. pyogenes* ATCC 12202 et *En. faecalis* JH2-2 comme souches réceptrices ont permis d'obtenir de nombreux transconjugants putatifs. La présence d'ICE*St3spc* chez ces clones a été vérifiée, comme lors des transferts intra-espèces, par une PCR amplifiant un fragment du module de régulation de l'élément. La nature de la souche dont les clones dérivent a, quant à elle, été vérifiée par l'amplification d'un fragment du gène *fda* spécifique de la souche ou de l'espèce utilisée comme réceptrice. De plus, certaines propriétés phénotypiques telles que le caractère hémolytique de *S. pyogenes* ou la pigmentation des colonies d'*En. casseliflavus* ont également été utilisées pour discriminer les transconjugants putatifs d'éventuels mutants. Ces analyses ont confirmé la nature des transconjugants putatifs. Ainsi, les fréquences de transfert d'ICE*St3spc* vers *S. pyogenes* ATCC 12202 et *En. faecalis* JH2-2 sont respectivement de $3{,}0 \times 10^{-6} \pm 1{,}5 \times 10^{-6}$ et $3{,}9 \times 10^{-7} \pm 0{,}9 \times 10^{-7}$. Des amplifications par PCR ont montré que, chez les transconjugants analysés, ICE*St3spc* est intégré dans le locus *fda*. Cet ICE est également toujours capable de s'exciser, suggérant qu'il pourrait se retransférer à partir des transconjugants.

De plus, un transconjugant putatif dérivant de *L. lactis* MG1363 pMG36e a été obtenu. Des PCR amplifiant un fragment interne à ICE*St3* et un fragment du gène *fda* spécifique à *S. thermophilus* ont permis de vérifier que le clone isolé est bien un transconjugant dérivant de *L. lactis* MG1363 portant ICE*St3spc* (Figure 15). ICE*St3* se transfère donc à très faible fréquence vers *L. lactis* ($< 10^{-9}$). Néanmoins, si des fragments portant les sites *attB* de *L. lactis* et *attI* d'ICE*St3* ont été amplifiés à partir de l'ADN de ce transconjugant (Figure 15), les produits de PCR correspondant aux sites *attR* et *attL* résultant de l'intégration de l'ICE dans le locus *fda* n'ont pas été obtenus. Ainsi, bien que la fin du gène *fda* soit identique chez *S. thermophilus* et *L. lactis* MG1363, ICE*St3spc* n'est pas intégré dans

le locus *fda* du transconjugant. Ceci suggère que l'ICE se serait intégré par recombinaison site-spécifique dans un site *attB* secondaire où que l'ICE se serait intégré par un événement de recombinaison illégitime n'impliquant pas le site *attI*.

Aucun transconjugant dérivant de *S. agalactiae*, *En. casseliflavus*, *Lb. bulgaricus*, *B. subtilis*, *St. aureus*, *C. difficile* et *E. coli* n'a été obtenu malgré au moins trois tentatives indépendantes.

Ces résultats indiquent qu'ICE*St3 *se transfère vers plusieurs espèces de streptocoques et plusieurs firmicutes de genres proches. De plus, il est intégré dans le locus* fda *chez tous les transconjugants analysés de* S. thermophilus, S. pyogenes *et* En. faecalis*.

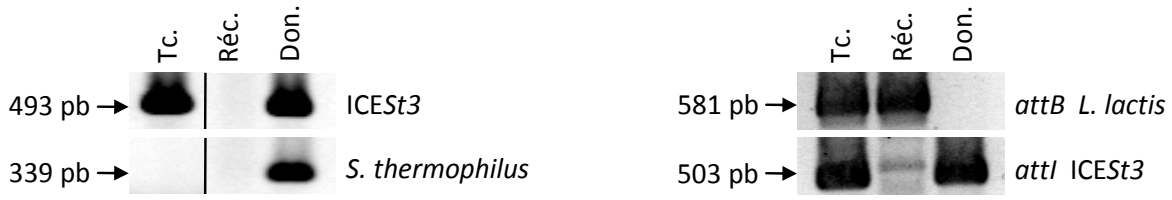


Figure 15 : Caractérisation du transconjugant de *L. lactis* MG1363 portant ICE*St3spc*.

Les souches *S. thermophilus* CNRZ385 ICE*St3spc* et *L. lactis* MG1363 pMG36e ont respectivement été utilisées comme donatrice et réceptrice.
Tc. : transconjugant ; Réc. : réceptrice ; Don. : donatrice ; ICE*St3* : amplification d'un fragment du module de régulation d'ICE*St3* ; *S. thermophilus* : amplification d'un fragment du gène *fda* spécifique de *S. thermophilus* ; *attB* et *attI* : amplification de fragments portant ces sites d'attachement.
La taille des produits de PCR, déduite des analyses de séquences, a été confirmée par comigration avec un marqueur de taille.

1.4 TRANSFERT D'ICE*ST3* A PARTIR D'*EN. FAECALIS*

L'étude par PCR des transconjugants d'*En. faecalis* JH2-2 a montré qu'ICE*St3spc* s'excise chez ces clones ce qui suggère qu'il pourrait se retransférer à partir de ceux-ci. C'est pourquoi, *En. faecalis* JH2-2 ICE*St3spc* et *S. thermophilus* LMG18311 pMG36e ont été respectivement utilisés comme souches donatrice et réceptrice lors de conjugaisons sur filtre. Des transconjugants de *S. thermophilus* dont la nature a été vérifiée par PCR, ont été obtenus à une fréquence de $3{,}2 \times 10^{-9} \pm 0{,}8 \times 10^{-9}$. De plus, ICE*St3* est intégré dans

l'extrémité 3' du gène *fda* chez les transconjugants analysés. Le retransfert d'ICE*St3* a également été obtenu à partir de transconjugants de *S. thermophilus* (voir § B.5).

Par ailleurs, bien qu'aucun transfert d'ICE*St3* de *S. thermophilus* vers *C. difficile* n'ait été obtenu, cette dernière espèce a été utilisée comme réceptrice lors de conjugaison utilisant *En. faecalis* JH2-2 ICE*St3spc* comme donatrice. Les résultats des PCR réalisées sur les différents transconjugants putatifs obtenus ont révélé un clone dérivant de *C. difficile* O27 et ayant acquis l'ICE (Figure 16). Ainsi, ces PCR ont démontré que ce clone était effectivement un transconjugant. Néanmoins, les sites *attR* et *attL* qui seraient formés lors de l'intégration d'ICE*St3spc* dans le locus *fda* n'ont pas été détectés par PCR. L'ICE ne s'est donc pas intégré dans ce locus, mais dans un site inconnu. Malgré d'autres tentatives, aucun autre transconjugant dérivant de *C. difficile* n'a été obtenu.

ICE*St3 *est capable de se re-transférer à partir des transconjugants d'*En. *faecalis.

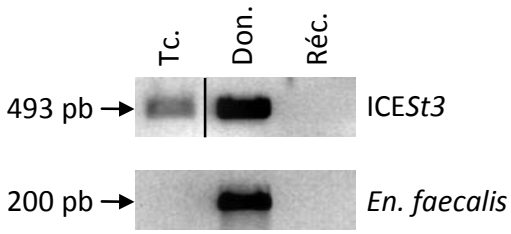


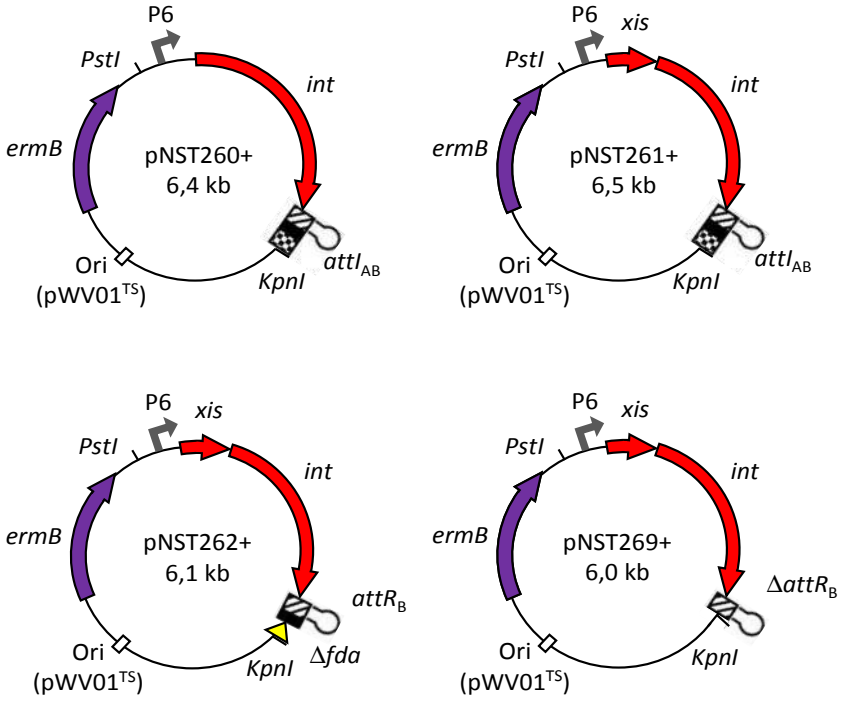
Figure 16 : Caractérisation du transfert d'ICE*St3spc* d'*En. faecalis* JH2-2 vers *C. difficile* O27.

Les souches *En. faecalis* JH2-2 ICE*St3spc* et *C. difficile* O27 ont respectivement été utilisées comme donatrice et réceptrice.
Tc. : transconjugant ; Réc. : réceptrice ; Don. : donatrice ; ICE*St3* : amplification d'un fragment du module de régulation d'ICE*St3* ; *En. faecalis* : amplification d'un fragment du gène *fda* spécifique d'*En. faecalis*.
La taille des produits de PCR, déduite des analyses de séquences, a été confirmée par comigration avec un marqueur de taille.

1.5 Efficacite d'integration de pNST260+

L'efficacité d'intégration du plasmide pNST260+ dans les sites *attB* putatifs, c'est-à-dire l'extrémité 3' du gène *fda*, chez certaines souches réceptrices utilisées lors de conjugaisons inter-espèces a été étudiée. Le plasmide pNST260+ dérivant du vecteur pG+host9 porte le gène *int* d'ICE*St1* sous le contrôle du promoteur constitutif P6 et le site *attI* de cet élément (Figure 17). Ce plasmide a été introduit par électroporation chez les

souches *S. thermophilus* LMG18311, *L. lactis* IL1403, *En. faecalis* JH2-2, *B. subtilis* 168 et *St. aureus* RN4220. Les résultats obtenus sont présentés en détail dans l'article 2.



<u>Figure 17</u> : Carte de plasmides à réplication thermosensible portant tout ou partie du module de recombinaison d'ICE*St1* sous le contrôle du promoteur constitutif P6.

La localisation de l'origine de réplication thermosensible (Ori(pWV01^{TS})) est indiquée par un rectangle blanc. La localisation et l'orientation du gène *ermB* codant une résistance à l'érythromycine est indiquée par une flèche mauve. Les sites de restriction *Pst*I et *Kpn*I utilisés pour le clonage moléculaire des inserts dans le vecteur pG^{+}host9 sont indiqués. La localisation et l'orientation du promoteur constitutif P6 de *Lb. acidophilus* ATCC 4356 est indiqué par une flèche cassée grise. Les flèches rouges indiquent la localisation et l'orientation des gènes *int* et *xis* codant respectivement l'intégrase et l'excisionase d'ICE*St1*. Le triangle jaune représente une courte séquence correspondant à l'extrémité 3' du gène *fda*. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb identiques dans les sites *attR*, *attL* et *attI* d'ICE*St1* ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Les terminateurs ρ indépendant putatifs en aval du gène *int* sont indiqués par une structure tige boucle.

L'efficacité d'intégration du plasmide pNST260+ chez les différentes souches testées a été calculée comme le rapport entre le nombre d'UFC résistant à l'érythromycine à température restrictive divisé par le nombre total d'UFC. Chez *S. thermophilus* LMG18311 et *L. lactis* IL1403, cette efficacité n'est pas statistiquement différente de 1,0 (Figure 18B) bien que la séquence du site *attB* putatif de cette dernière souche présente un nucléotide différent par rapport à la séquence de *S. thermophilus* (Figure 18A). De plus, ce plasmide s'intègre chez *En. faecalis* JH2-2 à une fréquence de $5{,}0 \times 10^{-1} \pm 0{,}2 \times 10^{-1}$ alors que la séquence de l'extrémité 3' du gène *fda* de cette souche est identique à celle de *L. lactis* IL1403 (Figure 18A). Chez *B. subtilis* 168 et *St. aureus* RN4220, dont les séquences des sites *attB* putatifs divergent fortement par rapport à la séquence de *S. thermophilus* (Figure 18A), le plasmide pNST260+ s'intègre respectivement à une fréquence de $5{,}5 \times 10^{-2} \pm 1{,}2 \times 10^{-2}$ et $6{,}3 \times 10^{-2} \pm 2{,}8 \times 10^{-2}$.

	A. **Extrémité 3' du gène *fda***	B. **Fréquence d'intégration de pNST260+**
S. thermophilus	GTTCAGCAAAC - - - AAAGCT TAA - - -	$9{,}7 \times 10^{-1} \pm 0{,}6 \times 10^{-1}$
S. agalactiae	GTTCAGCAAAC - - - AAAGC**A** TAA - - -	ND
S. pyogenes	G**A**TCAGC**T**AAC - - - AAAGC**A** TAA - - -	ND
L. Lactis IL1403	GTTCAGC**T**AAC - - - AAAGCT TAA - - -	$9{,}5 \times 10^{-1} \pm 0{,}6 \times 10^{-1}$
L. Lactis MG1363	GTTCAGCAAAC - - - AAAGCT TAA - - -	ND
En. faecalis	GTTCAGC**T**AAC - - - AAAGCT TAA - - -	$5{,}0 \times 10^{-1} \pm 0{,}2 \times 10^{-1}$
En. casseliflavus	séquence inconnue	ND
Lb. bulgaricus	pas de site *attB* putatif	ND
B. subtilis	GTTC**TT**CAAAC - - - **C**AAGCT TAA - - -	$5{,}5 \times 10^{-2} \pm 1{,}2 \times 10^{-2}$
St. aureus	GT**A**C**TT**CAAAC - - - **CGC**GCT**A**AA TAA	$6{,}3 \times 10^{-2} \pm 2{,}8 \times 10^{-2}$
C. difficile	GTTC**T**GC**T**AAC**TCT**A**T**A**AAC** TAA - - -	ND
E. coli	pas de site *attB* putatif	ND

Figure 18 : Comparaison des séquences de l'extrémité du gène *fda* et de la fréquence d'intégration du plasmide pNST260+ chez différentes souches réceptrices testées.

(A.) Séquences homologues aux 17 derniers nucléotides de l'ORF *fda* de *S. thermophilus*. Le codon stop des ORF *fda* est encadré. Les nucléotides qui divergent par rapport à la séquence de *S. thermophilus* sont en gras et soulignés. Les séquences indiquées sont celles des souches séquencées. Seul un des deux allèles de *St. aureus*, le plus courant dans les bases de données (GenBank/EMBL), est représenté. La séquence du second allèle de *St. aureus* diverge plus de la séquence de *S. thermophilus* que celui représenté puisque l'adénine en position 8 est remplacée par une thymine. Les autres séquences disponibles dans les bases de données sont identiques pour chaque espèce. La séquence de l'extrémité 3' du gène *fda* d'*En. casseliflavus* n'est pas disponible dans les bases de données. Les séquences de l'extrémité 3' du gène *fda* de *Lb. bulgaricus* et *E. coli* ne présentent pas de similarité significative avec celle de *S. thermophilus*. (B.) Fréquence d'intégration du plasmide pNST260+ chez différentes réceptrices.

L'efficacité d'intégration du plasmide pNST260+ semble diminuer lorsque la séquence de l'extrémité 3' du gène* fda *d'une souche diverge par rapport à la séquence présente chez S. thermophilus. Cependant, les résultats obtenus avec* L. lactis *IL1403 et* En. faecalis *JH2-2 montrent que la nature de la souche ou de l'espèce intervient également dans l'efficacité d'intégration du plasmide.

2 REGULATION DE L'EXCISION ET DU TRANSFERT CONJUGATIF

Bien que les séquences nucléotidiques des modules de conjugaison et de recombinaison d'ICE*St1* et ICE*St3* soient identiques à plus de 95 % (Figure 12), les fréquences d'excision et de transfert de ces deux éléments sont très différentes. En effet, les fréquences d'excision d'ICE*St1* et d'ICE*St3* sont respectivement de 10^{-6} et 0,9 x 10^{-3} (Pavlovic *et al.*, 2004), tandis que la fréquence de transfert intra-espèce est inférieure à 10^{-9} pour ICE*St1* et de 3,4 x 10^{-6} ± 0,5 x 10^{-6} pour ICE*St3*. L'origine de cette forte dissemblance pourrait être une régulation différente de ces ICE.

2.1 ANALYSE *IN SILICO* DES MODULES DE REGULATION

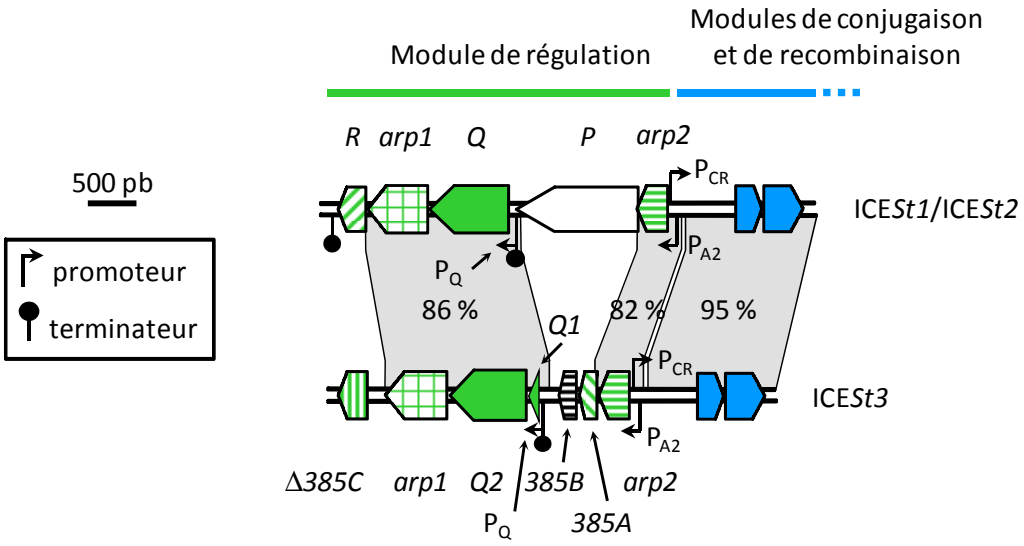
Contrairement à leurs modules de conjugaison et de recombinaison, les modules de régulation de ces éléments présentent des différences notables (Figures 12 et 19). Ces modules de régulation partagent deux ORF, *arp1* et *arp2* (Figure 19). Un décalage du cadre de lecture de type -1 a été détecté dans l'extrémité 5' de la séquence d'ICE*St3* apparentée à *orfQ* d'ICE*St1*/ICE*St2* (828 nt) (Figure 20). Les séquences *orfQ1* (21 nt) et *orfQ2* (804 nt) pourraient donc n'être que des pseudogènes. Les modules de régulation d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'ICE*St3* contiennent également des ORF ou pseudogènes qui leur sont propres : *orfP* et *orfR* pour ICE*St1*/ICE*St2* et *orf385A*, *orf385B* et Δ*orf385C* pour ICE*St3*.

Les protéines de régulation putatives codées par les gènes *arp1* et *arp2* appartiennent respectivement aux familles de régulateurs *cI* et *cI*-like. Lorsque les dommages à l'ADN provoquent l'accumulation de fragments d'ADN simple-brin, RecA* est produit en grande quantité et active le domaine autoprotéolytique des régulateurs de type cI. Le gène *arp1* serait donc impliqué dans une première voie de régulation répondant à RecA*. Les régulateurs de type *cI*-like ne possèdent aucun domaine protéolytique. Néanmoins, les protéines putatives OrfQ d'ICE*St1*/ICE*St2*, OrfQ2 d'ICE*St3* et leurs homologues portent un domaine DUF955 dont le motif H-E-X-X-H suggère qu'elles pourraient être des peptidases à zinc. L'activité protéolytique d'une de ces protéines à domaine DUF955, ImmA, a récemment été caractérisée (Bose *et al.*, 2008). Cette protéine

codée par ICE*Bs1* est une protéase, qui en réponse aux dommages à l'ADN et à la production de RecA*, est activée et clive le répresseur ImmR homologue à Arp2. Ainsi, les gènes *orfQ* et *arp2* d'ICE*St1*/ICE*St2* ainsi qu'*orfQ2* et *arp2* d'ICE*St3* pourraient être les deux partenaires d'une seconde voie de régulation répondant à RecA*.

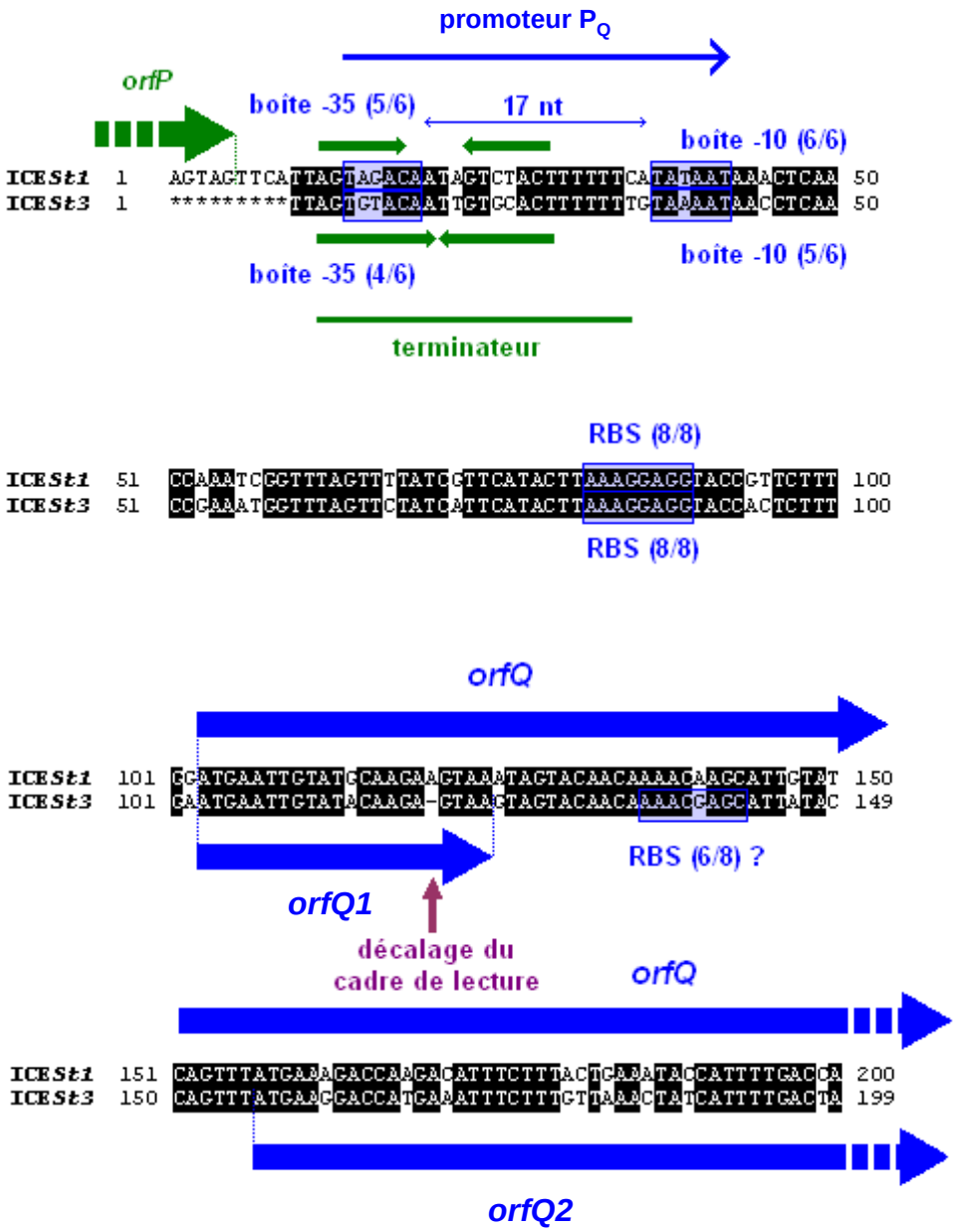
En outre, le gène *orf385A* code également une protéine putative à domaine HTH apparentée à des gènes de régulation de prophages. La fonction des protéines putatives codées par les autres ORF est inconnue.

Les séquences -35 et -10 des promoteurs putatifs P_{A2} (TTGACT-17 pb-TACAAT) situés en 5' des ORF *arp2* chez les deux éléments sont identiques et diffèrent légèrement du consensus décrit chez les *Firmicutes* (TTGACA-17 pb-TATAAT) (Figures 19 et 21) (Helmann, 1995; Morrison and Jaurin, 1990). Les séquences des RBS (Ribosome Binding Site) se situant en 5' de ces mêmes ORF sont également identiques, mais divergent du consensus établi chez *B. subtilis* (AAGGAGG) (Rocha *et al.*, 1999) en quatre positions.



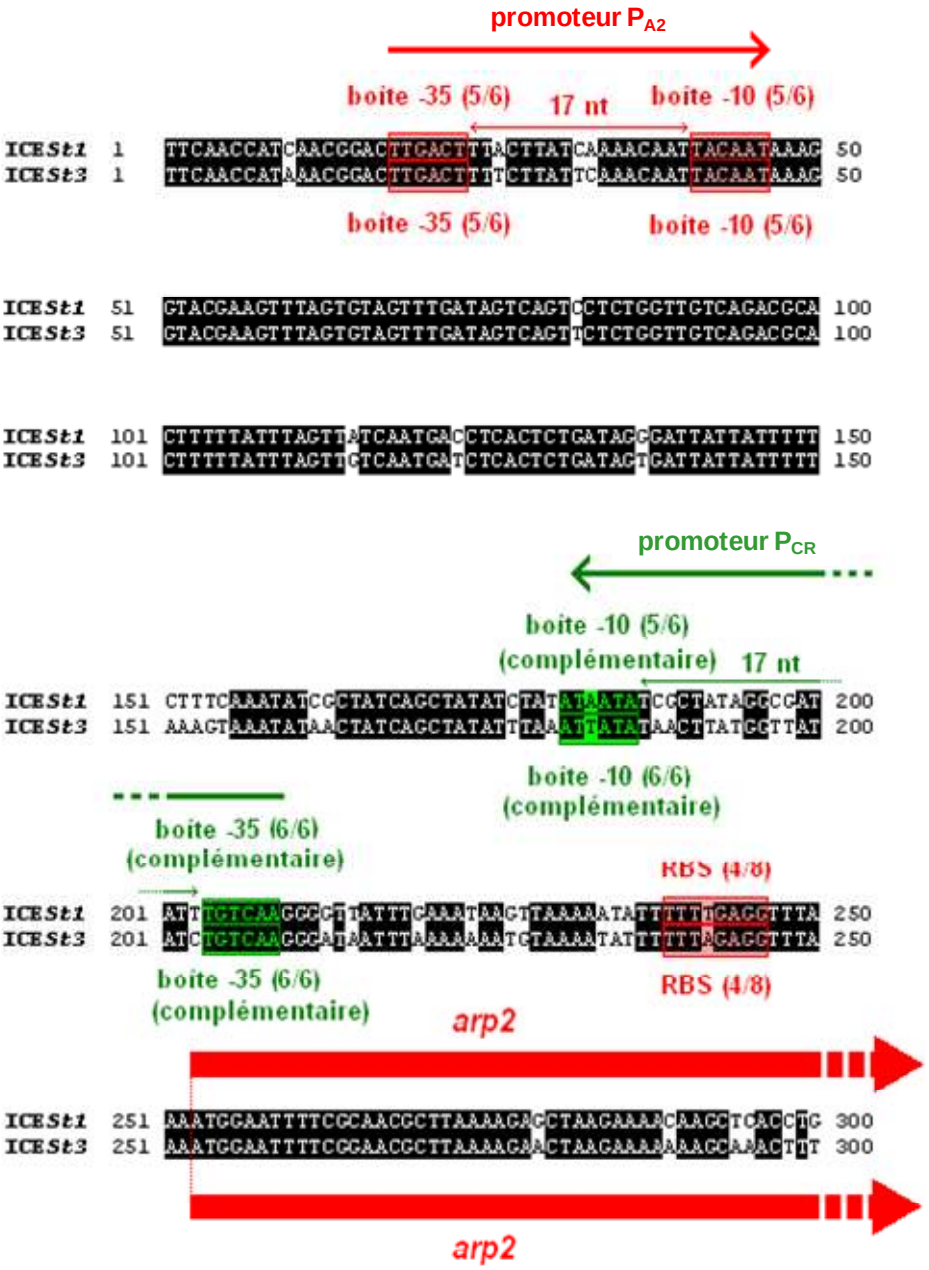
<u>Figure 19</u> : Carte génétique des modules de régulation d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'ICE*St3*.

Les symbolismes et couleurs utilisés sont identiques à ceux de la figure 9. Les noms d'ORF commençant par "*orf*" ont été abrégés avec le nom ou la lettre correspondante. La position et l'orientation des ORF ou des ORF tronquées (Δ) sont indiquées par des rectangles fléchés. *orfQ1* (21 nucléotides) n'est pas à l'échelle. Les ORF ayant de 40 à 80 % d'identité nucléotidique sont représentées par des symboles et une couleur identiques. Les zones grises relient les séquences étroitement apparentées des îlots génomiques (plus de 80 % d'identité nucléotidique); le pourcentage d'identité est indiqué. Les flèches cassées et les "sucettes" noires représentent respectivement les promoteurs et terminateurs ρ indépendants putatifs identifiés par analyse *in silico*.



<u>Figure 20</u> : Alignement des séquences nucléotidiques situées en 5' des ORF *orfQ1* et *orfQ2* d'ICE*St3* et *orfQ* d'ICE*St1*/ICE*St2*.

Le sens des séquences est opposé à celui utilisé dans les cartes précédentes (Figures 9, 11 et 19). Les nucléotides identiques dans les deux séquences sont écrits en blanc sur fond noir. Les astérisques correspondent aux régions d'ICE*St3* non apparentées à ICE*St1*/ICE*St2*. Les chiffres représentent la position des nucléotides dans la séquence. *orfQ1* et le début d'*orfQ* et d'*orfQ2* sont représentés par des flèches bleues. La fin d'*orfP* est représentée par une flèche verte. Les boîtes -10 et -35 des promoteurs P_Q ainsi que les RBS sont indiquées par des rectangles bleus. Les répétitions inversées des terminateurs en 3' d'*orfP* sont représentées par de petites flèches vertes. La flèche mauve indique le décalage du cadre de lecture entre les séquences d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'ICESt3. Les fractions entre parenthèses représentent, pour chaque RBS et pour chaque boîte -10 et -35 du promoteur, le nombre de nucléotides identiques au consensus.



<u>Figure 21</u> : Alignement des séquences nucléotidiques situées en 5' des ORF *arp2* d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'ICE*St3*.

Le sens des séquences est opposé à celui utilisé dans les cartes (Figures 9, 11 et 19). Les nucléotides identiques dans les deux séquences sont écrits en blanc sur fond noir. Les chiffres représentent la position des nucléotides dans la séquence. Le début *d'arp2* est représenté par une flèche rouge. Les séquences des boîtes -10 et -35 du promoteur P_{A2} et des RBS des ORF *arp2* sont représentées par des rectangles rouges. Les séquences des boîtes -10 et -35 du promoteur des gènes des modules de conjugaison et de recombinaison (P_{CR}) sont représentées par des rectangles verts. Les fractions entre parenthèses représentent, pour chaque RBS et pour chaque séquence des boîtes -10 et -35 des promoteurs, le nombre de nucléotides identiques au consensus.

De plus, bien que la séquence du promoteur putatif P_Q (TAGACA-17 pb-TATAAT) qui contrôlerait l'expression des ORF *orfQ* et *arp1* d'ICE*St1*/ICE*St2* soit quasiment identique au consensus, celle du promoteur putatif P_Q (TGTACA-17 pb-TAAAAT) qui contrôlerait l'expression des ORF *orfQ1*, *orfQ2* et *arp1* d'ICE*St3* s'en éloigne plus (Figures 19 et 20). En outre, si la séquence des RBS se situant en 5' d'*orfQ* d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'*orfQ1* d'ICE*St3* est identique au consensus établi chez *B. subtilis*, la séquence du RBS putatif se situant en 5' *d'orfQ2* d'ICE*St3* diverge du consensus en deux positions.

Par ailleurs, le promoteur putatif P_{CR} identifié chez chaque élément est le seul promoteur qui contrôlerait l'expression des modules de conjugaison et de recombinaison (Figures 19 et 21). Bien que la séquence du promoteur P_{CR} d'ICE*St1*/ICE*St2* (TTGACA-17 pb-TATTAT) et celle du promoteur P_{CR} d'ICE*St3* (TTGACA-17 pb-TATAAT) soient identiques ou quasi-identiques au consensus, de nombreuses différences existent dans la séquence de 17 pb séparant les boîtes -10 et -35 de ces deux promoteurs.

Les terminateurs ρ indépendants putatifs situés en 5' d'*orfQ* d'ICE*St1*/ICE*St2* et en 5' d'*orfQ1* chez ICE*St3* sont localisés dans les régions présentant 86 % d'identité (Figures 19 et 20). La taille des répétitions inversées est de 7 nucléotides chez ICE*St1*/ICE*St2* et de 9 nucléotides chez ICE*St3*. Cependant, la prédiction de structure secondaire sur ces répétitions inversées conduit dans les deux cas à une structure formée d'une tige de 2x7 nucléotides et d'une boucle de 4 nucléotides. La variation d'énergie libre associée à la formation de ces structures est de –7,7 kcal/mol pour ICE*St1*/ICE*St2* et de –7,8 kcal/mol pour ICE*St3*. L'analyse suggère donc que les modules de régulation d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'ICE*St3* seraient organisés en deux opérons.

La différence entre les fréquences d'excision et de transfert d'ICE*St1 *et d'ICE*St3 *pourrait être la conséquence de la présence de gènes propres à chaque ICE dans le module de régulation et/ou de la divergence entre les séquences des promoteurs et RBS présents dans ce module.

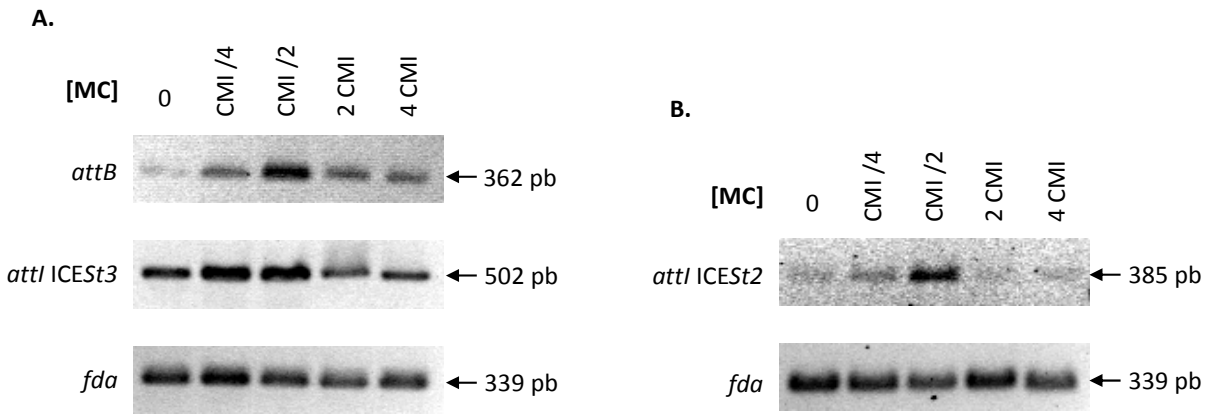
2.2 Impact de traitements a la mitomycine C

L'analyse de la séquence des modules de régulation d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'ICE*St3* suggérait que des dommages à l'ADN pouvaient induire l'excision et/ou le transfert de ces éléments par l'intermédiaire de RecA*. En effet, l'action des répresseurs de types *cI* et *cI*-like, auxquelles appartiennent respectivement les protéines putatives Arp1 et Arp2, est levée en réponse à la production de fragments d'ADN simple-brin et de RecA*. La mitomycine C a été utilisée pour tester l'hypothèse de la dérépression des ICE de *S. thermophilus* par les dommages à l'ADN. En effet, cet antibiotique est un agent pontant et

intercalant de l'ADN qui provoque des arrêts de la fourche de réplication et l'accumulation de fragments d'ADN simple-brin lors de la réplication.

2.2.1 IMPACT SUR LES FREQUENCES D'EXCISION

La concentration minimale inhibitrice (CMI) de mitomycine C pour les souches CNRZ368 et CNRZ385 portant respectivement ICE*St1*/ICE*St2* et ICE*St3* est de 0,2 µg/ml en milieu Hogg-Jago lactose (HJL). Des cellules en croissance exponentielle ont été traitées à la mitomycine C à des concentrations proches de la CMI (CMI/2, CMI/4, 2CMI et 4CMI). Ensuite, des fragments portant les sites d'attachement *attB* et *attI* produits par l'excision des différents éléments ont été amplifiés par PCR à partir de quantités connues d'ADN. Le traitement à la mitomycine C des souches CNRZ368 et CNRZ385 ne provoque aucune modification de l'intensité du signal témoin correspondant au gène *fda* mais conduit à une augmentation de l'intensité des signaux de PCR correspondant aux sites *attB* et *attI* d'ICE*St1* (article 1) et d'ICE*St3* (Figure 22A). Des amplifications par PCR similaires ont montré que le traitement de la souche CNRZ368 entraîne également une augmentation de l'intensité des signaux correspondant au site *attI'* d'ICE*St2* (Figure 22B). Cependant, malgré des conditions de PCR favorables, l'amplification du site *attB'* produit par l'excision d'ICE*St2* n'a pas été obtenue.

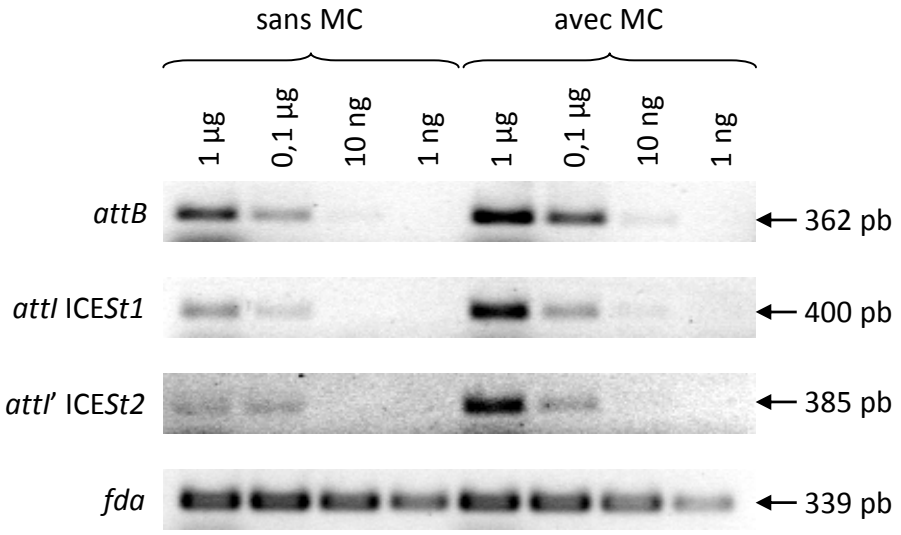


<u>Figure 22</u> : Analyse par PCR de l'effet des traitements à la mitomycine C sur l'excision d'ICE*St3* (A.) et d'ICE*St2* (B.).

Les PCR ont été réalisées sur 1 µg d'ADN matrice pour les sites *attB* et *attI* obtenus après excision d'ICE*St2* et sur 1 ng pour les sites *attB* et *attI* obtenus après excision d'ICE*St3* et la réaction témoin amplifiant un fragment du gène *fda*. Les cellules de CNRZ368 et CNRZ385 portant respectivement ICE*St1*/ICE*St2* et ICE*St3* ont été traitées à la mitomycine C à des concentrations de CMI/4, CMI/2, 2CMI et 4CMI. En parallèle, un témoin négatif (absence de mitomycine C) a été réalisé. La taille des produits de PCR, déduite des analyses de séquences, a été confirmée par comigration avec un marqueur de taille.
[MC] : concentration en mitomycine C.

Ainsi, les traitements à la mitomycine C provoquent une augmentation de la quantité relative des formes circulaires d'ICE*St1*, ICE*St2* et ICE*St3.* L'augmentation maximale est obtenue pour une concentration équivalente à la moitié de la CMI dans les trois cas (article 1, Figure 22).

Des PCR semi-quantitatives permettant d'amplifier des fragments portant les sites *attB*, *attI* d'ICE*St1* et *attI'* d'ICE*St2* ont été réalisées à partir de différentes quantités d'ADN matrice (1 µg à 1 ng) issu de cellules de CNRZ368 traitées ou non à la mitomycine C. Les amplifications effectuées à partir d'une même quantité d'ADN matrice démontrent que les traitements à la mitomycine C provoquent une augmentation de l'intensité des signaux correspondant aux sites d'attachement, tandis que l'intensité des signaux des amplifications témoins réalisés sur le gène *fda* ne varient pas (Figure 23). A partir de 10 ng d'ADN provenant de cellules traitées, des signaux de faible intensité sont obtenus pour les fragments correspondant aux sites *attI'* d'ICE*St2* et *attI* d'ICE*St1* (Figure 23) alors que la plus faible quantité d'ADN issue de cellules non traitées permettant d'obtenir un signal pour ces mêmes sites est seulement de 0,1 µg. Ainsi, les fragments correspondant aux sites *attI'* d'ICE*St2* et *attI* d'ICE*St1* sont amplifiables à partir d'une quantité d'ADN matrice 10 fois plus faible lorsque les cellules ont été traitées à la mitomycine C.



<u>Figure 23</u> : Analyse par PCR semi-quantitative de l'effet des traitements à la mitomycine C sur l'excision d'ICE*St1* et d'ICE*St2*.

Les PCR ont été réalisées sur des quantités d'ADN matrice allant de 1 µg à 1 ng. Les cellules de CNRZ368 traitées à la mitomycine C (MC) ont été cultivées avec des concentrations équivalentes à la moitié de la CMI. En parallèle, des PCR témoins réalisées sur de l'ADN issu de cellules cultivées en absence de mitomycine C ont été réalisées. Les lignes nommées *attB*, *attI* ICE*St1* et *attI'* ICE*St2* correspondent à des fragments portant ces sites d'attachement. La ligne nommée *fda* correspond à l'amplification d'un fragment interne à ce gène. La taille des produits de PCR, déduite des analyses de séquences, a été confirmée par comigration avec un marqueur de taille. Le signal obtenu pour l'amplification du site attI' à partir de 10 ng d'ADN est peu visible.

En présence de mitomycine C, une augmentation d'environ 10 fois de la quantité des formes circulaires d'ICE*St1, *ICE*St2 *et ICE*St3, *c'est-à-dire du nombre de copies circulaires de ces éléments par génome, est obtenue. Ceci suggère donc fortement que l'excision de ces éléments soit déréprimée par RecA*.

2.2.2 Impact sur la frequence de transfert d'ICE*St1* et d'ICE*St3*

Les souches CNRZ368 ICE*St1cat* et CNRZ385 ICE*St3cat* traitées à la mitomycine C et LMG18311 pMG36e ont été respectivement utilisées comme donatrices et réceptrice lors de conjugaisons sur filtre. Les cellules donatrices ont été traitées pendant une heure à des concentrations équivalentes à la moitié ou au quart de la CMI en mitomycine C. La nature des transconjugants obtenus a été vérifiée comme précédemment par PCR. Dans le cadre de ces expériences, les fréquences de transfert sont exprimées en nombre de transconjugants par réceptrice du fait de la mortalité importante des donatrices traitées.

Alors que la fréquence de transfert d'ICE*St3* à partir de cellules non traitées est de $3{,}8 \times 10^{-7} \pm 1{,}3 \times 10^{-7}$, les fréquences de transfert de cet élément sont de $1{,}0 \times 10^{-5} \pm 0{,}4 \times 10^{-5}$ et $7{,}6 \times 10^{-6} \pm 2{,}6 \times 10^{-6}$ lorsque les cellules donatrices sont respectivement traitées avec des concentrations égales au quart ou à la moitié de la CMI en mitomycine C. Lors des expériences testant les effets des traitements à la mitomycine C sur la fréquence de transfert d'ICE*St1cat*, aucun transconjugant n'a été observé.

Les traitements à la mitomycine C provoquent une augmentation de la fréquence de transfert d'ICE*St3cat *d'un facteur proche de 25.

2.3 Implication d'*arp1* dans la regulation de l'excision et du transfert

2.3.1 Role d'*arp1* dans la regulation de l'excision d'ICE*St1*/ICE*St2*

Les dommages à l'ADN induisent l'autoprotéolyse des répresseurs SetR de l'ICE SXT et cI du phage λ, ce qui entraîne la levée de la répression de ces deux éléments (Beaber *et al.*, 2004; Dodd *et al.*, 2004). La protéine putative Arp1 d'ICE*St1*/ICE*St2* étant un homologue de SetR et de cI, son implication dans la levée de la répression de l'excision et du transfert des ICE de *S. thermophilus* par les dommages à l'ADN a été étudiée.

Pour tester cette hypothèse, l'ORF *arp1* d'ICE*St1*/ICE*St2* (699 nucléotides) a été remplacée par une ORF *arp1* présentant une délétion interne en phase (Δ*arp1*) grâce au vecteur pG$^+$host9 (article 2, Figure 24). L'ORF Δ*arp1*, d'une taille de 42 nucléotides, est composée des 6 nucléotides correspondant à un site de restriction *Eco*RI flanqués des 15

premiers et 21 derniers nucléotides de l'ORF *arp1*. Ce remplacement permet de minimiser les effets polaires de la délétion d'*arp1* sur la transcription et la traduction des ORF présentes dans le même opéron.

L'effet de la délétion d'*arp1* chez la souche CNRZ368 portant ICE*St1*/ICE*St2* a été étudié par PCR semi-quantitative. Des fragments contenant les sites *attB*, *attI* d'ICE*St1* et *attI'* d'ICE*St2* ont été amplifiés à partir de 1 µg à 10 pg d'ADN matrice provenant des souches CNRZ368 et CNRZ368 Δ*arp1*. L'intensité des signaux issus de l'amplification témoin d'un fragment interne au gène *fda* est similaire pour les deux souches et ce, quelque soit la quantité d'ADN matrice utilisée (Figure 25). Si les quantités minimales d'ADN permettant d'obtenir les produits d'amplification chez la souche sauvage sont de 10 ng pour le site *attB* et de 0,1 µg pour les sites *attI* d'ICE*St1* et *attI'* d'ICE*St2*, lorsque le gène *arp1* est délété, ces quantités sont 100 fois plus faible pour *attI'* d'ICE*St2* et 1000 fois plus faible pour *attB* et *attI* d'ICE*St1* (Figure 25).

Cependant, bien que les éléments ICE*St1* Δ*arp1* et ICE*St1cat* Δ*arp1* présentent un phénotype d'excision identique, aucun transconjugant n'a été obtenu lorsqu'une souche portant ICE*St1cat* Δ*arp1* a été utilisée comme donatrice.

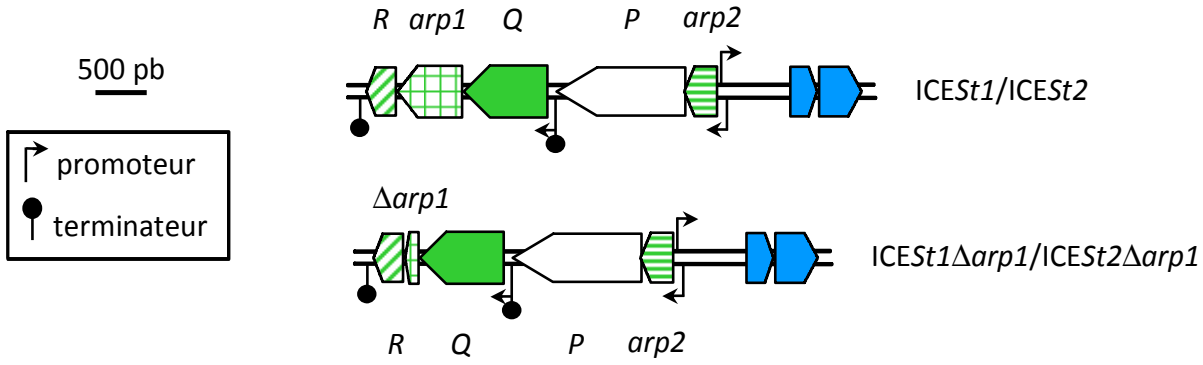
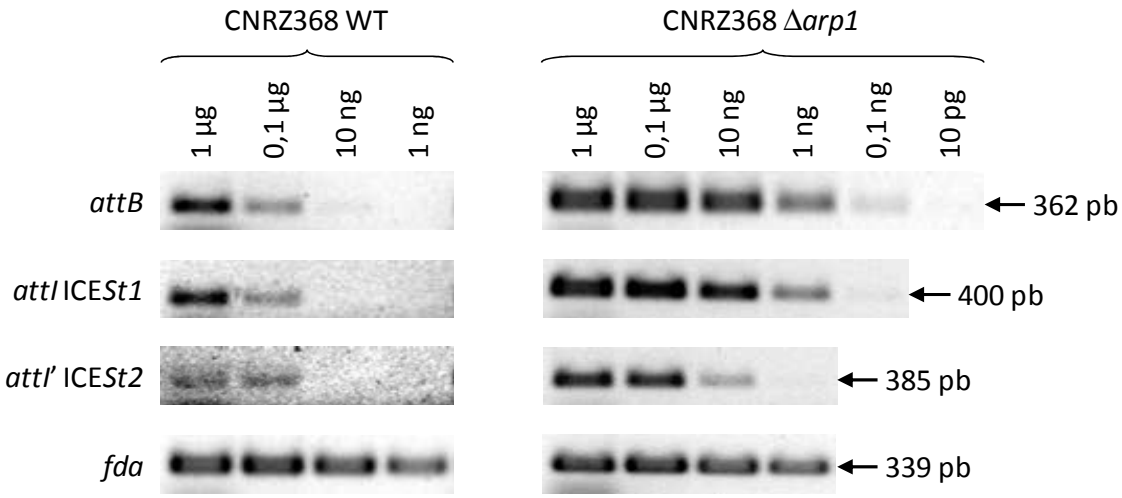


Figure 24 : Carte génétique des modules de régulation d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'ICE*St1*Δ*arp1*/ICE*St2*Δ*arp1*.

Les symbolismes et couleurs utilisés sont identiques à ceux de la figure 9. Les noms d'ORF commençant par "*orf*" ont été abrégés avec le nom ou la lettre correspondante. La position et l'orientation des ORF ou des ORF tronquées (Δ) sont indiquées par des rectangles fléchés. *orf*Δ*arp1* (42 nucléotides) n'est pas représentée à l'échelle. Les flèches cassées et les "sucettes" noires représentent respectivement les promoteurs et terminateurs ρ indépendants putatifs identifiés par analyse *in silico*.

De plus, les effets des traitements à la mitomycine C sur la souche CNRZ368 Δ*arp1* ont été étudiés par PCR semi-quantitative. Les amplifications témoins du gène *fda* réalisées sur l'ADN de la souche CNRZ368 Δ*arp1* ne varient pas significativement en présence de mitomycine C (Figures 23 et 26). Néanmoins, alors que les signaux correspondant aux trois sites d'attachement testés sont détectables chez la souche sauvage avec des quantités d'ADN moindre lorsque les cellules sont traitées à la mitomycine C (Figure 23), l'intensité de ces signaux ne présentent pas de différence significative entre les cellules de la souche CNRZ368 Δ*arp1* traitées ou non (Figure 26).

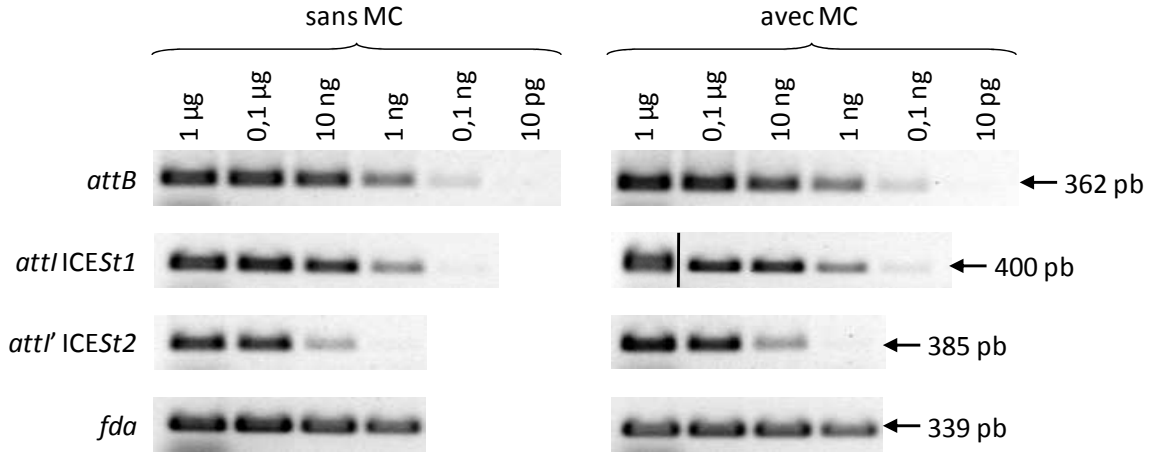


<u>Figure 25</u> : Analyse par PCR semi-quantitative de l'effet de la délétion d'*arp1* sur l'excision d'ICE*St1* et d'ICE*St2*.

Les PCR ont été réalisées sur des quantités d'ADN matrice allant de 1 µg à 1 ng pour la souche sauvage (CNRZ368 WT) et de 1 µg à 10 pg pour la souche délétée d'*arp1* (CNRZ368 Δ*arp1*). Les lignes nommées *attB*, *attI* ICE*St1* et *attI'* ICE*St2* correspondent à l'amplification de fragments portant ces sites d'attachement. La ligne nommée *fda* correspond à l'amplification témoin d'un fragment interne à ce gène. La taille des produits de PCR est déduite des analyses de séquences et ont été confirmées par comigration avec un marqueur de taille.

La délétion d'*arp1 *chez ICE*St1*/ICE*St2 *conduit donc à une augmentation de la quantité relative des formes circulaires d'ICE*St1 *et d'ICE*St2 *d'environ 1000 et 100 fois, respectivement. Ceci démontre donc que le gène* arp1 *réprime l'excision de ces éléments. Toutefois, malgré une dérépression de l'excision similaire à celle observé chez l'élément non marqué, aucun transconjugant d'ICE*St1cat *Δ*arp1 *n'a été obtenu. Il est donc possible que le gène* arp1 *ne régule que l'excision et non le transfert conjugatif de cet élément.

***De plus, l'excision d'ICE*St1 *et d'ICE*St2 *délétés d'*arp1 *ne semble pas ou très peu sensible aux dommages à l'ADN suggérant fortement que ce gène* soit impliqué dans la dérépression de *l'excision de ces éléments par RecA*. Le gène arp1 est donc un acteur central de la régulation d'ICE*St1*/ICE*St2.**



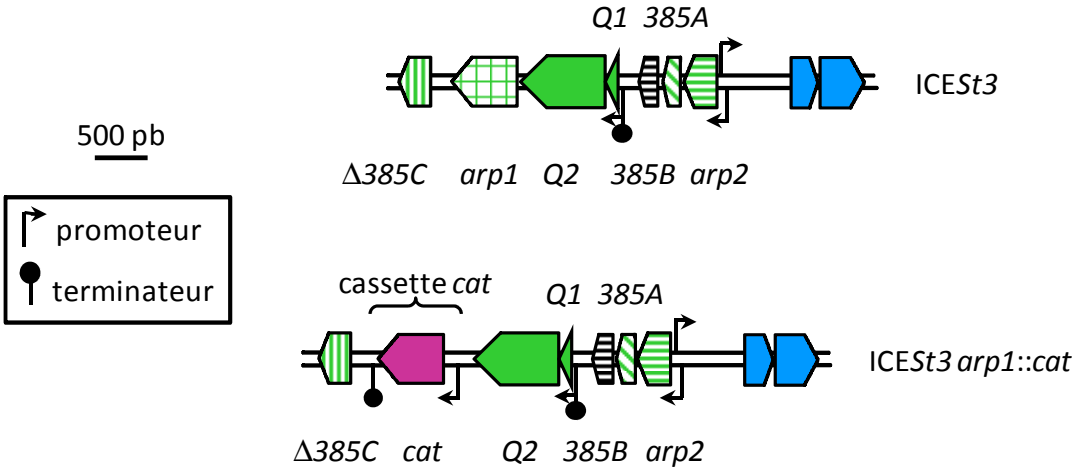
<u>Figure 26</u> : Analyse par PCR semi-quantitative de l'effet de traitements à la mitomycine C sur l'excision d'ICE*St1*Δ*arp1* et d'ICE*St2*Δ*arp1*.

Les PCR ont été réalisées sur des quantités d'ADN matrice allant de 1 µg à 10 pg. Les cellules de CNRZ368 Δ*arp1* traitées à la mitomycine C (MC) ont été cultivées avec des concentrations équivalentes à la moitié de la CMI. En parallèle, des PCR témoins réalisées sur de l'ADN issu de cellules cultivées en absence de mitomycine C ont été réalisées. Les lignes nommées *attB*, *attI* ICE*St1* et *attI'* ICE*St2* correspondent à l'amplification de fragments portant ces sites d'attachement. La ligne nommée *fda* correspond à l'amplification témoin d'un fragment interne à ce gène. La taille des produits de PCR est déduite des analyses de séquences et ont été confirmées par comigration avec un marqueur de taille.

2.3.2 ROLE D'*ARP1* DANS LA REGULATION DE L'EXCISION ET DU TRANSFERT D'ICE*ST3*

Les phénotypes du mutant CNRZ368 Δ*arp1* et la parenté d'ICE*St1*/ICE*St2* et ICE*St3* laissaient également supposer un rôle important d'*arp1* chez la souche CNRZ385 portant ICE*St3*. L'étude d'*arp1* chez cet ICE a débuté par son interruption grâce à l'intégration d'un plasmide recombinant portant un gène de résistance à l'érythromycine. Cependant, le phénotype de cet intégrant n'a pas été étudié du fait de sa très grande instabilité. En effet, en absence d'érythromycine, le plasmide intégré est perdu à très haute fréquence, probablement par recombinaison homologue, entraînant ainsi un retour au phénotype sauvage.

Cette instabilité suggère fortement que la mutation d'*arp1* est fortement contre-sélectionnée chez ICE*St3* et que ce gène est important dans la biologie de cet élément. De ce fait, la stratégie employée pour obtenir un élément ICE*St3* muté dans *arp1* a été le remplacement de cette ORF par le gène *cat* conférant une résistance au chloramphénicol (Figure 27). Ce gène avait déjà été utilisé pour marquer ICE*St1* et ICE*St3* par insertion dans des régions non codantes (§ B.1.1). Malgré l'acquisition du gène *cat* devant permettre de contrebalancer l'effet de la perte d'*arp1* sur la valeur adaptative, des mutants CNRZ385 *arp1*::*cat* ont été très difficilement obtenus. L'analyse succincte de trois mutants indépendants a suggéré que ceux-ci ont un temps de génération plus élevé que la souche sauvage laissant penser que le remplacement d'*arp1* a des conséquences importantes sur la croissance ou la survie des cellules.



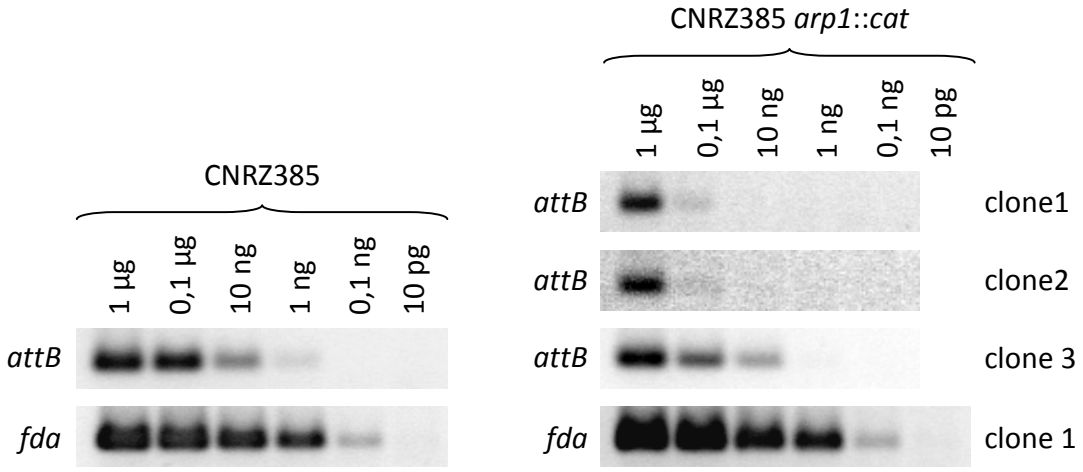
<u>Figure 27</u> : Carte génétique des modules de régulation d'ICE*St3* et d'ICE*St3 arp1*::*cat*.

Les symbolismes et couleurs utilisés sont identiques à ceux de la figure 9. Les noms d'ORF commençant par "*orf*" ont été abrégés avec le nom ou la lettre correspondante. La position et l'orientation des ORF ou des ORF tronquées (Δ) sont indiquées par des rectangles fléchés. *orfQ1* (21 nucléotides) n'est pas à l'échelle. Les flèches cassées et les "sucettes" noires représentent respectivement les promoteurs et terminateurs ρ indépendant putatifs identifiés par analyse *in silico*.

L'analyse de ces trois clones indépendants a ensuite été réalisée par PCR semi-quantitative. Bien que l'amplification témoin du gène *fda* soit similaire entre les trois mutants et la souche sauvage, l'amplification d'un fragment portant le site *attB* a montré que ces trois clones ne présentent pas la même proportion de forme circulaire libre de l'ICE (Figure 28). En effet, chez le clone 3 et la souche sauvage, une quantité minimale de 1 ng d'ADN permet de détecter la formation du site *attB*, suggérant que la proportion de formes circulaires d'ICE*St3* n'est pas différente chez ces deux souches. Néanmoins, la quantité minimale d'ADN permettant d'obtenir un signal de PCR est, chez les clones 1 et 2, environ 100 fois plus élevée.

Le clone 1 de CNRZ385 *arp1*::*cat* (CNRZ385 *arp1*::*cat*-1) a été utilisé comme donatrice lors d'expériences de conjugaison afin d'étudier la capacité de cette version mutée d'ICE*St3* à se transférer vers LMG18311 pMG36e. Les fréquences de transfert obtenues pour ICE*St3* *arp1*::*cat*-1 et ICE*St3* sauvage sont respectivement de $1{,}1 \times 10^{-5} \pm 0{,}4 \times 10^{-5}$ et $1{,}8 \times 10^{-5} \pm 0{,}7 \times 10^{-5}$. Ainsi, bien qu'ICE*St3* *arp1*::*cat*-1 s'excise à une fréquence environ 100 fois plus faible qu'ICE*St3* sauvage, ces 2 ICE se transfèrent tous deux à une fréquence similaire.

Le gène* arp1 *est donc impliqué dans la régulation de l'excision d'ICE*St3*. Toutefois, il ne semble pas intervenir dans la régulation du transfert conjugatif de cet élément.



<u>Figure 28</u> : Analyse par PCR semi-quantitative de l'effet sur l'excision d'ICE*St3* du remplacement d'*arp1* par la cassette *cat*.

Les PCR ont été réalisées sur des quantités variables d'ADN matrice (de 1 µg à 10 pg) issu de la souche CNRZ385 portant ICE*St3* et de 3 clones de CNRZ385 *arp1*::*cat* obtenus indépendamment (clone 1 à 3). Les lignes nommées *attB* correspondent à l'amplification d'un fragment portant ce site d'attachement. La ligne nommée *fda* correspond à l'amplification d'un fragment interne à ce gène. Seule l'amplification du fragment interne à *fda* réalisée à partir de l'ADN du clone 1 est présentée, les amplifications obtenues pour les clones 2 et 3 étant similaires.

3 ARTICLES TRAITANT DE LA REGULATION ET DU TRANSFERT D'ICE*ST1* ET D'ICE*ST3*

3.1 ARTICLE 1

Bellanger X, Morel C, Decaris B, Guédon G. Regulation of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*: role of the *arp1* repressor. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008; **14**: 16-21.

Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology

J Mol Microbiol Biotechnol 2008;14:16–21
DOI: 10.1159/000106078

Regulation of Excision of Integrative and Potentially Conjugative Elements from *Streptococcus thermophilus*: Role of the *arp1* Repressor

Xavier Bellanger Catherine Morel Bernard Decaris Gérard Guédon

Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR 1128, INRA, IFR110, Faculté des Sciences et Techniques, Nancy-Université, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Key Words
Integrative conjugative element · Site-specific excision · Regulation · cI repressor · *Streptococcus thermophilus*

Abstract
The integrative and conjugative elements (ICEs) excise by site-specific recombination between *attL* and *attR* flanking sites, self-transfer the resulting circular form and integrate into the genome of the recipient cell. Two putative ICEs, ICE*St1* and ICE*St3*, are integrated in the same locus in 2 strains of *Streptococcus thermophilus*. ICE*St1* is a composite element harbouring an internal recombination site, *attL'*. The recombination between *attL'* and *attR* leads to the excision of a shorter putative ICE, ICE*St2*. ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3* carry related regulation modules sharing the open reading frame *arp1* that encodes a protein related to the cI repressor of the phage λ. The repressors belonging to this family autoproteolyse in the presence of damaged DNA. Treatments with mitomycin C induce an increase in the excision of ICE*St1*, ICE*St2* and ICE*St3*. Furthermore, the *arp1* deletion leads to a 1,000-fold increase in the excision of ICE*St1* and ICE*St2* and to a decrease in the excision induction by mitomycin C. Thus, all together, these results suggest that the autocleavage of the *arp1* repressor is involved in derepression of the *S. thermophilus* putative ICE excision by mitomycin C.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Horizontal transfer of genomic islands plays a key role in bacterial evolution [Hacker and Carniel, 2001; Hacker and Kaper, 2000]. However, the mechanism of their transfer and integration remains generally unknown. Whereas in silico analyses revealed that numerous genomic islands could be integrative and conjugative elements (ICEs) or elements deriving from them [Bacic et al., 2005; Bentley et al., 2002; Burrus et al., 2002b; Gaillard et al., 2006; Larbig et al., 2002; Mohd-Zain et al., 2004; Toussaint et al., 2003; van der Meer and Sentchilo, 2003], only few ICEs have been described. ICEs excise by site-specific recombination between *attL* and *attR* flanking sites and self-transfer the resulting circular form carrying an *attI* site and integrate into a replicon of the recipient cell [Burrus et al., 2002a]. This class includes elements which have a very high integration specificity, such as SXT from *Vibrio cholerae* [Waldor et al., 1996], or a lower one, such as the conjugative transposon Tn*916* from *Enterococcus faecalis* [Clewell et al., 1995a]. The ICEs, like the other transferable elements such as prophages and plasmids, have a modular structure and evolution [Burrus et al., 2002a, b; Toussaint and Merlin, 2002]. Each module is composed of all sequences and genes involved in a biological function, such as recombination, regulation or transfer, and can be exchanged between transferable elements.

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel
1464–1801/08/0143–0016$24.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/mmb

Gérard Guédon
Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR INRA1128
Université Henri Poincaré-Nancy 1, 1, Bd des Aiguillettes BP239
FR–54506 Vandœuvre-lès-Nancy (France)
Tel. +33 3 83 68 42 06, Fax +33 3 83 68 11 76, E-Mail guedon@nancy.inra.fr

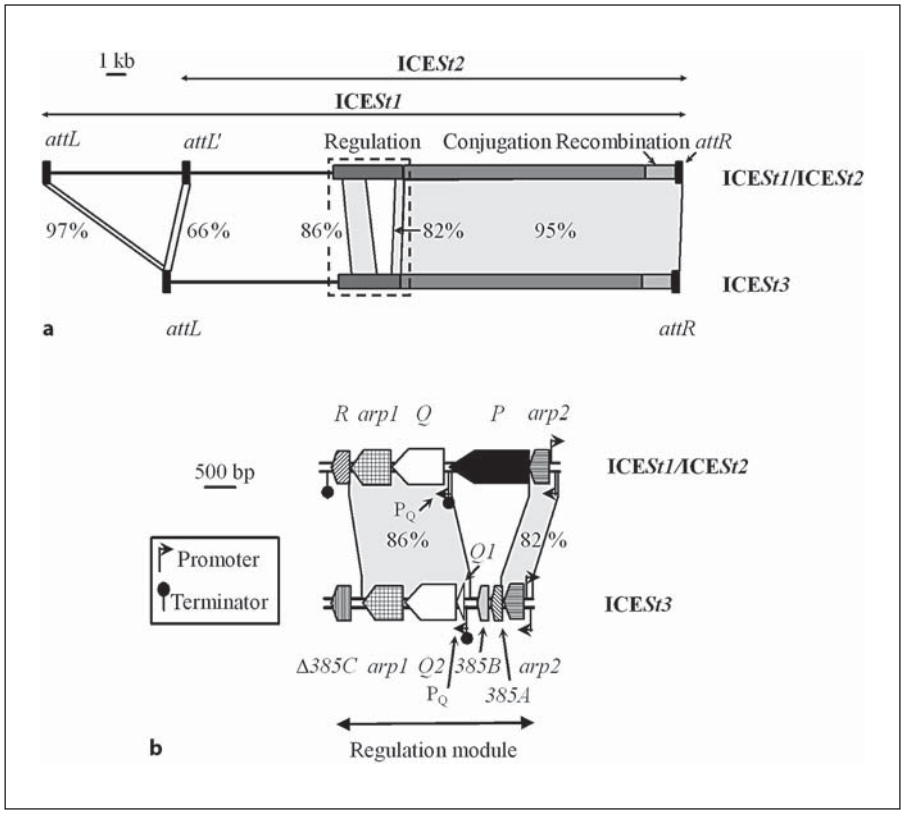


Fig. 1. Comparison of ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3* maps. **a** Location of the recombination, conjugation and regulation modules and the recombination sites on the ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3* maps. Recombination sites are magnified in the figure. The dotted rectangle indicates the area represented in **b**. **b** Map of regulation modules of ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3*. ORF names beginning with *orf* are abbreviated with the corresponding letter or name. Location and orientation of ORFs and truncated ORFs (Δ) belonging to the regulation modules are indicated by arrowed boxes. *orfQ1* is magnified. The angled arrows and the lollipops indicate the putative promoters and putative rho-independent transcription terminators, respectively, deduced from in silico analyses. The grey areas join closely related sequences belonging to the ICEs (>65% nucleotide identity); the percentage identity is indicated.

Whereas the regulation of the excision of numerous prophages is well known, the regulation of the excision of very few ICEs including Tn*916*, ICEs from *Bacteroides*, pSAM2 and *clc* has been described [Bonheyo et al., 2001; Clewell et al., 1995b; Sentchilo et al., 2003; Sezonov et al., 2000]. Furthermore, these few regulation systems are very different from each other. Recently, DNA-damaging agents were found to derepress the excision and transfer of ICE*Bs1* from *Bacillus subtilis* [Auchtung et al., 2005], SXT from *V. cholerae* [Beaber et al., 2004] and SXT-related elements from enterobacteria [McGrath et al., 2005]. Such regulations are similar to the derepression of the site-specific excision of numerous prophages by DNA damage.

The analysis of a chromosomal region including horizontally transferred sequences revealed related genomic islands integrated in the 3′ end of the *fda* locus of many strains of the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus* [Pavlovic et al., 2004]. Two of these genomic islands, the putative ICEs, ICE*St1* from CNRZ368 and ICE*St3* from CNRZ385 (fig. 1a), harbour almost identical potential conjugation modules distantly related to that of Tn*916*. The tyrosine integrase and the excisionase encoded by the ICE*St1* recombination module catalyse its excision by recombination between the *attL* and *attR* flanking sites [Burrus et al., 2000], while the integrase catalyses the integration by recombination between the *attI* and *attB* sites (data not shown). Furthermore, ICE*St1* carries an internal functional recombination site related to *attL*, *attL*′ (fig. 1a) [Pavlovic et al., 2004]. The recombination between *attL*′ and *attR* leads to the excision of the circular form of a shorter putative ICE, ICE*St2*, carrying an *attI*′ site. A genomic island corresponding to the left part of ICE*St1* and flanked by *attL* and *attB*′ sites remains integrated in *fda*. Whereas the recombination modules of ICE*St1* and ICE*St2* only differ by the sequence of the *attL* and *attL*′ sites, different ratios of the excised circular form per genome were found in the stationary phase of growth, 10^{-6} (ICE*St1*) and $<10^{-6}$ (ICE*St2*) [Pavlovic et al., 2004]. ICE*St3*, which possesses a recombination module almost identical to ICE*St1*, excises at a higher frequency, 0.9×10^{-3} [Pavlovic et al., 2004].

The closely related regulation modules of ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3* contain 2 shared open reading frames (ORFs; *arp1* and *arp2*; fig. 1b). A single –1 frameshift was found in the 5′ end of the ICE*St3* sequence related to *orfQ*

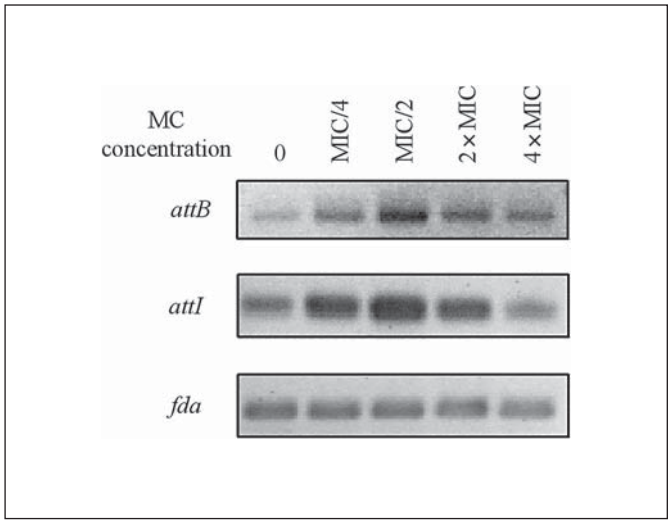


Fig. 2. Effects of MC treatments on excision frequency of ICE*St1*. Cells were grown at 42°C in Hogg-Jago lactose medium [Stingele and Mollet, 1996]. Exponentially growing CNRZ368 cells ($OD_{600\ nm}$ = 0.04 for MIC/4 and MIC/2; $OD_{600\ nm}$ = 0.4 for 2 × MIC and 4 × MIC) were treated with MC for 2.5 h. Fragments containing the recombination sites *attB* and *attI* were amplified using 1 μg template DNA from MC-treated cells.

(858 nt) from ICE*St1*/ICE*St2*. Thus, *orfQ1* (21 nt) and *orfQ2* (804 nt) from ICE*St3* could be pseudogenes. The ICE*St3* recombination module also includes 3 specific ORFs or pseudogenes *(orf385A*, *orf385B* and Δ*orf385C)* and the ICE*St1*/ICE*St2* recombination module contains 2 specific ORFs *(orfP* and *orfR)*. The putative regulatory proteins encoded by *arp1*, *arp2* and *orf385A* carry a helix-turn-helix (HTH) DNA-binding domain and are related to prophage transcriptional regulators involved in the control of lysogeny and/or lysis. The function of the putative proteins encoded by the other ORFs is unknown. Nevertheless, regulation modules of numerous firmicutes prophages such as TP901-1 from *Lactococcus lactis* [Madsen et al., 1999] and of another ICE, ICE*Bs1* from *B. subtilis* [Auchtung et al., 2005], encode an OrfQ homologue. OrfQ from ICE*St1*, OrfQ2 from ICE*St3* and the OrfQ homologues have a DUF955 domain possessing a conserved H-E-X-X-H motif, suggesting that these proteins could be Zn^{++} metalloproteinases [Rawlings and Barrett, 1995]. However, the activity of any of these proteins was not demonstrated. The putative promoter P_Q (TAGACA 17bp TATAAT) controlling the expression of *orfQ* and *arp1* in ICE*St1*/ICE*St2* has a sequence almost identical to the consensus sequence found in firmicutes (TTGACA 17 bp TATAAT) [Helmann, 1995; Morrison and Jaurin, 1990], while the P_Q putative promoter controlling the expression of *orfQ1*, *orfQ2* and *arp1* (TGTACA 17 bp TAAAAT) in ICE*St3* is more distant to the consensus. Thus, the differences between IC*ESt1* and ICE*St3* excision frequencies might be due to *orf385A*, *orfQ* and/or the expression of *arp1* and *orfQ*.

The *arp1* 5′ part encodes an HTH domain and its 3′ part a region characteristic of the COG2932 protein family that includes the cI repressor of the phage λ [Burrus et al., 2002b; Pavlovic et al., 2004]. This region has 2 functions, cI autoproteolysis and cI oligomerisation. In the presence of damaged DNA, the RecA protein, activated by single-strand DNA (RecA*), induces the autoproteolysis of cI and related proteins. Cleaved proteins are not able to oligomerise and therefore are no longer able to repress their target genes [Dodd et al., 2004].

These in silico analyses suggested that DNA damage could derepress excision of ICEs from *S. thermophilus*. The minimal inhibitory concentration (MIC) of mitomycin C (MC), a DNA-damaging agent [Tomasz and Palom, 1997], for strains harbouring ICE*St1*/ICE*St2* (CNRZ368) and ICE*St3* (CNRZ385) was found to be equal to 0.2 μg/ml. Exponentially growing cells have been treated with MC concentrations close to this MIC (MIC/4, MIC/2, 2 × MIC and 4 × MIC). Then, the recombination sites resulting from the excision, *attI* and *attB*, have been amplified by PCR using 1 μg genomic DNA for CNRZ368 and 1 ng for CNRZ385. Treatments of CNRZ368 with MC induced an increase in the PCR signal intensity corresponding to the *attB* and *attI* sites while they did not induce an increase in the PCR signal intensity corresponding to the *fda* gene used as control (fig. 2). The most intense signal, for both *attB* and *attI* sites, was obtained for MIC/2. The effects of MC were also measured by PCR amplification of fragments harbouring *attI* and *attB*, using 1 μg to 1 ng genomic CNRZ368 DNA. The minimum amount of template DNA giving a positive PCR amplification of the *attB* and *attI* site was 100 ng using CNRZ368 DNA in the absence of MC and 10 ng after treatment with MC (MIC/2), suggesting that DNA damage caused by MC induces at least a 10-fold increase in ICE*St1* excision (data not shown). Whereas, in the absence of MC, ICE*St2* and ICE*St3* excision frequencies are very different from that of ICE*St1*, treatments of the strains harbouring ICE*St2* or ICE*St3* with MC (MIC/2) were also found to induce at least a 10-fold increase in their excision (data not shown). This suggests that DNA damage caused by MC induces the excision of the 3 ICEs of *S. thermophilus*.

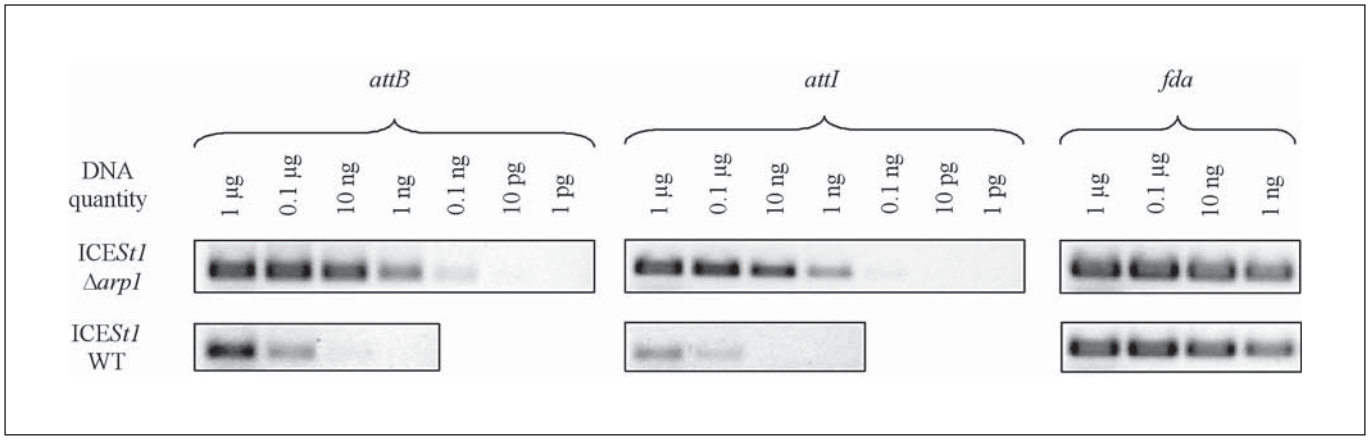


Fig. 3. Effects of *arp1* deletion on excision frequency of ICE*St1*. Cells were grown at 42°C in Hogg-Jago lactose medium [Stingele and Mollet, 1996]. Fragments containing the recombination sites *attB* and *attI* from the strains harboring ICE*St1* wild type or ICE*St1* Δ*arp1* were amplified by PCR using template DNA quantities ranging from 1 µg to 1 pg for CNRZ368 Δ*arp1*.

In order to test the *arp1* function, 2 fragments containing the 5′ and 3′ ends of *arp1* of ICE*St1*/ICE*St2* were cloned in the thermosensitive vector pG$^+$host9 [Biswas et al., 1993; Maguin et al., 1996]. The recombinant plasmid pNST267, carrying a very short deleted ORF, Δ*arp1*, was introduced in *S. thermophilus* CNRZ368. A strain harbouring pNST267 integrated in the chromosome by homologous recombination in 1 of the 2 fragments was isolated. A second homologous recombination in the other fragment led to a strain possessing a deletion of almost the whole *arp1* ORF (CNRZ368 Δ*arp1*). However, the Δ*arp1* ORF also carries a frame shift that might have an impact on the translation of *orfR*, an ORF located downstream from *arp1*.

The effects of the *arp1* deletion were measured by PCR amplification of fragments harbouring *attI* and *attB*, using amounts of genomic DNA from 1 µg to 1 ng for ICE*St1* WT and from 1 µg to 1 pg for ICE*St1* Δ*arp1* (fig. 3). The minimum amount of DNA producing a positive result for the *attB* site was 10 ng of CNRZ368 template DNA and 10 pg of CNRZ368 Δ*arp1* template DNA. In the same way, the lower amount of DNA producing a positive PCR result for the *attI* site was 0.1 µg of CNRZ368 DNA and 0.1 ng of CNRZ368 Δ*arp1* DNA. The *arp1* deletion does not induce an increase in the PCR signal intensity corresponding to the *fda* gene used as control. Thus, the deletion of *arp1* gene caused at least a 1,000-fold increase in the concentration of ICE*St1 attB* and *attI* sites. Furthermore, whereas ICE*St1* and ICE*St2* excise at different frequencies, the concentrations of fragments carrying *attI′* sites from ICE*St2* WT and ICE*St2* Δ*arp1* increased with a factor similar to that found for ICE*St1* (data not shown). Therefore, the *arp1* gene represses the excision of ICE*St1* and ICE*St2* from *S. thermophilus*.

To validate the assumption that Arp1 autoproteolysis is involved in the induction of the ICE excision by MC, exponentially growing cells of CNRZ368 Δ*arp1* were treated with MC 0.1 µg/ml (MIC/2). The minimal DNA quantity allowing the detection of *attB* amplification (1 ng) is identical either in the presence or the absence of MC (data not shown). Furthermore, the minimal DNA quantities allowing the detection of *attI* amplification are 0.1 or 1 ng in the absence of MC in 3 replicate experiments and 0.1 ng after treatment by MC. Therefore, the inducibility of ICE*St1* Δ*arp1* excision by MC is reduced or suppressed when compared to the same MC treatment in the wild-type strain. This suggests that MC treatment alleviates the repression of ICE*St1* excision mediated by Arp1. The minimal DNA quantity allowing the detection of *attI′* amplification (1 ng) is identical either in the presence or the absence of MC (data not shown). This suggests that MC treatment also alleviates the repression of ICE*St2* excision mediated by Arp1. In the same way, MC treatments derepress the excision and transfer of another ICE encoding a cI-related repressor, SXT from *V. cholera*e [Beaber et al., 2004]. Moreover, MC treatments fail to induce the expression of a reporter gene and the SXT transfer in a mutant strain harbouring a non-autocleavable cI-related repressor.

The functions of the other genes harbored by the ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3* regulation modules (fig. 1b) remain unknown. Nevertheless, the regulation modules of numerous firmicutes prophages, such as TP901-1 from *L. lactis* [Madsen et al., 1999] or ΦSfi21 from *S. thermophilus* [Brüssow and Bruttin, 1995], and of another ICE, ICE*Bs1* from *B. subtilis* [Auchtung et al., 2005], encode an OrfQ homologue and a 'cI-like' repressor related to Arp2, while none of these elements encode a genuine homologue of the cI repressor. These cI-like proteins repress the lytic growth of the phages. The *cI-like* genes are shorter than the genes encoding genuine cI homologues. Indeed, the cI-like repressors contain an HTH DNA-binding domain but are devoid of a region harbouring autoproteolytic and oligomerisation functions related to the genuine cI. However, the TP901-1 cI-like repressor binds to operators as dimers and higher multimers [Johansen et al., 2003]. Furthermore, the excision of prophages encoding *cI-like* genes and *orfQ* homologues such as TP901-1 [Madsen et al., 1999] or ΦSfi21 [Brüssow and Bruttin, 1995] is inducible by MC and the TP901-1 *cI-like* gene is involved in this induction pathway. Moreover, the induction of the prophage TP901-1 [Madsen et al., 1999] and of ICE*Bs1* by MC [Auchtung et al., 2005] is RecA dependent. Thus, *arp2* and *orfQ* might also be involved in the derepression pathway of the excision of the *S. thermophilus* ICEs.

To our knowledge, ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3* are the only integrative elements (phages, ICEs and related elements) encoding a genuine cI homologue and a cI-like homologue. Since MC induces the conjugative transfer of SXT, an ICE from *V. cholerae* encoding a genuine cI [Beaber et al., 2004], and of ICE*Bs1*, an ICE from *B. subtilis* encoding a cI-like repressor [Auchtung et al., 2005], DNA damage could not only regulate the excision but also the conjugation of the putative ICEs from *S. thermophilus*.

References

- 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 USA 2005;102:12554–12559.
- Bacic M, Parker AC, Stagg J, Whitley HP, Wells WG, Jacob LA, Smith CJ: Genetic and structural analysis of the *Bacteroides* conjugative transposon CTn*341*. J Bacteriol 2005;187:2858–2869.
- Beaber JW, Hochhut B, Waldor MK: SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature 2004;427:72–74.
- Bentley SD, Chater KF, Cerdeno-Tarraga AM, Challis GL, Thomson NR, James KD, Harris DE, Quail MA, Kieser H, Harper D, Bateman A, Brown S, Chandra G, Chen CW, Collins M, Cronin A, Fraser A, Goble A, Hidalgo J, Hornsby T, Howarth S, Huang CH, Kieser T, Larke L, Murphy L, Oliver K, O'Neil S, Rabbinowitsch E, Rajandream MA, Rutherford K, Rutter S, Seeger K, Saunders D, Sharp S, Squares R, Squares S, Taylor K, Warren T, Wietzorrek A, Woodward J, Barrell BG, Parkhill J, Hopwood DA: Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature 2002;417:141–147.
- Biswas I, Gruss A, Ehrlich SD, Maguin E: High-efficiency gene inactivation and replacement system for Gram-positive bacteria. J Bacteriol 1993;175:3628–3635.
- Bonheyo GT, Hund BD, Shoemaker NB, Salyers AA: Transfer region of a *Bacteroides* conjugative transposon contains regulatory as well as structural genes. Plasmid 2001;46:202–209.
- Brüssow H, Bruttin A: Characterization of a temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage and its genetic relationship with lytic phages. Virology 1995;212:632–640.
- Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G: Conjugative transposons: the tip of the iceberg. Mol Microbiol 2002a;46:601–610.
- Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G: The ICE*St1* element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. Plasmid 2002b;48:77.
- Burrus V, Roussel Y, Decaris B, Guédon G: Characterization of a novel integrative element, ICE*St1*, in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. Appl Environ Microbiol 2000;66:1749–1753.
- Clewell DB, Flannagan SE, Jaworski DD: Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn*916*-Tn*1545* family of conjugative transposons. Trends Microbiol 1995a;3:229–236.
- Clewell DB, Jaworski DD, Flannagan SE, Zitzow LA, Su YA: The conjugative transposon Tn*916* of *Enterococcus faecalis*: structural analysis and some key factors involved in movement. Dev Biol Stand 1995b;85:11–17.
- Dodd IB, Shearwin KE, Perkins AJ, Burr T, Hochschild A, Egan JB: Cooperativity in long-range gene regulation by the λ CI repressor. Genes Dev 2004;18:344–354.
- Gaillard M, Vallaeys T, Vorholter FJ, Minoia M, Werlen C, Sentchilo V, Puhler A, van der Meer JR: The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. J Bacteriol 2006;188:1999–2013.
- 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.
- Hacker J, Kaper JB: Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu Rev Microbiol 2000;54:641–679.
- Helmann JD: Compilation and analysis of *Bacillus subtilis* σ^A-dependent promoter sequences: evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. Nucleic Acids Res 1995;23:2351–2360.
- Johansen AH, Brondsted L, Hammer K: Identification of operator sites of the CI repressor of phage TP901-1: evolutionary link to other phages. Virology 2003;311:144–156.
- Larbig KD, Christmann A, Johann A, Klockgether J, Hartsch T, Merkl R, Wiehlmann L, Fritz HJ, Tummler B: Gene islands integrated into $tRNA^{Gly}$ genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. J Bacteriol 2002;184:6665–6680.
- Madsen PL, Johansen AH, Hammer K, Brondsted L: The genetic switch regulating activity of early promoters of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. J Bacteriol 1999;181:7430–7438.

Maguin E, Prévost H, Ehrlich SD, Gruss A: Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other Gram-positive bacteria. J Bacteriol 1996;178:931–935.

McGrath BM, O'Halloran JA, Pembroke JT: Preexposure 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 2005;243:461–465.

Mohd-Zain Z, Turner SL, Cerdeno-Tarraga 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.

Morrison DA, Jaurin B: *Streptococcus pneumoniae* possesses canonical *Escherichia coli* (sigma 70) promoters. Mol Microbiol 1990;4:1143–1152.

Pavlovic G, Burrus V, Gintz B, Decaris B, Guédon G: Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICE*St1*-related elements from *Streptococcus thermophilus*. Microbiology 2004;150:759–774.

Rawlings ND, Barrett AJ: Evolutionary families of metallopeptidases. Methods Enzymol 1995;248:183–228.

Sentchilo V, Ravatn R, Werlen C, Zehnder AJ, van der Meer JR: Unusual integrase gene expression on the *clc* genomic island in *Pseudomonas* sp. strain B13. J Bacteriol 2003;185:4530–4538.

Sezonov G, Possoz C, Friedmann A, Pernodet JL, Guérineau M: KorSA from the *Streptomyces* integrative element pSAM2 is a central transcriptional repressor: target genes and binding sites. J Bacteriol 2000;182:1243–1250.

Stingele F, Mollet B: Disruption of the gene encoding penicillin-binding protein 2b (pbp2b) causes altered cell morphology and cease in exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. Mol Microbiol 1996;22:357–366.

Tomasz M, Palom Y: The mitomycin bioreductive antitumor agents: cross-linking and alkylation of DNA as the molecular basis of their activity. Pharmacol Ther 1997;76:73–87.

Toussaint A, Merlin C, Monchy S, Benotmane MA, Leplae R, Mergeay M, Springael D: The biphenyl- and 4-chlorobiphenyl-catabolic transposon Tn*4371*, a member of a new family of genomic islands related to IncP and Ti plasmids. Appl Environ Microbiol 2003;69:4837–4845.

van der Meer JR, Sentchilo V: Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. Curr Opin Biotechnol 2003;14:1–7.

Waldor MK, Tschäpe H, Mekalanos JJ: A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. J Bacteriol 1996;178:4157–4165.

3.2 ARTICLE 2

Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guédon G. Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*. 2009; **191**: 2764-75.

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Apr. 2009, p. 2764–2775 Vol. 191, No. 8
0021-9193/09/$08.00+0 doi:10.1128/JB.01412-08
Copyright © 2009, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Conjugative Transfer of the Integrative Conjugative Elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*▽†

Xavier Bellanger,[1] Adam P. Roberts,[2] Catherine Morel,[1] Frédéric Choulet,[1]‡ Guillaume Pavlovic,[1]§ Peter Mullany,[2] Bernard Decaris,[1] and Gérard Guédon[1]*

Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR INRA-UHP 1128, IFR110, Nancy-Université, Vandoeuvre-lès-Nancy, France,[1] *and Division of Microbial Diseases, UCL Eastman Dental Institute, University College London, United Kingdom*[2]

Received 8 October 2008/Accepted 23 January 2009

Integrative and conjugative elements (ICEs), also called conjugative transposons, are genomic islands that excise, self-transfer by conjugation, and integrate in the genome of the recipient bacterium. The current investigation shows the intraspecies conjugative transfer of the first described ICEs in *Streptococcus thermophilus*, ICE*St1* and ICE*St3*. Mitomycin C, a DNA-damaging agent, derepresses ICE*St3* conjugative transfer almost 25-fold. The ICE*St3* host range was determined using various members of the *Firmicutes* as recipients. Whereas numerous ICE*St3* transconjugants of *Streptococcus pyogenes* and *Enterococcus faecalis* were recovered, only one transconjugant of *Lactococcus lactis* was obtained. The newly incoming ICEs, except the one from *L. lactis*, are site-specifically integrated into the 3′ end of the *fda* gene and are still able to excise in these transconjugants. Furthermore, ICE*St3* was retransferred from *E. faecalis* to *S. thermophilus*. Recombinant plasmids carrying different parts of the ICE*St1* recombination module were used to show that the integrase gene is required for the site-specific integration and excision of the ICEs, whereas the excisionase gene is required for the site-specific excision only.

Horizontal transfer of genomic islands plays a key role in bacterial evolution, leading to the acquisition of advantageous functions or to major modifications of the bacterial way of life (37, 38). However, the mechanism of their transfer and integration remains generally unknown. Recent in silico analyses revealed that numerous genomic islands could be integrative and conjugative elements (ICEs) or elements deriving from them (18, 30, 62, 67) The ICEs, also called conjugative transposons, were defined as elements which encode their own excision, their transfer by conjugation, and their integration in a replicon of the recipient cell, whatever their specificity and their mechanism of integration and conjugation (18). Most of the ICEs encode a putative integrase belonging to the tyrosine recombinase family. This enzyme, generally associated with an excisionase, catalyzes the recombination between identical sequences carried by the *attL* and *attR* recombination sites flanking the element. This event leads to the excision of a circular form of the ICE harboring an *attI* site, resulting from the recombination between *attL* and *attR* sites, and to a chromosome carrying an empty *attB* site. After conjugative transfer, most of the ICEs integrate by site-specific recombination between identical sequences carried by the *attI* site and the *attB* site. The *attB* sites are generally located in the 3′ end of a tRNA gene or a specific open reading frame (ORF). However, some ICEs, such as Tn*916*, can integrate in numerous sites (57). Host ranges can be very different in different ICEs. While Tn*916*, from the firmicute *Enterococcus faecalis*, has a very broad host range (7, 58), the sex factor from the firmicute *Lactococcus lactis* can self-transfer only between strains of this species (32).

The ICEs, like the other transferable elements such as prophages and plasmids, have a modular structure and evolution (18, 19, 70). Each module is composed of all the sequences and genes involved in a biological function, such as site-specific recombination, conjugation, or antibiotic resistance, and can be exchanged between transferable elements.

Stimuli inducing the conjugative transfer of ICEs have been identified in a small number of elements, including Tn*916*, *clc*, and ICEs from *Bacteroides* (11, 24, 59, 61). Recently, DNA-damaging agents were found to derepress the excision and transfer of ICE*Bs1* from *Bacillus subtilis* (2) and SXT from *Vibrio cholerae* (3). This is similar to the derepression of numerous prophages by DNA damage that leads to activation of the lytic pathway (29, 45).

Genomic islands related to each other were found to be integrated in the 3′ end of *fda* from *Streptococcus thermophilus*, an ORF encoding a putative fructose-1,6-diphosphate aldolase. They carry sequences almost identical to *L. lactis* sequences, including insertion sequences (ISs), a restriction-modification module, and a cadmium resistance module (19, 20, 54). Two of these elements, ICE*St1* and ICE*St3*, harbor very closely related recombination modules that encode a tyrosine integrase and an excisionase. They excise by site-specific recombination between two 27-bp direct repeats included in their two attachment sites, *attL* and *attR* (20, 54). A DNA-damaging agent, mitomycin C (MC), derepresses the site-specific excision of ICE*St1* and ICE*St3* (4). These elements also carry an almost identical putative conjugative module distantly related to those of two ICEs, Tn*916* and ICE*Bs1*, suggesting

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR INRA-UHP 1128, IFR110, Faculté des Sciences et Techniques, Nancy-Université, BP 239, 54506 Vandoeuvre-lès-Nancy, France. Phone: (33) 03 83 68 42 06. Fax: (33) 03 83 68 11 76. E-mail: guedon@nancy.inra.fr.

† Supplemental material for this article may be found at http://jb.asm.org/.

‡ Present address: INRA-Université Blaise Pascal, UMR 1095 Genetics Diversity and Ecophysiology of Cereals, Clermont-Ferrand, France.

§ Present address: Institut Clinique de la Souris, Illkirch, France.

▽ Published ahead of print on 30 January 2009.

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

that these genomic islands are ICEs or derived from ICEs (19, 54). In the present report, we show that these elements are able to transfer by conjugation to other strains of *S. thermophilus* and we characterize the ICE*St3* host range. In the vast majority of transconjugants, the *S. thermophilus* ICEs were found to be integrated by site-specific recombination into the 3′ end of the *fda* gene. Moreover, the transfer of this ICE is derepressed by MC-induced DNA damage. ICE*St3* is still active in the transconjugants and can transfer again to a new recipient. Finally, recombinant plasmids carrying different parts of the ICE*St1* recombination module were used to determine the role of the integrase, the excisionase, and the *attI* site in the site-specific recombination events.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and culture conditions. The original strains and plasmids used for electroporation to obtain recipient or donor strains are listed in Table 1. Strains which were modified or mutated were named according to the modification. For example, *Streptococcus pyogenes* ATCC 12202 Rif^r corresponds to a mutated derivative of *S. pyogenes* ATCC 12202 resistant to rifampin, and *S. thermophilus* LMG18311/pMG36e (Erm^r) corresponds to a derivative of *S. thermophilus* LMG18311 carrying the plasmid pMG36e encoding resistance to erythromycin.

S. thermophilus strains were grown in reconstituted skim milk (10%, wt/vol), M17 broth supplemented with 0.5% lactose (LM17) (Oxoid), Hogg-Jago broth supplemented with 1% lactose (HJL) (64), or Belliker broth (53) at 42°C under anaerobic conditions (GENbox Anaer atmosphere generators and incubation jars from bioMérieux, France). *L. lactis* strains were grown in M17 broth supplemented with 0.5% glucose (GM17) at 30°C under anaerobic conditions. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* was grown in MRS broth at 37°C under anaerobic conditions. *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *Enterococcus casseliflavus*, and *Clostridium difficile* strains were grown in brain hearth infusion (Difco) broth at 37°C without shaking, whereas *Streptococcus agalactiae*, *Bacillus subtilis*, and *Staphylococcus aureus* strains were grown in the same broth and at the same temperature with shaking. These species were spread on brain hearth infusion plates supplemented with defibrinated horse blood (5%). *C. difficile* plates were also supplemented with *Clostridium difficile* selective supplement (Oxoid). Cultures were supplemented with the following antibiotic when required: chloramphenicol, 4 $\mu g \cdot ml^{-1;}$ erythromycin, 5 $\mu g \cdot ml^{-1}$; fusidic acid, 25 $\mu g \cdot ml^{-1}$; rifampin, 25 $\mu g \cdot ml^{-1}$; spectinomycin, 50 $\mu g \cdot ml^{-1}$; or tetracycline, 10 $\mu g \cdot ml^{-1}$.

Escherichia coli strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C in aerobiosis (56). Recombinant plasmids derived from pG+host9 were transformed into *E. coli* EC101, a strain containing a chromosomal copy of the pWV01 *repA* gene (17), and selected at 37°C on LB containing 150 μg of erythromycin ml^{-1}.

DNA manipulations and recombinant DNA. Preparation of chromosomal and plasmid DNAs and Southern analysis were performed according to standard protocols (56). Primers used in this study were purchased from Eurogentec (Angers, France) and are listed in Table S1 in the supplemental material. Their location and orientation are indicated in Fig. 1. In the figures and in Table S1 in the supplemental material, each letter (A to H) indicates a class of primers hybridizing on the same locus in different species. For example, the primers O132.3, Lla fba2 MG1363, Lla fba2 IL1403, Efa fba2, Bsu fba2, and Sau fba2, belonging to class A, hybridize on the noncoding region flanking the stop codon of the *fda* ORF in *S. thermophilus*, *L. lactis* MG1363, *L. lactis* IL1403, *E. faecalis*, *B. subtilis*, and *Staphylococcus aureus*, respectively. Most of the primers used are strain specific, species specific, or ICE specific. PCRs and high-fidelity PCRs were carried out according to the instructions with the ThermoPol PCR kit (New England Biolabs, United Kingdom) and with the Triple Master PCR system (Eppendorf, France), respectively. The transformants and the integrants that were characterized by PCR amplification were previously purified by two successive streakings on agar plates. The restriction and modifying enzymes were purchased from New England Biolabs, United Kingdom.

(i) ICE tagging. *S. thermophilus* strains carrying a tagged ICE were constructed as previously described by Thibessard et al. (68) with the following modifications. Briefly, the two regions flanking the locus to be tagged were independently amplified by PCR using primers carrying restriction enzymes sites, digested by these enzymes, and joined by ligation together and with pG+host9 digested by the appropriate enzymes. Thereafter, restriction fragments carrying the spectinomycin (*spc*) or the chloramphenicol (*cat*) resistance genes from the plasmids pSET4s and pSET5s were ligated within the digested restriction site located between the two PCR fragments. After introduction of the recombinant plasmid into *S. thermophilus*, two crossovers, upstream and downstream of the tagged region, were selected (68). Thus, the locus of interest is replaced by the tagged locus carried by the plasmid.

(ii) Construction of plasmids carrying fragments of the ICE*St1* recombination module. Fragments of the ICE*St1* recombination module, i.e., the *int* and *xis* genes and the *attI* site, were amplified by high-fidelity nested PCRs using primers carrying a SalI or a XhoI restriction enzymes site and then digested by these enzymes. The amplicons were introduced into the plasmid pTRK398/θH digested by the same enzymes. SalI and XhoI produce compatible cohesive ends that allow the selection of the ligation of the ICE*St1* integration module in both orientations relative to the P6 constitutive promoter from *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 carried by this plasmid (sense and antisense transcriptions). Thereafter, the P6 constitutive promoter and the integration module fragments in either the sense or antisense orientation were amplified by PCR using primers carrying a PstI or KpnI restriction enzymes site. These two amplicons were digested by PstI or KpnI and joined by ligation with the thermosensitive replication vector pG+host9 digested by the same restriction enzymes (Fig. 2). The different cloned amplicons carry the *int* gene and the *attI* site (plasmids pNST260+ and pNST260−); the *int* gene, the *xis* gene, and the *attI* site (pNST261+ and pNST261−); or the *int* gene, the *xis* gene, and the *attR* site (pNST262+ and pNST262−).

Electroporation procedure. *S. thermophilus*, *L. lactis*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, and *B. subtilis* strains were electroporated as previously described by Tyvaert et al. (71), O'Sullivan and Klaenhammer (52), Serror et al. (60), and Matsuno et al. (48), respectively. *E. faecalis* and *Staphylococcus aureus* strains were electroporated as described by Okamoto et al. (50). The introduced plasmids carry the thermosensitive replication origin from plasmid pVE6002 (46). Plasmids harboring this replication origin can replicate in numerous gram-positive bacteria, including lactococci (8), streptococci (55, 69), enterococci (25, 49), staphylococci (39, 65), and bacilli (51).

Filter matings. The filter mating protocol was modified from that described by Wang et al. (73) as follows. Both donor and recipient strains were grown for 15 h. A 15-ml culture of the relevant broth was inoculated with 150 μl of overnight culture of the recipient or the donor strain. The cultures were grown at the relevant temperature until mid-exponential phase (optical density at 600 nm of 0.4). Cultures of the donor and recipient were mixed and centrifuged for 15 min in a prewarmed centrifuge at 4,500 × *g* to form a cell pellet. The pellet was resuspended in 1 ml of LM17 broth with or without 50 μg/ml DNase I (23), and 150-μl aliquots were spread on 0.45-μm-pore-size nitrocellulose filters (Sartorius) on LM17 agar plates which were incubated for 20 h at 42°C (intraspecies transfer) or at 37°C (interspecies transfer). The filters were removed from the agar plates, placed in 50-ml bottles containing 10 ml of sterile LM17 broth, and vortexed for 30 s. Various dilutions were spread on agar plates supplemented with the appropriate antibiotics, and the plates were incubated for 24 h to 48 h in order to count CFU of the donor, the recipient, and the transconjugants.

Integration frequencies of the recombinant plasmids. The recombinant plasmids created in this work carry a thermosensitive replication origin. The permissive temperature of the plasmids carrying this replication origin is 30°C, whereas temperatures greater than or equal to 35°C are restrictive (46). The plasmids were introduced by electroporation into the bacteria of interest. The transformants were cultivated at 30°C, and various dilutions were spread on plates both with and without erythromycin and incubated at a restrictive temperature. The integration frequency was calculated as the number of CFU resistant to erythromycin divided by the total number of CFU. The integration of the plasmids was verified by PCR amplifications of the resulting attachment sites.

Induction of ICE transfer by MC. *S. thermophilus* LMG18311/pMG36e was used as the recipient in the following filter mating experiments. The *S. thermophilus* donor strains carrying ICE*St1* or ICE*St3* were grown in LM17 at 42°C to an optical density at 600 nm of 0.4. They were then diluted 10-fold in 10 ml of prewarmed LM17 containing MC at a concentration equal to one-half or one-quarter of the MIC, i.e., 0.2 and 0.1 μg/ml in LM17. A 10-fold dilution without MC was used as a control. After 1 hour of culture, the cells were harvested by centrifugation in a prewarmed centrifuge and washed once with 10 ml of warmed LM17. The cells treated with MC were mixed with exponentially growing recipients (optical density at 600 nm of 0.4) and centrifuged for 15 min in a prewarmed centrifuge to form a cell pellet. The pellet was resuspended in 1 ml of LM17 broth, and 150 μl was spread on 0.45-μm-pore-size nitrocellulose filters on LM17 agar plates, which were incubated for 3 h at 42°C in anaerobiosis. The filters were then treated as in other filter matings.

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

TABLE 1. Strains and plasmids used in this work

Strain or plasmid	Relevant phenotype or genotype[a]	Source or reference
Strains		
S. thermophilus		
LMG18311	Wild-type strain, no element integrated in the *fda* gene	BCCM/LMG
CNRZ368	Wild-type strain carrying ICE*St1*	INRA-CNRZ
CNRZ385	Wild-type strain carrying ICE*St3*	INRA-CNRZ
CNRZ368 ICE*St1cat*	*S. thermophilus* CNRZ368 carrying ICE*St1* tagged with the *cat* gene inserted in a noncoding region flanked by fragments of IS*1192* and of IS*981*, Cm^r	This work
CNRZ368 ICE*St1spc*	*S. thermophilus* CNRZ368 carrying ICE*St1* tagged with the *spc* gene inserted in a noncoding region flanked by fragments of IS*1192* and of IS*981*, Spc^r	This work
CNRZ385 ICE*St3cat*	*S. thermophilus* CNRZ385 carrying ICE*St3* tagged with the *cat* gene inserted in the pseudogene Ψ*orf385J*, Cm^r	This work
CNRZ385 ICE*St3spc*	*S. thermophilus* CNRZ385 carrying ICE*St3* tagged with the *spc* gene inserted in the pseudogene Ψ*orf385J*, Spc^r	This work
S. pyogenes ATCC 12202	Wild-type strain, no element integrated in the *fda* gene	ATCC
S. agalactiae		
COH1	Wild-type strain, no element integrated in the *fda* gene	74
539-22	Wild-type strain, no element integrated in the *fda* gene	16
L. lactis subsp. *cremoris* MG1363	Wild-type strain, no element integrated in the *fda* gene	31
L. lactis subsp. *lactis* IL1403	Plasmid-free strain derived from *L. lactis* subsp *lactis* IL594, no element integrated in the *fda* gene	22
E. faecalis JH2-2	No element integrated in the *fda* gene, Rif^r Fus^r	40
E. casseliflavus 664.1H1	Wild-type strain, oral isolate from monkey with amalgam fillings, presence of an element integrated in the *fda* gene not determined, Tc^r	A.O. Summers (Athens, GA)
Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* VI104	Wild-type strain, presence of an element integrated in the *fda* gene not determined	Collection Génétique Microbienne INRA
B. subtilis		
168	Wild-type strain, no element integrated in the *fda* gene	43
CU2189	Wild-type strain, presence of an element integrated in the *fda* gene not determined	23
Staphylococcus aureus RN4220	Restriction-deficient derivative of phage group III strain 8325-4, presence of an element integrated in the *fda* gene not determined	42
C. difficile		
CD37	Wild-type strain, presence of an element integrated in the *fda* gene not determined, Tc^r	63
R20291	Wild-type strain, presence of an element integrated in the *fda* gene not determined	Anaerobe Reference Laboratory, Cardiff, United Kingdom
E. coli		
EC101	*supE hsd-5 thi* (*lac-proAB*) F (*traD6 proAB lacI*^{q} *lacZ* M15) *repA*, derivative of strain TG1 (56)	44
DH5α	*supE44 lacU169* (ϕ80 *lacZ* M15) *hsdR17 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*	56
HB101	*supE44 hsdS20 recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1*, no element integrated in the *fda* gene	47
Plasmids		
pG+host9	3.8 kb, pWV01-type thermosensitive replication origin from pVE6002, Erm^r	46
pSET4s	4.5 kb, pWV01-type thermosensitive replication origin from pVE6002, *lacZ′*, Spc^r	66
pSET5s	4.4 kb, pWV01-type thermosensitive replication origin from pVE6002, *LacZ′*, Cm^r	66
pMG36e	3.4 kb, replication origin from pWV01, Erm^r	72
pTRK398/θH	10.8 kb, P6 constitutive promoter from *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 upstream of the *llaIR* restriction cassette, Erm^r	27
pNST260+ and pNST260−	6.2 kb, plasmid derived from pG+host9 carrying the *int* gene and the *attI* site from ICE*St1* cloned downstream from the P6 constitutive promoter from pTRK398/θH; + and − indicate that the *int* gene is in forward or reverse orientation compared to the promoter, respectively	This work
pNST261+ and pNST261−	6.5 kb, plasmid derived from pG+host9 carrying the *xis* and the *int* genes and the *attI* site from ICE*St1* cloned downstream from the P6 constitutive promoter from pTRK398/θH; + and − indicate that the *int* gene is in forward or reverse orientation compared to the promoter, respectively	This work
pNST262+ and pNST262−	6.1 kb, plasmid derived from pG+host9 carrying the *xis* and *int* genes and the *attR* site from ICE*St1* cloned downstream from P6 constitutive promoter from pTRK398/θH; + and − indicate that the *int* gene is in forward or reverse orientation compared to the promoter, respectively	This work

[a] Abbreviations: Cm^r, chloramphenicol resistance; Ery^r, erythromycin resistance; Fus^r, fusidic acid resistance; Rif^r, rifampin resistance, Spc^r, spectinomycin resistance; Tc^r, tetracycline resistance.

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

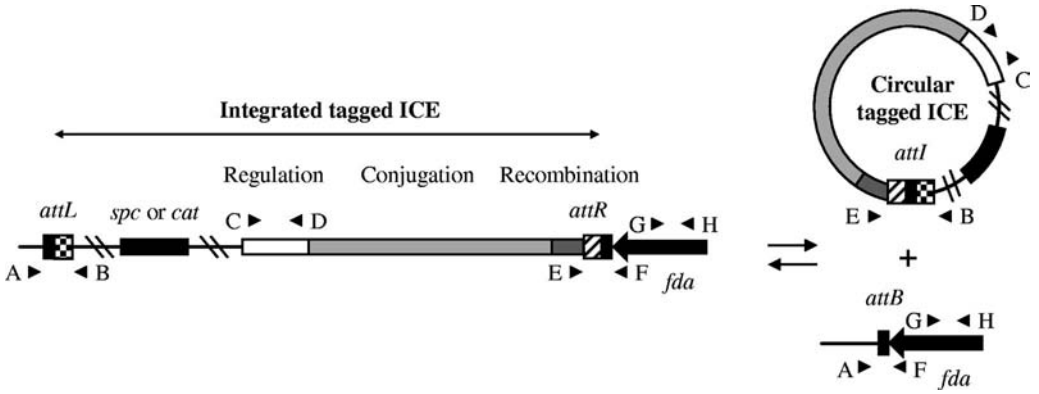


FIG. 1. Schematic representation of the locations and orientations of the primers used in this work to analyze the transconjugants. The locations of the recombination, conjugation, or regulation modules of the *S. thermophilus* ICEs are indicated by gray and white rectangles. Recombination sites are drawn as vertical rectangles: black, sequence identical in *attL*, *attR*, *attI*, and *attB* sites; checkerboards, arm of *attR* sites and related arm of *attI* sites; hatched boxes, arm of *attL* sites and related arm of *attI* sites. The recombination sites are magnified. The locations and orientations of the primers hybridizing into the ICEs (ICE*St1* or ICE*St3*) and into the flanking sequences are indicated by black arrowheads. Each letter (A to H) indicates a class of primers hybridizing on the same locus in different species (see Table S1 in the supplemental material). The primer pairs A-B, E-F, A-F, and E-B allow the amplification of fragments carrying the *attL*, the *attR*, the *attB*, and the *attI* sites, respectively. The primer pair C-D allows the amplification of an internal fragment of the regulation module of ICE*St1* or ICE*St3*. The amplification of an internal fragment of the *fda* gene using the species-specific primers G and H allows the identification of the species. The spectinomycin (*spc*) or the chloramphenicol (*cat*) resistance genes introduced in order to tag the ICEs are indicated by a large black rectangle. The sequences between the regulation module and the *attL* site are specific to each *S. thermophilus* ICE. The accession number of the untagged ICE*St1* and ICE*St3* nucleotide sequences are AJ278471 and AJ586568, respectively.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed as described by Georgin and Mouet (33) and Cumming et al. (26). The means and standard errors from at least five independent experiments are indicated.

RESULTS

ICE*St1* and ICE*St3* intraspecies transfer. Genes encoding resistance to spectinomycin (*spc*) or chloramphenicol (*cat*) were introduced into loci that should not be involved in the ICE excision or transfer, i.e., the noncoding sequence flanked by IS*1192* and IS*981* fragments in ICE*St1* and a pseudogene (Ψ*orf385J*) in ICE*St3* (Fig. 1 and Table 1).

Reconstituted skim milk and the rich media LM17, HJL, and Belliker were used during the development of a mating protocol for *S. thermophilus* ICEs. The mating attempts were performed using liquid cultures or nitrocellulose filters placed on agar plates. The only conditions which allowed putative transconjugants to be recovered were filter matings on skim milk or LM17 agar plates. The numbers of putative transconjugants per donor were similar with both media whether the filter matings were performed in aerobiosis or in anaerobiosis (data not shown). All of the following filter matings were performed on LM17 agar plates. When the cell-cell contacts between the donor and the recipient strains were prevented by use of a filter, no putative transconjugants were recovered in spite of satisfactory growth. Moreover, the numbers of putative transconjugants per donor were similar with or without DNase I (data not shown). Together, these data strongly suggest that the putative transconjugants were obtained following conjugation events.

S. thermophilus LMG18311/pMG36e, a strain devoid of an element integrated in the 3′ end of the *fda* gene and carrying the plasmid pMG36e, encoding erythromycin resistance, was used as the recipient in the intraspecies filter mating experiments. ICE*St3* tagged with a chloramphenicol resistance gene (ICE*St3cat*) was transferred from strain *S. thermophilus* CNRZ385 ICE*St3cat*. The number of putative transconjugants per donor resistant to erythromycin and chloramphenicol is $3.4 \times 10^{-6} \pm 0.5 \times 10^{-6}$. The frequencies of spontaneous mutations leading to the appearance of *S. thermophilus* strains resistant to erythromycin or chloramphenicol are less than 10^{-9} and thus do not interfere with the calculation of the transfer frequencies. Putative transconjugants were isolated and tested by PCR. The strain identity was confirmed by the amplification of the central part of the *cse* gene (Fig. 3A). This gene, which is specific to *S. thermophilus*, carries a central part that is highly variable in size and sequence between *S. thermophilus* strains (12; S. Layec, personal communication). Each pair of donor and recipient strains used have different *cse* alleles allowing their identification. These amplifications have shown that all of the putative transconjugants analyzed (>100) were derived from the recipient strain and carry ICE*St3*. For all of these clones, the ICE detection was confirmed by the amplification of an internal fragment of the ICE*St3* regulation module (Fig. 3A). Therefore, ICE*St3* is a functional *S. thermophilus* ICE.

Fragments carrying the *attL* and the *attR* sites resulting from the ICE*St3* site-specific integration into the *fda* 3′ region were amplified in all 50 transconjugants analyzed, showing that ICE*St3* integrates in the *fda* 3′ end with a high specificity in *S. thermophilus* (Fig. 3B). Moreover, fragments carrying the *attB* and the *attI* sites resulting from the site-specific excision of ICE*St3* were also detected in these transconjugants (Fig. 3C). Therefore, this element excises in the *S. thermophilus* transconjugants, suggesting that it is capable of transfer.

The strain *S. thermophilus* CNRZ368 carrying ICE*St1* tagged with the *cat* gene was used as the donor in intraspecies filter mating. Only one putative ICE*St1* transconjugant resistant to erythromycin and chloramphenicol was obtained. This clone was confirmed by PCRs as being a transconjugant, i.e.

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

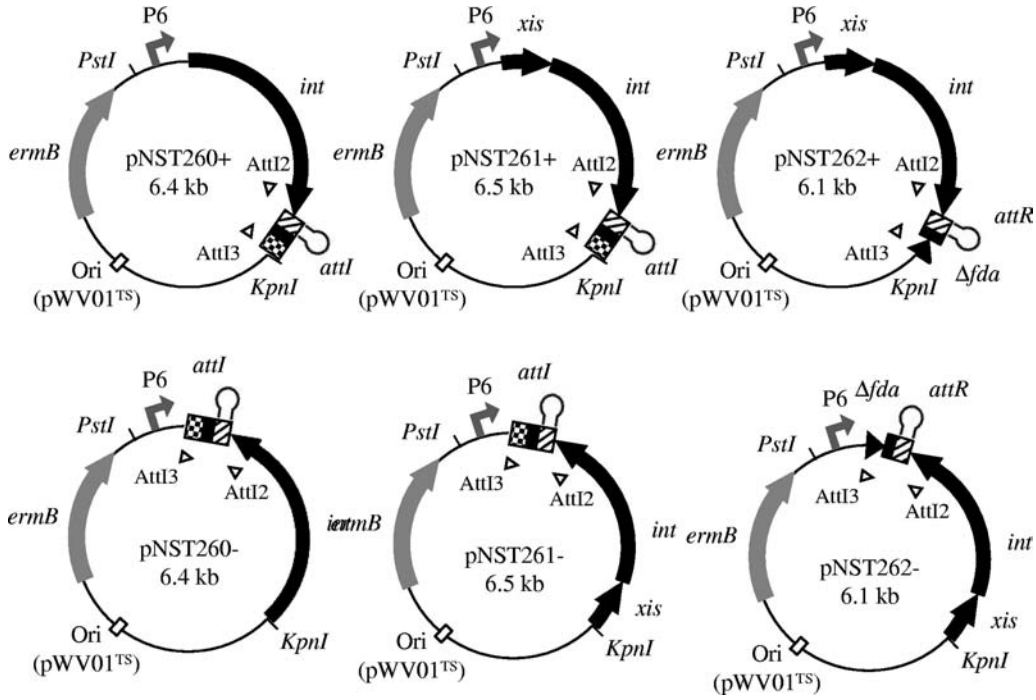


FIG. 2. Map of the thermosensitive replication plasmids carrying the P6 constitutive promoter and the various fragments of the ICE*St1* recombination module. The location of the thermosensitive replication origin [Ori(pWV01^{TS})] is indicated by a white rectangle. The location and the orientation of the *ermB* gene, encoding resistance to erythromycin, is indicated by a gray arrow. The PstI and KpnI restriction sites used for molecular cloning are indicated. The location and the orientation of the P6 constitutive promoter from *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 are indicated by a right-angle arrow. Black arrows indicate the locations and orientations of the *int* and *xis* genes, encoding the integrase and the excisionase, respectively. The location and the orientation of a fragment corresponding to the last 60 nucleotides of the *fda* gene is indicated by a black triangle. Recombination sites are drawn as rectangles: black, sequence identical in *attL*, *attR*, and *attI* sites; checkerboards, arm of *attL* sites and related arm of *attI* sites; hatched boxes, arm of *attR* sites and related arm of *attI* sites. The recombination sites are magnified. The putative rho-independent terminator downstream from the *int* gene is indicated by a lollipop. The locations and orientations of the primers AttI2 and AttI3 are indicated by white arrowheads (see Table S1 in the supplemental material).

deriving from the recipient *S. thermophilus* LMG18311/pMG36e and carrying ICE*St1* (data not shown). Moreover, the ICE was found to be integrated in the *fda* locus and to be still able to excise. This suggests that ICE*St1* is, like ICE*St3*, an *S. thermophilus* ICE but transfers at a very low frequency ($<10^{-9}$) to other *S. thermophilus* strains. ICE*St3* and ICE*St1* are the two first conjugative elements (ICEs or conjugative plasmids) identified and characterized in *S. thermophilus*. Moreover, ICE*St1* and ICE*S3* integrate with a high specificity in the *fda* 3′ end in *S. thermophilus* and are still able to excise in the transconjugants.

ICE*St3* interspecies transfer. Various *Firmicutes* that are close to, distant from, or very distant from *S. thermophilus* and a gammaproteobacterium, *Escherichia coli*, were used as recipients in order to determine the ICE*St3* host range (Table 1). The following species were used as recipients: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* (two strains), *Lactococcus lactis* (two strains), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus cas-*

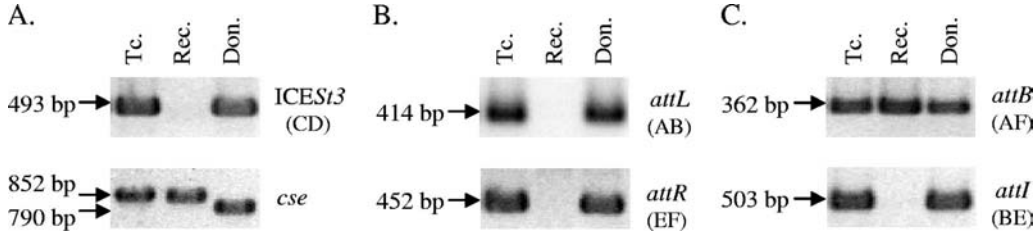


FIG. 3. Characterization by PCR of an intraspecies ICE*St3* transconjugant. CNRZ385 ICE*St3cat* and LMG18311/pMG36e were used as the donor and the recipient, respectively. Don, Rec, and Tc indicate donor, recipient, and transconjugant, respectively. (A) ICE*St3*, amplification of a fragment of the regulation module. *cse*, amplification of the central part of the *cse* gene. (B and C) *attR*, *attL*, *attB*, and *attI*, amplifications of fragments carrying these attachment sites. The sizes of the PCR fragments are deduced from sequence analysis and confirmed by comigration with a DNA ladder. The classes of primer pairs used for these amplifications are indicated in parentheses, and their localizations are indicated in Fig. 1.

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

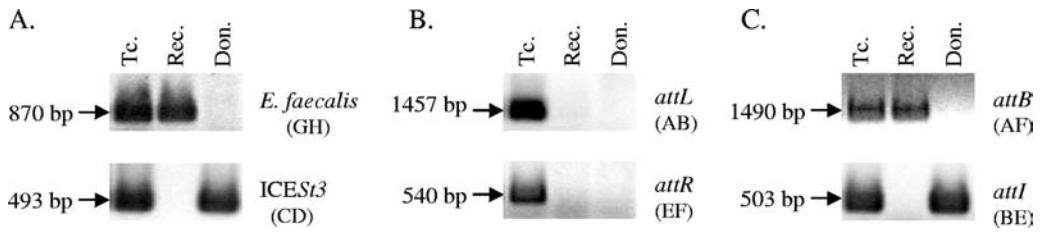


FIG. 4. Characterization of an ICE*St3* transconjugant of *E. faecalis* by PCR. *S. thermophilus* CNRZ385 ICE*St3spc* and *E. faecalis* JH2-2 Rif^r Fus^r were used as the donor and the recipient, respectively. Don, Rec, and Tc indicated donor, recipient, and transconjugant, respectively. (A) *E. faecalis* and ICE*St3*, amplification of an internal *fda* fragment specific to *E. faecalis* and amplification of a fragment of the ICE*St3* regulation module, respectively. (B and C) *attR*, *attL*, *attB*, and *attI*, amplifications of fragments carrying these attachment sites. The sizes of the PCR fragments are deduced from sequence analysis and confirmed by comigration with a DNA ladder. The classes of primer pairs used for these amplifications are indicated in parentheses, and their localizations are indicated in he Fig. 1.

seliflavus, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Bacillus subtilis* (two strains), *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile* (two strains), and *E. coli* (strain HB101). *S. thermophilus* strain CNRZ385 carrying ICE*St3* tagged with the *spc* gene was used as the donor in all the interspecies filter matings. The frequencies of spontaneous mutations leading to the appearance of donor or recipient strains resistant to the antibiotics used are less than 10^{-9} and thus do not interfere with the calculation of the transfer frequencies. Some of these filter matings were done in aerobiosis, but the intraspecies ICE*St3* transfer frequencies resulting from intraspecies filter matings in aerobiosis and anaerobiosis were found to be similar (data not shown).

Numerous putative transconjugants of *S. pyogenes* ATCC 12202 Rif^r and *E. faecalis* JH2-2 Rif^r Fus^r were obtained (Fig. 4). Some putative transconjugants were purified and analyzed by PCR. All the primers hybridizing to the chromosomes of the recipient strains (primers belonging to the classes A, F, G, and H) hybridize to a species-specific sequence (Fig. 1; see Table S1 in the supplemental material). Therefore, PCR products obtained with these primers are also species specific. The amplification of an *fda* fragment specific to each species and of an internal fragment of the ICE regulation module has shown that the putative ICE*St3* transconjugants of *E. faecalis* JH2-2 were derived from the recipient and that they carried the ICE (Fig. 1 and 4A). Similar amplifications by PCR have confirmed that transconjugants of *S. pyogenes* were obtained (data not shown). The hemolytic property of *S. pyogenes* was also used to differentiate *S. pyogenes* from *S. thermophilus*. The numbers of transconjugants per donor for *S. pyogenes* and *E. faecalis* were $3.0 \times 10^{-6} \pm 1.5 \times 10^{-6}$ and $3.9 \times 10^{-7} \pm 0.9 \times 10^{-7}$, respectively. Therefore, ICE*St3* transfers to various *Firmicutes*.

Fragments carrying the *attL* and the *attR* sites resulting from the site-specific recombination between the *fda* 3′ end from *E. faecalis* and the ICE*St3 attI* site were amplified from 40 transconjugants (Fig. 1 and 4B). These sites were also amplified in 25 transconjugants of *S. pyogenes* ATCC 12202 (data not shown). Therefore, ICE*St3* integrates in the *fda* 3′ end with a high specificity in these species. The *attB* site and the *attI* site resulting from the site-specific excision of ICE*St3* were amplified from 40 *E. faecalis* transconjugants (Fig. 4C) and from 25 *S. pyogenes* transconjugants (data not shown), indicating that this element is still able to excise in the transconjugants of these species.

One putative ICE*St3* transconjugant of *L. lactis* MG1363/pMG36e was also recovered. This clone was analyzed by PCR like the previous interspecies transconjugants. These amplifications confirmed that this clone is *L. lactis* MG1363 carrying ICE*St3.* This shows that ICE*St3* transfers to this species at low frequency ($<10^{-9}$). However, in this transconjugant, ICE*St3* did not enter the *fda* locus. Additionally, the detection of a chromosomal *attI* site in the transconjugant strongly suggests that this site was not used as a substrate for the integration of the element in a putative *attB′* site (data not shown).

After the incubation of *S. thermophilus* carrying ICE*St3* and one of the *S. agalactiae* recipient strains on a filter, no viable *S. thermophilus* colonies were recovered. Therefore, the conditions allowing the coculture of these two species on a filter could not be determined.

In spite of satisfactory growth conditions during cocultures, no transconjugants were recovered after at least three filter matings using recipients from the other species (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *C. difficile*, and *E. coli*). This suggests that ICE*St3* is poorly able to establish a functional mating apparatus with these species and/or is poorly able to integrate into the genomes of these strains.

ICE*St3* transfers from *E. faecalis*. The ability of the newly incoming ICE*St3* to transfer from a transconjugant was analyzed. *E. faecalis* JH2-2 carrying ICE*St3spc* and *S. thermophilus* LMG18311/pMG36e were used in filter mating as donor and recipient, respectively. Some putative transconjugants were purified and analyzed by PCR as described above. Thirteen ICE*St3*-containing transconjugants of *S. thermophilus* were obtained, at a frequency of $3.2 \times 10^{-9} \pm 0.8 \times 10^{-9}$ per donor. PCR amplification of a fragment of the ICE*St3* regulation module and an *fda* fragment showed that all 13 transconjugants were derived from the recipient and carried the ICE (data not shown). The PCR amplification of fragments harboring the specific *attR* and *attL* sites showed that ICE*St3* is integrated in the *fda* 3′ ends of all the transconjugants. Moreover, the amplification of fragments carrying the *S. thermophilus attB* site and the ICE*St3 attI* site in the transconjugants showed the site-specific excision of the ICE in the transconjugants. Therefore, ICE*St3* is still able to transfer from *E. faecalis* transconjugants. The amplification of the *attB* and the *attI* sites in the transconjugants of *S. pyogenes* and *S. thermophilus* strongly suggests that ICE*St3* could also transfer again from these strains.

Integration and excision of recombinant plasmids harboring the ICE*St1* recombination module. All the attachment sites

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

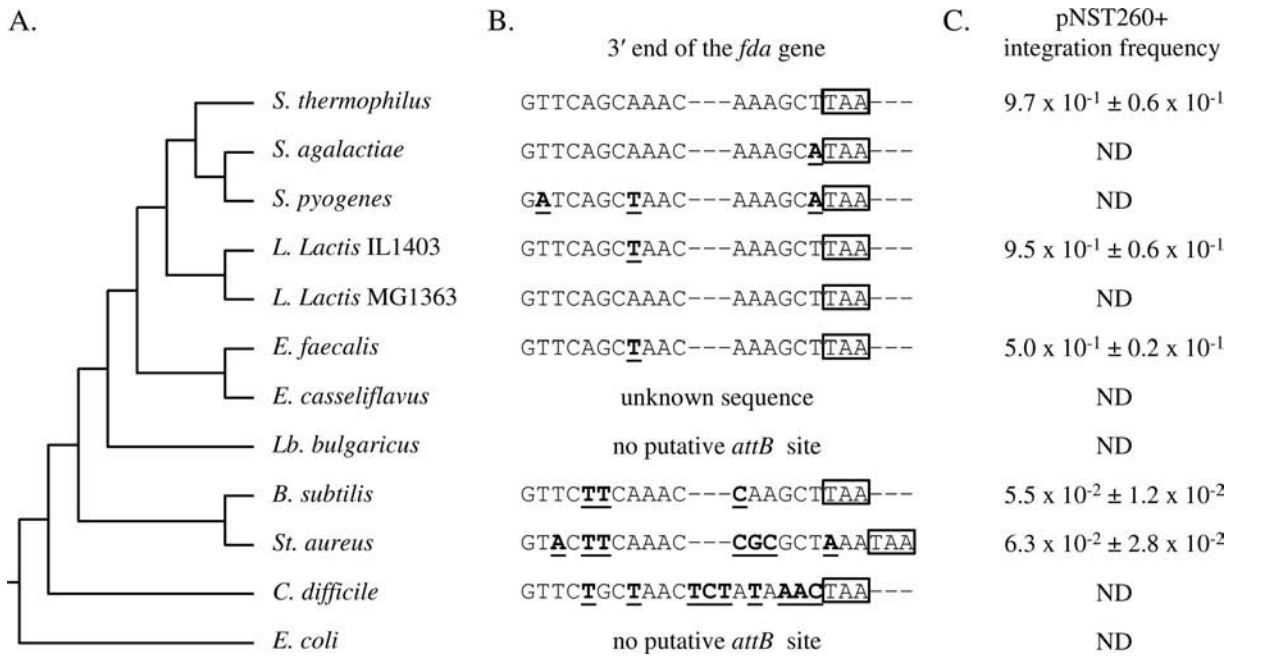


FIG. 5. Sequences of the *fda* 3′ ends of the strains used as recipients and integration frequencies of pNST260+ in some of these strains. (A) Cladogram of the species used as recipients in this work. (B) The stop codon of the *fda* ORFs is enclosed by a rectangle. The bold and underlined nucleotides indicate the differences from the *S. thermophilus* sequence. The sequences in this figure correspond to those found in the sequenced strains. Only one of the two *Staphylococcus aureus* alleles, the most common in databases, is indicated. The second *Staphylococcus aureus* allele is more different from the *S. thermophilus* sequence: the adenine at the position 8 is replaced by a thymine. The *fda* 3′ end sequences available in the databases are identical for all the strains of the other species. The sequence of the *E. casseliflavus fda* 3′ end is not available in databases. The *fda* 3′ end sequences from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *E. coli* do not display a significant identity with that of *S. thermophilus*. (C) pNST260+ integration frequencies in five strains used as recipients in intra- and interspecies filter mating. *S. thermophilus* LMG18311 and *B. subtilis* 168 were used in this experiment. ND, not determined.

of ICE*St1* and ICE*St3* contain, in *S. thermophilus*, a 27-bp sequence identical to the last 20 nucleotides of the *S. thermophilus fda* gene and the 7 nucleotides downstream the stop codon of this gene. Only the 20 nucleotides belonging to the *fda* ORF are similar in members of the *Firmicutes* (Fig. 5). Moreover, the *S. thermophilus* ICEs were shown in this work to integrate overwhelmingly in the *fda* 3′ end. Therefore, this sequence is the putative *attB* site of the *S. thermophilus* ICEs.

Recombinant thermosensitive plasmids were created in order to investigate the ability of the *S. thermophilus* ICEs to integrate in the *attB* sites of various *Firmicutes* and to excise. Different parts of the ICE*St1* recombination module, i.e., the integrase gene (*int*), the excisionase gene (*xis*), and the *attI* site of this element, were cloned in both orientations downstream from the P6 constitutive promoter, which is active in *L. lactis*, *E. faecalis*, and *B. subtilis* (27), in the vector pG+host9 (Fig. 2). In some plasmid constructs, the promoter fusions are expected to drive expression of the cloned gene(s), and in others there should be no expression (recombinant plasmid names end with a + or −, respectively).

The plasmids pNST260+ and pNST260− carrying the *int* gene and the *attI* site were introduced in *S. thermophilus* LGM18311, *L. lactis* IL1403, *E. faecalis* JH2-2, *B. subtilis* 168, and *Staphylococcus aureus* RN4220. The integration frequencies of pNST260+ in *S. thermophilus* LGM18311 and *L. lactis* IL1403 are $9.7 \times 10^{-1} \pm 0.6 \times 10^{-1}$ and $9.5 \times 10^{-1} \pm 0.6 \times 10^{-1}$ (Fig. 6), respectively. Therefore, pNST260+ has a very high ability to integrate in the chromosomes of *S. thermophilus* and *L. lactis*, whereas no ICE*St3* transconjugant of *L. lactis* integrated in the *fda* locus was recovered. The integration frequencies of pNST260+ in *E. faecalis* JH2-2, *B. subtilis* 168, and *Staphylococcus aureus* RN4220 are $5.0 \times 10^{-1} \pm 0.2 \times 10^{-1}$, $5.5 \times 10^{-2} \pm 1.2 \times 10^{-2}$, and $6.3 \times 10^{-2} \pm 2.8 \times 10^{-2}$, respectively (Fig. 5). Hence, pNST260+ integrates in the *E. faecalis* genome with an integration efficiency approximately two times lower than that in *S. thermophilus* or in *L. lactis*, whereas it does not integrate efficiently in *B. subtilis* 168 and *Staphylococcus aureus* RN4220. The integration frequencies of pNST260− in all these strains are less than 10^{-3}, strongly suggesting that the integration of pNST260+ was achieved through the expression of the *int* gene (data not shown).

Four purified *E. faecalis* transformants carrying pNST260+ were characterized by PCR using species-specific and ICE-specific primers. The amplification of the *attR* and *attL* sites resulting from the site-specific recombination between the *attI* site carried by pNST260+ and the *attB* site was obtained in the four integrants (Fig. 6). Thus, the plasmid pNST260+ integrates by site-specific recombination in the *fda* 3′ end in *E. faecalis*. Moreover, a fragment carrying the *attB* site could be amplified in the *E. faecalis* wild-type strain but not in the integrant, showing that the plasmid cannot excise (Fig. 6). This strongly suggests that the integrase alone cannot catalyze the excision of the plasmid.

Four purified pNST260+ transformants of *S. thermophilus*, *L. lactis*, *B. subtilis*, and *Staphylococcus aureus* were also characterized by PCRs using species-specific and ICE-specific

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

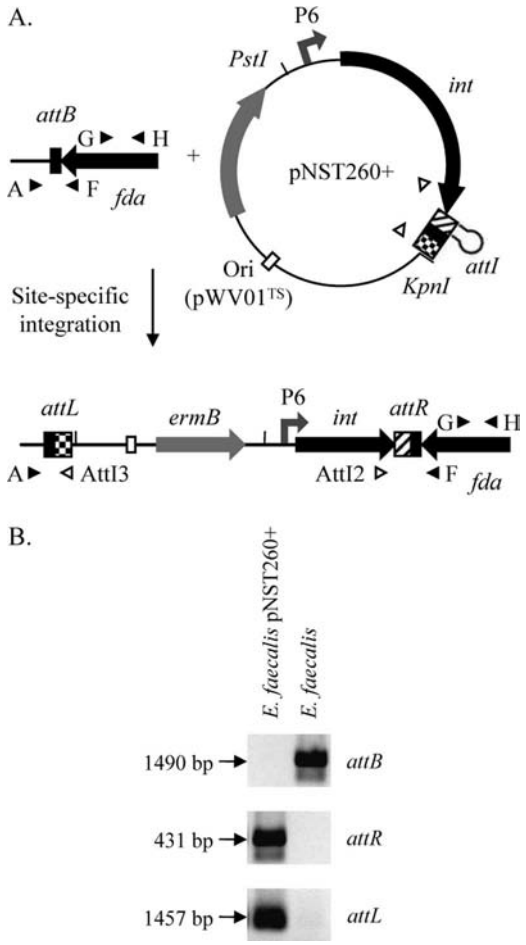


FIG. 6. Schematic representation of the site-specific integration of plasmid pNST260+ into the *fda* 3′ end and characterization of an *E. faecalis* transformant carrying this plasmid. (A) The locations and orientations of primers hybridizing to the chromosome and to the plasmid are indicated by black and white arrowheads, respectively. The recombination sites are magnified. The primer pairs A-AttI3, AttI2-F, A-F, and AttI3-AttI2 allow the amplification of fragments carrying the *attL*, the *attR*, the *attB*, and the *attI* sites, respectively (see Table S1 in the supplemental material). The classes of primer pairs used for these amplifications are indicated. The symbols used to represent plasmid pNST260+ are identical to those used in Fig. 3. (B) Amplifications by PCR using the DNA of *E. faecalis* JH2-2 and a clone of *E. faecalis* JH2-2 carrying plasmid pNST260+. *attR*ç *attL*, and *attB*, amplifications of fragments carrying these attachment sites.

primers. Transformants of *S. thermophilus* and *L. lactis* were similar to those of *E. faecalis*. However, PCRs failed to detect the integration of pNST260+ in the *fda* locus in *B. subtilis* and in *Staphylococcus aureus* (data not shown).

The plasmids pNST261+ and pNST261−, carrying the *int* and the *xis* genes and the *attI* site, were introduced in *S. thermophilus* LGM18311. Whereas pNST261− integrants were not recovered, integrants of pNST261+ were isolated at a frequency of $4.6 \times 10^{-2} \pm 2.2 \times 10^{-2}$. The *attR* and the *attL* sites resulting from the site-specific integration of pNST261+ into the *fda* 3′ end were detected by PCR (data not shown). Moreover, the amplification of the *attI* site of the plasmid and the chromosomal *attB* site from a purified pNST261+ integrant showed that this plasmid is also able to excise by site-specific recombination. Therefore, while the expression of the integrase gene is necessary and sufficient to obtain site-specific integration, the expression of the excisionase is required for site-specific excision. Previous results showed that the integrase gene is involved in the ICE*St1* site-specific excision (20). Together, these data strongly suggest that the expression of the integrase and the excisionase is required for the pNST261+ site-specific excision.

The plasmids pNST262+ and pNST262−, carrying the *int* and the *xis* genes and the *attR* site, were also introduced in *S. thermophilus* LGM18311; however, no integrants were isolated (Fig. 2). Therefore, while the integrase and the excisionase are expressed in pNST262+ (data not shown), the plasmid does not integrate in the *fda* 3′ end. Thus, the site-specific recombination between the *attB* and the *attR* sites cannot occur, suggesting that the presence of *attI* is also required for the site-specific integration of a circular molecule in the *attB* site.

The amino acid sequences of the proteins encoded by the *int* and the *xis* genes from ICE*St1* and ICE*St3* exhibit a high degree of identity of over 99% of their length. The 27-bp sequences of the *attI* sites from the *S. thermophilus* ICEs into which the site-specific recombinations occurred are identical, whereas the nucleotide sequences carrying these sites (285 bp) show more than 98% identity. These data strongly suggest that the site-specific recombinations of ICE*St1* and ICE*St3* are nearly identical.

ICE*St3* transfer to recipients carrying pNST260+. *S. thermophilus* LGM18311, *L. lactis* IL1403, and *L. lactis* MG1363 harboring pNST260+ integrated in the *fda* locus were used as recipients in filter mating in order to determine if the overexpression of the *int* gene in these strains could have an impact on the ICE*St3* transfer frequency. The recovering of transconjugants was confirmed by PCRs as described above (data not shown). The number of ICE*St3* transconjugants of LGM18311/pNST260+ per donor, $3.8 \times 10^{-6} \pm 1.5 \times 10^{-6}$, is similar to that obtained with LGM18311/pMG36e ($3.4 \times 10^{-6} \pm 0.5 \times 10^{-6}$); therefore, the overexpression of the *int* gene in the recipient strain LGM18311 does not have an obvious impact on ICE*St3* transfer frequency. No ICE*St3* transconjugants of *L. lactis* IL1403 or *L. lactis* MG1363 carrying pNST260+ was obtained. Hence, the overexpression of the *int* gene in this species cannot complement a hypothetical incoming ICE*St3* that could not express the ICE integrase.

Derepression of the conjugative transfer. Previous results have shown that MC, a DNA-damaging agent, derepresses the excision of ICE*St1* and ICE*St3* at least 10-fold (4). The MC concentration providing the highest derepression factor was equal to half of the MIC. *S. thermophilus* strains harboring ICE*St1* or ICE*St3* treated with MC and *S. thermophilus* LGM18311/pMG36e were used in filter matings as donor and recipient, respectively. The donor cells were treated with various concentrations of MC. The purified transconjugants were characterized by PCR as described above (data not shown). The transfer frequencies are expressed as the number of transconjugants per recipient instead of the number of transconjugants per donor because of the mortality of the donor caused by MC (2, 3). When the donor cells were not treated with MC, the number of ICE*St3* transconjugants per recipient was $3.8 \times 10^{-7} \pm 1.3 \times 10^{-7}$. The numbers of transconjugants per recipient were $1.0 \times 10^{-5} \pm 0.4 \times 10^{-5}$

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

and $7.6 \times 10^{-6} \pm 2.6 \times 10^{-6}$ after treatment with MC concentrations equal to one-fourth and one-half of the MIC, respectively. Therefore, MC treatment of cells carrying ICE*St3* leads to a derepression of the conjugative transfer of this ICE by almost 25-fold. Whereas MC derepresses the excision of ICE*St1* and ICE*St3*, no ICE*St1* transconjugants of LMG18311 were characterized after MC treatment of the donor cells carrying this element, suggesting that MC does not have a detectable impact on ICE*St1* transfer frequency.

DISCUSSION

Many ICE*St3* transconjugants of *S. thermophilus*, *S. pyogenes*, and *E. faecalis* and one ICE*St1* transconjugant of *S. thermophilus* were isolated and characterized in this work. Furthermore, the presence of DNase does not alter the transfer frequency, and ICE*St3* transfer is not observed if the donor and recipient strains are separated by a filter. Therefore, ICE*St3* is a functional conjugative element, the first one proven and characterized in *S. thermophilus*. Moreover, its retransfer from *E. faecalis* to *S. thermophilus* has shown that this element is able to transfer from different species. The observation of a single ICE*St1* transfer event can leave doubt as to the functionality of this ICE and its ability to transfer in the environment.

The late competence genes were found to be functional in some strains of *S. thermophilus*, *S. pyogenes*, and *E. faecalis*, and sequence data suggest that intergenomic recombinations have occurred. However, natural transformation was nevertheless never reported for these species (6, 9, 10, 14, 41). Furthermore, the chromosomal sequences near the *attL* site from the *S. thermophilus* ICEs, i.e., the sequence downstream from the *fda* gene in an empty *attB* site, are completely different in the various species used as recipient or donor. Therefore, the acquisition of an *S. thermophilus* ICE by natural transformation is very unlikely in interspecies matings, since no RecA-dependent recombination could occur in the chromosomal sequence near *attL*. During intraspecies matings, the donor and the recipient are two *S. thermophilus* strains. Therefore, the integration by homologous recombination of a linear DNA fragment carrying an ICE could happen if this transforming fragment is internalized in the recipient. Nevertheless, no ICE transfer was recovered in liquid cultures, which are the conditions used for the artificial induction of *S. thermophilus* competence (9). Therefore, the acquisition of an *S. thermophilus* ICE by natural transformation is also very unlikely in intraspecies matings.

The nucleotide sequences of the recombination and the conjugation modules of ICE*St1* and ICE*St3* are almost identical (95%) (54). Moreover, in spite of the high identity between the recombination modules of the *S. thermophilus* ICEs, the excision frequencies of ICE*St1* and ICE*St3* are very different: 1×10^{-6} and 0.9×10^{-3}, respectively (54). The regulation modules are more distantly related than the recombination and the conjugation modules. They shared three genes whose nucleotide sequences are 82 to 85% identical and which encode two putative regulatory pathways (5, 54). These pathways involved two ORFs named *arp1* and *arp2*, belonging to the *cI* and the *cI*-like repressor families, respectively. However, numerous particularities such as specific putative regulatory genes or differences in the sequences of the promoters and ribosome binding sites have been previously described in the regulation modules (5). We have proposed that the differences between the regulation modules of ICE*St1* and ICE*St3* could be responsible for the dissimilar excision frequencies of these elements. Together, these data suggest that these differences could also be involved in the very distinct transfer frequencies of the *S. thermophilus* ICEs.

In this work, the derepression by MC of the ICE*St3* conjugative transfer by a factor of 25 was demonstrated. Previous results have shown that MC treatment of cells harboring ICE*St1* or ICE*St3* led to a derepression of the excision of these elements by at least a factor of 10 (4). Thus, although the excision frequencies of ICE*St1* and ICE*St3* are very different and these elements seem to be differently regulated, MC treatments cause similar derepression of their excision frequencies. Nevertheless, no ICE*St1* transconjugant was recovered after such treatments.

While the role of the *arp1* gene, encoding a cI homolog, has been previously determined in ICE*St1*, the role of the *arp2* gene, encoding a cI-like homolog, has not yet been investigated (4). Furthermore, some recent results strongly suggest that the *arp1* gene is also functional in ICE*St3* (unpublished results). The role of the *arp2* gene encoding a cI-like homolog is also undetermined in this ICE. To our knowledge, the *S. thermophilus* ICEs are the only integrative elements (i.e., phages, ICEs, and related elements) carrying both a cI repressor and a cI-like repressor. Although these two repressor families are unrelated, they are both inactivated in response to DNA damage, which leads to a derepression of the target genes of the repressors (1, 13, 29, 45). MC-induced DNA damage is also known to derepress the conjugative transfer of others ICEs, such as SXT from *Vibrio cholerae* and ICE*Bs1* from *B. subtilis*, which carry a cI homolog and a cI-like homolog, respectively (2, 3).

ICE*St3* from *S. thermophilus* was characterized in this work as able to transfer to the other *Firmicutes S. pyogenes* and *E. faecalis*, whereas no ICE*St3* transconjugants of *S. agalactiae*, *E. casseliflavus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *C. difficile*, and *E. coli* were recovered. If optimal coculture conditions of the donor and the recipient strains were used, some traits specific to one of these strains were able to interfere with the ability of ICE*St3* to transfer. For example, the coculture of *S. thermophilus* and each of the two *S. agalactiae* recipient strains led to the death of the donor cells. This impossible coculture could be due to the synthesis by these *S. agalactiae* recipients of a compound such as a bacteriocin that is active against *S. thermophilus*.

Many studies with *att* site mutations have demonstrated that efficient recombination occurs only when the two attachment sites have very closed direct repeats. The plasmid pNST260+ was created in order to investigate the ability of the integrase to catalyze site-specific integrations into different *fda* 3′ ends, i.e., the putative ICE*St3 attB* site of the recipient strains. This plasmid carrying the *int* gene under the control of the P6 promoter and the *attI* site integrates efficiently in the *fda* 3′ ends from *S. thermophilus*, *L. lactis*, and *E. faecalis* but does not in *B. subtilis* and *Staphylococcus aureus*. The activity of the P6 promoter carried by the recombinant plasmids was shown in *B. subtilis* (27). Therefore, this strongly suggests that the integrase is expressed from pNST260+ but cannot catalyze the site-

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

specific integration of the plasmid in this species. *B. subtilis* and *Staphylococcus aureus* are related species, and therefore we hypothesize that pNST260+ should have behaved the same in these two species. The integration range of plasmid pNST260+ and the ICE*St3* host range are similar except for *L. lactis* (Fig. 5). Together these data suggest that although the promoters controlling the expression of the integrase in the plasmid and the ICE are not the same, a defective ICE*St3* integration similar to that observed for pNST260+ would be a limiting step of their transfer and another part of the explanation of their host range.

L. lactis is a species close to *S. thermophilus* and carries a putative *attB* site identical or almost identical to the *attB* site of *S. thermophilus* (Fig. 5). ICE*St3* transfers easily to *E. faecalis*, a species more distant from *S. thermophilus* than *L. lactis* and harboring the same putative *attB* site as *L. lactis* IL1403. Thus, the recovery of numerous ICE*St3* transconjugants of *L. lactis* integrated in the *fda* 3′ end was expected. Surprisingly, only one transconjugant of *L. lactis* was isolated and characterized. Analyses by PCR have confirmed that this clone derives from the recipient strain and that it carries the ICE, i.e., that this clone is an ICE*St3* transconjugant. Nonetheless, the amplification of the *attL* and the *attR* sites resulting from the site-specific integration of the ICE in the *fda* 3′ end of the recipient cell was not obtained. Together these data suggest that ICE*St3*, which cannot replicate itself and does not share any sequence identity with the *L. lactis* genome, was transferred and integrated in the chromosome of this transconjugant by a mechanism of illegitimate recombination. This integration in a locus other than *fda* could result from a defective integration process. Nevertheless, pNST260+, which overexpresses the *int* gene, integrates with a high efficiency in *L. lactis*. Differences in the integrase transcription from the P6 promoter of pNST260+ and from the natural integrase promoter in ICE*St3* could lead to this defective integration. However, no ICE*St3* transconjugant of *L. lactis* was recovered when a strain carrying pNST260+ was used as the recipient. Thus, pNST260+ cannot complement a hypothetical incoming ICE*St3* that could not express the ICE integrase. This suggests that ICE*St3* is poorly able to establish a functional mating apparatus with *L. lactis*.

The lactic acid bacterium *S. thermophilus* is extensively used as a starter in the manufacture of dairy products with other lactic acid bacteria, such as *Lactococcus lactis*. Sequence comparisons and hybridizations have revealed horizontal gene transfers between a large array of lactic acid bacteria. The quasi-identities of the IS*905* sequence of *L. lactis* (28) and the IS*1191* sequence of *S. thermophilus* and the distribution of these ISs suggested that IS*905*/IS*1191* were horizontally transferred from *S. thermophilus* to *L. lactis* (35, 36). In the same way, horizontal transfers of IS*981* and IS*S1* from *L. lactis* to *S. thermophilus* have recently occurred, probably in cocultures used for cheese manufacture (15, 35, 36). The sequencing of *S. thermophilus* genomes has shown that this species also acquired exogenic DNA from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and has suggested DNA exchanges with commensal streptococci (10). However, conjugative plasmids that might be involved in these transfers were never identified in *S. thermophilus*.

The *S. thermophilus* ICEs and the related genomic islands contain many examples of genetic exchange. They contain different types of enterococcal and lactococcal ISs and IS fragments (21, 54, 75). The genomic island ΔCIME308, which is related to ICE*St1* and ICE*St3*, carries a 10-kb sequence almost identical to the sequence of the plasmid pAH82 from *L. lactis*. Moreover, ICE*St1* and ICE*St3* are closely related to the putative ICE RD2 of *S. pyogenes* (34), to the putative ICE SmuE of *Streptococcus mutans* (18), and to six putative ICEs and genomic islands from *S. agalactiae* (16). Finally, one of the genomic islands related to the *S. thermophilus* ICEs carries a cadmium resistance module closely related to plasmids from *L. lactis*, *Listeria innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*; to the putative ICEs ICE*Lm1* from *Listeria monocytogenes*, ICE*_2603_rpiL* from *S. agalactiae*, and ICE*Sde3396* from *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*; and to SCC*mec* genomic islands from staphylococci (15, 50; unpublished data).

The presence of closely related genes in the *S. thermophilus* ICEs and the related genomic islands in various species strongly suggests that all these elements transfer in the environment and that they evolve by cointegration, deletion, and module exchanges. The genetic mixing between ICEs and other elements seems to be an important mechanism allowing the spread of exchanged genes into different ecological niches.

ACKNOWLEDGMENTS

X.B. was supported by a grant from the Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by a grant from the European Molecular Biology Organization (ASTF 279-2006).

REFERENCES

1. **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 ICE*Bs1* of *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **64:**1515–1528.
2. **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. USA **102:**12554–12559.
3. **Beaber, J. W., B. Hochhut, and M. K. Waldor.** 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature **427:**72–74.
4. **Bellanger, X., C. Morel, B. Decaris, and G. Guedon.** 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.
5. **Bellanger, X., C. Morel, B. Decaris, and G. Guedon.** 2008. Regulation of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*: role of the *arp1* repressor. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. **14:**16–21.
6. **Beres, S. B., E. W. Richter, M. J. Nagiec, P. Sumby, S. F. Porcella, F. R. DeLeo, and J. M. Musser.** 2006. Molecular genetic anatomy of inter- and intraserotype variation in the human bacterial pathogen group A *Streptococcus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **103:**7059–7064.
7. **Bertram, J., M. Stratz, and P. Durre.** 1991. Natural transfer of conjugative transposon Tn*916* between gram-positive and gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **173:**443–448.
8. **Biswas, I., A. Gruss, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. J. Bacteriol. **175:**3628–3635.
9. **Blomqvist, T., H. Steinmoen, and L. S. Havarstein.** 2006. Natural genetic transformation: a novel tool for efficient genetic engineering of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. **72:**6751–6756.
10. **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.
11. **Bonheyo, G. T., B. D. Hund, N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 2001. Transfer region of a *Bacteroides* conjugative transposon contains regulatory as well as structural genes. Plasmid **46:**202–209.
12. **Borges, F., S. Layec, A. Fernandez, B. Decaris, and N. Leblond-Bourget.**

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

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.
13. **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.
14. **Bourgogne, A., D. A. Garsin, X. Qin, K. V. Singh, J. Sillanpaa, S. Yerrapragada, Y. Ding, S. Dugan-Rocha, C. Buhay, H. Shen, G. Chen, G. Williams, D. Muzny, A. Maadani, K. A. Fox, J. Gioia, L. Chen, Y. Shang, C. A. Arias, S. R. Nallapareddy, M. Zhao, V. P. Prakash, S. Chowdhury, H. Jiang, R. A. Gibbs, B. E. Murray, S. K. Highlander, and G. M. Weinstock.** 2008. Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. Genome Biol. **9:**R110.
15. **Bourgoin, F., G. Guédon, M. Pébay, Y. Roussel, C. Panis, and B. Decaris.** 1996. Characterization of a mosaic IS*S1* element and evidence for the recent horizontal transfer of two different types of IS*S1* between *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. Gene **178:**15–23.
16. **Brochet, M., E. Couve, P. Glaser, G. Guedon, 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.
17. **Buist, G., J. Kok, K. J. Leenhouts, M. Dabrowska, G. Venema, and A. J. Haandrikman.** 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. J. Bacteriol. **177:**1554–1563.
18. **Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris, and G. Guédon.** 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. Mol. Microbiol. **46:**601–610.
19. **Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris, and G. Guédon.** 2002. The ICE*St1* 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.
20. **Burrus, V., Y. Roussel, B. Decaris, and G. Guédon.** 2000. Characterization of a novel integrative element, ICE*St1*, in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. **66:**1749–1753.
21. **Burrus, V., and M. K. Waldor.** 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. Res. Microbiol. **155:**376–386.
22. **Chopin, A., M. C. Chopin, A. Moillo-Batt, and P. Langella.** 1984. Two plasmid-determined restriction and modification systems in *Streptococcus lactis*. Plasmid **11:**260–263.
23. **Christie, P. J., R. Z. Korman, S. A. Zahler, J. C. Adsit, and G. M. Dunny.** 1987. Two conjugation systems associated with *Streptococcus faecalis* plasmid pCF10: identification of a conjugative transposon that transfers between *S. faecalis* and *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **169:**2529–2536.
24. **Clewell, D. B., D. D. Jaworski, S. E. Flannagan, L. A. Zitzow, and Y. A. Su.** 1995. The conjugative transposon Tn*916* of *Enterococcus faecalis*: structural analysis and some key factors involved in movement. Dev. Biol. Stand. **85:**11–17.
25. **Connil, N., Y. Le Breton, X. Dousset, Y. Auffray, A. Rince, and H. Prevost.** 2002. Identification of the *Enterococcus faecalis* tyrosine decarboxylase operon involved in tyramine production. Appl. Environ. Microbiol. **68:**3537–3544.
26. **Cumming, G., F. Fidler, and D. L. Vaux.** 2007. Error bars in experimental biology. J. Cell Biol. **177:**7–11.
27. **Djordjevic, G. M., and T. R. Klaenhammer.** 1996. Positive selection, cloning vectors for gram-positive bacteria based on a restriction endonuclease cassette. Plasmid **35:**37–45.
28. **Dodd, H. M., N. Horn, and M. J. Gasson.** 1994. Characterization of IS*905*, a new multicopy insertion sequence identified in lactococci. J. Bacteriol. **176:** 3393–3396.
29. **Dodd, I. B., K. E. Shearwin, A. J. Perkins, T. Burr, A. Hochschild, and J. B. Egan.** 2004. Cooperativity in long-range gene regulation by the lambda CI repressor. Genes Dev. **18:**344–354.
30. **Gaillard, M., T. Vallaeys, F. J. Vorholter, M. Minoia, C. Werlen, V. Sentchilo, A. Puhler, and J. R. van der Meer.** 2006. The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. J. Bacteriol. **188:**1999–2013.
31. **Gasson, M. J.** 1983. Plasmid complements of *Streptococcus lactis* NCDO 712 and other lactic streptococci after protoplast-induced curing. J. Bacteriol. **154:**1–9.
32. **Gasson, M. J., J. J. Godon, C. J. Pillidge, T. J. Eaton, K. Jury, and C. A. Shearman.** 1995. Characterization and exploitation of conjugation in *Lactococcus lactis*. Int. Dairy J. **5:**757–762.
33. **Georgin, P., and M. Mouet.** 2000. Statistiques avec Excel, Eyrolles ed. Presses Universitaires de Rennes, Paris, France.
34. **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.
35. **Guédon, G., F. Bourgoin, and B. Decaris.** 1998. Does gene horizontal transfer occur in lactic acid bacteria co-cultures? Lait **78:**53–58.
36. **Guédon, G., F. Bourgoin, M. Pébay, Y. Roussel, C. Colmin, J. M. Simonet, and B. Decaris.** 1995. Characterization and distribution of two insertion sequences, IS*1191* and iso-IS*981*, in *Streptococcus thermophilus*: does intergeneric transfer of insertion sequences occur in lactic acid bacteria cocultures? Mol. Microbiol. **16:**69–78.
37. **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.
38. **Hacker, J., and J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. Annu. Rev. Microbiol. **54:**641–679.
39. **Hartford, O., L. O'Brien, K. Schofield, J. Wells, and T. J. Foster.** 2001. The Fbe (SdrG) protein of *Staphylococcus epidermidis* HB promotes bacterial adherence to fibrinogen. Microbiology **147:**2545–2552.
40. **Jacob, A. E., and S. J. Hobbs.** 1974. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes.* J. Bacteriol. **117:**360–372.
41. **Kehoe, M. A., V. Kapur, A. M. Whatmore, and J. M. Musser.** 1996. Horizontal gene transfer among group A streptococci: implications for pathogenesis and epidemiology. Trends Microbiol. **4:**436–443.
42. **Kreiswirth, B. N., S. Lofdahl, M. J. Betley, M. O'Reilly, P. M. Schlievert, M. S. Bergdoll, and R. P. Novick.** 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. Nature **305:**709–712.
43. **Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, A. Danchin, and et al.** 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature **390:**249–256.
44. **Leenhouts, K.** 1995. Integration strategies and vectors. Dev. Biol. Stand. **85:**523–530.
45. **Madsen, P. L., A. H. Johansen, K. Hammer, and L. Brondsted.** 1999. The genetic switch regulating activity of early promoters of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. J. Bacteriol. **181:**7430–7438.
46. **Maguin, E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, and A. Gruss.** 1992. New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. J. Bacteriol. **174:**5633–5638.
47. **Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook.** 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
48. **Matsuno, Y., T. Ano, and M. Shoda.** 1992. High-efficiency transformation of *Bacillus subtilis* NB22, an antifungal antibiotic iturin producer, by electroporation. J. Ferment. Bioeng. **73:**261–264.
49. **Nallapareddy, S. R., K. V. Singh, and B. E. Murray.** 2006. Construction of improved temperature-sensitive and mobilizable vectors and their use for constructing mutations in the adhesin-encoding *acm* gene of poorly transformable clinical *Enterococcus faecium* strains. Appl. Environ. Microbiol. **72:**334–345.
50. **Okamoto, R., T. Okubo, and M. Inoue.** 1996. Detection of genes regulating beta-lactamase production in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. **40:**2550–2554.
51. **O'Reilly, M., and K. M. Devine.** 1997. Expression of AbrB, a transition state regulator from *Bacillus subtilis*, is growth phase dependent in a manner resembling that of Fis, the nucleoid binding protein from *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **179:**522–529.
52. **O'Sullivan, D. J., and T. R. Klaenhammer.** 1993. High- and low-copy-number *Lactococcus* shuttle cloning vectors with features for clone screening. Gene **137:**227–231.
53. **O'Sullivan, T. F., and G. F. Fitzgerald.** 1999. Electrotransformation of industrial strains of *Streptococcus thermophilus*. J. Appl. Microbiol. **86:**275–283.
54. **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: ICE*St1*-related elements from *Streptococcus thermophilus*. Microbiology **150:**759–774.
55. **Perez-Casal, J., J. A. Price, E. Maguin, and J. R. Scott.** 1993. An M protein with a single C repeat prevents phagocytosis of *Streptococcus pyogenes*: use of a temperature-sensitive shuttle vector to deliver homologous sequences to the chromosome of *S. pyogenes*. Mol. Microbiol. **8:**809–819.
56. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
57. **Scott, J. R., F. Bringel, D. Marra, G. Van Alstine, and C. K. Rudy.** 1994. Conjugative transposition of Tn*916*: preferred targets and evidence for conjugative transfer of a single strand and for a double-stranded circular intermediate. Mol. Microbiol. **11:**1099–1108.
58. **Scott, J. R., and G. G. Churchward.** 1995. Conjugative transposition. Annu. Rev. Microbiol. **49:**367–397.
59. **Sentchilo, V., R. Ravatn, C. Werlen, A. J. 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.
60. **Serror, P., T. Sasaki, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 2002. Electrotransformation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *L. delbrueckii* subsp. *lactis* with various plasmids. Appl. Environ. Microbiol. **68:**46–52.
61. **Sezonov, G., C. Possoz, A. Friedmann, J. L. Pernodet, and M. Guérineau.** 2000. KorSA from the *Streptomyces* integrative element pSAM2 is a central

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

transcriptional repressor: target genes and binding sites. J. Bacteriol. **182:** 1243–1250.
62. **Sirand-Pugnet, P., C. Lartigue, M. Marenda, D. Jacob, A. Barre, V. Barbe, C. Schenowitz, S. Mangenot, A. Couloux, B. Segurens, A. de Daruvar, A. Blanchard, and C. Citti.** 2007. Being pathogenic, plastic, and sexual while living with a nearly minimal bacterial genome. PLoS Genet. **3:**e75.
63. **Smith, C. J., S. M. Markowitz, and F. L. Macrina.** 1981. Transferable tetracycline resistance in *Clostridium difficile*. Antimicrob. Agents Chemother. **19:**997–1003.
64. **Stingele, F., and B. Mollet.** 1996. Disruption of the gene encoding penicillin-binding protein 2b (*pbp2b*) causes altered cell morphology and cease in exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. Mol. Microbiol. **22:**357–366.
65. **Supersac, G., Y. Piemont, M. Kubina, G. Prevost, and T. J. Foster.** 1998. Assessment of the role of gamma-toxin in experimental endophthalmitis using a hlg-deficient mutant of Staphylococcus aureus. Microb. Pathog. **24:** 241–251.
66. **Takamatsu, D., M. Osaki, and T. Sekizaki.** 2001. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. Plasmid **46:**140–148.
67. **te Poele, E. M., H. Bolhuis, and L. Dijkhuizen.** 2008. Actinomycete integrative and conjugative elements. Antonie van Leeuwenhoek **94:**127–143.
68. **Thibessard, A., F. Borges, A. Fernandez, B. Gintz, B. Decaris, and N. Leblond-Bourget.** 2004. Identification of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 genes involved in defense against superoxide stress. Appl. Environ. Microbiol. **70:**2220–2229.
69. **Thibessard, A., A. Fernandez, B. Gintz, B. Decaris, and N. Leblond-Bourget.** 2002. Transposition of pGh9:ISS1 is random and efficient in *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. Can. J. Microbiol. **48:**473–478.
70. **Toussaint, A., and C. Merlin.** 2002. Mobile elements as a combination of functional modules. Plasmid **47:**26–35.
71. **Tyvaert, G., C. Morel, J. Joly, B. Decaris, and F. Charron-Bourgoin.** 2006. The eps locus of *Streptococcus thermophilus* IP6756 is not involved in exopolysaccharide production. Int. Dairy J. **16:**467–473.
72. **van de Guchte, M., J. M. van der Vossen, J. Kok, and G. Venema.** 1989. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis.* Appl. Environ. Microbiol. **55:** 224–228.
73. **Wang, H., A. P. Roberts, D. Lyras, J. I. Rood, M. Wilks, and P. Mullany.** 2000. Characterization of the ends and target sites of the novel conjugative transposon Tn*5397* from *Clostridium difficile*: excision and circularization is mediated by the large resolvase, TndX. J. Bacteriol. **182:**3775–3783.
74. **Wessels, M. R., R. F. Haft, L. M. Heggen, and C. E. Rubens.** 1992. Identification of a genetic locus essential for capsule sialylation in type III group B streptococci. Infect. Immun. **60:**392–400.
75. **Willems, R. J., J. Top., N. van den Braak, A. van Belkum, D. J. Mevius, G. Hendriks, M. van Santen-Verheuvel, and J. D. van Embden.** 1999. Molecular diversity and evolutionary relationships of Tn*1546*-like elements in enterococci from humans and animals. Antimicrob. Agents Chemother. **43:**483–491.

Downloaded from jb.asm.org at SCD NANCY 1 - UHP on July 9, 2009

TABLE S1: Oligonucleotides used for the construction of the plasmids, the ICE labeling and the detection of the *att* sites

Primer	Sequence[a] (5'-3´)	Utilization[b]
O2.M.1H	GCCAAGCTTCATACCCTAAAAAGGCTGA	ICE*St1* labeling
O2.M.2B	CCCTAGGCTTCGAATTCTCGATTCC	ICE*St1* labeling
O2.M.3B	CCCTAGGCGAGAATTCGAAGCTTTTT	ICE*St1* labeling
O2.M.4P	ATCCTGCAGCTAGGCCTTAAGAAAACTCAA	ICE*St1* labeling
O3.M.1H	GCCAAGCTTGCCGATATTTTTAAAGCAAA	ICE*St3* labeling
O3.M.2B	CCCTAGGTATGCTCAATCTCCCATTTT	ICE*St3* labeling
O3.M.3B	CCCTAGGGGACTTGATGAAATTAGA	ICE*St3* labeling
O3.M.4P	ATCCTGCAGCGATTCCAGATTCAGATACAA	ICE*St3* labeling
AttI2	GCCATTCAAGATCGTGT	ICE*St1 attI* and *attR* amplification (E)
AttI3	TTGAAACCAGGTCTTACG	ICE*St1 attI* and *attL* amplification (B)
O131.5	CAGGAATCGATATTGACA	ICE*St3 attI* and *attR* amplification (E)
385.2	TCCAACCAGGTCTTACG	ICE*St3 attI* and *attL* amplification (B)
O131.2	TGTTGCTGAATACGAAGC	*S. thermophilus attB* and *attR* amplification (F)
O132.3	GGACTACTAAGAGAACAT	*S. thermophilus attB* and *attL* amplification (A)
fda1	TTCAAGAATTTACGTGGG	amplification of a *fda* fragment from *S. thermophilus* (G)
fda2	AGATGCTAAAGCTATGGTTG	amplification of a *fda* fragment from *S. thermophilus* (H)
Lla fba1	GAAAAATTGAACAAAGCACT	amplification of a *fda* fragment, the *attB* and *attR* sites from *L. lactis* (H)
Lla fba1b	TTAGCTGAACCGAATACATC	amplification of a *fda* fragment from *L. lactis* (G)
Lla fba2 MG1363	AATATGATTGCGCTTTCTAA	amplification of the *attB* and *attL* sites from *L. lactis* MG1363 (A)
Lla fba2 IL1403	TAAGACAAGCATTCTTCTGG	amplification of the *attB* and *attL* sites from *L. lactis* IL1403 (A)
Efa fba1	ATTCCTCAAGAACAAATTGA	amplification of a *fda* fragment, the *attB* and *attR* sites from *E. faecalis* (H)

Efa fba1b	ATGTGTTCTTCTGCATCTTT	amplification of a *fda* fragment from *E. faecalis* (G)
Efa fba2	CCCATTGATTACGATTTTT	amplification of the *attB* and *attL* sites from *E. faecalis* (A)
Bsu fba1	TCCATTTGAAGAAAACGTAG	amplification of a *fda* fragment, the *attB* and *attR* sites from *B. subtilis* (H)
Bsu fba1b	ACCGATAACTGTTTCTTTGA	amplification of a *fda* fragment from *B. subtilis* (G)
Bsu fba2	AATATGATTGCGCTTTCTAA	amplification of the *attB* and *attL* sites from *B. subtilis* (A)
Sau fba1	GGTGTTTCTGTAGAAGCTGA	amplification of a *fda* fragment, the *attB* and *attR* sites from *St. aureus* (H)
Sau fba1b	ACGTGCAGGTCCTAAGTATT	amplification of a *fda* fragment from *St. aureus* (G)
Sau fba2	TCATAAATTGCTCATTTTCC	amplification of the *attB* and *attL* sites from *St. aureus* (A)
for var	CTGTAGTAGCAGAATCTAAC	amplification of the *var* region of the *cse* gene from *S. thermophilus* (11)
rev var2	GCACTAGCAATCCAGTCTT	amplification of the *var* region of the *cse* gene from *S. thermophilus* (11)
O133-8	CGCACTATCTTTTAGCCCAAGACA	amplification of the ICE*St1* fragment carrying *xis*, *int* and *attI* (nested PCR)
O132-11	AAATGGAAGATTTTGATGCTATTGA	amplification of the ICE*St1* fragment carrying *xis*, *int* and *attI* (nested PCR)
int133-9	AGGCAAAATAGTCGACTTAAGGAG	amplification of the ICE*St1* fragment carrying *int* and *attI* (nested PCR)
O132-13	TGGATTCCTCGAGCTTGATTGAGCTAA	amplification of the ICE*St1* fragments carrying *int* and *attI*, or *xis*, *int* and *attI* (nested PCR)
O133-7	TATGTTAGTCGACAATAGAAAGGAGTT	amplification of the ICE*St1* fragments carrying *xis*, *int* and *attI* (nested PCR) or *xis*, *int* and *attR*.
int131-4	GAAACCAGGTCTCGAGCTATTACA	amplification of the ICE*St1* fragment carrying *xis*, *int* and *attR*
*Pst*IpTRK	AGGGCGAACTGCAGCTCCAC	amplification of the locus carrying the P6 promoter and the insert of plasmids deriving from pTRK398/θH

*Kpn*IpTRK	GCTTTACACTTTATGGTACCGGCTCG	amplification of the locus carrying the P6 promoter and the insert of plasmids deriving from pTRK398/θH
O1.A1.1H	CCCAAGCTTAAAAGCTAGAAGATGGAACA	amplification of a fragment of the ICE*St1* regulation module (C)
O1.A1.2E	GGAATTCAAAGAAGGAAGAAATGGATAG	amplification of a fragment of the ICE*St1* regulation module (D)
O3.A1.1H	CCCAAGCTTCTCTCAATCGAATAGCTACC	amplification of a fragment of the ICE*St3* regulation module (C)
O3.A1.2E	GGAATTCTTAGAGGTGTAAGTTAGGAGAA	amplification of a fragment of the ICE*St3* regulation module (D)

[a] Restriction enzyme sites used for molecular cloning are underlined. [b] The capital letters indicate the location of the primers in Figures 1 and 6.

4 ACCRETION SITE-SPECIFIQUE ET IMMUNITE

S. thermophilus CNRZ302, ATCC 19258 et LMD-9 portent respectivement CIME302, CIME19258 et CIME9 (Tableau 2). CIME302 est flanqué de sites *attL* et *attR* presque identiques à ceux d'ICE*St1* (Figure 10). CIME19258 est flanqué d'un site *attL* presque identique à celui d'ICE*St2* et un site *attR* identique à 76 % à celui d'ICE*St1* (Figure 10). CIME9 est, quant à lui, bordé d'un site *attL* presque identique à celui d'ICE*St1* et d'un site *attB* identique à celui produit par l'excision de cet ICE (Figure 10). Chacun de ces éléments possède donc une combinaison de sites d'attachement qui lui est propre, suggérant fortement qu'ils pourraient se comporter différemment les uns des autres. L'étude de ces trois CIME a été initiée au cours de ce travail.

4.1 ETUDE DE LA FONCTIONNALITE DES CIME

Pour que les CIME intégrés au locus *fda* soient effectivement des éléments mobilisables en *cis*, ils doivent être flanqués de sites d'attachement fonctionnels. L'étude des CIME a débuté par l'étude de la recombinaison site-spécifique entre ces éléments et plusieurs plasmides recombinants contenant une partie ou la totalité du module de recombinaison d'ICE*St1* sous le contrôle du promoteur constitutif P6 (Figure 17). Dans la suite de l'étude, une nomenclature permettant de distinguer les séquences des sites d'attachement a été adoptée. Des chiffres ont été affectés aux séquences spécifiques des sites *att* des CIME : 1 pour *attL* et 2 pour *attR*. Des lettres ont été affectées aux séquences spécifiques des sites *att* des ICE ou des plasmides recombinants portant tout ou partie du module de recombinaison d'ICE*St1* : A pour *attL* et B pour *attR*. Les sites *attI* sont constitués d'un bras issu d'*attR*, de la séquence de 27 pb et d'un bras issu d'*attL*. Les noms des sites *attI* résultant de l'accrétion ou de l'excision de différents types d'éléments reflètent l'origine de leurs deux bras. Par exemple, la recombinaison site spécifique entre un site $attL_1$ et un site $attR_B$ conduira à la formation d'un site *attB* chromosomique et d'un site $attI_{B1}$ porté par l'élément composite qui s'est excisé.

4.1.1 ETUDE DE CIME19258

L'étude du CIME intégré dans le locus *fda* de *S. thermophilus* ATCC 19258 avait été initiée lors de précédents travaux qui sont résumés dans ce paragraphe B.4.1.1 (Pavlovic *et al.*, 2004). Le plasmide pNST260+ portant le gène *int* et le site $attI_{AB}$ (Figure 17) s'intègre par recombinaison site-spécifique dans le site *attB* d'une souche dépourvue d'élément mais, ne possédant pas le gène *xis*, il n'est pas capable de s'exciser. Après avoir été introduit chez

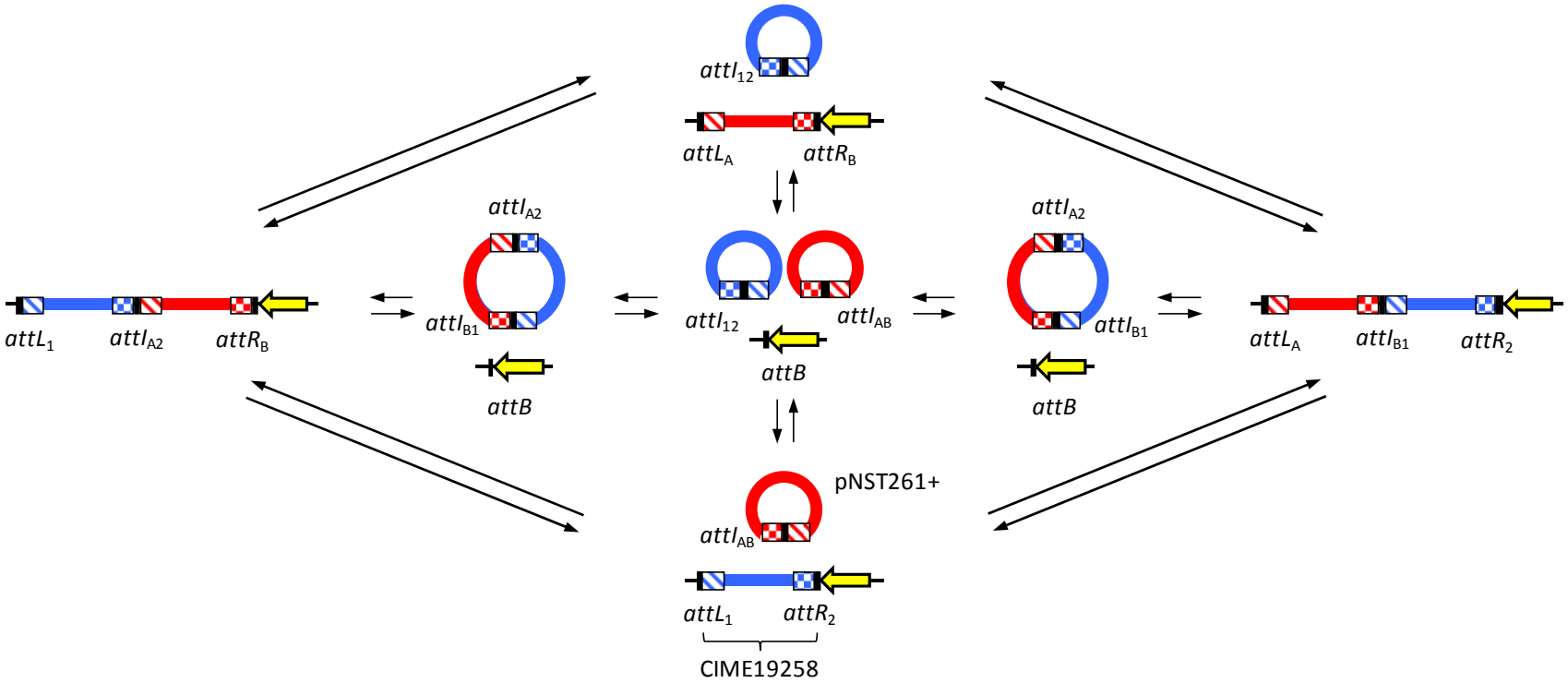
ATCC 19258, pNST260+ s'intègre dans le site *attR*$_2$ de CIME19258 mais non dans le site *attL*$_1$. Ainsi, le site *attL*$_1$ de cet élément ne semble pas pouvoir être un site d'intégration de pNST260+. Ceci suggérait fortement qu'ICE*St3*, dont le gène de l'intégrase et le site *attI* sont étroitement apparentés à ceux portés par le plasmide, se comportera de la même manière et ne s'intègrera que dans le site *attR*$_2$ de CIME19258.

Le plasmide pNST261+ portant les gènes *int* et *xis* ainsi que le site *attI*$_{AB}$ (Figure 17) est capable, chez une souche dépourvue d'élément, de s'intégrer dans le site *attB* et de s'exciser par recombinaison site-spécifique. Ce plasmide avait également été introduit chez ATCC 19258 par électroporation lors de ces précédents travaux. L'amplification par PCR de fragments portant les sites *attL*$_1$, *attI*$_{A2}$ et *attR*$_B$ à partir l'ADN des transformants obtenus avait suggéré que le plasmide pNST261+ s'était intégré dans le site *attR*$_2$ du CIME pour donner naissance à un tandem CIME19258/pNST261+/*fda* (Figure 29). De même, l'amplification des sites *attL*$_A$, *attI*$_{B1}$ et *attR*$_2$ correspondant à la structure en tandem pNST261+/CIME19258/*fda* avait été obtenue (Figure 29). Ainsi, la présence de pNST261+ chez *S. thermophilus* ATCC 19258 entraîne la formation de structures en tandem composées du plasmide et du CIME. Des PCR avaient également permis de détecter la formation du site *attB* chromosomique et des sites *attI*$_{AB}$ et *attI*$_{12}$ respectivement portés par les formes circulaires de pNST261+ et CIME19258 (Figure 29). La présence de pNST261+ peut donc provoquer l'excision de CIME19258 en *trans*. Ces amplifications suggèrent également que les structures obtenues subissent de nombreuses intégrations et excisions successives. Néanmoins, puisque chacun des sites d'attachements détectés par PCR est potentiellement présent dans deux des états possibles dans lesquels se trouvent pNST261+ et CIME19258 (Figure 29), la détection de la formation d'un site d'attachement ne peut pas être rattachée à l'existence d'un de ces états

Le plasmide pNST260+ portant le gène l'intégrase et le site* attI *d'ICE*St1 *ne peut former un tandem avec CIME19258 que par son intégration dans le site* attR$_2$ *de cet élément. De plus, l'introduction du plasmide pNST261+ portant les gènes* int *et* xis *chez S. thermophilus ATCC 19258 entraîne la détection de CIME19258 sous forme circulaire. Ainsi, les sites* attL$_1$ *et* attR$_2$ *de cet élément sont fonctionnels. CIME19258 est donc potentiellement mobilisable par ICE*St3*.

4.1.2 Etude de CIME9

CIME9 est un CIME « atypique » dans le sens où il est flanqué par un site *attL*$_1$ présentant 97 % d'identité avec le site *attL* d'ICE*St1* et un site *attB* identique à celui produit par l'excision de cet ICE. L'étude de cet élément a débuté par l'analyse de l'intégration site-spécifique du plasmide pNST261+ par hybridation ADN-ADN chez des transformants isolés



<u>Figure 29</u> : Représentation schématique des états qui pourraient être en théorie adoptés par les éléments portant les sites d'attachement détectés par PCR après introduction du plasmide pNST261+ dans la souche ATCC 19258 contenant CIME19258.

L'état représenté en bas de la figure correspond à la structure initiale suivant la transformation. L'expression des gènes de l'intégrase et de l'excisionase portés par le plasmide pNST261+ pourrait conduire aux autres structures représentées.
Les éléments pNST261+ et CIME19258 sont respectivement représentés par un rectangle rouge et un rectangle bleu. Le gène *fda* est représenté par une flèche jaune Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Des lettres (A, B) et des chiffres (1, 2) sont respectivement utilisés pour discriminer les sites d'attachement de pNST261+ et CIME19258. Les noms des sites *attI* résultant de l'accrétion de ces deux éléments reflètent l'origine de leurs deux bras.

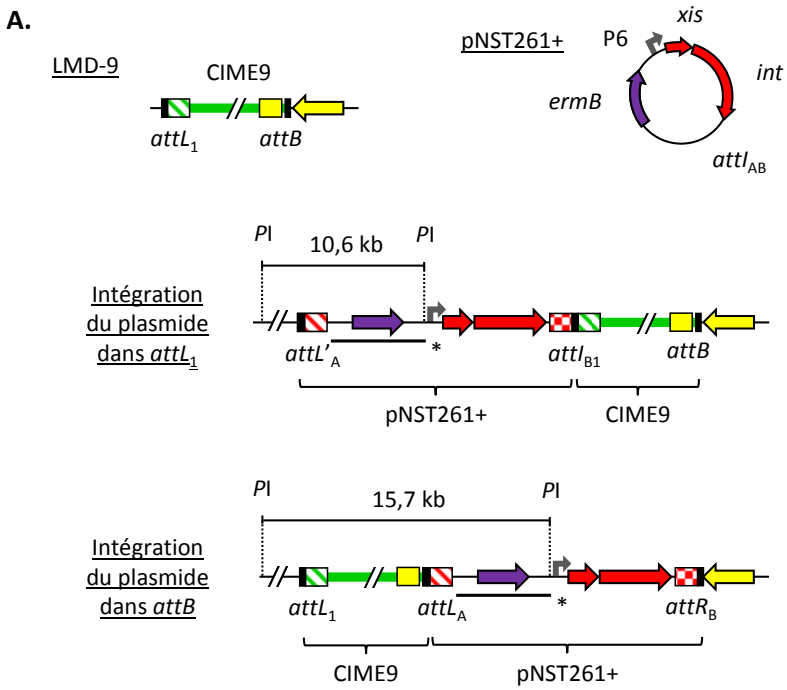
de *S. thermophilus* LMD-9 cultivés à température restrictive. La sonde utilisée correspond au vecteur pG$^+$host9 ayant servi de base pour la construction du plasmide pNST261+ (Figure 17). Les fragments attendus, d'une taille de 11 et 16 kb, correspondent respectivement à l'intégration du plasmide dans les sites *attL*$_1$ et *attB* flanquant l'élément (Figure 30A). Ces deux fragments ont été révélés pour chacun des cinq transformants étudiés (Figure 30B). Ces résultats suggèrent donc que le plasmide portant le module de recombinaison d'ICE*St1* peut s'intégrer dans les deux sites flanquant CIME9. La structure CIME9/pNST261+/*fda* qui résulte de l'intégration du plasmide dans le site *attB* du CIME est comparable à la structure composite d'ICE*St1* qui possède un site *attL'* interne (Figures 10 et 30).

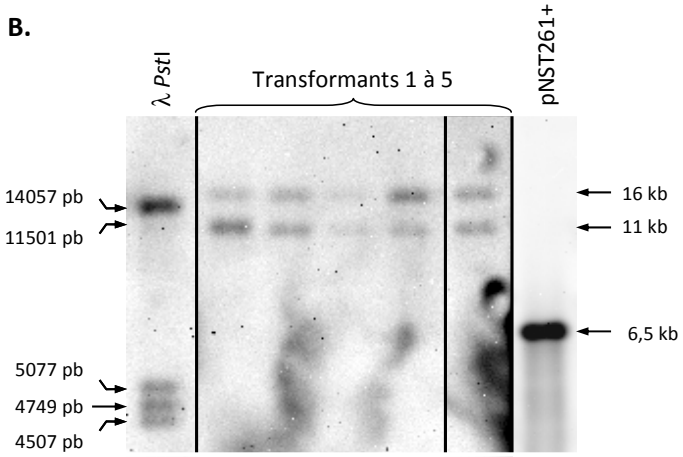
Ces données suggèrent que le plasmide pNST261+ s'intègre en tandem avec CIME9 par recombinaison site-spécifique entre son site* attI *et l'un ou l'autre des deux sites d'attachement flanquant le CIME. ICE*St3 *peut donc très probablement s'intégrer en tandem avec le CIME de la même manière. La structure CIME9/ICE*St3/fda *résultant de l'intégration d'ICE*St3 *dans le site* attL$_1$ *du CIME pourrait s'exciser de manière comparable à ICE*St1*, puis se transférer par conjugaison.

4.1.3 CIME*L*$_3$*CAT*R_3

La souche *S. thermophilus* CNRZ302 et les souches portant des CIME presque identiques sont très difficilement transformables par électroporation et aucun plasmide recombinant n'a pu y être introduit. Le CIME porté par CNRZ302 n'a donc pas pu être étudié. Une souche dérivant de *S. thermophilus* LMG18311 et portant un CIME artificiel flanqué des sites d'attachement d'ICE*St3*, c'est-à-dire des sites étroitement apparentés à ceux de CIME302, a donc été construite. Cette construction est décrite de manière exhaustive dans l'article 3. Brièvement, des fragments portant les sites d'attachement d'ICE*St3* et les séquences chromosomiques flanquantes ont été amplifiés par PCR puis clonés dans le vecteur pG$^+$host9 (Figure 31A). Le plasmide résultant portait un CIME constitué d'une courte séquence non codante bordée d'un site *attL* et d'un site *attR*. Cet élément de 547 pb nommé CIME*L*$_3$*R*$_3$ a ensuite été marqué par insertion entre les sites *attL* et *attR* du gène *cat* conférant une résistance au chloramphénicol. Après avoir introduit le plasmide pG$^+$host9 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ chez *S. thermophilus* LMG18311, deux événements de recombinaison homologue de part et d'autre de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ ont été sélectionnés afin d'introduire cet élément dans l'extrémité 3' du gène *fda* (Figure 31B).

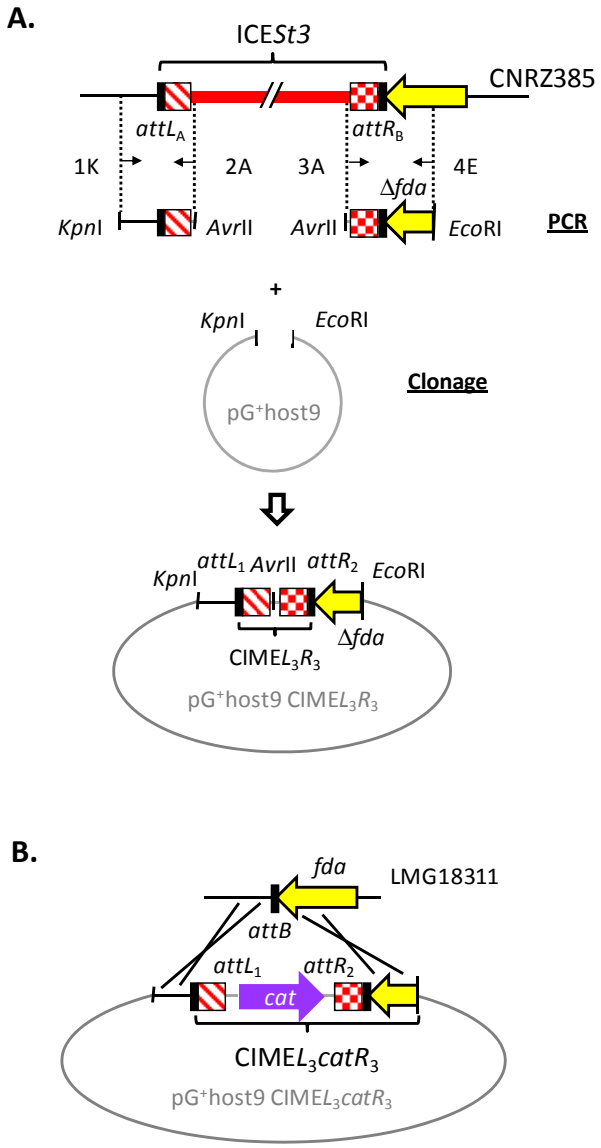
Cet élément porte les deux sites d'attachement d'ICE*St3* dont la fonctionnalité avait déjà été démontrée. La fonctionnalité des sites *att* de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ n'a donc pas été étudiée.





<u>Figure 30</u> : Détermination du site d'intégration du plasmide pNST261+ chez *S. thermophilus* LMD-9 par hybridation ADN-ADN.

(A.) Représentation schématique des structures de la souche LMD-9 portant CIME9, du plasmide pNST261+ et des intégrants de ce plasmide dans les sites *attL*$_1$ ou *attB* flanquant CIME9. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Les séquences délimitées par des pointillés correspondent aux fragments de restriction *Pst*I (*P*I) révélés par la sonde pG$^+$host9 dont la zone de recouvrement est symbolisée par le trait noir épais. Les flèches et les rectangles jaunes représentent respectivement le gène *fda* et ΔIS*1195L*. (B.) Profil d'hybridation de la sonde pG$^+$host9 sur l'ADN de génomique de 5 intégrants de pNST2621+ digéré par l'enzyme *Pst*I. La taille approximative des fragments révélés a été déterminée par comigration avec un marqueur de taille. λ *Pst*I : ADN du phage λ digéré par l'enzyme *Pst*I.



<u>Figure 31</u> : Représentation schématique de la construction du plasmide pG$^+$host9 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et de la souche *S. thermophilus* LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$.

(A.) Les sites *attR* et *attL* d'ICE*St3* et les séquences chromosomiques flanquantes ont été amplifiés par PCR à partir d'ADN de la souche CNRZ385 grâce aux couples d'amorces 1K-2A et 3A-4E possédant des sites de restriction. Les fragments obtenus ont été digérés par les enzymes de restriction appropriées, puis clonés dans le vecteur pG$^+$host9. Le plasmide résultant porte une courte séquence chromosomique non codante flanquée d'un site *attR* et d'un site *attL*, c'est-à-dire un CIME nommé CIME*L*$_3$*R*$_3$. Le gène *cat* a ensuite été inséré dans le site de restriction *Avr*II séparant les deux sites d'attachement de cet élément pour produire CIME*L*$_3$*catR*$_3$ (non représenté). (B.) Le plasmide pG$^+$host9 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ a été introduit par électroporation dans la souche LMG18311 portant un site *attB*. Enfin, deux événements de recombinaison homologue de part et d'autre de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ ont été sélectionnés afin de remplacer le site *attB* par le CIME.
Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*.

Une souche portant un CIME ayant des sites d'attachement étroitement apparentés à CIME302 a été construite. Cet élément, CIME*L$_3$catR$_3$*, contient un gène de résistance au chloramphénicol.

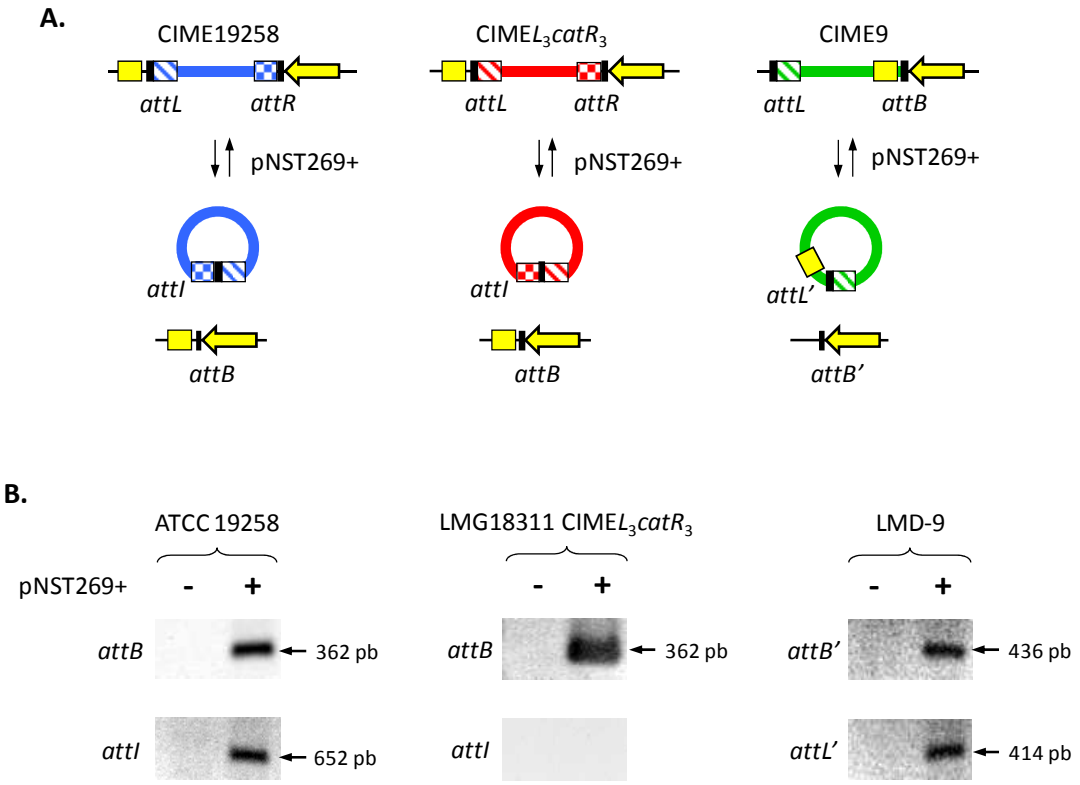
4.1.4 EXCISION DES CIME EN PRESENCE DE PLASMIDE PNST269+

Le plasmide pNST269+, créé lors de ce travail, porte les gènes de l'excisionase et de l'intégrase d'ICE*St1*, ainsi qu'un site *attR* tronqué dépourvu de la séquence de 27 pb dans laquelle à lieu l'échange de brin lors de l'intégration par recombinaison site-spécifique (Figure 17). Lorsqu'une souche de *S. thermophilus* dépourvue d'élément est transformée par électroporation avec ce plasmide, celui-ci s'avère incapable de s'intégrer dans le site *attB* (données non montrées).

Le plasmide pNST269+ a été introduit dans *S. thermophilus* ATCC 19258, LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et LMD-9 (Tableau 2) afin d'étudier l'impact de la présence de ce plasmide sur les CIME qu'elles contiennent. Les résultats présentés dans les chapitres précédents suggéraient fortement que la présence du plasmide pNST269+ dans les souches ATCC 19258 et LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ portant respectivement CIME19258 et CIME*L*$_3$*catR*$_3$ pourrait conduire à l'excision de ces éléments sous forme circulaire (Figure 32A). L'excision de CIME9 chez la souche LMD-9 portant le plasmide était quant à elle beaucoup plus hypothétique puisque cela impliquerait une recombinaison site-spécifique entre un site *attB* et un site *attL* (Figure 32A).

Des amplifications par PCR réalisées sur l'ADN des souches ATCC 19258, LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et LMD-9 ne possédant pas pNST269+ ont démontré que les trois CIME ne s'excisent pas en absence de l'intégrase et de l'excisionase (Figure 32B). Cependant, lorsque ces mêmes amplifications sont réalisées sur l'ADN des souches portant le plasmide, les sites *attB* ou *attB'* résultant de l'excision de chaque CIME sont détectés (Figure 32B). L'excision de CIME19258 et CIME9 a été confirmée par l'amplification des sites *attI* ou *attL'* portés par les formes circulaires de ces éléments (Figure 32B). Le séquençage des produits de PCR obtenus a confirmé leur nature. Bien que le fragment de 1115 pb correspondant au site *attI* porté par la forme circulaire de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ n'ait pas été amplifié chez la souche LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ pNST269+ (Figure 32B), la détection du site chromosomique *attB* démontre l'excision de ce CIME. La détection de ces différents événements d'excision en présence de pNST269+ n'implique pas que ceux-ci se produisent dans des conditions physiologiques normales d'expression des gènes de l'intégrase et de l'excisionase.

L'intégrase et l'excisionase codée par les gènes du plasmide pNST269+ sont donc capable de catalyser l'excision en* trans *de CIME19258, CIME*L$_3$catR$_3$ *et CIME9.



<u>Figure 32</u>: Mise en évidence de l'excision de CIME19258, CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et CIME9 en présence du plasmide pNST269+.

(A.) Représentation schématique de l'excision et l'intégration de CIME19258, CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et CIME9 respectivement portés par les souches ATCC 19258, LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et LMD-9 en présence du plasmide pNST269+. Le gène *fda* et IS*1195L* (tronquée ou entière) sont respectivement représentés par une flèche et un rectangle jaune. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. (B.) Amplification par PCR de fragments portant les sites d'attachement prédits dans la partie A. Le site *attI* produit par l'excision de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ n'a pas été détecté bien qu'un fragment portant le site *attB* correspondant ait été amplifié. Les signes + et – représentent respectivement la présence ou l'absence du plasmide pNST269+ dans les souches. La taille des produits de PCR, déduite des analyses de séquences, a été confirmée par comigration avec un marqueur de taille.

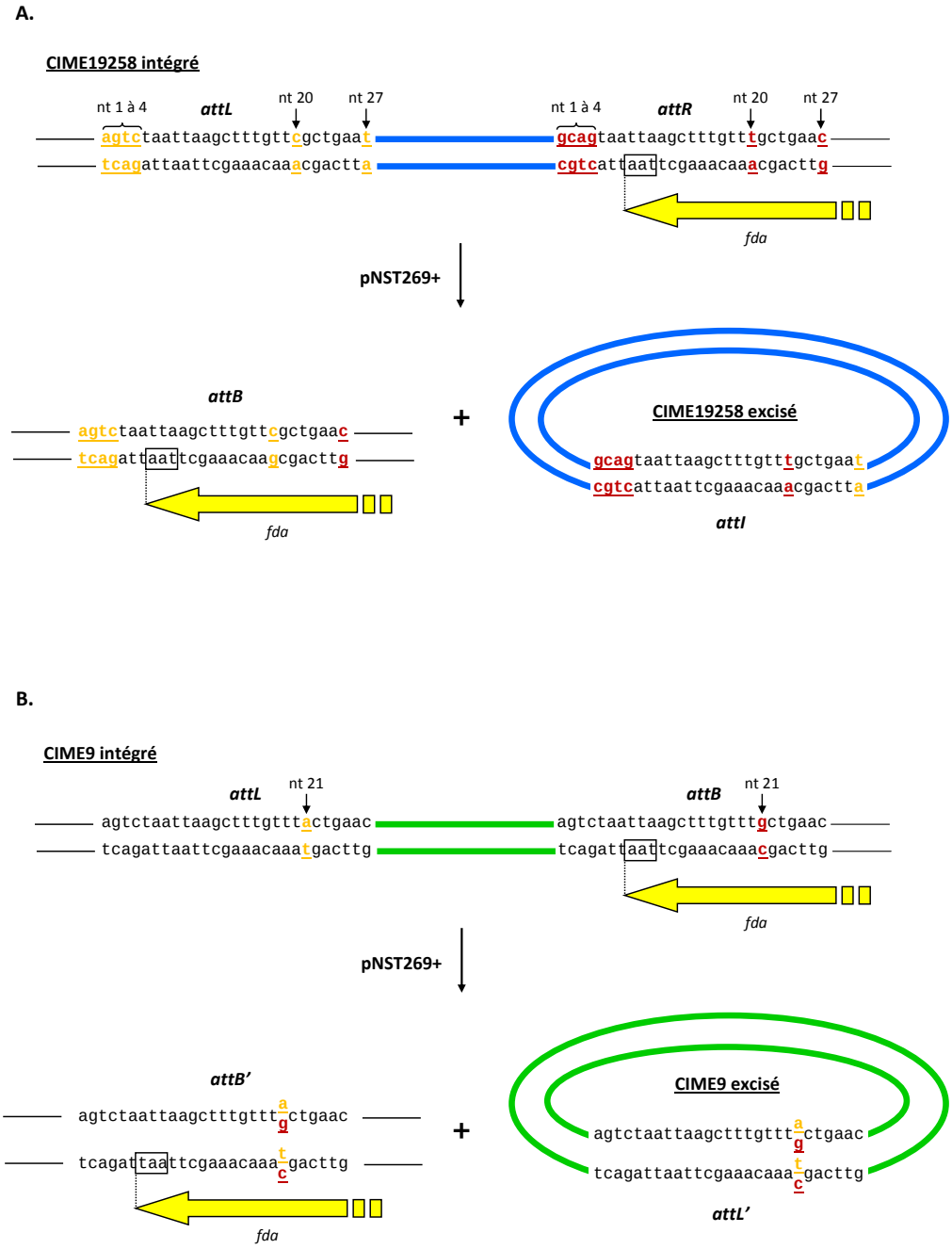
4.1.5 LOCALISATION DU SITE DE COUPURE DECALEE AU SEIN DES SITES *ATT*

Les coupures décalées permettant l'échange de brins conduisant à l'intégration ou l'excision d'un élément grâce à une recombinase à tyrosine se produisent entre deux séquences identiques ou quasi-identiques de 6 à 8 pb portées par deux sites d'attachement (Rajeev *et al.*, 2009).

L'étude des sites d'attachement flanquant ICE*St3* et ICE*St1* permet d'affirmer que chez cette famille d'éléments l'échange de brins à lieu dans la séquence de 27 pb partagées par ces sites. Chez CIME19258 et CIME9, les séquences homologues à cette séquence de 27 pb dans les deux sites flanquant le même élément présentent des divergences et constituent des répétitions imparfaites (Figure 33 A et B). Les sites d'attachement résultant de l'excision de CIME19258 et CIME9 grâce au plasmide pNST269+ ont été séquencés afin de rechercher la position des coupures décalées impliquées dans ces échanges. Si la coupure décalée catalysée par l'intégrase des ICE de *S. thermophilus* chevauche ces nucléotides différents, des mésappariements pourront apparaître.

Chez CIME19258, la séquence de 27 pb des sites *attL* et *attR* présentent des différences entre elles en positions 1-4, 20 et 27 (Figure 33 A). La partie gauche de la séquence de 27 pb du site *attB* produit par l'excision de CIME19258 provient de celle du site *attL* jusqu'au moins la position 20, car les nucléotides en positions 1 à 20 sont identiques entre les séquences de 27 pb de ces deux sites. L'extrémité droite de ce site *attB* provient du site *attR* car le nucléotide en position 27 est identique dans les deux sites (Figure 33A). De plus, dans le site *attI* de CIME19258, les nucléotides en positions 1 à 4 et le nucléotide en position 27 de la séquence de 27 pb sont respectivement identiques à ceux des sites *attR* et *attL* de cet élément. Par conséquent, l'échange de brin a eu lieu entre les positions 20 et 27 des répétitions imparfaites d'*attL* et d'*attR* de CIME19258 (Figure 33A).

Chez CIME9, les séquences de 27 pb des sites *attL* et *attB* flanquants présentent une différence en positions 21 (Figure 33B). Le séquençage des sites *attB'* et *attL'* résultant de l'excision de CIME9 a fait apparaître, au niveau de la position 21, deux pics de même volume correspondant, pour le brin codant du gène *fda*, aux nucléotides A et G (données non montrées). La présence de ces deux pics de même volume résulte de la formation d'un mésappariement à la position 21 lors de l'excision de CIME9 (Figure 33B). Ainsi, la coupure décalée permettant l'excision de CIME chevauche la position 21.



<u>Figure 33</u> : Représentation schématique des répétitions directes imparfaites des sites d'attachement avant et après excision de CIME19258 et CIME9 grâce à pNST269+.

(A.) Comparaison des répétitions directes imparfaites des sites d'attachement avant et après l'excision de CIME19258. (B.) Comparaison des répétitions directes imparfaites des sites d'attachement avant et après l'excision de CIME9. Les nucléotides identiques entre les séquences de 27 pb des deux sites *att* flanquant un élément sont représentés en noir. Les nucléotides différents entre les séquences de 27 pb des deux sites *att* sont représentés en orange pour les sites *attL* des deux CIME et en brun pour les sites *attR* de CIME19258 ou *attB* de CIME9 ; leur position dans la séquence est indiquée. Le codon stop du gène *fda* est encadré. Les nucléotides superposés dans les répétitions imparfaites produites par l'excision de CIME9 (a et g, ou t et c) représentent la formation d'un mésappariement à la position 21.

Les séquences des sites d'attachement résultant de l'excision de CIME9 et CIME19258 par le plasmide pNST269+ suggèrent fortement que la coupure décalée permettant l'échange de brins lors des événements d'intégration et d'excision des éléments intégrés au locus* fda *est d'une longueur maximale de 6 pb et se produit entre les nucléotides en position 20 et 21 des répétitions directes pour l'un des brins et 26 et 27 pour l'autre brin.

4.2 ACCRETION SITE-SPECIFIQUE ENTRE ICE*ST3* ET LES ILOTS APPARENTES

Afin d'étudier l'accrétion site-spécifique entre îlots génomiques apparentés et ses conséquences, ICE*St3* a été transféré vers différentes souches réceptrices portant déjà un ICE ou un CIME dans le locus *fda*. Si l'accrétion site-spécifique entre deux ICE a été décrite pour de rares éléments (Hochhut *et al.*, 2001a; Possoz *et al.*, 2001), l'accrétion entre un ICE et un CIME apparenté n'a jamais été rapportée. Dans la suite de ce manuscrit, deux éléments intégrés en tandem seront séparés par un tiret lorsque leur ordre par rapport l'un par rapport à l'autre et par rapport au gène *fda* est inconnu (exemple : ICE*St1*-ICE*St3*). Lorsque cet ordre est connu, les deux éléments seront séparés par un trait oblique et le gène *fda* sera indiqué (exemple : ICE*St1*/ICE*St3*/*fda*).

4.2.1 TANDEMS FORMES DE DEUX ICE

4.2.1.1 TANDEMS ICE*ST3*-ICE*ST3*

S. thermophilus CNRZ385 ICE*St3cat* et un mutant dérivant de *S. thermophilus* CNRZ385 ICE*St3spc* résistant à la rifampicine ont été respectivement utilisés comme donatrice et réceptrice lors de conjugaisons sur filtres. Les transconjugants obtenus ont été isolés sur un milieu contenant chloramphénicol, spectinomycine et rifampicine afin de ne pas sélectionner les transconjugants d'ICE*St3spc* vers CNRZ385 ICE*St3cat*. La fréquence de transfert d'ICESt3*cat* dans ces conditions est de $1,5 \times 10^{-7} \pm 0,5 \times 10^{-7}$ transconjugant par donatrice. Le site d'intégration d'ICESt3*cat* a été analysé par hybridation ADN-ADN chez 17 transconjugants purifiés. L'intégration d'ICE*St3cat* dans les sites *attL* ou *attR* d'ICE*St3spc* aboutirait à l'accrétion site-spécifique des deux éléments et la formation d'une structure en tandem (Figure 34A). Pour déterminer le site d'intégration d'ICE*St3cat*, deux sondes spécifiques des gènes *spc* et *cat* et l'enzyme de restriction *Eco*RV ont été utilisées lors de cette analyse. La sonde *spc* a permis de révéler chez 16 transconjugants, un fragment d'une taille similaire à celle du fragment obtenu pour la souche réceptrice, c'est-à-dire environ 6,0 kb (Figure 34B). La sonde *cat* a révélé chez ces mêmes transconjugants, un fragment d'une taille estimée à 6,2 kb (Figure 34B). Pour le transconjugant de la piste 2, la sonde *spc* s'est hybridée sur un fragment d'une taille de 6,2 kb tandis que la sonde *cat* a révélé pour ce

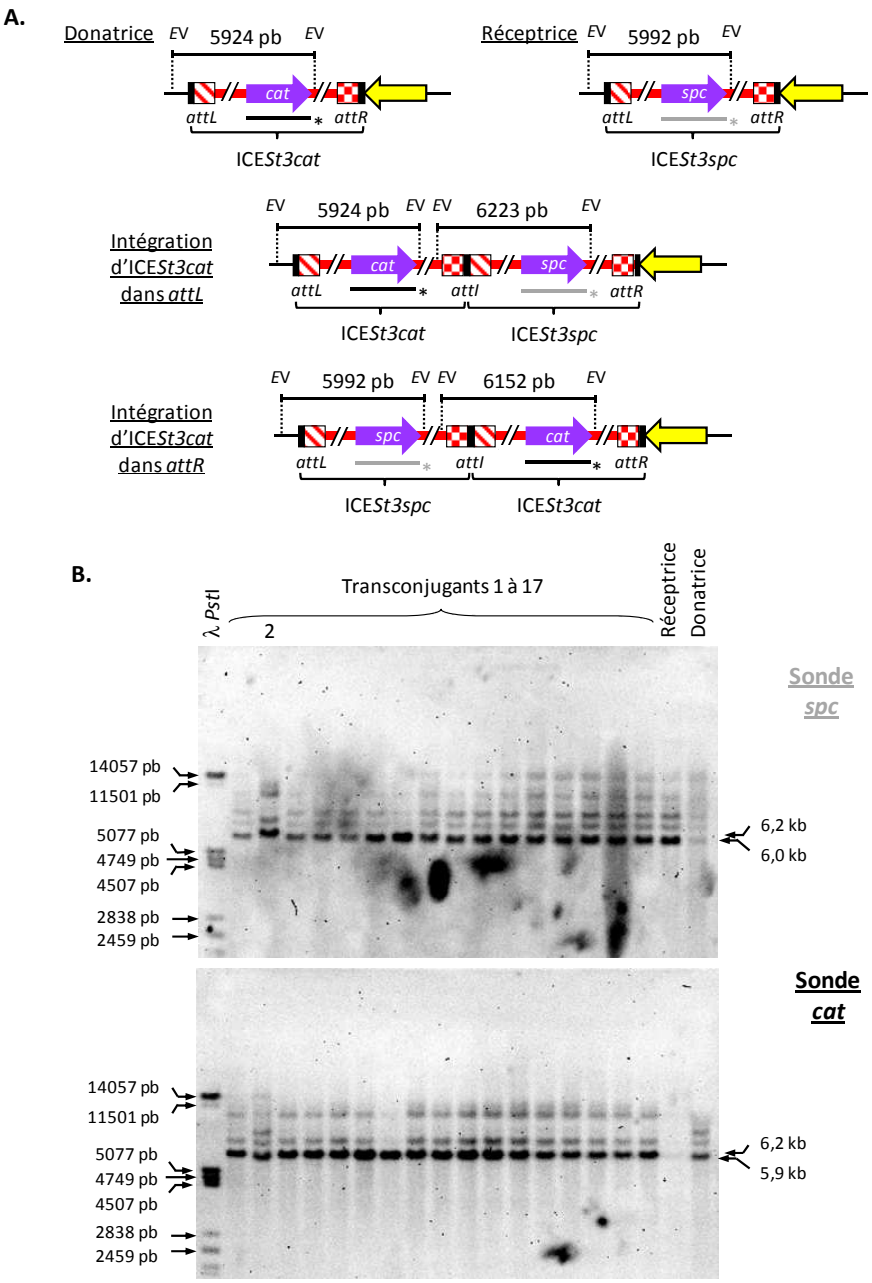


Figure 34 : Détermination du site d'intégration d'ICE*St3cat* chez les transconjugants de *S. thermophilus* CNRZ385 ICE*St3spc* Rif^R par hybridation ADN-ADN.

(A.) Représentation schématique des structures présentes chez la souche donatrice CNRZ385 ICE*St3cat*, la souche réceptrice CNRZ385 ICE*St3spc* Rif^R et les transconjugants dans lesquels ICE*St3cat* se serait intégré dans les sites *attL* ou *attR* flanquant ICE*St3spc*. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Les séquences délimitées par des pointillés correspondent aux fragments de restriction *Eco*RV (*E*V). La zone de recouvrement des sondes *spc* ou *cat* est respectivement symbolisée par les traits épais gris et noirs suivis d'un astérisque. Les flèches jaunes représentent le gène *fda*. (B.) Profil d'hybridation des sondes *spc* ou *cat* sur l'ADN génomique de 17 transconjugants d'ICE*St3cat* digéré par l'enzyme *Eco*RV. La taille des fragments révélés a été déterminée par comigration avec un marqueur de taille. λ *Pst*I : ADN du phage λ digéré par l'enzyme *Pst*I.

transconjugant un fragment d'une taille de 5,9 kb identique à celui obtenu pour la souche donatrice (Figure 34B). ICE*St3cat* s'est donc intégré dans le site *attR* de l'élément ICE*St3* résident chez 16 des 17 transconjugants et dans le site *attL* de l'élément résident chez le transconjugant de la piste 2.

ICE*St3 *peut donc se transférer vers une souche possédant déjà une copie résidente de cet élément. L'élément entrant s'intègre par recombinaison site-spécifique dans l'un des sites* att *flanquant l'ICE résident entraînant l'accrétion site-spécifique des deux copies. La copie entrante d'ICE*St3 *s'intègre préférentiellement dans le site* attR *de l'ICE résident.

4.2.1.2 TANDEMS ICE*ST3*-ICE*ST1*

Les souches étroitement apparentées A054 et CNRZ368 diffèrent notamment par la présence d'ICE*St1* dans cette dernière, A054 portant un site *attB* vide (Burrus *et al.*, 2000). Lors des expériences de transfert d'ICE*St3* de CNRZ385 ICE*St3cat* vers les deux souches A054 et CNRZ368 contenant le plasmide pMG36e (*ermB*), seuls de rares transconjugants dérivant de la souche A054 ont été obtenus (fréquence de $3{,}0 \times 10^{-8} \pm 1{,}6 \times 10^{-7}$).

La culture d'un transconjugant purifié A054 ICE*St3cat* pMG36e pendant environ 100 générations en absence d'érythromycine a permis d'isoler quelques clones ayant perdu le plasmide pMG36e. Un des clones ainsi isolé (souche A054 ICE*St3cat*) a été utilisé comme donatrice lors d'expériences de conjugaison. À partir de cette souche, la fréquence de transfert d'ICE*St3cat* vers la souche A054 pMG36e est de $1{,}7 \times 10^{-5} \pm 0{,}7 \times 10^{-5}$. Ainsi, la fréquence de transfert d'ICE*St3* d'A054 ICE*St3cat* vers A054 pMG36e est environ 600 fois plus élevée que lorsque que la souche donatrice est CNRZ385 ICE*St3cat*. De plus, bien qu'aucun transconjugant n'ait été isolé après l'utilisation des souches CNRZ385 ICE*St3cat* et CNRZ368 pMG36e respectivement comme donatrice et réceptrice, ICE*St3* se transfère d'A054 ICE*St3cat* vers cette même réceptrice à une fréquence de $9{,}3 \times 10^{-7} \pm 2{,}7 \times 10^{-7}$. Un système RM présent chez les souches étroitement apparentées A054 et CNRZ368 limite donc probablement le transfert d'ICE*St3cat* à partir de la souche CNRZ385.

Le site d'intégration d'ICE*St3cat* a été analysé par hybridation ADN-ADN chez 14 transconjugants purifiés dérivant de CNRZ368 pMG36e. La sonde spécifique du gène *cat* et l'enzyme de restriction *Eco*RV ont été utilisées lors de cette étude. Chez ces transconjugants, ICE*St3cat* pourrait s'être intégré dans les sites *attL* et *attR* flanquant ICE*St1* mais également dans le site *attL'* interne à cet élément (Figure 35A). La sonde *cat* a révélé chez 4 de ces transconjugants des fragments d'une taille similaire à celle du fragment obtenu pour la souche donatrice, c'est-à-dire environ 5,9 kb (pistes 5, 6, 13 et 14) (Figure 35B). Ce fragment de 5,9 kb correspond au tandem ICE*St3cat*/ICE*St1*/*fda* (Figure 35A). Un fragment d'une taille

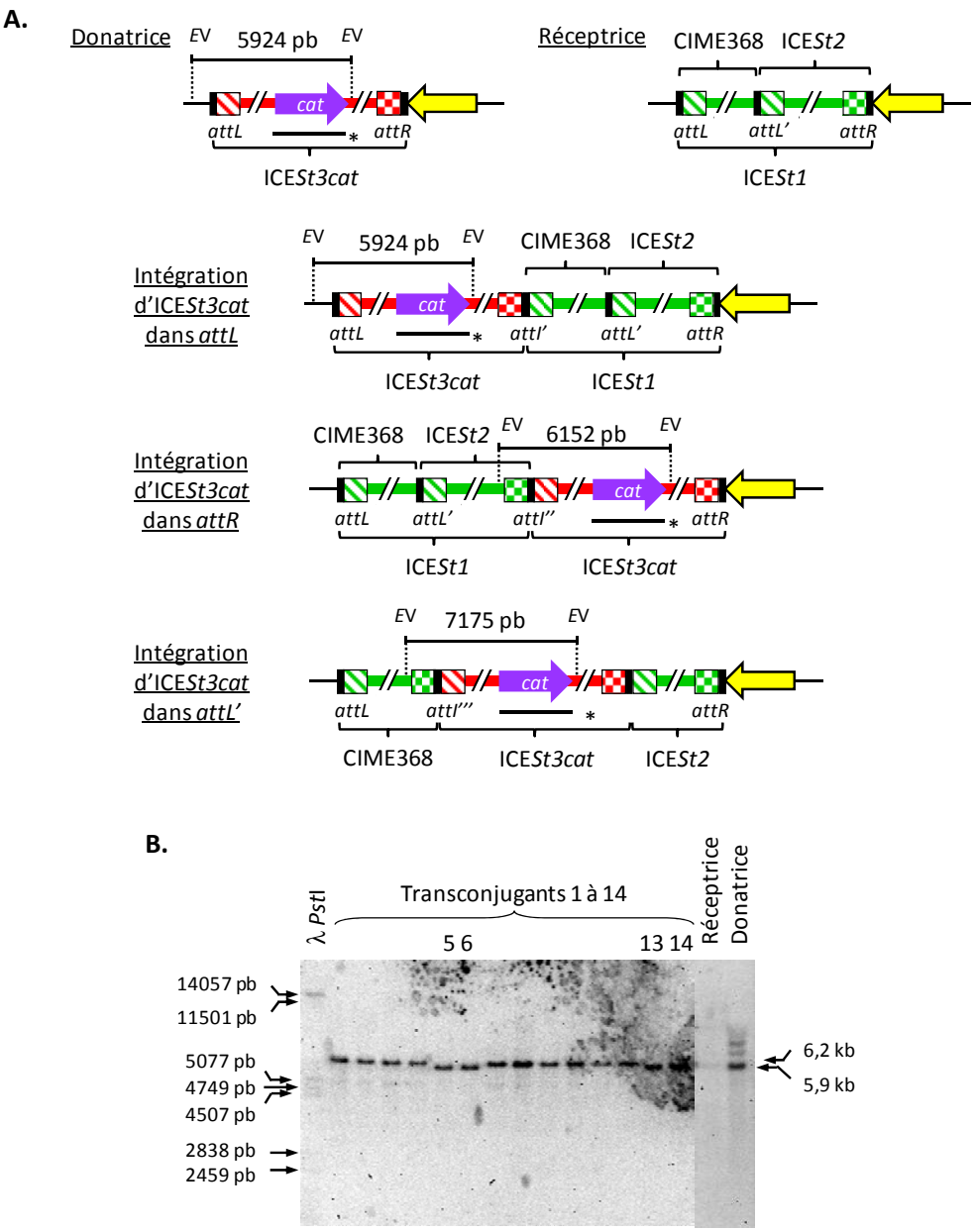


Figure 35 : Détermination du site d'intégration d'ICE*St3cat* chez les transconjugants de *S. thermophilus* CNRZ368 pMG36e par hybridation ADN-ADN.

(A.) Représentation schématique des structures présentes chez la souche donatrice CNRZ385 ICE*St3cat*, la souche réceptrice CNRZ368 pMG36e et les transconjugants dans lesquels ICE*St3cat* se serait intégré dans les sites *attL, attR* ou *attL'* d'ICE*St1*. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Les séquences délimitées par des pointillés correspondent aux fragments de restriction *Eco*RV (*EV*) révélés par la sonde *cat* dont la zone de recouvrement est symbolisée par les traits noirs épais suivis d'un astérisque. Les flèches jaunes représentent le gène *fda*. (B.) Profil d'hybridation de la sonde *cat* sur l'ADN génomique de 14 transconjugants d'ICE*St3cat* digéré par l'enzyme *Eco*RV. La taille des fragments révélés a été déterminée par comigration avec un marqueur de taille. λ *Pst*I : ADN du phage λ digéré par l'enzyme *Pst*I.

de 6,2 kb correspondant au tandem ICE*St1*/ICE*St3cat*/*fda* a été révélé chez les 10 autres transconjugants (pistes 1 à 4 et 7 à 12) (Figure 35 Aet B).

L'accrétion site-spécifique d'ICE*St3cat *avec ICE*St1 *a été obtenue. Aucune intégration d'ICE*St3cat *dans le site interne d'ICE*St1 attL' *n'a été caractérisée. De plus, ICE*St3cat *semble s'intégrer préférentiellement dans le site* attR *d'ICE*St1*, comme c'est le cas dans une copie résidente d'ICE*St3*.

Par ailleurs, le transfert d'ICE*St3cat *de* S. thermophilus *CNRZ385 vers A054 et CNRZ368 semble être limité par un système RM partagé par ces deux souches étroitement apparentées.

4.2.2 TANDEMS FORMES D'ICE*ST3* ET D'UN CIME

4.2.2.1 TANDEMS ICE*ST3SPC*-CIME19258*CAT*

L'élément CIME19258 a été marqué par le gène de résistance au chloramphénicol grâce à la méthode développée dans l'article 2 pour le marquage des ICE de *S. thermophilus*. Ainsi, le gène *cat* a été inséré dans la répétition terminale inversée d'IS*1192* se situant entre l'extrémité 5′ de l'ORF *cadC* et l'extrémité 3′ du gène de la transposase de cette IS (Figure 36).

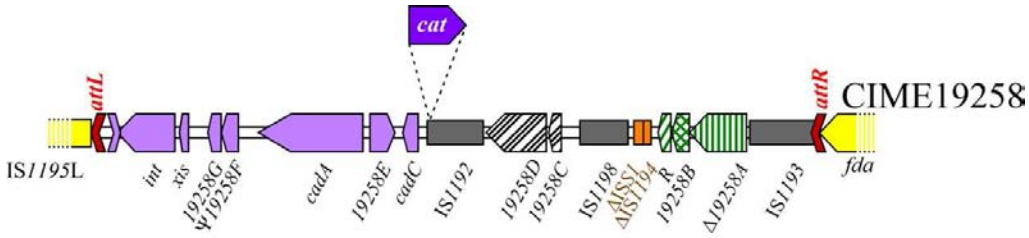


Figure 36 : Représentation schématique du locus choisi pour le marquage de CIME19258*cat* de *S. thermophilus*.

La légende utilisée est identique à celle de la figure 9. Le gène de résistance au chloramphénicol *cat* a été inséré dans la répétition terminale inversée d'IS*1192* se situant entre l'extrémité 5′ de *cadC* et l'extrémité 3′ du gène de la transposase.

Les souches CNRZ385 ICE*St3spc* et ATCC 19258 CIME19258*cat* ont respectivement été utilisées comme donatrice et réceptrice lors d'expériences de conjugaison. La fréquence de transfert d'ICE*St3spc* vers cette souche réceptrice est de $3,3 \times 10^{-6} \pm 0,7 \times 10^{-6}$. Le site d'intégration de l'ICE a été analysé par hybridation de la sonde spécifique du gène *spc* sur l'ADN de 12 transconjugants digéré par *Eco*RV. Chez ces transconjugants, l'intégration site-spécifique d'ICE*St3spc* dans les sites *attL* ou *attR* flanquant CIME19258*cat* devrait aboutir à l'obtention d'une structure en tandem et d'un événement d'accrétion entre un ICE et un CIME apparenté (Figure 37A).

La sonde *spc* a permis de révéler chez tous les transconjugants un fragment de 9,6 kb correspondant à l'intégration d'ICE*St3spc* dans le site *attR* de CIME19258*cat* (Figure 37B). Ce résultat était attendu puisque l'étude précédemment décrite de l'intégration du plasmide pNST260+ chez ATCC 19258 avait révélé que celui-ci s'intègre uniquement dans le site *attR* de CIME19258 (§ B.4.1.1). Cependant, un fragment d'environ 6,0 kb identique à celui révélé pour la souche donatrice est obtenu avec le transconjugant 4 (Figure 37B). La détection d'un fragment de cette taille suggère fortement l'intégration d'ICE*St3spc* dans le site *attL* de CIME19258 (Figure 37A). La présence de ces deux fragments dans la piste du transconjugant 4 est soit due au fait que la culture de ce clone contient un mélange de population constitué d'intégrants d'ICE*St3spc* dans l'un ou l'autre des deux sites d'attachement du CIME, soit due au fait que ce clone a acquis deux copies de l'ICE, chacune intégrée dans un site d'attachement flanquant CIME19258*cat* (Figure 37A).

Après son transfert vers ATCC 19258 CIME19258*cat*, ICE*St3spc* s'intègre préférentiellement dans le site attR de CIME19258. L'accrétion des deux éléments a donc été obtenue.

4.2.2.2 TANDEMS ICE*ST3*- CIMEL_3*CATR*$_3$

L'étude des tandems formés par l'intégration d'ICE*St3spc* dans l'un des deux sites d'attachement de CIMEL_3*catR*$_3$, décrite de manière exhaustive dans l'article 3, n'est pas développée dans ce paragraphe. Succinctement, le site d'intégration d'ICE*St3spc* a été étudié par hybridation ADN-ADN chez 12 transconjugants purifiés dérivant de LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$. La sonde spécifique du gène *spc* a révélé deux fragments de 7,6 et 6,0 kb pour tous les clones (Figure 38B). Le signal du fragment de 6,0 kb est d'intensité comparable au fragment de plus grande taille pour les clones 7 et 12 et d'intensité bien plus faible pour les autres clones (Figure 38B). La détection du fragment de 7,6 kb correspond à l'intégration d'ICE*St3spc* dans le site *attR* de CIMEL_3*catR*$_3$ (Figure 38A). Le fragment de 6,0 kb traduit, quant à lui, très probablement, une intégration d'ICE*St3spc* dans le site *attL* du CIME (Figure 38A). Néanmoins, il n'est pas exclu que ce signal provienne d'une intégration de deux copies de l'ICE dans le site *attR* du CIME (Figure 38A). Toutefois, le transfert simultané de deux

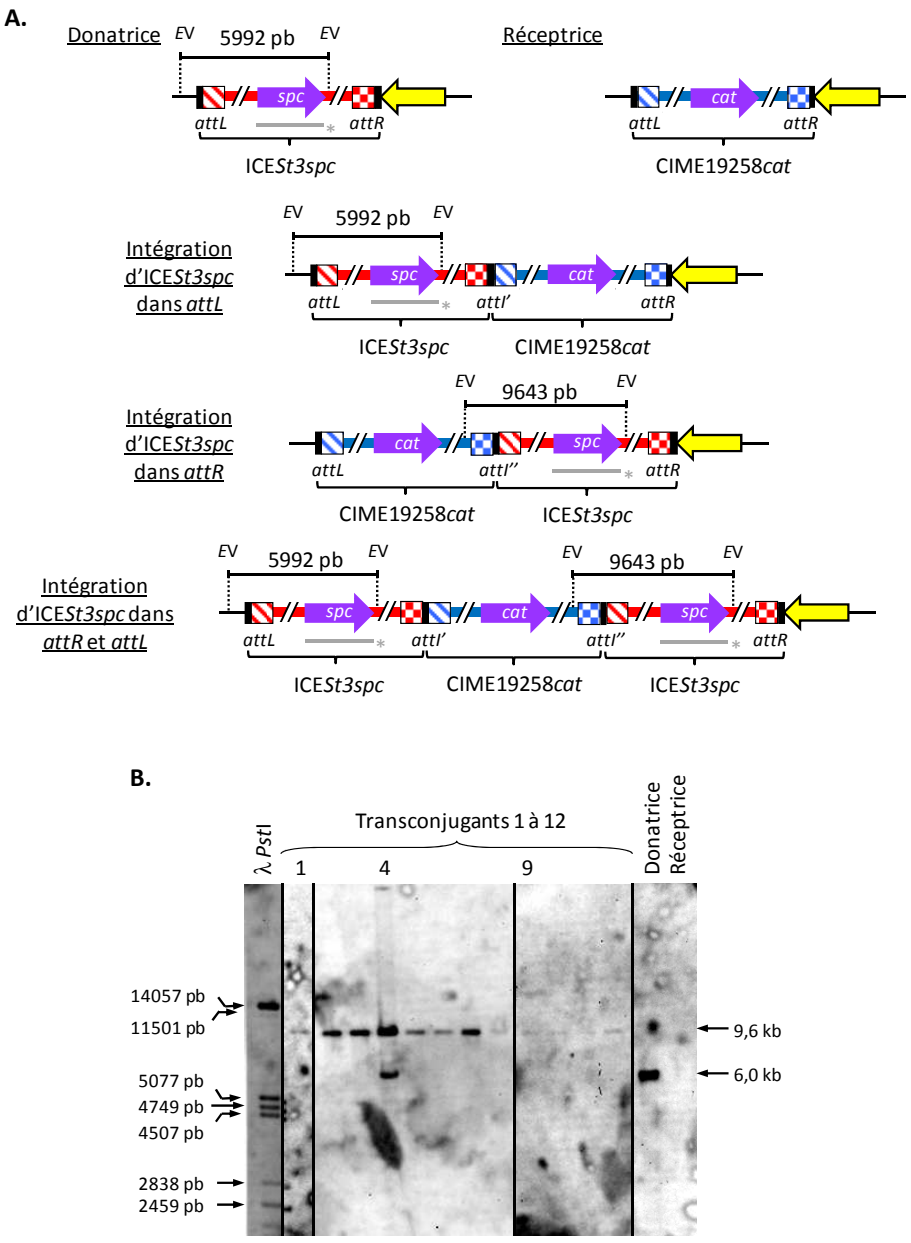
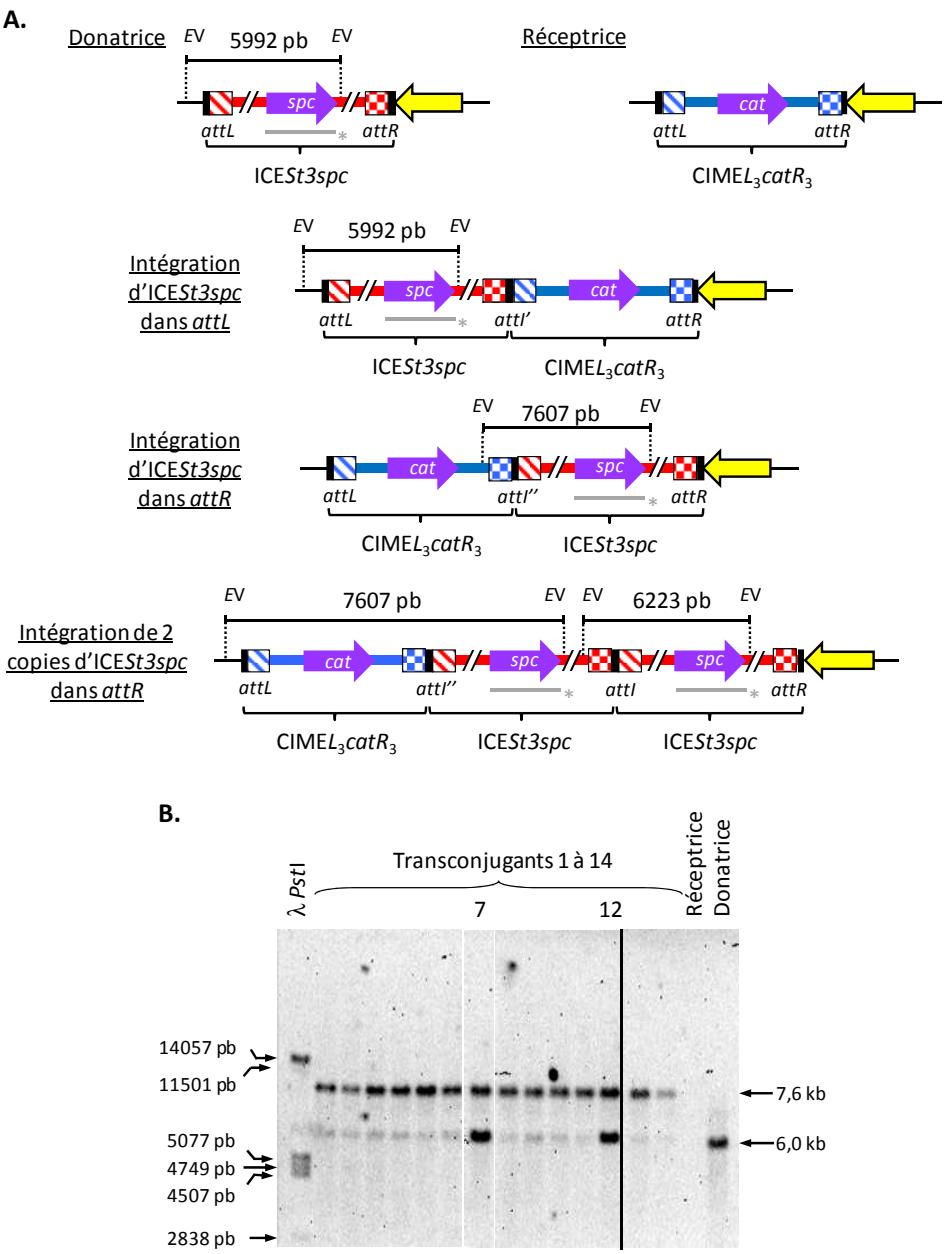


Figure 37 : Détermination du site d'intégration d'ICE*St3spc* chez les transconjugants de *S. thermophilus* ATCC 19258 CIME19258*cat* par hybridation ADN-ADN.

(A.) Représentation schématique des structures présentes chez la souche donatrice CNRZ385 ICE*St3spc*, la souche ATCC 19258 CIME19258*cat* et les transconjugants dans lesquels ICE*St3spc* s'est intégré dans les sites *attL* et/ou *attR* de CIME19258*cat*. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Les séquences délimitées par des pointillés correspondent aux fragments de restriction *Eco*RV (*EV*) révélés par la sonde *spc* dont la zone de recouvrement est symbolisée par les traits gris épais suivis d'un astérisque. Les flèches jaunes représentent le gène *fda*. (B.) Profil d'hybridation de la sonde *spc* sur l'ADN génomique de 12 transconjugants d'ICE*St3spc* digéré par l'enzyme *Eco*RV. La taille des fragments révélés a été déterminée par comigration avec un marqueur de taille. λ *Pst*I : ADN du phage λ digéré par l'enzyme *Pst*I.



<u>Figure 38</u> : Détermination du site d'intégration d'ICE*St3spc* chez les transconjugants de *S. thermophilus* LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$ par hybridation ADN-ADN.

(A.) Représentation schématique des structures présentes chez la souche donatrice CNRZ385 ICE*St3spc*, la souche LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$ et les transconjugants dans lesquels ICE*St3spc* se serait intégré dans les sites *attL* ou *attR* de CIMEL_3*catR*$_3$. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Les séquences délimitées par des pointillés correspondent aux fragments de restriction *Eco*RV (*EV*) révélés par la sonde *spc* dont la zone de recouvrement est symbolisée par les traits gris épais suivis d'un astérisque. Les flèches jaunes représentent le gène *fda*. (B.) profil d'hybridation de la sonde *spc* sur l'ADN génomique de 12 transconjugants d'ICE*St3spc* digéré par l'enzyme *Eco*RV. La taille des fragments révélés a été déterminée par comigration avec un marqueur de taille. λ *Pst*I : ADN du phage λ digéré par l'enzyme *Pst*I.

copies d'ICE*St3* n'a jamais été caractérisé lors des autres études de transconjugants par hybridation. L'obtention du transfert de deux copies d'ICE*St3* chez la totalité des transconjugants analysés dans ce paragraphe paraît donc très peu probable.

L'intensité des signaux relatifs aux fragments de 6,0 kb suggère que la structure en tandem dans laquelle ICE*St3spc* est intégré dans le site *attL* de CIMEL_3catR_3 est importante au sein des populations issues des clones 7 et 12, mais marginale chez les populations issues des autres clones. La présence des fragments de 7,6 et 6,0 kb issus de l'intégration d'ICE*St3spc* dans les deux sites d'attachement du CIME chez tous les clones suggère que les éléments formant le tandem initial subissent des événements d'intégration et d'excision successifs générant une population hétérogène de cellules possédant différentes structures.

ICE*St3spc *s'intègre en tandem avec CIME*L3catR$_3$. *L'ICE est intégré dans le site* attR *du CIME chez tous les transconjugants analysés. De plus, les données obtenues suggèrent que les structures en tandem obtenues sont dynamiques. Ainsi, les éléments composant les tandems subiraient des événements d'intégration et d'excision successifs générant un mélange de populations.

4.2.2.3 TANDEMS ICE*ST3*-CIME9

S. thermophilus CNRZ385 ICE*St3cat* et LMD-9 pMG36e ont été respectivement utilisées comme donatrice et réceptrice lors d'expériences de conjugaison visant à étudier l'accrétion d'ICE*St3cat* et de CIME9. Les transconjugants putatifs résistants à l'érythromycine et au chloramphénicol ont été obtenus à une fréquence de $1,4 \times 10^{-6} \pm 1,0 \times 10^{-6}$. La nature de 10 de ces clones purifiés a été vérifiée par PCR. L'amplification d'un fragment interne à ICE*St3cat* et de la région centrale du gène *cse* ont confirmé que ces clones possèdent l'ICE et qu'ils dérivent de la réceptrice, et donc que ce sont des transconjugants (Figure 39).

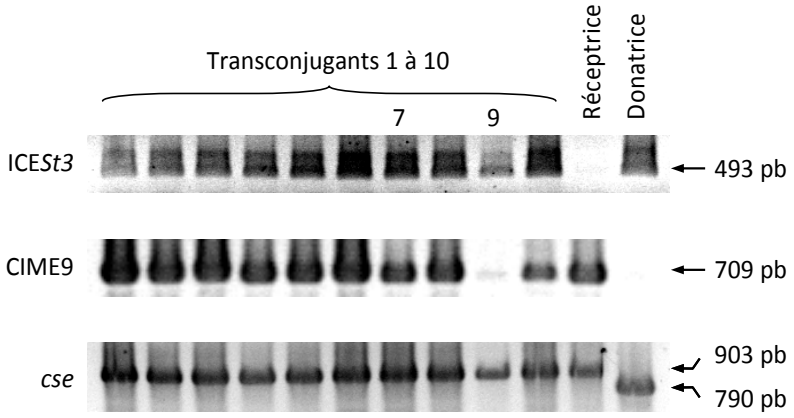
Cependant, si l'amplification d'un fragment interne à CIME9 a montré que cet élément est présent chez 9 des transconjugants, le signal obtenu pour le clone 9 est de très faible intensité par comparaison aux autres clones testés (Figure 39). Ceci suggère que le CIME puisse être absent ou que la majorité des descendants issus du clone 9 ait perdu cet élément.

Le site d'intégration de l'ICE a été déterminé par hybridation ADN-ADN chez ces 10 transconjugants. La sonde spécifique du gène *cat* a été utilisée lors de cette étude. Chez ces transconjugants, l'intégration site-spécifique d'ICE*St3cat* dans les sites *attL* ou *attB* flanquant CIME9 aboutira à l'obtention de structures en tandem Figure 40A). La sonde *cat* a permis de révéler chez 8 des transconjugants (clones 1 à 6, 8 et 10) un fragment de 6,0 kb correspondant à l'intégration d'ICE*St3cat* dans le site *attB* de CIME9 (Figure 40B). De plus, un

fragment de 6,4 kb pouvant résulter de l'intégration d'ICE*St3cat* dans le site *attL* du CIME a été révélé pour les clones 7 et 9.

La perte de CIME9 chez le clone 9 conduirait également à l'obtention d'un fragment de 6,4 kb (Figure 40A). Cette hybridation ne permet pas de trancher sur la présence du CIME chez ce transconjugant.

L'accrétion d'ICE*St3cat *et de CIME9 a été obtenue. L'ICE s'intègre préférentiellement dans le site* attB *du CIME9. De plus, un transconjugant ayant perdu CIME9 suite à l'acquisition d'ICE*St3cat *a probablement été isolé.



<u>Figure 39</u> : Caractérisation de transconjugants d'ICE*St3cat* vers LMD-9 pMG36e

Les souches *S. thermophilus* CNRZ385 ICE*St3cat* et LMD-9 pMG36e ont respectivement été utilisées comme donatrice et réceptrice.
ICE*St3* : amplification d'un fragment du module de régulation d'ICE*St3* ; CIME9 : amplification d'un fragment interne à CIME9 ; *cse* : amplification de la région centrale du gène *cse*.
La taille des produits de PCR, déduite des analyses de séquences, a été confirmée par comigration avec un marqueur de taille.

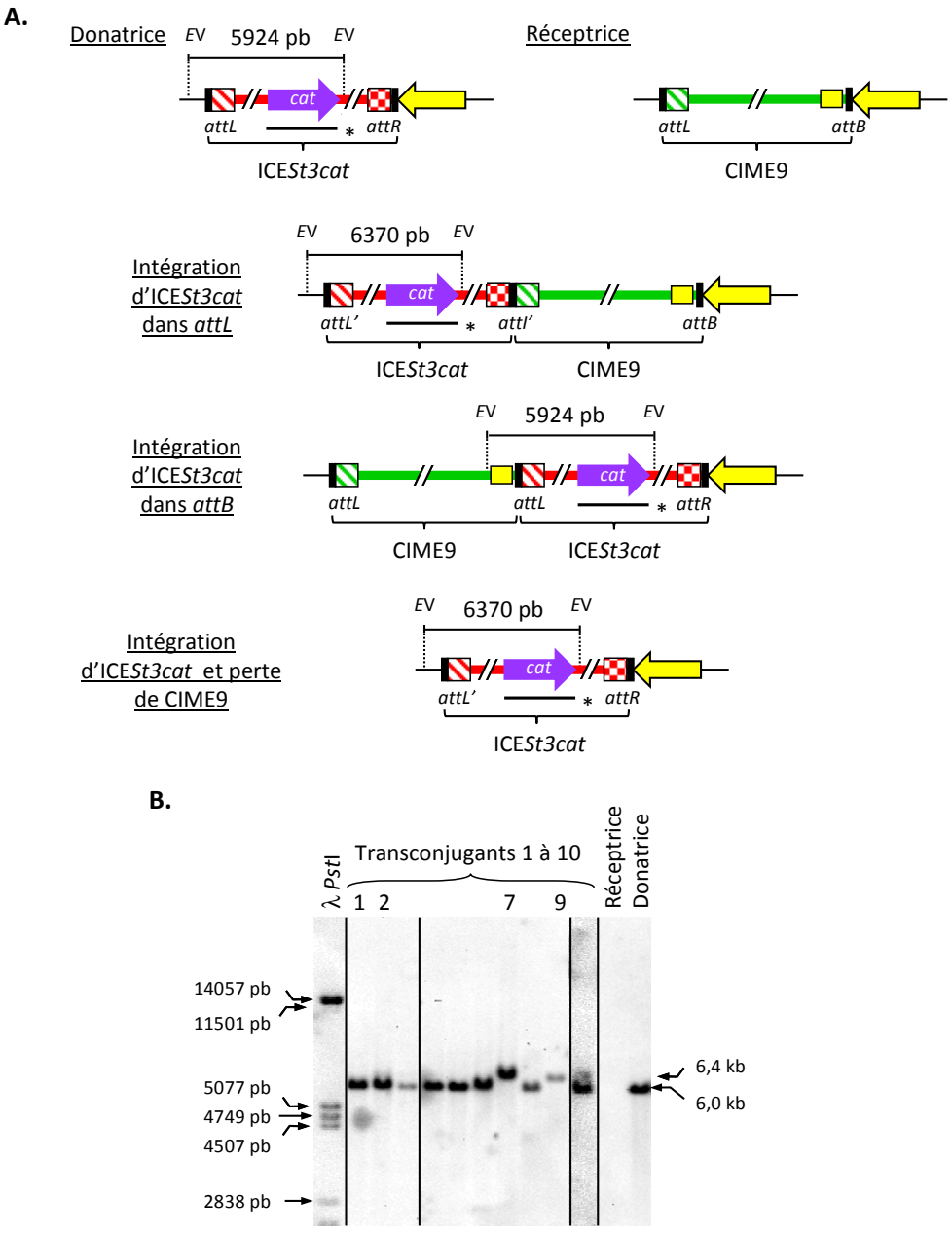


Figure 40 : Détermination du site d'intégration d'ICE*St3cat* chez les transconjugants de *S. thermophilus* LMD-9 pMG36e par hybridation ADN-ADN.

(A.) Représentation schématique des structures présentes chez la souche donatrice CNRZ385 ICE*St3cat*, la souche LMD-9 pMG36e et les transconjugants dans lesquels ICE*St3cat* se serait intégré dans les sites *attL* ou *attB* de CIME9. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Les séquences délimitées par des pointillés correspondent aux fragments de restriction *Eco*RV (*EV*) révélés par la sonde *cat* dont la zone de recouvrement est symbolisée par les traits gris épais suivis d'un astérisque. Les flèches et rectangles jaunes représentent respectivement le gène *fda* et ΔIS*1195L*. (B.) Profil d'hybridation de la sonde *spc* sur l'ADN génomique de 10 transconjugants d'ICE*St3cat* digéré par l'enzyme *Eco*RV. La taille des fragments révélés a été déterminée par comigration avec un marqueur de taille. λ *Pst*I : ADN du phage λ digéré par l'enzyme *Pst*I.

4.3 IMMUNITE DE CONJUGAISON ET DE CIBLE

L'immunité désigne l'ensemble des mécanismes codés par un élément génétique mobile et limitant l'acquisition par la cellule hôte d'un élément apparenté ou d'une seconde copie de cet élément. Les ICE et les CIME naturels et artificiels de *S. thermophilus* ne portent pas d'ORF dont les homologues soient impliqués dans des systèmes d'immunité de type plasmidique tels qu'une exclusion de surface ou une exclusion d'entrée. Ainsi, seuls les gènes de régulation portés par ces éléments sont potentiellement impliqués dans des mécanismes d'immunité.

4.3.1 MISE EN EVIDENCE DE DEUX MECANISMES D'IMMUNITE

Des expériences de conjugaisons sur filtre utilisant la donatrice CNRZ385 ICE*St3cat* et les réceptrices isogéniques CNRZ385 pMG36e et CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e ont été réalisées afin de tester l'existence d'une immunité. L'emploi de ces souches permet d'éviter l'effet limitatif éventuel d'un système RM sur la fréquence de transfert. La fréquence de transfert d'ICE*St3cat* vers CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e est de $2,6 \times 10^{-6} \pm 0,7 \times 10^{-6}$ tandis que cet élément se transfère à une fréquence environ 70 fois plus faible lorsque que la souche réceptrice possède une copie résidente d'ICE*St3* (Tableau 3). La présence d'ICE*St3* chez une souche réduit donc la capacité de celle-ci à acquérir une seconde copie de l'élément. ICE*St3* confère donc une immunité envers lui-même.

Les souches LMG18311, LMG18311 CIMEL_3catR_3 et LMG18311 ICE*St3cat* portant le plasmide pMG36e ont ensuite été utilisées comme réceptrice afin de déterminer l'origine de cette immunité (Tableau 2). Alors que la fréquence de transfert d'ICE*St3* de CNRZ385 ICE*St3spc* vers LMG18311 pMG36e est de $8,4 \times 10^{-6} \pm 3,0 \times 10^{-6}$, cet élément se transfère à une fréquence environ 8 fois plus faible lorsque le site *attB* est occupé par CIMEL_3catR_3 (Tableau 3). Cet élément est donc responsable d'une immunité bien qu'il ne porte aucun autre gène que le gène *cat*. Les résultats présentés dans le paragraphe B.4.2.2.2 montrent qu'ICE*St3cat* s'intègre dans le site *attR* ou le site *attL* flanquant le CIME. L'ensemble de ces données suggère donc que l'efficacité d'intégration d'ICE*St3cat* dans les sites *attR* et le site *attL* flanquant CIMEL_3catR_3 est inférieure à son efficacité d'intégration dans un site *attB*. Le transposon Tn*7* code un mécanisme empêchant l'insertion d'une seconde copie de cet élément à proximité de son propre site d'insertion (Arciszewska *et al.*, 1989). En effet, la fixation de la sous-unité de la transposase de Tn7 TnsB aux extrémités de l'élément empêche la fixation de la protéine TnsC qui est indispensable à la transposition (Stellwagen and Craig, 1997a). Ce phénomène a été nommé immunité de cible. Ainsi, par analogie avec le

mécanisme décrit chez Tn7, la diminution de la fréquence de transfert d'ICE*St3* vers une cellule dont le site *attB* est occupé par CIMEL_3catR_3 a été nommée immunité de cible.

De plus, la fréquence de transfert d'ICE*St3spc* vers LMG18311 ICE*St3cat* pMG36e est respectivement 12 et 100 fois plus faible que la fréquence de transfert de cet élément vers LMG18311 CIMEL_3catR_3 pMG36e et LMG18311 pMG36e (Tableau 3). CIMEL_3catR_3 et ICE*St3cat* étant flanqués des mêmes sites d'attachement, la présence de ces deux éléments conduit donc très probablement à une immunité de cible identique. La réduction plus importante de la fréquence de transfert d'ICE*St3* vers la souche portant déjà une copie de l'ICE suggère très fortement que celui-ci code un (des) gène(s) responsable(s) d'une immunité de surconjugaison que l'on peut différencier du phénomène d'immunité de cible.

La présence de CIME*$\mathbf{L_3catR_3}$ *chez la souche réceptrice entraîne une immunité de cible. Ce résultat suggère fortement que les autres éléments flanqués de sites* attR *et* attL, *dans lesquels un ICE viendrait s'intégrer, pourraient être à l'origine d'un phénomène d'immunité de cible similaire. C'est la première démonstration d'une immunité de cible associée au transfert conjugatif d'un ICE.

De plus, ICE*St3 *porte très probablement un (des) gène(s) responsable(s) d'une immunité de conjugaison dont l'action s'additionne à l'immunité de cible.

<u>Tableau 3</u> : Mise en évidence des phénomènes d'immunités de cible et de conjugaison

Donatrice	Réceptrice *	Fréquence de transfert d'ICE*St3* †
CNRZ385 ICE*St3cat*	CNRZ385 ΔICE*St3*	$2,6 \times 10^{-6} \pm 0,7 \times 10^{-6}$
	CNRZ385	$3,6 \times 10^{-8} \pm 0,7 \times 10^{-8}$
CNRZ385 ICE*St3spc*	LMG18311	$8,4 \times 10^{-6} \pm 3,0 \times 10^{-6}$
	LMG18311 CIMEL_3catR_3	$1,0 \times 10^{-6} \pm 0,3 \times 10^{-6}$
	LMG18311 ICE*St3cat*	$8,7 \times 10^{-8} \pm 2,9 \times 10^{-8}$

* : Toutes les réceptrices contiennent le plasmide pMG36e dont le gène *ermB* confère une résistance à l'érythromycine.

† : Les fréquences indiquées sont la moyenne des UFC de transconjugants/UFC de la souche donatrice ± l'erreur standard à la moyenne calculées sur au moins 9 filtres.

4.3.2 CIME19258, CIME9 ET IMMUNITE DE CIBLE

L'introduction par électroporation du plasmide pNST269+ (*ermB*) exprimant les gènes de l'excisionase et de l'intégrase dans les souches *S. thermophilus* ATCC 19258 et LMD-9 conduit à l'excision du CIME porté par chacune de ces souches (§ B.4.1.4). La culture de transformants dérivant de ces deux souches pendant environ 100 générations en présence d'érythromycine a permis l'isolement de clones ayant perdu le CIME. La culture de ces clones délétés de leur CIME pendant environ 100 générations supplémentaires en absence d'érythromycine a permis l'isolement de clones ayant perdu le plasmide. Ainsi, les souches ATCC 19258 ΔCIME19258 et LMD-9 ΔCIME9 ont été obtenues. Le seul clone obtenu de la souche ATCC 19258 ΔCIME19258 croît sensiblement moins vite que la souche sauvage ATCC 19258. Cette différence de croissance est due soit à la perte du CIME, soit à l'apparition d'une (de) mutation(s) pendant les 200 générations nécessaires à l'obtention de la souche délétée.

Les souches portant CIME19258 et CIME9 et les souches délétées en dérivant ont été utilisées pour étudier l'éventuelle immunité de cible conférée par ces éléments. Du fait de la différence de croissance entre les souches réceptrices ATCC 19258 ΔCIME19258 et ATCC 19258, les fréquences de conjugaison d'ICE*St3* sont exprimées dans ce paragraphe B.4.3.2 en nombre de transconjugant/réceptrice.

Les fréquences de transfert d'ICE*St3spc* vers les souches LMD-9 pMG36e et LMD-9 ΔCIME9 pMG36e, toutes deux proches de $1{,}6 \times 10^{-6}$, ne sont pas statistiquement différentes (Tableau 4). L'élément CIME9, flanqué d'un site *attL* et d'un site *attB*, ne confère donc aucune immunité de cible envers ICE*St3*. Par opposition, la fréquence de transfert d'ICE*St3spc* vers la souche ATCC 19258 ΔCIME19258 pMG36e, $5{,}8 \times 10^{-7} \pm 2{,}7 \times 10^{-7}$, est environ 6 fois plus élevée que vers la souche ATCC 19258 pMG36e (Tableau 4). Ainsi, bien que les sites *attR* et *attL* flanquant CIME19258 soient différents de ceux flanquant ICE*St3* et CIMEL_3catR_3, ce CIME qui ne porte pas de gène de régulation fonctionnel confère une immunité de cible envers ICE*St3*.

Les CIME flanqués de sites* attR *et* attL*, CIME*L_3catR$_3$ *et CIME19258, confèrent donc, contrairement à CIME9, bordé d'un site* attL *et d'un site* attB*, une immunité de cible envers ICE*St3*.

Tableau 4 : Etude de l'immunité de cible éventuelle conférée par CIME19258 et CIME9

Réceptrice *	Fréquence de transfert d'ICE*St3* †	Rapport ‡
LMG18311 CIMEL_3*cat*R_3	$2,8 \times 10^{-5} \pm 1,9 \times 10^{-5}$	7,9
LMG18311	$2,2 \times 10^{-4} \pm 1,0 \times 10^{-4}$	
LMD-9	$1,4 \times 10^{-6} \pm 1,0 \times 10^{-6}$	-
LMD-9 ΔCIME9	$1,8 \times 10^{-6} \pm 0,6 \times 10^{-6}$	
ATCC 19258	$9,5 \times 10^{-8} \pm 4,7 \times 10^{-8}$	6,1
ATCC 19258 ΔCIME19258	$5,8 \times 10^{-7} \pm 2,7 \times 10^{-7}$	

* : Toutes les réceptrices contiennent le plasmide pMG36e dont le gène *ermB* confère une résistance à l'érythromycine.
† : Les fréquences sont exprimées par la moyenne des UFC de transconjugants/UFC de la souche réceptrice ± l'erreur standard à la moyenne calculées sur 4 à 12 filtres.
‡ : les fréquences de transfert d'ICE*St3* vers LMD-9 et LMD-9 ΔCIME9 n'étant pas statistiquement différentes, leur rapport n'a pas été calculé.

4.3.3 IMMUNITE DE SURCONJUGAISON CODEE PAR ICE*ST1*

Les souches isogéniques *S. thermophilus* CNRZ368 pMG36e et CNRZ368 ΔICE*St1* pMG36e ont été utilisées comme réceptrices afin de déterminer si ICE*St1* confère une immunité envers ICE*St3cat*. Cet élément a été transféré à partir de la souche A054 ICE*St3cat* pour s'affranchir du système RM putatif limitant le transfert à partir de CNRZ385. Les fréquences de transfert d'ICE*St3cat* vers CNRZ368 pMG36e et CNRZ368 ΔICE*St1* pMG36e sont respectivement de $9,3 \times 10^{-7} \pm 2,7 \times 10^{-7}$ et $5,0 \times 10^{-5} \pm 1,5 \times 10^{-5}$ transconjugant/donatrice. La fréquence de transfert de l'ICE est donc environ 50 fois plus faible lorsque qu'ICE*St1* est présent. Cette diminution de fréquence de transfert pouvait être due à plusieurs facteurs : une immunité de cible, une immunité de conjugaison codée par ICE*St1* et l'action du système RM *Sth*368I codé par cet ICE.

Une nouvelle souche réceptrice, CNRZ368 Δ*arp1* pMG36e, a été utilisée pour déterminer si *arp1* est responsable d'une immunité. La fréquence de transfert d'ICE*St3cat* vers cette souche est de $2,4 \times 10^{-6} \pm 1,0 \times 10^{-6}$. La présence du gène *arp1* chez la souche CNRZ368 pMG36e provoque donc, par rapport à la souche CNRZ368 Δ*arp1* pMG36e, une diminution de la fréquence de transfert d'ICE*St3cat* d'un facteur 2,5 ($2,4 \times 10^{-6}/9,3 \times 10^{-7} = 2,5$).

***Le gène* arp1 *d'ICE*St1 *est impliqué dans une faible immunité de conjugaison envers ICE*St3cat.**

4.4 DYNAMIQUE DES TANDEMS ICE*St3*-CIME

La dynamique des tandems constitués d'ICE*St3* et CIME19258c*a*t, CIMEL_3catR_3 ou CIME9 a été étudiée par amplification des différents sites d'attachement portés par les formes intégrées ou circulaires de ces éléments. Des lettres (A, B) et des chiffres (1, 2) sont respectivement utilisés pour discriminer les sites d'attachement d'ICE*St3* et des CIME.

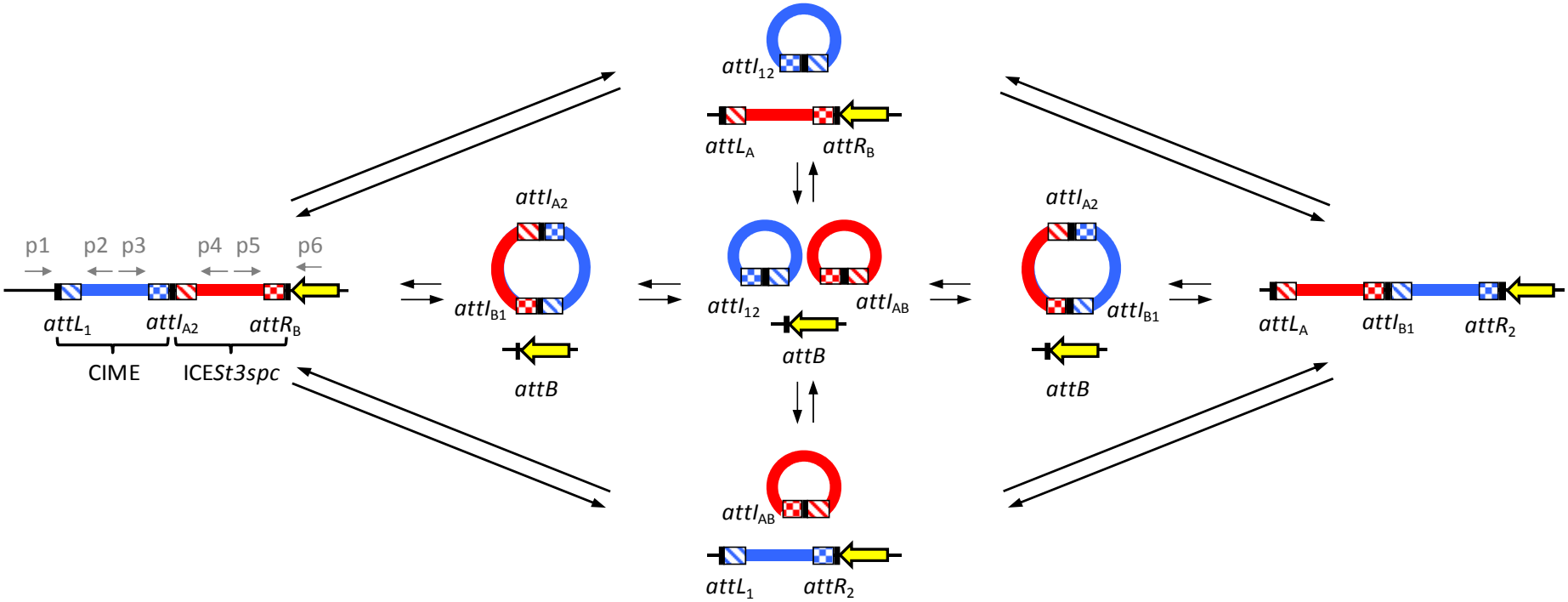
4.4.1 DYNAMIQUE DES TANDEMS CIME19258*CAT*-ICE*ST3SPC*

L'étude par hybridation ADN-ADN des clones 1 et 9 présentés dans le paragraphe 4.2.2.1 a montré que ceux-ci sont des transconjugants dérivant de la souche ATCC 19258 CIME19258*cat* dans lesquels ICE*St3spc* s'est intégré dans le site *attR* du CIME. La dynamique des structures en tandem portées par ces deux clones a été étudiée par PCR. Les amorces utilisées pour ces amplifications s'hybrident de part et d'autre des différents sites d'attachement dont la présence a été recherchée (Figure 17).

Les fragments portant les sites $attL_1$, $attI_{A2}$ et $attR_B$ retrouvés dans la structure en tandem CIME19258*cat*/ICE*St3spc*/*fda* caractérisée lors de l'hybridation ont été amplifiés à partir de l'ADN de ces deux transconjugants (Figures 41 et 42). Néanmoins, les fragments portant les sites $attL_A$, $attI_{B1}$ et $attR_2$ retrouvés dans la seconde structure en tandem, ICE*St3spc*/CIME19258*cat*/*fda*, ont été également amplifiés (Figures 41 et 42). Les sites $attI_{A2}$ et $attI_{B1}$, caractéristiques de la formation des tandems formés d'ICE*St3spc* et de CIME19258*cat* ne sont amplifiés que chez les transconjugants (Figure 41). De plus, le site *attB* ainsi que les sites $attI_{AB}$ et $attI_{12}$ respectivement caractéristiques des formes circulaires d'ICE*St3spc* et de CIME19258*cat* ont été détectés. L'amplification du site $attI_{12}$ caractéristique de la forme circulaire de CIME19258*cat* n'a pu être obtenue qu'avec une amplification par PCR nichée.

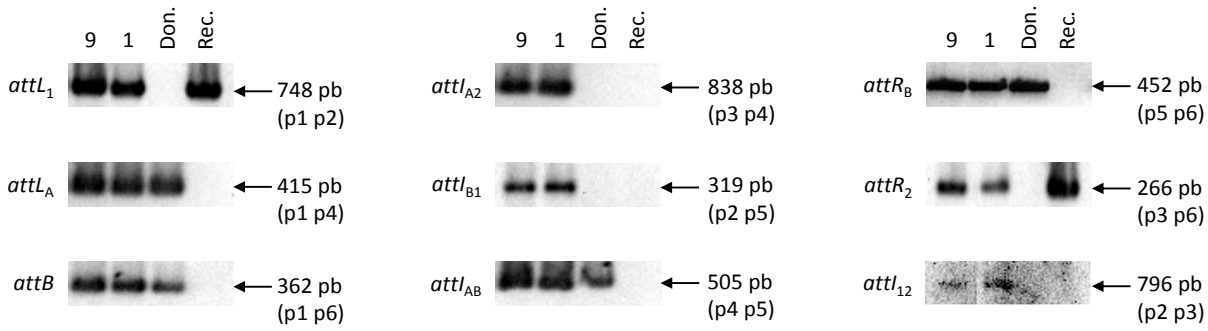
Ces amplifications montrent que la présence d'ICE*St3spc *chez les deux clones d'ATCC 19258 ICE*St3spc *CIME19258*cat *analysés conduit à l'excision de CIME19258*cat*. Les tandems formés d'ICE*St3spc *et de CIME19258*cat *sont donc des structures dynamiques.

Chacun des sites d'attachement détectés étant potentiellement présent dans deux structures différentes, il n'est pas possible de déterminer si toutes les structures représentées dans la figure 37 existent réellement. Néanmoins, les tandems formés d'ICE*St3spc *et de CIME19258*cat *s'excisent probablement sous la forme d'une unique molécule circulaire portant les sites* attI$_{B1}$ *et* attI$_{A2}$*.



<u>Figure 41</u> : Représentation schématique de la dynamique des tandems constitués d'ICE*St3spc* et de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ ou CIME19258*cat*.

ICE*St3spc* et le CIME (CIME19258*cat* ou CIME*L*$_3$*catR*$_3$) sont respectivement représentés par un rectangle rouge et un rectangle bleu. Le gène *fda* est représenté par une flèche jaune. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Des lettres (A, B) et des chiffres (1, 2) sont respectivement utilisés pour discriminer les sites d'attachement d'ICE*St3spc* et du CIME. Les noms des sites *attI* résultant de l'accrétion de ces deux éléments reflètent l'origine de leurs deux bras. Le tandem représenté à gauche est la structure majoritaire détectée par hybridation (Figures 37 et 38). Les flèches grises nommées p1 à p6 représentent les amorces utilisées pour la détection des différents sites d'attachement.



<u>Figure 42</u> : Amplification des différents sites d'attachement traduisant la dynamique des tandems ICE*St3spc*-CIME19258*cat*.

Des fragments portant les sites d'attachement prédits dans la figure 41 dans le cadre d'une dynamique des tandems constitués d'ICE*St3spc* et de CIME19258*cat* ont été amplifiés par PCR. La formation du site *attI*$_{12}$ n'a été détectée que par PCR nichée. Les pistes 1 et 9 correspondent respectivement aux transconjugants d'ICE*St3spc* dérivant de la souche ATCC 19258 CIME19258*cat* étudiés dans les pistes 1 et 9 de la figure 40. Les pistes Don. et Rec. correspondent respectivement aux souches donatrice (CNRZ385 ICE*St3spc*) et réceptrice (ATCC 19258 CIME19258*cat*). Les amorces utilisées pour chaque PCR sont indiquées entre parenthèses. La position de ces amorces est représentée dans la figure 41. La taille des produits de PCR, déduite des analyses de séquences, a été confirmée par comigration avec un marqueur de taille.

4.4.2 Dynamique des tandems ICE*St3spc*-CIME*L*$_3$*catR*$_3$

Les résultats de l'étude de dynamique des tandems constitués d'ICE*St3spc* et CIME*L*$_3$*catR*$_3$ sont présentés de manière exhaustive dans l'article 3 et ne sont pas détaillés dans ce paragraphe. Sommairement, des fragments portant les sites *attL*$_1$, *attI*$_{A2}$ et *attR*$_B$ correspondant à l'intégration d'ICE*St3spc* dans le site *attR*$_2$ de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ ont été amplifiés par PCR (Figure 41). La détection de ces sites est en accord avec les résultats de l'hybridation présentée dans le paragraphe B.4.2.2.3. Des fragments portant les sites *attL*$_A$, *attI*$_{A1}$ et *attR*$_2$ pouvant correspondre à l'intégration d'ICE*St3spc* dans le site *attL*$_1$ de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ ont également été amplifiés (Figure 41). Ce second type de structure en tandem peut donc exister au sein de la population issue d'un transconjugant d'ICE*St3spc* vers LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$. La formation du site *attI*$_{AB}$, caractéristique de la forme circulaire d'ICE*St3spc*, et celle du site *attB* ont également été détectées (Figure 41). La formation du site *attI*$_{12}$ caractéristique de la forme circulaire de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ n'a pas été observée par PCR classique. Cependant, la formation de ce site n'avait déjà pas été détectée après l'introduction du plasmide pNST269+ dans la souche LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ alors que l'amplification du site *attB* avait démontré que le CIME s'excise (§ B.4.1.4). Ceci suggère fortement que la forme circulaire de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ puisse être produite à partir des tandems CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* mais ne pas être détectée.

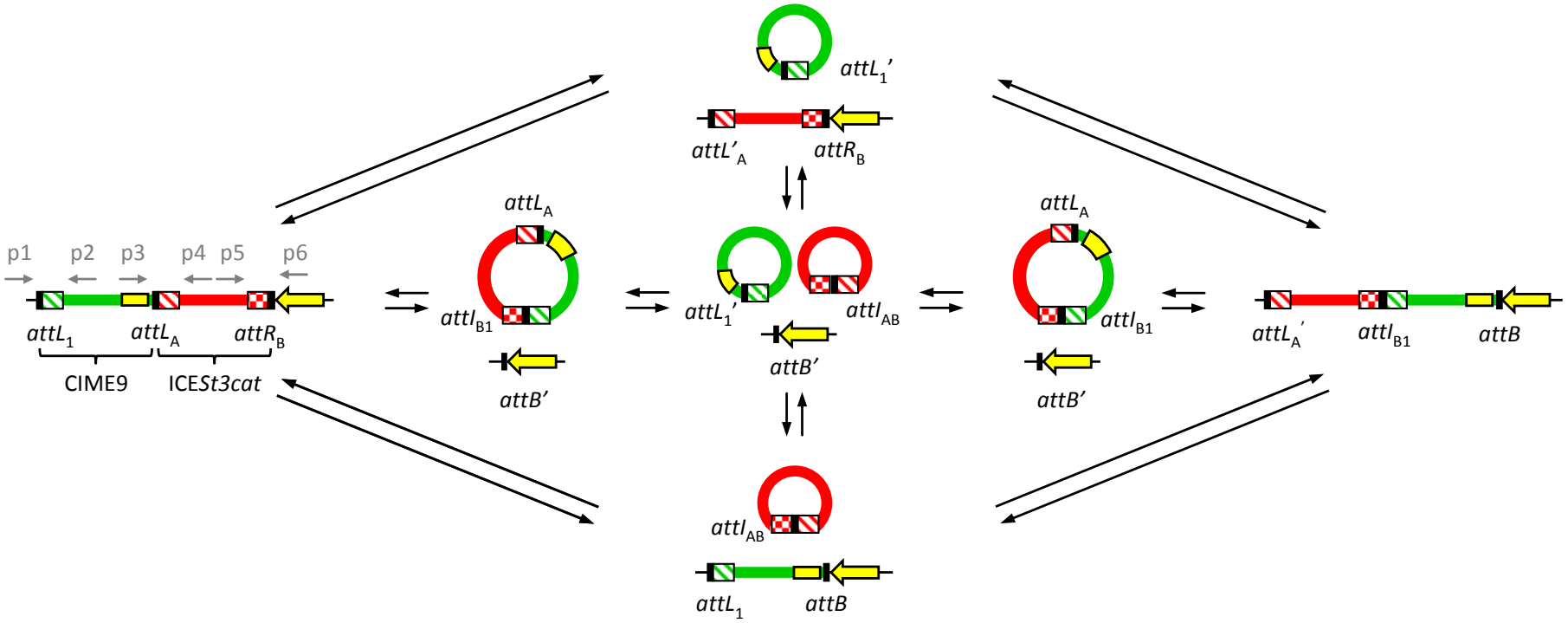
***Ces amplifications montrent clairement que les structures en tandem portés par les différents clones isolés de la souche LMG18311 ICE*St3spc *CIME*L_3catR$_3$ *sont dynamiques et suggèrent fortement que CIME*L_3catR$_3$ *s'excise grâce à la présence d'ICE*St3spc*. Comme avec CIME19258*cat*, chacun des sites d'attachement détectés étant potentiellement présent dans des structures différentes, il n'est pas possible de déterminer si toutes les structures représentées dans la figure 41 existent réellement. Néanmoins, les tandems formés d'ICE*St3spc *et de CIME*L_3catR$_3$ *s'excisent également probablement sous la forme d'une unique molécule circulaire portant les sites* attI$_{B1}$ *et* attI$_{A2}$.**

4.4.2 Dynamique des tandems ICE*St3cat*-CIME9

La dynamique des éléments portés par 4 transconjugants d'ICE*St3cat* dérivant de LMD-9 pMG36e (clones 1,2 7 et 9 ; § B.4.2.2.3) a été étudiée par PCR. Les transconjugants 1 et 2 présentent une structure CIME9/ICE*St3cat*/*fda*, tandis que le clone 7 porte un tandem ICE*St3cat*/CIME9/*fda* (Figures 39 et 40). Le clone 9 contient quant à lui, soit une structure en tandem identique au clone 7, soit seulement l'ICE (Figures 39 et 40).

Les analyses menées sur l'ADN des clones 1 et 2 ont permis l'amplification des sites *attL*$_1$, *attL*$_A$ et *attR*$_B$ présent dans la structure CIME9/ICE*St3cat*/*fda* (Figures 43 et 44). Les sites *attL*$_A$', *attI*$_{B1}$ et *attB* retrouvés dans la structure ICE*St3cat*/CIME9/*fda* ont également été amplifiés (Figures 43 et 44). De plus, la formation des sites *attI*$_{AB}$ et *attL*$_1$' respectivement caractéristiques des formes circulaires d'ICE*St3cat* et de CIME9, ainsi que le site *attB'* ont été détectés (Figures 43 et 44). Par conséquent, tous les sites d'attachement prédits en cas d'une mobilisation de CIME9 par ICE*St3cat* ont été obtenus à partir des clones 1 et 2 portant la structure CIME9/ICE*St3cat*/*fda*. Tous ces sites ont également été détectés chez le clone 7 qui porte un tandem ICE*St3cat*/CIME9/*fda* (Figures 43 et 44).

Par ailleurs, les PCR effectuées sur l'ADN du clone 9 n'ont permis d'obtenir des signaux intenses que pour les sites *attL*$_A$', *attR*$_B$ et *attI*$_{AB}$. Bien que le site vide *attB*' n'ait pas été amplifié, la détection de ces sites correspond à la présence d'ICE*St3cat* s'excisant et s'intégrant chez une souche LMD-9 ayant perdu CIME9. Ces PCR n'ayant été réalisées qu'une fois, l'absence de l'amplification du site *attB*' peut s'expliquer par une erreur expérimentale. Treize nouveaux transconjugants putatifs d'ICE*St3cat* dérivant de LMD-9 pMG36e obtenus lors de 3 expériences indépendantes ont été analysés par PCR. L'amplification de la région centrale du gène *cse* a montré que ces clones dérivent tous de la souche réceptrice (données non montrées). De plus, si tous les clones testés portent ICE*St3cat* et s'il s'agit donc de transconjugants, l'amplification d'un fragment interne à CIME9 n'a pas obtenue pour 5 des 13 clones suggérant que cet élément est absent (données non montrées).



<u>Figure 43</u> : Représentation schématique de la dynamique des tandems constitués d'ICE*St3cat* et de CIME9.

ICE*St3cat* et CIME9 sont respectivement représentés par un rectangle rouge et un rectangle vert. Le gène *fda* et ΔIS*1195L* sont respectivement représentés par une flèche et un rectangle jaunes. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Des lettres (A, B) et le chiffre 1 sont respectivement utilisés pour discriminer les sites d'attachement d'ICE*St3cat* et de CIME9. Les noms des sites *attI* résultant de l'accrétion de ces deux éléments reflètent l'origine de leurs deux bras. Les flèches grises nommées p1 à p6 représentent les amorces utilisées pour la détection des différents sites d'attachement.

***Ces amplifications montrent que la présence d'ICE*St3cat *chez les clones 1, 2 et 7 de LMD-9 ICE*St3cat *pMG36e analysés conduit à l'excision de CIME9. Les deux types de structures en tandems formés d'ICE*St3cat *et de CIME9 sont donc dynamiques. Comme pour les tandems impliquant les autres CIME, il n'est pas possible de déterminer si toutes les structures représentées dans la figure 41 existent. Toutefois, les tandems formés d'ICE*St3cat *et de CIME9 s'excisent probablement sous la forme d'une unique molécule circulaire portant les sites* $attI_{B1}$ *et* $attL_A$.

Par ailleurs, l'étude du clone 9 et de 13 transconjugants issus d'une nouvelle expérience suggère très fortement que l'acquisition d'ICE*St3cat *par LMD-9 pMG36e conduirait fréquemment à la perte de CIME9.

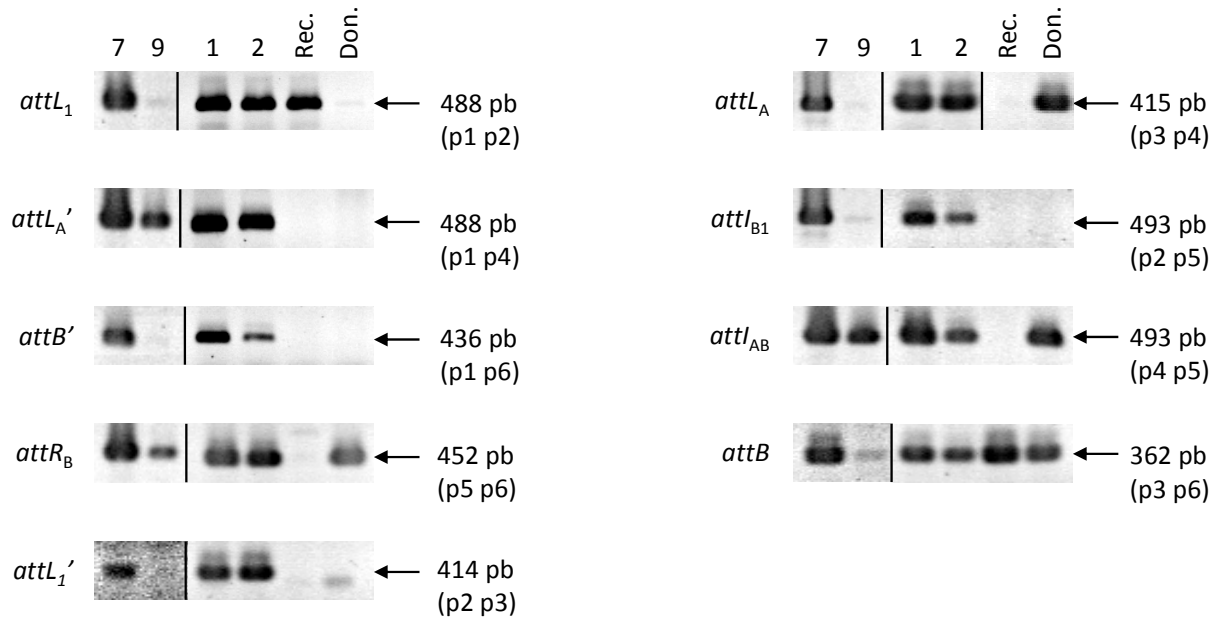


Figure 44 : Amplification par PCR des différents sites d'attachement traduisant la dynamique des tandems constitués d'ICE*St3cat* et de CIME9.

Amplification par PCR de fragments portant les sites d'attachement prédits dans la figure 43. Les pistes 1, 2, 7 et 9 correspondent respectivement aux transconjugants d'ICE*St3spc* dérivant de la souche LMD-9 pMG36e étudiés dans les pistes 1, 2, 7 et 9 de la figure 43. Les pistes Don. et Rec. correspondent respectivement aux souches donatrice (CNRZ385 ICE*St3cat*) et réceptrice (LMD-9 pMG36e). Les amorces utilisées pour chaque PCR sont indiquées entre parenthèses. La position de ces amorces est représentée dans la figure 43. La taille des produits de PCR, déduite des analyses de séquences, a été confirmée par comigration avec un marqueur de taille.

4.5 Stabilité des tandems

L'étude des rares tandems ICE-ICE identifiés dans la littérature montre que ceux-ci sont instables (Ravatn *et al.*, 1998a ; Possoz *et al*., 2001 ; Hochhut *et al*., 2001a). De la même façon, les structures en tandem obtenues chez les transconjugants de *S. thermophilus* pourraient être instables, ce qui limiterait la mobilisation conjugative du CIME par l'ICE. L'analyse des 3 tandems ICE*St3*-CIME a démontré qu'ICE*St3* s'excise à partir de chacune de ces structures. L'excision sous forme circulaire de CIME19258 et de CIME9 a également été montré et celle de CIMEL_3*catR*$_3$ très fortement suggérée à partir des tandems où ils sont présents. ICE*St1* et d'ICE*St3* pourraient également s'exciser à partir des structures en tandem ICE*St3*-ICE*St3* et ICE*St3*-ICE*St1*. Chaque élément excisé pourrait ensuite être perdu par dilution lors des divisions cellulaires. La stabilité des tandems constitués de deux copies d'ICE*St3* ou d'une copie d'ICE*St3* et d'un CIME a été testée par l'étude de la persistance de ces éléments chez les descendants des transconjugants après des cultures prolongées.

4.5.1 Tandems ICE*St3spc*-ICE*St3cat* et ICE*St3spc*-CIMEL_3*catR*$_3$

L'étude de la stabilité des tandems résultant du transfert d'ICE*St3spc* vers des souches réceptrices portant ICE*St3cat* ou CIMEL_3*catR*$_3$ est présentée de manière complète dans l'article 3 et n'est que résumée ici.

Après avoir cultivé pendant environ 100 générations la souche CNRZ385 ICE*St3spc* sans antibiotique, aucun des 250 clones analysés n'était sensible à la spectinomycine montrant qu'ils n'avaient pas perdu l'ICE. Des résultats similaires ont été obtenus après la culture de la souche LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$ en absence de chloramphénicol. Ainsi, dans ces conditions, la fréquence de perte d'ICE*St3spc* et de CIMEL_3*catR*$_3$ est inférieure à 1,0 x 10^{-5} par cellule/par génération.

La culture sans antibiotique de clones portant ICE*St3spc* et ICE*St3cat* intégrés en tandem conduit à la perte d'une des deux copies de cet ICE à une fréquence d'environ 2,0 x 10^{-4} par cellule/par génération. Si la culture est réalisée avec chloramphénicol ou spectinomycine, la copie d'ICE*St3* conférant une résistance envers l'autre antibiotique est perdue à une fréquence similaire.

Par ailleurs, aucun descendant des cellules portant un tandem composé d'ICE*St3spc* et de CIMEL_3*catR*$_3$ ayant perdu sa copie d'ICE*St3* lors des divisions cellulaires n'a été observé, que la culture soit effectuée en présence ou en absence de spectinomycine (fréquence de perte < 1 x 10^{-5} par cellule/par génération). De plus, la culture de ces mêmes cellules en absence de chloramphénicol, aboutit à la perte du CIME à une fréquence proche de 2,0 x 10^{-3} par cellule/par génération.

Chaque élément présent de manière isolé dans une souche est stable. De plus, les descendants des bactéries portant un tandem composé d'ICE*St3spc *et d'ICE*St3cat *ou d'ICE*St3spc *et de CIME*L$_3$catR$_3$ *héritent toujours d'une copie de l'ICE. Au contraire, les bactéries possédant un tandem formé d'ICE*St3spc *et de CIME*L$_3$catR$_3$ *peuvent perdre leur unique copie du CIME. Cette fréquence est environ 10 fois plus élevée que la fréquence de perte d'une deux copies d'ICE*St3 *chez les bactéries possédant un tandem composé d'ICE*St3spc *et d'ICE*St3cat*. L'instabilité des éléments découle donc de leur association en tandem.

4.5.1 Tandems CIME19258*cat*-ICE*St3spc*

Une étude préliminaire de la stabilité des tandems composés de CIME19258*cat* et d'ICE*St3spc* a été effectuée. L'analyse par hybridation du transconjugant purifié n°3 d'ICE*St3spc* vers la souche ATCC 19258 CIME19258*cat* a démontré que celui-ci porte un tandem CIME19258*cat*/ICE*St3spc*/*fda* (§ B.4.2.2.1). Après la culture de ce transconjugant pendant environ 20 générations, 200 colonies isolées ont été répliquées sur des milieux ne contenant pas d'antibiotique, contenant de la spectinomycine ou du chloramphénicol. Aucun des 200 clones analysés n'est sensible à la spectinomycine. ICE*St3spc* est donc présent chez tous les clones, ce qui correspond à une fréquence de perte inférieure à $5{,}0 \times 10^{-5}$ par cellule/par génération. Par contre, en moyenne 81 clones testés sur 210 sont sensibles au chloramphénicol et ont donc probablement été délétés du CIME. Ainsi, la copie de CIME19258*cat* présente chez ce transconjugant est perdue à une fréquence d'environ $2{,}5 \times 10^{-2}$ par cellule/par génération.

***Les descendants du transconjugant portant un tandem composé d'ICE*St3spc *et de CIME19258*cat *héritent également toujours d'une copie de l'ICE. Par contre, le CIME est perdu à une fréquence d'environ 2,5 x 10^{-2} par cellule/par génération. Cette fréquence de perte est environ 10 fois plus élevée que celle de CIME*L$_3$catR$_3$ *lorsqu'il est intégré en tandem avec ICE*St3spc.**

5 Mobilisation conjugative par ICE*St3*

5.1 Cotransfert de deux copies d'ICE*St3*

Un clone dérivant de la souche CNRZ385 et possédant un tandem ICE*St3spc*/ICE*St3cat*/*fda* a été utilisé comme souche donatrice lors d'expériences de conjugaison visant à étudier le cotransfert éventuel des deux copies de l'ICE vers la réceptrice LMG18311 pMG36e (*ermB*). Les gènes *spc*, *cat* et *ermB* confèrent respectivement une résistance à la spectinomycine, au chloramphénicol et à l'érythromycine. Les transconjugants potentiels ont été étalés sur des milieux contentant de l'érythromycine, ainsi que de la spectinomycine, du chloramphénicol ou de la spectinomycine et du chloramphénicol afin de sélectionner les clones dérivant de la souche réceptrice ayant acquis au moins une copie de l'ICE ou les deux copies à la fois. Les fréquences de transfert d'au moins ICE*St3spc*, d'au moins ICE*St3cat* et la fréquence de co-transfert de ces deux ICE ne sont pas statistiquement différentes (Tableau 5).

Chacune des deux copies d'ICE*St3 *formant le tandem présent dans la souche CNRZ385 ICE*St3spc *ICE*St3cat *se transfère à une fréquence similaire. De plus, les deux copies de l'ICE semblent se co-transférer à une fréquence comparable à celle de leur transfert seul.

Tableau 5 : Etude du cotransfert de deux copies d'ICE*St3* de la souche CNRZ385 ICE*St3spc* ICE*St3cat* vers la réceptrice LMG18311 pMG36e.

Elément(s) transféré(s) (marqueurs sélectionnés)	Fréquence de transfert †
au moins ICE*St3spc* (*spc* et *ermB*)	$1,6 \times 10^{-5} \pm 1,0 \times 10^{-5}$
au moins ICE*St3cat* (*cat* et *ermB*)	$5,9 \times 10^{-6} \pm 1,9 \times 10^{-6}$
ICE*St3spc* et ICE*St3cat* (*spc*, *cat* et *ermB*)	$6,9 \times 10^{-6} \pm 4,9 \times 10^{-6}$

† : Les fréquences sont exprimées par la moyenne des UFC de transconjugants/UFC de la souche réceptrice ± l'erreur standard à la moyenne calculées sur 6 filtres.

5.2 Mobilisation de CIME*L*$_3$*catR*$_3$

L'étude de la mobilisation conjugative de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ par ICE*St3spc*, détaillée dans l'article 3, n'est présentée dans ce paragraphe que de façon concise.

5.2.1 Mobilisation conjugative de CIME*L*$_3$*catR*$_3$

Les souches LMG18311 ICE*St3spc* CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e (*ermB*) ont respectivement été utilisées comme donatrice et réceptrice lors d'expériences de conjugaison. Les transconjugants potentiels ont été étalés sur des milieux contentant de l'érythromycine ainsi que de la spectinomycine, du chloramphénicol ou de la spectinomycine et du chloramphénicol afin de sélectionner les clones dérivant de la souche réceptrice ayant acquis respectivement au moins l'ICE, au moins le CIME ou ces deux éléments à la fois. La fréquence de transfert d'au moins ICE*St3spc* et la fréquence de co-transfert de ces deux éléments sont respectivement de $1{,}4 \times 10^{-5} \pm 0{,}3 \times 10^{-5}$ et $2{,}6 \times 10^{-7} \pm 0{,}7 \times 10^{-7}$. Ainsi, le tandem composé de l'ICE et du CIME se transfère effectivement mais à une fréquence 50 fois inférieure à celle d'ICE*St3spc*.

De plus, l'analyse par hybridation des transconjugants ayant acquis les deux éléments suggère que ceux-ci portent tous un tandem dont la structure est CIME*L*$_3$*catR*$_3$/ICE*St3spc*/*fda* (données non montrées). Ces transconjugants ont donc très probablement acquis une molécule circulaire constituée d'ICE*St3spc* et de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ qui se serait intégrée par recombinaison site spécifique entre le site *attI*$_{B1}$ qu'elle porte et le site *attB* chromosomique (Figure 42).

Les transconjugants isolés sur un milieu contenant érythromycine et chloramphénicol et ayant par conséquent acquis au moins CIME*L*$_3$*catR*$_3$ sont obtenus à une fréquence de $3{,}2 \times 10^{-7} \pm 1{,}0 \times 10^{-7}$. L'analyse par PCR et hybridation de 10 de ces transconjugants a montré que 6 d'entre eux possèdent également ICE*St3spc*, mais que les quatre autres en sont dépourvus. Ces 4 clones ont donc uniquement acquis CIME*L*$_3$*catR*$_3$.

La mobilisation conjugative en* cis *de CIME*L$_3$catR$_3$ *par ICE*St3spc *a été obtenue. C'est la première fois que la mobilisation en* cis *d'un CIME par un ICE apparenté est rapportée. De plus, la molécule circulaire formée de CIME*L$_3$catR$_3$ *et d'ICE*St3spc *s'intègre probablement chez les transconjugants grâce à son site* attI$_{B1}$*. Par ailleurs, le transfert du seul CIME*L$_3$catR$_3$ *à partir de la structure en tandem a été caractérisé.

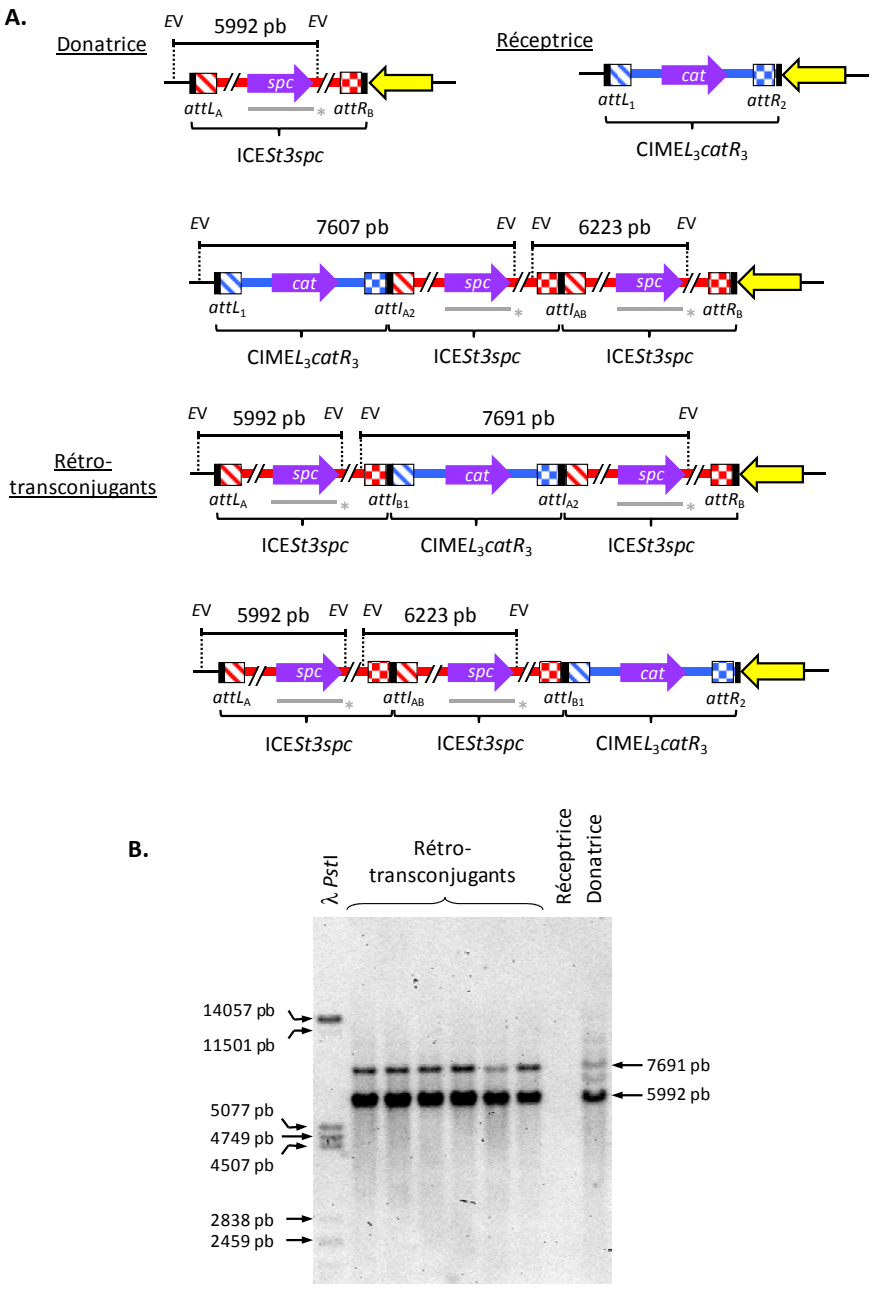
5.2.2 Rétromobilisation de CIME*L*$_3$*catR*$_3$

Les souches CNRZ385 ICE*St3spc* pMG36e (*ermB*) et LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ ont été utilisées respectivement en tant que donatrice et réceptrice afin d'étudier l'éventuelle rétromobilisation de ce CIME par ICE*St3*, c'est-à-dire la capture de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ par la souche porteuse de l'ICE. Les transconjugants d'ICE*St3spc* vers LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ ont été obtenus à une fréquence de 2,7 x 10^{-6} ± 0,7 x 10^{-6} transconjugant/donatrice. Six clones résistant à la spectinomycine, à l'érythromycine et au chloramphénicol ont également été isolés, ce qui correspond à une fréquence de 8,8 x 10^{-10} ± 1,8 x 10^{-10} UFC/donatrice. L'analyse par PCR a montré que les clones trirésistants dérivent de la souche donatrice et possèdent CIME*L*$_3$*catR*$_3$. De plus, le remplacement de la souche donatrice CNRZ385 ICE*St3spc* pMG36e par la souche isogénique délétée de l'ICE, CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e, ne permet pas d'isoler de clones résistants à l'érythromycine et au chloramphénicol. La présence d'ICE*St3spc* chez la souche donatrice est donc nécessaire pour que celle-ci acquière CIME*L*$_3$*catR*$_3$. Ceci suggère que l'ICE se transférerait tout d'abord vers la souche réceptrice LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ où il s'intègrerait en tandem avec le CIME. La structure en tandem ainsi formée s'exciserait du chromosome de ce transconjugant pour se transférer vers une cellule donatrice.

Pour vérifier cette hypothèse, les 6 clones trirésistants ont été analysés par hybridation. L'acquisition par une cellule donatrice d'un tandem formé d'ICE*St3spc* et de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ en provenance d'un transconjugant devrait aboutir à la présence de deux copies de l'ICE chez les clones tri-résistants. Les structures potentielles attendues sont représentées dans la figure 45A. La révélation, par la sonde spécifique du gène *spc*, de deux fragments de 6,0 et 7,7 kb pour chacun des clones analysés suggère que ceux-ci possèdent un tandem dont la structure est ICE*St3spc*/CIME*L*$_3$*catR*$_3$/ICE*St3spc*/*fda* (Figure 45 A et B). Ces clones sont donc des rétrotransconjugants ayant très probablement acquis un tandem formé d'ICE*St3spc* et de CIME*L*$_3$*catR*$_3$.

Dans les événements de rétromobilisation, ce sont les transconjugants qui jouent le rôle de donatrice. C'est pourquoi, il paraît plus judicieux d'exprimer la fréquence d'obtention des rétrotransconjugants par la valeur de 4,8 x 10^{-4} ± 1,0 x 10^{-4} UFC/transconjugant.

La présence d'ICE*St3spc *chez la souche donatrice peut entraîner la rétromobilisation ou la capture de CIME*L$_3$catR$_3$*. Ce travail rapporte l'un des rares événements de rétromobilisation décrit chez les bactéries Gram positives et le premier cas de rétromobilisation provoqué par un ICE.



<u>Figure 45</u> : Etude des rétrotransconjugants de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ dérivant de la souche CNRZ385 ICE*St3spc* pMG36e par hybridation ADN-ADN.

(A.) Représentation schématique des structures présentes chez la souche donatrice CNRZ385 ICE*St3spc* pMG36e, la souche réceptrice LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et les rétrotransconjugants possibles. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences de 27 pb ou séquences homologues ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Les séquences délimitées par des pointillés correspondent aux fragments de restriction *Eco*RV (*E*V) révélés par la sonde *spc* dont la zone de recouvrement est symbolisée par les traits gris épais suivis d'un astérisque. Les flèches jaunes représentent le gène *fda*. (B.) Profil d'hybridation de la sonde *spc* sur l'ADN génomique des 6 rétrotransconjugants digéré par l'enzyme *Eco*RV. La taille des fragments révélés a été déterminée par comigration avec un marqueur de taille. λ *Pst*I : ADN du phage λ digéré par l'enzyme *Pst*I.

5.3 Mobilisation de CIME19258*cat* et de CIME9

Un transconjugant d'ICE*St3spc* vers la souche ATCC 19258 CIME19258*cat*, portant un tandem CIME19258*cat*/ICE*St3spc*/*fda* (voir chapitre B.4.2.2.1) a été utilisé comme souche donatrice dans une étude préliminaire de la mobilisation conjugative de CIME19258*cat* par ICE*St3spc*. Le transfert d'ICE*St3spc* vers la souche LMG18311 pMG36e est obtenu à une fréquence de $3{,}0 \times 10^{-5} \pm 1{,}0 \times 10^{-5}$. Néanmoins, aucun clone résistant à la spectinomycine, à l'érythromycine et au chloramphénicol n'a été isolé. La fréquence de transfert du tandem formé d'ICE*St3spc* et de CIME19258*cat* est donc inférieure à $1{,}0 \times 10^{-8}$.

Par ailleurs, le marquage de CIME9 n'a pas été obtenu avant la fin de ce travail. Par conséquent, la mobilisation conjugative de cet élément par ICE*St3* n'a pas pu être étudiée.

Bien que l'excision du tandem CIME19258*cat-*ICE*St3spc** soit très probable et que l'ICE seul se transfère, aucun événement de mobilisation conjugative de ce CIME n'a été détecté.

5.4 ARTICLE 3 TRAITANT DE L'ACCRETION SITE-SPECIFIQUE ET LA MOBILISATION EN *CIS* DE CIMEL_3*CAT*R_3

Bellanger X, Morel C, Decaris B, and Guédon G. Site-specific accretion of an Integrative Conjugative Element and a related genomic island leads to *cis*-mobilization and gene capture. Article soumis au journal *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Title page

Classification

Major category: Biological sciences
Minor category: Microbiology

Title

Site-specific accretion of an Integrative Conjugative Element and a related genomic island leads to *cis*-mobilization and gene capture

Authors

Bellanger Xavier, Morel Catherine, Decaris Bernard, and Guédon Gérard.

Author affiliation

Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR INRA-UHP 1128, IFR110, Nancy-Université, Vandœuvre-lès-Nancy, France

Corresponding author

Gérard Guédon
Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR INRA-UHP 1128, IFR110, Faculté des Sciences et Techniques, Nancy-Université, BP 239, 54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France
Tel: (33) 03 83 68 42 06
Fax: (33) 03 83 68 11 76
E-mail: guedon@nancy.inra.fr

Manuscript information

19 text pages, 3 figures and 2 tables
(supplementary information: 2 text pages, 5 figures and 2 tables)

Abstract

Integrative and Conjugative Elements (ICE) encoding a tyrosine recombinase are genomic islands which excise by site-specific recombination between their *attR* and *attL* flanking sites, self-transfer by conjugation and integrate in the recipient cell. Related genomic islands were previously found to be integrated in the *fda* locus from various *Streptococcus thermophilus* strains. This family includes ICEs, such as ICE*St3*, and defective elements, that derive from ICEs by deletion of regulation, recombination and conjugation modules but have retained *attL* and *attR* sites. The current investigation shows that ICE*St3* transfers at low frequency to recipients harbouring the defective element CIMEL_3catR_3 revealing a target immunity. The incoming ICE integrates by site-specific recombination into *attL* or *attR* of CIMEL_3catR_3, leading to the accretion of the two elements. The resulting composite island can excise and transfer by conjugation, showing that ICE*St3* mobilizes CIMEL_3catR_3 in *cis*. The ICE*St3* transfer to a recipient bearing CIMEL_3catR_3 also leads to the retromobilization of the CIME, i.e. the capture of the CIME by the donor strain. This is the first report of conjugative mobilization and retromobilization of a genomic island in *cis* by an ICE. CIMEL_3catR_3 would be the first functional member of a novel class of non autonomous mobile elements, the CIMEs (CIs Mobilizable Elements). Sequence analyses have shown that ICEs and related CIMEs are probably widespread and that numerous genomic islands contain evidences of site-specific accretion events, suggesting that this mechanism has a key role in evolution of genomic islands.

\body

Introduction

Horizontal transfer of genomic islands plays a key role in bacterial evolution (1, 2). However, the mechanism of their transfer and integration is rarely known. Recent *in silico* analyses revealed that numerous genomic islands could be integrative and conjugative elements (ICEs) or related elements (Brochet *et al.*, 2008 and references therein). The ICEs, also called conjugative transposons, were defined as elements which encode their excision, their conjugative transfer and their integration (3). Most of the ICEs encode a putative tyrosine integrase and an excisionase that catalyze the recombination between identical sequences carried by the *attL* and *attR* sites flanking the element. This event leads to the excision of a circular form of the ICE harboring an *attI* site and to a chromosome carrying an *attB* site. After conjugative transfer, most of the ICEs integrate by site-specific recombination between identical sequences carried by the *attI* site and the *attB* site. ICEs and other bacterial mobile elements evolve by acquisition, exchanges or deletion of modules, i.e. regions grouping all the genes and sequences involved in a biological function (3-7).

We have previously found that related genomic islands (5-35 kb) are integrated in the 3' end of *fda*, ORF encoding a putative fructose-1,6-diphosphate aldolase, in various strains of *Streptococcus thermophilus* (8, 9), a lactic acid bacterium used in the fabrication of yoghurts and various cheeses. Two of these islands, including ICE*St3*, are functional ICEs carrying regulation, conjugation and recombination modules and flanked by 27-bp direct repeats included in their *attL* and *attR* sites (10). Three other islands (CIMEs for cis mobilizable elements) derive from ICEs by deletion of regulation, conjugation and recombination modules but have retained *attL*, *attR* or *attB* sites related to the sites of the ICEs (9, 11).The sequence comparison suggested that these elements would evolve by an original mechanism, the accretion-mobilization (9). The circular form of an incoming ICE would integrate by site-

specific recombination in one of the CIME attachment site leading to the accretion of the elements separated by an *attI* site. The CIME-ICE tandem would be a composite ICE that could excise (intracellular mobilization *in cis*) and transfer by conjugation (conjugative mobilization *in cis*). The internal *attI* site of the CIME-ICE tandem could also be deleted leading to an ICE that has acquired the modules carried by the CIME.

In the present report, we show that ICE*St3* can transfer towards a recipient strain harboring a CIME, integrate in the *att* sites flanking the CIME leading to accretion and mobilize the CIME. Moreover, the ICE*St3* transfer to a recipient bearing the CIME can also lead to the capture of the CIME by the donor strain. Globally, these data show that the CIMEs correspond to a novel class of non autonomous mobile elements that are probably widespread in bacteria.

Manuscript Text

Results

Conjugation immunity. ICE*St3* has been tagged with the chloramphenicol resistance gene *cat* (ICE*St3cat*) or the spectinomycin resistance gene *spc* (ICE*St3spc*) in order to be able to detect its conjugative transfer or its loss by the cell (10). All the *S. thermophilus* strains harboring a CIME flanked by *attR* and *attL* attachment sites closely related to that of ICE*St3*, such as CIME302, are not or very poorly transformable by electroporation. Therefore, a *S. thermophilus* LMG18311 deriving strain carrying an artificial element similar to CIME302 was created. This element, named CIMEL_3*cat*R_3, is composed by the *cat* gene located between the two ICE*St3* attachment sites (Fig. S1). LMG18311 is a WT *S. thermophilus* strain devoid of element integrated in the *fda* locus. The ICE*St3* transfer from CNRZ385 ICE*St3spc* to the recipients LMG18311 pMG36e, LMG18311 CIMEL_3*cat*R_3 pMG36e and LMG18311 ICE*St3cat* pMG36e was investigated by filter matings. The nature of putative

purified transconjugants was checked by the amplification of an internal fragment of the ICE*St3* regulation module and the amplification of the *cse* gene central region. The *cse* gene, specific to *S. thermophilus*, carries a central part that is highly variable in size and sequence between *S. thermophilus* strains (12). The used donor and recipient strains used have different *cse* alleles allowing their identification by PCR. These amplifications have shown that all the 30 analyzed putative transconjugants were derived from the LMG18311 strain and carry ICE*St3* (Fig. S2, data not shown). Whereas ICE*St3spc* transfers from CRNRZ385 ICE*St3spc* to LMG18311 pMG36e at a frequency of $8.4 \times 10^{-6} \pm 3.0 \times 10^{-6}$, it transfers at a frequency of $1.0 \times 10^{-6} \pm 0.3 \times 10^{-6}$ to LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$ pMG36e. Therefore, the occupation of the recipient *attB* site by an element flanked by *attR* and *attL* attachment sites reduces the ICE*St3* transfer frequency. By comparison with a similar phenomenon described for Tn7 (13), this reduction of the ICE*St3* transfer frequency could be named target immunity. As CIMEL_3*catR*$_3$ and ICE*St3cat* are flanked by identical attachment sites, they should lead to similar target immunity. Nevertheless, the ICE*St3spc* transfer frequency to LMG18311 ICE*St3cat* pMG36e is $8.7 \times 10^{-8} \pm 2.9 \times 10^{-8}$. All together, these data strongly suggest that ICE*St3* encodes gene(s) responsible for a phenomenon of conjugation immunity that is different of the target immunity caused by the occupation of the *attB* site by CIMEL_3*catR*$_3$.

Site-specific accretion between ICE*St3spc* and related elements. When a *S. thermophilus* strain carrying an empty *attB* site is used as recipient in filter matings, ICE*St3* was found to be integrated in this site in the analyzed transconjugants (Fig. 1A) (10). Nevertheless, in the LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$ pMG36e strain, the *attB* site is occupied by CIMEL_3*catR*$_3$. Therefore, in the transconjugants deriving from this strain, ICE*St3spc* could be integrated in a secondary *attB* site or in one of the CIMEL_3*catR*$_3$ flanking sites leading to a CIME-ICE tandem structure (Fig. 1B and 1C). The ICE*St3spc* integration sites were investigated by

DNA-DNA hybridization in 12 purified transconjugants (Fig. S3A). DNA used for this analysis was extract from bacterial cultures deriving from each purified transconjugant. The bacterial populations deriving from the 12 transconjugants seem to be mixes of cells carrying the ICE*St3spc*/CIMEL_3*catR*$_3$/*fda* or the CIMEL_3*catR*$_3$/ICE*St3spc/fda* tandem structure, although the last structure is predominant in 10 of the 12 clones (Fig. S3B). The 2 other clones seem to be composed of a similar proportion of cells carrying each structure or to result from the acquisition by a recipient cell of two ICE*St3spc* copies and the integration of an ICE*St3spc* copy in each attachment site flanking CIMEL_3*catR*$_3$ (Fig. S3A). The characterized ICE*St3spc*/CIMEL_3*catR*$_3$/*fda* and CIMEL_3*catR*$_3$/ICE*St3spc/fda* tandem structures result from the site-specific accretion between the two elements and more precisely from the site-specific recombination between the ICE*St3spc attI* site and the CIMEL_3*catR*$_3$ *attL* or *attR* sites, respectively (Fig. 1B and 1C).

The ICE*St3cat* integration site was also characterized in 17 transconjugants of the strain CNRZ385 ICE*St3spc* resistant to rifampin (data not shown). Each clone was found to harbor either an ICE*St3spc*/ICE*St3cat*/*fda* or an ICE*St3cat*/ICE*St3spc/fda* tandem structure. The ICE*St3spc*/ICE*St3cat*/*fda* tandem structure resulting from the site-specific integration of ICE*St3cat* in the ICE*St3spc attR* site was found in 16 of the 17 analyzed transconjugants. These data jointly suggest that ICE*St3* integrates preferentially in the *attR* site of the resident element and that the tandem structures could be unstable and could rearrange during the cell cycles.

Dynamics of the tandem structures. CIMEL_3*catR*$_3$ does not harbor the integrase and excisionase genes which could allow its excision. Thus, this element does not excise in the LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$ strain (Fig. S4). PCR amplifications were performed on DNA from LMG18311 deriving clones bearing the CIMEL_3*catR*$_3$/ICE*St3spc/fda* tandem as predominant structure in order to characterize the dynamics of the tandems and to detect which element(s)

could excise. Letters (A, B) and numbers (1, 2) are used in index to discriminate the arms of the *att* sites from ICE*St3spc* and CIMEL_3catR_3, respectively, whereas the sites of the two elements are actually identical. Fragments carrying the attachment sites of the ICE*St3spc*/CIMEL_3catR_3/*fda* tandem structure, i.e. the $attL_A$ and $attR_2$ flanking sites and the $attI_{B1}$ site separating the two elements, were amplified by PCR using oligonucleotides specific of the sequences flanking the *att* sites in the ICE, the CIME or in one of the chromosomal flanking sequences (Fig. 1 and S4). Similarly, fragments carrying the $attL_1$, $attR_B$ and $attI_{A2}$ sites of the CIMEL_3catR_3/ICE*St3spc/fda* tandem were obtained. Moreover, the fragment containing $attI_{AB}$ was amplified showing that ICE*St3spc* excise from at least one of the tandem structures. The empty *attB* site that would result from the tandem structures was also detected. However, the fragment bearing the $attI_{12}$ site which would result from the production of the CIMEL_3catR_3 circular form was not obtained. Nevertheless, when the integrase and the excisionase genes were expressed from the pNST269+ plasmid in the LMG18311 CIMEL_3catR_3 strain, a PCR fragment corresponding to the empty *attB* site was amplified (data not shown). Thus, the integrase and the excisionase proteins produced from pNST269+ catalyze the excision of CIMEL_3catR_3 *in trans*. In the same way, the ICE*St3spc* integrase and excisionase genes could also probably lead to the CIMEL_3catR_3 excision. All together, these data strongly show that the tandem structures composed of CIMEL_3catR_3 and ICE*St3spc* are dynamics and that various integrated and circular forms of CIMEL_3catR_3 and ICE*St3spc* coexist in the same culture (Fig. 2). Moreover, the whole CIMEL_3catR_3/ICE*St3spc* tandem structure probably excises under a single circular form harboring both $attI_{B1}$ and $attI_{A2}$ sites. Because of the tandem dynamics, each tandem composed of CIMEL_3catR_3 and ICE*St3spc* will be refer as a "CIMEL_3catR_3-ICE*St3spc* tandem" when the relative location of the two elements is unknown.

Tandem structure instability. No clone that has lost ICE*St3* or CIMEL_3*catR*$_3$ was obtained after successive cultures when these elements are single in a bacterium, whatever the conditions used, indicating that the loss frequency if these elements is less than 10^{-5} per cell per generation. Nevertheless, the tandem dynamics might lead to the instability of ICE*St3* or CIMEL_3*catR*$_3$ by loss of the excised elements in one of the daughter cells during cell division. Therefore, the inheritance stability of elements constituting the tandem, ICE*St3cat*, ICE*St3spc* and CIMEL_3*catR*$_3$, was studied after around 100 successive generations either in presence or in absence of spectinomycin and/or chloramphenicol. The culture of the bacteria carrying a tandem composed of ICE*St3cat* and ICE*St3spc* without antibiotics leads to the loss of one of the copies of ICE*St3* at a frequency about 2.0×10^{-4} per cell per generation (Table 1). If one antibiotic was added, the ICE*St3* copy conferring a resistance to the other antibiotic is lost at a similar frequency. Nevertheless, the ICE*St3spc* copy of the bacteria bearing a CIMEL_3*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem is never lost, either that spectinomycin is used or not (Table 1). Therefore, the bacteria progeny always inherits at least one ICE*St3* copy, whatever the original tandem structure. Otherwise, in absence of chloramphenicol, the bacteria carrying a CIMEL_3*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem loss the CIME at a frequency about 2.0×10^{-3} per cell per generation (Table 1). These data strongly suggest that ICE*St3spc* can promote CIMEL_3*catR*$_3$ excision. Furthermore, bacteria bearing a CIMEL_3*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem can lose their single CIMEL_3*catR*$_3$ copy. This CIMEL_3*catR*$_3$ loss frequency is almost 10 times higher than the loss frequency of one ICE*St3* copy from a tandem composed of ICE*St3cat* and ICE*St3spc*.

Conjugative mobilization of CIMEL_3*catR*$_3$ by ICE*St3spc*. The conjugative transfer of the CIMEL_3*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem was investigated by filter matings using LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$ ICE*St3spc* and CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e (Erm^R) as donor and recipient, respectively. Putative transconjugants were recovered on agar plates containing erythromycin

and spectinomycin, erythromycin and chloramphenicol or erythromycin, spectinomycin and chloramphenicol. Ten putative transconjugants from each type of plates were analyzed. The amplification of the central part of the *cse* gene confirmed that the 30 clones derive from the recipient (data not shown). PCRs have also confirmed that the 10 clones resistant to erythromycin, spectinomycin and chloramphenicol carry ICE*St3spc* and CIMEL_3*catR*$_3$ (Fig. S5C). Moreover, the analysis of the tandem structure carried by these clones has shown that they all harbor a CIMEL_3*catR*$_3$/ICE*St3spc*/*fda* tandem. Thus, the accretion of ICE*St3spc* with CIMEL_3*catR*$_3$ in leads to the conjugative mobilization of this CIME (data not shown).

Furthermore, phenotypical and PCR analyses of the 10 erythromycin and spectinomycin resistant transconjugants have shown that nine of them only carry ICE*St3spc* and that the last one carries ICE*St3spc* and CIMEL_3*catR*$_3$ (Fig. S5A). The transfer frequencies of at least ICE*St3spc* (clones recovered on Spc and Erm) and CIMEL_3*catR*$_3$ + ICE*St3spc* (Spc^R Cm^R Erm^R clones) are $1.4 \times 10^{-5} \pm 0.3 \times 10^{-5}$ and $2.6 \times 10^{-7} \pm 0.7 \times 10^{-7}$, respectively (Table 2). Consequently, ICE*St3spc* transfers alone almost 50 times more than the CIMEL_3*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem.

Furthermore, whereas the ten erythromycin and chloramphenicol resistant clones are CIMEL_3*catR*$_3$ transconjugants of CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e (Fig. S5B), four of them are sensitive to spectinomycin and do not harbor ICE*St3spc* (Fig. S5B). Accordingly, the frequency of transconjugants recovered on plates containing erythromycin and chloramphenicol, $3.2 \times 10^{-7} \pm 1.0 \times 10^{-7}$, seems to be higher than the transfer frequency of the CIMEL_3*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem (Table 2). No CIMEL_3*catR*$_3$ transfer from the strain LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$ to CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e was characterized. Therefore, the presence of ICE*St3spc* can lead to the transfer of the single CIMEL_3*catR*$_3$.

Retromobilization of CIME*L*$_3$*catR*$_3$ by ICE*St3spc*. The donor CNRZ385 ICE*St3spc* pMG36e and the recipient LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ were used in filters matings in order to test the retromobilization of CIME*L*$_3$*catR*$_3$ by the ICE. In these experiments, the ICE*St3spc* transfer frequency from the donor to the recipient is $2.7\times 10^{-6} \pm 0.7 \times 10^{-6}$ CFU/CFU of the donor (Table 2). Clones resistant to erythromycin, spectinomycin and chloramphenicol were also recovered at a frequency $8.8 \times 10^{-10} \pm 1.8 \times 10^{-10}$ CFU/CFU of the donor (Table 2). The amplification of the central region of the *cse* gene and the detection of ICE*St3spc* and CIME*L*$_3$*catR*$_3$ showed that these clones derived from the donor and carry both elements (Fig. 3). Seeing as CIME*L*$_3$*catR*$_3$ does not transfer from the strain LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$ to CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e, the presence of ICE*St3spc* in the donor causes the retromobilization of CIME*L*$_3$*catR*$_3$ i.e. the capture of this CIME by the donor strain. A DNA-DNA hybridization suggests that the retrotransconjugants carry a tandem whose structure is ICE*St3spc*/CIME*L*$_3$*catR*$_3$/ICE*St3spc*/*fda* (data not shown). Thus, the retrotransconjugants derive from donor cells that might have acquired a CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem from a transconjugant. For that reason, it should be better to express the retromobilization frequency as the CFU of retrotransconjugants/CFU of transconjugants instead of CFU of retrotransconjugants/CFU of donor. Thus, the CIME*L*$_3$*catR*$_3$ retromobilization frequency is $4.8 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-4}$.

Discussion

The artificial element CIME*L*$_3$*catR*$_3$ is only composed of the *cat* gene conferring a resistance to chloramphenicol and the attachment sites from ICE*St3* (Fig. S1). We have shown that, in the presence of CIME*L*$_3$*catR*$_3$ integrated in the *attB* site, the ICE*St3spc* transfer frequency decreases by a factor of 8 and that the ICE integrates in the *attL*$_1$ or the *attR*$_2$ sites flanking the CIME flanking sites. Since CIME*L*$_3$*catR*$_3$ does not encode any gene able to interfere with the

transfer of ICE*St3spc* DNA by conjugation, we assume that a lesser ICE*St3spc* integration efficiency in the CIMEL_3*catR*$_3$ *attL*$_1$ or *attR*$_2$ sites compared to the empty *attB* site is responsible for the reduction of the ICE*St3spc* transfer frequency. In the same way, very recently, the *attR* site of ICE*clc* from *Pseudomonas knackmussii* was shown as a worse ICE*clc* integration site than the same site deleted of the putative ICE*clc* integrase and/or co-factor binding sequence (14). This suggests that the binding of integrase(s) and/or cofactor(s) on the *attL* or *attR* sites from a resident island might interfere with the site-specific integration of an incoming ICE. Thus, CIMEL_3*catR*$_3$ would be responsible for target immunity, a mechanism never described in connection with an ICE. The major immunity mechanism limiting the transfer of ICE*Bs1* from *Bacillus subtilis* between donor strains is the repression of the incoming element by the immunity repressor encoded by the resident ICE*Bs1* copy (15). However, an uncharacterized immunity mechanism independent from the role of the immunity repressor, leads to a reduction of ICE*Bs1* transfer frequency by a factor of 4 to 20 (15). These reductions of ICE*Bs1* transfer frequency could be also due to target immunity.

Furthermore, we have shown that ICE*St3spc* encodes a conjugation immunity different from target immunity leading to an almost 12 times decrease of the transfer frequency. The two genes *arp1* and *arp2* of the ICE*St3* regulation module belong to the *cI* and the *cI*-like repressor families, respectively. The cI repressors of the phage λ and the related phages are responsible for superinfection immunity (16). Similarly, the cI-like repressors, unrelated to cI, are responsible for superinfection immunity encoded by numerous prophages such as TP901-1 from *Lactococcus lactis* (17). Thus, the cI or the cI-like repressor of a resident prophage repress the incoming genome of a closely related phage. The latter will integrate in the genome of the infected cell with a reduced efficiency. Although no conjugation immunity function is described for the cI repressor SetR from SXT, the ICE*Bs1* cI-like repressor ImmR is responsible for such phenomenon (15, 18-20). Therefore, the *arp1*

and *arp2* genes from ICE*St3spc* could be involved in the conjugation immunity encoded by this element.

We have found that, after its conjugative transfer, ICE*St3* integrates preferentially in the *attR* site of CIMEL_3catR_3 or the resident ICE*St3* copy leading to the accretion of the elements. While such accretion was previously reported only for two types of ICEs, pSAM2 from the actinobacteria *Streptomyces ambofacies* and for two very closely related ICEs from enterobacteria, SXT and R391 (21, 22), these results are the first report of the accretion by site-specific recombination of an ICE and a related genomic island devoid of recombination and conjugation modules but harboring *attL* and *attR* sites. Our data showed that not only the tandems composed of two copies of ICE*St3* but also the ones composed of ICE*St3* and CIMEL_3catR_3 are unstable.. Such instability was previously found in all the very few reports of tandems of identical or very closely related ICEs (21-23). Although, the tandems composed of ICE*St3spc* and ICE*St3cat* or CIMEL_3catR_3 are unstable, the progeny of bacterial strains bearing these structures always inherits at least one ICE*St3* copy. Additionally, no natural ICE*St3*-cured strain was ever recovered. ICE*St3* encodes two putative type II restriction-modification (RM) systems (9). Type II RM systems not only confer a resistance against bacteriophages but are also toxin-antitoxin (TA) systems that leads to cell death if the RM system is lost (24). A TA system was recently described as promoting the maintenance of SXT (25). These data suggest that the type II RM systems of ICE*St3* could promote the maintenance of this element by killing most of the natural cured-strains. It should be noticed that the ICEs and related genomic islands integrated in the *fda* locus carry remnants of internal *att* sites resulting from past event of accretion and subsequent partial deletion (Pavlovic). These sites would be easily explained by the instability of the putative tandems CIME-ICE. Indeed after accretion of ICEs and CIMEs encoding RM systems such as ICEst3,

ICESt1 and CIME302 (burrus système RM, Pavlovic) and/or functions advantageous for the host, any mutation stabilizing tandem including deletions of the internal *att* site resulting from the accretion would be positively selected..

CIME*L*$_3$*catR*$_3$ is only composed by the *cat* gene conferring a resistance to chloramphenicol and the attachment sites from ICE*St3* (Fig. S1). Consequently, the CIME is devoid of sequence related to the ICE*St3* origin of transfer. We have shown that CIME*L*$_3$*catR*$_3$ does not transfer from a strain carrying only this element and that the presence of ICE*St3spc* in the donor strain can lead to the CIME transfer. This transfer very probably results from the excision and the transfer of the whole CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem, i.e. the *cis*-mobilization of CIME*L*$_3$*catR*$_3$ by ICE*St3spc*. CIME*L*$_3$*catR*$_3$ is the first functional *cis*-mobilizable element which conjugative mobilization in *cis* by a related ICE was reported.

Nonetheless, the transfer of CIME*L*$_3$*catR*$_3$ alone from the tandem was characterized. We hypothesize that, after the conjugative transfer of the whole CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem, an intramolecular site-specific recombination between the *attI*$_{A2}$ and the *attI*$_{B1}$ sites will result in the production of the free circular form of each element. Thereafter, the integrase encoded by ICE*St3spc* could catalyze the integration of CIME*L*$_3$*catR*$_3$ *in trans* while the ICE would not integrate and could be lost by dilution during cell division.

The presence of ICE*St3spc* in the donor leads to the retromobilization of CIME*L*$_3$*catR*$_3$, i.e. the capture of this CIME by the donor strain. The retrotransconjugants have probably acquired a CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem. The whole CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem probably excise from a transconjugant, transfer back to the recipient and integrate in one attachment sites of the resident ICE*St3spc*. In the retromobilization events the cells being able to transfer CIME*L*$_3$*catR*$_3$ are the transconjugants. Thus, the CIME*L*$_3$*catR*$_3$ retromobilization frequency is $4.8 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-4}$. Whereas retromobilization seem to be

common in Gram negative bacteria (26, 27), this study is the third report of a such event in Gram positive bacteria (28, 29) an the first retromobilization involving an ICE. This study is also the first report of the conjugative mobilization and the retromobilization of a genomic island by a related ICE.

Taken together, these results presented in this report are the first experimental demonstration of the model of evolution genomic islands by accretion and mobilization in *cis* of ICE and CIMEs, previously proposed from sequence comparison of *S. thermophilus* genomic islands. They also show that CIME*L3catR3* is a novel non autonomous mobile element, which is completely devoid of conjugation machinery and only possess flanking *att* sites. It uses the integrase, the recombinase and the conjugation machinery of a related ICE to excise, transfer and integrate. Many genomic islands do not carry conjugation and recombination modules and are flanked by direct repeats that may belong to *att* sites (1). However, to be considered as putative CIMEs, they should be related to ICEs or to integrative mobilizable elements (IMEs), i.e. elements that harbour their own recombination module and transfer origin but used the conjugation machinery of ICEs or plasmids to transfer (6). Thus, the pathogenicity island HPI of *Y. pestis*, which is flanked by *att* sites and related to ICE*Ec1* from *E. coli* (30, 31), is a putative CIME. Furthermore, sequencing of various genomic islands has revealed evidence of internal copies of the repetitions flanking the element that could result of site-specific accretion of many of various origins. The most prominent example is the island ISL3-MIT9312 found in the genome of the cyanobacterium *Prochlorococcus* sp. which alone contains 13 putative *att* sites (32). Although the genomic islands are systematically searched in the sequenced genomes, in most cases, their nature and/or evolution has not been analyzed. A unique exhaustive search of ICES, related elements, and site-specific accretion events, made on the eight sequenced genomes of *S. agalactiae*, (33) revealed 30 distinct genomic islands integrated in a site-specific manner.

Eleven of these islands are composite and exhibit traces of 14 accretion events involving 5 tyrosine recombinases with different specificities. If each sequence flanked by putative *att* sites is considered as a single element, these genomic islands include 9 putative ICE, 7 putative IMEs 7, and 13 putative CIMEs that do no encode a recombinase. These data strongly suggest that the site-specific accretion events catalyzed by the tyrosine integrase and *cis* mobilization resulting from this accretion are very common and could play a key role in the evolution of genomic islands. Accordingly, many genomic islands would not correspond to a single element acquired by horizontal transfer but would consist of a mosaic of related elements that had integrated in tandem and had undergone deletions of the internal *att* sites resulting from accretion. This mechanism could be a major mechanism involved in the acquisition of novel modules by ICE and genomic islands.

Materials and Methods

Bacterial strains, plasmids and culture conditions. Strains and plasmids used in this work are listed in Table S1. The construction of the strain LMG18311 CIMEL_3*cat*R_3 is described in Fig S1. The construction of the strains LMG18311 ICE*St3cat* and CNRZ385 ΔICE*St3* are described in SI text. Strains which were modified or mutated were named according to the modification. For example, *S. thermophilus* CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e corresponds to a derivative of the *S. thermophilus* CNRZ385 cured of ICE*St3* and carrying the plasmid pMG36e encoding resistance to erythromycin.

S. thermophilus strains were grown in reconstituted skimmed milk (10 % w/v), M17 broth supplemented with 0.5 % lactose (LM17) (Oxoid), Hogg-Jago broth supplemented with 1 % lactose (HJL) (34) or Belliker broth (35) at 42°C under anaerobic conditions (GENbox anaer atmosphere generators and incubation jars from bioMérieux, France). Cultures were

supplemented with the following antibiotic when required, chloramphenicol 4 µg.ml^{-1}, erythromycin 5 µg.ml^{-1}, rifampicin 25 µg.ml^{-1} or spectinomycin 50 µg.ml^{-1}.

Escherichia coli strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C in aerobiosis (36). Recombinant plasmids derived from pG+host9 were transformed into *E. coli* EC101, a strain containing a chromosomal copy of the pWV01 *repA* gene (37), and selected at 37°C on LB containing 150 µg of erythromycin ml^{-1}.

DNA manipulations and recombinant DNA. Preparation of chromosomal and plasmid DNA and Southern analysis were performed according to standard protocols (36). Primers used in this study were purchased from Eurogentec (Angers, France) and are listed in Table S2. The primers used to amplify the attachment sites are element-specific. PCRs and high fidelity PCRs were carried out according to the instructions of the ThermoPol PCR kit (New England Biolabs, United Kingdom) and of the Triple Master PCR System (Eppendorf, France), respectively. The restriction and modifying enzymes were purchased from New England Biolabs, United Kingdom. *S. thermophilus* strains were electroporated as previously described by Tyvaert *et al.* (2006).

Filter-matings. The filter-mating protocol used was described in Bellanger *et al*., 2009. Briefly, a 15 ml culture of LM17 broth was inoculated with 150 µL of the overnight culture of the recipient or the donor strain. The cultures were grown at the relevant temperature until mid-exponential phase (optical density at 600 nm of 0.4). Cultures of donor and recipient were mixed and centrifuged for 15 minutes in a pre-warmed centrifuge at 4500 g to form a cell pellet. The pellet was resuspended in 1 ml of LM17 broth and 150 µl aliquots were spread on nitrocellulose 0.45-µm-pore-size filters (Sartorius) on LM17 agar plates which were then incubated for 20 h at 42°C. The filters were removed from the agar plates and placed in 50-ml

bottles containing 10 ml of sterile LM17 broth and vortexed for 30 s. Various dilutions were spread on agar plates supplemented with the appropriate antibiotics and the plates were incubated during 24 h to 48 h in order to count CFUs of the donor, the recipient and the transconjugants. The transfer frequencies are expressed as the CFUs of transconjugants or retotransconjugants per the CFUs of donor. The transconjugants that were characterized by PCR amplifications and Southern blots were previously purified by two successive streaking on agar plates.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed as described Georgin and Mouet (2000) and Cumming *et al.* (2007). The mean and the standard error of at least five independent experiments are indicated.

Acknowledgement

X.B. was supported by a grant from the Ministère de l'Education Nationale de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. We thank Fabien Gonot, a Master's student who collaborated to the analysis of the element stabilities.

References

1. Hacker, J., Kaper, J. B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54**:**641-679.
2. Hacker, J., Kaper, J. (1999) *Pathogenicity Islands and Other Mobile Virulence Elements.*
3. Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., Guédon, G. (2002) Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol.* 46**:**601-610.
4. Garnier, F., Taourit, S., Glaser, P., Courvalin, P., Galimand, M. (2000) Characterization of transposon Tn*1549*, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiology* 146**:**1481-1489.

5. Roberts, A. P., Johanesen, P. A., Lyras, D., Mullany, P., Rood, J. I. (2001) Comparison of Tn*5397* from *Clostridium difficile*, Tn*916* from *Enterococcus faecalis* and the CW459*tet*(M) element from *Clostridium perfringens* shows that they have similar conjugation regions but different insertion and excision modules. *Microbiology* 147**:**1243-1251.
6. Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., Guédon, G. (2002) The ICE*St1* 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.
7. Toussaint, A., Merlin, C. (2002) Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid* 47**:**26-35.
8. Burrus, V., Roussel, Y., Decaris, B., Guédon, G. (2000) Characterization of a novel integrative element, ICE*St1*, in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66**:**1749-1753.
9. Pavlovic, G., Burrus, V., Gintz, B., Decaris, B., Guédon, G. (2004) Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICE*St1*-related elements from *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology* 150**:**759-774.
10. Bellanger, X., Roberts, A. P., Morel, C., Choulet, F., Pavlovic, G., Mullany, P., Decaris, B., Guedon, G. (2009) Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICESt1 and ICESt3 from Streptococcus thermophilus. *J. Bacteriol.*
11. Burrus, V., Waldor, M. K. (2004) Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* 155**:**376-386.
12. Borges, F., Layec, S., Fernandez, A., Decaris, B., Leblond-Bourget, N. (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.
13. Stellwagen, A. E., Craig, N. L. (1997) Avoiding self: two Tn7-encoded proteins mediate target immunity in Tn7 transposition. *Embo J.* 16**:**6823-6834.
14. Sentchilo, V., Czechowska, K., Pradervand, N., Minoia, M., Miyazaki, R., van der Meer, J. R. (2009) Intracellular excision and reintegration dynamics of the ICEclc genomic island of Pseudomonas knackmussii sp. strain B13. *Mol. Microbiol.* 72**:**1293-1306.
15. Auchtung, J. M., Lee, C. A., Garrison, K. L., Grossman, A. D. (2007) Identification and characterization of the immunity repressor (ImmR) that controls the mobile genetic element ICEBs1 of Bacillus subtilis. *Mol. Microbiol.* 64**:**1515-1528.
16. Birge, E. A. (1994) *Bacterial and bacteriophage genetics.* (Springer-Verlag, New York).
17. Madsen, P. L., Johansen, A. H., Hammer, K., Brondsted, L. (1999) The genetic switch regulating activity of early promoters of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J. Bacteriol.* 181**:**7430-7438.
18. Beaber, J. W., Hochhut, B., Waldor, M. K. (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* 427**:**72-74.
19. Marrero, J., Waldor, M. K. (2005) Interactions between inner membrane proteins in donor and recipient cells limit conjugal DNA transfer. *Dev Cell* 8**:**963-970.
20. Marrero, J., Waldor, M. K. (2007) The SXT/R391 family of integrative conjugative elements is composed of two exclusion groups. *J. Bacteriol.* 189**:**3302-3305.
21. Hochhut, B., Beaber, J. W., Woodgate, R., Waldor, M. K. (2001) Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative

chromosomally integrating elements that share an attachment site. *J. Bacteriol.* 183**:**1124-1132.
22. Possoz, C., Ribard, C., Gagnat, J., Pernodet, J. L., Guérineau, M. (2001) The integrative element pSAM2 from *Streptomyces*: kinetics and mode of conjugal transfer. *Mol. Microbiol.* 42**:**159-166.
23. Ravatn, R., Studer, S., Springael, D., Zehnder, A. J., van der Meer, J. R. (1998) Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* sp. Strain B13. *J. Bacteriol.* 180**:**4360-4369.
24. Kobayashi, I. (2001) Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res.* 29**:**3742-3756.
25. Wozniak, R. A., Waldor, M. K. (2009) A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet* 5**:**e1000439.
26. Ankenbauer, R. G. (1997) Reassessing forty years of genetic doctrine: retrotransfer and conjugation. *Genetics* 145**:**543-549.
27. Szpirer, C., Top, E., Couturier, M., Mergeay, M. (1999) Retrotransfer or gene capture: a feature of conjugative plasmids, with ecological and evolutionary significance. *Microbiology* 145 (Pt 12)**:**3321-3329.
28. Lotareva, O. V., Shilovskii, I. P., Prozorov, A. A. (2006) A phenomenon of plasmid retrotransfer in conjugation of Bacillus subtilis. *Genetika* 42**:**1735-1738.
29. Timmery, S., Modrie, P., Minet, O., Mahillon, J. (2009) Plasmid capture by the Bacillus thuringiensis conjugative plasmid pXO16. *J. Bacteriol.* 191**:**2197-2205.
30. Schubert, S., Dufke, S., Sorsa, J., Heesemann, J. (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.
31. Schubert, S., Rakin, A., Heesemann, J. (2004) The Yersinia high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int. J. Med. Microbiol.* 294**:**83-94.
32. Coleman, M. L., Sullivan, M. B., Martiny, A. C., Steglich, C., Barry, K., Delong, E. F., Chisholm, S. W. (2006) Genomic islands and the ecology and evolution of Prochlorococcus. *Science* 311**:**1768-1770.
33. Brochet, M., Couve, E., Glaser, P., Guedon, G., Payot, S. (2008) Integrative conjugative elements and related elements are major contributors to the genome diversity of Streptococcus agalactiae. *J. Bacteriol.* 190**:**6913-6917.
34. Stingele, F., Mollet, B. (1996) Disruption of the gene encoding penicillin-binding protein 2b (pbp2b) causes altered cell morphology and cease in exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Mol. Microbiol.* 22**:**357-366.
35. O'Sullivan, T. F., Fitzgerald, G. F. (1999) Electrotransformation of industrial strains of *Streptococcus thermophilus*. *J. Appl. Microbiol.* 86**:**275-283.
36. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed.* (Cold Spring Harbor, N.Y.).
37. Buist, G., Kok, J., Leenhouts, K. J., Dabrowska, M., Venema, G., Haandrikman, A. J. (1995) Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of Lactococcus lactis, a muramidase needed for cell separation. *J. Bacteriol.* 177**:**1554-1563.

Figures

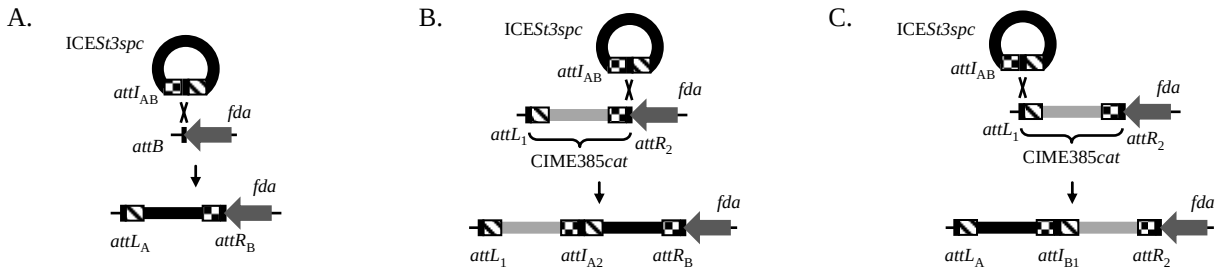


Figure 1. Schematic representation of the ICE*St3spc* integration in the *attB* site, the $attR_2$ or the $attL_1$ sites. (A.) The site-specific recombination between the ICE*St3spc* $attI_{AB}$ site and the chromosomal *attB* site leads to the integration of this element and to the formation of the $attL_A$ and $attR_B$ flanking sites. (B.) The site-specific recombination between the ICE*St3spc* $attI_{AB}$ site and the CIMEL_3catR_3 $attR_2$ site leads to the integration of this element and to the formation of the $attR_B$ site and the $attI_{A2}$ site separating the two elements. (C.) The site-specific recombination between the ICE*St3spc* $attI_{AB}$ site and the CIMEL_3catR_3 $attL_1$ site leads to the integration of this element and to the formation of the $attL_A$ site and the $attI_{B1}$ site separating the two elements. ICE*St3spc* and CIMEL_3catR_3 are indicated by a black and a grey rectangle, respectively. The *fda* gene is indicated by a dark grey arrow. Recombination sites are drawn as rectangles: black, sequence identical in *attB*, *attL*, *attR* and *attI* sites; checkerboards, arm of *attR* sites and related arm of *attI* sites; hatched boxes, arm of *attL* sites and related arms of *attI* sites. While the *attL* and *attR* flanking sites of ICE*St3spc* and CIMEL_3catR_3 are identical, letters (A, B) and numbers (1, 2) are used in index to discriminate the *att* site of ICE*St3spc* and CIMEL_3catR_3, respectively. The recombination sites are magnified on the figure. The *fda* gene is indicated by a grey arrow.

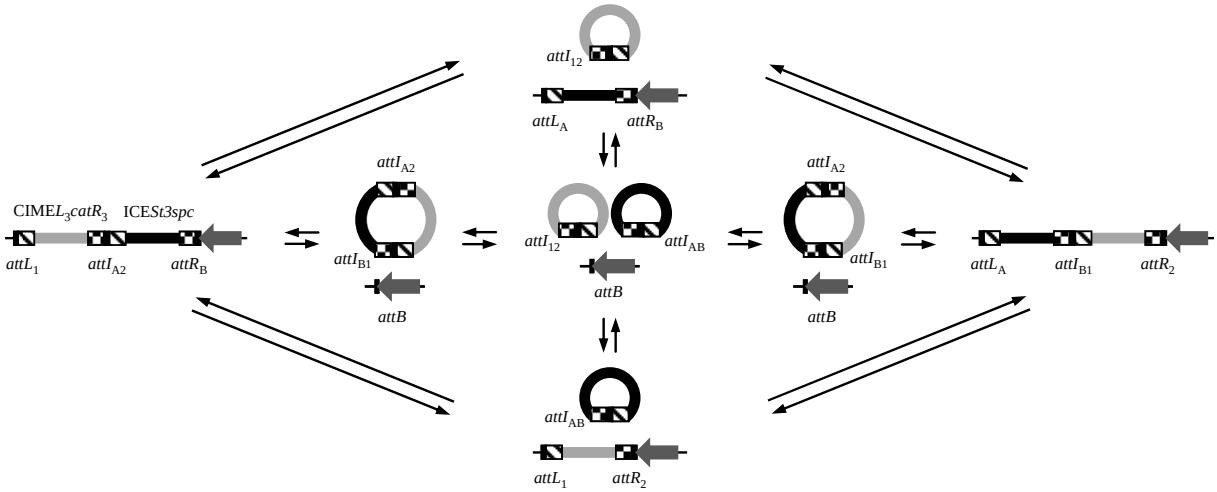


Figure 2. Schematic representation of the different integrated or circular forms of CIME*L*$_3$*catR*$_3$ and ICE*St3spc* that might be produced from a tandem structure.

ICE*St3spc* and CIME*L*$_3$*catR*$_3$ are indicated by a black and a grey rectangle, respectively. The *fda* gene is indicated by a dark grey arrow. Recombination sites are drawn as rectangles: black, sequence identical in *attB*, *attL*, *attR* and *attI* sites; checkerboards, arm of *attR* sites and related arm of *attI* sites; hatched boxes, arm of *attL* sites and related arms of *attI* sites. While the *attL* and *attR* flanking sites of ICE*St3spc* and CIME*L*$_3$*catR*$_3$ are identical, letters (A, B) and numbers (1, 2) are used in index to discriminate the *att* site of ICE*St3spc* and CIME*L*$_3$*catR*$_3$, respectively. The recombination sites are magnified on the figure.

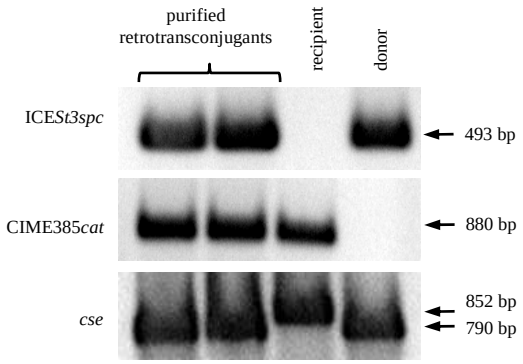


Figure 3. Characterization by PCR of CIMEL_3*cat*R_3 retrotransconjugants of *S. thermophilus* CNRZ385 ICE*St3spc*. CNRZ385 ICE*St3spc* pMG36e and LMG18311 CIMEL_3*cat*R_3 were used as the donor and the recipient, respectively. The line named ICE*St3spc* indicates the amplification of a fragment of the ICE*St3spc* regulation module. The line named CIMEL_3*cat*R_3 indicates the amplification of a fragment of the *cat* gene used to tag CIMEL_3R_3. The amplification of the central region of the *cse* gene (line named *cse*) was used to show that the retrotransconjugants derived from the donor. The size of the PCR fragments are deduced from sequence analysis and confirmed by co-migration with a DNA ladder. The primer pairs used for these amplifications are indicated in the table S1.

Tables

Table 1. Stability of the elements composing the tandem structures.

Antibiotic (s) present in the cultures	Loss frequency per cell per generation ± SEM *					
	tandem composed of ICE*St3spc* and ICE*St3cat*			tandem composed of CIMEL_3*catR*$_3$ and ICE*St3spc*		
	Spc^S	Cm^S	Spc^S and Cm^S	Spc^S	Cm^S	Spc^S and Cm^S
-	$2.6 \times 10^{-4} \pm 0.5 \times 10^{-4}$	$1.5 \times 10^{-4} \pm 1.3 \times 10^{-4}$	NS	NS	$1.1 \times 10^{-3} \pm 1.2 \times 10^{-3}$	NS
Spc	NS	$8.2 \times 10^{-5} \pm 1.7 \times 10^{-5}$	NS	NS	$1.5 \times 10^{-3} \pm 1.0 \times 10^{-3}$	NS
Cm	$3.9 \times 10^{-4} \pm 1.9 \times 10^{-4}$	NS	NS	NS	NS	NS

* NS: no susceptible clones recovered (loss frequency per cell per generation < 10^{-5}). The resistances to spectinomycin and to chloramphenicol are conferred by the *spc* and *cat* genes, respectively. Spc^S: spectinomycin sensitive; Cm^S chloramphenicol sensitive.

The loss frequency per cell per generation for the strains only carrying a tagged ICE*St3* or CIM385*cat* is less than 10^{-5}.

Table 2. Conjugative mobilization and retromobilization of CIMEL_3catR_3 by ICE*St3spc*.

Donor	Transfer direcion	Recipient	Transferred element (selection marker)*	Transfer frequency
LMG18311 CIMEL_3catR_3	→	CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e	CIME385*cat* (Cm^R Erm^R)	$< 1.0 \times 10^{-9}$
LMG18311 CIMEL_3catR_3 ICE*St3spc*	→	CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e	at least ICE*St3spc* (Spc^R Erm^R)	$1.4 \times 10^{-5} \pm 0.3 \times 10^{-5}$ †
			at least CIMEL_3catR_3 (Cm^R Erm^R)	$3.2 \times 10^{-7} \pm 1.0 \times 10^{-7}$ †
			ICE*St3spc* and CIMEL_3catR_3 (Spc^R Cm^R Erm^R)	$2.6 \times 10^{-7} \pm 0.7 \times 10^{-7}$ †
CNRZ385 ICE*St3spc* pMG36e	→	LMG18311 CIMEL_3catR_3	ICE*St3spc* (Spc^R Cm^R)	$2.7 \times 10^{-6} \pm 0.7 \times 10^{-6}$ †
CNRZ385 ICE*St3spc* pMG36e	←	LMG18311 CIMEL_3catR_3	CIMEL_3catR_3 (Spc^R Cm^R Erm^R)	$8.8 \times 10^{-10} \pm 1.8 \times 10^{-10}$ † $4.8 \times 10^{-4} \pm 1.0 \times 10^{-4}$ ‡

* The resistances to spectinomycin (Spc^R), to chloramphenicol (Cm^R) and to erythromycin (Erm^R) are conferred by the *spc*, *cat* and *ermB* genes, respectively. The *ermB* gene is carried by the non-mobilizable plasmid pMG36e.

† Transfer frequency is expressed as the CFUs of transconjugants or retotransconjugants per the CFUs of donor ± SEM.

‡ Transfer frequency is expressed as the CFUs of retotransconjugants per the CFUs of transconjugants ± SEM.

SI text

Strain LMG18311 ICE*St3cat* construction

After a filter mating using CNRZ385 ICE*St3cat* as donor and LMG18311 carrying pMG36e (*ermB*) as recipient, a transconjugant (LMG18311 ICE*St3cat* pMG36e) was isolated (1, 2). The *cat* and *ermB* genes confer resistance to chloramphenicol and erythromycin, respectively. Thereafter, this transconjugant was cultivated for 100 generations in HJL broth with chloramphenicol but without erythromycin and clones were isolated. Some clones resistant to chloramphenicol and sensitive to erythromycin were recovered. Analyses have confirmed these clones derive from LMG18311, carry ICE*St3cat* but are devoid of pMG36e.

Strain CNRZ385 ΔICE*St3* construction

The thermosensitive plasmid pNST262+ carries the integrase, the excisionase and the *attR* site from ICE*St1* under the control of the P6 constitutive promoter and an erythromycin resistance gene (1). This plasmid was introduced in the WT strain CNRZ385 carrying ICE*St3* by electroporation. Then, pNST262+ integrants were recovered after culture at 42°C (restrictive temperature). The integration of pNST262+ in the chromosome leads to an ICE*St3*-pNST262+ tandem structure flanked by the ICE*St3 attL* site and the *attR* site carried by the plasmid. The overexpression of the integrase and the excisionase genes leads to the excision of the ICE*St3*-pNST262+ tandem structure at high frequency. Thereafter, integrants were cultivated for 100 generations in HJL broth without erythromycin and clones were isolated. Some clones sensitive to erythromycin were recovered. Analyses have confirmed that these clones derive from CNRZ385 and that most of them are cured of ICE*St3*.

1. Bellanger X, *et al*. (2009) Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 191:2764-75.

2. van de Guchte, M., J. M. van der Vossen, J. Kok, and G. Venema (1989) Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* 55:224-8.

Supplementary Figures

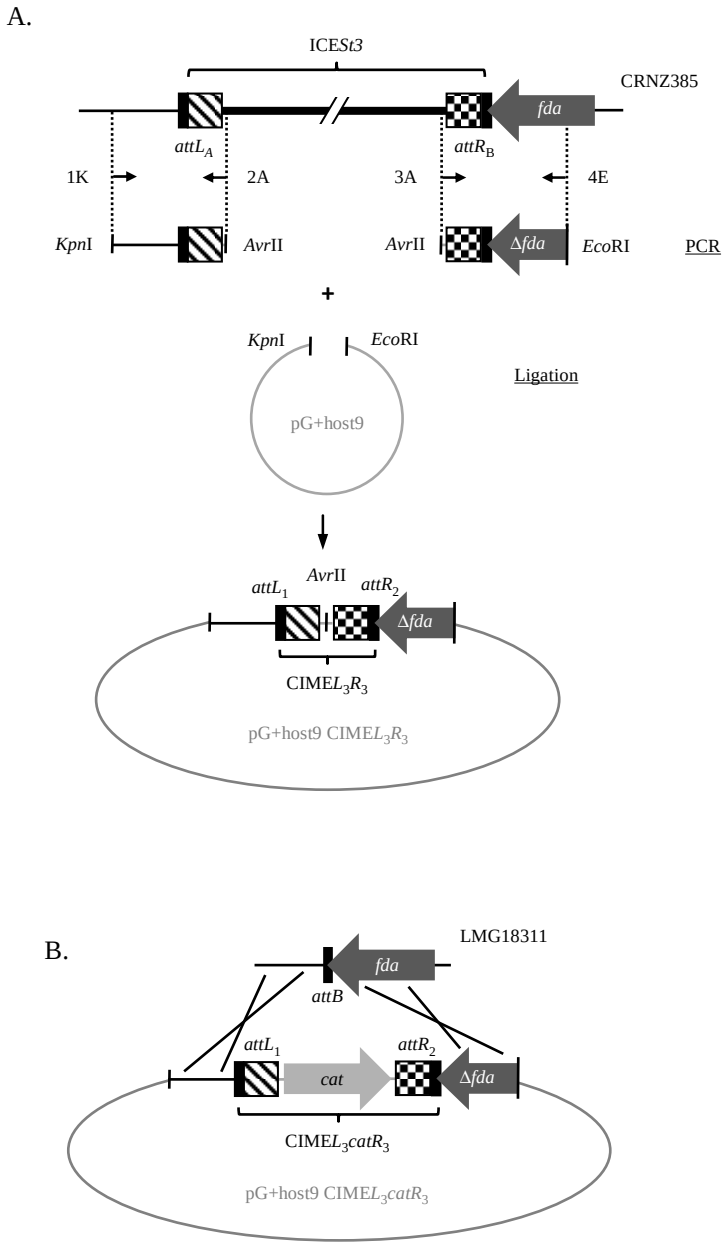


Figure S1. Schematic representation of the construction of the *S. thermophilus* LMG18311 CIME385*cat* strain. (A.) The *attL* and the *attR* sites from ICE*St3* and their flanking regions were amplified from the WT strain CNRZ385 with primers carrying restriction enzymes sites, digested by these enzymes, and joined by ligation together and with pG$^+$host9 digested by the appropriate enzymes (1). The resulting plasmid carried a *cis*-

mobilizable element (CIME) flanked by the *attL* and *attR* sites from ICE*St3* and named CIMEL_3R_3. Thereafter, the *Spe*I restriction fragment carrying the chloramphenicol (*cat*) resistance gene from the plasmid pSET5s was ligated within the digested *Avr*II restriction site located between the attachment sites in obtain a tagged CIME (2). The localization of the primers CIME.1K, CIME.2A, CIME.3A and CIME.4E are indicated by the symbols 1K, 2A, 3A and 4E, respectively. The restriction enzymes whose sites were introduced in the primers in order to clone the PCR fragments are specified. The sequence of these primers is indicated in Table S2. Whereas the attachment sites of these elements are identical, letters (A, B) and numbers (1, 2) are used in index to discriminate the *att* site of ICE*St3* and CIMEL_3catR_3, respectively. All the ligation mixes were transformed into the *Escherichia coli* EC101 strain. (B.) The plasmid pG$^+$host9 CIMEL_3catR_3 was introduced in the WT *S. thermophilus* LMG18311 strain devoid of element integrated in the *attB* site by electroporation. Thereafter, 2 crossovers, one per CIMEL_3catR_3 flanking sequence, were selected in order to replace the *attB* site by the CIME (3).

1. Maguin, E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, and A. Gruss (1992) New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 174:5633-8.

2. Takamatsu, D., M. Osaki, and T. Sekizaki (2001) Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* 46:140-8.

3. Thibessard, A, *et al*. (2004) Identification of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 genes involved in defense against superoxide stress. *Appl Environ Microbiol* 70:2220-9.

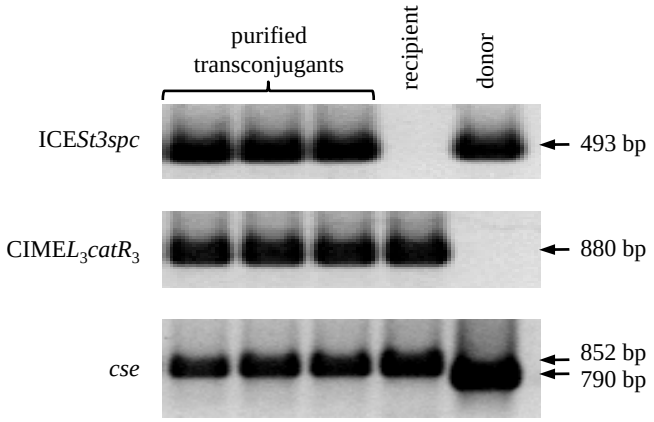
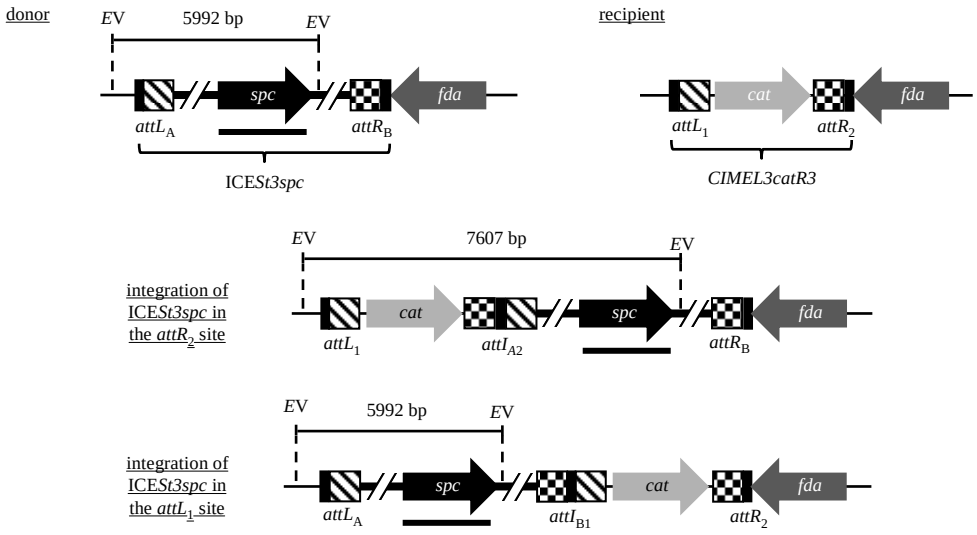


Figure S2. Characterization by PCR of ICE*St3spc* transconjugants deriving from *S. thermophilus* LMG18311 CIMEL_3catR_3. CNRZ385 ICE*St3spc* and LMG18311 CIMEL_3catR_3 were used as the donor and the recipient, respectively. The line named ICE*St3spc* indicates the amplification of a fragment of the regulation module (1). The line named CIMEL_3catR_3 indicates the amplification of a fragment of the *cat* gene used to tag CIMEL_3R_3. The *cse* gene, specific to *S. thermophilus*, carries a central part that is highly variable in size and sequence between *S. thermophilus* strains (2). The amplification of the central part of this gene (line named *cse*) indicates that the transconjugants derived from the recipient. The size of the PCR fragments are deduced from sequence analysis and confirmed by co-migration with a DNA ladder. The primer pairs used for these amplifications are indicated in the table S1.

1. Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guédon G (2009) Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*.191:2764-75.

2. 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* 90:245-55.

A.



B.

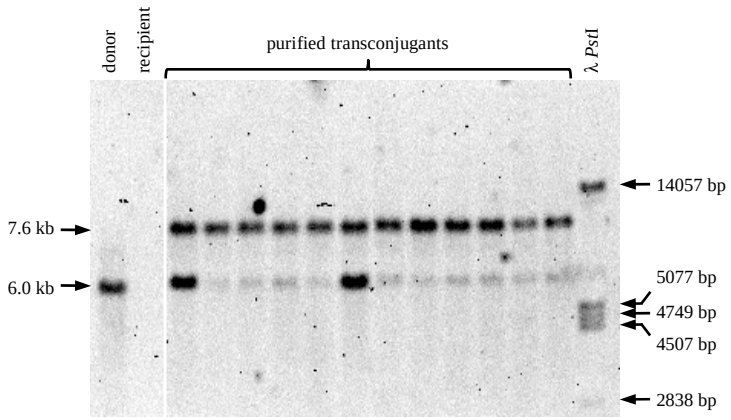


Figure S3. Characterization of the ICE*St3spc* integration sites in transconjugants deriving from LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$ by DNA-DNA hybridization. (A.) Schematic representation of *Eco*RV (*E*V) DNA fragments revealed by the *spc* probe. The DNA fragments from the donor, the recipient and the expected transconjugants are indicated. The region where the probe specific to the *spc* gene hybridizes is indicated by a black thick line. (B.) Southern blot analysis of the genomic DNA extracted from 12 purified transconjugants, the recipient and the donor digested by *Eco*RV and hybridized with the *spc* probe. The λ phage DNA digested by *Pst*I was used as ladder. The size of the restriction fragments are

deduced from co-migration with a DNA ladder. The donor and the recipient strains are CNRZ385 ICE*St3spc* and LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$, respectively.

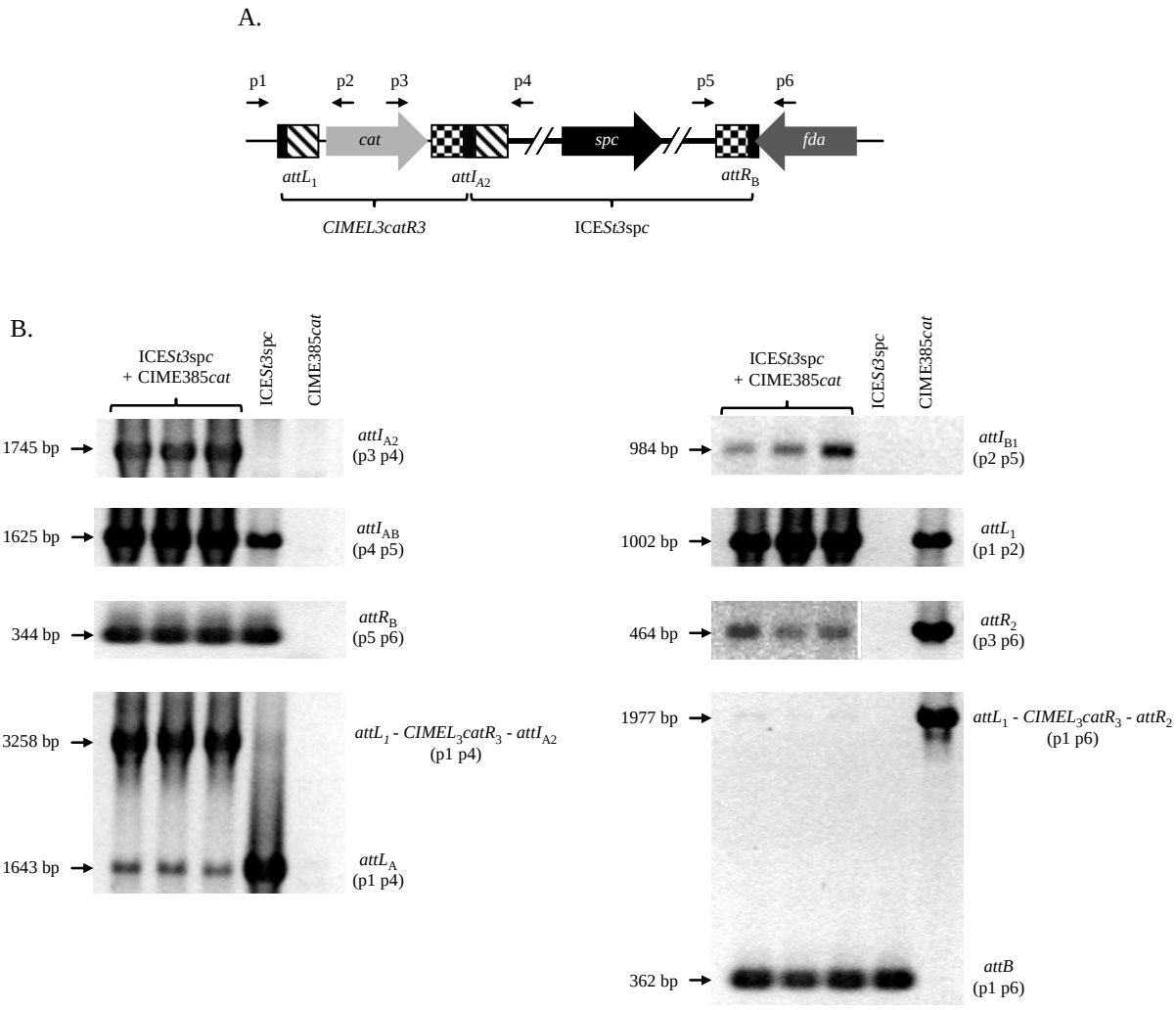


Figure S4. Amplification by PCR of the different attachment sites resulting from the dynamics of the CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* tandem. (A.) Localization of the primers used in the PCRs in the CIME*L*$_3$*catR*$_3$/ICE*St3spc*/*fda* tandem structure. The other forms described in the figure 2 are not represented (B.) The columns named ICE*St3spc* and CIME*L*$_3$*catR*$_3$ correspond to PCR amplifications performed on genomic DNA from the strains CNRZ385 ICE*St3spc* and LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$, respectively. The columns named ICE*St3spc* + CIME*L*$_3$*catR*$_3$ correspond to PCR amplifications performed on genomic DNA from three independent ICE*St3spc* transconjugants of LMG18311 CIME*L*$_3$*catR*$_3$. The line names indicate the amplification of a fragment carrying the corresponding attachment site. Some PCR fragments also carry CIME*L*$_3$*catR*$_3$ which is 1615 bp long. The size of the PCR fragments are

deduced from sequence analysis and confirmed by co-migration with a DNA ladder. The classes of primer pairs used for these amplifications are reported in brackets. The $attI_{12}$ site resulting from the CIMEL_3catR_3 excision was not amplified by PCR. All the other sites represented in the figure 2 were detected.

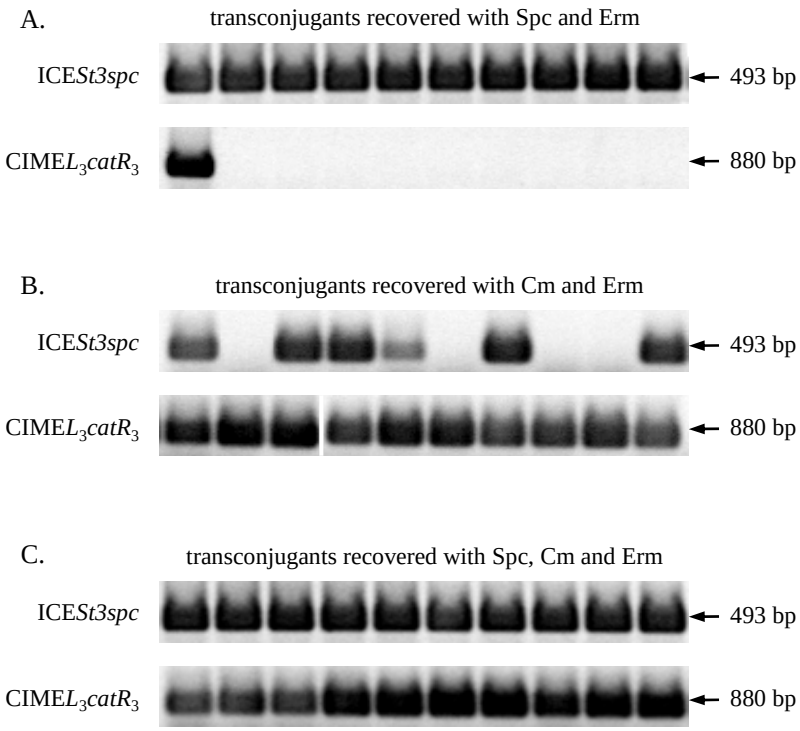


Figure S5. Detection by PCR of the elements transferred from a donor strain carrying the ICE*St3spc* CIMEL_3catR_3 tandem structure. (A.) Analysis of ten purified transconjugants recovered on medium containing spectinomycine (Spc) and erythromycin (Erm). (B.) Analysis of ten purified transconjugants recovered on medium containing chloramphenicol (Cm) and erythromycin (Erm). (C.) Analysis of ten purified transconjugants recovered on medium containing spectinomycine (Spc), chloramphenicol (Cm) and erythromycin (Erm).

LMG18311 ICE*St3spc* CIMEL_3catR_3 and CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e were used as the donor and the recipient, respectively. The resistances to spectinomycine, to chloramphenicol and to erythromycin are conferred by the *spc*, *cat* and *ermB* genes, respectively. The *ermB* gene is carried by the non-mobilizable plasmid pMG36e. The line named ICE*St3spc* indicates the amplification of a fragment of the regulation module of the ICE (1). The line named CIMEL_3catR_3indicates the amplification of a fragment of the *cat* gene used to tag CIMEL_3R_3. The amplification of an internal fragment of the *cse* gene has confirmed that all these clones

derived from the recipient strain (data not shown). The size of the PCR fragments are deduced from sequence analysis and confirmed by co-migration with a DNA ladder. The primer pairs used for these amplifications are indicated in the table S1.

1. Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guédon G (2009) Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol*.191:2764-75.

Supplementary Tables

Table S1. Strains and plasmid used in this study

Strains or plasmids	Relevant phenotype or genotype	Reference
Strains		
LMG18311	Wild-type strain, no element integrated in the *fda* locus	BCCM/LMG
CNRZ385	Wild-type strain carrying ICE*St3*	INRA-CNRZ
CNRZ385 ICE*St3spc*	CNRZ385 strain carrying ICE*St3* tagged with the *spc* gene inserted in the pseudogene Ψ*orf385J*, Spc^r	(1)
CNRZ385 ICE*St3cat*	CNRZ385 strain carrying ICE*St3* tagged with the *cat* gene inserted in the pseudogene Ψ*orf385J*, Cm^r	(1)
LMG18311 CIMEL_3*cat*R_3 *	LMG18311 strain carrying CIMEL_3*cat*R_3 integrated in the *fda* locus, Cm^r	This work
LMG18311 ICE*St3cat* †	LMG18311 strain carrying ICE*St3* tagged with the *cat* gene inserted in the pseudogene Ψ*orf385J*, Cm^r	This work
CNRZ385 ΔICE*St3* †	ICE*St3*-cured CNRZ385 strain	This work
Plasmids		
pMG36e	3.4 kb, replication origin from pWV01, Erm^r	(2)
pG+host9	3.8 kb, pWV01-type thermosensitive replication origin from pVE6002, Erm^r	(3)
pSET5s	4.4 kb, pWV01-type thermosensitive replication origin from pVE6002, *LacZ'*, Cm^r	(4)
pNST262+	6.1 kb, plasmid deriving from pG+host9 carrying the P6 constitutive promoter from pTRK398/θH upstream of the *xis* and *int* genes and the *attR* site from ICE*St1*. + indicates that the genes are in forward orientation compared to the promoter.	(1)
pNST269+	5.9 kb, plasmid deriving from pG+host9 carrying the P6 constitutive promoter from pTRK398/θH upstream of the *xis* and *int* genes from ICE*St1*. + indicates that the genes are in forward orientation compared to the promoter.	This work

* The construction of this strain is described in figure S1.

† The construction of these strains is described in SI text.

1. Bellanger X, *et al*. (2009) Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 191:2764-75.

2. van de Guchte, M., J. M. van der Vossen, J. Kok, and G. Venema (1989) Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* 55:224-8.

3. Maguin, E., P. Duwat, T. Hege, D. Ehrlich, and A. Gruss (1992) New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 174:5633-8.

4. Takamatsu, D., M. Osaki, and T. Sekizaki (2001) Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* 46:140-8.

5. Thibessard, A, *et al*. (2004) Identification of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 genes involved in defense against superoxide stress. *Appl Environ Microbiol* 70:2220-9.

Table S2. Primers used for the construction of the plasmids and the amplification of fragments carrying the expected attachment sites.

Primer	Sequence* (5'-3')	Utilization †
CIME.1K	AGCCATTTACAAAGGACAATT	amplification of the ICE*St3* $attL_A$ and flanking region
CIME.2B	CGAACCTAGGCAAGTGCATACACCTGAGTT	amplification of the ICE*St3* $attL_A$ and flanking region
CIME.3B	AAAACCTAGGACACAATAAGTGTGGCAAAT	amplification of the ICE*St3* $attR_B$ and flanking region
CIME.4E	CGGAATTCAAGCTCCAGTACTTATCCAA	amplification of the ICE*St3* $attR_B$ and flanking region
O132.3	GGACTACTAAGAGAACAT	amplification of the ICE*St3* and CIME385*cat* *attL* sites and *attB* (p1)
O131.2	TGTTGCTGAATACGAAGC	amplification of the ICE*St3* and CIME385*cat* *attR* sites and *attB* (p6)
cat2	TAAAAGTCGTTTGTTGGTTC	amplification of the CIME385*cat* $attI_{12}$ and $attL_1$ sites (p2)
cat1	ATGAGATAATGCCGACTGTA	amplification of the CIME385*cat* $attI_{12}$ and $attR_2$ sites (p3)
385.37	GATTTGTTCGTCTGACC	amplification of the ICE*St3* $attI_{AB}$ and $attL_A$ sites (p4)
O131.5	CAGGAATCGATATTGACA	amplification of the ICE*St3* $attI_{AB}$ and $attR_B$ sites (p5)
spc_for	CGTGACTGGCAAGAGATATT	amplification of a fragment of the *spc* gene
spc_rev	TCCAAGATAACTACGAACTGC	amplification of a fragment of the *spc* gene
cat_for	GCAGACAAGTAAGCCTCCTA	amplification of a fragment of the *cat* gene
cat_rev	GAGGCTCAACGTCAATAAAG	amplification of a fragment of the *cat* gene
O3.A1.1H	CCCAAGCTTCTCTCAATCGAATAGCTACC	amplification of a fragment of the ICE*St3* regulation module
O3.A1.2E	GGAATTCTTAGAGGTGTAAGTTAGGAGAA	amplification of a fragment of the ICE*St3* regulation module
for var	CTGTAGTAGCAGAATCTAAC	amplification of the *var* region of the *cse* gene from *S. thermophilus* (1)
rev var2	GCACTAGCAATCCAGTCTT	amplification of the *var* region of the *cse* gene from *S. thermophilus* (1)

* Restriction enzyme sites used for molecular cloning are underlined.

† The letters “p” followed by a number indicate the location of the primers in Figure S4.

1. 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* 90:245-55.

C. Discussion

Le modèle original d'évolution des îlots génomiques intégrés dans l'extrémité 3' du gène *fda* de *S. thermophilus* par accrétion site-spécifique et mobilisation en *cis,* élaboré lors d'une précédente étude, a constitué le point de départ de ce travail. Deux de ces îlots, ICE*St1* et ICE*St3* portaient un module de recombinaison fonctionnel et des modules de conjugaison et de régulation putatifs ; ils constituaient donc des éléments intégratifs potentiellement conjugatifs ou ICE putatifs. Trois autres îlots qui dérivaient d'ICE par délétion de fragments internes et pouvaient être des éléments mobilisables en *cis* (CIME putatifs) selon un nouveau mécanisme.

La première étape de ce travail a été de démontrer le transfert conjugatif d'ICE*St1* et d'ICE*St3*. Ces travaux ont permis de démontrer qu'ICE*St3* peut se transfèrer par conjugaison vers diverses souches de *S. thermophilus* et vers au moins deux autres espèces, *S. pyogenes* et *En. faecalis*, suggérant qu'il pourrait être impliqué dans des transferts horizontaux inter-espèces. Cependant, un seul transconjugant d'ICE*St1* a été obtenu, laissant planer quelques doutes sur le caractère conjugatif de cet élément. Ces ICE sont les premiers éléments conjugatifs identifiés et caractérisés chez *S. thermophilus*.

Une étude des mécanismes mis en jeu dans la régulation de l'excision et du transfert de ces éléments a permis de démontrer que l'excision et le transfert d'ICE*St3* étaient induits par un agent endommageant l'ADN. Un régulateur de type cI est impliqué dans cette régulation et dans une immunité de surconjugaison codée par ICE*St1* envers ICE*St3*. De plus, un phénomène original d'immunité lié à la spécificité de recombinaison, l'immunité de cible, a été mis en évidence et décrit.

L'analyse des transconjugants a démontré l'accrétion site-spécifique d'ICE*St3* avec les deux ICE et les trois CIME analysés. Les modalités de ce phénomène varient en fonction des éléments impliqués. L'étude des structures résultant de ces accrétions a révélé une forte plasticité des structures qui peut conduire à l'instabilité des éléments qui les constituent. L'accrétion peut également conduire non seulement au cotransfert des ICE et CIME par mobilisation en *cis* comme cela était prédit par le modèle mais aussi au transfert et maintien du seul CIMEL_3catR_3, voire à la capture du CIME par les cellules donatrice porteuse d'un ICE. Globalement, ces données démontrent pour la première fois l'accrétion site-spécifique et révèle l'existence d'une nouvelle classe d'éléments mobiles non autonomes, les CIME. De plus, l'analyse des données bibliographiques parues pendant ce travail suggère que l'accrétion des ICE et éléments apparentés joue un rôle clé dans l'évolution des îlots génomiques et plus généralement dans celle des génomes bactériens.

1 Transfert d'ICE*St1* et d'ICE*St3*

1.1 ICE*St3* est un élément conjugatif

ICE*St3* se transfère vers diverses souches *S. thermophilus*, une souche de *S. pyogenes* et une souche d'*En. faecalis* L'ajout de DNAse lors de plusieurs expériences de conjugaisons sur filtre utilisant *S. thermophilus* CNRZ385 ICE*St3cat* comme donatrice et *S. thermophilus* LMG18311 pMG36e comme réceptrice n'a pas provoqué de variation statistiquement significative de la fréquence de transfert. De plus, lorsque les cellules donatrices et réceptrices sont séparées par un filtre de nitrocellulose, aucun transconjugant potentiel n'est obtenu. Ces données démontrent donc que la très grande majorité des événements de transfert d'ICE*St3* ne nécessite pas la présence d'ADN dans le milieu extracellulaire et qu'un contact cellule-cellule est nécessaire. Cet élément se transfère donc par conjugaison.

De plus, le re-transfert d'ICE*St3* a été obtenu à partir de transconjugants de plusieurs souches de *S. thermophilus* et d'une souche de *En. faecalis* suggérant très fortement que cet élément est autonome.

Enfin, les études menées chez *S. pyogenes* et *En. faecalis* n'ont jamais montré que ces espèces sont naturellement compétentes (Bourgogne *et al.*, 2008; Kehoe *et al.*, 1996). De plus, les séquences chromosomiques se situant en aval de l'extrémité 3' du gène *fda* ne sont pas apparentées entre *S. thermophilus* et les espèces *S. pyogenes* et *En. faecalis* utilisées comme réceptrices lors d'expériences de transfert inter-espèce d'ICE*St3*. Ainsi, l'acquisition d'ICE*St3* par transformation lors des expériences de transfert inter-espèce est également très peu probable.

L'ensemble de ces données démontre qu'ICE*St3* est un ICE fonctionnel, le premier caractérisés chez *S. thermophilus* et qu'il est capable de se transférer vers d'autres espèces.

De nombreux événements de transferts horizontaux récents entre *S. thermophilus* et *L. lactis* ont été mis en évidences par diverses analyses de séquences (Bourgoin *et al*., 1999 ; Guédon *et al*., 1995 ; Bourgoin *et al*., 1996 ; Solow and Somkuti, 2001). Les éléments génétiques mobiles ou les mécanismes à l'origine de ces transferts sont inconnus. Cependant, un transconjugant d'ICE*St3* dérivant de *L. lactis* a été obtenu lors de ce travail. Cet ICE pourrait donc être impliqué dans les échanges de gènes entre ces deux espèces.

1.2 ICE*St1* : un ICE fonctionnel?

Un seul transconjugant d'ICE*St1* ayant été obtenu, un fort doute subsiste quant à la fonctionnalité de cet ICE. Bien que les séquences nucléotidiques des modules de conjugaison et de recombinaison d'ICE*St1* et d'ICE*St3* soient identiques à plus de 95 % (Figure 11) et que

les protéines codées par ces modules soient très étroitement apparentées, la fréquence de transfert intra-espèce maximale de ces deux ICE, respectivement inférieure à 10^{-9} et $3{,}0 \times 10^{-5}$, est très différente. La protéine OrfE d'ICE*St1* (125 aa) est plus courte que la protéine OrfE d'ICE*St3* (136 aa) en raison d'un décalage de phase de lecture dans l'extrémité 3' de l'ORF présente chez ICE*St1*. La comparaison de la séquences de la protéine OrfE d'ICE*St3* avec celle des protéines homologues codées par l'ICE putatif apparenté RD2 de *S. pyogenes* M28 (Green *et al.*, 2005) et les ICE putatifs apparentés intégrés dans $tRNA^{Lys}$ chez plusieurs souches de *S. agalactiae* (Brochet *et al.*, 2008a) montrent un fort pourcentage d'identité jusqu'à la fin de la séquence de 136 aa. En conséquence, bien qu'aucun domaine n'ait été identifié dans la protéine OrfE, la protéine tronquée d'ICE*St1* pourrait ne pas être fonctionnelle. Cela pourrait expliquer, au moins en partie, que cet ICE se transfère à très faible fréquence.

De plus, bien que le contact cellule-cellule ait été établi sur filtre lors de l'expérience ayant conduit à l'obtention de l'unique clone dérivant de LMG18311 et ayant acquis ICE*St1*, cette expérience a été réalisée en absence de DNAse. Il n'est donc pas exclu que ce transfert soit dû à une acquisition d'ICE*St1* par transformation. En effet, la souche réceptrice utilisée, *S. thermophilus* LMG18311, a très récemment été montrée comme étant naturellement transformable (Gardan *et al.*, 2009). Cependant, l'état de compétence ne semble pas être développé par *S. thermophilus* dans le milieu riche LM17 qui est celui utilisé pour les transferts sur filtre d'ICE*St1* et d'ICE*St3*. Il apparaît donc très probable que l'acquisition d'ICE*St1* par ce clone dérivant de LMG18311 ait été due au transfert conjugatif de cet élément.

1.3 Spectre de transfert

L'obtention d'un transconjugant d'ICE*St1* ou d'ICE*St3* nécessite trois étapes : l'excision de l'ICE chez une donatrice, son transfert par conjugaison vers une réceptrice puis son intégration dans un réplicon de cette dernière. Chacune de ces étapes pourraient être limitantes. Cependant, aucune évidence ne permet d'affirmer que l'excision d'ICE*St1* ou d'ICE*St3* ne soit impliquée dans l'efficacité du transfert conjugatif de ces éléments. Le transfert conjugatif de ces éléments et leur intégration chez la réceptrice apparaissent donc comme les étapes limitantes les plus probables.

Les protéines CwlT et CsiA sont respectivement codées par un gène appartenant aux modules de conjugaison d'ICE*Bs1* de *B. subtilis* et de l'ICE de *L. lactis* appelé « facteur sexuel ». Ces enzymes portent toutes deux un domaine CHAP ayant une activité d'hydrolase du peptidoglycane (Fukushima *et al.*, 2008; Stentz *et al.*, 2009). CwlT porte également un domaine ayant une activité d'hydrolase du peptidoglycane nommé SLT tandis que CsiA porte

un domaine qui séquestre un précurseur de la synthèse du peptidoglycane, empêchant ainsi sa synthèse. Si la fonction biologique de CwlT dans le transfert d'ICE*Bs1* n'a pas été étudiée, la délétion du gène codant CsiA abolit le transfert du facteur sexuel (Stentz *et al.*, 2009). Plusieurs autres hydrolases du peptidoglycane codées par des T4SS ou des modules de conjugaisons de bactéries Gram négatives interviennent de manière importante dans la sécrétion protéique ou la conjugaison (Koraimann, 2003).

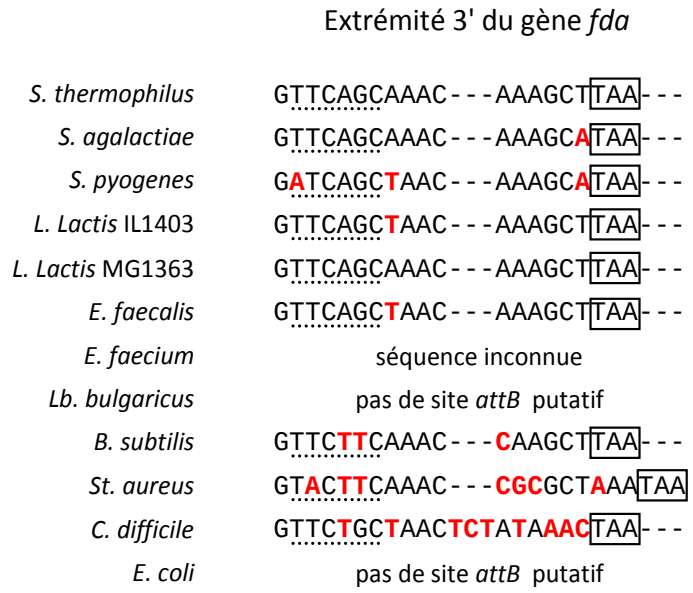
Le gène *orfA* des modules de conjugaison d'ICE*St1* et d'ICE*St3* code une protéine putative portant comme seul domaine identifié un domaine CHAP (Pavlovic *et al*., 2004 ; Figure 9). L'étude des protéines CwlT, CsiA et de leurs homologues fonctionnels chez plusieurs T4SS et modules de conjugaisons suggèrent fortement qu'OrfA jouerait un rôle important dans le transfert d'ICE*St3*. Ainsi, cette protéine pourrait permettre la mise en place correcte du pore de conjugaison entre cellules donatrices et réceptrice. L'activité des protéines CwlT, CsiA et de leurs homologues fonctionnels n'a été étudiée que chez les cellules donatrices. Cependant, l'étude de la mise en place du pore de conjugaison chez les bactéries Gram négative a montré que des protéines sont synthétisées chez la cellule donatrice puis transportées dans la paroi de la cellule réceptrice (Funnell, 2004; Rees and Wilkins, 1990). Ainsi, une structure trans-enveloppe ressemblant au moins partiellement à celle présente dans la paroi de la donatrice serait mise en place dans la paroi de la structure réceptrice (Figure 5). Bien que cela ne soit pas évoqué dans la littérature, il semble donc probable que les hydrolases du peptidoglycane qui interviennent dans la mise en place du pore chez la donatrice interviennent également dans la mise en place de la structure présente chez la réceptrice. Ces enzymes seraient donc actives sur le peptidoglycane des deux cellules. Seul de très rares études présentent l'analyse de l'activité d'une hydrolase du peptidoglycane sur la paroi de plusieurs espèces. Ainsi, la protéine Aml de *Streptococcus mutans* n'est active que sur la paroi de cette espèce et de l'espèce très proche phylogénétiquement *Streptococcus sobrinus* alors qu'elle ne présente aucune activité sur la paroi des autres streptocoques (Yoshimura *et al.*, 2006). Le spectre d'activité de l'hydrolase du peptidoglycane putative OrfA d'ICE*St3* pourrait donc déterminer, au moins en partie, le spectre de transfert de cet ICE.

Le plasmide pNST260+ portant le gène de l'intégrase et le site *attI* d'ICE*St1* (Figure 17) a été introduit chez différentes souches réceptrices utilisées lors des essais de conjugaison inter-espèce. Ce plasmide présente une forte efficacité d'intégration chez *S. thermophilus*, *L. lactis* et *En. faecalis* mais s'intègre peu efficacement chez *B. subtilis* et *St. aureus*. La séquence de l'extrémité 3' du gène *fda* chez ces deux dernières espèces diffèrent nettement de la séquence homologue présente chez *S. thermophilus* (Figure 46). Cette divergence est notamment importante dans la séquence homologue à la séquence de 6 pb identifiée lors de ce travail comme étant le substrat de la coupure décalée catalysée par l'intégrase d'ICE*St1* (Figure 46). Une séquence trop éloignée de la séquence de 6 pb de *S. thermophilus* pourrait constituer un mauvais substrat pour l'intégrase d'ICE*St1*. L'efficacité d'intégration du plasmide pNST260+ semble donc dépendre de la divergence de la séquence

du site *attB* putatif par rapport à la séquence de *S. thermophilus* et/ou de la nature de l'espèce. Par ailleurs, les séquences nucléotidiques des modules de recombinaison d'ICE*St1* et d'ICE*St3* sont identiques à près de 99 %. L'ensemble de ces données suggère qu'ICE*St3* se comporte de la même manière que pNST260+ chez les réceptrices testées bien que le gène *int* qu'il porte ne soit pas surexprimé.

En outre, bien que la séquence consensus des promoteurs et RBS des diverses *Firmicutes* soient identiques ou très similaires (Helmann, 1995; Morrison and Jaurin, 1990; Rocha *et al.*, 1999), l'efficacité de fixation des différentes protéines d'une cellule réceptrice sur les opérateur(s), promoteur(s) et RBS du gène de l'intégrase des ICE de *S. thermophilus* n'est pas connue. Ainsi, une expression moindre de ce gène chez une espèce réceptrice par rapport à celle obtenue chez *S. thermophilus* pourrait être impliquée dans une faible efficacité d'intégration de l'ICE entrant.

Le spectre de transfert d'ICE*St3* pourrait donc, non seulement être limité par un défaut de mise en place du pore de conjugaison, mais également par une faible efficacité d'intégration chez certaines espèces.



<u>Figure 46</u> : Comparaison des séquences provenant de plusieurs souches réceptrices et homologues aux dernières 17 pb de l'ORF *fda* de *S. thermophilus*.

Le codon stop des ORF *fda* est encadré. Les nucléotides qui divergent par rapport à la séquence de *S. thermophilus* sont en gras et en rouge. Les 6 nucléotides soulignés représentent la séquence de *S. thermophilus* subissant la coupure décalée catalysée par l'intégrase d'ICE*St1* ou ces homologues. Les séquences indiquées sont celles des souches séquencées. Seul un des deux allèles de *St. aureus*, le plus courant dans les bases de données, est représenté. La séquence du second allèle de *St. aureus* diverge plus de la séquence de *S. thermophilus* que celui représenté puisque l'adénine en position 8 est remplacée par une thymine. Les autres séquences disponibles dans bases de données sont identiques pour chaque espèce. La séquence de l'extrémité 3' du gène *fda* d'*En. casseliflavus* n'est pas disponible dans bases de données. Les séquences de l'extrémité 3' du gène *fda* de *Lb. bulgaricus* et *E. coli* ne présentent pas d'homologies significatives avec celle de *S. thermophilus*.

2 Régulation des ICE de *S. thermophilus*

2.1 *arp1* d'ICE*St1*/ICE*St2* : un répresseur de type cI

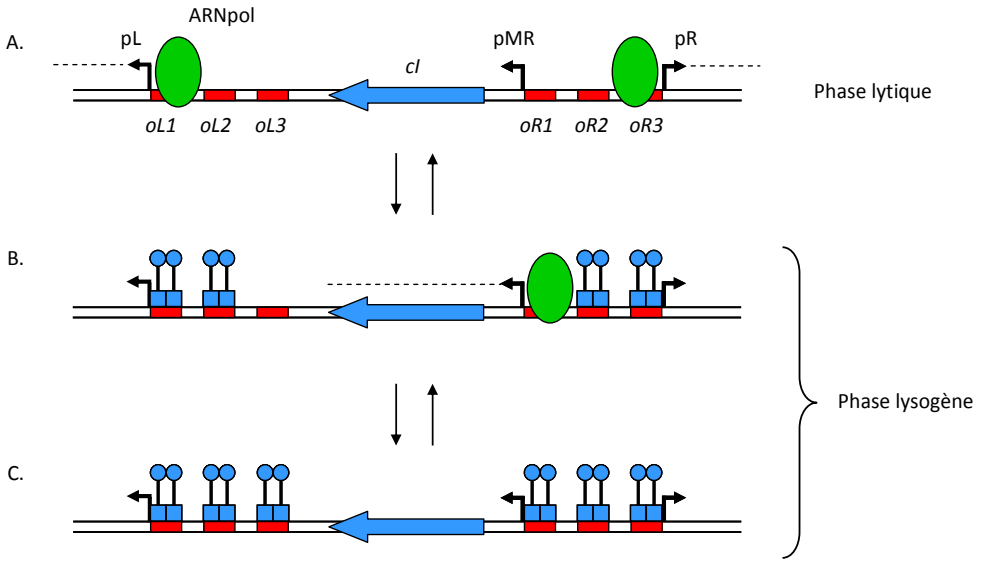
Un ICE est par définition un élément qui s'excise et qui s'intègre. Dans une cellule, un ICE va subir de très nombreux cycles d'intégration et d'excision successifs. Ainsi, la culture d'une cellule portant un ICE va conduire à l'obtention d'un mélange de population constitué de cellules portant, à un temps *t*, l'ICE sous différentes formes : intégré ou circulaire. Des clones ayant été délétés de l'ICE par perte de la forme circulaire lors des divisions cellulaires peuvent également faire partie de la population. La proportion relative de forme circulaire d'un ICE, c'est-à-dire le nombre de copie circulaire de l'ICE par génome, est la résultante de deux fréquences : la fréquence d'excision de l'élément et sa fréquence d'intégration (Figure 3). Chez un ICE codant une recombinase à tyrosine, l'intégrase intervient seule dans les événements d'intégration tandis que l'excision nécessite, en plus de l'intégrase, la présence de l'excisionase.

La délétion du gène *arp1* chez *S. thermophilus* CNRZ368 entraîne une augmentation de la proportion relative des formes circulaires d'ICE*St1* et d'ICE*St2* d'environ respectivement un facteur 1000 et un facteur 100. Le gène *arp1* est donc un répresseur de l'excision de ces deux ICE. Néanmoins, la séquence cible de la protéine Arp1 étant inconnue, les gènes régulés par ce répresseur n'ont pas été identifiés. De plus, si les souches CNRZ368 ΔICE*St1* et CNRZ385 ΔICE*St3* ont été délétées de leur ICE grâce à l'utilisation du plasmide pNST262+ surexprimant les gènes de l'intégrase et de l'excisionase (Figure 17, Article 3), *Mezorhizobium loti* R7A a été délétée d'ICE*MlSym*^{R7A} grâce à un plasmide ne surexprimant que le gène de l'excisionase de cet élément (Ramsay *et al.*, 2006). Le phénotype observé après la délétion du gène *arp1* chez ICE*St1*/ICE*St2* peut donc être dû à un impact sur l'expression de l'excisionase ou de l'intégrase et de l'excisionase.

Si la répression de l'excision d'ICE*St1* et d'ICE*St2* a été partiellement levée en réponse aux traitements à la mitomycine C, ces mêmes traitements n'ont pas ou peu eut d'impact sur l'excision de ces ICE délétés du gène *arp1*. Le répresseur Arp1 est donc impliqué dans la dérépression d'ICE*St1* et d'ICE*St2* par la mitomycine C, ce qui fait très probablement de lui une protéine dont le domaine autocatalytique est fonctionnel. Ainsi, le gène *arp1* serait bien un répresseur de type cI.

Les protéines de type cI activent généralement leur propre transcription et inhibent l'expression des gènes activateurs de l'élément (Figure 47) (Oppenheim *et al.*, 2005 ; Beaber and Waldor, 2004). Elles se fixent sous forme de dimères sur des séquences opératrices constituées de répétitions inversée imparfaites. Ces répétitions, au nombre de douze chez le phage λ (Figure 47), ne sont pas facilement identifiables lors d'une analyse sans à priori de la séquence de cet élément. Des répétitions similaires pouvant jouer le rôle d'opérateurs pour

la protéine Arp1 d'ICE*St1*/ICE*St2* ont été recherchées dans les régions comprenant les promoteurs putatifs des modules de régulation, de conjugaison et de recombinaison (Figures 20 et 21). Aucune série de répétitions pouvant jouer un tel rôle n'a été identifiée. Ceci suggère fortement que les répétitions imparfaites formant les opérateurs d'Arp1 sont fortement dégénérées comme dans le cas du phage λ (Dodd *et al.*, 2005).



<u>Figure 47</u> : **Représentation schématique de l'implication du répresseur cI dans la régulation du phage λ** (d'après Oppenheim *et al.*, 2005)**.**

En phase lysogène, les dimères de protéines cI en faible concentration se fixent sur les opérateurs *oL1*, *oL2*, *oR2* et *oR3* (B.). Ces fixations entraînent l'activation du promoteur du gène cI, pMR, et l'inactivation des promoteurs pR et pL contrôlant la phase lytique. La protéine cI réprime donc la majorité des gènes du phage λ mais active la transcription de son propre gène. Lorsque les dimères de protéines cI sont en forte concentration, ils se fixent également sur les opérateurs de plus faible affinité *oL3* et *oR3* (C.) Cela entraîne la répression du promoteur pMR. A la suite d'une suite d'événements stochastiques ou de dommages à l'ADN, la concentration de protéines cI peut devenir trop faible pour assurer l'activation du promoteur pMR et la répression des promoteurs pL et pR (A.). Le phage entre alors en phase lytique.
Les symbolismes suivant sont utilisée : rectangle rouge, opérateur ; ovale vert, ARN polymérase ; flèche bleue, gène *cI* ; flèche noire cassée, promoteur ; ligne pointillée, transcrit ; carré surmonté d'un cercle, protéine cI.

2.2 ARP1, REPRESSEUR DE L'EXCISION

La première approche utilisée pour étudier le gène *arp1* d'ICE*St3* a montré que l'interruption de ce gène par l'insertion d'un plasmide dérivant du vecteur pG$^+$host9 est très instable. Cela suggérait que le gène *arp1* d'ICE*St3* est fonctionnel et que sa mutation est fortement contre-sélectionnée. La seconde approche employée a donc été le remplacement de l'ORF *arp1* par la cassette *cat* de résistance au chloramphénicol (Figure 27). L'idée sous-jacente à ce remplacement était de pouvoir compenser l'effet sur la valeur adaptative de la perte d'*arp1* par l'acquisition du gène *cat*. Les trois mutants indépendants analysés de la souche CNRZ385 *arp1*::*cat* ont présenté un temps de génération plus élevé que la souche sauvage.

Par ailleurs, la proportion de formes circulaires d'ICE*St3* sauvage par génome est de 0,9 x 10^{-3} (Pavlovic *et al.*, 2004). Si, comme pour ICE*St1*, la mutation d'*arp1* entraîne une augmentation du nombre de copie circulaire de l'ICE par génome d'environ un facteur 1000, la fréquence d'excision d'ICE*St3 arp1*::*cat* ne sera pas très différente de 1,0 x 10^0. Lorsqu'un ICE s'excise à trop haute fréquence, il peut être rapidement perdu par dilution lors des divisions cellulaires. ICE*St3* porte deux gènes codant une méthyltransférase putative (*orf385F* et *orf385G*) et deux gènes codant une enzyme de restriction putative (*orf385D* et *orf385E*) constituant un ou deux systèmes RM potentiels (Figure 9). Or, l'étude de la stabilité des tandems ICE-ICE et ICE-CIME a montré que les descendants des cellules portant un tandem héritent toujours d'au moins une copie d'ICE*St3*. Ceci suggère qu'au moins le (ou l'un des deux) système(s) RM putatif(s) de type II porté(s) par ICE*St3* serait fonctionnel et qu'il pourrait également avoir une fonction de système toxine-antitoxine. Dans ce cas, la perte d'ICE*St3 arp1*::*cat* à haute fréquence entraînerait une mortalité cellulaire importante dans la descendance des cellules portant cet ICE muté. Au fil des générations, les clones présentant des mutations compensatoires qui stabiliseraient l'élément seraient sélectionnés positivement puisque des telles mutations augmenteraient la survie de leur descendance. L'apparition de mutations de ce type pourrait expliquer que chez deux des clones de CNRZ385 *arp1*::*cat*, ICE*St3* s'excise moins que chez la souche sauvage (Figure 28). L'apparition, dans chacun des trois clones de CNRZ385 *arp1*::*cat*, de mutations de nature et de phénotype différents expliquerait également qu'ICE*St3* se comporte de manière distincte dans ces souches.

Néanmoins, les mutations compensatoires qui pourraient affecter la fréquence d'excision chez le clone portant ICE*St3 arp1*::*cat*-1 ne semblent pas avoir d'impact sur la fréquence de transfert de cet élément. Le gène *arp1* pourrait donc uniquement être impliqué dans la régulation de l'excision d'ICE*St3* et non dans la régulation de son transfert conjugatif. De plus, ICE*St1cat* Δ*arp1* présente un nombre de copie circulaire d'ICE par génome environ 1000 fois supérieur à celui d'ICE*St1* sauvage. La proportion de formes

circulaires d'ICE*St1* par génome étant proche de 1 x 10^{-6} (Pavlovic *et al.*, 2004), ICE*St1cat* Δ*arp1* s'excise donc dans une proportion similaire à celle d'ICE*St3* (0,9 x 10^{-3}). Cependant, aucun événement de transfert de cet ICE délété d'*arp1* n'a été caractérisé. Ces résultats peuvent soutenir l'hypothèse que le gène *arp1* ne serait impliqué que dans la régulation de l'excision des ICE de *S. thermophilus* et qu'il ne régulerait pas le transfert de ces éléments.

2.3 *ARP2* ET *ORFQ* : UNE SECONDE VOIE DE REGULATION?

L'excision d'ICE*St1* Δ*arp1* et d'ICE*St2* Δ*arp1* est insensible ou peu sensible à la mitomycine C démontrant qu'Arp1 est impliqué dans la dérépression de l'excision de ces éléments par les dommages à l'ADN. Bien que l'effet de la mitomycine C sur l'excision et la transfert d'ICE*St3 arp1*::*cat*-1 n'ait pas été étudié, la parenté étroite entre ICE*St1*/ICE*St2* et ICE*St3* suggère fortement un rôle similaire d'*arp1* chez ces éléments. Le répresseur Arp1 est donc également probablement impliqué la dérépression d'ICE*St3* par la mitomycine C.

Les fréquences d'excision et de transfert des ICE ne sont pas directement corrélées. En effet, si la surexpression des gènes codant l'excisionase et l'intégrase de Tn*916* augmente la fréquence d'excision de cet élément, elle n'a aucune influence sur la fréquence du transfert (Marra *et al.*, 1999; Marra and Scott, 1999). De plus, l'expression des gènes de transfert de Tn*916* est induite par la tétracycline, antibiotique pour lequel cet ICE code une résistance (Celli and Trieu-Cuot, 1998). De ce fait, la présence de tétracycline augmente la fréquence de transfert de Tn*916* d'un facteur 10 à 100 (Showsh and Andrews, 1992) tandis qu'elle n'a aucune influence sur la fréquence d'excision (Celli *et al.*, 1997). De même, si l'irradiation aux UV d'une souche d'*E. coli* contenant R391 provoque une augmentation de la fréquence d'excision d'un facteur 4500 (McGrath *et al.*, 2005), l'induction du système SOS, par la présence de mitomycine C ou par irradiation aux UV, n'augmente le transfert que d'un facteur 300 chez SXT et R391 (Beaber *et al.*, 2004; McGrath *et al.*, 2005).

Les traitements à la mitomycine C des souches portant ICE*St1*, ICE*St2* et ICE*St3* provoquent une augmentation du nombre de copie circulaire d'ICE par génome d'environ un facteur 10 et une augmentation de la fréquence de transfert d'ICE*St3* vers LMG18311 pMG36e d'un facteur 25. Cependant, l'étude des éléments ICE*St1* Δ*arp1*/ICE*St2* Δ*arp1* et ICE*St3 arp1*::*cat*-1 a respectivement montré qu'une augmentation et une réduction du nombre de copie circulaire d'ICE par génome n'a aucun impact sur la fréquence de transfert de ces éléments. Ces données suggèrent qu'*arp1* ne régule pas le transfert des ICE de *S. thermophilus*. L'augmentation de la fréquence de transfert d'ICE*St3* lorsque les cellules sont traitées à la mitomycine C ne semble donc pas simplement découler de l'augmentation du nombre relatif de copies circulaires de cet élément. Une hypothèse permettant

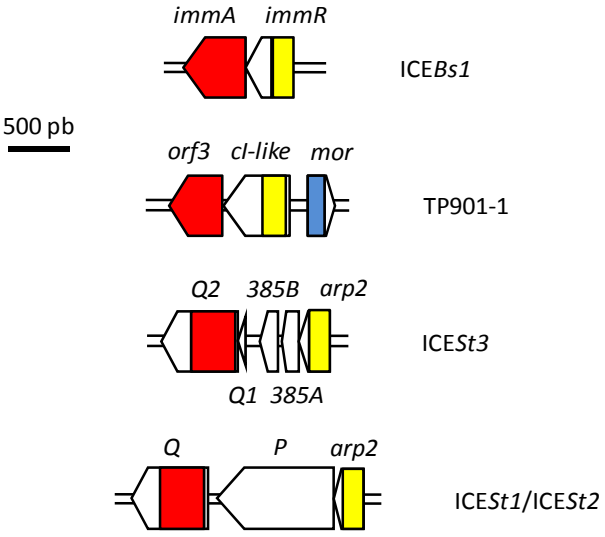
d'expliquer l'augmentation de la fréquence de transfert d'ICE*St3* par la mitomycine C serait l'intervention d'un mécanisme de régulation non élucidé.

Les régulations du phage TP901-1 de *L. lactis* et d'ICE*Bs1* de *B. subtilis* présentent de nombreuses similitudes. TP901-1 et ICE*Bs1* sont respectivement régulés par les gènes *cI*-like et *immR* appartenant tout deux à la famille des régulateurs *cI*-like (Auchtung *et al.*, 2007; Desiere *et al.*, 2002). La fixation à l'ADN des protéines cI-like et ImmR grâce à leur domaine HTH-XRE entraîne l'activation de leur propre gène et la répression des gènes activateurs de TP901-1 et ICE*Bs1*. L'inactivation de ces protéines est responsable de la levée de répression de ces deux éléments par la mitomycine C. La régulation d'ICE*Bs1* implique également le gène *immA* (Auchtung *et al.*, 2007). La protéine codée par ce gène est une protéase qui, en réponse aux dommages à l'ADN et à la production de RecA*, dégrade la protéine ImmR (Figure 8). Le clivage de la protéine ImmR conduit à la dérépression d'ICE*Bs1* et à son transfert conjugatif. Le domaine catalytique porté par la protéine ImmR se nomme DUF955. Bien qu'un gène homologue d'*immR* soit porté par de tous les phages codant un répresseur de type cI-like, tel TP901-1 (Figure 48) (Desiere *et al.*, 2002), son rôle n'ait jamais été étudié chez ces éléments (Figure 48). De plus, les gènes *immR* et *immA* d'ICE*Bs1* font parties du même opéron. Les extrémités 5′ du gène *orf3* et 3′ du gène *cI*-like de TP901-1 étant chevauchantes, ces gènes appartiennent également probablement à un même opéron. Par ailleurs, lorsque des cellules isogéniques portant le prophage TP901-1 sont en condition normale de croissance, 3 % d'entres-elles rentrent spontanément en phase lytique (Pedersen and Hammer, 2008). Lorsque les cellules portent un prophage TP901-1 délété du gène *mor*, plus aucune cellule ne rentre spontanément en phase lytique. De plus, la probabilité qu'un prophage rentre en phase lytique après un traitement à la mitomycine C est 5 fois plus faible si celui-ci est délété du gène *mor*. Ainsi, chez le prophage TP901-1, la transition entre les phases lysogène et lytique est nettement favorisée la présence du gène *mor*. Cependant, aucun gène d'ICE*Bs1* n'est homologue au gène *mor*. Les mécanismes de régulations des éléments codant un répresseur de type cI-like semblent donc fortement similaires mais présentent également des différences.

Les protéines putatives codées par les ORF *arp2* d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'ICE*St3* appartiennent à la famille des régulateurs de type cI-like et portent un domaine HTH-XRE caractéristique de cette famille (Figure 48) (Pavlovic *et al.*, 2004). De plus, les protéines putatives OrfQ d'ICE*St1*/ICE*St2* et OrfQ2 d'ICE*St3* possèdent comme Orf3 de TP901-1 et ImmA d'ICE*Bs1*, un domaine DUF955 (Figure 48) (Pavlovic *et al.*, 2004). Cependant, aucun homologue du gène *mor* de TP901-1 n'est présent chez ICE*St1*/ICE*St2* ou ICE*St3*. Les gènes *arp2* et *orfQ2* d'ICE*St3* et *arp2* et *orfQ* d'ICE*St1*/ICE*St2* pourraient donc constituer une voie de régulation plus ou moins similaire à celle de TP901-1 et d'ICE*Bs1*. Cette voie de régulation pourrait être le mécanisme de régulation non identifié permettant l'augmentation de la fréquence de transfert d'ICE*St3* par la mitomycine C.

Les régulateurs de type cI-like activent généralement leur propre transcription. Les protéines Arp2 se fixeraient donc dans la région intergénique en 5′ des ORF *arp2*.

Néanmoins, nous avons déjà vu qu'aucune série de répétitions pouvant jouer le rôle de séquence opératrice n'a été identifiée dans cette région. De plus, les ICE de *S. thermophilus* sont les seuls éléments génétiques mobiles qui, à notre connaissance, possèdent deux voies de régulation respectivement régies par un régulateur de type *cI* (*arp1*) et un régulateur de type *cI*-like (*arp2*). Les interactions potentielles de ces deux voies et les mécanismes des ICE de *S. thermophilus* qu'elles régulent sont inconnues.



<u>Figure 48</u> : Représentation schématique des ORF codant une protéine à domaine DUF955, un régulateur de type cI-like ou un régulateur de type Mor chez le phage TP901-1 et les éléments ICE*Bs1*, ICE*St1*/ICE*St2* et ICE*St3*.

Les ORF sont représentées par des flèches. Les rectangles rouge, jaune et bleu au sein des ORF symbolisent respectivement les séquences codant les domaines DUF955, HTH-XRE et DUF739.

2.4 UN SYSTEME DE REGULATION BISTABLE CHEZ ICE*ST3*?

Lorsque les souches de *S. thermophilus* CNRZ385 ICE*St3spc* pMG36e et LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$ sont utilisées lors de conjugaisons sur filtre, le transfert de l'ICE vers la souche dérivant de LMG18311 est détecté à une fréquence de 2,7 x 10^{-6} ± 0,7 x 10^{-6} transconjugant/donatrice tandis que la rétromobilisation du CIME vers la souche dérivant de CNRZ385 est obtenu à une fréquence de 4,8 x 10^{-4} ± 1,0 x 10^{-4} rétrotransconjugant/transconjugant. Comment expliquer que la fréquence de rétromobilisation du CIME soit environ 200 fois plus élevée que la fréquence de transfert de l'ICE?

Pour qu'un événement de conjugaison sur filtre ait lieu, une cellule donatrice et une cellule réceptrice doivent suffisamment rapprochées pour permettre la mise en place du pore de conjugaison. Bien que lors des conjugaisons sur filtre des ICE de *S. thermophilus* les cellules donatrices et réceptrices soient mélangées dans un ratio 1:1, une très grande majorité des donatrices n'est probablement pas suffisamment proche des réceptrices pour leur transmettre l'ICE. Une modification du ratio de cellules donatrices et réceptrices entraîne l'obtention de fréquences de transfert différentes pour de nombreux éléments conjugatifs, suggérant que la proportion de donatrices capables de transmettre l'élément qu'elles portent influe fortement sur la fréquence de transfert observée de celui-ci (Auchtung *et al.*, 2005; Bohne *et al.*, 1998; Brochet *et al.*, 2009; Lampkowska *et al.*, 2008). La fréquence détectée de transfert d'un élément conjugatif devrait donc être relativisée par rapport à cette proportion dont la valeur est inconnue. Lors des événements de rétromobilisation, tous les transconjugants d'ICE*St3* dérivant de LMG18311 CIMEL_3*cat*R_3 ont naturellement bénéficié d'une distance efficace entre une donatrice et une réceptrice. Chacun de ces transconjugants est donc à une distance qui lui permet éventuellement de transmettre le tandem CIME-ICE qu'il porte vers une cellule donatrice. La proportion de cellules capables de transmettre l'élément ou les éléments qu'elles portent entre les événements de transfert et de rétrotransfert se déroulant sur un même filtre sont donc potentiellement très différents. Une telle différence de rendement pourrait expliquer le facteur 200 entre la fréquence de transfert d'ICE*St3spc* vers la réceptrice et la fréquence de rétromobilisation de CIMEL_3*cat*R_3.

Par ailleurs, la régulation de nombreux éléments génétiques mobiles oscille en permanence entre deux états stables soumis à des transitions aléatoires. La régulation de ce type d'éléments est qualifiée de bistable. Lorsqu'un élément génétique mobile est régulé par un système bistable, l'état activé perdure quelques temps après l'acquisition de cet élément par une cellule. Cette activation prolongée permet à cet élément de se répandre dans la population dont la nouvelle cellule hôte provient. La bistabilité de la régulation n'a été démontrée que chez un seul ICE, ICE*clc*, et plusieurs types de plasmides conjugatifs (Jagura-Burdzy and Thomas, 1994; Kozlowicz *et al.*, 2006; Minoia *et al.*, 2008). Néanmoins, l'étude de plusieurs autre ICE suggèrent fortement que ceux-ci soient régulés par des systèmes de ce type (Dimopoulou *et al.*, 1992; Dimopoulou *et al.*, 1997; Leaves *et al.*, 2000; Possoz *et al.*, 2001; She *et al.*, 2004). Les mécanismes de régulation des phages λ et TP901-1 respectivement régis par un répresseur cI et un répresseur cI-like constituent également des systèmes bistables (Pedersen and Hammer, 2008; Tian and Burrage, 2004). Or, ICE*St3* porte les gènes *arp1* et *arp2* qui codent respectivement des protéines de type cI et cI-like. Les gènes de régulation de cet ICE sont donc très probablement impliqués dans un système bistable. Les systèmes bistables répondent à des stimuli qui provoquent un déplacement de l'équilibre entre les états inactif et actif des éléments en faveur de ce dernier. Ainsi, l'augmentation de la fréquence de transfert d'ICE*St3* à la suite des traitements des cellules donatrices par la mitomycine C ne proviendrait pas d'une dérépression de l'élément dans

toutes les cellules de la même manière mais plutôt d'une augmentation de la proportion de cellules donatrices dans lesquelles l'élément est déréprimé.

La régulation d'ICE*St3* par un système bistable constitue une seconde hypothèse, non exclusive avec celle de la distance minimale entre cellules donatrices et réceptrices, pouvant expliquer le facteur 200 entre la fréquence de transfert d'ICE*St3spc* vers la réceptrice et la fréquence de rétromobilisation de CIMEL_3*catR*$_3$.

2.5 IMMUNITE DE SURCONJUGAISON

Le transfert d'ICE*St3spc* vers des réceptrices dérivant de *S. thermophilus* LMG18311 et qui portent ICE*St3cat*, CIMEL_3*catR*$_3$ ou aucun îlot dans le locus *fda* a montré que cet ICE code envers lui-même une immunité de surconjugaison nettement dissociable de l'immunité de cible provoqué par l'occupation du site *attB*. Ainsi, la fréquence de transfert de l'ICE vers LMG18311 ICE*St3cat* pMG36e est 12 fois plus faible que vers LMG18311 CIMEL_3*catR*$_3$ pMG36e. ICE*St3* ne code aucun gène dont l'homologue soit impliqué dans un phénomène d'immunité couramment associé aux plasmides conjugatifs tels que l'exclusion de surface ou l'exclusion d'entrée. En conséquence, il semble probable que seuls les gènes du module de régulation porté par ICE*St3* puissent être impliqués dans la diminution de sa fréquence de transfert d'un facteur 12. Les répresseurs cI et cI-like, respectivement codés par les prophage λ et TP901-1, sont responsables d'une immunité de surinfection envers les phages étroitement apparentés (Birge, 1994; Madsen *et al.*, 1999). En effet, ces deux protéines répriment les phages étroitement apparentés infectant une cellule lysogène, empêchant l'intégration du génome de celui-ci dans le chromosome. Les protéines Arp1 et Arp2 étant respectivement homologues aux répresseurs cI et cI-like, leur action conjuguée est très probablement responsables de tout ou partie de l'immunité de surconjugaison codée par ICE*St3* envers lui-même. Ainsi, de manière analogue aux phages, l'élément entrant serait réprimé par les protéines Arp1 et Arp2 codée par l'élément résident et, ne pouvant s'intégrer dans le chromosome, il serait perdu par dilution lors des divisions cellulaires.

De plus, les fréquences de transfert d'ICE*St3cat* vers CNRZ368 pMG36e et CNRZ368 ΔICE*St1* pMG36e sont respectivement de $9{,}3 \times 10^{-7} \pm 2{,}7 \times 10^{-7}$ et $5{,}0 \times 10^{-5} \pm 1{,}5 \times 10^{-5}$ transconjugant/donatrice. Ainsi, l'étude des ces souches de *S. thermophilus* a montré que la présence d'ICE*St1* dans une réceptrice diminue la fréquence de transfert d'ICE*St3* d'un facteur 50. L'utilisation de la souche CNRZ368 Δ*arp1* pMG36e a permis de préciser que la seule présence du gène *arp1* d'ICE*St1* est responsable d'une diminution de la fréquence de transfert d'ICE*St3cat* d'un facteur 2,5. Ce gène est donc responsable d'une faible immunité de surconjugaison envers ICE*St3*. Bien que les domaines HTH-XRE des protéines Arp1 d'ICE*St1* et d'ICE*St3* ne soient identiques qu'à 86 %, la protéine Arp1 d'ICE*St1* réprime donc très probablement la fonction d'intégration de la copie entrante d'ICE*St3* en se fixant sur des

séquences opératrices de la protéine Arp1 chez cet ICE. Ceci suggère fortement que deux ICE de *S. thermophilus* soient soumis à des mécanismes de régulation croisés. De même, la protéine Arp1 codée par une copie résidente d'ICE*St3* serait impliquée dans la diminution de la fréquence d'acquisition d'une seconde copie de cet ICE. De plus, la protéine SetR de l'ICE SXT, qui appartient comme Arp1 à la famille des régulateurs de type cI, n'intervient pas dans un mécanisme d'immunité de surconjugaison envers une seconde copie entrante de SXT (Beaber *et al.*, 2002a; Marrero and Waldor, 2005, 2007a). La protéine Arp1 d'ICE*St1* est donc le premier régulateur de type cI codé par un ICE a être impliqué dans un mécanisme d'immunité de surconjugaison.

Par ailleurs, la protéine régulatrice ImmR d'ICE*Bs1*, de type cI-like, est également responsable d'une immunité de surconjugaison (Auchtung *et al.*, 2007). En effet, la fréquence de transfert de cet ICE est réduite d'un facteur 10^3 si la réceptrice contient déjà une copie d'ICE*Bs1* ou du gène *immR*. De même, le répresseur cI-like codé par le phage TP901-1 est responsable d'une immunité de surinfection (Pedersen and Hammer, 2008). Le gène *arp2* porté par ICE*St1* et ICE*St3*, appartenant à la famille *cI*-like, pourrait donc être impliqué dans un mécanisme d'immunité de surconjugaison. Une action de la protéine Arp2 codée par ICE*St1* sur une copie entrante d'ICE*St3* implique une seconde régulation croisée, différente de celle déjà mise en évidence pour Arp1.

3 CONSEQUENCES DE L'ACCRETION SITE-SPECIFIQUE

Chez tous les transconjugants analysés de *S. thermophilus*, *S. pyogenes* et *En. faecalis* ne possédant pas d'élément déjà inséré dans ce site, soit plusieurs centaines de clones, ICE*St3* s'est intégré dans l'extrémité 3' du gène *fda*. Cet élément possède donc une haute spécificité d'intégration, ce qui a diverses conséquences. Tout d'abord, lorsque celui-ci se transfère vers une cellule portant un unique site chromosomique *attB,* il s'intègre dans celui-ci. Lorsqu'un îlot génomique, apparenté ou non, occupe ce site, l'élément entrant s'agrégera avec celui-ci par recombinaison site-spécifique. Ensuite, dans une population, un ICE coexiste dans certaines proportions sous forme intégrée et circulaire libre. Par conséquent, si le tandem résultant de l'accrétion d'un élément intégratif et d'un autre îlot est flanqué de sites d'attachement compatibles, il pourra subir de nombreux événements de recombinaisons site-spécifiques susceptibles de le remanier. Enfin, si la totalité du tandem peut s'exciser, son transfert pourra probablement être obtenu.

3.1 IMMUNITE DE CIBLE

Lors de ce travail, la réduction de la fréquence de transfert d'ICE*St3* lorsque le site *attB* de la cellule réceptrice est occupé par un îlot flanqué de sites *attR* et *attL* a été démontrée. Toutefois, la question de l'origine de cette immunité de cible reste posée.

Bien que l'impact sur la fréquence d'acquisition d'un ICE de l'occupation du site *attB* d'une cellule réceptrice par un îlot génomique n'ait jamais été étudié auparavant, certaines observations réalisées lors du transfert d'ICE pourraient également être liées au phénomène d'immunité de cible. Ainsi, une étude très récente menée sur ICE*clc* a montré que cet élément s'intègre avec une plus grande efficacité dans un site *attR* tronqué d'une majeur partie de son bras que dans un site *attR* non muté (Sentchilo *et al.*, 2009). De plus, lors d'événements de surconjugaison d'ICE*Bs1* de *B. subtilis*, le mécanisme principal d'immunité est la répression du gène de l'intégrase de l'élément entrant par la protéine ImmR de type cI-like (Auchtung *et al.*, 2007). Cependant, un mécanisme inconnu indépendant du rôle d'ImmR sur l'expression du gène de l'intégrase conduit à une réduction de la fréquence de transfert d'ICE*Bs1* d'un facteur 20 (Auchtung *et al.*, 2007). L'ensemble de ces données suggère que la fixation d'intégrase(s) et/ou d'un (de) cofacteur(s) sur le bras d'un site *att* réduirait l'efficacité d'intégration d'un élément entrant. Par conséquent, l'occupation d'un site *attB* par un élément flanqué d'un site *attR* et d'un site *attL* conduira à un phénomène d'immunité de cible. Dans ce cadre, l'absence d'immunité de cible observée lorsqu'une réceptrice porte CIME9 s'expliquerait par le fait que cet élément est flanqué d'un site *attB* et d'un site *attL* et non d'un site *attR* et d'un site *attL*.

Par ailleurs, le transfert conjugatif d'ICE*St3* vers une souche contenant déjà un îlot apparenté flanqué de sites *attL* et *attR* conduit majoritairement à l'intégration de l'ICE dans le site *attR* de l'élément résident , le degré de cette préférence semblant cependant varier. L'intégration préférentielle d'un ICE dans le site *attR* ou le site *attL* d'un îlot génomique apparenté pose la question de l'origine de cette préférence.

Les ICE étroitement apparentés SXT et R391 s'intègrent dans l'extrémité 5' du gène *prfC* (Murphy and Pembroke, 1999; Waldor *et al.*, 1996). Le transfert de SXT vers une cellule portant R391 conduit à l'obtention de tandems SXT/R391/*prfC* et R391/SXT/*prfC* dans des proportions similaires (Hochhut *et al.*, 2001a). Bien que les sites *attR* et *attL* de SXT et R391 ne diffèrent que de deux nucléotides et que le transfert de R391 vers une souche portant SXT conduit également à l'obtention de tandems, plus de 90 % de ceux-ci présentent une structure R391/SXT/*prfC* (Hochhut *et al.*, 2001a). Les mécanismes d'intégration de deux ICE ou éléments génétiques mobiles étroitement apparentés peuvent donc présenter des propriétés différentes.

Une réaction de recombinaison site-spécifique catalysée par une intégrase à tyrosine nécessite la fixation de deux monomères d'intégrase sur le site *attB* et de deux autres monomères sur le site *attI* ou *attP* (Figure 49) (Rajeev *et al.*, 2009). Sur chaque site d'attachement, les monomères se fixent de part et d'autre de la séquence dans laquelle la

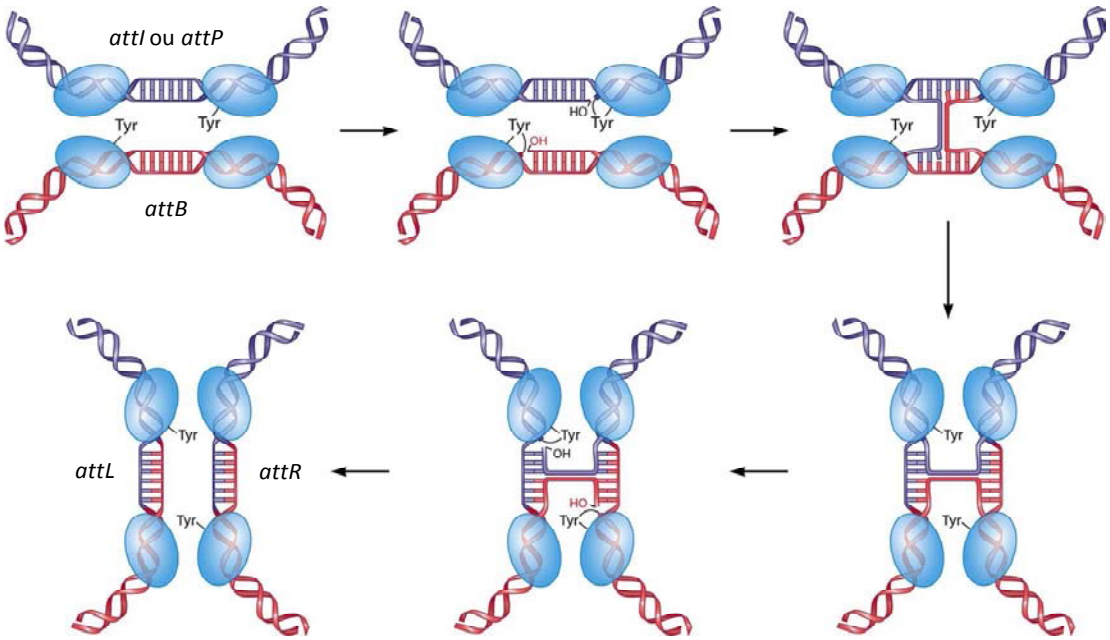


Figure 49 : **Intégration site spécifique par une recombinase à tyrosine** (d'après Rajeev *et al.*, 2009).

Quatre monomères de recombinase (ovales bleus) se fixent aux sites cibles *attB* et *attI* ou *attP.* Deux monomères sont actifs (les résidus tyrosine sont alors indiqués) tandis que les deux autre sont inactifs. Les monomères actifs catalysent les deux premières coupures simples brins provoquant la formation d'intermédiaires 3'-phosphotyrosyl et de résidus 5'-OH libres. L'échange de brins qui s'en suit conduit à la formation d'une croix de Holliday. Après le changement conformationnel des enzymes, les deux monomères jusqu'alors inactifs catalysent deux autres coupures simples brins. Un second échange de brins aboutit à la formation des sites *attR* et *attL*.

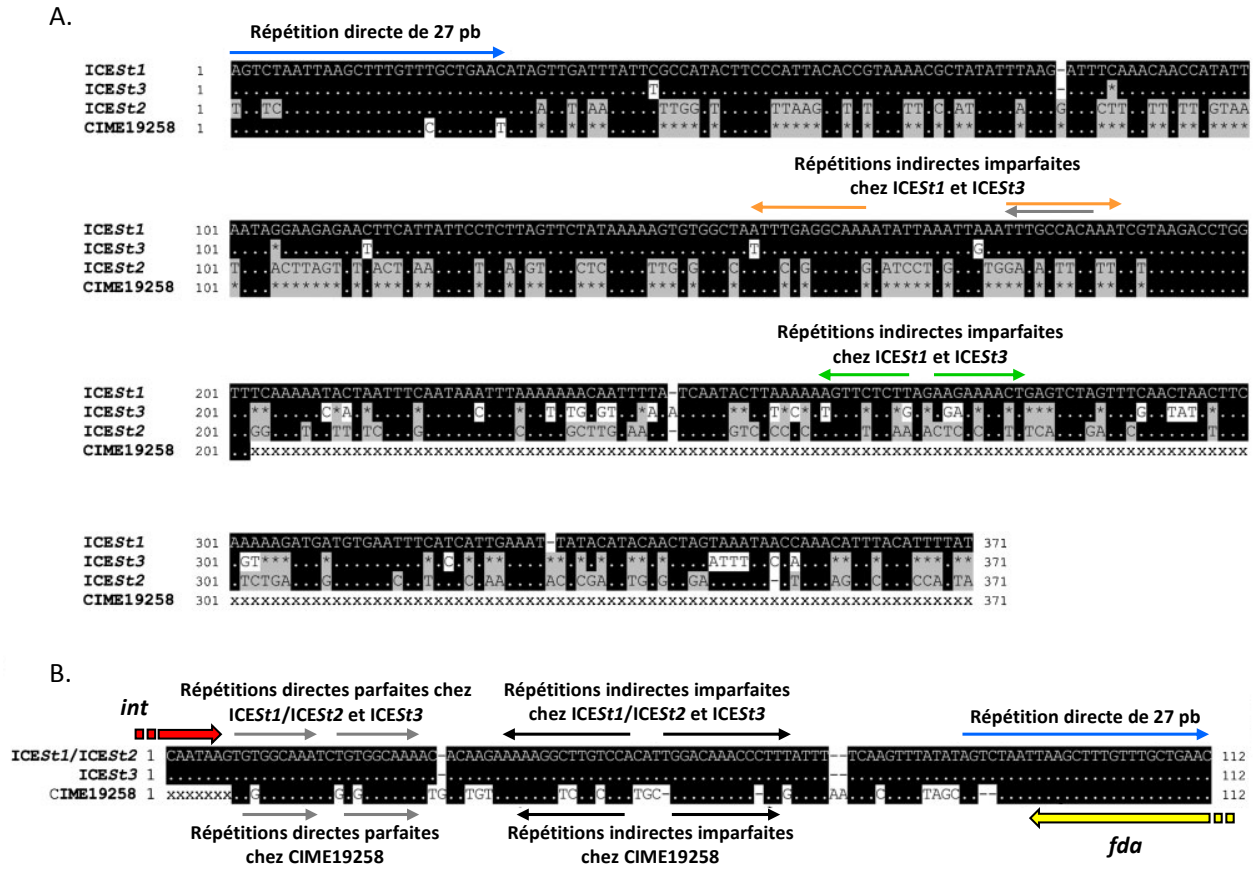
coupure décalée va être catalysée. Si les sites de fixation de l'intégrase sur le site *attI* ou le site *attP* sont formés par des répétitions directes ou indirectes, les sites de fixation de cette enzyme sur le site *attB* sont beaucoup moins facilement identifiables.

La comparaison des sites d'attachement des différents îlots intégrés au locus *fda* chez *S. thermophilus* a montré que ceux-ci ne portent pas les mêmes répétitions directes et indirectes (Figure 50) (Pavlovic *et al.*, 2004). Les deux sites d'attachement d'un îlot pourraient donc présenter une affinité différente pour l'intégrase. Lorsqu'un élément génétique mobile s'intègre dans le site d'attachement d'un un îlot apparenté, la recombinaison site-spécifique a lieu entre le site *attI* de l'élément entrant et le site *attR* ou *attL* de l'îlot intégré (Figure 41). Par conséquent, une différence d'affinité de fixation de l'intégrase entre les sites *attR* et *attL* de l'élément intégré pourrait expliquer l'intégration préférentielle de l'élément génétique mobile entrant dans l'un de ces deux sites. Ainsi, si le site *attR* d'ICE*St1*, d'ICE*St3*, de CIME19258 et de CIMEL_3catR_3 confère une immunité de cible inférieure aux sites *attL* de ces éléments, l'ICE entrant s'intégrera majoritairement dans le site *attR*.

En outre, les facteurs d'hôte pourraient de la même manière intervenir dans la différence d'efficacité d'intégration d'un élément entrant dans les sites *attR* et *attL* d'un îlot résident en se fixant avec une plus grande affinité sur l'un de ces deux sites.

3.2 DYNAMIQUE DES TANDEMS

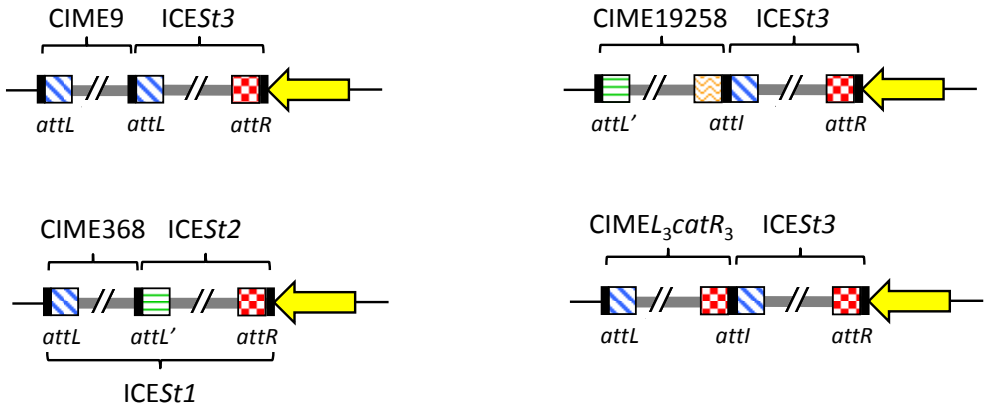
Si les sites *attR* d'ICE*St1*/ICE*St2*, d'ICE*St3* et de CIME302 sont parfaitement identiques, le site *attR* de CIME19258, nommé dans la suite du texte *attR'*, n'est identique à ceux-ci qu'à 76 % (Figure 50) (Pavlovic *et al.*, 2004). Par conséquent, 2 types de sites *attR* doivent être distingués. De plus, les sites *attL* d'ICE*St1*, d'ICE*St3*, de CIME302 et de CIME9 sont identiques à plus de 93 %. Les sites nommés *attL'* d'ICE*St2* et de CIME19258 sont quant à eux identiques à plus de 99 % mais ne sont identiques aux sites *attL* des 4 éléments précédents que de 59 à 66 % (Figure 50). Deux types de sites *attL* existent donc également. Ainsi, les trois types de tandems CIME-ICE obtenus lors de ce travail (ICE*St3* avec CIMEL_3catR_3, CIME19258 ou CIME9) et l'élément composite ICE*St1* (Pavlovic *et al.*, 2004) portent chacun une combinaison de sites d'attachement qui lui est propre (Figure 51). L'étude de la fonctionnalité des CIME et celle de la formation des tandems CIME-ICE ont montré que ces deux types de sites *attL* présentent des propriétés différentes. Par exemple, si l'intégration d'un plasmide portant le site *attI* et le gène de l'intégrase d'ICE*St1* dans le site *attL* de CIME9 a été obtenue, un tel plasmide ne s'intègre pas dans le site *attL'* de CIME19258. La dynamique de chaque tandem va donc dépendre des propriétés des sites d'attachement qu'il porte.



<u>Figure 50</u> : Comparaison des sites d'attachement des îlots génomiques intégrés au locus *fda* chez *S. thermophilus* (d'après Pavlovic *et al.*, 2004).

(A.) Site *attL*. (B.) Site *attR*. Les nucléotides identiques à la séquence d'ICE*St1* sont indiqués par des points blancs. Les nucléotides identiques à la séquence du site *attL'* d'ICE*St2* mais non au site *attL* d'ICE*St1* sont indiqués par des astérisques noires. Les séquences non apparentées aux séquences alignées sont représentées par une succession de « x ». Les trous sont symbolisés par des traits noirs. Les séquences répétées identiques ou quasi-identiques sont représentées par des flèches de la même couleur. La flèche grise présente sur la séquence des sites *attL* symbolise, chez ICE*St1* et ICE*St3*, une séquence identique à la répétition parfaite trouvée dans les sites *attR* d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'ICE*St3*. Les sites d'attachement de CIME302 et CIMEL_3catR_3 sont identiques ou quasi-identiques aux sites d'ICE*St1* et d'ICE*St3* et portent les mêmes répétitions que celle retrouvée chez ces deux ICE. Les 188 premiers nucléotides du site *attL* de CIME9 sont identiques à 96 % avec la séquence du site *attL* d'ICE*St1*. Ainsi, le site *attL* de ce CIME ne porte qu'une des deux répétitions indirectes imparfaites présentes dans le site *attL* d'ICE*St1*.

Les formes circulaires d'ICE*St3*, de CIME19258*cat* et de CIME9 ont été détectées par PCR lors de l'étude des tandems CIME-ICE de *S. thermophilus*. De plus, l'analyse par PCR du tandem CIMEL_3*catR*$_3$-ICE*St3spc* a très fortement suggéré que la présence de l'ICE dans cette structure permet l'excision du CIME sous forme circulaire. Ainsi, des recombinaisons intramoléculaires telles que celles se produisant entre des sites *attR'* et *attI*, *attL* et *attI* ou encore *attB* et *attI* peuvent avoir lieu dans les tandems. Des réactions de recombinaison inattendues ou inhabituelles peuvent également se produire. Ainsi, l'étude des tandems CIME9-ICE*St3cat* a démontré l'existence de la forme circulaire de CIME9 qui ne peut résulter que de la recombinaison entre un site *attB* et un site *attL* ou entre deux sites *attL* (Figures 32, 43 et 44). Par conséquent, bien qu'il ne présente aucune similarité notable avec les sites *attR* d'ICE*St3* ou de CIME19258, le site *attB* de CIME9 pourrait être en réalité un nouveau type de site *attR*. De plus, lorsque le plasmide pNST262+ portant le site *attR* et les gènes de l'intégrase et de l'excisionase d'ICE*St1* (Figure 17) est introduit chez *S. thermophilus* LMD-9, il s'intègre par une recombinaison intermoléculaire entre le site *attR* du plasmide et le site *attL* de CIME9 (données non montrées). De nombreuses réactions de recombinaison site-spécifique d'intégration et d'excision peuvent donc participer à la dynamique d'éléments intégrés en tandem.



<u>Figure 51</u> : Représentation schématique de la combinaison de sites d'attachement portée par chacun des tandems CIME-ICE intégré au locus *fda* de *S. thermophilus*.

La séquence de tous les îlots génomiques, mis à part leurs sites d'attachement, est représentée par un rectangle gris. Le gène *fda* est représenté par une flèche jaune. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences répétées ; hachures obliques bleues, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; hachures horizontales vertes, bras du site *attL'* et bras correspondant du site *attI* ; damier rouge, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*; zigzags oranges, bras du site *attR'* et bras correspondant du site *attI*. Les sites *attR* d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'ICE*St3* sont identiques. Les sites *attL* sont identiques à plus de 93 %. Les sites *attL'* sont identiques entre eux à 99 % mais identiques aux sites *attL* de 59 à 66 %. Les noms des sites *attI* résultant de l'accrétion de ces deux éléments reflètent l'origine de leurs deux bras : *attI* si le site résulte d'une recombinaison entre *attR* et *attL* et *attI'* s'il résulte d'une recombinaison entre *attR* et *attL'*. Seul un des états pouvant être adopté par chaque tandem est représenté.

3.3 STABILITE DES TANDEMS

L'étude de la stabilité des tandems a montré que la dynamique des tandems peut conduire à la perte d'un des éléments les composant, soit le CIME dans les structures CIME-ICE, soit l'un des ICE dans les structures ICE-ICE. ICE*St3* porte deux gènes codant une méthyltransférase putative (*orf385F* et *orf385G*) et deux gènes codant une enzyme de restriction putative (*orf385D* et *orf385E*) (Figure 9). Ces quatre gènes groupés en un module codent probablement un ou deux système(s) RM de type II. Les systèmes RM de type II testés en ce sens confèrent non seulement une résistance envers les bactériophages, mais sont également des systèmes toxine-antitoxine (Kobayashi, 2001). Or, si un des ICE composant le tandem ICE*St3spc*-ICE*St3cat* peut être perdu, au moins une copie d'ICE*St3* est toujours transmise à la descendance. De plus, aucun clone descendant de cellules portant tandems CIME-ICE et ayant perdu son unique copie d'ICE*St3* n'a été détectée. Ceci suggère qu'ICE*St3* porte au moins un système RM fonctionnel et que celui-ci ait également une activité toxine-antitoxine. L'élément CIME302 porte lui aussi deux gènes codant un système RM putatif (Pavlovic *et al.*, 2004). La perte de cet élément à partir des tandems CIME-ICE pourrait donc être contre-sélectionnée de la même manière que la perte d'ICE*St3*. Si cela est effectivement le cas, toute mutation stabilisant le tandem ou inactivant l'enzyme de restriction sera sélectionnée à court terme. Plusieurs sites d'attachement tronqués sont présents dans les îlots intégrés au locus *fda* (Figure 9). Ainsi, une telle délétion du site *attI* séparant le CIME et l'ICE pourrait stabiliser un tandem composé de CIME302 et d'ICE*St3* et entraîner la création d'un ICE composite ayant acquis de nouveaux modules (Figure 11). De nombreux îlots génomiques portent des sites d'attachement tronqués, traces d'anciens événements d'accrétion suivis d'une délétion (voir § C.4.1.2). La stabilité des tandems d'îlots génomiques pourrait donc influer de manière importante sur la formation de tels îlots composites.

L'élément CIMEL_3*cat*R_3 créé lors de ce travail ne porte que le gène *cat* tandis que le seul module fonctionnel identifié porté par CIME19258*cat* confère une résistance aux ions cadmium (Pavlovic *et al.*, 2004). Ces éléments ne portent donc à priori aucun gène dont la perte puisse, en absence de pression de sélection, être fortement contre-sélectionnée. Ceci explique donc très probablement que la dynamique des tandems puisse entraîner l'obtention de clones ayant perdu ces CIME. Cependant, la souche délétée ATCC 19258 ΔCIME19258 pousse moins vite que la souche sauvage. Ainsi, bien que chez CIME19258 seul le module de résistance au cadmium ait été identifié comme fonctionnel, un gène codé par ce CIME et situé hors de ce module pourrait intervenir dans un processus cellulaire non identifié. L'apparition d'une (de) mutation(s) altérant la vitesse de croissance au cours des générations nécessaires à l'obtention de la souche curée pourrait également être une possibilité.

Les deux copies de l'ICE formant le tandem ICE*St3spc*-ICE*St3cat* sont identiques sur une longueur de 28 kb. Une recombinaison homologue entre ces deux éléments pourrait

conduire à la perte de l'un d'entre eux. La taille des sites d'attachement flanquant CIME*L*$_3$*catR*$_3$ étant courte (150 pb pour *attR* et 350 pb pour *attL*), sa perte par recombinaison homologue lorsqu'il est intégré en tandem avec ICE*St3* est quant à elle très peu probable. Par conséquent, la copie du CIME inclue le tandem ICE*St3spc*-CIME*L*$_3$*catR*$_3$ ne peut être perdus qu'après une excision par recombinaison site-spécifique, tandis que les éléments du tandem ICE*St3spc*-ICE*St3cat* pourraient perdus, soit après excision, soit par recombinaison homologue. Cependant, CIME*L*$_3$*catR*$_3$ est perdu à partir tandems ICE*St3spc*-CIME*L*$_3$*catR*$_3$ à une fréquence 10 fois plus grande que celle de chaque copie de l'ICE formant le tandem ICE*St3spc*-ICE*St3cat*. La recombinaison homologue ne semble donc pas prépondérante dans la perte d'une copie de l'ICE composant le tandem ICE*St3spc*-ICE*St3cat*. Par ailleurs, une différence importante entre les tandems ICE*St3spc*-CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et ICE*St3spc*-ICE*St3cat* est la présence chez ce dernier de deux copies des modules de recombinaison et de régulation. La présence de ces modules en deux copies pourrait modifier l'équilibre entre les fréquences d'excision et d'intégration en faveur de cette dernière. Cela aurait pour conséquence une stabilisation du tandem ICE*St3spc*-ICE*St3cat* par rapport au tandem ICE*St3spc*-CIME*L*$_3$*catR*$_3$.

De plus, l'étude préliminaire de la stabilité des tandems portant CIME19258*cat* a montré que ce CIME est quant à lui être perdu à une fréquence de 2,5 x 10^{-2} par cellule/par génération. Ainsi, CIME19258*cat* serait perdu à une fréquence 10 fois plus élevée que celle de CIME*L*$_3$*catR*$_3$. Cette différence pourrait être due aux différentes propriétés de leurs sites d'attachement respectifs.

Par ailleurs, l'étude du site d'intégration d'ICE*St3cat* chez les transconjugants dérivant de LMD-9 pMG36e a fortement suggéré que l'un des clones analysés a perdu CIME9 (§ B.4.2.2 et § B.4.4.2). Lorsque qu'ICE*St3* s'intègre chez la souche LMD-9, deux structures en tandem composées de cet ICE et de CIME9 sont attendues : *attL*$_1$-CIME9-*attL*$_A$-ICE*St3cat*-*attR*$_B$ lorsque l'ICE s'intègre dans le site *attB* et *attL*$_{A'}$-ICE*St3cat*-*attI*$_{B1}$-CIME9-*attB* lorsque l'ICE s'intègre dans le site *attL*$_1$ de CIME9 (Figure 40A). Cette dernière structure porte un site *attI* et un site *attB*. Ces deux sites sont à priori fortement recombinogènes. CIME9 pourrait donc s'exciser à haute fréquence à partir de la structure en tandem portant ces 2 sites. Une telle fréquence d'excision est susceptible d'entraîner la perte de cet élément à haute fréquence. Une forte instabilité pourrait, comme la présence d'un système toxine-antitoxine chez un élément, influer sur l'évolution de la structure d'un tandem et le devenir des éléments qui le composent.

3.4 MOBILISATION ET RETROMOBILISATION EN *CIS*

3.4.1 TRANSFERT DE CIME*L*$_3$*CATR*$_3$ SEUL

Les expériences de conjugaison utilisant comme donatrice la souche LMG18311 ICE*St3spc* CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et comme réceptrice CNRZ385 ΔICE*St3* pMG36e ont révélé des

transferts du CIME seul. CIME*L*$_3$*catR*$_3$ est un élément artificiel qui ne porte aucun gène pouvant être impliqué dans la recombinaison site-spécifique ou la conjugaison, ni de séquence apparentée à l'origine de transfert d'ICE*St3*. Ainsi, cet élément ne peut très probablement ni être l'objet d'une mobilisation conjugative en *trans* par l'ICE, ni assurer le maintien de sa forme circulaire. De plus, l'étude du transfert de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et des tandems CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* a démontré que le transfert de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ n'est obtenu qu'en présence de l'ICE et a fortement suggéré que le cotransfert du CIME et de l'ICE résulte du transfert du tandem sous forme circulaire. Ceci suggère donc que le transfert de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ seul à partir des cellules portant un tandem CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* implique l'*oriT* et l'intégrase de l'ICE.

Deux types d'hypothèses permettent d'expliquer que cet ICE ne se soit pas maintenu chez le transconjugant bien qu'il ait permis le transfert conjugatif et l'intégration du CIME. L'hypothèse du premier type implique, qu'après son excision, le tandem CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* se soit transféré par conjugaison vers une cellule réceptrice (Figure 52). Ensuite, ce tandem nouvellement acquis serait résolu grâce à une recombinaison site-spécifique entre les sites *attI*$_{A2}$ et *attI*$_{B1}$, entraînant la formation des formes circulaires des deux éléments. Enfin, l'intégrase produite à partir du gène porté par ICE*St3spc* aurait catalysé l'intégration en *trans* de la forme circulaire du CIME. L'ICE, quant à lui, ne se serait pas intégré et aurait été perdu par dilution lors des divisions cellulaires. L'instabilité du tandem CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* évoquée dans le paragraphe précédent (§ C.3.3) abonderait dans le sens de cette hypothèse.

Le second type d'hypothèses implique qu'une structure incomplète CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* ait été transférée vers les transconjugants. Ce transfert incomplet pourrait être causé par une conjugaison interrompue du tandem préalablement excisé sous forme circulaire (Figure 53A) ou d'une mobilisation en *cis* du CIME par un mécanisme de type Hfr (Figure 53B). La conjugaison interrompue du tandem CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* sous forme circulaire pourrait permettre le transfert d'un fragment d'ADN simple-brin portant le module de recombinaison de l'ICE et le CIME flanqués des deux sites *attI* (Figure 53A). Après la synthèse du brin complémentaire de ce fragment, le CIME pourrait s'exciser grâce à l'intégrase et à l'excisionase codées par ICE*St3spc* tronqué, puis s'intégrer dans le site *attB* de la réceptrice (Figure 53A). L'acquisition du CIME par un mécanisme de type Hfr mettrait en jeu le transfert d'un fragment d'ADN simple-brin à partir de l'*oriT* située sur un tandem intégré (Figure 53B). Lorsque le brin complémentaire de ce fragment serait synthétisé, une recombinaison entre les sites *attI*$_{B1}$ et *attR*$_2$ flanquant le CIME pourrait permettre son excision puis son intégration dans le site *attB* de la cellule réceptrice (Figure 53B). Des mécanismes de types Hfr sont probablement responsables du transfert d'îlots génomiques dans plusieurs études menées chez *S. agalactiae*, *Mycobacterium smegmatis* et *Y. pestis* (Benedek and Schubert, 2007; Brochet *et al.*, 2008b; Lesic and Carniel, 2005; Wang *et al.*, 2003). Cependant, ces transferts sont RecA dépendant et ne nécessitent pas l'excision de ces îlots sous forme circulaire. Les mécanismes décrits dans les deux dernières hypothèses nécessitent quant à eux la transcription du module de recombinaison d'ICE*St3spc* et

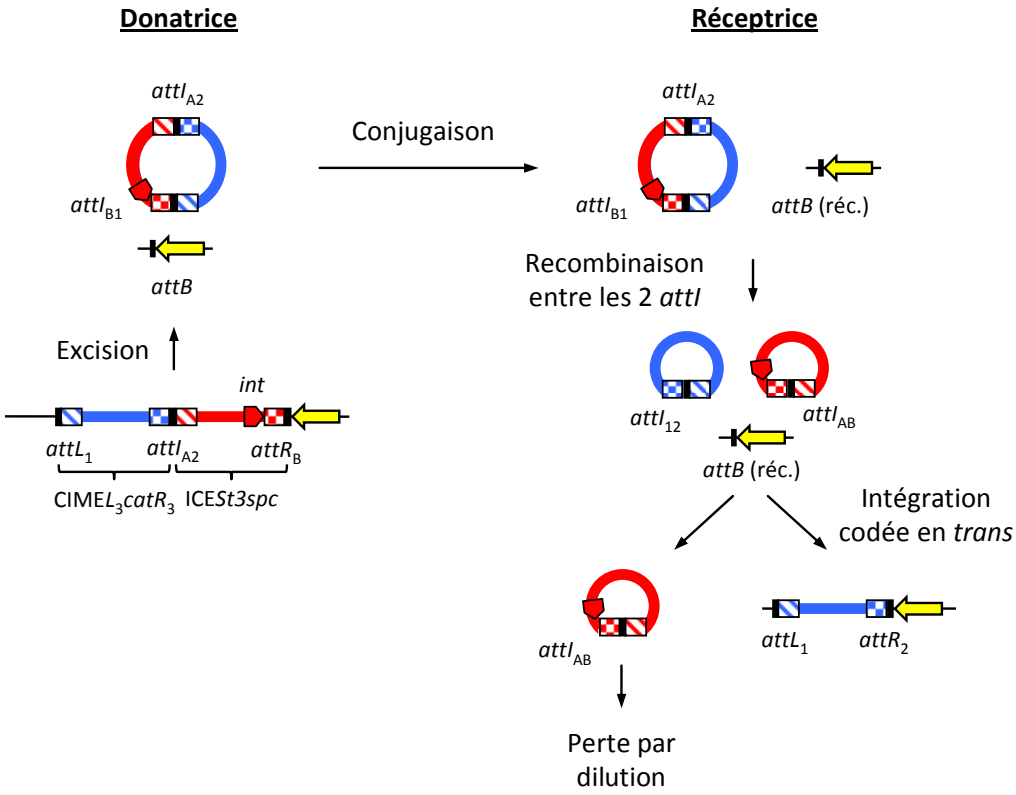
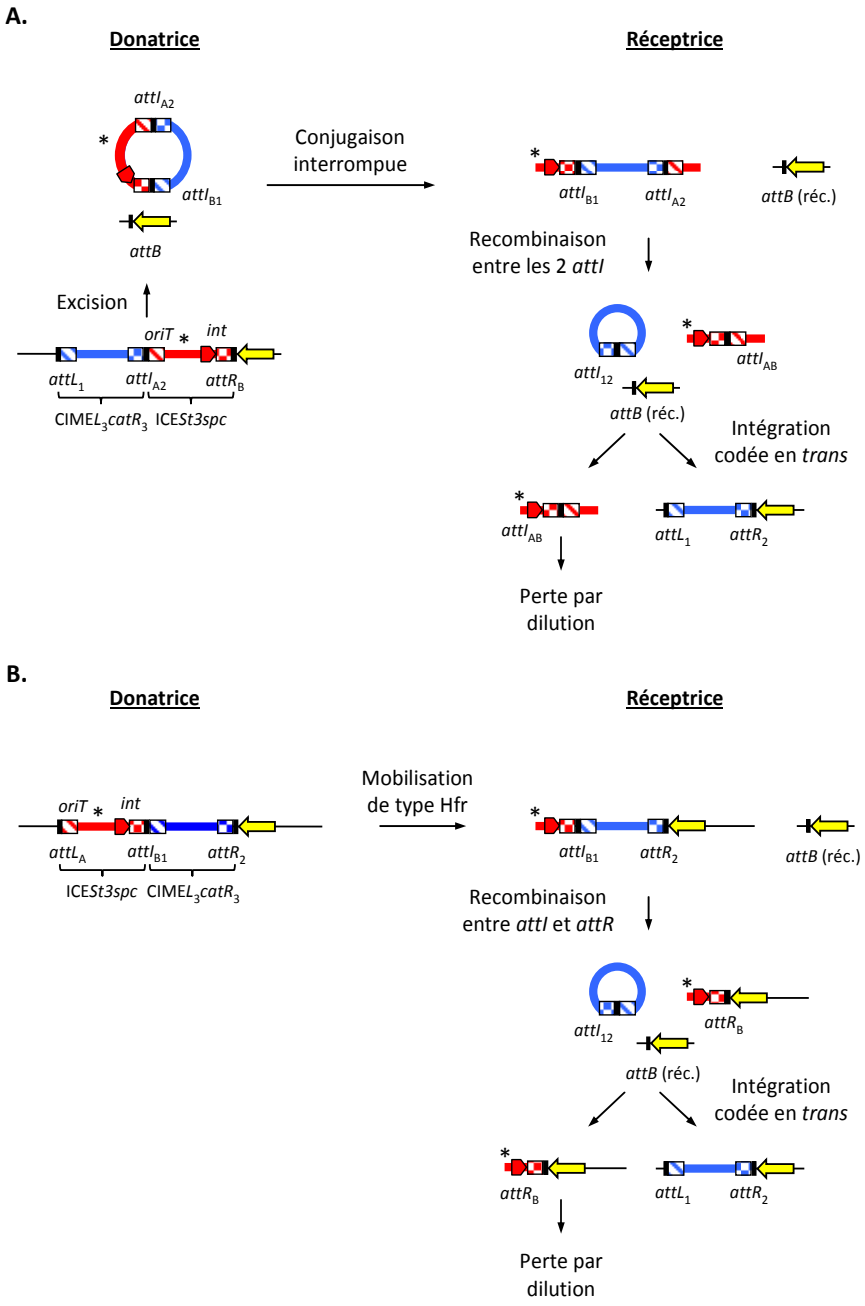


Figure 52 : **Représentation schématique du transfert du seul CIME*L*$_3$*catR*$_3$ après transfert et résolution du tandem CIME-ICE.**

ICE*St3spc* et CIME*L*$_3$*catR*$_3$ sont respectivement représentés par un rectangle rouge et un rectangle bleu. Les gènes *fda* et *int* sont respectivement représentés par une flèche jaune et un rectangle fléché rouge. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences répétées ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Des lettres (A, B) et des chiffres (1, 2) sont utilisés pour discriminer les sites d'attachement des ICE et du CIME. Les noms des sites *attI* résultant de l'accrétion de ces deux éléments reflètent l'origine de leurs deux bras. Les événements représentés à gauche et à droite de la figure se déroulent respectivement dans la cellule donatrice et la cellule réceptrice ayant acquis le tandem (futur transconjugant). réc. : réceptrice.



<u>Figure 53</u> : Représentation schématique du transfert du seul CIME*L*$_3$*catR*$_3$ par conjugaison interrompue (A.) ou par mobilisation de type Hfr (B.).

ICE*St3spc* et CIME*L*$_3$*catR*$_3$ sont respectivement représentés par un rectangle rouge et un rectangle bleu. Les gènes *fda* et *int* sont respectivement représentés par une flèche jaune et un rectangle fléché rouge. L'origine de transfert (*oriT*) est symbolisée par un astérisque. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences répétées ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Des lettres (A, B) et des chiffres (1, 2) sont utilisés pour discriminer les sites d'attachement des ICE et du CIME. Les noms des sites *attI* résultant de l'accrétion de ces deux éléments reflètent l'origine de leurs deux bras. Les événements représentés à gauche et à droite de la figure se déroulent respectivement dans la cellule donatrice et la cellule réceptrice ayant acquis le tandem (futur transconjugant). réc. : réceptrice.

l'excision de l'ICE sous forme circulaire. Dans le tandem CIME-ICE, le site d'initiation du transfert et le début du fragment d'ADN transféré se situent au niveau de l'*oriT* (Figure 53). La nature du brin transféré a été déterminé par comparaison d'ICE*St1* et d'ICE*St3* avec les ICE apparentés Tn*916* et ICE*Bs1* chez lesquels l'*oriT* et la coupure catalysée par la relaxase ont été étudiées (Lee and Grossman, 2007; Rocco and Churchward, 2006). Cependant, le seul promoteur putatif qui pourrait contrôler l'expression du module de recombinaison a été identifié dans le module de régulation de l'ICE (Figure 19). Ainsi, le module de recombinaison porté par les fragments simple-brin transférés ne serait pas exprimé. Ces deux dernières hypothèses semblent donc moins probables que celle de la résolution de la forme circulaire du tandem CIME-ICE après transfert.

3.4.2 ICE ET TANDEMS CIME-ICE : ORIGINES DES DIFFERENCES ENTRE LES FREQUENCES DE TRANSFERT

L'étude de la mobilisation conjugative de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ par ICE*St3spc* a démontré que la fréquence de transfert d'au moins ICE*St3spc* est de 1,4 x 10^{-5} ± 0,3 x 10^{-5}, tandis que celle du tandem CIME-ICE est de 2,6 x 10^{-7} ± 0,7 x 10^{-7}. Bien que les deux éléments composant le tandem soient flanqués de sites d'attachement dont la séquence est identique, l'excision d'ICE*St3spc* implique la recombinaison entre un site *attI* et un site *attR* ou un site *attL*, tandis que celle du tandem résulte obligatoirement de la recombinaison entre les sites *attR* et *attL* flanquant cette structure (Figure 41). Si les couples de sites *attI-attR et attI-attL* sont plus fortement recombinogènes que le couple *attL-attR*, le nombre de copie circulaire de l'ICE pourrait être supérieur au nombre de copie circulaire du tandem.

De plus, l'étude du tandem CIME19258*cat*-ICE*St3spc* a montré que son excision sous la forme d'une molécule circulaire est très probable. Cependant, seul le transfert conjugatif de l'ICE a été obtenu à partir de la souche portant cette structure. Contrairement au tandem CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc*, différents sites d'attachement sont présents dans ce tandem. En effet, CIME19258*cat* porte un site *attL* identique à 99 % avec le site *attL* d'ICE*St2*, tandis qu'ICE*St3spc* porte un site *attL* identique à 93 % avec le site *attL* d'ICE*St1* (Figure 9). Bien que ces deux éléments possèdent le même site *attR*, l'étude d'ICE*St2* a montré qu'il s'excise environ 10 fois moins qu'ICE*St1*. Les sites *attL* portés par ces deux éléments présentent donc des propriétés différentes, le site d'ICE*St2* semblant moins recombinogène. Puisque les sites *attL* de CIME19258*cat* et d'ICE*St2* ainsi que les sites *attL* d'ICE*St3spc* et d'ICE*St1* sont étroitement apparentés, ces éléments présentent probablement deux à deux des propriétés d'excision similaires. Ainsi, le tandem CIME19258*cat*-ICE*St3spc* s'exciserait à plus faible fréquence que l'ICE seul.

En outre, l'étude des mutants du gène *arp1* d'ICE*St3* a démontré une absence d'effet significatif de la diminution du nombre de copie circulaire de cet ICE par génome sur sa fréquence de transfert. Ceci suggère que le nombre de copie circulaire d'ICE*St3* par génome et sa fréquence de transfert ne sont pas directement corrélés. Par conséquent, bien qu'une

une différence du nombre de formes circulaires de l'ICE seul et des tandems CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* et CIME19258*cat*-ICE*St3spc* soit probable, son implication dans la différence de fréquence de transfert entre ces deux types de molécules n'est pas connue.

Par ailleurs, ICE*St3spc*, CIME*L*$_3$*catR*$_3$ et CIME19258*cat* ont respectivement une taille de 29, 1,7 et 16 kb. Ainsi, les tandems CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* et CIME19258*cat*-ICE*St3spc* représentent respectivement environ 106 % et 150 % de la taille de l'ICE. Si la légère augmentation de taille du tandem CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* par rapport à ICE*St3spc* seul est en partie responsable de la différence de transfert observée entre ces deux types de molécules, le transfert du tandem CIME19258*cat*-ICE*St3spc* ne sera que très difficilement obtenu puisque celui-ci est beaucoup plus grand que le tandem CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc*. L'augmentation de la taille de l'élément à transférer pourrait donc également être impliquée dans l'écart observé entre les fréquences de transfert d'ICE*St3spc* et des deux tandems CIME-ICE.

Enfin, les tandems CIME19258*cat*-ICE*St3spc* et CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc* portent, sous forme circulaire, deux sites *attI* (Figure 41). La présence de ces deux sites pourrait permettre des recombinaisons intramoléculaires et entraîner, après excision des tandems, la formation de la forme circulaire de l'ICE et du CIME. Lorsque tous ces éléments sont sous forme circulaire, seul l'ICE est capable de se transférer. Par conséquent, une instabilité du tandem sous forme circulaire à cause de la présence des deux sites *attI* pourrait jouer un rôle dans la différence entre les fréquences de transfert de l'ICE et des deux tandems CIME-ICE. De plus, si les réactions de recombinaison *attI*-*attL* sont moins efficaces que les recombinaisons *attI*-*attI*, la présence dans un tandem CIME-ICE d'un site *attL* interne, comme chez CIME368-ICE*St2* et CIME9-ICE*St3cat,* et non d'un site *attI* interne, comme chez les tandems CIME19258*cat*-ICE*St3spc* et CIME*L*$_3$*catR*$_3$-ICE*St3spc*, pourrait favoriser la stabilité et le transfert du tandem (Figure 51).

En conclusion, plusieurs hypothèses non exclusives sont envisageables pour expliquer la différence de fréquence de transfert entre l'ICE et le tandem.

3.4.3 RETROMOBILISATION

La rétromobilisation ou capture de CIME*L*$_3$*catR*$_3$ par ICE*St3spc* caractérisée dans ce travail est la troisième observation d'un événement de rétromobilisation chez les bactéries Gram positive, des rétromobilisations par des plasmides conjugatifs ayant été récemment décrits chez quelques bactéries du genre *Bacillus* (Lotareva *et al.*, 2006; Timmery *et al.*, 2009). De plus, ce travail représente le premier cas décrit de rétromobilisation impliquant un ICE. Ainsi, les tentatives d'observation d'une rétromobilisation de plasmides de *B. subtilis* et

B. thuringiensis par les ICE Tn*916* et Tn*925* n'avaient pas abouti (Showsh and Andrews, 1996). C'est également la première fois que l'élément rétromobilisé est un îlot génomique et non un plasmide ou fragment de chromosome.

Après qu'une cellule ait acquis un ICE lui conférant un avantage adaptatif, la perte du module de conjugaison de l'élément ne sera à priori pas contre-sélectionnée puisque le transfert de l'ICE ne confère pas, à priori, de phénotype avantageux à l'hôte. Cependant, la capture d'éléments génétiques mobiles par rétromobilisation pourrait conférer un tel avantage. En effet, les études de captures de plasmides mobilisables menées chez les bactéries Gram négative suggèrent fortement que ce phénomène est très courant (Ankenbauer, 1997; Szpirer *et al.*, 1999). Par ailleurs, de nombreux îlots génomiques flanqués de répétitions directes, dont des îlots portant des gènes du métabolisme ou de pathogénicité, pourraient être des CIME ou des IME potentiels (voir § A.2). Ceci conduit à l'hypothèse que la rétromobilisation de CIME après accrétion avec un ICE apparenté pourrait également être répandue. De même, la rétromobilisation d'un IME par un élément conjugatif, que ce soit un plasmide ou un ICE, bien que jamais décrite, pourrait être répandue. Globalement, la rétromobilisation ou capture d'îlots génomiques par les bactéries portant des systèmes conjugatifs pourrait avoir un impact important sur l'évolution de ces organismes.

4 ACCRETION SPECIFIQUE : MECANISME MAJEUR D'EVOLUTION DES ILOTS GENOMIQUES ?

L'intégration en tandem d'ICE*St3* avec des ICE et des CIME apparentés a été démontrée lors de ce travail. De plus, la mobilisation conjugative en *cis* de CIMEL_3catR_3 par ICE*St3* a été obtenue. Ces résultats démontrent la validité du modèle d'évolution des îlots génomiques de *S. thermophilus* par accrétion et mobilisation conjugative en *cis*, établi après l'étude des séquences des îlots intégrés au locus *fda* (Figure 11). Les premières analyses de données bibliographiques réalisées dans ce but avant le début de ce travail avaient suggéré que les événements d'accrétion et de mobilisation en *cis* interviennent dans l'évolution de plusieurs autres familles d'ICE codant des intégrases à tyrosine (Pavlovic *et al.*, 2004), le nombre de cas facilement identifiables sans réanalyse complète des données de séquence étant cependant extrêmement limité. Existe-t-il aujourd'hui des études ou des données de séquences suggérant que les îlots génomiques évoluant grâce à ces deux phénomènes sont plus largement répandus ? Les évidences actuelles correspondent à de rares expériences conduisant à la formation de tandems de phages ou d'ICE qui seront présentées et des données de séquences de plus en plus nombreuses, rarement interprétées par les auteurs, suggérant des accrétions passées. Les mécanismes d'accrétion spécifique n'impliquant pas d'intégrases à tyrosine et/ou de sites d'attachements seront également présentés.

Par ailleurs, l'accrétion de deux éléments génétiques mobiles peut également se produire par de nombreux mécanismes non spécifiques tels la transposition réplicative d'IS ou l'intégration d'un ICE à faible spécificité comme Tn*916*. Ces mécanismes contribuent de façon importante à l'évolution des éléments génétiques mobiles en permettant l'échange de modules entre éléments non apparentés. Ainsi, l'acquisition du module de résistance aux ions cadmium par CIME19258 s'est produite après l'intégration d'un ICE apparenté à Tn*916* dans sont extrémité gauche (Pavlovic *et al*., 2004 ; Figure 11). Toutefois, ils ne sont pas exposés dans ce chapitre.

4.1 ACCRETION IMPLIQUANT DES RECOMBINASES A TYROSINE

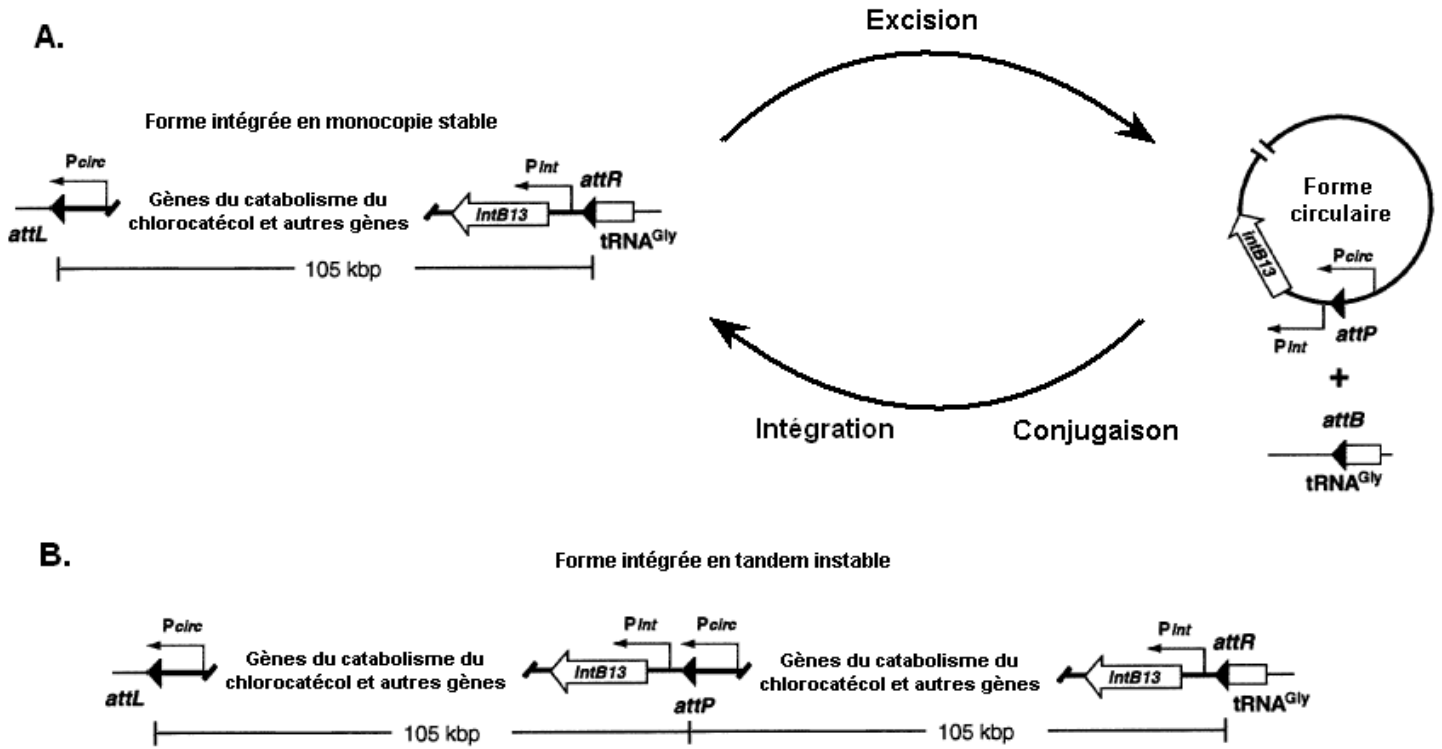
4.1.1 ETUDES DE LA FORMATION DE TANDEMS

4.1.1.1 TANDEMS DE DEUX ELEMENTS IDENTIQUES

Le devenir d'un seul ICE et de rares phages à haute spécificité d'intégration se transférant vers une réceptrice possédant déjà une copie résidente du même élément dans le site *attB* a été analysé (Kholodii and Mindlin, 1985; Possoz *et al.*, 2001).

Les phages apparentés λ et ϕ80 d'*E. coli* portent une intégrase à tyrosine de type P4. Lors d'une infection à multiplicité élevée et identique par les phages λ ou ϕ80, des cellules polylysogènes, c'est-à-dire des cellules possédant plusieurs prophages intégrés dans leur génome, sont respectivement obtenues à une fréquence de 40 % et 4 % (Kholodii and Mindlin, 1985). Si la polylysogénisation du prophage λ se traduit toujours par l'obtention de tandems intégrés dans le site $attB_{\lambda}$, l'acquisition multiple du prophage ϕ80 se caractérise par l'intégration d'un élément dans le site $attB_{\phi 80}$ et d'un ou de plusieurs élément(s) dans un site *attB* secondaire (Kholodii and Mindlin, 1985). De plus, les tandems du prophage λ sont stables tandis que ceux obtenus pour le prophage ϕ80 sont hautement instables. Cette différence de comportement entre ces deux phages apparentés semble provenir de l'expression constitutive du gène de l'intégrase du prophage ϕ80 (Kholodii and Mindlin, 1985).

Par ailleurs, ICE*clc* de *Pseudomonas knackmussii* B13, élément codant le catabolisme de divers produits chlorés dont le chlorocatécol, peut former des tandems par des mécanismes non déterminés (van der Meer *et al.*, 2001). Le gène *intB13* codant l'intégrase de cet ICE est situé à proximité immédiate des sites *attR* de la forme intégrée et *attP* de la forme circulaire (Figure 54) (Sentchilo *et al.*, 2003). ICE*clc* porte un promoteur fort, Pcirc, situé près d'*attL* dans la forme intégrée et au-delà d'*attP* dans la forme circulaire. Des clones présentant des intégrations en tandem instables d'ICE*clc* ont été isolés en présence de chlorobenzène comme seule source carbonée (Ravatn *et al.*, 1998a). Sous cette forme, le gène *intB13* de l'intégrase serait fortement transcrit à partir du promoteur Pcirc de l'ICE



<u>Figure 54</u> : **Représentation schématique d'ICE*clc*. A. Forme intégrée en monocopie et forme circulaire de l'ICE clc. B. Forme intégrée en tandem** (d'après Sentchilo *et al*., 2003b).

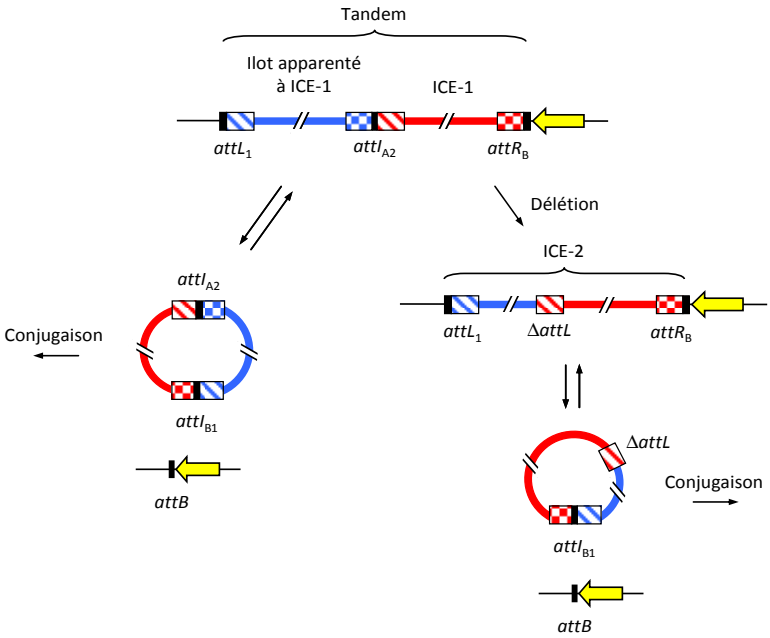
ICE*clc*, d'une taille de 105 kb, est encadré, sous forme intégrée, des sites *attL* et *attR* représentés par des triangles noirs. Sous forme circulaire, il ne contient qu'un site *attP* qui peut recombiner avec un autre site *att* (*attB*, *attL* ou *attR*). Pint et Pcirc sont les deux promoteurs du gène de l'intégrase *intB13*. Les réactions d'excision et d'intégration sont catalysées par l'intégrase de *clc*, *IntB13*.

adjacent (Figure 54). De ce fait, la fréquence d'excision augmenterait, entraînant la perte de la structure en tandem (Sentchilo *et al.*, 2003).

La régulation des éléments génétiques mobiles apparaît donc jouer un rôle important dans la capacité de ces éléments à former des tandems et sur la stabilité de ce type de structure. De plus, bien que l'implication de la recombinaison homologue dans ce phénomène ne soit pas été étudiée, l'ensemble de ces études suggèrent fortement que la formation de tandems d'un même élément résulte d'une recombinaison site-spécifique entre le site *attR* ou *attL* de l'élément résident et le site *attI* de l'élément transféré.

4.1.1.2 TANDEMS DE DEUX ELEMENTS APPARENTES S'INTEGRANT AU MEME LOCUS

Avant ce travail, une seule étude sur l'intégration en tandem de deux éléments différents (SXT et R391) portant des modules de recombinaison étroitement apparentés avait été réalisée (Hochhut *et al.*, 2001a). Cette parenté étroite se traduit par la synthèse de 2 intégrases ayant une même spécificité d'intégration et l'existence de sites d'attachement compatibles, c'est-à-dire des sites pouvant être reconnus par l'une ou l'autre de ces 2 intégrases. Le transfert de l'ICE SXT vers une cellule d'*E. coli* possédant l'ICE étroitement apparenté R391 conduit à la formation de tandems SXT-R391 (Hochhut *et al.*, 2001a). De même, des transconjugants portant des structures en tandem composées des éléments ICE*St3* et ICE*St1* de *S. thermophilus* ont été obtenus et caractérisés lors de ce travail. Dans ces deux cas, la formation de tandems résulte très probablement de l'intégration de l'ICE entrant par recombinaison site-spécifique. Cependant, ces tandems pourraient également résulter d'une recombinaison homologue puisque ces ICE de protéobactéries et de streptocoques partagent respectivement une séquence de 65 kb et 14 kb présentant plus de 95 % d'identité (Beaber *et al.*, 2002a; Pavlovic *et al.*, 2004). Les éléments CIMEL_3*cat*R_3, CIME19258*cat* et CIME9 ne possèdent pas de séquences pouvant permettre une intégration d'ICE*St3* par recombinaison homologue. Par conséquent, les tandems formés de l'un de ces CIME et d'ICE*St3* résultent obligatoirement de l'intégration site-spécifique de l'ICE dans l'un des deux sites d'attachement flanquant le CIME. L'accrétion de deux éléments différents présentant des sites d'attachement compatibles peut permettre l'excision et le transfert conjugatif de cet ensemble constituant donc un ICE composite (Figure 55). La délétion d'un fragment contenant le site *attI* interne d'un tel tandem pourrait conduire à un nouvel ICE ayant acquis certains des modules de l'autre ICE (Figure 55). Par opposition aux tandems composés de plusieurs copies d'un seul élément, seuls les tandems issus de l'accrétion site-spécifique de deux îlots différents possédant des modules de recombinaison apparentés peuvent permettre à un élément d'acquérir de nouveaux modules.



<u>Figure 55</u> : Conséquences de la présence de sites d'attachement compatibles dans un tandem comportant un ICE.

L'ICE et l'îlot génomique apparenté sont respectivement représentés par un rectangle rouge et un rectangle bleu. Le gène dont l'extrémité est incluse dans le site *attB* est représenté par une flèche jaune. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences répétées ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attI*. Des lettres (A, B) et des chiffres (1, 2) sont respectivement utilisés pour discriminer les sites d'attachement de l'ICE et de l'îlot génomique. Les noms des sites *attI* résultant de l'accrétion de ces deux éléments reflètent l'origine de leurs deux bras.

4.1.2 TRACES D'EVENEMENTS D'ACCRETION PASSES

4.1.2.1 TRACES D'ACCRETION D'ILOTS APPARENTES S'INTEGRANT AU MEME LOCUS

L'accrétion site-spécifique de deux îlots génomiques apparentés portant des modules de recombinaison étroitement apparentés ou des reliquats de ces modules, conduit à la formation d'un îlot composite présentant une structure caractéristique. Celui-ci portera au moins trois copies identiques ou quasi-identiques d'une séquence, incluse dans les sites d'attachement. Deux de ces répétitions flanquent les îlots composites, tandis qu'une répétition supplémentaire est localisée dans le site d'attachement interne résultant de l'accrétion. Ainsi, l'élément composite ICE*St1* et le tandem CIME19258*cat*/ICE*St3spc*/*fda* portent trois répétitions directes imparfaites (Figures 10 et 36). La présence au sein de tout îlot génomique intégré par recombinaison site-spécifique d'une ou plusieurs séquences identiques ou quasi-identiques aux répétitions directes flanquant l'élément sera la trace d'un ou plusieurs événements d'accrétion passé.

Bien que de plus en plus d'études s'attachent à identifier et caractériser des îlots génomiques, très peu d'entre elles ont également été menées dans le but d'étudier leur éventuelle nature chimérique et leur dynamique évolutive. Ainsi, seule la recherche des îlots génomiques présents dans le génome de 8 souches de *S. agalactiae* et l'étude des événements d'accrétion éventuels qu'ils ont subi ont été réalisées de manière exhaustive (Brochet *et al.*, 2008a). Quarante-huit éléments apparentés à un ICE et intégrés dans 15 loci différents d'intégration ont été identifiés. Ces éléments constituent 35 îlots génomiques distincts, pour la plupart composites, dont 12 ICE putatifs, 6 IME potentiels et 13 CIME putatifs. Chaque souche contient une combinaison unique de 4 à 8 éléments. Douze éléments, soit un tiers des éléments découverts, portent des sites d'attachement internes ou sont des coïntégrats. Ainsi, 15 événements d'accrétion impliquant 6 recombinases site-spécifique à tyrosine différentes ont été mis en évidence.

Par ailleurs, le séquençage de génomes ou l'étude de certains éléments a mis en évidence des preuves d'accrétion site-spécifiques chez de nombreux îlots génomiques d'origine diverse, dont une partie est présentée dans le tableau 6. La nature de ces îlots à intégration site-spécifique est très variable : prophage, ICE, ICE putatifs, IME potentiels, CIME putatifs. De plus, si la plupart de ces éléments ne contiennent qu'1 ou 2 sites d'attachement interne(s), l'îlot MIT9312-ISL3 de la cyanobactérie *Prochlorococcus sp.* en contient 13 (Tableau 6) (Coleman *et al.*, 2006).

Ces données suggèrent donc très fortement que les événements d'accrétion site-spécifique et de mobilisation en *cis* catalysés par les intégrases à tyrosine seraient très fréquents et pourraient jouer un rôle clé dans l'évolution des ICE, IME et îlots génomiques apparentés. La conséquence de ce mécanisme d'évolution est que de nombreux îlots

Tableau 6 : Exemples d'îlots génomiques portant la trace d'événements d'accrétion catalysés par des intégrases à tyrosine

Ilot génomique[a]	Espèce (division)[b]	Taille (kb)[c]	Fonctions codées par l'élément[d]	Sites *att* internes[e]	Sites d'intégration[f]	Référence
Rv1041c–Rv1055	*Mycobacterium tuberculosis* (act.)	20	aucune identifiée	1	extrémité 3' d'un gène codant un ARNt^{Leu}	Jang *et al.*, 2008
tandem pSAM2 (ICE)/CIME putatif	*Streptomyces ambofaciens* (act.)	53	aucune identifiée	1	extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Pro}	Boccard *et al.*, 1989
tandem prophage VWB/ΔICE	*Streptomyces ghanaensis* (act.)	57	aucune identifiée	1	extrémité 3' d'un gène codant un ARNt^{Arg}	Ostash *et al.*, 2009
MIT9312-IS*L3*	*Prochlorococcus sp.* (cya.)	95	transporteur de sodium transporteur ABC	13	extrémité 3' d'un gène codant un ARNt^{Pro}	Coleman *et al.,* 2006
Pam100G (ICE putatif)	*Protochlamydia amoebophila* (chl.)	100	aucune identifiée	2	extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Gly}	Greub *et al.*, 2004
IS*L1*	*Synecchococcus sp.* (chl.)	140	métallothionéine	1	extrémité 3' du gène *ssrA*	Scanlan *et al.*, 2009
Tn*5481* (ICE putatif)	*Lactococcus lactis* (fir.)	ND	utilisation du saccharose et synthèse d'une bactériocine (nisine)	1	ND	Immonen *et al.*, 1998
IME_A909_*tRNA*^{Lys}	*Streptococcus agalactiae* (fir.)	13	aucune identifiée	2	extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys}	Brochet *et al.*, 2008
CIME_NEM_*rpmG*	*Streptococcus agalactiae* (fir.)	8	aucune identifiée	1	extrémité 3' du gène *rpmG*	Brochet *et al.*, 2008
GI18311R (ΔICE)	*Streptococcus thermophilus* (fir.)	ND	aucune identifiée	1	extrémité 3' du gène *rpsI*	Données non montrées
ICE*St1* ou CIME368/ICE*St2*	*Streptococcus thermophilus* (fir.)	35	système RM	1	extrémité 3' du gène *fda*	Burrus *et al.*, 2002
tandem GI1/GI2/GI3 (3 ICE putatifs)	*Bordetella petrii* (β)	510	dégradation du chlorocatéchol	2	extrémité 3' d'un gène codant un ARNt^{Gly}	Gross *et al.*, 2008
région *flk*	*Escherichia coli* (γ)	6	variation de phase des antigènes flagellaires	2	extrémité 3' du gène *rnpB*	Feng *et al.*, 2008

Tableau 6 (suite)

Ilot génomique[a]	Espèce (division)[b]	Taille (kb)[c]	Fonctions codées par l'élément[d]	Sites *att* internes[e]	Sites d'intégration[f]	Référence
îlot *pheV*	*Klebsiella pneumoniae* (γ)	4	aucune identifiée	1	extrémité 3' du gène *pheV*	van Aarsten, 2008
P36	*Legionella pneumophila* (γ)	36	aucune identifiée	1	extrémité 3' du gène *prlC*	Doléans-Jordheim *et al.,* 2006
tandem PAGI-2 (ICE putatif) /Dit (CIME putatif)	*Pseudomonas aeruginosa* (γ)	217	pathogénicité	1	extrémité 3' d'un gène codant un ARNt^{Gly}	Mathee *et al.*, 2008
tandem PAPI-1 (ICE) /PAPI-2 (ΔICE)	*Pseudomonas aeruginosa* (γ)	109	pathogénicité	1	extrémité 3' de 2 gènes codant un ARNt^{Lys}	Qiu *et al.,* 2006
SPI-7 (ICE putatif)	*Salmonella enterica* (γ)	134	synthèse d'une capsule (pathogénicité)	1	extrémité 3' d'un gène codant un ARNt^{Phe}	Pickard *et al.*, 2003
CTX (prophage) /RS1	*Vibrio cholerae* (γ)	12	prophage	1	site de résolution chromosomique dif	Davis and Waldor, 2000

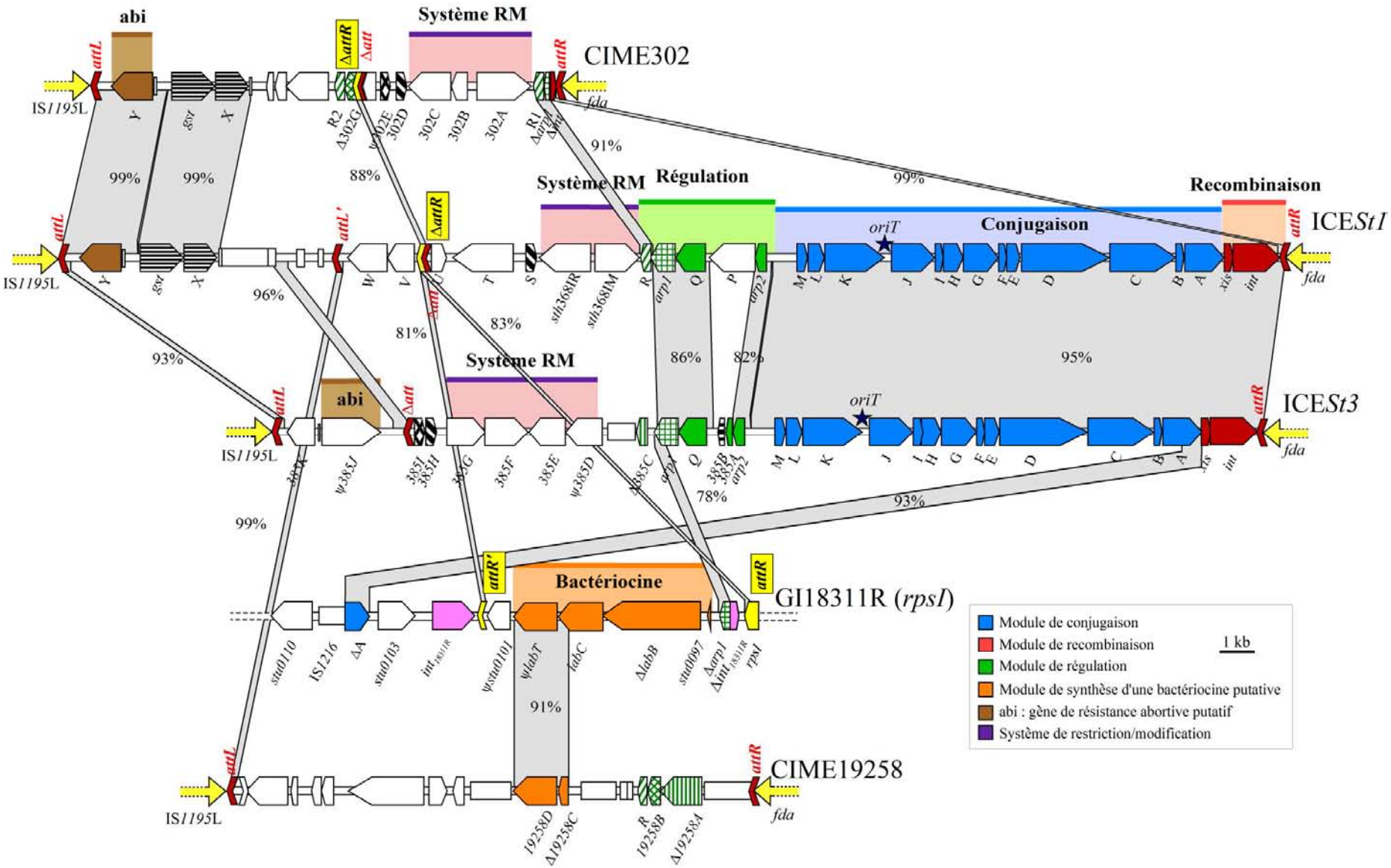
[a] : La nature de l'îlot est indiquée quand celle-ci est connue.
[b] : β, protéobactérie beta ; γ, protéobactérie gamma ; act., actinobactérie ; chl., chlamydiaceae ; cya., cyanobactérie ; fir., firmicute. Les parasites intracellulaires obligatoires sont soulignés en pointillés.
[c] : ND, non déterminé.
[d] : Seules les fonctions utiles à la bactérie porteuse de l'îlot sont citées.
[e] : Nombre de site(s) d'attachement interne(s) à l'îlot.
[f] : ND, non déterminé.

génomiques ne correspondraient pas à un seul et unique élément mais seraient constitués d'une mosaïque d'éléments s'étant intégrés en tandem puis ayant subi des délétions.

4.1.2.2 Traces d'accrétion d'îlots non apparentés

Deux éléments peuvent porter des intégrases à tyrosine non apparentées mais s'intégrer dans un même locus. Ainsi, bien que la séquence protéique des intégrases des ICE putatifs non apparentés *Sav3708* et *Sav3728* de *Streptomyces avermitilis* ne soient identiques qu'à 24 %, ces deux éléments sont intégrés en tandem (te Poele *et al.*, 2008). Des intégrases portées par deux éléments non apparentés mais provoquant l'intégration de ceux-ci dans un même locus ne reconnaissent probablement pas les mêmes séquences cibles et ne catalysent sûrement pas la même coupure décalée. Par conséquent, les sites d'attachement flanquant ces deux éléments ne sont vraisemblablement pas compatibles. Ainsi, un tandem formé de tels éléments n'est sans doute pas capable de s'exciser sous la forme d'une unique molécule circulaire. De même, si la délétion d'un fragment interne au tandem peut conduire à la formation d'un îlot génomique chimérique, celui-ci ne pourra probablement pas s'exciser.

Par ailleurs, un ICE putatif et de nombreux îlots génomiques apparentés sont intégrés dans l'extrémité 3' du gène *rpsI* codant la protéine ribosomique S9 chez de nombreux firmicutes (données non montrées). Des îlots de cette famille sont portés par les trois souches séquencées de *S. thermophilus*. Une analyse de l'îlot présent chez *S. thermophilus* LMG18311 (GI18311R) a révélé que celui-ci contient des séquences nucléotidiques identiques de 78 à 93 % avec des séquences issues des modules de conjugaison, de régulation et de synthèse de bactériocine présents dans les îlots intégrés dans le locus *fda* (Figure 56). Ainsi, les îlots CIME302 et ICE*St1* contiennent respectivement des séquences de 93 et 57 pb identiques à plus de 80 % aux sites *attR* et *attR'* putatifs présents dans l'îlot GI18311R. Ces deux séquences sont probablement les sites *attR* tronqués (Δ*attR*) d'un élément apparenté à GI18311R (Figure 56). La présence de ces résidus de sites d'attachement et les fragments de modules partagés par les deux familles d'îlot montrent de nombreux échanges entre les îlots de *S. thermophilus* intégrés au locus *fda* et ceux intégrés au locus *rpsI*.


abi
Système RM
CIME302
attL
ΔattR
Δatt
attR
IS1195L
fda
Système RM
Régulation
Recombinaison
ICESt1
oriT
Conjugaison
attL'
ΔattL'
Système RM
abi
ICESt3
attR'
Bactériocine
GI18311R (rpsI)
CIME19258
Module de conjugaison
Module de recombinaison
Module de régulation
Module de synthèse d'une bactériocine putative
abi : gène de résistance abortive putatif
Système de restriction/modification
1 kb

<u>Figure 56</u> : Comparaison des séquences des îlots génomiques intégrés dans le locus *fda* et le locus *rpsI* chez *S. thermophilus*.

La localisation et l'orientation des séquences IS*1195*L, *fda* et *rpsI*, c'est-à-dire les séquences flanquant les îlots génomiques intégrés dans les locus *fda* et *rpsI*, sont représentées par des flèches 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 (Ψ) et ORF tronquées (Δ) appartenant aux îlots génomiques sont représentées par des rectangles fléchés, les IS par des rectangles. Les sites *att* complets ou tronqués des îlots des locus *fda* et *rpsI* sont respectivement représentés par des chevrons rouges et des chevrons jaunes. 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 ; 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 IS*1195*L) 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'ICE*St1* et ICE*St3* déduites des comparaisons de séquences avec les *oriT* connues de Tn*916* et IC*EBs1* sont indiquées par des étoiles bleues.

Ces données de séquences permettent de formuler le modèle suivant : l'accrétion non spécifique d'éléments non apparentés appartenant à deux familles distinctes peut aboutir à la création d'un îlot chimérique portant des sites d'attachement non compatibles. Ces sites d'attachement ou des sites tronqués en dérivant pourraient être à l'origine d'événements d'intégrations site-spécifiques impliquant des éléments appartenant à l'une ou l'autre des familles. Un événement d'accrétion non spécifique peut donc conduire à de nombreux échanges de modules par recombinaison site-spécifique entre deux familles d'îlot. Ainsi, un ICE apparenté à l'îlot GI18311R de *S. thermophilus* LMG18311 pourrait s'intégrer dans les sites Δ*attR* portés par CIME302 ou ICE*St1*.

4.2 AUTRES MECANISMES D'ACCRETION SPECIFIQUE

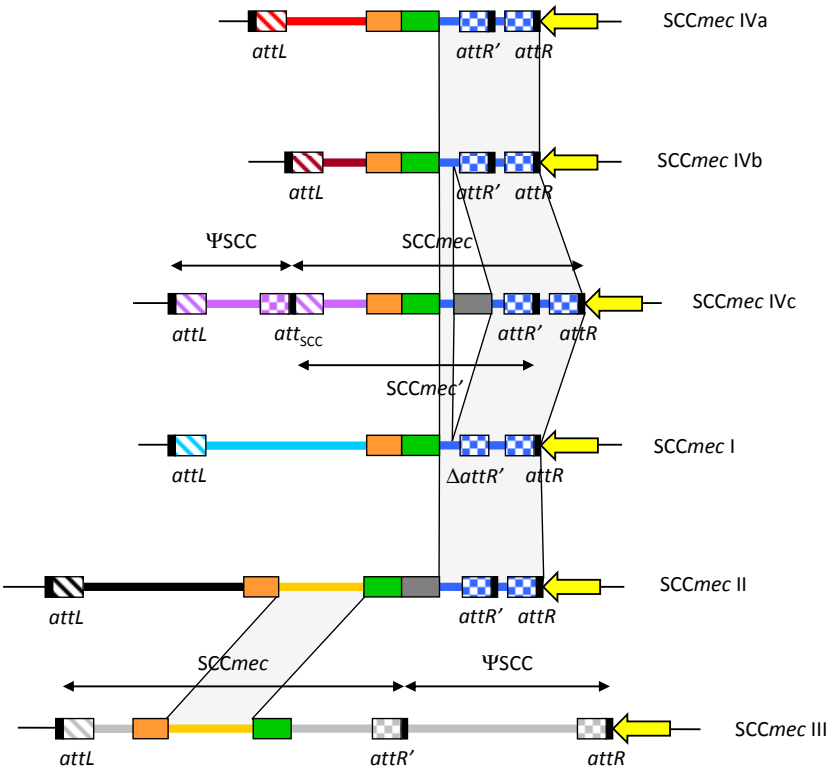
Seuls des accrétions site-spécifiques résultant de l'intégration d'un élément dans le site *att* d'un second élément grâce à une recombinase à tyrosine étaient impliqués dans les événements présentés ci-dessus. Cependant, quelques rares cas d'accrétion site-spécifiques ont été catalysés par des enzymes appartenant à d'autres familles et/ou ont impliqué des séquences qui ne sont pas des sites d'attachement.

4.2.1 INTEGRASES SITE-SPECIFIQUES A SERINE

Les éléments appelés cassettes chromosomiques de staphylocoques (SCC) présents dans le locus *orfX* de nombreuses souches de ce genre s'intègrent et s'excisent grâce à un couple de recombinases site-spécifiques à sérine (Ito *et al.*, 2003). Bien que de nombreuses études aient montré que les îlots SCC se transfèrent horizontalement, le mécanisme à l'origine de ces transferts reste inconnu. Ces éléments appartiennent à une famille contenant des îlots SCC fonctionnels pouvant s'exciser et des îlots en dérivant ne portant pas les gènes des recombinases site-spécifiques à sérine appelés ΨSCC. De nombreux îlots SCC portent le gène *mecA* conférant une résistance à la méthicilline et sont nommés SCC*mec*. Parmi les 7 types d'îlots SCC*mec* recensés (I-VII), les types I, II, III et IV (sous-types a,b et c) contiennent des sites d'attachement internes ou des séquences en dérivant (Figure 57) (Ito *et al.*, 2003). L'étude de l'îlot SCC*mec* IVc porté par la souche *St. aureus* wkz-2 (Figure 57) a montré que les éléments SSC*mec*, ΨSCC et le tandem ΨSCC/SSC*mec* s'excisent sous forme circulaire grâce aux recombinases site-spécifique CcrA et CcrB de l'élément SSC*mec* (Jansen *et al.*, 2006). De plus, lorsque les gènes codant ces deux enzymes sont surexprimés, la forme circulaire de l'élément SSC*mec*' résultant de la recombinaison entre les sites att_{SCC} et *attR'*est détectée (Jansen *et al.*, 2006). Une étude similaire menée sur l'îlot SSC*mec* III de la souche *St. aureus* 85/2082 (Figure 57) a montré que seul le tandem SSC*mec*/ΨSCC s'excise (Chongtrakool *et al.*, 2006). Par ailleurs, le séquençage des génomes de *Staphylococcus haemolyticus* JCSC1435 et *Staphylococcus epidermidis* ATCC 122228 a récemment mis en évidence que les locus *orfX* de ces souches contiennent des tandems respectivement composés de 4 éléments ΨSCC avec un élément SCC et de 6 éléments ΨSCC avec 2 éléments SCC (Takeuchi *et al.*, 2005). Les analyses ayant pour but de rechercher la présence de sites d'attachement internes ou de séquences en dérivant chez les îlots SCC sont rares. Par conséquent, d'autres types d'îlots de cette famille contiennent probablement des traces d'accrétion site-spécifique.

En outre, l'ICE Tn*5397* de *C. difficile* code une recombinase à sérine (Wang and Mullany, 2000). Une souche sauvage de *B. subtilis* ne possède pas de site *attB* proche de celui présent chez *C. difficile* (Wang *et al.*, 2006). Par conséquent, si cet élément se transfère vers une souche sauvage de *B. subtilis*, il s'intègre dans différents sites chromosomiques. Cependant, lorsque les sites *attR* ou *attL* flanquant la forme intégrée de cet élément chez *C. difficile* sont insérés dans le chromosome d'une souche de *B. subtilis*, Tn*5397* s'intègre très préférentiellement dans ces sites *att* (Wang *et al.*, 2006).

Bien que les éléments codant une recombinase à sérine soient plus rares que ceux codant une recombinase à tyrosine, l'ensemble de ces données suggère fortement que les intégrations en tandem d'éléments apparentés grâce à une recombinase à sérine seraient relativement fréquentes.



<u>Figure 57</u> : Représentation schématiques de quatre types d'îlots SCC*mec* (d'après Ito *et al*., 2003 ; Chongtrakool *et al*., 2006 ; Jansen *et al*., 2006)**.**

Les îlots SCC*mec* s'intègrent dans l'extrémité 3' d'*orfX* qui est représenté par une flèche jaune. Ils sont composés de deux complexes de gènes essentiels, le complexe *mer* (rectangle orange) et le complexe *ccr* contenant les recombinases à sérine *ccrA* et *ccrB* (rectangle vert). Le type d'un îlot SCC*mec* est déterminé par la combinaison de ces complexes *mer* et *ccr*. Les rectangles gris symbolisent une IS ou un transposon. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences répétées ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site att_{SCC} ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site att_{SCC}. Les zones grises relient les séquences étroitement apparentées des îlots génomiques. La parenté entre les différents complexes *mer* et *ccr* n'est pas représentée. Les traits de couleur représentent les séquences propres à chaque îlot ou partagées. Les îlots de type I, II, III, IVa, IVb et IVc représentés sont respectivement portés par les souches *St. aureus* NCTC10442, N315, 85/2082, CA05, 8/6-3P et MR108.

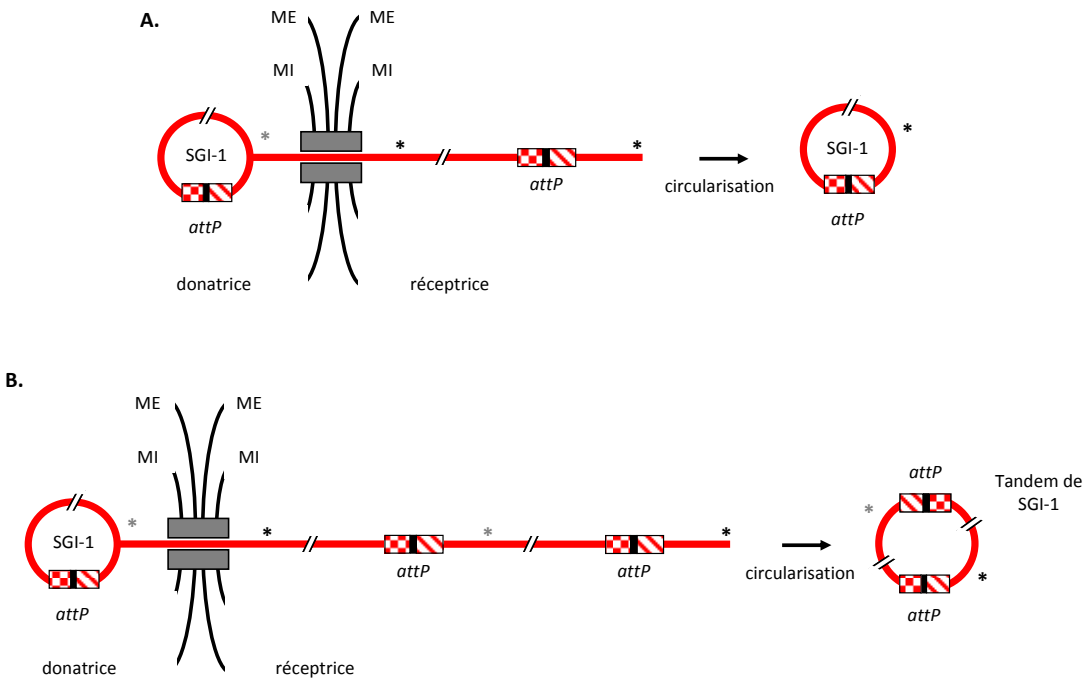
4.2.2 Relaxases et origines de transfert

Bien qu'une relaxase soit codée par tous les éléments conjugatifs se transférant sous forme simple brin, la coupure catalysée par ces enzymes n'a été étudiée que chez quelques ICE et plasmides conjugatifs. Parmi ces enzymes, la relaxase TrwC du plasmide conjugatif R388 présente, en plus de son rôle dans la conjugaison, une activité de recombinase site-spécifique (Draper *et al.*, 2005). En effet, cette enzyme peut catalyser un échange de brin entre deux *oriT*. Si deux *oriT* sont présentes dans la même orientation sur une seule molécule, l'échange de brin catalysé par TrwC provoque la délétion de la séquence comprise entre ces deux *oriT*. Si les deux *oriT* sont portées par deux molécules différentes, TrwC provoque la coïntégration des deux molécules. Bien que la relaxase de SXT ou de R391 ne soit pas apparentée à TrwC, un mécanisme similaire de recombinaison entre *oriT* a été proposé pour expliquer la formation d'ICE chimériques à partir de tandems composés de ces deux ICE (Burrus and Waldor, 2004a; Ceccarelli *et al.*, 2008). De même, des ICE hybrides pourraient également être produit à partir des tandems ICE*St1*-ICE*St3cat*. La recombinaison site-spécifique entre *oriT* grâce aux relaxases pourrait donc être un mécanisme courant mais méconnu d'accrétion site-spécifique et/ou de recombinaison entre éléments après l'accrétion site-spécifique catalysée par une intégrase.

Par ailleurs, l'ICE BTF-37 de *Bacteroides fragilis* LV23 conférant une résistance à la tétracycline se transfère vers d'autres Bacteroidetes et vers *E. coli* puis s'intègre dans un site inconnu (Vedantam and Hecht, 2002). Cet ICE peut également, chez *Bt. fragilis* LV23, s'exciser du chromosome puis s'intégrer dans l'origine de transfert du plasmide mobilisable pRK231 (Vedantam and Hecht, 2002). Le coïntégrat obtenu est un plasmide conjugatif. De plus, la comparaison des ICE putatifs ICE*_515_tRNA*^{Lys} et ICE*_18RS21_tRNA*^{Lys} de *S. agalactiae* a montré que ce dernier élément porte un IME putatif (Figure 2) (Brochet *et al.*, 2008a ; G. Guédon, com. pers.). Les analyses de séquences suggèrent que cet IME putatif se serait intégré par recombinaison site spécifique entre son site *attI* et l'origine de transfert prédite d'ICE*_18RS21_tRNA*^{Lys} (G. Guédon, com. pers.). Bien que le mécanisme mis en jeu dans ces deux coïntégrations n'ait pas été élucidé, une relaxase ou une intégrase codée par l'un des deux éléments impliqués intervient très probablement. Ces données suggèrent fortement que certaines relaxases et/ou certaines intégrases peuvent provoquer l'intégration site-spécifique d'éléments génétiques mobiles grâce à la recombinaison entre une *oriT* une séquence proche ou entre une *oriT* et un site *attI*.

En outre, un élément intégratif mobilisable (IME) est un élément qui s'excise du chromosome d'une souche donatrice grâce à une enzyme qu'il code, qui est mobilisé en *trans* par un élément conjugatif puis qui s'intègre dans un réplicon de la cellule réceptrice. Le transfert de l'IME SGI-1 de *Salmonella enterica* vers une souche sauvage ne possédant cet élément conduit dans plus de 40 % des cas à l'obtention de tandems (Doublet *et al.*, 2008). Ces structures pourraient résulter de plusieurs acquisitions successives de monomères de

SGI-1 suivies d'accrétion site-spécifiques. Cependant, de tels tandems pourraient également être obtenus si la relaxase de l'IME ne catalyse pas la re-circularisation de l'élément à la première origine de transfert rencontrée, mais permet le transfert d'un concatémère de SGI-1 (Figure 58) (Doublet *et al.*, 2008). Le transfert de concatémères pourrait également expliquer l'apparition de tandem d'ICE*clc* lorsque les cellules de *P. knackmussii* B13 sont cultivées en présence de chlorobenzène comme seule source carbonée (Ravatn *et al.*, 1998a). Bien que le transfert de concatémères ne soient pas des accrétions site-spécifiques, les relaxases codées par les ICE ou les IME pourraient être impliquées dans l'acquisition d'un tandem formé de plusieurs copies d'un même élément.



<u>Figure 58</u> : **Représentation schématique du transfert d'un monomère ou d'un concatémère de SGI-1** (d'après Doublet *et al.*, 2008).

(A.) Transfert d'un monomère de SGI-1. (B.) Transfert d'un concatémère de SGI-1. SGI-1 est représenté par un rectangle rouge. Les étapes d'excision et d'intégration site-spécifiques ne sont pas représentées. Les sites d'attachement sont représentés par des rectangles : noir, séquences répétées ; hachuré, bras du site *attL* et bras correspondant du site *attI* ; damier, bras du site *attR* et bras correspondant du site *attP*. Les origines de transfert sont représentées par des astérisques. Les astérisques noirs indiquent les origines de transfert utilisées chez la cellule réceptrice pour la circularisation du monomère ou du concatémère de SGI-1. Les rectangles gris symbolisent le pore de conjugaison. ME : membrane externe. MI : membrane interne.

4.2.3 ACCRETIONS STRUCTURE-SPECIFIQUE

La plupart des transposons codant une transposase à DDE présente une faible spécificité d'intégration, s'intégrant préférentiellement dans des séquences présentant certaines caractéristiques. Le transposon Tn7 et les transposons apparentés présentent quant à eux la propriété inhabituelle de pouvoir reconnaître deux types de sites cibles (Parks and Peters, 2007; Wolkow *et al.*, 1996). La cible reconnue lors des transpositions du premier type n'est pas un site précis mais tout ADN simple brin produit lors de la réplication par cercle roulant d'un élément conjugatif se transferant (Wolkow *et al.*, 1996). Ainsi, ce type d'événements entraîne la transposition réplicative des transposons apparentés à Tn7 sur les éléments conjugatifs en cours de transfert. Il conduit donc à l'accrétion de Tn7 et de l'élément conjugatif. De plus, lorsqu'un élément conjugatif portant Tn7 est acquis par une cellule, ce dernier transpose de façon site-spécifique de l'élément conjugatif vers un site chromosomique unique nommé *att*Tn7 (Wolkow *et al.*, 1996). Ce type d'événements constitue le second type de transposition permettant le transfert de Tn7. Globalement, les deux activités confèrent à cet élément la capacité d'être mobilisé par un élément conjugatif et de se maintenir de façon autonome après transfert.

Par ailleurs, une étude récente a montré que la séquence d'insertion IS*608* code une transposase apparentée à la relaxase TrwC et ne transpose que dans un ADN cible simple brin (Guynet *et al.*, 2008). Par conséquent, les IS de la famille d'IS*608* se transfèrent à haute fréquence sur les éléments conjugatifs lorsqu'ils sont sous forme simple brin, c'est-à-dire lors de leur entrée dans la cellule réceptrice ou lors de leur transfert conjugatif (Guynet *et al.*, 2008).

Les transposons de type Tn7 et les IS de la famille d'IS*608* sont des éléments génétiques mobiles ciblant les éléments conjugatifs se transférant. La transposition de ces deux types d'éléments génétiques mobiles est donc spécifique de la structure de l'ADN cible et non de sa séquence. De plus, les transposons apparentés à Tn7 peuvent portés de modules conférant des fonctions très différentes telles que des résistances aux antibiotiques, la synthèse d'une bactériocine ou un système RM (Parks and Peters, 2007). Ces données suggèrent donc que les éléments à intégration structure-spécifique participent de manière importante à l'échange de modules entre éléments conjugatifs.

5 NATURE ET ABONDANCE DES CIME

5.1 CIME : NOUVELLE CLASSE D'ELEMENT GENETIQUE MOBILE NON AUTONOME

L'utilisation du plasmide pNST269+ et l'étude des tandems CIME-ICE ont démontré que les CIME sont mobilisables de manière intracellulaire en *trans* et en *cis*. De plus, la mobilisation conjugative en *cis* d'un CIME a été obtenue.

Si les éléments génétiques mobiles non autonomes sont relativement fréquents chez dans les génomes eucaryotes et connus depuis de nombreuses années, ils semblaient jusqu'à récemment rares dans les génomes bactériens (Delihas, 2008; Hartl *et al.*, 1992). Les mini-éléments transposables flanqués de répétitions inversées ou MITE (Miniatures Inverted-repeat Transposable Elements) sont des éléments de 100 à 200 nucléotides présents chez de nombreuses bactéries et dont le nombre de ne cesse de croître avec le séquençage des génomes (Delihas, 2008). La plupart de ces éléments sont flanqués de répétitions terminales inversées (TIR), ont un dinucléotide $^{5'}$TA$^{3'}$ à leurs extrémités, ont une séquence riche en nucléotides A et T et produisent une duplication de la séquence cible à l'intégration. Les MITE sont généralement retrouvés dans des séquences intergéniques mais ils peuvent également interrompre des séquences codantes (Delihas, 2008). Beaucoup de TIR flanquant ces éléments présentent des ressemblances avec les TIR d'IS (Buisine *et al.*, 2002; Mazzone *et al.*, 2001; Oggioni and Claverys, 1999). La transposase d'une IS dont les TIR sont apparentées aux TIR d'un MITE, catalyserait la transposition réplicative ou non réplicative de cet élément mobilisable en *trans* (Delihas, 2008; Oggioni and Claverys, 1999). Les MITE présenteraient donc les mêmes propriétés de transposition que les IS dont la transposase reconnaît les TIR.

Par ailleurs, les intégrons sont des îlots génomiques bactériens qui constituent un système de capture, d'expression et de dissémination d'éléments génétiques mobiles appelées cassettes (Mazel, 2006; Rowe-Magnus and Mazel, 2001). Ces éléments sont constitués d'un gène *intI* codant une recombinase site-spécifique à tyrosine et de nombreuses cassettes (Mazel, 2006; Rowe-Magnus and Mazel, 2001). Les cassettes portent le plus souvent une ORF de résistance à un antibiotique mais pas de promoteur (Rowe-Magnus *et al.*, 2002). Lorsqu'une nouvelle cassette est acquise par transfert horizontal, la forme circulaire de celle-ci est intégrée dans l'intégron grâce à une recombinaison entre le site *attI* flanquant l'extrémité 5′ du gène *intI* et le site *attC* porté par la cassette (Mazel, 2006). Cette réaction conduit à l'intégration de la cassette flanquée d'un site *attI* se situant près de l'intégrase et d'un site *attC* se situant près de l'autre cassette.

Les CIME éléments sont donc, au même titre que les MITE ou les cassettes d'intégrons, des éléments mobilisables non autonomes. Par ailleurs, bien qu'ils aient été décrits comme des éléments mobilisables en *cis*, les CIME apparaissent comme une nouvelle classe d'éléments mobilisables en *trans* et en *cis*.

5.2 CIME, TRANSPOSON SITE-SPECIFIQUE OU IME ?

Bien que très peu d'entre eux aient été identifiés, quelques plasmides et un IME naturels ne codent pas de relaxase mais seulement une *oriT* apparentée ou non à celle de l'élément conjugatif mobilisateur. Ainsi, MTn*Sag1*, un IME de *S. agalactiae* qui s'intègre grâce à une transposase à DDE, ne code aucune protéine impliquée directement dans son transfert mais présente une *oriT* interne au gène *lnu* conférant une résistance aux lincosamides (Achard and Leclercq, 2007). Bien que la séquence de cette *oriT* ne soit pas apparentée à celle de Tn*916*, la relaxase codée par cet ICE la reconnaît et conduit à la mobilisation en *trans* de MTn*Sag1* à une fréquence de 3,1 x 10^{-8}. Cet élément est le premier élément intégratif mobilisable naturel ne possédant pas de relaxase mais seulement une *oriT*. De même, le plasmide mobilisable pES213 de *V. fischeri* porte deux *oriT* apparentées à celle du plasmide conjugatif pES100, mais ne code aucune relaxase (Dunn *et al.*, 2005). La mobilisation en *trans* de pES213 nécessite non seulement la synthèse d'un pore grâce au plasmide pES100, mais également la présence de la relaxase de ce plasmide conjugatif.

Par ailleurs, de nombreux îlots génomiques flanqués de répétitions directes codent une intégrase à tyrosine mais ne codent pas de relaxase. Ces éléments sont ou semblent capables de s'exciser (Bourhy *et al.*, 2007; Hacker and Kaper, 2000; Hochhut *et al.*, 2006; Murphy and Boyd, 2008). De plus, la recherche récente des ICE et des îlots génomiques apparentés chez *S. agalactiae* à conduit à la découverte d'éléments également flanqués de répétitions directes et portant une intégrase à tyrosine (Brochet *et al.*, 2008a). Bien que la définition des ce type d'éléments n'impliquait pas la présence d'un module de recombinaison complet, ces îlots de *S. agalactiae* avaient été inclus dans les CIME dans cet article. De même, les îlots SCC codent des recombinases site-spécifiques à sérine, s'excisent et s'intègrent dans un site chromosomique unique, mais ne codent pas de relaxase (Haroche *et al.*, 2002; Ito *et al.*, 2003). Tn*554*, un transposon de *St. aureus* dont la mobilité est assuré par une intégrase à tyrosine, s'intègre à haute spécificité (> 99 %) dans un site nommé att_{Tn554} (Murphy *et al.*, 1991). Ainsi, cet élément est qualifié de transposon site-spécifique. De manière similaire, l'ensemble des éléments décrits dans ce paragraphe pourraient également être qualifiés de transposons site-spécifiques puisqu'ils s'intègrent dans un site chromosomique unique et s'excisent. Certains de ces îlots génomiques pourraient également porter des *oriT* non identifiées permettant leur mobilisation conjugative en *trans* et correspondre en fait à des IME. L'identification d'une *oriT* ne pourrait se faire que par comparaison avec les rares *oriT* identifiées des éléments mobilisateurs, ICE ou plasmides conjugatifs, si leurs séquences sont proches ou par la mobilisation conjugative elle-même. Il est donc très probable que de nombreux IME soient passés complètement inaperçus. Bien qu'un seul de ces éléments ait été identifié, les IME ne codant pas de relaxase pourraient être très répandus.

5.3 Repandus mais meconnus : le paradoxe des CIME

Les CIME sont des îlots génomiques dérivant d'ICE par délétions des modules de régulation, de conjugaison et de recombinaison mais qui restent flanqués de sites d'attachement. De nombreux îlots génomiques dépourvus des mêmes modules sont également flanqués de répétitions directes (Hacker and Kaper, 2000). Toutefois, pour que ceux-ci soient des CIME, ils doivent être apparentés à un ICE ou un IME qui pourrait s'intégrer dans l'un de leur site d'attachement flanquant et les mobiliser en *cis*. Ainsi, l'îlot de pathogénicité HPI de *Y. pestis*, étroitement apparenté à ICE*Ec1* d'*E. coli*, est un CIME putatif (Schubert *et al.*, 2004a; Schubert *et al.*, 2004b). La seule étude dont le but n'a pas simplement été de rechercher des îlots génomiques, mais de déterminer leur nature putative (CIME, IME ou ICE) a été réalisée sur les génomes de 8 souches de *S. agalactiae* (Brochet *et al.*, 2008a). Ainsi, 7 CIME potentiels différents dépourvus d'intégrase ont été décrits. Chaque souche contient 1 à 2 CIME. La forte fréquence des îlots génomiques, les études de plus en plus nombreuses mettant en évidence des ICE et des ICE putatifs ainsi que la forte prévalence des CIME putatifs chez 8 souches de *S. agalactiae* suggèrent très fortement que les CIME pourraient être aussi variés et répandus que les ICE.

6 Perspectives

Les éléments transférables ou mobilisables jouent un rôle majeur dans les transferts horizontaux, l'échange et l'acquisition de nouvelles fonctions par les bactéries et les archées. De plus en plus d'études récentes ont mises en évidence la place importante des ICE dans les transferts horizontaux et l'évolution bactérienne. Des analyses bibliographiques et une analyse de séquence génomique (Brochet *et al.*, 2008a) suggèrent très fortement que les CIME soient aussi nombreux et variés que les ICE. Bien que ce travail présente la première étude menée sur la mobilisation d'un CIME, ces éléments jouent donc très probablement, au même titre que les ICE, un rôle essentiel dans la dissémination des gènes par transfert horizontal. Comprendre les modalités des transferts conjugatifs et l'évolution des ICE et des CIME apparentés pourrait donc constituer un enjeu majeur pour appréhender l'acquisition et l'évolution des îlots génomiques et des bactéries.

6.1 Mise en place du pore de conjugaison et spectre de transfert

Les connaissances sur le pore de conjugaison chez les bactéries Gram positives sont quasiment inexistantes. L'étude de la structure et de la mise en place du pore de conjugaison des ICE de *S. thermophilus* pourra être entreprise.

Tout d'abord, une mutagenèse dirigée des ORF du module de conjugaison d'ICE*St3* pourra être effectuée afin de tester leur implication dans le transfert. L'ORF tronquée *orfE* d'ICE*St1*/ICE*St2* pourrait être responsable de la très faible fréquence de transfert de ces deux éléments. L'effet du remplacement de cette ORF par son homologue issu d'ICE*St3* pourra être analysé. De même, les ICE de *S. thermophilus* et ceux de *S. agalactiae* étant apparentés, un échange d'ORF entre des modules de conjugaison issus de ces deux espèces pourrait être envisagé afin d'en connaître l'effet sur la fréquence et le spectre de transfert.

Ensuite, la structure du pore pourra également être étudiée par la création de gène de fusion entre des ORF du module de conjugaison des ICE de *S. thermophilus* et le gène de la GFP. *S. thermophilus* se développant sous forme de chaînette, ces gènes de fusion pourraient donc également permettre de déterminer si le pore de conjugaison présente une localisation particulière dans la chaînette de cellules.

Enfin, l'implication de l'hydrolase du peptidoglycane putative OrfA dans la mise en place du pore de conjugaison et le spectre de transfert d'ICE*St3* pourra être étudiée. La délétion de toute l'ORF ou des différentes régions codant les domaines protéiques identifiés pourrait être effectuée. Les hydrolases du peptidoglycane CwlT d'ICE*Bs1* et CsiA de l'ICE pRS01 ne portent pas les mêmes domaines catalytiques qu'OrfA (Fukushima *et al.*, 2008; Stentz *et al.*, 2009). Ces domaines reconnaissent et clivent tous des liaisons différentes du peptidoglycane (Layec *et al.*, 2008). L'effet de l'échange ou de l'ajout de ces domaines catalytiques sur la mise en place du pore de conjugaison et le spectre de transfert d'ICE*St3* pourra être analysé.

6.2 Regulation des ICE de *S. thermophilus*

Les modules de régulation des ICE de *S. thermophilus* comportent des gènes conservés (*arp1*, *arp2* et *orfQ*) et des gènes spécifiques (*orfP*, *orfR* pour ICE*St1*/ICE*St2* et *orf385A*, *orf385B*, Δ*orf385C* pour ICE*St3*) (Figure 19). Ce travail a montré que le gène *arp1*, qui code une protéine fonctionnelle homologue au répresseur cI du phage λ, est l'acteur central d'une voie de régulation de l'excision des ICE. De plus, le gène *arp2* qui code une protéine putative homologue au répresseur cI-like du phage TP901-1 et le gène *orfQ* qui code une protéase putative pourraient constituer une seconde voie de régulation des ICE. La présence simultanée de voies de régulation de ces deux types est une caractéristique originale et, à l'heure actuelle, propre aux ICE de *S. thermophilus*. Parmi les gènes spécifiques à chaque ICE, l'analyse de séquence ne permet d'attribuer une fonction putative qu'à *orf385A*. En effet, le domaine HTH de la protéine codée par ce gène est apparenté aux domaines HTH des répresseurs Arp1 et Arp2. Le gène *orf385A* coderait donc un régulateur transcriptionnel putatif.

L'étude d'Arp1 d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'ICE*St3* pourrait être poursuivie par l'étude de ses sites de fixation à l'ADN et de sa stœchiométrie. L'analyse de son activité protéolytique et l'implication dans celle-ci de RecA* pourrait être effectuée. Ensuite, la délétion d'*arp2* et d'*orfQ* d'ICE*St1*/ICE*St2* ainsi que celle d'*arp2* et d'*orfQ2* d'ICE*St3* permettraient de déterminer si ces gènes constituent une seconde voie de régulation des ICE. L'étude de l'activité protéolytique d'OrfQ et d'OrfQ2 envers Arp2 ainsi que l'implication de RecA* dans celle-ci pourrait également être entreprise. Les interactions éventuelles entre les régulateurs Arp1, Arp2 et/ou Orf385A d'un même élément pourront être analysées. Les régulations croisées putatives entre ICE*St1*/ICE*St2* et ICE*St3* pourront également être testées.

Par ailleurs, les différences de fréquence d'excision et de transfert entre ICE*St1* et ICE*St3* peuvent aussi provenir des gènes spécifiques du module de régulation de chaque élément, des différences dans les séquences d'*orfQ* d'ICE*St1*/ICE*St2* et d'*orfQ2* d'ICE*St3* ou des différences des séquences promotrices et des RBS contrôlant l'expression d'*arp1*. Ces hypothèses pourront par exemple être testées en générant des modules de régulation hybrides (échange d'*orfQ* et d'*orfQ2* entre ICE*St1*/ICE*St2* et ICE*St3*), en délétant les ORF spécifiques des éléments ou en étudiant la force des différents promoteurs.

6.3 Specificite d'integration et immunite de cible

Chez tous les transconjugants d'ICE*St3* analysés dérivant de *S. thermophilus*, *S. pyogenes* et *En. faecalis*, l'ICE s'est intégré dans l'extrémité 3' du gène *fda.* La séquence de l'extrémité de ce gène est très proche chez ces espèces (Figure 46). L'extrémité 3' de l'ORF *fda* ne peut sans doute pas être délétée puisqu'elle coderait une protéine essentielle de la glycolyse. Toutefois, une mutagenèse dirigée pourrait être effectuée afin de remplacer, chez *S. thermophilus*, la séquence des 7 derniers codons du gène *fda* par des séquences différentes constituées de codons synonymes. Les souches obtenues pourraient être utilisées comme réceptrices afin de déterminer la fréquence de transfert de l'ICE et d'étudier la spécificité ou l'efficacité d'intégration d'ICE*St3* et du plasmide intégratif pNST260+ dans ces sites *attB* dégénérés. L'intégration éventuelle de l'ICE dans un site *attB* secondaire pourrait également être recherchée. Le site *attB* de *S. thermophilus* pourrait également être introduit dans le génome de différentes espèces pour étudier l'effet de la présence de cette séquence sur la fréquence de transfert d'ICE*St3*.

Une étude d'ICE*clc* très récente suggère que le phénomène d'immunité de cible serait due aux séquences constituant les bras flanquant les sites d'attachement (Sentchilo *et al.*, 2009). Si l'efficacité d'intégration d'ICE*St3* dans le site *attB* dégénéré se trouve être faible, la souche portant ce site pourrait être utilisée pour caractériser précisément les

mécanismes conduisant à l'immunité de cible. En effet, la séquence totale ou tronquée des différents sites d'attachement flanquant les îlots intégrés au locus *fda* pourraient être introduite dans un locus ectopique chez cette souche. La comparaison des fréquences de transfert d'ICE*St3* vers les souches portant ces différents types de sites d'attachement permettrait de déterminer le rôle de leur bras dans le phénomène d'immunité de cible.

6.4 Relaxase, origine de transfert et recombinaison site-specifique

L'étude de l'origine de transfert des ICE de *S. thermophilus* pourrait être effectuée grâce au clonage de séquences chevauchant totalement ou partiellement l'*oriT* putative identifiée dans le plasmide pMG36e (Figure 9) (Burrus *et al.*, 2002a; Pavlovic *et al.*, 2004). Après leur introduction par électroporation chez une souche de *S. thermophilus* portant ICE*St3*, l'efficacité de mobilisation de ces différents plasmides pourrait permettre de déterminer la séquence minimale d'*oriT*.

L'étude de l'*oriT* de Tn*916* suggère que l'intégrase de cet élément se fixe sur cette séquence et qu'elle guide la coupure simple brin effectuée par la relaxase (Rocco and Churchward, 2006). La fixation éventuelle de l'intégrase des ICE de *S. thermophilus* sur leur *oriT* et le site de coupure simple brin catalysée par la relaxase dans cette séquence pourraient être analysés.

Une activité de recombinase site-spécifique a été démontrée chez la relaxase TrwC du plasmide conjugatif R388 d'*E. coli* (Draper *et al.*, 2005). Bien que les relaxases de SXT ou de R391 ne soient pas apparentées à TrwC, un mécanisme similaire de recombinaison entre *oriT* a été proposé pour expliquer la formation d'ICE chimériques à partir de tandems composés de ces deux ICE (Burrus and Waldor, 2004a; Ceccarelli *et al.*, 2008). L'étude de la formation d'ICE hybrides à partir des tandems ICE*St1*-ICE*St3* pourrait être étudiée. De plus, les 2 ICE de *S. thermophilus* présentant des fréquences de transfert et d'excision très différentes, l'analyse de ces mêmes fréquences chez les ICE hybrides pourrait être effectuée afin de déterminer l'origine des différences constatées chez ICE*St1* et ICE*St3*.

6.5 Mobilisation en *cis* et stabilite

Ce travail a démontré la première mobilisation conjugative en *cis* d'un îlot génomique par un ICE apparenté. Cet îlot génomique, CIMEL_3*catR*$_3$, est un élément artificiel. Tout d'abord, la démonstration des mécanismes de mobilisation conjugative en *cis* pourrait être confortée par l'étude de la mobilisation des éléments naturels CIME19258, CIME9, CIME368 et CIME302.

L'étude de la stabilité des tandems obtenus avec ces CIME pourrait permettre d'apporter plus de précision sur les événements pouvant influer sur l'évolution des tandems CIME-ICE par délétion des sites d'attachement internes et création d'îlots chimériques.

ICE*St1* code un système RM fonctionnel tandis qu'ICE*St3* et CIME302 codent des systèmes RM putatifs (Burrus *et al.*, 2002a; Pavlovic *et al.*, 2004). La fonctionnalité de ces systèmes RM et l'implication de leur propriété toxine-antitoxine dans la stabilisation des tandems ICE*St1*-ICE*St3* et CIME302-ICE*St3* pourraient également être étudiées. Cette étude serait d'autant plus intéressante que l'effet des systèmes RM sur la stabilité des plasmides a été testé mais que leur impact sur la stabilité des ICE n'a jamais été analysé.

D. Références

Achard, A., and Leclercq, R. (2007) Characterization of a small mobilizable transposon, MTn*Sag1*, in *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* **189**: 4328-4331.

Achtman, M., Kennedy, N., and Skurray, R. (1977) Cell--cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of traT protein in surface exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5104-5108.

Achtman, M., Manning, P.A., Kusecek, B., Schwuchow, S., and Willetts, N. (1980) A genetic analysis of F sex factor cistrons needed for surface exclusion in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **138**: 779-795.

Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A., and Carniel, E. (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 14043-14048.

Adamczyk, M., and Jagura-Burdzy, G. (2003) Spread and survival of promiscuous IncP-1 plasmids. *Acta Biochim Pol* **50**: 425-453.

Adams, V., Lyras, D., Farrow, K.A., and Rood, J.I. (2002) The clostridial mobilisable transposons. *Cell Mol Life Sci* **59**: 2033-2043.

Adzuma, K., and Mizuuchi, K. (1988) Target immunity of Mu transposition reflects a differential distribution of Mu B protein. *Cell* **53**: 257-266.

Althorpe, N.J., Chilley, P.M., Thomas, A.T., Brammar, W.J., and Wilkins, B.M. (1999) Transient transcriptional activation of the Incl1 plasmid anti-restriction gene (ardA) and SOS inhibition gene (*psiB*) early in conjugating recipient bacteria. *Mol Microbiol* **31**: 133-142.

Ammann, A., Neve, H., Geis, A., and Heller, K.J. (2008) Plasmid transfer via transduction from *Streptococcus thermophilus* to *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **190**: 3083-3087.

Anderson, D.G., and McKay, L.L. (1984) Genetic and physical characterization of recombinant plasmids associated with cell aggregation and high-frequency conjugal transfer in *Streptococcus lactis* ML3. *J Bacteriol* **158**: 954-962.

Ankenbauer, R.G. (1997) Reassessing forty years of genetic doctrine: retrotransfer and conjugation. *Genetics* **145**: 543-549.

Anthony, K.G., Sherburne, C., Sherburne, R., and Frost, L.S. (1994) The role of the pilus in recipient cell recognition during bacterial conjugation mediated by F-like plasmids. *Mol Microbiol* **13**: 939-953.

Anthony, K.G., Klimke, W.A., Manchak, J., and Frost, L.S. (1999) Comparison of proteins involved in pilus synthesis and mating pair stabilization from the related plasmids F and R100-1: insights into the mechanism of conjugation. *J Bacteriol* **181**: 5149-5159.

Arciszewska, L.K., Drake, D., and Craig, N.L. (1989) Transposon Tn*7*. cis-Acting sequences in transposition and transposition immunity. *J Mol Biol* **207**: 35-52.

Auchtung, J.M., Lee, C.A., Monson, R.E., Lehman, A.P., and Grossman, A.D. (2005) Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 12554-12559.

Auchtung, J.M., Lee, C.A., Garrison, K.L., and Grossman, A.D. (2007) Identification and characterization of the immunity repressor (ImmR) that controls the mobile genetic element ICE*Bs1* of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **64**: 1515-1528.

Audette, G.F., Manchak, J., Beatty, P., Klimke, W.A., and Frost, L.S. (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.

Ayoubi, P., Kilic, A.O., and Vijayakumar, M.N. (1991) Tn*5253*, the pneumococcal omega (*cat tet*) BM6001 element, is a composite structure of two conjugative transposons, Tn*5251* and Tn*5252*. *J Bacteriol* **173**: 1617-1622.

Babic, A., Lindner, A.B., Vulic, M., Stewart, E.J., and Radman, M. (2008) Direct visualization of horizontal gene transfer. *Science* **319**: 1533-1536.

Bacic, M., Parker, A.C., Stagg, J., Whitley, H.P., Wells, W.G., Jacob, L.A., and Smith, C.J. (2005) Genetic and structural analysis of the *Bacteroides* conjugative transposon CTn*341*. *J Bacteriol* **187**: 2858-2869.

Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D.A., and Horvath, P. (2007) CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709-1712.

Barre, F.X. (2007) FtsK and SpoIIIE: the tale of the conserved tails. *Mol Microbiol* **66**: 1051-1055.

Bashkirov, V.I., Kashanov, F.K., and Prozorov, A.A. (1987) Illegitimate recombination in *Bacillus subtilis*: nucleotide sequences at recombinant DNA junctions. *Mol Gen Genet* **210**: 578-580.

Bashkirov, V.I., Stoilova-Disheva, M., and Prozorov, A.A. (1988) Interplasmidic illegitimate recombination in *Bacillus subtilis*. *Mol Gen Genet* **213**: 465-470.

Bates, S., Cashmore, A.M., and Wilkins, B.M. (1998) IncP plasmids are unusually effective in mediating conjugation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the *tra2* mating system. *J Bacteriol* **180**: 6538-6543.

Beaber, J.W., Burrus, V., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2002a) 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.

Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2002b) Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **184**: 4259-4269.

Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2004) SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**: 72-74.

Beaber, J.W., and Waldor, M.K. (2004) Identification of operators and promoters that control SXT conjugative transfer. *J Bacteriol* **186**: 5945-5949.

Bedzyk, L.A., Shoemaker, N.B., Young, K.E., and Salyers, A.A. (1992) Insertion and excision of Bacteroides conjugative chromosomal elements. *J Bacteriol* **174**: 166-172.

Belhocine, K., Mandilaras, V., Yeung, B., and Cousineau, B. (2007) Conjugative transfer of the *Lactococcus lactis* sex factor and pRS01 plasmid to *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett* **269**: 289-294.

Belogurov, A.A., Delver, E.P., Agafonova, O.V., Belogurova, N.G., Lee, L.Y., and Kado, C.I. (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.

Benedek, O., and Schubert, S. (2007) Mobility of the Yersinia High-Pathogenicity Island (HPI): transfer mechanisms of pathogenicity islands (PAIS) revisited (a review). *Acta Microbiol Immunol Hung* **54**: 89-105.

Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeno-Tarraga, A.M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C.W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C.H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabbinowitsch, E., Rajandream, M.A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B.G., Parkhill, J., and Hopwood, D.A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**: 141-147.

Bibb, M.J., Ward, J.M., Kieser, T., Cohen, S.N., and Hopwood, D.A. (1981) Excision of chromosomal DNA sequences from *Streptomyces coelicolor* forms a novel family of plasmids detectable in *Streptomyces lividans*. *Mol Gen Genet* **184**: 230-240.

Birge, E.A. (1994) *Bacterial and bacteriophage genetics.* New York: Springer-Verlag.

Blanc, G., Ogata, H., Robert, C., Audic, S., Claverie, J.M., and Raoult, D. (2007) Lateral gene transfer between obligate intracellular bacteria: evidence from the *Rickettsia massiliae* genome. *Genome Res* **17**: 1657-1664.

Blanco, G., F. Ramos, J. R. Medina, J. C. Gutierrez, and M. Tortolero. (1991) Conjugal retrotransfer of chromosomal markers in *Azotobacter vinelandii*. *Curr. Microbiol.* **22**: 241-246.

Boccard, F., Smokvina, T., Pernodet, J.L., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1989a) Structural analysis of loci involved in pSAM2 site-specific integration in *Streptomyces*. *Plasmid* **21**: 59-70.

Boccard, F., Smokvina, T., Pernodet, J.L., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1989b) The integrated conjugative plasmid pSAM2 of *Streptomyces ambofaciens* is related to temperate bacteriophages. *Embo J* **8**: 973-980.

Bohne, J., Yim, A., and Binns, A.N. (1998) The Ti plasmid increases the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens* as a recipient in virB-mediated conjugal transfer of an IncQ plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7057-7062.

Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P., Sorokin, A., Ehrlich, S.D., Kulakauskas, S., Lapidus, A., Goltsman, E., Mazur, M., Pusch, G.D., Fonstein, M., Overbeek, R., Kyprides, N., Purnelle, B., Prozzi, D., Ngui, K., Masuy, D., Hancy, F., Burteau, S., Boutry, M., Delcour, J., Goffeau, A., and Hols, P. (2004) Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol* **22**: 1554-1558.

Bolotin, A., Quinquis, B., Sorokin, A., and Ehrlich, S.D. (2005) Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology* **151**: 2551-2561.

Boltner, D., MacMahon, C., Pembroke, J.T., Strike, P., and Osborn, A.M. (2002) R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *J Bacteriol* **184**: 5158-5169.

Borges, F., Layec, S., Fernandez, A., Decaris, B., and Leblond-Bourget, N. (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.

Bose, B., Auchtung, J.M., Lee, C.A., and Grossman, A.D. (2008) A conserved anti-repressor controls horizontal gene transfer by proteolysis. *Mol Microbiol*.

Bourgogne, A., Garsin, D.A., Qin, X., Singh, K.V., Sillanpaa, J., Yerrapragada, S., Ding, Y., Dugan-Rocha, S., Buhay, C., Shen, H., Chen, G., Williams, G., Muzny, D., Maadani, A., Fox, K.A., Gioia, J., Chen, L., Shang, Y., Arias, C.A., Nallapareddy, S.R., Zhao, M., Prakash, V.P., Chowdhury, S., Jiang, H., Gibbs, R.A., Murray, B.E., Highlander, S.K., and Weinstock, G.M. (2008) Large scale variation in *Enterococcus faecalis* illustrated by the genome analysis of strain OG1RF. *Genome Biol* **9**: R110.

Bourgoin, F., Guédon, G., Pébay, M., Roussel, Y., Panis, C., and Decaris, B. (1996) Characterization of a mosaic IS*S1* element and evidence for the recent horizontal transfer of two different types of IS*S1* between *Streptococcus thermophilus* and *Lactococcus lactis*. *Gene* **178**: 15-23.

Bourgoin, F., Pluvinet, A., Gintz, B., Decaris, B., and Guédon, G. (1999) Are horizontal transfers involved in the evolution of the *Streptococcus thermophilus* exopolysaccharide synthesis loci? *Gene* **233**: 151-161.

Bourhy, P., Salaun, L., Lajus, A., Medigue, C., Boursaux-Eude, C., and Picardeau, M. (2007) A genomic island of the pathogen *Leptospira interrogans* serovar *Lai* can excise from its chromosome. *Infect Immun* **75**: 677-683.

Bringel, F., Van Alstine, G.L., and Scott, J.R. (1992a) Conjugative transposition of Tn*916*: the transposon int gene is required only in the donor. *J Bacteriol* **174**: 4036-4041.

Bringel, F., Van Alstine, G.L., and Scott, J.R. (1992b) Transfer of Tn*916* between *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains is nontranspositional: evidence for a chromosomal fertility function in strain MG1363. *J Bacteriol* **174**: 5840-5847.

Brochet, M., Couve, E., Glaser, P., Guedon, G., and Payot, S. (2008a) Integrative conjugative elements and related elements are major contributors to the genome diversity of *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* **190**: 6913-6917.

Brochet, M., Rusniok, C., Couve, E., Dramsi, S., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Kunst, F., and Glaser, P. (2008b) Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of *Streptococcus agalactiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 15961-15966.

Brochet, M., Da Cunha, V., Couve, E., Rusniok, C., Trieu-Cuot, P., and Glaser, P. (2009) Atypical association of DDE transposition with conjugation specifies a new family of mobile elements. *Mol Microbiol* **71**: 948-959.

Brom, S., Girard, L., Tun-Garrido, C., Garcia-de los Santos, A., Bustos, P., Gonzalez, V., and Romero, D. (2004) Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. *J Bacteriol* **186**: 7538-7548.

Brondsted, L., Pedersen, M., and Hammer, K. (2001) An activator of transcription regulates phage TP901-1 late gene expression. *Appl Environ Microbiol* **67**: 5626-5633.

Brouns, S.J., Jore, M.M., Lundgren, M., Westra, E.R., Slijkhuis, R.J., Snijders, A.P., Dickman, M.J., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and van der Oost, J. (2008) Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* **321**: 960-964.

Brussow, H. (2001) Phages of dairy bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**: 283-303.

Brüssow, H., and Bruttin, A. (1995) Characterization of a temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage and its genetic relationship with lytic phages. *Virology* **212**: 632-640.

Brüssow, H., Bruttin, A., Desiere, F., Lucchini, S., and Foley, S. (1998) Molecular ecology and evolution of *Streptococcus thermophilus* bacteriophages--a review. *Virus Genes* **16**: 95-109.

Buisine, N., Tang, C.M., and Chalmers, R. (2002) Transposon-like Correia elements: structure, distribution and genetic exchange between pathogenic *Neisseria sp*. *FEBS Lett* **522**: 52-58.

Burrus, V., Roussel, Y., Decaris, B., and Guédon, G. (2000) Characterization of a novel integrative element, ICE*St1*, in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 1749-1753.

Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., and Guédon, G. (2002a) Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* **46**: 601-610.

Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., and Guédon, G. (2002b) The ICE*St1* 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.

Burrus, V., and Waldor, M.K. (2003) Control of SXT integration and excision. *J Bacteriol* **185**: 5045-5054.

Burrus, V., and Waldor, M.K. (2004a) Formation of SXT tandem arrays and SXT-R391 hybrids. *J Bacteriol* **186**: 2636-2645.

Burrus, V., and Waldor, M.K. (2004b) Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res Microbiol* **155**: 376-386.

Burrus, V., Marrero, J., and Waldor, M.K. (2006a) The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* **55**: 173-183.

Burrus, V., Quezada-Calvillo, R., Marrero, J., and Waldor, M.K. (2006b) SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3054-3057.

Byrd, D.R., and Matson, S.W. (1997) Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. *Mol Microbiol* **25**: 1011-1022.

Calcutt, M.J., Lewis, M.S., and Wise, K.S. (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.

Callanan, M., Kaleta, P., O'Callaghan, J., O'Sullivan, O., Jordan, K., McAuliffe, O., Sangrador-Vegas, A., Slattery, L., Fitzgerald, G.F., Beresford, T., and Ross, R.P. (2008) Genome sequence of *Lactobacillus helveticus*, an organism distinguished by selective gene loss and insertion sequence element expansion. *J Bacteriol* **190**: 727-735.

Campbell, A. (1994) Comparative molecular biology of lambdoid phages. *Annu Rev Microbiol* **48**: 193-222.

Cascales, E., and Christie, P.J. (2003) The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **1**: 137-149.

Catanzano, F., Graziano, G., Cafaro, V., D'Alessio, G., Di Donato, A., and Barone, G. (1998) Circular dichroism study of ribonuclease A mutants containing the minimal structural requirements for dimerization and swapping. *Int J Biol Macromol* **23**: 277-285.

Ceccarelli, D., Daccord, A., Rene, M., and Burrus, V. (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.

Celli, J., Poyart, C., and Trieu-Cuot, P. (1997) Use of an excision reporter plasmid to study the intracellular mobility of the conjugative transposon Tn*916* in gram-positive bacteria. *Microbiology* **143**: 1253-1261.

Celli, J., and Trieu-Cuot, P. (1998) Circularization of Tn*916* 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.

Chen, L., Brugger, K., Skovgaard, M., Redder, P., She, Q., Torarinsson, E., Greve, B., Awayez, M., Zibat, A., Klenk, H.P., and Garrett, R.A. (2005) The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the Crenarchaeota. *J Bacteriol* **187**: 4992-4999.

Cheng, Q., Paszkiet, B.J., Shoemaker, N.B., Gardner, J.F., and Salyers, A.A. (2000) Integration and excision of a *Bacteroides* conjugative transposon, CTnDOT. *J Bacteriol* **182**: 4035-4043.

Cheng, Q., Sutanto, Y., Shoemaker, N.B., Gardner, J.F., and Salyers, A.A. (2001) Identification of genes required for excision of CTnDOT, a *Bacteroides* conjugative transposon. *Mol Microbiol* **41**: 625-632.

Cheng, Q., Wesslund, N., Shoemaker, N.B., Salyers, A.A., and Gardner, J.F. (2002) Development of an in vitro integration assay for the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J Bacteriol* **184**: 4829-4837.

Chilley, P.M., and Wilkins, B.M. (1995) Distribution of the *ardA* family of antirestriction genes on conjugative plasmids. *Microbiology* **141 (Pt 9)**: 2157-2164.

Chongtrakool, P., Ito, T., Ma, X.X., Kondo, Y., Trakulsomboon, S., Tiensasitorn, C., Jamklang, M., Chavalit, T., Song, J.H., and Hiramatsu, K. (2006) Staphylococcal cassette chromosome mec (SCCmec) typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in 11 Asian countries: a proposal for a new nomenclature for *SCCmec* elements. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 1001-1012.

Choulet, F. (2002) Etude de l'intégration et de l'excision site-spécifique d'un élément intégratif et potentiellement conjugatif, ICE*St1 ,* chez *Streptococcus thermophilus*. DEA de l'Université Henri Poincaré.

Christie, P.J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S., and Cascales, E. (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* **59**: 451-485.

Clewell, D., Yagi, Y., Dunny, G., and Schultz, S. (1974) Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J Bacteriol* **117**: 283-289.

Clewell, D.B. (1990) Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**: 90-102.

Clewell, D.B., Flannagan, S.E., and Jaworski, D.D. (1995a) Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn*916*-Tn*1545* family of conjugative transposons. *Trends Microbiol* **3**: 229-236.

Clewell, D.B., Jaworski, D.D., Flannagan, S.E., Zitzow, L.A., and Su, Y.A. (1995b) The conjugative transposon Tn*916* of *Enterococcus faecalis*: structural analysis and some key factors involved in movement. *Dev Biol Stand* **85**: 11-17.

Coakley, M., Fitzgerald, G., and Ros, R.P. (1997) Application and evaluation of the phage resistance- and bacteriocin-encoding plasmid pMRC01 for the improvement of dairy starter cultures. *Appl Environ Microbiol* **63**: 1434-1440.

Coleman, M.L., Sullivan, M.B., Martiny, A.C., Steglich, C., Barry, K., Delong, E.F., and Chisholm, S.W. (2006) Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*. *Science* **311**: 1768-1770.

Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2000) CTXphi contains a hybrid genome derived from tandemly integrated elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 8572-8577.

de Vries, J., and Wackernagel, W. (2002) Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2094-2099.

Delihas, N. (2008) Small mobile sequences in bacteria display diverse structure/function motifs. *Mol Microbiol* **67**: 475-481.

Desiere, F., Lucchini, S., Canchaya, C., Ventura, M., and Brüssow, H. (2002) Comparative genomics of phages and prophages in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* **82**: 73-91.

Desomer, J., Crespi, M., and van Montagu, M. (1991) Illegitimate integration of non-replicative vectors in the genome of *Rhodococcus fascians* upon electrotransformation as an insertional mutagenesis system. *Mol Microbiol* **5**: 2115-2124.

Deveau, H., Barrangou, R., Garneau, J.E., Labonte, J., Fremaux, C., Boyaval, P., Romero, D.A., Horvath, P., and Moineau, S. (2008) Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **190**: 1390-1400.

Dimopoulou, I.D., Kraak, W.A., Anderson, E.C., Nichols, W.W., Slack, M.P., and Crook, D.W. (1992) Molecular epidemiology of unrelated clusters of multiresistant strains of *Haemophilus influenzae*. *J Infect Dis* **165**: 1069-1075.

Dimopoulou, I.D., Jordens, J.Z., Legakis, N.J., and Crook, D.W. (1997) A molecular analysis of Greek and UK *Haemophilus influenzae* conjugative resistance plasmids. *J Antimicrob Chemother* **39**: 303-307.

Dimopoulou, I.D., Russell, J.E., Mohd-Zain, Z., Herbert, R., and Crook, D.W. (2002) Site-specific recombination with the chromosomal *tRNA*(*Leu*) gene by the large conjugative *Haemophilus* resistance plasmid. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 1602-1603.

Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J. (2004) Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**: 414-424.

Dodd, I.B., Shearwin, K.E., Perkins, A.J., Burr, T., Hochschild, A., and Egan, J.B. (2004) Cooperativity in long-range gene regulation by the lambda CI repressor. *Genes Dev* **18**: 344-354.

Dodd, I.B., Shearwin, K.E., and Egan, J.B. (2005) Revisited gene regulation in bacteriophage lambda. *Curr Opin Genet Dev* **15**: 145-152.

Doleans-Jordheim, A., Akermi, M., Ginevra, C., Cazalet, C., Kay, E., Schneider, D., Buchrieser, C., Atlan, D., Vandenesch, F., Etienne, J., and Jarraud, S. (2006) Growth-phase-dependent mobility of the lvh-encoding region in Legionella pneumophila strain Paris. *Microbiology* **152**: 3561-3568.

Doublet, B., Golding, G.R., Mulvey, M.R., and Cloeckaert, A. (2008) Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable Salmonella genomic island 1. *PLoS One* **3**: e2060.

Draper, O., Cesar, C.E., Machon, C., de la Cruz, F., and Llosa, M. (2005) Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 16385-16390.

Dreiseikelmann, B. (1994) Translocation of DNA across bacterial membranes. *Microbiol Rev* **58**: 293-316.

Dunlap, P.V. (1999) Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**: 5-12.

Dunn, A.K., Martin, M.O., and Stabb, E.V. (2005) Characterization of pES213, a small mobilizable plasmid from *Vibrio fischeri*. *Plasmid* **54**: 114-134.

Dunny, G.M. (2007) The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**: 1185-1193.

Dziewit, L., Jazurek, M., Drewniak, L., Baj, J., and Bartosik, D. (2007) The SXT conjugative element and linear prophage N15 encode toxin-antitoxin-stabilizing systems homologous to the tad-ata module of the *Paracoccus aminophilus* plasmid pAMI2. *J Bacteriol* **189**: 1983-1997.

Engelberg-Kulka, H., and Glaser, G. (1999) Addiction modules and programmed cell death and antideath in bacterial cultures. *Annu Rev Microbiol* **53**: 43-70.

Erauso, G., Stedman, K.M., van de Werken, H.J., Zillig, W., and van der Oost, J. (2006) Two novel conjugative plasmids from a single strain of *Sulfolobus*. *Microbiology* **152**: 1951-1968.

Fayard, B. (1993) Caractérisation de 69 bactériophages de *Streptococcus salivarius* subps. *thermophilus*. Thèse de l'Université Henri Poincaré

Feng, L., Liu, B., Liu, Y., Ratiner, Y.A., Hu, B., Li, D., Zong, X., Xiong, W., and Wang, L. (2008) A genomic islet mediates flagellar phase variation in *Escherichia coli* strains carrying the flagellin-specifying locus flk. *J Bacteriol* **190**: 4470-4477.

Flannagan, S.E., and Clewell, D.B. (1991) Conjugative transfer of Tn*916* in *Enterococcus faecalis*: trans activation of homologous transposons. *J Bacteriol* **173**: 7136-7141.

Friedman, D.I., and Court, D.L. (2001) Bacteriophage lambda: alive and well and still doing its thing. *Curr Opin Microbiol* **4**: 201-207.

Fukushima, T., Kitajima, T., Yamaguchi, H., Ouyang, Q., Furuhata, K., Yamamoto, H., Shida, T., and Sekiguchi, J. (2008) Identification and characterization of novel cell wall hydrolase CwlT: a two-domain autolysin exhibiting n-acetylmuramidase and DL-endopeptidase activities. *J Biol Chem* **283**: 11117-11125.

Funnell, B.E.a.G., J. P. (2004) *Plasmid Biology.* Whashinghton, DC: ASM Press.

Garcillan-Barcia, M.P., and de la Cruz, F. (2008) Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid* **60**: 1-18.

Gardan, R., Besset, C., Guillot, A., Gitton, C., and Monnet, V. (2009) The oligopeptide transport system is essential for the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* strain LMD-9. *J Bacteriol*.

Garnier, F., Taourit, S., Glaser, P., Courvalin, P., and Galimand, M. (2000) Characterization of transposon Tn*1549*, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp. *Microbiology* **146**: 1481-1489.

Gasson, M.J., Godon, J.J., Pillidge, C.J., Eaton, T.J., Jury, K., and Shearman, C.A. (1995) Characterization and exploitation of conjugation in *Lactococcus lactis*. *Int Dairy J* **5**: 757-762.

Gerdes, K., Gultyaev, A.P., Franch, T., Pedersen, K., and Mikkelsen, N.D. (1997) Antisense RNA-regulated programmed cell death. *Annu Rev Genet* **31**: 1-31.

Ghosh, S., Sadowsky, M.J., Roberts, M.C., Gralnick, J.A., and LaPara, T.M. (2009) *Sphingobacterium sp*. strain PM2-P1-29 harbours a functional *tet(X)* gene encoding for the degradation of tetracycline. *J Appl Microbiol* **106**: 1336-1342.

Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., Zouine, M., Couve, E., Lalioui, L., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., and Kunst, F. (2002) Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol Microbiol* **45**: 1499-1513.

Grandoso, G., Avila, P., Cayon, A., Hernando, M.A., Llosa, M., and de la Cruz, F. (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.

Green, N.M., Zhang, S., Porcella, S.F., Nagiec, M.J., Barbian, K.D., Beres, S.B., LeFebvre, R.B., and Musser, J.M. (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.

Greub, G., Collyn, F., Guy, L., and Roten, C.A. (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.

Greve, B., Jensen, S., Brugger, K., Zillig, W., and Garrett, R.A. (2004) Genomic comparison of archaeal conjugative plasmids from *Sulfolobus*. *Archaea* **1**: 231-239.

Griffith, F. (1928) The significance of pneumococcal types. *Journal of Hygiene* **27**: 113-159.

Grohmann, E., Muth, G., and Espinosa, M. (2003) Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 277-301, table of contents.

Gross, R., Guzman, C.A., Sebaihia, M., dos Santos, V.A., Pieper, D.H., Koebnik, R., Lechner, M., Bartels, D., Buhrmester, J., Choudhuri, J.V., Ebensen, T., Gaigalat, L., Herrmann, S., Khachane, A.N., Larisch, C., Link, S., Linke, B., Meyer, F., Mormann, S., Nakunst, D., Ruckert, C., Schneiker-

Bekel, S., Schulze, K., Vorholter, F.J., Yevsa, T., Engle, J.T., Goldman, W.E., Puhler, A., Gobel, U.B., Goesmann, A., Blocker, H., Kaiser, O., and Martinez-Arias, R. (2008) The missing link: *Bordetella petrii* is endowed with both the metabolic versatility of environmental bacteria and virulence traits of pathogenic *Bordetellae*. *BMC Genomics* **9**: 449.

Groth, A.C., and Calos, M.P. (2004) Phage integrases: biology and applications. *J Mol Biol* **335**: 667-678.

Guédon, G., Bourgoin, F., Pébay, M., Roussel, Y., Colmin, C., Simonet, J.M., and Decaris, B. (1995) Characterization and distribution of two insertion sequences, IS*1191* and iso-IS*981*, in *Streptococcus thermophilus*: does intergeneric transfer of insertion sequences occur in lactic acid bacteria co-cultures? *Mol. Microbiol.* **16**: 69-78.

Guynet, C., Hickman, A.B., Barabas, O., Dyda, F., Chandler, M., and Ton-Hoang, B. (2008) In vitro reconstitution of a single-stranded transposition mechanism of IS608. *Mol Cell* **29**: 302-312.

Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**: 641-679.

Hacker, J., and Carniel, E. (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes. *EMBO Rep* **2**: 376-381.

Hacker, J., Hochhut, B., Middendorf, B., Schneider, G., Buchrieser, C., Gottschalk, G., and Dobrindt, U. (2004) Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria. *Int J Med Microbiol* **293**: 453-461.

Hagège, J., Pernodet, J.L., Sezonov, G., Gerbaud, C., Friedmann, A., and Guérineau, M. (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.

Hanssen, A.M., and Ericson Sollid, J.U. (2006) *SCCmec* in staphylococci: genes on the move. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**: 8-20.

Haroche, J., Allignet, J., and El Solh, N. (2002) Tn*5406*, a new staphylococcal transposon conferring resistance to streptogramin a and related compounds including dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 2337-2343.

Hartl, D.L., Lozovskaya, E.R., and Lawrence, J.G. (1992) Nonautonomous transposable elements in prokaryotes and eukaryotes. *Genetica* **86**: 47-53.

Hattman, S. (1999) Unusual transcriptional and translational regulation of the bacteriophage Mu mom operon. *Pharmacol Ther* **84**: 367-388.

Hazan, R., and Engelberg-Kulka, H. (2004) *Escherichia coli* mazEF-mediated cell death as a defense mechanism that inhibits the spread of phage P1. *Mol Genet Genomics* **272**: 227-234.

He, J., Baldini, R.L., Deziel, E., Saucier, M., Zhang, Q., Liberati, N.T., Lee, D., Urbach, J., Goodman, H.M., and Rahme, L.G. (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.

Heather, Z., Holden, M.T., Steward, K.F., Parkhill, J., Song, L., Challis, G.L., Robinson, C., Davis-Poynter, N., and Waller, A.S. (2008) A novel streptococcal integrative conjugative element involved in iron acquisition. *Mol Microbiol* **70**: 1274-1292.

Heinemann, J.A., and Ankenbauer, R.G. (1993) Retrotransfer in *Escherichia coli* conjugation: bidirectional exchange or de novo mating? *J Bacteriol* **175**: 583-588.

Heinemann, J.A., Scott, H.E., and Williams, M. (1996) Doing the conjugative two-step: evidence of recipient autonomy in retrotransfer. *Genetics* **143**: 1425-1435.

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.

Hochhut, B., Jahreis, K., Lengeler, J.W., and Schmid, K. (1997) CTn*scr94*, a conjugative transposon found in enterobacteria. *J Bacteriol* **179**: 2097-2102.

Hochhut, B., and Waldor, M.K. (1999) Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol Microbiol* **32**: 99-110.

Hochhut, B., Marrero, J., and Waldor, M.K. (2000) Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol* **182**: 2043-2047.

Hochhut, B., Beaber, J.W., Woodgate, R., and Waldor, M.K. (2001a) 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.

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

Hochhut, B., Wilde, C., Balling, G., Middendorf, B., Dobrindt, U., Brzuszkiewicz, E., Gottschalk, G., Carniel, E., and Hacker, J. (2006) Role of pathogenicity island-associated integrases in the genome plasticity of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Mol Microbiol* **61**: 584-595.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., Decaris, B., Bolotin, A., Delorme, C., Dusko Ehrlich, S., Guedon, E., Monnet, V., Renault, P., and Kleerebezem, M. (2005) New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 435-463.

Horiuchi, K., and Zinder, N.D. (1975) Site-specific cleavage of single-stranded DNA by a *Haemophilus* restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**: 2555-2558.

Horodniceanu, T., Bouanchaud, D., Biet, G., and Chabbert, Y. (1976) R plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Antimicrob Agents Chemother* **10**: 795-801.

Horvath, P., Coute-Monvoisin, A.C., Romero, D.A., Boyaval, P., Fremaux, C., and Barrangou, R. (2008a) Comparative analysis of CRISPR loci in lactic acid bacteria genomes. *Int J Food Microbiol*.

Horvath, P., Romero, D.A., Coute-Monvoisin, A.C., Richards, M., Deveau, H., Moineau, S., Boyaval, P., Fremaux, C., and Barrangou, R. (2008b) Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **190**: 1401-1412.

Hosking, S.L., Deadman, M.E., Moxon, E.R., Peden, J.F., Saunders, N.J., and High, N.J. (1998) An in silico evaluation of Tn916 as a tool for generalized mutagenesis in *Haemophilus influenzae* Rd. *Microbiology* **144 (Pt 9)**: 2525-2530.

Howard, M.T., Nelson, W.C., and Matson, S.W. (1995) Stepwise assembly of a relaxosome at the F plasmid origin of transfer. *J Biol Chem* **270**: 28381-28386.

Hurst, G.D., and Werren, J.H. (2001) The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet* **2**: 597-606.

Ike, Y., Tanimoto, K., Tomita, H., Takeuchi, K., and Fujimoto, S. (1998) Efficient transfer of the pheromone-independent *Enterococcus faecium* plasmid pMG1 (Gm^r) (65.1 kilobases) to *Enterococcus* strains during broth mating. *J Bacteriol* **180**: 4886-4892.

Immonen, T., Wahlstrom, G., Takala, T., and Saris, P.E. (1998) Evidence for a mosaic structure of the Tn*5481* in *Lactococcus lactis* N8. *DNA Seq* **9**: 245-261.

Ishikawa, K., Watanabe, M., Kuroita, T., Uchiyama, I., Bujnicki, J.M., Kawakami, B., Tanokura, M., and Kobayashi, I. (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.

Ishiwa, A., and Komano, T. (2004) PilV adhesins of plasmid R64 thin pili specifically bind to the lipopolysaccharides of recipient cells. *J Mol Biol* **343**: 615-625.

Ito, T., Okuma, K., Ma, X.X., Yuzawa, H., and Hiramatsu, K. (2003) Insights on antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island *SCC*. *Drug Resist Updat* **6**: 41-52.

Iyer, L.M., Makarova, K.S., Koonin, E.V., and Aravind, L. (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.

Jagura-Burdzy, G., and Thomas, C.M. (1994) KorA protein of promiscuous plasmid RK2 controls a transcriptional switch between divergent operons for plasmid replication and conjugative transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10571-10575.

Jang, J., Becq, J., Gicquel, B., Deschavanne, P., and Neyrolles, O. (2008) Horizontally acquired genomic islands in the tubercle bacilli. *Trends Microbiol* **16**: 303-308.

Jansen, W.T., Beitsma, M.M., Koeman, C.J., van Wamel, W.J., Verhoef, J., and Fluit, A.C. (2006) Novel mobile variants of staphylococcal cassette chromosome mec in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2072-2078.

Jaworski, D.D., and Clewell, D.B. (1995) A functional origin of transfer (*oriT*) on the conjugative transposon Tn*916*. *J Bacteriol* **177**: 6644-6651.

Johnsborg, O., Eldholm, V., and Havarstein, L.S. (2007) Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol* **158**: 767-778.

Juhas, M., Power, P.M., Harding, R.M., Ferguson, D.J., Dimopoulou, I.D., Elamin, A.R., Mohd-Zain, Z., Hood, D.W., Adegbola, R., Erwin, A., Smith, A., Munson, R.S., Harrison, A., Mansfield, L., Bentley, S., and Crook, D.W. (2007) Sequence and functional analyses of *Haemophilus spp*. genomic islands. *Genome Biol* **8**: R237.

Juhas, M., Crook, D.W., and Hood, D.W. (2008) Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence. *Cell Microbiol*.

Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., and Crook, D.W. (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 376-393.

Karl, W., Bamberger, M., and Zechner, E.L. (2001) Transfer protein TraY of plasmid R1 stimulates TraI-catalyzed oriT cleavage in vivo. *J Bacteriol* **183**: 909-914.

Keeling, P.J., and Palmer, J.D. (2008) Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet* **9**: 605-618.

Kehoe, M.A., Kapur, V., Whatmore, A.M., and Musser, J.M. (1996) Horizontal gene transfer among group A streptococci: implications for pathogenesis and epidemiology. *Trends Microbiol* **4**: 436-443.

Kers, J.A., Cameron, K.D., Joshi, M.V., Bukhalid, R.A., Morello, J.E., Wach, M.J., Gibson, D.M., and Loria, R. (2005) A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species. *Mol Microbiol* **55**: 1025-1033.

Khan, S.A. (1997) Rolling-circle replication of bacterial plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 442-455.

Khan, S.A. (2000) Plasmid rolling-circle replication: recent developments. *Mol Microbiol* **37**: 477-484.

Khasanov, F.K., Zvingila, D.J., Zainullin, A.A., Prozorov, A.A., and Bashkirov, V.I. (1992) Homologous recombination between plasmid and chromosomal DNA in *Bacillus subtilis* requires approximately 70 bp of homology. *Mol Gen Genet* **234**: 494-497.

Kholodii, G.Y., and Mindlin, S.Z. (1985) Integration of bacteriophages lambda and phi 80 in wild-type *Escherichia coli* at secondary attachment sites. II. Genetic structure and mechanism of polylysogen formation for lambda, phi 80 and the lambda *att80* hybrid. *Mol Gen Genet* **198**: 491-496.

Kiewitz, C., Larbig, K., Klockgether, J., Weinel, C., and Tummler, B. (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.

Kingsman, A., and Willetts, N. (1978) The requirements for conjugal DNA synthesis in the donor strain during flac transfer. *J Mol Biol* **122**: 287-300.

Klockgether, J., Reva, O., Larbig, K., and Tummler, B. (2004) Sequence analysis of the mobile genome island pKLC102 of *Pseudomonas aeruginosa* C. *J Bacteriol* **186**: 518-534.

Kobayashi, I. (2001) Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution. *Nucleic Acids Res* **29**: 3742-3756.

Koraimann, G. (2003) Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci* **60**: 2371-2388.

Korona, R., Korona, B., and Levin, B.R. (1993) Sensitivity of naturally occurring coliphages to type I and type II restriction and modification. *J Gen Microbiol* **139 (Pt 6)**: 1283-1290.

Kozlowicz, B.K., Shi, K., Gu, Z.Y., Ohlendorf, D.H., Earhart, C.A., and Dunny, G.M. (2006) Molecular basis for control of conjugation by bacterial pheromone and inhibitor peptides. *Mol Microbiol* **62**: 958-969.

Lampkowska, J., Feld, L., Monaghan, A., Toomey, N., Schjorring, S., Jacobsen, B., van der Voet, H., Andersen, S.R., Bolton, D., Aarts, H., Krogfelt, K.A., Wilcks, A., and Bardowski, J. (2008) A standardized conjugation protocol to asses antibiotic resistance transfer between lactococcal species. *Int J Food Microbiol* **127**: 172-175.

Larbig, K., Kiewitz, C., and Tummler, B. (2002) Pathogenicity islands and PAI-like structures in *Pseudomonas* species. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**: 201-211.

Lawley, T.D., Klimke, W.A., Gubbins, M.J., and Frost, L.S. (2003) F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol Lett* **224**: 1-15.

Layec, S., Decaris, B., and Leblond-Bourget, N. (2008) Diversity of Firmicutes peptidoglycan hydrolases and specificities of those involved in daughter cell separation. *Res Microbiol* **159**: 507-515.

Leaves, N.I., Dimopoulou, I., Hayes, I., Kerridge, S., Falla, T., Secka, O., Adegbola, R.A., Slack, M.P., Peto, T.E., and Crook, D.W. (2000) Epidemiological studies of large resistance plasmids in Haemophilus. *J Antimicrob Chemother* **45**: 599-604.

Lee, C.A., Auchtung, J.M., Monson, R.E., and Grossman, A.D. (2007) Identification and characterization of *int* (integrase), *xis* (excisionase) and chromosomal attachment sites of the integrative and conjugative element ICE*Bs1* of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **66**: 1356-1369.

Lee, C.A., and Grossman, A.D. (2007) Identification of the origin of transfer (*oriT*) and DNA relaxase required for conjugation of the integrative and conjugative element IC*EBs1* of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**: 7254-7261.

Lee, J.H., and O'Sullivan, D.J. (2006) Sequence analysis of two cryptic plasmids from *Bifidobacterium longum* DJO10A and construction of a shuttle cloning vector. *Appl Environ Microbiol* **72**: 527-535.

Lee, K.B., De Backer, P., Aono, T., Liu, C.T., Suzuki, S., Suzuki, T., Kaneko, T., Yamada, M., Tabata, S., Kupfer, D.M., Najar, F.Z., Wiley, G.B., Roe, B., Binnewies, T.T., Ussery, D.W., D'Haeze, W., Herder, J.D., Gevers, D., Vereecke, D., Holsters, M., and Oyaizu, H. (2008) The genome of the versatile nitrogen fixer *Azorhizobium caulinodans* ORS571. *BMC Genomics* **9**: 271.

Lee, S.F., Forsberg, C.W., and Gibbins, A.M. (1992) Type II DNA restriction-modification system and an endonuclease from the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* S85. *J Bacteriol* **174**: 5275-5283.

Lesic, B., and Carniel, E. (2005) Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* **187**: 3352-3358.

Lewis, J.A., and Hatfull, G.F. (2001) Control of directionality in integrase-mediated recombination: examination of recombination directionality factors (RDFs) including Xis and Cox proteins. *Nucleic Acids Res* **29**: 2205-2216.

Li, J., Wolf, S.G., Elbaum, M., and Tzfira, T. (2005) Exploring cargo transport mechanics in the type IV secretion systems. *Trends Microbiol* **13**: 295-298.

Li, L.Y., Shoemaker, N.B., and Salyers, A.A. (1995a) Location and characteristics of the transfer region of a *Bacteroides* conjugative transposon and regulation of transfer genes. *J Bacteriol* **177**: 4992-4999.

Li, L.Y., Shoemaker, N.B., Wang, G.R., Cole, S.P., Hashimoto, M.K., Wang, J., and Salyers, A.A. (1995b) The mobilization regions of two integrated *Bacteroides* elements, NBU1 and NBU2, have only a single mobilization protein and may be on a cassette. *J Bacteriol* **177**: 3940-3945.

Lillestol, R.K., Redder, P., Garrett, R.A., and Brugger, K. (2006) A putative viral defence mechanism in archaeal cells. *Archaea* **2**: 59-72.

Lin, T.L., Lee, C.Z., Hsieh, P.F., Tsai, S.F., and Wang, J.T. (2008) Characterization of integrative and conjugative element ICE*Kp1*-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess. *J Bacteriol* **190**: 515-526.

Llosa, M., Gomis-Ruth, F.X., Coll, M., and de la Cruz Fd, F. (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* **45**: 1-8.

Lotareva, O.V., Shilovskii, I.P., and Prozorov, A.A. (2006) A phenomenon of plasmid retrotransfer in conjugation of Bacillus subtilis. *Genetika* **42**: 1735-1738.

Lu, F., and Churchward, G. (1995) Tn*916* target DNA sequences bind the C-terminal domain of integrase protein with different affinities that correlate with transposon insertion frequency. *J Bacteriol* **177**: 1938-1946.

Madsen, P.L., Johansen, A.H., Hammer, K., and Brondsted, L. (1999) The genetic switch regulating activity of early promoters of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *J Bacteriol* **181**: 7430-7438.

Makarova, K.S., Grishin, N.V., Shabalina, S.A., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2006) A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol Direct* **1**: 7.

Manson, J.M., and Gilmore, M.S. (2006) Pathogenicity island integrase cross-talk: a potential new tool for virulence modulation. *Mol Microbiol* **61**: 555-559.

Marenda, M., Barbe, V., Gourgues, G., Mangenot, S., Sagne, E., and Citti, C. (2006) A new integrative conjugative element occurs in *Mycoplasma agalactiae* as chromosomal and free circular forms. *J Bacteriol* **188**: 4137-4141.

Marra, D., Pethel, B., Churchward, G.G., and Scott, J.R. (1999) The frequency of conjugative transposition of Tn*916* is not determined by the frequency of excision. *J Bacteriol* **181**: 5414-5418.

Marra, D., and Scott, J.R. (1999) Regulation of excision of the conjugative transposon Tn*916*. *Mol Microbiol* **31**: 609-621.

Marraffini, L.A., and Sontheimer, E.J. (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**: 1843-1845.

Marrero, J., and Waldor, M.K. (2005) Interactions between inner membrane proteins in donor and recipient cells limit conjugal DNA transfer. *Dev Cell* **8**: 963-970.

Marrero, J., and Waldor, M.K. (2007a) The SXT/R391 family of integrative conjugative elements is composed of two exclusion groups. *J Bacteriol* **189**: 3302-3305.

Marrero, J., and Waldor, M.K. (2007b) Determinants of entry exclusion within Eex and TraG are cytoplasmic. *J Bacteriol* **189**: 6469-6473.

Mathee, K., Narasimhan, G., Valdes, C., Qiu, X., Matewish, J.M., Koehrsen, M., Rokas, A., Yandava, C.N., Engels, R., Zeng, E., Olavarietta, R., Doud, M., Smith, R.S., Montgomery, P., White, J.R., Godfrey, P.A., Kodira, C., Birren, B., Galagan, J.E., and Lory, S. (2008) Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 3100-3105.

Matson, S.W., Sampson, J.K., and Byrd, D.R. (2001) F plasmid conjugative DNA transfer: the TraI helicase activity is essential for DNA strand transfer. *J Biol Chem* **276**: 2372-2379.

Matson, S.W., and Ragonese, H. (2005) The F-plasmid TraI protein contains three functional domains required for conjugative DNA strand transfer. *J Bacteriol* **187**: 697-706.

Maxwell, A., Craigie, R., and Mizuuchi, K. (1987) B protein of bacteriophage mu is an ATPase that preferentially stimulates intermolecular DNA strand transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 699-703.

Mazel, D. (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nat Rev Microbiol* **4**: 608-620.

Mazodier, P., Thompson, C., and Boccard, F. (1990) The chromosomal integration site of the *Streptomyces* element pSAM2 overlaps a putative *tRNA* gene conserved among actinomycetes. *Mol Gen Genet* **222**: 431-434.

Mazodier, P., and Davies, J. (1991) Gene transfer between distantly related bacteria. *Annu Rev Genet* **25**: 147-171.

Mazzone, M., De Gregorio, E., Lavitola, A., Pagliarulo, C., Alifano, P., and Di Nocera, P.P. (2001) Whole-genome organization and functional properties of miniature DNA insertion sequences conserved in pathogenic Neisseriae. *Gene* **278**: 211-222.

McGrath, B.M., O'Halloran, J.A., and Pembroke, J.T. (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.

McLeod, S.M., Burrus, V., and Waldor, M.K. (2006) Requirement for *Vibrio cholerae* integration host factor in conjugative DNA transfer. *J Bacteriol* **188**: 5704-5711.

Mead, S., Vaisman, A., Valjavec-Gratian, M., Karata, K., Vandewiele, D., and Woodgate, R. (2007) Characterization of polVR391: a Y-family polymerase encoded by *rumA'B* from the IncJ conjugative transposon, R391. *Mol Microbiol* **63**: 797-810.

Mergeay, M., Lejeune, P., Sadouk, A., Gerits, J., and Fabry, L. (1987) Shuttle transfer (or retrotransfer) of chromosomal markers mediated by plasmid pULB113. *Mol Gen Genet* **209**: 61-70.

Milkman, R., Raleigh, E.A., McKane, M., Cryderman, D., Bilodeau, P., and McWeeny, K. (1999) Molecular evolution of the *Escherichia coli* chromosome. V. Recombination patterns among strains of diverse origin. *Genetics* **153**: 539-554.

Miller, R.V. (2001) Environmental bacteriophage-host interactions: factors contribution to natural transduction. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**: 141-147.

Mills, D.A., Phister, T.G., Dunny, G.M., and McKay, L.L. (1998) An origin of transfer (*oriT*) on the conjugative element pRS01 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3. *Appl Environ Microbiol* **64**: 1541-1544.

Minoia, M., Gaillard, M., Reinhard, F., Stojanov, M., Sentchilo, V., and van der Meer, J.R. (2008) Stochasticity and bistability in horizontal transfer control of a genomic island in *Pseudomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 20792-20797.

Mojica, F.J., Diez-Villasenor, C., Garcia-Martinez, J., and Soria, E. (2005) Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* **60**: 174-182.

Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 255-261.

Moon, K., Sonnenburg, J., and Salyers, A.A. (2007) Unexpected effect of a *Bacteroides* conjugative transposon, CTnDOT, on chromosomal gene expression in its bacterial host. *Mol Microbiol* **64**: 1562-1571.

Morrison, D.A., and Jaurin, B. (1990) *Streptococcus pneumoniae* possesses canonical Escherichia coli (sigma 70) promoters. *Mol Microbiol* **4**: 1143-1152.

Mullany, P., Roberts, A.P., and Wang, H. (2002) Mechanism of integration and excision in conjugative transposons. *Cell Mol Life Sci* **59**: 2017-2022.

Mulvey, M.R., Boyd, D.A., Olson, A.B., Doublet, B., and Cloeckaert, A. (2006) The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect* **8**: 1915-1922.

Munoz-Najar, U., and Vijayakumar, M.N. (1999) An operon that confers UV resistance by evoking the SOS mutagenic response in streptococcal conjugative transposon Tn*5252*. *J Bacteriol* **181**: 2782-2788.

Murphy, D.B., and Pembroke, J.T. (1999) Monitoring of chromosomal insertions of the IncJ elements R391 and R997 in *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett* **174**: 355-361.

Murphy, E., Reinheimer, E., and Huwyler, L. (1991) Mutational analysis of *att554*, the target of the site-specific transposon Tn*554*. *Plasmid* **26**: 20-29.

Murphy, R.A., and Boyd, E.F. (2008) Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates. *J Bacteriol* **190**: 636-647.

Nagy, Z., and Chandler, M. (2004) Regulation of transposition in bacteria. *Res Microbiol* **155**: 387-398.

Nair, S., Alokam, S., Kothapalli, S., Porwollik, S., Proctor, E., Choy, C., McClelland, M., Liu, S.L., and Sanderson, K.E. (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.

Naito, M., Hirakawa, H., Yamashita, A., Ohara, N., Shoji, M., Yukitake, H., Nakayama, K., Toh, H., Yoshimura, F., Kuhara, S., Hattori, M., and Hayashi, T. (2008) Determination of the genome

sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*. *DNA Res* **15**: 215-225.

Nakayama, K., Yamashita, A., Kurokawa, K., Morimoto, T., Ogawa, M., Fukuhara, M., Urakami, H., Ohnishi, M., Uchiyama, I., Ogura, Y., Ooka, T., Oshima, K., Tamura, A., Hattori, M., and Hayashi, T. (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.

Nandasena, K.G., O'Hara, G.W., Tiwari, R.P., Sezmis, E., and Howieson, J.G. (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.

Nester, E.W., Gordon, M.P., and Kerr, A. (2005) *Agrobacterium tumefaciens: From Plant Pathology to Biotechnology.* St. Paul, MN: APS Press.

Nishi, A., Tominaga, K., and Furukawa, K. (2000) A 90-kilobase conjugative chromosomal element coding for biphenyl and salicylate catabolism in *Pseudomonas putida* KF715. *J Bacteriol* **182**: 1949-1955.

Nishigaki, K., Kaneko, Y., Wakuda, H., Husimi, Y., and Tanaka, T. (1985) Type II restriction endonucleases cleave single-stranded DNAs in general. *Nucleic Acids Res* **13**: 5747-5760.

Norgren, M., and Scott, J.R. (1991) The presence of conjugative transposon Tn*916* in the recipient strain does not impede transfer of a second copy of the element. *J Bacteriol* **173**: 319-324.

Oggioni, M.R., and Claverys, J.P. (1999) Repeated extragenic sequences in prokaryotic genomes: a proposal for the origin and dynamics of the RUP element in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **145 (Pt 10)**: 2647-2653.

Ohtani, N., Sato, M., Tomita, M., and Itaya, M. (2008) Restriction on conjugational transfer of pLS20 in *Bacillus subtilis* 168. *Biosci Biotechnol Biochem* **72**: 2472-2475.

Oppenheim, A.B., Kobiler, O., Stavans, J., Court, D.L., and Adhya, S. (2005) Switches in bacteriophage lambda development. *Annu Rev Genet* **39**: 409-429.

Ostash, B., Makitrinskyy, R., Walker, S., and Fedorenko, V. (2009) Identification and characterization of *Streptomyces ghanaensis* ATCC14672 integration sites for three actinophage-based plasmids. *Plasmid* **61**: 171-175.

Parker, C., and Meyer, R. (2005) Mechanisms of strand replacement synthesis for plasmid DNA transferred by conjugation. *J Bacteriol* **187**: 3400-3406.

Parks, A.R., and Peters, J.E. (2007) Transposon Tn*7* is widespread in diverse bacteria and forms genomic islands. *J Bacteriol* **189**: 2170-2173.

Parsons, L.M., Jankowski, C.S., and Derbyshire, K.M. (1998) Conjugal transfer of chromosomal DNA in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol* **28**: 571-582.

Pavlovic, G., Burrus, V., Gintz, B., Decaris, B., and Guédon, G. (2004) Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICE*St1*-related elements from *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology* **150**: 759-774.

Pecota, D.C., and Wood, T.K. (1996) Exclusion of T4 phage by the *hok/sok* killer locus from plasmid R1. *J Bacteriol* **178**: 2044-2050.

Pedersen, M., and Hammer, K. (2008) The role of MOR and the CI operator sites on the genetic switch of the temperate bacteriophage TP901-1. *J Mol Biol* **384**: 577-589.

Perego, M., and Brannigan, J.A. (2001) Pentapeptide regulation of aspartyl-phosphate phosphatases. *Peptides* **22**: 1541-1547.

Pernodet, J.L., Simonet, J.M., and Guérineau, M. (1984) Plasmids in different strains of *Streptomyces ambofaciens*: free and integrated form of plasmid pSAM2. *Mol Gen Genet* **198**: 35-41.

Perry, R.D., and Fetherston, J.D. (1997) *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10**: 35-66.

Phillips, Z.E., and Strauch, M.A. (2002) *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol Life Sci* **59**: 392-402.

Pickard, D., Wain, J., Baker, S., Line, A., Chohan, S., Fookes, M., Barron, A., Gaora, P.O., Chabalgoity, J.A., Thanky, N., Scholes, C., Thomson, N., Quail, M., Parkhill, J., and Dougan, G. (2003) Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *J Bacteriol* **185**: 5055-5065.

Pitcher, R.S., Brissett, N.C., and Doherty, A.J. (2007) Nonhomologous end-joining in bacteria: a microbial perspective. *Annu Rev Microbiol* **61**: 259-282.

Polard, P., and Chandler, M. (1995) Bacterial transposases and retroviral integrases. *Mol Microbiol* **15**: 13-23.

Possoz, C., Ribard, C., Gagnat, J., Pernodet, J.L., and Guérineau, M. (2001) The integrative element pSAM2 from *Streptomyces*: kinetics and mode of conjugal transfer. *Mol Microbiol* **42**: 159-166.

Possoz, C., Gagnat, J., Sezonov, G., Guérineau, M., and Pernodet, J.L. (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.

Poyart-Salmeron, C., Trieu-Cuot, P., Carlier, C., and Courvalin, P. (1989) Molecular characterization of two proteins involved in the excision of the conjugative transposon Tn*1545*: homologies with other site-specific recombinases. *Embo J* **8**: 2425-2433.

Poyart-Salmeron, C., Trieu-Cuot, P., Carlier, C., and Courvalin, P. (1990) The integration-excision system of the conjugative transposon Tn *1545* is structurally and functionally related to those of lambdoid phages. *Mol Microbiol* **4**: 1513-1521.

Prangishvili, D., Albers, S.V., Holz, I., Arnold, H.P., Stedman, K., Klein, T., Singh, H., Hiort, J., Schweier, A., Kristjansson, J.K., and Zillig, W. (1998) Conjugation in archaea: frequent occurrence of conjugative plasmids in Sulfolobus. *Plasmid* **40**: 190-202.

Priefer, U.B., Simon, R., and Puhler, A. (1985) Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication and mobilization functions. *J Bacteriol* **163**: 324-330.

Qiu, X., Gurkar, A.U., and Lory, S. (2006) Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of Pseudomonas aeruginosa. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 19830-19835.

Ragonese, H., Haisch, D., Villareal, E., Choi, J.H., and Matson, S.W. (2007) The F plasmid-encoded TraM protein stimulates relaxosome-mediated cleavage at oriT through an interaction with TraI. *Mol Microbiol* **63**: 1173-1184.

Rajeev, L., Malanowska, K., and Gardner, J.F. (2009) Challenging a paradigm: the role of DNA homology in tyrosine recombinase reactions. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 300-309.

Ramsay, J.P., Sullivan, J.T., Stuart, G.S., Lamont, I.L., and Ronson, C.W. (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.

Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P., Crabtree, J., Sebaihia, M., Thomson, N.R., Chaudhuri, R., Henderson, I.R., Sperandio, V., and Ravel, J. (2008) The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol* **190**: 6881-6893.

Rasmussen, T.B., Danielsen, M., Valina, O., Garrigues, C., Johansen, E., and Pedersen, M.B. (2008) Streptococcus thermophilus core genome: comparative genome hybridization study of 47 strains. *Appl Environ Microbiol* **74**: 4703-4710.

Rauch, P.J., and de Vos, W.M. (1992a) Transcriptional regulation of the Tn*5276*-located Lactococcus lactis sucrose operon and characterization of the *sacA* gene encoding sucrose-6-phosphate hydrolase. *Gene* **121**: 55-61.

Rauch, P.J., and de Vos, W.M. (1992b) Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn*5276* and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **174**: 1280-1287.

Rauch, P.J., and de Vos, W.M. (1994) Identification and characterization of genes involved in excision of the *Lactococcus lactis* conjugative transposon *Tn5276*. *J Bacteriol* **176**: 2165-2171.

Ravatn, R., Studer, S., Springael, D., Zehnder, A.J., and van der Meer, J.R. (1998a) Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-

kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* sp. Strain B13. *J Bacteriol* **180**: 4360-4369.

Ravatn, R., Zehnder, A.J., and van der Meer, J.R. (1998b) Low-frequency horizontal transfer of an element containing the chlorocatechol degradation genes from *Pseudomonas* sp. strain B13 to *Pseudomonas putida* F1 and to indigenous bacteria in laboratory-scale activated-sludge microcosms. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2126-2132.

Rawlings, D.E., and Tietze, E. (2001) Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**: 481-496, table of contents.

Raynal, A., Tuphile, K., Gerbaud, C., Luther, T., Guérineau, M., and Pernodet, J.L. (1998) Structure of the chromosomal insertion site for pSAM2: functional analysis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 333-342.

Rees, C.E., and Wilkins, B.M. (1990) Protein transfer into the recipient cell during bacterial conjugation: studies with F and RP4. *Mol Microbiol* **4**: 1199-1205.

Reimmann, C., and Haas, D. (1993) Mobilization of chromosomes and nonconjugative plasmids by cointegrative mechanisms. In *Bacterial conjugation.* Clewell, D.B. (ed). New York: Plenum Press, pp. 137-188.

Rice, L.B., and Carias, L.L. (1998) Transfer of Tn*5385*, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol* **180**: 714-721.

Rice, L.B., Carias, L.L., Marshall, S.H., Hutton-Thomas, R., and Rudin, S. (2007) Characterization of Tn*5386*, a Tn*916*-related mobile element. *Plasmid* **58**: 61-67.

Richardson, P.T., and Park, S.F. (1997) Integration of heterologous DNA into multiple sites on the genome of *Campylobacter coli* following natural transformation. *J Bacteriol* **179**: 1809-1812.

Roberts, A.P., Johanesen, P.A., Lyras, D., Mullany, P., and Rood, J.I. (2001) Comparison of Tn*5397* from *Clostridium difficile*, Tn*916* from *Enterococcus faecalis* and the CW459*tet*(M) element from *Clostridium perfringens* shows that they have similar conjugation regions but different insertion and excision modules. *Microbiology* **147**: 1243-1251.

Roberts, A.P., and Mullany, P. (2006) Genetic basis of horizontal gene transfer among oral bacteria. *Periodontol 2000* **42**: 36-46.

Roberts, A.P., and Mullany, P. (2009) A modular master on the move: the Tn*916* family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol* **17**: 251-258.

Rocco, J.M., and Churchward, G. (2006) The integrase of the conjugative transposon Tn*916* directs strand- and sequence-specific cleavage of the origin of conjugal transfer, *oriT*, by the endonuclease Orf20. *J Bacteriol* **188**: 2207-2213.

Rocha, E.P., Danchin, A., and Viari, A. (1999) Translation in Bacillus subtilis: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis. *Nucleic Acids Res* **27**: 3567-3576.

Rowe-Magnus, A.D., Davies, J., and Mazel, D. (2002) Impact of integrons and transposons on the evolution of resistance and virulence. *Curr Top Microbiol Immunol* **264**: 167-188.

Rowe-Magnus, D.A., and Mazel, D. (2001) Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. *Curr Opin Microbiol* **4**: 565-569.

Rudy, C.K., Scott, J.R., and Churchward, G. (1997) DNA binding by the Xis protein of the conjugative transposon Tn*916*. *J Bacteriol* **179**: 2567-2572.

Sadowski, P. (1986) Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist. *J Bacteriol* **165**: 341-347.

Salyers, A.A., Shoemaker, N.B., and Li, L.Y. (1995) In the driver's seat: the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize. *J Bacteriol* **177**: 5727-5731.

Sampath, J., and Vijayakumar, M.N. (1998) Identification of a DNA cytosine methyltransferase gene in conjugative transposon Tn*5252*. *Plasmid* **39**: 63-76.

Scanlan, D.J., Ostrowski, M., Mazard, S., Dufresne, A., Garczarek, L., Hess, W.R., Post, A.F., Hagemann, M., Paulsen, I., and Partensky, F. (2009) Ecological genomics of marine picocyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**: 249-299.

Schirawski, J., Hagens, W., Fitzgerald, G.F., and Van Sinderen, D. (2002) Molecular characterization of cadmium resistance in *Streptococcus thermophilus* Strain 4134: an example of lateral gene transfer. *Appl Environ Microbiol* **68**: 5508-5516.

Schleper, C., Holz, I., Janekovic, D., Murphy, J., and Zillig, W. (1995) A multicopy plasmid of the extremely thermophilic archaeon Sulfolobus effects its transfer to recipients by mating. *J Bacteriol* **177**: 4417-4426.

Schubert, S., Dufke, S., Sorsa, J., and Heesemann, J. (2004a) A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island. *Mol Microbiol* **51**: 837-848.

Schubert, S., Rakin, A., and Heesemann, J. (2004b) The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects. *Int J Med Microbiol* **294**: 83-94.

Scott, J.R., Kirchman, P.A., and Caparon, M.G. (1988) An intermediate in transposition of the conjugative transposon Tn*916*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 4809-4813.

Scott, J.R., Bringel, F., Marra, D., Van Alstine, G., and Rudy, C.K. (1994) Conjugative transposition of Tn*916*: preferred targets and evidence for conjugative transfer of a single strand and for a double-stranded circular intermediate. *Mol Microbiol* **11**: 1099-1108.

Sebaihia, M., Wren, B.W., Mullany, P., Fairweather, N.F., Minton, N., Stabler, R., Thomson, N.R., Roberts, A.P., Cerdeno-Tarraga, A.M., Wang, H., Holden, M.T., Wright, A., Churcher, C., Quail, M.A., Baker, S., Bason, N., Brooks, K., Chillingworth, T., Cronin, A., Davis, P., Dowd, L., Fraser, A., Feltwell, T., Hance, Z., Holroyd, S., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Price, C., Rabbinowitsch, E., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Unwin, L., Whithead, S., Dupuy, B., Dougan, G., Barrell, B., and Parkhill, J. (2006) The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome. *Nat Genet* **38**: 779-786.

Sentchilo, V., Ravatn, R., Werlen, C., Zehnder, A.J., and van der Meer, J.R. (2003) Unusual integrase gene expression on the *clc* genomic island in *Pseudomonas sp.* strain B13. *J Bacteriol* **185**: 4530-4538.

Sentchilo, V., Czechowska, K., Pradervand, N., Minoia, M., Miyazaki, R., and van der Meer, J.R. (2009) Intracellular excision and reintegration dynamics of the *ICEclc* genomic island of *Pseudomonas knackmussii sp*. strain B13. *Mol Microbiol* **72**: 1293-1306.

Serfiotis-Mitsa, D., Roberts, G.A., Cooper, L.P., White, J.H., Nutley, M., Cooper, A., Blakely, G.W., and Dryden, D.T. (2008) The Orf18 gene product from conjugative transposon Tn*916* Is an ArdA antirestriction protein that inhibits type I DNA restriction-modification systems. *J Mol Biol* **383**: 970-981.

She, Q., Phan, H., Garrett, R.A., Albers, S.V., Stedman, K.M., and Zillig, W. (1998) Genetic profile of pNOB8 from *Sulfolobus*: the first conjugative plasmid from an archaeon. *Extremophiles* **2**: 417-425.

She, Q., Shen, B., and Chen, L. (2004) Archaeal integrases and mechanisms of gene capture. *Biochem Soc Trans* **32**: 222-226.

Shimizu, H., Yamaguchi, H., Ashizawa, Y., Kohno, Y., Asami, M., Kato, J., and Ikeda, H. (1997) Short-homology-independent illegitimate recombination in *Escherichia coli*: distinct mechanism from short-homology-dependent illegitimate recombination. *J Mol Biol* **266**: 297-305.

Shoemaker, N.B., Vlamakis, H., Hayes, K., and Salyers, A.A. (2001) Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl Environ Microbiol* **67**: 561-568.

Showsh, S.A., and Andrews, R.E., Jr. (1992) Tetracycline enhances Tn*916*-mediated conjugal transfer. *Plasmid* **28**: 213-224.

Showsh, S.A., and Andrews, R.E., Jr. (1996) Functional comparison of conjugative transposons Tn*916* and Tn*925*. *Plasmid* **35**: 164-173.

Shu, A.C., Wu, C.C., Chen, Y.Y., Peng, H.L., Chang, H.Y., and Yew, T.R. (2008) Evidence of DNA transfer through F-pilus channels during *Escherichia coli* conjugation. *Langmuir* **24**: 6796-6802.

Sia, E.A., Kuehner, D.M., and Figurski, D.H. (1996) Mechanism of retrotransfer in conjugation: prior transfer of the conjugative plasmid is required. *J Bacteriol* **178**: 1457-1464.

Skelding, Z., Queen-Baker, J., and Craig, N.L. (2003) Alternative interactions between the Tn*7* transposase and the Tn*7* target DNA binding protein regulate target immunity and transposition. *Embo J* **22**: 5904-5917.

Smith, C.J., Tribble, G.D., and Bayley, D.P. (1998) Genetic elements of *Bacteroides* species: a moving story. *Plasmid* **40**: 12-29.

Smith, C.J., Parker, A.C., and Bacic, M. (2001) Analysis of a *Bacteroides* conjugative transposon using a novel 'targeted capture' model system. *Plasmid* **46**: 47-56.

Smith, M.C., and Thorpe, H.M. (2002) Diversity in the serine recombinases. *Mol Microbiol* **44**: 299-307.

Smokvina, T., Boccard, F., Pernodet, J.L., Friedmann, A., and Guérineau, M. (1991) Functional analysis of the *Streptomyces ambofaciens* element pSAM2. *Plasmid* **25**: 40-52.

Solow, B.T., and Somkuti, G.A. (2001) Molecular properties of *Streptococcus thermophilus* plasmid pER35 encoding a restriction modification system. *Curr Microbiol* **42**: 122-128.

Somkuti, G.A., and Steinberg, D.H. (2007) Molecular organization of plasmid pER13 in *Streptococcus thermophilus*. *Biotechnol Lett* **29**: 1991-1999.

Sorek, R., Kunin, V., and Hugenholtz, P. (2008) CRISPR--a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* **6**: 181-186.

Spigaglia, P., Barbanti, F., and Mastrantonio, P. (2006) New variants of the tet(M) gene in *Clostridium difficile* clinical isolates harbouring Tn*916*-like elements. *J Antimicrob Chemother* **57**: 1205-1209.

Srinivas, P., Kilic, A.O., and Vijayakumar, M.N. (1997) Site-specific nicking in vitro at ori T by the DNA relaxase of Tn*5252*. *Plasmid* **37**: 42-50.

Stark, W.M., Boocock, M.R., and Sherratt, D.J. (1992) Catalysis by site-specific recombinases. *Trends Genet* **8**: 432-439.

Stellwagen, A.E., and Craig, N.L. (1997a) Avoiding self: two Tn*7*-encoded proteins mediate target immunity in Tn*7* transposition. *Embo J* **16**: 6823-6834.

Stellwagen, A.E., and Craig, N.L. (1997b) Gain-of-function mutations in TnsC, an ATP-dependent transposition protein that activates the bacterial transposon Tn*7*. *Genetics* **145**: 573-585.

Stentz, R., Wegmann, U., Parker, M., Bongaerts, R., Lesaint, L., Gasson, M., and Shearman, C. (2009) CsiA is a bacterial cell wall synthesis inhibitor contributing to DNA translocation through the cell envelope. *Mol Microbiol*.

Stingele, F., and Mollet, B. (1996) Disruption of the gene encoding penicillin-binding protein 2b (*pbp2b*) causes altered cell morphology and cease in exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. *Mol Microbiol* **22**: 357-366.

Storrs, M.J., Poyart-Salmeron, C., Trieu-Cuot, P., and Courvalin, P. (1991) Conjugative transposition of Tn*916* requires the excisive and integrative activities of the transposon-encoded integrase. *J Bacteriol* **173**: 4347-4352.

Su, Y.A., and Clewell, D.B. (1993) Characterization of the left 4 kb of conjugative transposon Tn*916*: determinants involved in excision. *Plasmid* **30**: 234-250.

Sullivan, J.T., and Ronson, C.W. (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.

Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Cruickshank, R.W., Gouzy, J., Brown, S.D., Elliot, R.M., Fleetwood, D.J., McCallum, N.G., Rossbach, U., Stuart, G.S., Weaver, J.E., Webby, R.J., De Bruijn, F.J., and Ronson, C.W. (2002) Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* **184**: 3086-3095.

Surtees, J.A., and Funnell, B.E. (2003) Plasmid and chromosome traffic control: how ParA and ParB drive partition. *Curr Top Dev Biol* **56**: 145-180.

Sutanto, Y., DiChiara, J.M., Shoemaker, N.B., Gardner, J.F., and Salyers, A.A. (2004) Factors required in vitro for excision of the *Bacteroides* conjugative transposon, CTnDOT. *Plasmid* **52**: 119-130.

Szpirer, C., Top, E., Couturier, M., and Mergeay, M. (1999) Retrotransfer or gene capture: a feature of conjugative plasmids, with ecological and evolutionary significance. *Microbiology* **145 (Pt 12)**: 3321-3329.

Takeuchi, F., Watanabe, S., Baba, T., Yuzawa, H., Ito, T., Morimoto, Y., Kuroda, M., Cui, L., Takahashi, M., Ankai, A., Baba, S., Fukui, S., Lee, J.C., and Hiramatsu, K. (2005) Whole-genome sequencing of *staphylococcus haemolyticus* uncovers the extreme plasticity of its genome and the evolution of human-colonizing staphylococcal species. *J Bacteriol* **187**: 7292-7308.

Taviani, E., Ceccarelli, D., Lazaro, N., Bani, S., Cappuccinelli, P., Colwell, R.R., and Colombo, M.M. (2008) Environmental *Vibrio spp*., isolated in Mozambique, contain a polymorphic group of integrative conjugative elements and class 1 integrons. *FEMS Microbiol Ecol* **64**: 45-54.

te Poele, E.M., Bolhuis, H., and Dijkhuizen, L. (2008) Actinomycete integrative and conjugative elements. *Antonie Van Leeuwenhoek* **94**: 127-143.

Tian, T., and Burrage, K. (2004) Bistability and switching in the lysis/lysogeny genetic regulatory network of bacteriophage lambda. *J Theor Biol* **227**: 229-237.

Timmery, S., Modrie, P., Minet, O., and Mahillon, J. (2009) Plasmid capture by the Bacillus thuringiensis conjugative plasmid pXO16. *J Bacteriol* **191**: 2197-2205.

Toulmay, A. (2003) Mise en évidence de l'accrétion/mobilisation par recombinaison site-spécifique entre les éléments ICE*St1* et CIME19258 chez *Streptococcus thermophilus*. DEA de l'Université Henry Poincaré.

Toussaint, A., and Merlin, C. (2002) Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid* **47**: 26-35.

Toussaint, A., Merlin, C., Monchy, S., Benotmane, M.A., Leplae, R., Mergeay, M., and Springael, D. (2003) The biphenyl- and 4-chlorobiphenyl-catabolic transposon Tn*4371*, a member of a new family of genomic islands related to IncP and Ti plasmids. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4837-4845.

Tun-Garrido, C., Bustos, P., Gonzalez, V., and Brom, S. (2003) Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing. *J Bacteriol* **185**: 1681-1692.

Turgeon, N., and Moineau, S. (2001) Isolation and characterization of a *Streptococcus thermophilus* plasmid closely related to the pMV158 family. *Plasmid* **45**: 171-183.

van Aarten, J. (2008) The Klebsiella pheV tRNA locus: a hotspot for integration of alien genomic islands. *Bioscience Horizons* **1**: 51-60.

Van der Auwera, G., and Mahillon, J. (2008) Transcriptional analysis of the conjugative plasmid pAW63 from *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid* **60**: 190-199.

van der Meer, J.R., Ravatn, R., and Sentchilo, V. (2001) The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13 and other mobile degradative elements employing phage-like integrases. *Arch Microbiol* **175**: 79-85.

van der Meer, J.R., and Sentchilo, V. (2003) Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. *Curr Opin Biotechnol* **14**: 1-7.

Vedantam, G., and Hecht, D.W. (2002) Isolation and characterization of BTF-37: chromosomal DNA captured from *Bacteroides fragilis* that confers self-transferability and expresses a pilus-like structure in *Bacteroides* spp. and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**: 728-738.

Waldor, M.K., Tschäpe, H., and Mekalanos, J.J. (1996) A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J Bacteriol* **178**: 4157-4165.

Wang, H., and Mullany, P. (2000) The large resolvase TndX is required and sufficient for integration and excision of derivatives of the novel conjugative transposon Tn*5397*. *J Bacteriol* **182**: 6577-6583.

Wang, H., Roberts, A.P., and Mullany, P. (2000) DNA sequence of the insertional hot spot of Tn*916* in the *Clostridium difficile* genome and discovery of a Tn*916*-like element in an environmental isolate integrated in the same hot spot. *FEMS Microbiol Lett* **192**: 15-20.

Wang, H., Smith, M.C., and Mullany, P. (2006) The conjugative transposon Tn*5397* has a strong preference for integration into its *Clostridium difficile* target site. *J Bacteriol* **188**: 4871-4878.

Wang, J., Parsons, L.M., and Derbyshire, K.M. (2003) Unconventional conjugal DNA transfer in mycobacteria. *Nat Genet* **34**: 80-84.

Wang, Y., Rotman, E.R., Shoemaker, N.B., and Salyers, A.A. (2005) Translational control of tetracycline resistance and conjugation in the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J Bacteriol* **187**: 2673-2680.

Wegmann, U., O'Connell-Motherway, M., Zomer, A., Buist, G., Shearman, C., Canchaya, C., Ventura, M., Goesmann, A., Gasson, M.J., Kuipers, O.P., van Sinderen, D., and Kok, J. (2007) Complete genome sequence of the prototype lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* MG1363. *J Bacteriol* **189**: 3256-3270.

Wesslund, N.A., Wang, G.R., Song, B., Shoemaker, N.B., and Salyers, A.A. (2007) Integration and excision of a newly discovered *bacteroides* conjugative transposon, CTnBST. *J Bacteriol* **189**: 1072-1082.

Whetzel, P.L., Hnatow, L.L., Keeler, C.L., Jr., and Dohms, J.E. (2003) Transposon mutagenesis of *Mycoplasma gallisepticum*. *Plasmid* **49**: 34-43.

Whittle, G., Hund, B.D., Shoemaker, N.B., and Salyers, A.A. (2001) Characterization of the 13-kilobase *ermF* region of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *Appl Environ Microbiol* **67**: 3488-3495.

Whittle, G., Shoemaker, N.B., and Salyers, A.A. (2002) Characterization of genes involved in modulation of conjugal transfer of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *J Bacteriol* **184**: 3839-3847.

Wilkins, B.M., and Thomas, A.T. (2000) DNA-independent transport of plasmid primase protein between bacteria by the I1 conjugation system. *Mol Microbiol* **38**: 650-657.

Wilkins, B.M. (2002) Plasmid promiscuity: meeting the challenge of DNA immigration control. *Environ Microbiol* **4**: 495-500.

Wilson, G.G., and Murray, N.E. (1991) Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet* **25**: 585-627.

Wolkow, C.A., DeBoy, R.T., and Craig, N.L. (1996) Conjugating plasmids are preferred targets for Tn*7*. *Genes Dev* **10**: 2145-2157.

Wozniak, R.A., and Waldor, M.K. (2009) A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet* **5**: e1000439.

Yang, J.C., Lessard, P.A., Sengupta, N., Windsor, S.D., O'Brien X, M., Bramucci, M., Tomb, J.F., Nagarajan, V., and Sinskey, A.J. (2007) TraA is required for megaplasmid conjugation in *Rhodococcus erythropolis* AN12. *Plasmid* **57**: 55-70.

Yoshimura, G., Komatsuzawa, H., Hayashi, I., Fujiwara, T., Yamada, S., Nakano, Y., Tomita, Y., Kozai, K., and Sugai, M. (2006) Identification and molecular characterization of an N-Acetylmuraminidase, Aml, involved in *Streptococcus mutans* cell separation. *Microbiol Immunol* **50**: 729-742.

E. Annexes

JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Feb. 2007, p. 1478–1481 Vol. 189, No. 4
0021-9193/07/$08.00+0 doi:10.1128/JB.01125-06
Copyright © 2007, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Derepression of Excision of Integrative and Potentially Conjugative Elements from *Streptococcus thermophilus* by DNA Damage Response: Implication of a cI-Related Repressor▽

Xavier Bellanger, Catherine Morel, Bernard Decaris, and Gérard Guédon*

Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR1128, INRA, IFR110, Université Henri Poincaré Nancy 1, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Received 27 July 2006/Accepted 9 November 2006

A DNA-damaging agent, mitomycin C, derepresses the site-specific excision of two integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*, ICE*St1* and ICE*St3*. The regulation pathway involves a repressor related to phage lambda cI repressor. It could also involve a putative regulator related to another type of phage repressors, the "cI-like" repressors.

Whereas in silico analyses revealed that numerous genomic islands could be integrative and conjugative elements (ICEs) or elements derived from ICEs (2, 4, 9, 13, 15, 19, 25, 26), only a few ICEs have been described. ICEs excise by site-specific recombination, transfer through conjugation, and integrate into a replicon of the recipient cell (8). Whereas the regulation of the excision of numerous prophages is well known, the regulation of site-specific excision of only a few ICEs, including Tn*916*, ICEs from *Bacteroides*, pSAM2, and *clc*, has been described (6, 11, 22, 23). These few regulation systems are very different from each other. Recently, DNA-damaging agents were found to derepress the excision and transfer of two other ICE types, ICE*Bs1* from *Bacillus subtilis* (1) and IncJ elements, including SXT from *Vibrio cholerae* (3) and SXT-related elements from enterobacteria (18). Such regulation systems are similar to the derepression of the site-specific excision of numerous prophages by DNA damage.

Two putative ICEs, ICE*St1* and ICE*St3*, are integrated in the 3′ end of the *fda* locus of the lactic acid bacteria *Streptococcus thermophilus* CNRZ368 and CNRZ385, respectively (Fig. 1A). These ICEs harbor almost identical recombination and conjugation modules (20). The tyrosine integrase and the excisionase encoded by the ICE*St1* recombination module catalyze its excision by recombination between the *attL* and *attR* flanking sites, leading to an excised circular ICE harboring an *attI* site and to a chromosomal *attB* site (10). Furthermore, ICE*St1* carries an internal recombination site related to *attL*, *attL′* (Fig. 1A) (20). Recombination between *attL′* and *attR* leads to excision of the circular form of a shorter putative ICE, ICE*St2*, carrying an *attI′*site. A genomic island corresponding to the left part of ICE*St1* and flanked by *attL* and *attB′* sites remains integrated in *fda*.

The closely related regulation modules of ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3* contain three shared open reading frames (ORFs) (*arp1*, *orfQ*, and *arp2*) (Fig. 1B). The ICE*St3* recombination module also includes three specific ORFs or pseudogenes (*orf385A*, *orf385B*, and Δ*orf385C*), and the ICE*St1*/ICE*St2* recombination module contains two specific ORFs (*orfP* and *orfR*). The putative regulatory proteins encoded by *arp1*, *arp2*, and *orf385A* have a helix-turn-helix (HTH) DNA binding domain. The functions of the putative proteins encoded by the other ORFs are unknown.

The 5′ part of *arp1* encodes an HTH domain, and its 3′ part encodes a region characteristic of the COG2932 protein family, including the cI repressor of phage λ (9, 20). This region has two functions, cI autoproteolysis and cI oligomerization. In the presence of damaged DNA, the RecA protein, activated by single-stranded DNA (RecA*), induces autoproteolysis of cI and related proteins. Cleaved proteins are not able to oligomerize and therefore are not able to repress their target genes (12). In silico analysis suggested that DNA damage could derepress excision of ICEs from *S. thermophilus*.

To test this hypothesis, strains harboring ICE*St1*/ICE*St2* (CNRZ368) or ICE*St3* (CNRZ385) were grown at 42°C in HJL medium (24). Exponentially growing cells (optical density at 600 nm for MIC/4 and MIC/2, 0.04; optical density at 600 nm for 2× MIC and 4× MIC, 0.4) were treated with mitomycin C (MC) concentrations close to the MIC for 2.5 h to induce DNA damage. Then the recombination sites resulting from excision, *attI* and *attB* (ICE*St1* and ICE*St3*) or *attI′* (ICE*St2*), were amplified by PCR using 1 μg genomic DNA for CNRZ368 and 1 ng genomic DNA for CNRZ385. PCR experiments were performed in 25-μl mixtures using 0.5 U of *Taq* DNA polymerase (Biolabs) according to the manufacturer's specifications and primers (melting temperatures, 49.6 to 53.1°C) described in the legend to Fig. 1. After an initial denaturation step consisting of 4 min at 95°C, PCR was performed for 30 cycles of denaturation for 30 s at 95°C, annealing for 30 s at 47.5°C, and extension for 30 s at 72°C, followed by final extension for 7 min at 72°C.

Treatment of CNRZ368 with MC induced an increase in the PCR signal intensity corresponding to the *attB* and *attI* sites, while this treatment did not induce an increase in the PCR signal intensity corresponding to the *fda* gene used as a control (Fig. 2). The most intense signal for both *attB* and *attI* sites was

* Corresponding author. Mailing address: Laboratoire de Génétique et Microbiologie UMR1128, INRA, Faculté des Sciences et Techniques, Université Henri Poincaré Nancy 1, 1 Bd des Aiguillettes, BP239, F-54506 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Phone: (33) 03 83 68 49 72. Fax: (33) 03 83 68 11 76. E-mail: guedon@nancy.inra.fr.

▽ Published ahead of print on 17 November 2006.

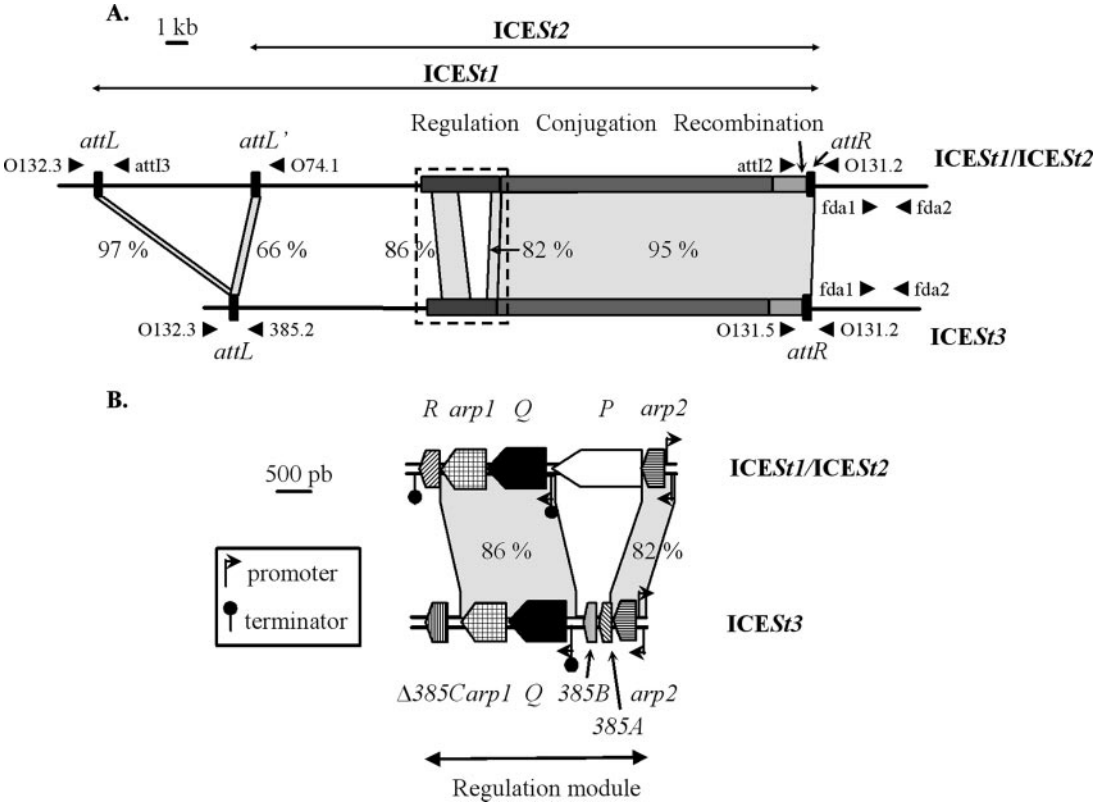


FIG. 1. Comparison of ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3* maps. (A) Location of the recombination, conjugation, and regulation modules and the recombination sites on the ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3* maps. The recombination sites are indicated by solid rectangles and are magnified. The schematic localizations and orientations of oligonucleotides used for PCRs are indicated by arrowheads. The following primer pairs were used for amplification of fragments containing the recombination sites resulting from ICE excision: primers O131.2 and O132.3 (*attB* from ICE*St1* and ICE*St3*), primers attI2 and attI3 (*attI* from ICE*St1*), primers attI2 and O74.1 (*attI'* from ICE*St2*), and primers O131.5 and 385.2 (*attI* from ICE*St3*). The fda1-fda2 primer pair was used for amplification of an *fda* internal region. The dotted rectangle indicates the area shown in panel B. (B) Map of regulation modules of ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3*. ORF designations beginning with "*orf*" are abbreviated with the corresponding letter or name. The locations and orientations of ORFs and truncated ORFs (Δ385C) belonging to the regulation modules are indicated by arrow boxes. The angled arrows and the lollipops indicate the putative promoters and rho-independent transcription terminators deduced from in silico analyses. The gray areas join closely related modules and *att* sites belonging to the ICEs (>65% nucleotide identity); the levels of identity are indicated. The close relationships between short sequences and insertion elements are not shown.

obtained when 0.1 μg/ml MC (MIC/2) was used. The effects of MC were also determined by PCR amplification of fragments harboring *attI* and *attB*, using 1 μg to 1 ng genomic CNRZ368 DNA. The minimum amounts of template DNA that resulted in positive PCR amplification of the *attB* and *attI* sites were 100 ng using CNRZ368 DNA in the absence of MC and 10 ng after treatment with MC (MIC/2), suggesting that DNA damage caused by MC induced at least a 10-fold increase in ICE*St1* excision.

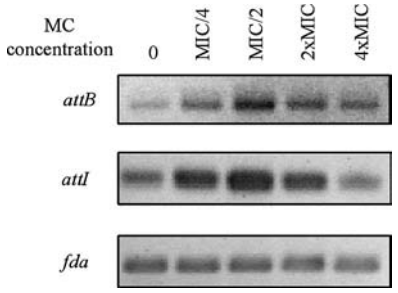


FIG. 2. Effects of MC treatment of exponentially growing cells on the excision frequency of ICE*St1*. Fragments containing the *attB* (361 bp) or *attI* (400 bp) recombination site were amplified using 1 μg template DNA from MC-treated cells and primers described in the legend to Fig. 1. An internal fragment of the *fda* gene (339 bp) was amplified as a control using 1 ng template DNA.

In the absence of MC, the following ratios of the excised circular form to the genome were found in the stationary phase of growth: 10^{-6} for ICE*St1*, $<10^{-6}$ for ICE*St2*, and 9×10^{-3} for ICE*St3* (20). However, treatment of the strains harboring ICE*St2* or ICE*St3* with MC (MIC/2) was also found to induce excision (data not shown). This suggests that DNA damage induced excision of the three ICEs.

In order to examine the *arp1* function, two fragments containing the 5′ and 3′ ends of *arp1* of ICE*St1*/ICE*St2* were cloned in the thermosensitive vector pG$^+$host9 (5, 17). The recombinant plasmid, carrying a very short deleted ORF, Δ*arp1*, was introduced into *S. thermophilus* CNRZ368. A strain harboring the Δ*arp1* ORF instead of *arp1* (CNRZ368 Δ*arp1*) was obtained by two successive homologous recombination events.

The effects of the *arp1* deletion were determined by PCR

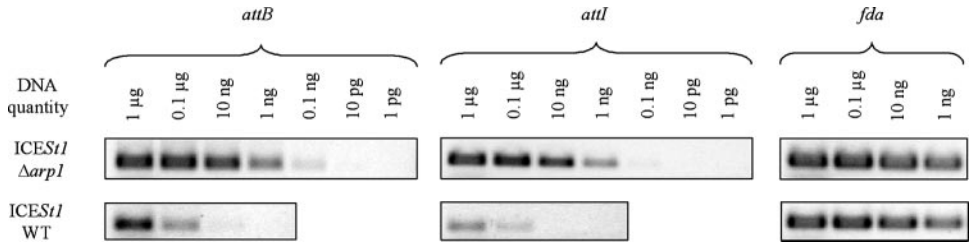


FIG. 3. Effects of *arp1* deletion on the excision frequency of ICE*St1*. Fragments containing the *attB* (361 bp) and *attI* (400 bp) recombination sites from the strains harboring wild-type ICE*St1* (ICE*St1* WT) or ICE*St1* Δ*arp1* were amplified by PCR using primers described in the legend to Fig. 1 and amounts of template DNA ranging from 1 μg to 1 pg for CNRZ368 Δ*arp1* and from 1 μg to 1 ng for CNRZ368. An internal fragment of the *fda* gene (339 bp) was amplified as a control.

amplification of fragments harboring *attI* and *attB*, using amounts of genomic DNA ranging from 1 μg to 1 ng for wild-type ICE*St1* and from 1 μg to 1 pg for ICE*St1* Δ*arp1* (Fig. 3). The minimum amounts of DNA that produced a positive result for the *attB* site were 10 ng of CNRZ368 template DNA and 10 pg of CNRZ368 Δ*arp1* template DNA. Using the same procedure, the minimum amounts of DNA that produced a positive PCR result for the *attI* site were 0.1 μg of CNRZ368 DNA and 0.1 ng of CNRZ368Δ*arp1* DNA. The *arp1* deletion did not induce an increase in the PCR signal intensity when the *fda* gene was used as a control. Thus, deletion of the *arp1* gene resulted in at least a 1,000-fold increase in the concentration of ICE*St1 attB* and *attI* sites. Furthermore, whereas ICE*St1* and ICE*St2* were excised at different frequencies, the concentrations of a fragment carrying the *attI′* site from wild-type ICE*St2* or ICE*St2* Δ*arp1* (Fig. 1A) increased by a factor similar to that observed for ICE*St1* (data not shown). Therefore, the *arp1* gene repressed the excision of ICE*St1* and ICE*St2*.

To validate the assumption that Arp1 autoproteolysis is involved in the induction of ICE excision by MC, exponentially growing cells of CNRZ368 Δ*arp1* were treated with MC at a concentration of 0.1 μg/ml (MIC/2). In three replicate experiments, the minimal amount of DNA that allowed detection of *attB* amplification (1 ng) was the same in the presence and in the absence of MC. Furthermore, in these three replicate experiments, the minimal amounts of DNA that allowed detection of *attI* amplification were 0.1 ng or 1 ng in the absence of MC and 0.1 ng after treatment with MC. Therefore, the inducibility of ICE*St1* Δ*arp1* excision by MC was reduced or suppressed compared to the results for the same MC treatment in the wild-type strain. This suggests that MC treatment alleviates the repression of ICE*St1* excision mediated by Arp1. The minimal amount of DNA that allowed detection of *attI′* amplification (1 ng) was the same in the presence and in the absence of MC. This suggests that MC treatment also alleviates the repression of ICE*St2* excision mediated by Arp1. In the same way, MC treatment derepressed the excision and transfer of another ICE, SXT from *V. cholera*e, probably by promoting the autocleavage of a cI homologue encoded by the element (3).

The functions of the other genes harbored by the ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3* regulation modules (Fig. 1B) remain unknown. Nevertheless, the regulation modules of numerous *Firmicutes* prophages, such as TP901-1 from *Lactococcus lactis* (16), and of another ICE, ICE*Bs1* from *B. subtilis* (1), encode an OrfQ homologue and a "cI-like" repressor (i.e., a repressor related to Arp2), while none of these elements encode a genuine homologue of the cI repressor. OrfQ and the OrfQ homologues have a DUF955 domain that has a conserved H-E-X-X-H motif, suggesting that these proteins could be Zn^{2+} metalloproteinases (21). However, the activity of these proteins has not been demonstrated. Whereas the "cI-like" proteins encoded by prophages repress their lytic growth, these proteins are shorter than genuine cI homologues. Indeed, the cI-like repressors contain an HTH DNA binding domain but lack a region harboring autoproteolytic and oligomerization functions related to the genuine cI. However, the TP901-1 "cI-like" repressor binds to operators as dimers and higher multimers (14). Furthermore, the excision of prophages with *cI*-like genes and *orfQ* homologues, such as ϕSfi21 from *S. thermophilus* (7) or TP901-1 (16), is inducible by MC, and the prophage TP901-1 *cI*-like gene is involved in the lytic phase induction pathway. Moreover, the induction of the prophage TP901-1 (16) and of ICE*Bs1* by MC (1) is RecA dependent. Thus, *arp2* and *orfQ* might also be involved in the derepression pathway of the excision of the *S. thermophilus* ICEs.

To our knowledge, ICE*St1*/ICE*St2* and ICE*St3* are the only integrative elements (i.e., phages, ICEs, or related elements) that encode a genuine cI homologue and might encode a cI-like homologue. Since MC induces the conjugative transfer of SXT, an ICE from *V. cholerae* coding for a genuine cI (3), and of ICE*Bs1*, an ICE from *B. subtilis* coding for a cI-like repressor (1), DNA damage could regulate not only the excision but also the conjugative transfer of the ICEs from *S. thermophilus*.

REFERENCES

1. **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. USA **102:**12554–12559.
2. **Bacic, M., A. C. Parker, J. Stagg, H. P. Whitley, W. G. Wells, L. A. Jacob, and C. J. Smith.** 2005. Genetic and structural analysis of the *Bacteroides* conjugative transposon CTn*341*. J. Bacteriol. **187:**2858–2869.
3. **Beaber, J. W., B. Hochhut, and M. K. Waldor.** 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature **427:**72–74.
4. **Bentley, S. D., K. F. Chater, A. M. Cerdeno-Tarraga, G. L. Challis, N. R. Thomson, K. D. James, D. E. Harris, M. A. Quail, H. Kieser, D. Harper, A. Bateman, S. Brown, G. Chandra, C. W. Chen, M. Collins, A. Cronin, A. Fraser, A. Goble, J. Hidalgo, T. Hornsby, S. Howarth, C. H. Huang, T. Kieser, L. Larke, L. Murphy, K. Oliver, S. O'Neil, E. Rabbinowitsch, M. A. Rajandream, K. Rutherford, S. Rutter, K. Seeger, D. Saunders, S. Sharp, R. Squares, S. Squares, K. Taylor, T. Warren, A. Wietzorrek, J. Woodward, B. G. Barrell, J. Parkhill, and D. A. Hopwood.** 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). Nature **417:**141–147.
5. **Biswas, I., A. Gruss, S. D. Ehrlich, and E. Maguin.** 1993. High-efficiency gene inactivation and replacement system for gram-positive bacteria. J. Bacteriol. **175:**3628–3635.

6. **Bonheyo, G. T., B. D. Hund, N. B. Shoemaker, and A. A. Salyers.** 2001. Transfer region of a *Bacteroides* conjugative transposon contains regulatory as well as structural genes. Plasmid **46:**202–209.
7. **Brüssow, H., and A. Bruttin.** 1995. Characterization of a temperate *Streptococcus thermophilus* bacteriophage and its genetic relationship with lytic phages. Virology **212:**632–640.
8. **Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris, and G. Guédon.** 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. Mol. Microbiol. **46:**601–610.
9. **Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris, and G. Guédon.** 2002. The ICE*St1* 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.
10. **Burrus, V., Y. Roussel, B. Decaris, and G. Guédon.** 2000. Characterization of a novel integrative element, ICE*St1*, in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. Appl. Environ. Microbiol. **66:**1749–1753.
11. **Clewell, D. B., D. D. Jaworski, S. E. Flannagan, L. A. Zitzow, and Y. A. Su.** 1995. The conjugative transposon Tn*916* of *Enterococcus faecalis*: structural analysis and some key factors involved in movement. Dev. Biol. Stand. **85:**11–17.
12. **Dodd, I. B., K. E. Shearwin, A. J. Perkins, T. Burr, A. Hochschild, and J. B. Egan.** 2004. Cooperativity in long-range gene regulation by the lambda CI repressor. Genes Dev. **18:**344–354.
13. **Gaillard, M., T. Vallaeys, F. J. Vorholter, M. Minoia, C. Werlen, V. Sentchilo, A. Puhler, and J. R. van der Meer.** 2006. The *clc* element of *Pseudomonas* sp. strain B13, a genomic island with various catabolic properties. J. Bacteriol. **188:**1999–2013.
14. **Johansen, A. H., L. Brondsted, and K. Hammer.** 2003. Identification of operator sites of the CI repressor of phage TP901-1: evolutionary link to other phages. Virology **311:**144–156.
15. **Larbig, K. D., A. Christmann, A. Johann, J. Klockgether, T. Hartsch, R. Merkl, L. Wiehlmann, H. J. Fritz, and B. Tummler.** 2002. Gene islands integrated into $tRNA^{Gly}$ genes confer genome diversity on a *Pseudomonas aeruginosa* clone. J. Bacteriol. **184:**6665–6680.
16. **Madsen, P. L., A. H. Johansen, K. Hammer, and L. Brondsted.** 1999. The genetic switch regulating activity of early promoters of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. J. Bacteriol. **181:**7430–7438.
17. **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.
18. **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.
19. **Mohd-Zain, Z., S. L. Turner, A. M. Cerdeno-Tarraga, 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.
20. **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: ICE*St1*-related elements from *Streptococcus thermophilus*. Microbiology **150:**759–774.
21. **Rawlings, N. D., and A. J. Barrett.** 1995. Evolutionary families of metallopeptidases. Methods Enzymol. **248:**183–228.
22. **Sentchilo, V., R. Ravatn, C. Werlen, A. J. 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.
23. **Sezonov, G., C. Possoz, A. Friedmann, J. L. Pernodet, and M. Guérineau.** 2000. KorSA from the *Streptomyces* integrative element pSAM2 is a central transcriptional repressor: target genes and binding sites. J. Bacteriol. **182:**1243–1250.
24. **Stingele, F., and B. Mollet.** 1996. Disruption of the gene encoding penicillin-binding protein 2b (pbp2b) causes altered cell morphology and cease in exopolysaccharide production in *Streptococcus thermophilus* Sfi6. Mol. Microbiol. **22:**357–366.
25. **Toussaint, A., C. Merlin, S. Monchy, M. A. Benotmane, R. Leplae, M. Mergeay, and D. Springael.** 2003. The biphenyl- and 4-chlorobiphenyl-catabolic transposon Tn*4371*, a member of a new family of genomic islands related to IncP and Ti plasmids. Appl. Environ. Microbiol. **69:**4837–4845.
26. **van der Meer, J. R., and V. Sentchilo.** 2003. Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria. Curr. Opin. Biotechnol. **14:**1–7.

Des analyses de génomes avaient suggéré que de nombreux îlots génomiques bactériens seraient des éléments intégratifs conjugatifs (ICE) ou des éléments en dérivant. Les ICE s'excisent sous forme circulaire par la recombinaison site-spécifique entre les sites *attR* et *attL* qui les flanquent, se transfèrent par conjugaison et s'intègrent chez une cellule réceptrice. Les éléments de ce type sont très abondants aux seins des génomes de bactéries et d'archées.

Divers îlots génomiques apparentés intégrés dans l'extrémité 3' de l'ORF *fda* chez plusieurs souches de la bactérie lactique *Streptococcus thermophilus*. Cette famille inclurait 2 éléments intégratifs potentiellement conjugatifs, dont ICE*St3*, et quatre éléments génomiques qui dérivent d'ICE par délétion des modules de régulation, de conjugaison et de recombinaison, les CIME (*cis* mobilizable elements). Les comparaisons de séquences avaient suggéré que cette famille d'îlots génomiques évoluait selon le modèle original suivant. Un ICE acquis par conjugaison s'intégrerais par recombinaison site-spécifique dans l'un des deux sites *att* flanquant le CIME, conduisant à l'accrétion des 2 îlots apparentés. Ce tandem d'îlots nouvellement formé serait un ICE composite capable de s'exciser sous forme circulaire et de se transférer par conjugaison.

Ce travail a montré qu'ICE*St3* se transfère entre souches de *S. thermophilus* et entre espèces proches. Cet élément est le premier élément conjugatif identifié chez ce streptocoque.

Le transfert d'ICE*St3* vers une cellule portant un ICE ou un CIME intégré a conduit à l'accrétion site-spécifique d'ICE*St3* et d'un îlot génomique apparenté. L'étude des structures en tandem résultant de ces événements a révélé qu'elles possèdent une grande plasticité car elles sont soumises à une grande variété d'intégrations et d'excisions.

A partir de cellules portant un tandem CIME-ICE, le cotransfert du CIME et de l'ICE ainsi que le transfert du CIME seul ont été obtenus, démontrant la mobilisation conjugative d'un CIME par ICE*St3*. De plus, une souche donatrice porteuse d'ICESt3 peut capturer un CIME présent dans une souche réceptrice par rétromobilisation. Ainsi, le modèle d'évolution des îlots génomiques de *S. thermophilus* par accrétion site-spécifique et mobilisation conjugative a été démontré.

L'ensemble de ces travaux démontrent que ces éléments évoluent selon le modèle proposé et que les CIME sont une nouvelle classe d'éléments mobiles non autonomes.

Par ailleurs, une analyse des données bibliographiques réalisée pendant ce travail et une étude récente de génomes séquencés suggèrent très fortement que les CIME sont très répandus et que les événements d'accrétion site-spécifique entre îlots génomiques jouent un rôle important dans l'évolution bactérienne.