



HAL
open science

Diversité génétique et phénotypique d'une collection de souches de *Streptococcus salivarius*: étude des éléments intégratifs et des capacités d'adhésion aux cellules des écosystèmes digestif et buccal

Fanny Chaffanel

► To cite this version:

Fanny Chaffanel. Diversité génétique et phénotypique d'une collection de souches de *Streptococcus salivarius*: étude des éléments intégratifs et des capacités d'adhésion aux cellules des écosystèmes digestif et buccal. Bactériologie. Université de Lorraine, 2016. Français. NNT: 2016LORR0070 . tel-01752352

HAL Id: tel-01752352

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752352>

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>



Ecole doctorale RP2E (Ressources, Procédés, Produits, Environnement)

Collegium Sciences et Technologie

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

par Fanny CHAFFANEL

**Diversité génétique et phénotypique d'une collection de souches de
Streptococcus salivarius : étude des éléments intégratifs et des capacités
d'adhésion aux cellules des écosystèmes digestif et buccal**

Le 13 mai 2016

Membres du jury :

Rapporteurs : Mme Christine Delorme, Chargée de recherches (HDR), INRA

Mr Jean-François Cavin, Professeur, AgroSup Dijon

Examineurs : Mme Pascale Serror, Directeur de recherches, INRA

Mme Nathalie Leblond-Bourget, Professeur, Université de Lorraine

Mme Florence Charron-Bourgoin, Maître de conférences, Université de Lorraine

UMR1128 Génétique et Microbiologie, INRA-Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies,

Boulevard des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex.



Ecole doctorale RP2E (Ressources, Procédés, Produits, Environnement)

Collegium Sciences et Technologie

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Spécialité « Procédés Biotechnologiques et Alimentaires »

par Fanny CHAFFANEL

**Diversité génétique et phénotypique d'une collection de souches de
Streptococcus salivarius : étude des éléments intégratifs et des capacités
d'adhésion aux cellules des écosystèmes digestif et buccal**

Le 13 mai 2016

Membres du jury :

Rapporteurs : Mme Christine Delorme, Chargée de recherches (HDR), INRA

Mr Jean-François Cavin, Professeur, AgroSup Dijon

Examineurs : Mme Pascale Serror, Directeur de recherches, INRA

Mme Nathalie Leblond-Bourget, Professeur, Université de Lorraine

Mme Florence Charron-Bourgoin, Maître de conférences, Université de Lorraine

UMR1128 Génétique et Microbiologie, INRA-Université de Lorraine, Faculté des Sciences et Technologies,
Boulevard des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy cedex.

Remerciements

Je tiens à remercier monsieur le Professeur Pierre Leblond pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire Dynamique des génomes et Adaptation Microbienne.

Je souhaite remercier madame le professeur Nathalie Leblond-Bourget et madame le docteur Florence Charron-Bourgoin pour leur encadrement et leur aide tout au long de ce doctorat ainsi que pour la confiance qu'elles m'ont accordée.

Je remercie également madame le docteur Christine Delorme et monsieur le Professeur Jean-François Cavin pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Merci aussi à madame le directeur de recherche Pascale Serror pour avoir accepté de juger ce travail.

Je tiens également à remercier mesdames les docteurs Sophie Payot et Virginie Libante, monsieur le docteur Gérard Guédon ainsi que messieurs Stéphane Bertin et Charles Coluzzi pour leur aide technique et leurs précieux conseils, tant à la paillasse que lors de conférences. Je remercie tous les membres de l'équipe ICE Transfert et Adaptation ainsi que tous les membres du laboratoire pour leur accueil, leur amitié et leur sympathie.

Je remercie mesdames Mounira Kebouchi et Claire Soligot-Hognon ainsi que monsieur le professeur Yves Le Roux de l'équipe PB2P du laboratoire UR AFPA pour leur aide et leur investissement dans notre travail de collaboration sur l'adhésion bactérienne aux cellules gastro-intestinales.

Merci aux stagiaires mademoiselle Pauline Maigrat et messieurs Alexis Durand et Loïc Meisse pour leur participation à cette étude.

Je souhaite remercier également madame Christine Fivet, messieurs Stéphane Desobry et Michel Buès ainsi que tous les membres du conseil de l'école doctorale et les autres représentants doctorants. Ces deux années à siéger au conseil de l'école et à la représenter au sein du Conseil Lorrain des Études Doctorales furent riches en apprentissages, bonne humeur et rebondissements. Je suis heureuse d'avoir participé à l'évolution du statut de représentant étudiant en école doctorale.

Enfin, il me reste quelques lignes pour remercier mon entourage : mon compagnon, Guillaume, sans le soutien de qui je ne serais pas celle que je suis aujourd'hui ; ma famille qui m'a permis d'aller au bout de mon (long) chemin étudiantin ; mes compagnons d'armes de la troupe d'escrime ancienne et artistique « *Les Fines Lames de Stanislas* » pour leur patience sans fin face à mes absences régulières et mes retards à l'entraînement ; mes amis et mon filleul qui, même sans me voir et depuis l'autre bout de la France, n'ont jamais cessé de me soutenir et de m'encourager. Merci.

Liste des abréviations

- ADN : Acide Désoxyribonucléique
- ARN : Acide Ribonucléique
- ATP : Adenosine TriPhosphate
- CA-SFM : Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de microbiologie
- CDS : CoDing Sequence
- CDS : CoDing Sequence
- CHU : Centre Hospitalier Universitaire
- com. pers. : communication personnelle
- CP : Protéine de Couplage
- CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
- CSP : Competence Stimulating Peptide
- dNTP : Deoxynucleotide Solution Mix
- DR : Répétition Directe
- GM17 : Milieu M17 additionné de glucose 10%
- H2O UP : Eau Ultra Pure
- ICE : Integrative and Conjugative Element ou Élément Intégratif Conjugatif
- IME : Integrative and Mobilizable Element ou Élément Intégratif et mobilisable
- IR : Répétition Inversée
- Kb : kilobase
- LM17 : Milieu M17 additionné de lactose 10 g/L
- LrGG : *Lactobacillus rhamnosus* GG
- MBF : Mucus-Binding Factor
- MCD : Milieu Chimiquement Défini
- MEGA : Macrolide Efflux Genetic Assembly
- MLST : MultiLocus Sequence Typing
- MMC : Mitomycine C
- MPF : Mating Pair Formation
- ND : Non déterminé
- ORF : Open Reading Frame
- pb : paire de bases
- PBS : Phosphate Buffered Saline

- PCR : Polymerase Chain Reaction
- pH : potentiel Hydrogène
- qsp : quantité suffisante pour
- RM : Restriction Modification
- SEM : Standard Error of the Mean ou erreur standard
- SRP : Signal Recognition Particule
- SRRP : Serine Rich Repeat Protein
- ST : Sequence Type
- T4SS : Système de Sécrétion de Type IV
- TBE : Tris, Borate, EDTA
- UFC : Unités Formant Colonies
- UV : Ultra-Violet

Table des matières

Remerciements	4
Liste des abréviations	4
Table des matières	7
Table des figures	12
Table des tableaux	14
Introduction	15
I. <i>Streptococcus salivarius</i> : un bon modèle d'étude du transfert de gènes au sein du microbiote ?	16
1. <i>S. salivarius</i> : une espèce commensale	16
2. Des pathogènes opportunistes parmi les souches de <i>S. salivarius</i>	17
3. Diversité des souches de <i>S. salivarius</i>	18
II. Conjugaison chez les streptocoques	19
1. Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) chez les streptocoques	20
a. Définition des ICE	20
b. Le module d'intégration/excision des ICE chez les streptocoques	22
c. Le module de conjugaison des ICE chez les streptocoques	24
d. Le module de régulation des ICE chez les streptocoques	31
e. Le module d'adaptation des ICE chez les streptocoques	34
f. Le mécanisme d'évolution modulaire des ICE chez les streptocoques.....	36
2. Les éléments intégratifs mobilisables (IME) chez les streptocoques.....	37
3. Les barrières au transfert conjugal des ICE.....	38
a. Systèmes d'exclusion.....	39
b. Systèmes de restriction-modification (RM)/loci CRISPR	39
c. Immunité de cible.....	40

III.	Transfert conjugatif et tractus digestif, une synergie ?	40
1.	Biofilm : définition et formation.....	40
2.	L'adhésion au tractus gastro-intestinal.....	42
a.	Le tractus gastro-intestinal : substrat d'adhésion du microbiote gastro-intestinal.....	42
b.	Les lignées cellulaires épithéliales gastro-intestinales.....	44
c.	Le mécanisme d'adhésion bactérienne sur des cellules épithéliales.....	45
d.	Systèmes de sécrétion des adhésines des streptocoques	45
e.	Systèmes d'ancrage des adhésines des streptocoques	48
f.	Diversité des adhésines des streptocoques	50
3.	Transfert conjugatif et biofilm : une synergie	51
	Objectifs de l'étude	53
	Résultats.....	55
I.	Identification et caractérisation des éléments intégratifs chez <i>S. salivarius</i>	55
1.	Etude de la diversité de la collection de souches de <i>S. salivarius</i>	55
2.	Détection des éléments intégratifs chez <i>S. salivarius</i> par PCR.....	56
a.	Détection d'éléments intégratifs porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques	56
b.	Détection d'autres éléments intégratifs	57
3.	Détection des éléments intégratifs chez <i>S. salivarius</i> par analyse de la séquence des génomes.....	
	69	
a.	Détection et diversité des ICE chez <i>S. salivarius</i>	71
b.	Détection et diversité des IME chez <i>S. salivarius</i>	72
c.	Comparaison des ICE de la famille ICESt3 chez <i>S. salivarius</i>	73
d.	Détection des éléments MEGA chez <i>S. salivarius</i>	76
II.	Etude des capacités d'adhésion de <i>S. salivarius</i> aux cellules des écosystèmes digestif et buccal	78
1.	Etude des capacités d'adhésion à la salive de 24 souches de <i>S. salivarius</i>	78

2.	Etude des capacités d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales de 14 souches de <i>S. salivarius</i>	80
a.	Etude des capacités d'adhésion aux cellules Caco2 de 14 souches de <i>S. salivarius</i>	81
b.	Étude des capacités d'adhésion aux cellules HT29-MTX de 14 souches de <i>S. salivarius</i> ..	82
c.	Y-a-t-il un lien entre les capacités d'adhésion et d'auto-agrégation des 14 souches de <i>S. salivarius</i> ?	84
3.	Impact du mucus sur la capacité d'adhésion de <i>S. salivarius</i> F6-1 aux cellules épithéliales intestinales caliciformes	85
a.	Etude des capacités d'adhésion à deux lignées cellulaires gastro-intestinales productrices de mucus de <i>S. salivarius</i> F6-1.....	85
b.	Identification de protéines exprimées à la surface de <i>S. salivarius</i> F6-1	86
c.	Sélection des protéines de surface à étudier	89
d.	Impact de la sortase A sur les capacités d'adhésion de F6-1	90
e.	Impact de protéines de surface sur les capacités d'adhésion de <i>S. salivarius</i> F6-1.....	91
III.	Étude du transfert conjugatif d'ICESt3 F6-1 <i>rpsI</i> chez <i>S. salivarius</i>	94
1.	Description d'ICESt3 F6-1 <i>rpsI</i> de <i>S. salivarius</i> F6-1.....	94
2.	Test d'excision d'ICESt3 F6-1 <i>rpsI</i>	96
3.	Etude du transfert conjugatif de l'ICESt3 F6-1 <i>rpsI</i>	97
a.	Marquage d'ICESt3 F6-1 <i>rpsI</i>	98
b.	Choix des souches réceptrices.....	98
c.	Tests de transfert conjugatif d'ICESt3 F6-1 <i>rpsI</i> vers <i>S. salivarius</i> L21 et N17.....	102
	Discussion	108
I.	Diversité génétique et phénotypique d'une collection de souches de <i>S. salivarius</i>	108
1.	Diversité génétique	108
2.	Diversité phénotypique des résistances aux antibiotiques.....	111
II.	Abondance et diversité des éléments intégratifs chez <i>S. salivarius</i>	112
1.	Abondance et diversité des éléments intégratifs porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques.....	112
2.	Abondance et diversité d'autres éléments intégratifs.....	114

III.	Diversité des capacités d'adhésion de <i>S. salivarius</i> aux cellules des écosystèmes digestif et buccal	117
1.	Diversité des capacités d'adhésion à la salive chez <i>S. salivarius</i>	117
2.	Diversité des capacités d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales chez <i>S. salivarius</i>	117
3.	Impact d'adhésines sur les capacités d'adhésion de <i>S. salivarius</i> F6-1 aux cellules épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus.....	118
IV.	Transfert conjugatif d'ICESt3 F6-1 <i>rpsI</i> chez <i>S. salivarius</i>	121
1.	Choix des souches réceptrices	121
2.	Transfert conjugatif de l'ICESt3 F6-1 <i>rpsI</i> chez <i>S. salivarius</i>	121
V.	Conclusions et perspectives	124
	Matériel et méthodes	126
I.	Matériel.....	126
1.	Souches bactériennes.....	126
2.	Matériel biologique	127
3.	Conditions de culture	127
a.	Conditions de culture des streptocoques	127
b.	Conditions de culture des cellules épithéliales gastro-intestinales	128
II.	Méthodes	129
1.	Test d'adhésion à la salive.....	129
2.	Test d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales	130
3.	Test d'auto-agrégation.....	131
4.	Conjugaison sur filtre	131
5.	Test de production de bactériocines.....	131
6.	Construction de mutants et marquage d'ICESt3 F6-1 <i>rpsI</i>	132
7.	Electrophorèse	136
	Références bibliographiques	137
	Annexes	157

Table des figures

Figure 1 : Isolement de <i>S. salivarius</i> sur gélose mitis salivarius.	16
Figure 2 : Cycle de transfert d'un ICE d'après Wozniak & Waldor (2010).....	20
Figure 3 : Comparaison d'ICESt1 et ICESt3 de <i>S. thermophilus</i> d'après Carraro & Burrus (2014).	21
Figure 4 : Région core de Tn916 avec ses quatre modules d'après Roberts & Mullany (2009).....	21
Figure 5 : Organisation modulaire d'un ICE sous forme excisée et intégrée d'après Bellanger <i>et al.</i> (2014).	23
Figure 6 : Mécanisme de transfert via un pore de conjugaison de type T4SS d'après Bellanger <i>et al.</i> (2014)	25
Figure 7 : Structure du T4SS du plasmide conjugatif pKM101 d' <i>E. coli</i> d'après Ilangovan <i>et al.</i> (2015).	26
Figure 8 : Les deux modes d'action du T4SS des bactéries Gram - d'après Ilangovan <i>et al.</i> (2015).	27
Figure 9 : Modèle de localisation et d'interaction des protéines codées par le T4SS de pIP501 de <i>S. agalactiae</i> d'après Goessweiner-Mohr <i>et al.</i> (2013).....	28
Figure 10 : Comparaison de l'organisation des éléments ICEBs1, Tn916, ICESt1 et Tn5252 d'après Burrus <i>et al.</i> (2002b).....	30
Figure 11 : Régulation de l'expression des gènes des modules d'intégration/excision et de conjugaison de Tn916 d'après Celli & Trieu-Cuot (1998).....	32
Figure 12 : Régulation de l'ICE SXT de <i>V. cholerae</i> d'après Wozniak & Waldor (2010).....	33
Figure 13 : Déterminants génétiques de résistance aux macrolides portés par les éléments génétiques mobiles de <i>S. pneumoniae</i> d'après Chancey <i>et al.</i> (2015).	35
Figure 14 : Comparaison de l'organisation des ICE Tn5397, Tn916 et Tn1549 d'après Burrus <i>et al.</i> , (2002a).	36
Figure 15 : Comparaison des IME intégrés au sein de l'origine de transfert de plusieurs ICE retrouvés chez <i>S. agalactiae</i> d'après Puymège <i>et al.</i> (2015).....	38
Figure 16 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm d'après Sauer (2003).....	40
Figure 17 : A : La barrière épithéliale intestinale d'après Liévin-Le Moal & Servin (2013). B : Biopsie colique. Inserm 2014.....	43
Figure 18 : Modèle en deux étapes de l'adhésion des streptocoques à des cellules épithéliales gastro-intestinales d'après Hasty <i>et al.</i> (1992).....	45
Figure 19 : Système de sécrétion Sec des bactéries Gram+ d'après Freudl (2013).	47
Figure 20 : Système de sécrétion accessoire SecA2/secY2 ou Sec2 d'après Freudl (2013).	48

Figure 21 : Diversité des systèmes d'ancrage des protéines de surface chez les bactéries Gram + d'après Desvaux <i>et al.</i> (2006).....	49
Figure 22 : Système d'ancrage covalent d'une protéine de surface à motif LPxTG au peptidoglycane via le motif LPxTG et la sortase d'après Hendrickx <i>et al.</i> (2011).....	50
Figure 23 : Localisation des ICE, IME et éléments MEGA de <i>S. salivarius</i>	71
Figure 24 : Arbre phylogénétique des intégrases à tyrosine des 18 ICE de la famille ICESt3 détectés parmi les 19 génomes séquencés de <i>S. salivarius</i>	74
Figure 25 : Comparaison de 6 ICE de la famille ICESt3 portés par des souches différentes de <i>S. salivarius</i> et intégrés dans trois sites d'insertion différents (<i>fda</i> , <i>rpsI</i> et <i>rpmG</i>).....	75
Figure 26 : Comparaison de l'élément MEGA décrit par Stadler & Teuber (2002) et de ceux identifiés chez 10 souches de <i>S. salivarius</i>	77
Figure 27 : Capacité d'adhésion à la salive des 24 souches de <i>S. salivarius</i> sélectionnées.....	79
Figure 28 : Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales de la lignée Caco2 des 14 souches de <i>S. salivarius</i> sélectionnées.	81
Figure 29 : Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales de la lignée HT29-MTX des 14 souches de <i>S. salivarius</i> sélectionnées.	82
Figure 30 : Pourcentage d'auto-agrégation au bout de 5 heures des 14 souches de <i>S. salivarius</i> testées en adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales.	84
Figure 31 : Comparaison des capacités d'adhésion de la souche F6-1 sur les deux lignées cellulaires HT29-MTX et HT29-CL16E.	86
Figure 32 : Distribution des protéines de surface potentielles retrouvées par l'analyse <i>in silico</i> du génome de F6-1.....	88
Figure 33 : Capacité d'adhésion de la souche sauvage F6-1 et de son mutant délété du gène <i>srtA</i> (F6-1 Δ srtA) aux cellules épithéliales gastro-intestinales des lignées cellulaires HT29-MTX et HT29-CL16E.	91
Figure 34 : Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales des lignées HT29-MTX et HT29-CL16E de la souche sauvage F6-1 et de quatre mutants délétés des gènes codant les différentes protéines de surface sélectionnées.....	92
Figure 35 : Comparaison d'ICESt3 F6-1 <i>rpsI</i> de <i>S. salivarius</i> F6-1 et d'ICESt3 de <i>S. thermophilus</i> CNRZ385.	95
Figure 36 : Test d'excision d'ICESt3 F6-1 <i>rpsI</i>	96
Figure 37 : Schéma de l'expérience de conjugaison sur filtre mise au point par Bellanger <i>et al.</i> , (2009) avec ATB pour antibiotique.	97
Figure 38 : Représentation schématique d'ICESt3 <i>rpsI</i> F6-1. Le site d'insertion du gène de résistance à la kanamycine est marqué d'un triangle noir et des lettres KAN.....	98

Figure 39 : Principales étapes de l'expérience de conjugaison avec le protocole de Bellanger <i>et al.</i> (2009) (A) et les modifications testées dans cette étude (B).....	102
Figure 40 : Concentration cellulaire de la donatrice F6-1K7 ICES _t 3 <i>rpsI</i> (UFC/mL) sur milieu GM17 additionné de kanamycine à 1,2 mg/ml dans les différentes conditions de conjugaison testées.	104
Figure 41 : Concentration cellulaire des réceptrices N17 et L21 (UFC/mL) sur milieu GM17 additionné de tétracycline à 20 µg/ml dans les différentes conditions de conjugaison testées.	106
Figure 42 : Construction de mutants par remplacement d'un gène d'intérêt (en rouge) par une cassette de résistance à un antibiotique.....	132

Table des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques des 24 souches d'intérêt, sélectionnées pour la présence potentielle d'éléments de la famille ICES _t 3.	70
Tableau 2 : Capacité d'adhésion aux différents supports biotiques testés et pourcentage d'auto-agrégation de 14 souches de <i>S. salivarius</i>	80
Tableau 3 : Souches réceptrices sélectionnées pour le transfert conjugatif d'ICES _t 3 F6-1 <i>rpsI</i> . Ery, Tet et Cm correspondent respectivement à l'érythromycine, la tétracycline et au chloramphénicol.	99
Tableau 4 : Caractéristiques des souches utilisées dans ce travail.	126
Tableau 5 : Composition du milieu M17 d'après Terzaghi & Sandine, (1975).	128
Tableau 6 : Composition du tampon PBS.	130
Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour le marquage d'ICES _t 3 F6-1 <i>rpsI</i> et la construction des mutants de <i>S. salivarius</i> F6-1.....	135

Introduction

Plus de 1000 espèces bactériennes différentes interagissent entre elles au niveau du tractus digestif humain qui, avec ses 9 m de long, offre une surface d'échange de 300 m². Avec les virus, les levures et les champignons, elles constituent le microbiote intestinal qui joue un rôle clef dans l'alimentation humaine et dans la protection contre les infections (bactériémie) ou encore contre l'inflammation chronique de l'intestin (Eckburg *et al.*, 2005; Hao & Lee, 2004). De même, la cavité buccale humaine renferme des communautés bactériennes qui sont essentielles dans la lutte contre les caries et la parodontite chronique qui est une inflammation des tissus de soutien de l'organe dentaire (Bik *et al.*, 2010).

Le genre bactérien le plus retrouvé au sein de ces communautés bactériennes est le genre *Streptococcus* (Hao & Lee, 2004). Parmi les streptocoques, *Streptococcus salivarius* est une bactérie commensale qui est présente dans la cavité buccale et tout au long du tractus digestif (Eckburg *et al.*, 2005; Hao & Lee, 2004). Elle est généralement retrouvée dans des biofilms présents en particulier sur les dents ou les parois stomacales et intestinales (Cvitkovitch *et al.*, 2003; Aas *et al.*, 2005; Hao & Lee, 2004).

Ces biofilms permettent, d'une part, d'assurer la survie et la colonisation des bactéries commensales et d'autre part, de protéger l'hôte d'une invasion de pathogènes (Hao & Lee, 2004). La formation progressive d'un biofilm implique des interactions bactérie-hôte et notamment l'adhésion des bactéries sur un support (dents, cellules de la paroi intestinale *etc.*).

Au sein d'un biofilm, la densité cellulaire implique une proximité physique entre les bactéries de différentes espèces qui est propice aux échanges de gènes entre elles. Ces transferts horizontaux permettent l'acquisition par les bactéries de gènes d'adaptation tels que des gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence (Kolenbrander *et al.*, 2010; Molin & Tolker-Nielsen, 2003).

Il existe différents mécanismes permettant le transfert horizontal. Parmi eux, la conjugaison qui implique en particulier les éléments intégratifs conjugatifs (ICE). Des études récentes montrent que les ICE sont très répandus dans les génomes bactériens, notamment chez les streptocoques (Ambroset *et al.*, 2016). De ce fait, ils jouent probablement un rôle majeur dans ces transferts et dans l'adaptation des souches à leur environnement.

I. *Streptococcus salivarius* : un bon modèle d'étude du transfert de gènes au sein du microbiote ?

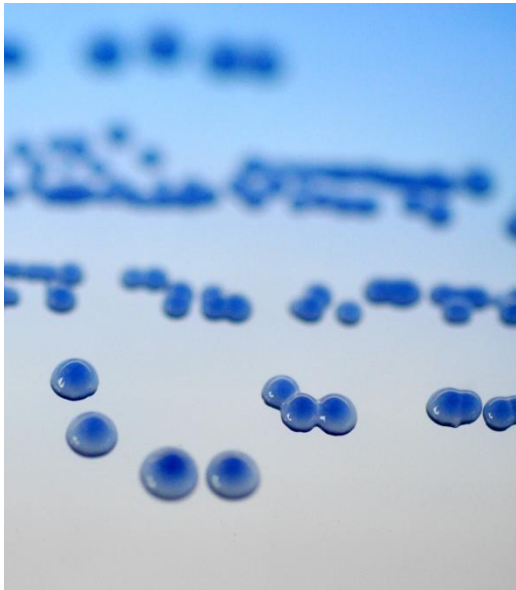


Figure 1 : Isolement de *S. salivarius* sur gélose mitis salivarius. Photo : P. Leblond, laboratoire DynAMic

S. salivarius est une bactérie Gram + appartenant au phylum des *Firmicutes* et dont le génome présente une faible teneur en bases G et C de 35.7 % à 38.8 % (Tettelin *et al.*, 2002). L'espèce *S. salivarius* est l'une des 113 espèces de streptocoques (<http://www.bacterio.net/streptococcus.html>, 14 octobre 2015). La majorité de ces espèces sont classées en 8 groupes (*pyogenic*, *bovis*, *salivarius*, *anginosus*, *sanguinis*, *downei*, *mitis* et *mutans*) (Richards *et al.*, 2014). L'espèce *S. salivarius* appartient au groupe *salivarius* qui inclut également les espèces *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus vestibularis*. *S. salivarius* est aéro-anaérobie facultative

et présente des colonies caractéristiques sur gélose mitis salivarius (figure 1).

1. *S. salivarius* : une espèce commensale

S. salivarius est une espèce commensale de l'homme. Elle est principalement retrouvée au sein de la salive et dans le biofilm multi-espèces du dos de la langue (Aas *et al.*, 2005 ; Corredoira *et al.*, 2005). Elle est primo-colonisatrice de la cavité buccale mais également du système digestif chez les nouveau-nés (Carlsson *et al.*, 1970; Favier *et al.*, 2002; Millar *et al.*, 1996; Park *et al.*, 2005). Elle persiste dans la cavité buccale, l'estomac et les intestins tout au long de la vie (Hakalehto *et al.*, 2011; Van den Bogert *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2005). Ainsi, *S. salivarius* est la 36^{ème} espèce bactérienne la plus fréquemment retrouvée au sein du système digestif (Qin *et al.*, 2010).

Des souches de *S. salivarius* présentent une activité probiotique au sein de leurs écosystèmes humains. Par exemple, les souches K12 et M18 sont commercialisées en tant que probiotique oral en Nouvelle Zélande depuis 2001 (<http://blis.co.nz/about-blis>, 14 octobre 2015). Elles ont un rôle dans la limitation des pharyngites à streptocoques et de la mauvaise haleine (Tagg & Dierksen, 2003) mais aussi dans la réponse immunitaire des cellules épithéliales naso-pharyngées (Cosseau *et al.*, 2008; Sliepen *et al.*, 2009).

En particulier, ces souches sont connues pour leur production de bactériocines (Dempster & Tagg, 1982; Dierksen *et al.*, 2000; Heng *et al.*, 2011). Les gènes *salaA* et *sboB* de la souche K12 codent

respectivement la production de salivaricine A et de salivaricine B, des bactériocines de la classe des lantibiotiques particulièrement efficaces dans la lutte contre l'invasion de la cavité buccale par *Streptococcus pyogenes* qui est notamment impliqué dans les pharyngites. Ces gènes sont portés par un plasmide de 190 kb, appelé mégaplasmide (Hyink *et al.*, 2006; Ross *et al.*, 1993; Wescombe *et al.*, 2006). Toutes les souches de *S. salivarius* productrices de bactériocines décrites jusqu'à présent portent un mégaplasmide codant plusieurs lantibiotiques (Tagg & Dierksen, 2003; Wescombe *et al.*, 2011). Le transfert *in vitro* des mégaplasmes des souches K12 et M18 a été démontré entre souches de *S. salivarius* (Burton *et al.*, 2013). Le transfert du mégaplasmide de la souche K12 a également été montré dans la salive (Wescombe *et al.*, 2006). Néanmoins, le mécanisme de transfert de ces mégaplasmes demeure inconnu.

Les cellules K12 sont également capables d'adhérer aux cellules épithéliales vaginales des souris et d'empêcher la colonisation de leur tractus vaginal par *Streptococcus agalactiae* (Patras *et al.*, 2015). *S. agalactiae* colonise le tractus vaginal de 20 à 30 % des femmes enceintes et ainsi contamine les nouveaux nés. Cette infection peut causer de graves infections pouvant aller jusqu'à la mort du nourrisson (Verani *et al.*, 2010). Les cellules K12 pourraient empêcher la colonisation du tractus vaginal des femmes et ainsi être utilisée à but thérapeutique.

Il a également été montré que la souche TOVE de *S. salivarius* permet de bloquer l'adhésion de micro-organismes responsables de la parodontite comme *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* et *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Sliepen *et al.*, 2009; Van Hoogmoed *et al.*, 2008). Cette inhibition nécessite que la souche TOVE ait adhéré à la surface avant la mise en contact des agents pathogènes, mais le mécanisme impliqué n'a pas été décrit (Sliepen *et al.*, 2009).

Enfin, certaines souches de *S. salivarius* sont capables d'inhiber *in vitro* l'activation de la voie de signalisation NF- κ B, un régulateur transcriptionnel des gènes impliqués dans l'inflammation chronique de l'intestin (Kaci *et al.*, 2014; Wan & Lenardo, 2010).

2. Des pathogènes opportunistes parmi les souches de *S. salivarius*

Bien que l'espèce *S. salivarius* soit considérée comme commensale, certaines souches sont des pathogènes opportunistes qui provoquent des méningites ou des bactériémies chez des individus affaiblis (Kitten *et al.*, 2012; Wilson *et al.*, 2012). Les souches commensales étant incapables de passer les barrières de protection naturelles de l'organisme humain, les pathologies développées font suite à une contamination extérieure par des souches de *S. salivarius* (Wilson *et al.*, 2012). De simples mesures d'hygiène permettent de contrer ces contaminations, par exemple en portant un masque chirurgical lors d'une opération des méninges pour éviter une contamination via la flore buccale naturelle de l'équipe médicale (Wilson *et al.*, 2012)

Les bactériémies causées par *S. salivarius* présentent les mêmes symptômes cliniques que celles causées par *Streptococcus bovis* chez des patients affaiblis (Corredoira *et al.*, 2005). Toutefois, les bactériémies causées par *S. salivarius* sont minoritaires par rapport aux bactériémies causées par d'autres streptocoques. En effet, Han *et al.* (2006) ont analysé 50 souches de streptocoques responsables de bactériémies et seules deux souches isolées de patients affaiblis par un cancer se sont avérées être de l'espèce *S. salivarius*.

La méningite à *S. salivarius* survient après une opération des méninges et fait suite à la contamination du liquide céphalo-rachidien (Wilson *et al.*, 2012). Les études récentes de Shirokawa *et al.* (2014) montrent que les méningites provoquées par *S. salivarius* peuvent être confondues avec des méningites à *Streptococcus pneumoniae* car les souches de *S. salivarius* impliquées expriment des antigènes ressemblant aux antigènes pneumococaux. Ces données suggèrent que *S. salivarius* possède des antigènes de surface proches de *S. pneumoniae* qui ont pu être acquis par transfert horizontal.

3. Diversité des souches de *S. salivarius*

Les exemples décrits précédemment montrent que les souches de *S. salivarius* ne présentent pas toutes les mêmes propriétés suggérant que cette espèce présente une diversité phénotypique et génotypique. La diversité génotypique a été mise en évidence par Delorme *et al.* (2007) en utilisant la technique de MLST (Multilocus Sequence Typing) qui indexe la diversité des séquences nucléotidiques de fragments internes de gènes très conservés (Enright & Spratt, 1999). Dans leur étude, ces auteurs basent leur MLST sur 8 loci (*dnaE*, *thrS*, *pyrE*, *ilvC*, *pepO*, *ddlA*, *sodA* et *glcK*) et sur 27 souches dont 11 sont issues d'individus sains, 11 de patients malades dont les pathologies n'ont pas été décrites et 5 d'origines autres. Les résultats de MLST révèlent une divergence de séquence maximale comprise entre 5 et 32 % selon les gènes. Il s'agit du plus haut taux de diversité connu chez les streptocoques puisque le maximum observé jusqu'alors était de 16.6 % pour *Streptococcus oralis* et le groupe C et G des streptocoques (Delorme *et al.*, 2007). Cette étude montre également que les souches commensales et les souches potentiellement pathogènes n'appartiennent pas à des populations distinctes (Delorme *et al.*, 2007).

La diversité de ces séquences MLST est confirmée par la comparaison des génomes de deux souches de *S. salivarius*, JIM8777 et CCHSS3. Elles présentent un core génome de 1691 gènes et respectivement 252 et 295 gènes spécifiques (Delorme *et al.*, 2014). Parmi ces gènes spécifiques qui ont probablement été acquis par transfert horizontal, un grand nombre code des protéines excrétées ou des protéines de surface. Ces différentes protéines sont impliquées dans des fonctions physiologiques et écologiques majeures comme l'adhésion ou les interactions hôte-bactérie (Delorme *et al.*, 2014). La diversité des fonctions de ces protéines de surface pourrait conférer à *S.*

salivarius ses capacités d'adhésion à de nombreux substrats et de colonisation d'environnements différents

II. Conjugaison chez les streptocoques

Le concept de transfert horizontal correspond à l'acquisition et au maintien par un organisme (cellule réceptrice) de matériel génétique provenant d'un autre organisme (cellule donatrice) sans en être le descendant. Pour que ce transfert devienne un succès évolutif, il faut que le matériel génétique acquis par la cellule réceptrice code des fonctions pouvant lui apporter un avantage adaptatif (Wozniak *et al.*, 2009).

Plusieurs mécanismes de transfert de gènes sont à l'origine de l'évolution des génomes des streptocoques. L'un d'eux est la transformation bactérienne qui a été mise en évidence en 1928 par Griffith chez *S. pneumoniae* (Griffith, 1928). Il s'agit d'un mécanisme au cours duquel la cellule réceptrice intègre au sein de son génome de l'ADN provenant du milieu extérieur (Hartl & Jones, 2003). La transformation a lieu lorsque la cellule réceptrice est dans un état de compétence. L'induction de cet état est régulée par un système de quorum sensing basé sur des phéromones et bien décrit chez *S. thermophilus* (Fontaine *et al.*, 2010; Fontaine *et al.*, 2015). Bien que ce système n'ait pas été décrit chez *S. salivarius*, une partie des gènes le codant sont présents (Fontaine *et al.*, 2010; Fontaine *et al.*, 2015).

Le second mécanisme de transfert de gènes chez les streptocoques est la transduction. Elle consiste en l'encapsidation par erreur d'un fragment d'ADN de l'hôte à la place du génome phagique. La particule transductrice ainsi générée peut alors injecter son ADN dans le cytoplasme d'une bactérie réceptrice (Hartl & Jones, 2003). Celui-ci pourra alors être intégré par recombinaison homologue au sein du chromosome bactérien comme cela a été décrit chez *Streptococcus suis* par exemple (Tang & Lu, 2015). L'étude du génome de la souche *S. salivarius* 57.I a montré la présence d'un phage de 40,8 kb codant 55 protéines (Geng *et al.*, 2011), suggérant que la transduction serait possible chez cette espèce.

Le dernier mécanisme de transfert de gènes connu chez les streptocoques est la conjugaison. C'est un mécanisme qui nécessite un contact étroit entre les bactéries réceptrice et donatrice (Lederberg & Tatum, 1946 ; Lederberg, 1998). La donatrice doit également posséder un élément conjugatif qui correspond à un fragment d'ADN capable de se transférer par ce mécanisme. Il existe 2 types d'éléments conjugatifs : les plasmides conjugatifs et les éléments intégratifs. Ces derniers sont de 2 types : les ICE (pour 'Integrative Conjugative Element') et les IME (pour 'Integrative Mobilizable Element').

Les plasmides conjugatifs sont des molécules d'ADN extra-chromosomiques qui codent leur transfert conjugatif via un pore de conjugaison (Smillie *et al.*, 2010). Ils se maintiennent dans les lignées cellulaires en se répliquant de manière autonome. En plus de leur fonction de transfert, ils portent très souvent des gènes impliqués dans la virulence, la résistance aux antibiotiques ou dans des interactions écologiques. De ce fait, les plasmides conjugatifs sont des vecteurs clefs du transfert horizontal (Smillie *et al.*, 2010). Par exemple, le plasmide pIP501 d'*Enterococcus faecalis* se transfère *in vitro* à une fréquence de 10^{-2} entre deux souches de cette espèce (Horodniceanu *et al.*, 1979). Il est également capable de se transférer *in vitro* vers un grand nombre d'hôtes comme *S. agalactiae*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus helveticus*, *Escherichia coli* ou encore *Streptomyces lividans* (Krah & Macrina, 1991; Kurenbach *et al.*, 2003; Schaberg *et al.*, 1982; Thompson & Collins, 1988; Zúñiga *et al.*, 2003). La suite de cette introduction va se concentrer sur les éléments intégratifs qui semblent être très abondants dans les génomes bactériens, bien plus encore que les plasmides conjugatifs (Guglielmini *et al.*, 2011).

1. Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) chez les streptocoques

a. Définition des ICE

Un ICE est un élément intégré dans le génome d'une cellule donatrice. Il code toutes les fonctions nécessaires à son transfert : son excision sous forme circulaire, son transfert conjugatif vers une cellule réceptrice qui implique l'établissement d'un pore de conjugaison, sa répllication et enfin son intégration site-spécifique dans le génome des cellules réceptrice et donatrice (Burrus *et al.*, 2002a) (Figure 2).

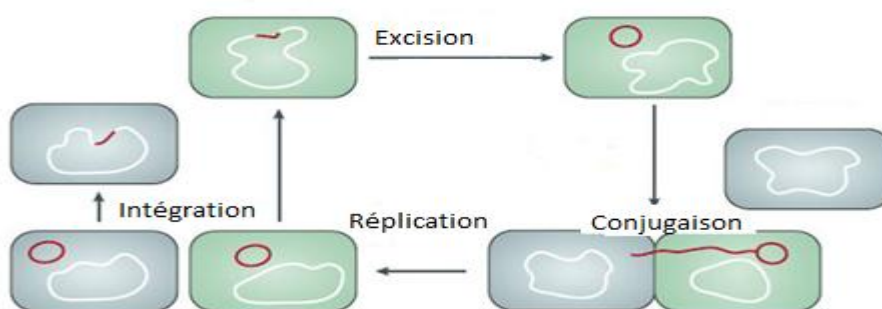


Figure 2 : Cycle de transfert d'un ICE d'après Wozniak & Waldor (2010). En rouge l'ICE, en blanc l'ADN génomique, en vert la cellule donatrice et en gris-bleu la cellule réceptrice.

Les ICE sont organisés en 4 modules qui regroupent chacun les gènes codant pour une même fonction : un module d'intégration/excision aussi appelé module de recombinaison, un module de conjugaison, un module de régulation et un module d'adaptation (Burrus *et al.*, 2002a). Par exemple, les éléments ICESt1 et ICESt3 découverts chez *S. thermophilus* ont respectivement une taille de 35 kb

et 28 kb (figure 3). Ils sont très proches phylogénétiquement et partagent une région core (« core region ») composée des modules de régulation, de conjugaison et de recombinaison (Burrus *et al.*, 2000; Pavlovic *et al.*, 2004). Ils comportent également un module d'adaptation (« variable region») qui est spécifique de chaque élément. De plus, leur organisation peut varier en fonction des ICE.

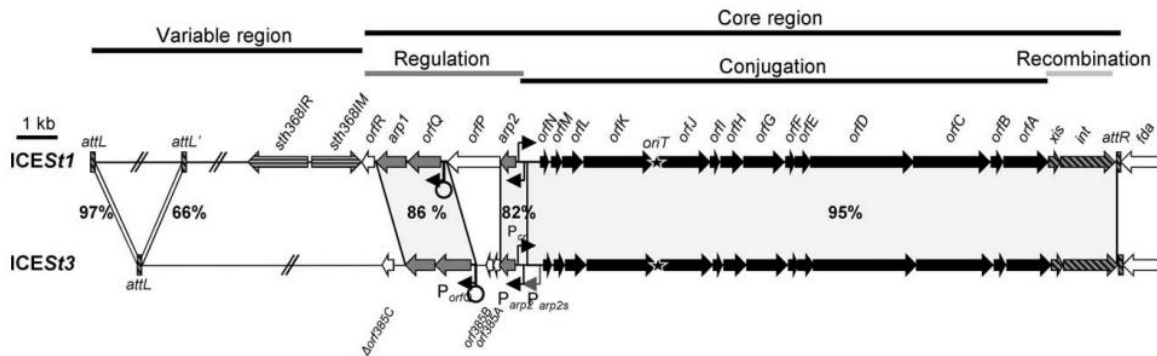


Figure 3 : Comparaison d'ICESt1 et ICESt3 de *S. thermophilus* d'après Carraro & Burrus (2014). Les différentes ORF sont représentées par des flèches avec un code couleur : en noir, les ORF impliquées dans la conjugaison, en gris dans la régulation, avec des stries diagonales dans la recombinaison, avec des stries horizontales dans un système de restriction – modification et en blanc, les ORF de fonction inconnue ou n'appartenant pas à l'élément (site d'insertion *fd*). Les zones grisées mettent en évidence les séquences homologues avec leurs pourcentages d'identité. Les promoteurs et les terminateurs sont désignés respectivement par des flèches coudées noires et des cercles blancs. Les étoiles signalent les origines de transfert (*oriT*). Les modules sont indiqués par des lignes grises plus ou moins foncées et leur nom.

Dans le cas de l'ICE Tn916 qui a été décrit pour la première fois chez *Enterococcus faecalis* (Franke & Clewell, 1981), les différents modules sont bien présents (figure 4). Cependant, le module d'adaptation qui porte le gène *tet(M)* codant une résistance à la tétracycline est inséré dans le module de régulation (Roberts & Mullany, 2009).

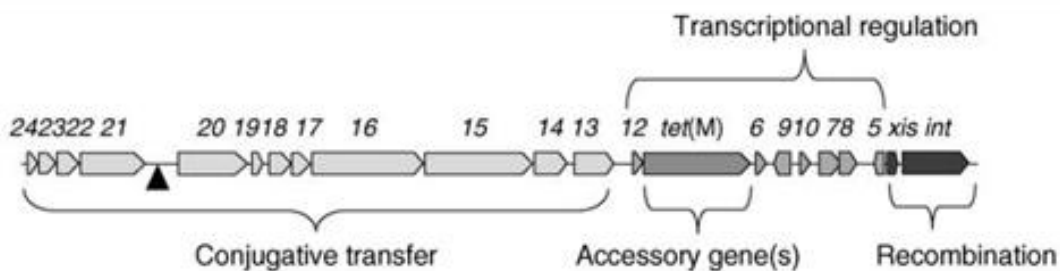


Figure 4 : Région core de Tn916 avec ses quatre modules d'après Roberts & Mullany (2009). Le triangle noir indique la position de l'origine de transfert. Le module d'adaptation (« accessory genes ») est flanqué de gènes impliqués dans la régulation transcriptionnelle de l'élément. Le module de recombinaison contient les gènes *xis* et *int* qui codent respectivement pour l'excisionase et l'intégrase.

L'abondance et la diversité des ICE chez les streptocoques ont été principalement étudiées chez les streptocoques pathogènes car la majorité de ces éléments portent des gènes de résistance aux antibiotiques. L'étude d'Haenni *et al.* (2010) a ainsi montré que 30 à 50 % des souches de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* et *S. agalactiae* résistantes à la

tétracycline portent un élément Tn916. Cette étude montre donc que les ICE sont d'importants vecteurs de gènes de résistance aux antibiotiques chez les streptocoques.

Jusqu'alors, la nomenclature des ICE présents dans les différents genres bactériens était basée sur la séquence de leur module d'intégration/excision (Ghinet *et al.*, 2011), mais une nouvelle classification est aujourd'hui proposée par le laboratoire DynAMic. En effet, l'étude de 124 génomes de streptocoques a permis d'identifier 105 ICE putatifs (Ambroset *et al.*, 2016). Ils ont été classés en 3 super familles en fonction de la séquence de leur module de conjugaison: la super famille Tn916, la super famille Tn5252 et la super famille TnGBS1. Dans chacune de ces superfamilles, se distinguent des familles. Il en existe 7 : les familles Tn916 et ICESt3 dans la super famille Tn916, les familles TnVanG, Tn5252, Tn1549 et TnGBS2 dans la super famille Tn5252 et enfin la famille TnGBS1 dans la super famille TnGBS1.

En particulier, la super famille Tn916 comporte la famille ICESt3 dans laquelle sont classés les éléments ICESt1 et ICESt3 décrits précédemment. Elle comporte également la famille Tn916 dans laquelle est classé l'élément Tn916 décrit précédemment mais aussi d'autres ICE aujourd'hui décrits chez un grand nombre de streptocoques comme *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus australis*, *Streptococcus infantis*, *S. pneumoniae*, *Streptococcus sanguinis* ou encore, *Streptococcus mitis* (Ciric *et al.*, 2012; Roberts & Mullany, 2009). Des ICE de cette famille ont également été décrits chez d'autres espèces bactériennes comme *Clostridium difficile* ou *S. aureus* (Roberts & Mullany, 2011).

b. Le module d'intégration/excision des ICE chez les streptocoques

Le module d'intégration/excision code les fonctions nécessaires à l'intégration et à l'excision de l'élément du génome bactérien. Lorsque les ICE sont intégrés dans le génome bactérien, ils sont bordés par des sites *attL* et *attR* (figure 5). Lors de l'excision de l'élément (figure 5), il y a une recombinaison site-spécifique entre ces deux sites pour former un site *attI* sur la forme circulaire de l'élément et un site *attB* sur le chromosome bactérien (Bellanger *et al.*, 2014; Mullany *et al.*, 2002). Lors de l'intégration de cette forme circulaire dans le génome bactérien (figure 5), il y a une recombinaison site-spécifique entre le site *attI* de la forme circulaire et le site d'intégration *attB* du chromosome. Elle permet de générer les sites *attL* et *attR* qui bordent l'élément intégré.

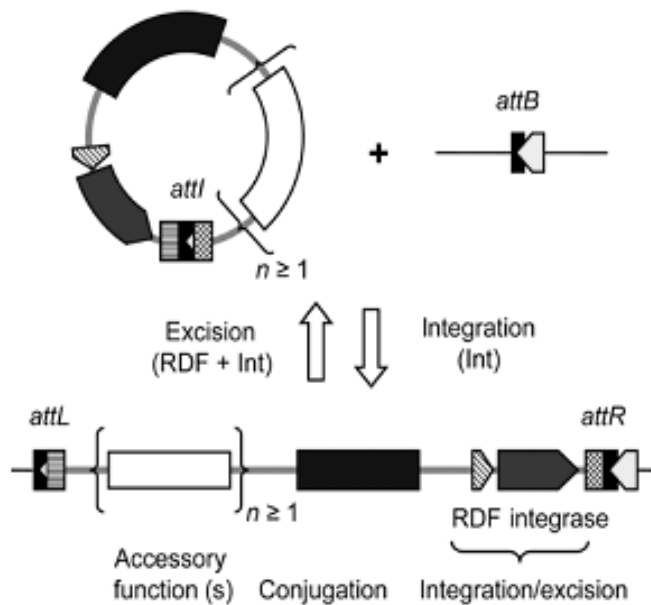


Figure 5 : Organisation modulaire d'un ICE sous forme excisée et intégrée d'après Bellanger *et al.* (2014). L'élément intégré dans le génome bactérien est borné par les sites *attL* à gauche et *attR* à droite. Le module d'intégration/excision est représenté en rouge tandis que celui de conjugaison est représenté en bleu. *attB* correspond au site d'intégration de l'élément dans le génome bactérien tandis qu'*attI* est le site présent sur la forme circulaire de l'élément. RDF et Int correspondent respectivement au facteur de recombinaison directionnelle et à l'intégrase. Enfin, $n \geq 1$ indique qu'il y a au moins un gène dans le module d'adaptation.

Le module d'intégration/excision code une intégrase, une enzyme catalysant la réaction de crossing-over conduisant à l'excision ou à l'intégration de l'élément (Wozniak & Waldor, 2010). Trois classes non apparentées d'intégrases sont décrites chez les ICE de streptocoques : les intégrases à tyrosine, les intégrases à sérine et les transposases à DDE. Les intégrases à tyrosine et à sérine catalysent une recombinaison site-spécifique ; site-spécifique indique que le gène ciblé pour l'intégration est toujours le même (figure 5) (Wozniak & Waldor, 2010). De nombreux ICE et IME de streptocoques portent une intégrase à tyrosine. Une analyse menée au laboratoire sur 105 ICE de streptocoques confirme l'existence des 3 familles d'intégrases (Ambroset *et al.*, 2016). Elle indique que les intégrases à tyrosine sont majoritaires (66 détectées). Par exemple, les ICE de la famille ICESt3, ICESt1 et ICESt3 de *S. thermophilus*, codent une intégrase à tyrosine de type ϕ LC3 catalysant une intégration site-spécifique à l'extrémité 3' du gène *fdA* (fructose-1,6-biphosphate aldolase) (Bellanger *et al.*, 2007). ICE_515_ *tRNA*^{Lys} fait également partie de cette famille d'ICE mais son intégrase à tyrosine n'est pas apparentée à la précédente et elle catalyse son intégration à l'extrémité 3' d'un gène *tRNA*^{Lys} chez *S. agalactiae* (Chuzeville *et al.*, 2012).

Les ICE de la famille Tn916 codent majoritairement une intégrase à tyrosine apparentée à celle du phage λ (Rajeev *et al.*, 2009). Contrairement aux autres intégrases à tyrosine décrites, elle n'est pas site-spécifique. Elle catalyse préférentiellement l'intégration de l'élément dans des séquences riches en A/T (Roberts & Mullany, 2009). Ainsi, l'intégrase de Tn916 peut catalyser son intégration dans des

sites différents chez des hôtes différents (Roberts & Mullany, 2009). De même, il est possible de retrouver, chez un même hôte, plusieurs ICE dérivés de Tn916 codant la même intégrase et intégrés dans différents sites (Chancey *et al.*, 2015; Ciric *et al.*, 2012).

La majorité des ICE codant une intégrase à tyrosine codent également une excisionase Xis (figures 3 et 4), aussi appelée RDF (Recombinase Directional Factor ; figure 5), dont le rôle est de favoriser l'excision. En effet, l'intégrase à tyrosine est une enzyme qui catalyse l'intégration de l'ICE mais quand elle est associée à l'excisionase, la réaction s'inverse pour permettre l'excision de l'ICE (Groth & Calos, 2004).

Les intégrases à sérine, sont capables de catalyser l'intégration des ICE mais aussi leur excision en absence d'excisionase (Wang *et al.*, 2006). Ces intégrases sont relativement fréquentes comme le montre Ambroset *et al.*, en 2016 puisque sur les 105 ICE de streptocoques, 32 portent des intégrases à sérine. De plus, il peut y avoir trois intégrases à sérine codées par le même module d'intégration/excision, c'est-à-dire au sein du même ICE. Elles sont site-spécifiques puisque tous les ICESe2 détectés chez *Streptococcus equi* sont intégrés dans la même région intergénique (Heather *et al.*, 2008). En revanche, l'ICE2096-RD.2 qui code une intégrase à sérine non apparentée à la précédente est intégré à l'extrémité 3' du gène *rumA* (ARNr uracile méthyltransférase) de *Streptococcus pyogenes* (Beres & Musser, 2007).

Certains ICE de streptocoques codent une transposase à DDE apparentée à celles présentes dans les séquences d'insertion (IS). Les transposases à DDE sont minoritaires (23 détectées sur 105 ICE) et sont retrouvées presque exclusivement chez les ICE des familles TnGBS1 et TnGBS2 (Ambroset *et al.*, 2016). Une transposase à DDE reconnaît les séquences répétées inversées (IR) bordant l'élément et catalyse son excision. Elle catalyse aussi son insertion qui provoque la duplication du site d'intégration pour créer les séquences répétées directes (DR) bordant l'élément (Brochet *et al.*, 2009; Guérillot *et al.*, 2013). L'analyse des sites d'intégration de TnGBS2 chez *S. agalactiae* a mis en évidence son insertion site-préférentielle dans les régions intergéniques (Brochet *et al.*, 2009).

c. Le module de conjugaison des ICE chez les streptocoques

Le module de conjugaison code les fonctions nécessaires au transfert conjugatif de l'ICE et à la mise en place du pore de conjugaison. Il contient une origine de transfert *oriT* et il code une relaxase (MOB), toutes les protéines du pore de conjugaison, aussi appelé système MPF (pour Mating Pair Formation), et une protéine de couplage (CP) (de la Cruz *et al.*, 2010). Jusqu'à maintenant, l'analyse des ICE de différents genres bactériens montre l'existence de 8 familles de MOB et 6 familles de MPF. Elles peuvent être associées en diverses combinaisons (Guglielmini *et al.*, 2011; Smillie *et al.*, 2010).

i. Le transfert conjugatif

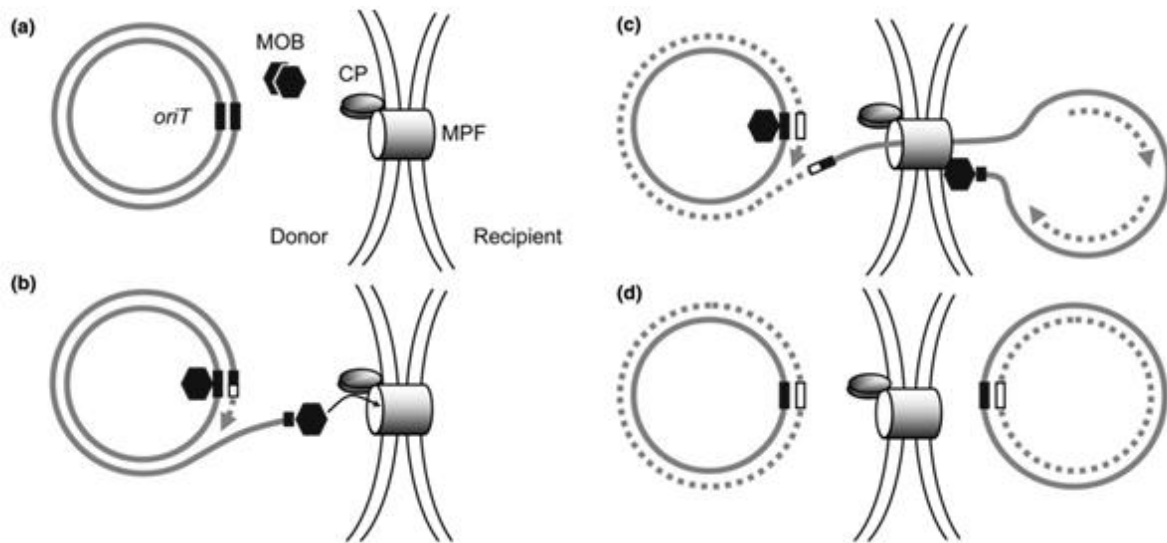


Figure 6 : Mécanisme de transfert via un pore de conjugaison de type T4SS d'après Bellanger *et al.* (2014) avec CP pour la protéine de couplage, MPF pour le pore de conjugaison, *oriT* pour l'origine de transfert et MOB pour la relaxase.

Le mécanisme de transfert des ICE peut se décomposer en quatre étapes schématisées sur la figure 6. Il peut être assimilé à une répllication intercellulaire (Bellanger *et al.*, 2014). L'élément sous forme excisé et circulaire (figure 6a) est pris en charge par une relaxase. Celle-ci initie le transfert en coupant un brin d'ADN de l'élément au niveau du site *nic* de l'origine de transfert *oriT* (figure 6b). Un monomère de relaxase reste lié à l'extrémité 5' de l'ADN simple brin généré pour former le relaxosome (figure 6b). Celui-ci est reconnu par la protéine de couplage puis transporté à travers le pore de conjugaison vers la cellule réceptrice (figure 6c). Dans le même temps, l'élément est répliqué par cercle roulant dans la cellule donatrice et par un mécanisme encore inconnu dans la cellule réceptrice (figure 6c). Enfin, les deux éléments sont recircularisés par un monomère de relaxase (figure 6d).

ii. Mise en place du pore de conjugaison

Le pore de conjugaison des ICE est apparenté aux systèmes de sécrétion de type IV (T4SS) (Ambroset *et al.*, 2016; Guglielmini *et al.*, 2014). Ces systèmes permettent le transport d'ADN et de protéines à travers les enveloppes cellulaires bactériennes que ce soit chez les bactéries Gram + et Gram -.

- Mise en place du système de sécrétion de type IV du plasmide conjugatif pKM101 d'*Escherichia coli*

Chez les bactéries Gram⁻, les T4SS conjugatifs ont une structure commune qui a été principalement décrite chez les plasmides conjugatif pKM101 d'*E. coli* (Ilangoan *et al.*, 2015). Ils sont composés de deux parties (figure 7):

- le complexe central (« Core Complex ») qui comprend les protéines VirB7, 9 et 10. Il est majoritairement placé dans le périplaste et il s'insère dans les membranes externe et interne.
- le complexe de la membrane interne (IMC pour « Inner Membrane Complex ») qui est composé des protéines VirB3, 4, 6 et 8.

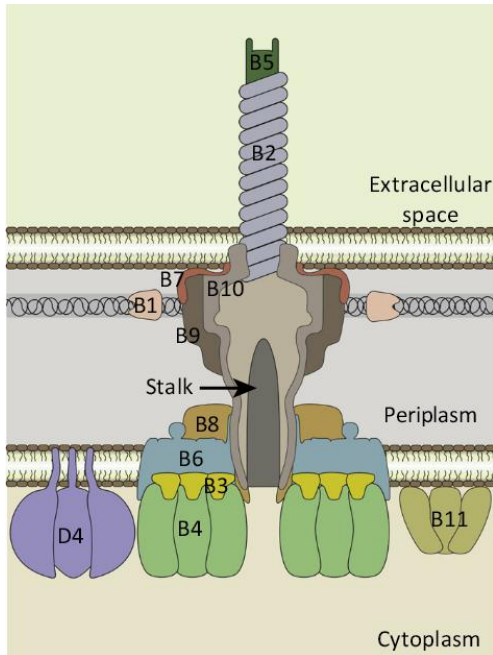


Figure 7 : Structure du T4SS du plasmide conjugatif pKM101 d'*E. coli* d'après Ilangovan *et al.* (2015). La localisation précise de VirD4 et VirB11 ainsi que la composition de la tige (stalk) et du début du pilus (zone gris clair sans dénomination) ne sont pas encore déterminés.

La tige (« stalk » sur la figure 7), dont la composition est encore inconnue, est insérée dans la membrane interne et permet de lier le complexe central au complexe de la membrane interne.

Les protéines constituant les T4SS conjugatifs sont divisées en trois classes en fonction de leur rôle (Ilangovan *et al.*, 2015) :

- les protéines du pilus VirB2 et VirB5 qui constituent les structures tubulaires extracellulaires (figure 7). Celles-ci permettent de rapprocher les cellules donatrice et réceptrice et de transférer l'ADN vers la cellule réceptrice. VirB1 est impliquée dans la biogénèse du pilus et serait responsable de la stabilité du pilus en servant de base de développement.
- les protéines de translocation VirB3, 6, 7, 8, 9 et 10 qui correspondent à la structure majeure du système (figure 7). VirB3 et VirB6 seraient impliquées dans la stabilité du système. VirB7 agirait comme un pilote qui permet l'insertion dans la membrane externe du T4SS assemblé. Les rôles de VirB8 et VirB9 sont encore inconnus. VirB10 interagit avec les membranes interne et externe afin de former un pore dans la

membrane externe. Cette protéine interagit également avec les ATPases au niveau de la membrane interne. Elle aurait donc un rôle de transmission du signal et/ou de transfert d'énergie.

- Les 3 ATPases VirB4, VirD4 et VirB11 qui apportent de l'énergie au système. La séquence de la protéine VirB4 est très conservée entre les bactéries Gram + et Gram. Cette protéine de la membrane interne interagit avec les protéines VirB3, 6 et 8 de l'IMC. Les ATPases VirD4 et VirB11 sont liées à la membrane interne mais ne font pas partie de l'IMC. VirD4 est une protéine de couplage qui a pour rôle de recruter le relaxosome et de le délivrer au T4SS. VirB11 permet le passage entre les deux modes de fonctionnement du T4SS, la biosynthèse du pilus et le transfert du relaxosome (Ilangovan *et al.*, 2015).

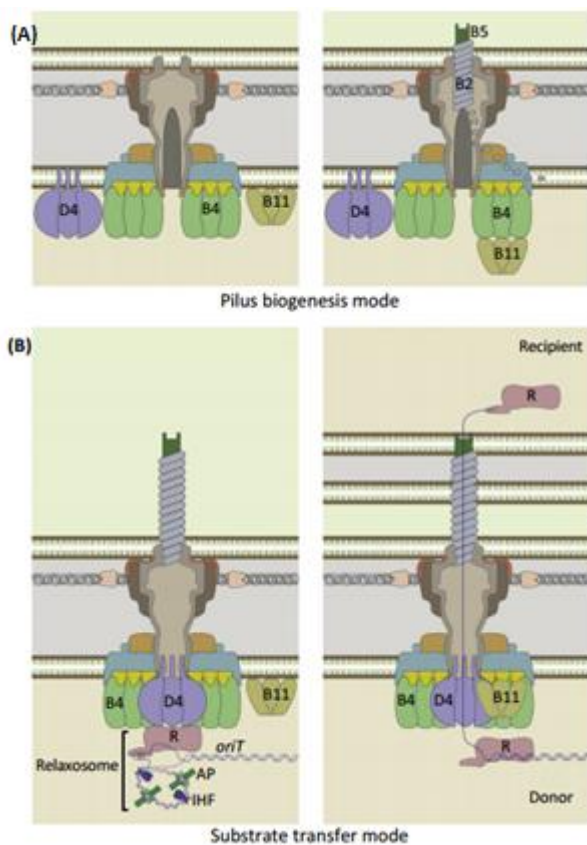


Figure 8 : Les deux modes d'action du T4SS des bactéries Gram - d'après Ilangovan *et al.* (2015). Lors de la biosynthèse du pilus (A), VirB11 interagit avec VirB4 afin d'activer la croissance du pilus à partir de la tige. Lors du transfert du relaxosome (B), VirB11 interagit avec la protéine de couplage VirD4. Le relaxosome (R pour relaxase, AP pour protéine accessoire, *oriT* pour origine de transfert et IHF pour facteur d'intégration de l'hôte) est alors recruté par le T4SS via VirD4 et l'ADN est transféré vers la cellule réceptrice avec la relaxase.

Lors de la biosynthèse du pilus (figure 8A), le complexe T4SS a une structure similaire à l'IMC avec VirB11 liée à VirB4. Cette liaison induirait le recrutement et l'assemblage des protéines VirB2 pour former le pilus. Lors du transfert du relaxosome (figure 8B), VirD4 serait recrutée au niveau de l'IMC.

VirB11 pourrait alors s'y fixer et permettre l'activation du transfert. Ce serait donc la liaison de VirB11 à VirD4 ou à VirB4 qui activerait l'un ou l'autre des modes (Ilangoan *et al.*, 2015).

- Mise en place du système de sécrétion de type IV du plasmide conjugatif pIP501 de *Streptococcus agalactiae*

La mise en place du pore de conjugaison est moins bien connue chez les bactéries Gram +. Cependant, le rôle de certaines protéines a été défini par homologie de leurs séquences avec celles de protéines du T4SS de bactéries Gram -.

Des protéines homologues aux protéines VirB7, 9 et 10 qui forment le canal à travers la membrane externe chez les bactéries Gram - ne sont jamais détectées chez les éléments codés par les bactéries Gram + ce qui est cohérent avec le fait qu'elles ne possèdent pas de membrane externe (Bhatty *et al.*, 2013). En revanche, des protéines homologues aux protéines VirD4, VirB1, 3, 6 et 8 ont été identifiées (Bhatty *et al.*, 2013). En particulier, elles sont codées par le plasmide conjugatif pIP501 de *S. agalactiae* (Goessweiner-Mohr *et al.*, 2013; Horodniceanu *et al.*, 1979) dont le pore de conjugaison putatif est présenté dans la figure 11 et qui est le plasmide conjugatif dont le T4SS est le mieux décrit à ce jour.

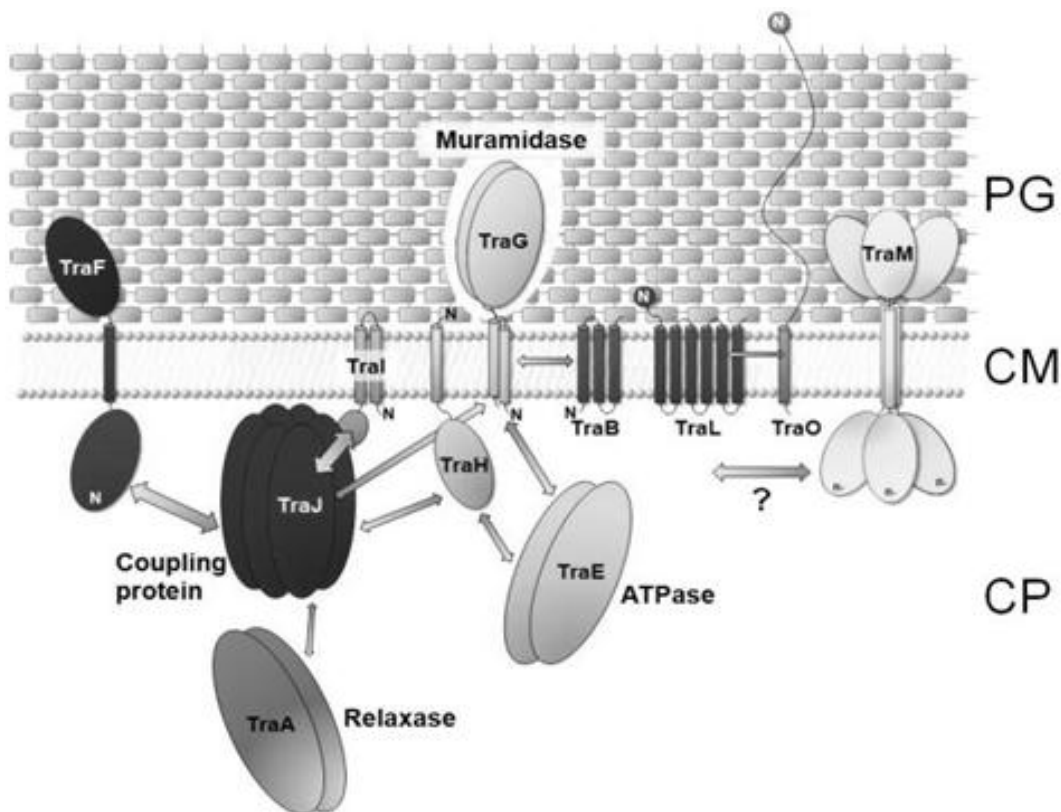


Figure 9 : Modèle de localisation et d'interaction des protéines codées par le T4SS de pIP501 de *S. agalactiae* d'après Goessweiner-Mohr *et al.* (2013). N pour extrémité N-terminale, PG pour peptidoglycane, CM pour membrane cytoplasmique et CP pour cytoplasme. TraM a une flèche avec un point d'interrogation puisqu'aucune interaction protéine-protéine n'a été détectée.

Ainsi la protéine TraG est un homologue de VirB1, mais elle présente une hydrolase transmembranaire en N-terminal qui lui permet d'hydrolyser le peptidoglycane de la paroi afin d'y former un canal. Elle s'associe à TraM (homologue de VirB8) pour former le corps du pore au travers du peptidoglycane (E. Grohmann, com. pers.). TraG est aussi ancrée dans la membrane cytoplasmique où elle interagit avec TraL (homologue de VirB6) afin d'y former un canal. L'interaction entre TraG et TraE (homologue de VirB4, ATPase) permet de fournir de l'énergie au système. D'autre part, l'interaction de TraG avec le couple putatif TraJ/TraI (TraJ homologue de VirD4) conduit au couplage du relaxosome (via la relaxase TraA) avec le pore de conjugaison. Enfin, TraL (homologue de VirB6) interagit avec TraO qui intervient dans l'adhésion entre la cellule donatrice et la cellule réceptrice (Bhatty *et al.*, 2013; Goessweiner-Mohr *et al.*, 2014). Le rôle des protéines TraB, TraF et TraH n'a pas encore été défini. De même, une protéine homologue à VirB3 existe chez les bactéries Gram +, mais son rôle n'a pas encore été décrit chez pIP501.

Le modèle présenté dans la figure 11 est fondé sur l'étude des protéines du pore de conjugaison du plasmide pIP501 mais d'autres éléments conjugatifs codent la plupart de ces protéines comme les plasmides conjugatifs pCF10 d'*E. faecalis* et pCW3 chez *Clostridium perfringens* ainsi que les ICE Tn916 d'*E. faecalis* et ICEBs1 de *Bacillus subtilis* (Bhatty *et al.*, 2013; Goessweiner-Mohr *et al.*, 2013). Ainsi, Tn916 code 6 protéines homologues à celles du T4SS de la bactérie Gram – *Agrobacterium tumefaciens*, les protéines VirD4 T4CP, VirB1, VirB3, VirB4, VirB6 et VirB8 (Bhatty *et al.*, 2013). Cet élément coderait un T4SS dont le fonctionnement serait similaire à celui des bactéries Gram – au niveau de la membrane interne.

➤ Contacts cellulaires nécessaires à l'établissement du pore de conjugaison chez les bactéries Gram +

La conjugaison implique un contact étroit entre les cellules donatrice et réceptrice qui fait intervenir le pilus chez les bactéries Gram-. Chez les bactéries Gram+ qui n'ont pas de pilus, ce contact implique les adhésines qui sont des protéines de surface impliquées dans l'adhésion cellulaire (Bhatty *et al.*, 2013). Par exemple, le plasmide pIP501 code la protéine de surface TraO qui possède un motif LPxTG en partie C-terminale permettant son ancrage à la paroi, sa partie N-terminale restant exposée à la surface de la cellule (Goessweiner-Mohr *et al.*, 2013). Cette protéine est considérée comme une adhésine, car elle possède des domaines similaires à ceux d'autres protéines de surface impliquées dans l'adhésion à l'immunoglobuline A de *S. agalactiae* ou dans la liaison à la fibronectine chez les streptocoques (Bhatty *et al.*, 2013; Krishnan & Narayana, 2011).

Le plasmide conjugatif pCF10 code également une adhésine, nommée PrgB (Hirt *et al.*, 2005; Olmsted *et al.*, 1991). Cette protéine possède un motif d'ancrage à la paroi bactérienne (LPxTG) et un domaine d'adhésion aux glucanes similaire à celui de la protéine GbpC impliquées dans l'adhésion

des streptocoques aux glucanes () (Bhatty *et al.*, 2013; Waters & Dunny, 2001; Waters *et al.*, 2003). Cependant la mutation du gène codant cette protéine n'empêche pas le transfert, indiquant que d'autres protéines de surface ou le pore lui-même seraient impliqués dans l'adhésion cellulaire (Bhatty *et al.*, 2013).

Certains ICE codent également des protéines de surface comme les protéines SAL_2036 et SAL_2056 de l'ICE_515_ *tRNA^{lys}* de *S. agalactiae*, mais leur rôle dans l'adhésion n'a pas été démontré (Thèse S. Chuzeville, 2012).

iii. Diversité des modules de conjugaison

La nouvelle classification des ICE en superfamilles et familles proposée par le laboratoire DynAMic s'appuie sur la séquence de 3 « protéines étiquettes » du module de conjugaison : la protéine de couplage, la relaxase et la protéine VirB4 (Ambroset *et al.*, 2016).

L'analyse de la séquence d'ICESt1 indique que son module de conjugaison est composé de 14 ORF, notées d'*orfA* à *orfN* (figure 10) (Burrus *et al.*, 2002b). Il est quasiment identique à celui d'ICESt3 (figure 3). Il a été montré qu'OrfJ contient un domaine Rep_trans (PF02486) qui est caractéristique des relaxases de la famille MOB_T. De même, OrfK contient un domaine catalytique FtsK_SpoIIIE (PF01580) qui est caractéristique des protéines de couplage appartenant à la classe CP-I aussi nommée TcpA. Enfin, OrfD contient un domaine « AAA-10 » (PF12846) qui est caractéristique des protéines VirB4 (Ambroset *et al.*, 2016).

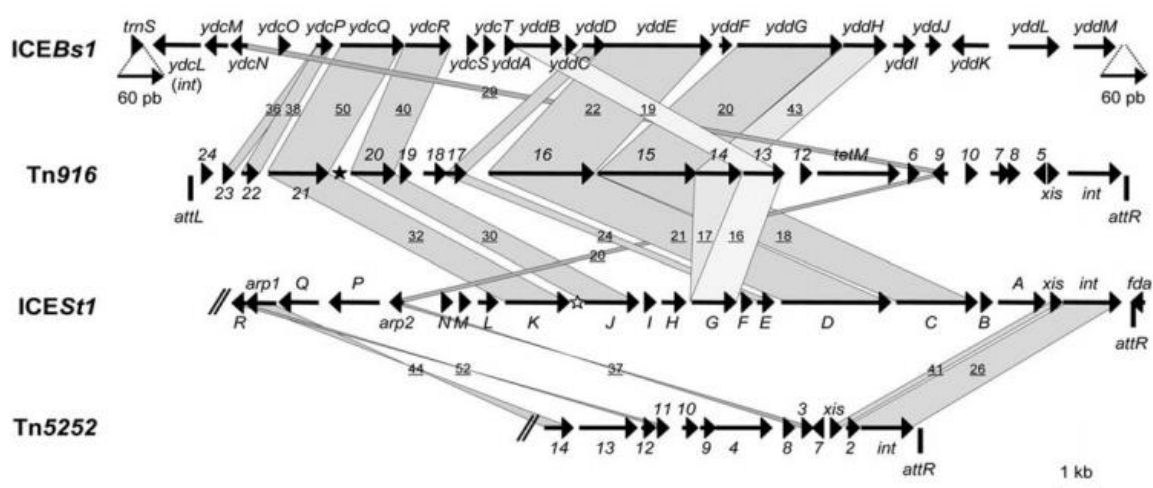


Figure 10 : Comparaison de l'organisation des éléments ICEBs1, Tn916, ICESt1 et Tn5252 d'après Burrus *et al.* (2002b). Les flèches indiquent le sens de transcription des ORF. Les noms des différentes ORF ont été abrégés par leur lettre ou chiffre. Les zones grisées indiquent des similarités significatives entre les produits des différentes ORF. Les nombres soulignés correspondent aux pourcentages d'identité des protéines codées. Les origines de transfert de Tn916 et ICESt1 ont été signalées respectivement par une étoile noire et blanche. Bien que les pourcentages d'identité des intégrases d'ICESt1, de Tn916 et YddL d'ICEBs1 n'aient pas été indiqués, ils sont suffisamment éloignés pour qu'elles appartiennent à trois familles distinctes d'intégrase à tyrosine.

Le module de conjugaison d'ICESt1 présente une organisation comparable à celle des modules de conjugaison des éléments ICEBs1 et Tn916 (figure 10). De plus, ces 3 modules codent des protéines apparentées dont la relaxase (OrfJ, YdcR et Orf20), la protéine de couplage (OrfK, YdcQ et Orf21) et la protéine VirB4 (OrfD, YddE et Orf16), ce qui a permis de classer ces éléments dans la superfamille Tn916 (Ambroset *et al.*, 2016). Tn916 et ICESt1 ont été respectivement classés dans les familles Tn916 et ICESt3 puisque leurs protéines étiquettes VirB4 (respectivement Orf16 et OrfD) présentent moins de 25% d'homologie. En revanche, ces 3 modules de conjugaison sont complètement différents de celui de l'élément Tn5252 (figure 10) qui a été classé dans la famille Tn5252 de la superfamille Tn5252 (Ambroset *et al.*, 2016).

Le rôle de toutes les protéines codées par le module de conjugaison d'ICESt1 et ICESt3 n'a pas été étudié mais elles sont homologues à des protéines composant le pore de conjugaison de plasmides de bactéries Gram+. Ainsi, l'analyse des domaines catalytiques des protéines OrfD et OrfG a permis de conclure qu'elles sont respectivement homologues à TraE et TraM (Burrus *et al.*, 2002b; Pavlovic *et al.*, 2004). Par ailleurs, il a été montré qu'ICESt1 était capable de se transférer vers une autre souche de *S. thermophilus*, mais à très basse fréquence, un seul transconjugant ayant été obtenu (Bellanger *et al.*, 2009). ICESt3 est également capable de se transférer vers une autre souche de *S. thermophilus* mais à une fréquence de $3,6 \cdot 10^{-7}$ transconjugants par cellule réceptrice. Cet élément peut aussi se transférer vers d'autres espèces de bactéries Gram+ comme *S. pyogenes* ou *E. faecalis* (Bellanger *et al.*, 2009). Ces données indiquent que le module de conjugaison de cet élément est complet et fonctionnel.

d. Le module de régulation des ICE chez les streptocoques

Le transfert des ICE est régulé par un ensemble de gènes regroupés au sein du module de régulation. Il existe une grande diversité de ces gènes au niveau de leur séquence nucléotidique et de leur nombre. Deux exemples de régulation d'ICE bien décrits chez les streptocoques sont présentés ci-dessous.

i. Régulation environnementale chez Tn916

Le module de régulation de Tn916 est constitué de 6 ORF (*orf 6, 7, 8, 9, 10 et 12*), de 4 promoteurs (P_{tet} , P_{orf9} , P_{orf7} et P_{xis}) et de 4 terminateurs (pal_{orf12} , pal_{orf6} , pal_{orf10} et pal_{orf8}) qui sont présentés dans la figure 13. Les *orf 7, 8 et 9* codent des régulateurs transcriptionnels. L'expression des gènes de ce module, mais aussi des modules d'intégration/excision et de conjugaison de l'ICE sont régulés par l'environnement de la bactérie hôte, en particulier par la présence ou l'absence de tétracycline (Celli & Trieu-Cuot, 1998).

En absence de tétracycline, le promoteur P_{orf9} induit un fort taux de transcription d'*orf9*. Le régulateur transcriptionnel Orf9 réprime alors la transcription d'*orf7* et *orf8*, mais aussi des gènes *xis* et *int* qui codent respectivement l'excisionase et l'intégrase (figure 13). La fréquence d'excision de l'élément est donc faible (Celli & Trieu-Cuot, 1998).

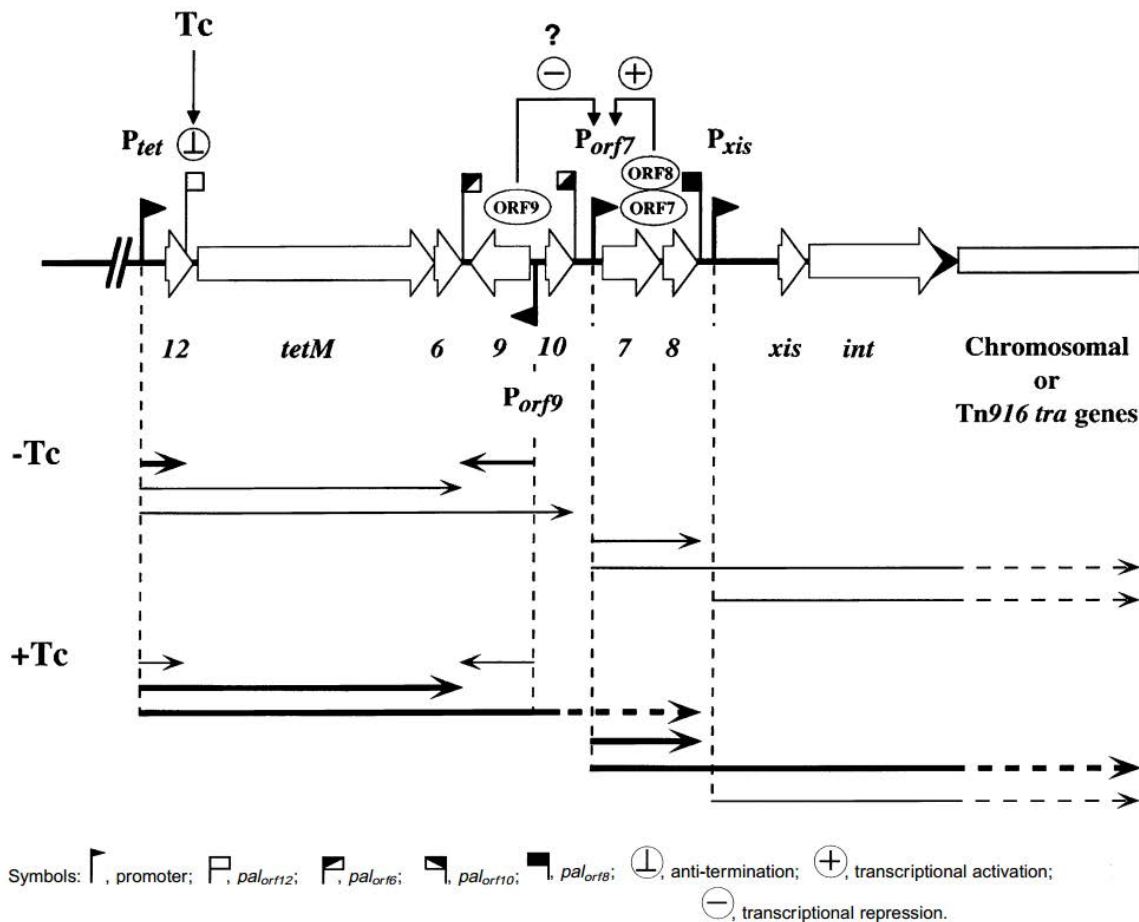


Figure 11 : Régulation de l'expression des gènes des modules d'intégration/excision et de conjugaison de Tn916 d'après Celli & Trieu-Cuot (1998). Tc pour tétracycline. Les flèches symbolisent la transcription des différents gènes. Plus la flèche est épaisse, plus le taux de transcription est élevé.

En revanche, en présence de tétracycline, la transcription du gène *tetM* de résistance à la tétracycline est activée alors que la transcription d'*orf9* est réprimée. Le promoteur P_{orf7} n'est donc pas réprimé et les gènes *orf7* et *orf8* sont fortement transcrits, de même que les gènes *xis* et *int* (figure 11) (Celli & Trieu-Cuot, 1998). De plus, les régulateurs Orf7 et Orf8 activent leur propre transcription. La fréquence d'excision de l'élément est alors augmentée. Quand l'élément est sous forme circulaire, le module de conjugaison est positionné en 3' du gène codant l'intégrase, ce qui active sa transcription (figure 11). La fréquence de transfert de Tn916 est alors multipliée par 10 en présence de tétracycline (Celli & Trieu-Cuot, 1998).

ii. Régulation du transfert conjugatif d'ICESt1 et ICESt3 : un système homologue à celui des ICE SXT et ICEBs1

Pour les éléments ICESt1 et ICESt3, il a été montré que l'expression des gènes du module d'intégration/excision était plus importante en phase stationnaire qu'en phase exponentielle de croissance (Carraro *et al.*, 2011). De plus, la fréquence d'excision d'ICESt3 en phase exponentielle de croissance est 7 fois plus importante que celle d'ICESt1 (Carraro *et al.*, 2011). L'excision d'ICESt1 et d'ICESt3 est également augmentée en présence de mitomycine C (MMC), un agent endommageant l'ADN, avec un impact 10 fois plus important pour ICESt1 que pour ICESt3 (Bellanger *et al.*, 2007; Carraro *et al.*, 2011).

Les modules de régulation d'ICESt1 et ICESt3 présentent une organisation similaire avec 3 gènes communs (*arp1*, *arp2* et *orfQ*) qui montrent plus de 80% d'identité (figure 3). Ils présentent également des gènes spécifiques, *orfP* et *orfR* pour ICESt1 et *orf385A*, *orf385B* et Δ *orf385C* pour ICESt3 (figure 3) (Carraro *et al.*, 2011).

Le gène *arp1* code une protéine homologue à SetR qui est le régulateur de l'ICE SXT de la bactérie Gram - *Vibrio cholerae* (Carraro *et al.*, 2011). En effet, SetR est homologue aux régulateurs de type ci (Beaber *et al.*, 2004).

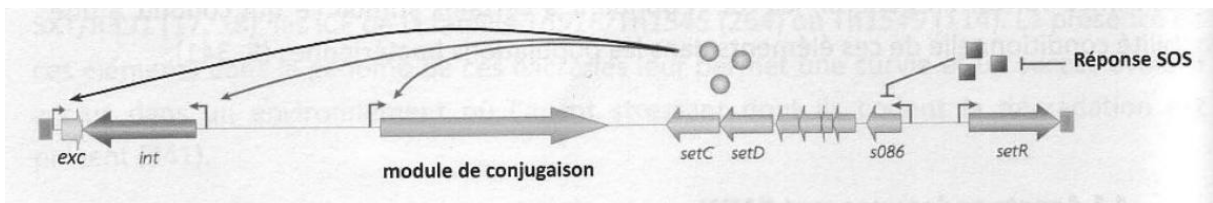


Figure 12 : Régulation de l'ICE SXT de *V. cholerae* d'après Wozniak & Waldor (2010). Int correspond au gène codant l'intégrase et exc à l'excisionase. Les flèches représentent des inductions tandis que les barres perpendiculaires indiquent une répression.

La figure 12 montre qu'en réponse à un stress comme des dommages à l'ADN via la MMC ou des irradiations aux UV, une réponse SOS se met en place chez *V. cholerae*. RecA active alors l'activité auto-protéolytique de SetR. Celui-ci ne peut donc plus réprimer la transcription des gènes codant SetC et SetD. Ces activateurs transcriptionnels induisent alors l'expression des gènes codant l'intégrase et l'excisionase mais également des gènes du module de conjugaison (Burrus & Waldor, 2003; Wozniak & Waldor, 2010).

Les gènes *arp2* et *orfQ* codent des protéines qui sont respectivement homologues à ImmR et ImmA du système de régulation d'ICEBs1 de la bactérie Gram+ *B. subtilis* (Carraro *et al.*, 2011). Le fonctionnement de ce système est analogue au précédent. Lors de la réponse SOS, l'activité protéolytique d'ImmA est activée. Celle-ci clive le répresseur ImmR qui ne peut donc plus réprimer la

transcription du gène codant l'excisionnase, l'intégrase et des gènes du module de conjugaison (Bose *et al.*, 2008; Bose & Grossman, 2011).

Les gènes *arp1* et *arp2* d'une part et *orfQ* d'autre part appartiennent : (i) à deux opérons distincts séparés par un terminateur de transcription rho-dépendant dans le cas d'ICESt1 et (ii) à un seul opéron dans le cas d'ICESt3. Cette organisation différente entre les deux éléments pourrait avoir des conséquences sur l'expression des gènes *arp1*, *arp2* et *orfQ* et expliquer les taux d'excision différents de ces éléments (Carraro *et al.*, 2011). Par ailleurs, l'impact de la présence simultanée de ces deux régulateurs au sein d'un même élément n'a pas encore été démontré.

e. Le module d'adaptation des ICE chez les streptocoques

i. Diversité des modules d'adaptation

En plus des modules nécessaires à leur transfert par conjugaison, tous les ICE décrits à ce jour comportent un module d'adaptation. Ce module code des gènes de fonction inconnue mais aussi des gènes impliqués dans diverses fonctions pouvant conférer un avantage adaptatif à la souche hôte. Le nombre et la nature des gènes codés par ce module varient d'un élément à un autre (Bellanger *et al.*, 2014). Ainsi, ICESt1 et ICESt3 de *S. thermophilus* portent des modules d'adaptation de tailles différentes (19 et 12,4 kb respectivement) et de séquences différentes (figure 3) (Bellanger *et al.*, 2009; Pavlovic *et al.*, 2004). Par exemple, le module d'adaptation d'ICESt1 contient des gènes codant un système de restriction-modification qui permet une résistance aux bactériophages (Burrus *et al.*, 2001), ces gènes sont absents chez ICESt3.

Les gènes adaptatifs décrits chez les ICE peuvent être impliqués dans la résistance aux métaux lourds. Par exemple, l'ICESde3396 de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* code deux opérons de résistance au cadmium et un opéron de résistance à l'arsenic (Davies *et al.*, 2009).

D'autres éléments portent des gènes impliqués dans le métabolisme de la bactérie. Ainsi, l'élément Tn5276 porté par *Lactococcus lactis* code un système de phosphotransférase qui transporte le saccharose à travers la membrane plasmique. Cet élément confère également à *L. lactis* la capacité de produire une bactériocine, la nisine, et d'y être résistant (Rauch & De Vos, 1992).

Certains éléments portent des gènes impliqués dans la virulence des souches. Par exemple, l'ICESp23FST81 de *S. pneumoniae* (Croucher *et al.*, 2009) et l'ICESe2 de *Streptococcus equi* (Heather *et al.*, 2008) portent des gènes codant un sidérophore. Ce système d'acquisition du fer est décrit chez *E. coli* comme impliqué dans la virulence des souches pathogènes (Roche *et al.*, 2010; Schubert *et al.*, 2004).

ii. Modules codant des gènes de résistance aux antibiotiques

Chez les streptocoques, les modules d'adaptation les plus étudiés portent des gènes de résistance aux antibiotiques. C'est le cas de l'élément Tn916 qui porte le gène *tet(M)* conférant la résistance à la tétracycline par une modification de la conformation des ribosomes (Roberts, 2005). Des éléments dérivés de Tn916 portent *tet(M)* ainsi qu'un gène de résistance aux macrolides, *erm(B)* ou *mef(A/E)* (Chancey *et al.*, 2015). La figure 13 montre que les gènes *mef(E)* sont portés par l'élément MEGA (Macrolide Efflux Genetic Assembly (Gay & Stephens, 2001)) alors que les gènes *erm(B)* sont apportés par les éléments Tn917 ou « *erm(B)* element ». Par exemple, Tn3872 correspond à l'intégration de Tn917 dans l'*orf9* de Tn916 (Cochetti *et al.*, 2007), Tn2009 correspond à l'insertion de MEGA dans l'*orf6* de Tn916 (Roberts & Mullany, 2011) et Tn6002 correspond à l'insertion d'un « *erm(B)* element » dans l'*orf20* de Tn916 (Del Grosso *et al.*, 2004).

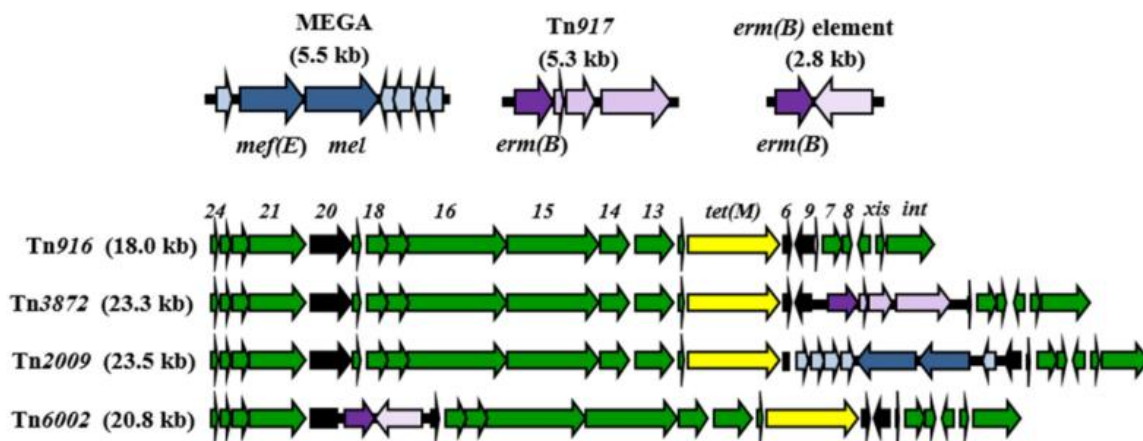


Figure 13 : Déterminants génétiques de résistance aux macrolides portés par les éléments génétiques mobiles de *S. pneumoniae* d'après Chancey *et al.* (2015). Comparaison de Tn916 et de ses dérivés porteurs de l'élément MEGA contenant le gène *mef(E)* (bleu) et des éléments Tn917 et *erm(B)* element contenant le gène *erm(B)* (violet). Les flèches noires désignent les ORF dans lesquelles ces éléments peuvent s'intégrer. Les flèches jaunes correspondent aux gènes *tet(M)* codant la résistance à la tétracycline.

Le gène *mef(A/E)* (Macrolide Efflux) induit une résistance de bas niveau à l'érythromycine (appelé phénotype M pour Macrolides) par le biais de pompes à efflux évacuant les macrolides de 14 et 15 carbones uniquement (Sutcliffe *et al.*, 1996). Le gène *erm(B)* (Erythromycine Ribosome Méthylation) qui est le plus retrouvé chez les streptocoques induit le phénotype MLS_B qui confère une résistance aux macrolides mais également aux lincosamides et aux streptogramines B (Leclercq, 2002). En effet, l'expression de ce gène provoque la modification du site cible de ces antibiotiques par une méthylation de l'ARNr 23S (Brenciani *et al.*, 2014; Leclercq, 2002; Malhotra-Kumar *et al.*, 2004). Le phénotype MLS_B peut être constitutif (cMLS_B) ou inductible (iMLS_B).

La résistance au chloramphénicol est également fréquemment codée par les ICE des streptocoques (Mingoia *et al.*, 2014). Elle correspond à une inactivation enzymatique de l'antibiotique via différentes Chloramphenicol AcetylTransferase (CAT) codées par les gènes *cat* (Schwarz *et al.*, 2004).

Le plus fréquemment retrouvé sur les ICE de streptocoques est le gène *catQ* (Mingoa *et al.*, 2014). Ainsi, ICESpy029IQ et ICESpy005IQ de *S. pyogenes* ainsi qu'ICESpn529IQ de *S. pneumoniae* portent les gènes *catQ* et *mef*. Ces gènes sont portés par l'élément IQ présent sur l'ICE (Mingoa *et al.*, 2014; Mingoa *et al.*, 2007).

Ces exemples montrent que les ICE constituent un important réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. Leur dissémination dépendra de la capacité de transfert des éléments qui les portent. Ainsi, il a été montré que la dissémination du gène *tet(M)* porté par Tn916 et ses dérivés est importante au sein de la cavité buccale (Roberts *et al.*, 2001). De même, l'ICESpy005IQ est capable de se transférer par conjugaison à haute fréquence de façon intra-spécifique mais également entre différentes espèces de streptocoques (Mingoa *et al.*, 2014). Dans le cas où l'élément est incapable de se transférer par conjugaison, il peut être transféré par un autre mécanisme. C'est le cas d'ICESpy029IQ et ICESpn529IQ dont le transfert intra-spécifique par transformation naturelle a été montré à faible fréquence (Mingoa *et al.*, 2014)

f. Le mécanisme d'évolution modulaire des ICE chez les streptocoques

La comparaison de la séquence des ICE a révélé de nombreux échanges de modules complets ou de parties de modules (Burrus *et al.*, 2002a; Roberts & Mullany, 2011). Par exemple, TnGBS1 a acquis son intégrase (DDE transposase) de l'ICE TnGBS2 qui l'a lui-même acquis d'une séquence d'insertion (Guérillot *et al.*, 2013).

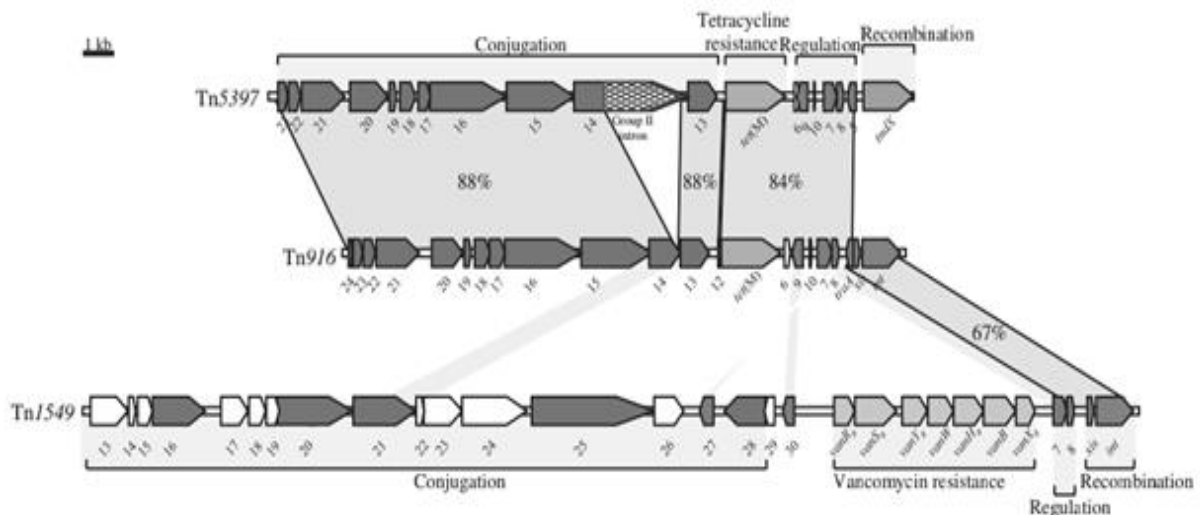


Figure 14 : Comparaison de l'organisation des ICE Tn5397, Tn916 et Tn1549 d'après Burrus *et al.*, (2002a). Les ORF sont connectés par des zones grisées lorsqu'une identité de séquence nucléotidique significative est détectée (pourcentage indiqué). Les zones grisées sans pourcentage indiqué connectent des ORF dont les protéines codées présentent une homologie de séquence.

De même, la comparaison de la séquence des module de conjugaison des ICE Tn916, Tn1549 et Tn5397 (figure 14) montre que les modules d'intégration/excision (recombinaison) de Tn916 et

Tn1549 présentent 67% d'identité alors le reste de la séquence de ces éléments est complètement différent. Ainsi, il est probable que le module de recombinaison de Tn1549 provienne d'un élément de la famille Tn916. De cette façon, il y aurait eu un transfert des modules de conjugaison et de régulation entre Tn5397 et Tn916. Une autre hypothèse serait que Tn5397 serait dérivé de Tn916 par l'acquisition d'un autre module d'intégration/excision (Burrus *et al.*, 2002a).

La structure modulaire et les échanges de modules sont la clef de l'évolution des ICE et, par conséquent, participent à leur diversité.

2. Les éléments intégratifs mobilisables (IME) chez les streptocoques

Un IME est un élément génétique mobile intégré dans le génome d'une bactérie hôte et capable de s'en exciser de façon autonome. Toutefois, contrairement aux ICE, les IME ne codent qu'une partie des protéines impliquées dans leur transfert conjugatif. Ils ne peuvent pas se transférer de façon autonome (Burrus *et al.*, 2002b) et doivent donc être mobilisés en *trans*. Pour cela, ils doivent emprunter le pore de conjugaison codé par un élément « helper », c'est-à-dire un ICE ou un plasmide conjugatif qui serait également présent dans la cellule (Bellanger *et al.*, 2014).

Comme les ICE, les IME sont bordés par des sites *attL* et *attR* (figure 15). Ils présentent également une organisation modulaire avec un module d'intégration/excision, un module de régulation et un module d'adaptation. Comme pour les ICE, le premier module code l'intégrase et l'excisionnase (figure 15). De même que pour les ICE, le module d'adaptation porte des fonctions variées, avec des gènes de résistance au mercure comme *merA* et *merR* sur l'IME_18RS21_oriT_ICEtRNALys de *S. agalactiae* ou des gènes de résistance aux antibiotiques, comme *Isa(C)* de l'IME_GB00984_oriT_Tn916 de *S. agalactiae* qui confère une résistance aux lincosamides, aux streptogramines A et à la pleuromutiline (figure 15; Puymège *et al.*, 2015). Les IME ne possèdent pas de module de conjugaison, il est remplacé par un module de mobilisation codant pour leur mobilisation en *trans*. Il contient l'origine de transfert (*oriT*) et le gène codant la relaxase (figure 15) (Bellanger *et al.*, 2014). Une fois excisé sous forme circulaire par les protéines codées par leur module d'intégration/excision, leur origine de transfert est reconnue par des protéines codées par le module de conjugaison de l'élément « helper » pour permettre leur transfert (Bellanger *et al.*, 2014).

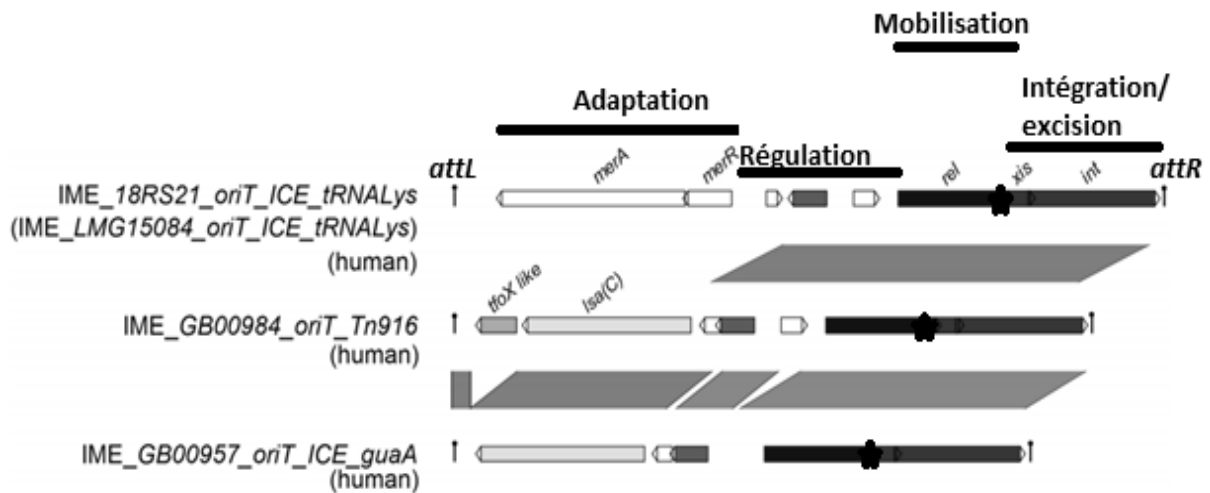


Figure 15 : Comparaison des IME intégrés au sein de l'origine de transfert de plusieurs ICE retrouvés chez *S. agalactiae* d'après Puymège *et al.* (2015). Les noms des IME comportent le nom de la souche dans laquelle ils ont été décrits puis leur site d'insertion. Entre parenthèse se trouve l'origine de la souche. Les ORF sont matérialisés par des flèches. Le module de recombinaison comporte le gène *rel* codant la relaxase et l'origine de transfert qui est désignée par une étoile. Le module de recombinaison porte les gènes *xis* et *int* qui codent respectivement l'excisionase et l'intégrase. Les différents modules sont représentés par des barres horizontales noires avec leurs noms. Les autres ORF font partie du module d'adaptation. Les zones grisées désignent des séquences présentant plus de 80% d'identité.

L'analyse de 303 génomes de *S. agalactiae* a permis de mettre en évidence 57 ICE putatifs et 69 IME putatifs (Puymège *et al.*, 2015). Cette analyse montre la prévalence des IME chez les streptocoques, mais leur diversité y est méconnue car encore trop peu étudiée. Jusqu'à présent, plusieurs familles d'IME ont été décrites chez *S. agalactiae* en se basant sur la diversité de leur site d'intégration : par exemple IME_2603_ *rpmG* et IME_2603_ *rpsI* s'intègrent respectivement à l'extrémité des gènes *rpmG* et *rpsI* (Brochet *et al.*, 2008) alors qu'IME *tRNA^{Lys}* s'intègre dans le gène *tRNA^{Lys CTT}* (Puymège *et al.*, 2015).

La présence d'IME intégrés au sein de l'origine de transfert d'ICE appartenant à la superfamille Tn916 (ICE_ *tRNALys*, ICE_ *guaA* et Tn916) a également été montrée (figure 15) (Puymège *et al.*, 2015). Cette classification en fonction du site d'intégration est en cours d'évolution vers une classification selon la séquence du module de mobilisation (N. Leblond-Bourget, com. pers.).

3. Les barrières au transfert conjugatif des ICE

Il a été démontré que des ICE sont capables de se transférer naturellement dans les écosystèmes de *S. salivarius*, comme Tn916 au sein de la cavité buccale (Roberts *et al.*, 2001). La fréquence de transfert de l'élément dépend de sa capacité à s'exciser, comme nous l'avons vu précédemment, mais aussi de différents facteurs comme les barrières mises en place par la cellule réceptrice. Les ICE sont néanmoins capables de coder des mécanismes leur permettant de déjouer ces systèmes de défense.

a. Systèmes d'exclusion

Le système d'exclusion permet de diminuer la fréquence de transfert des ICE en inhibant l'entrée de son ADN dans le pore de conjugaison. A ce jour, aucun système de ce type n'a été décrit chez les ICE des streptocoques. Cependant, l'ICE pSAM2 de *Streptomyces ambofaciens* code la protéine Pif (pSAM2 immunity factor) dont la présence chez la bactérie réceptrice permet de diminuer l'excision et l'initiation au transfert de pSAM2 chez la cellule donatrice. Sa fréquence de transfert est ainsi réduite d'un facteur 2000 (Possoz *et al.*, 2003).

Les protéines des systèmes d'exclusion sont codées par un élément déjà intégré dans la cellule réceptrice et permettent, par un mécanisme inconnu, d'empêcher la surconjugaison pour un site d'intégration donné (Marrero & Waldor, 2005). Ce système est absent chez Tn916 puisqu'il est possible de trouver plusieurs copies de Tn916 au sein d'un même génome (Clewell *et al.*, 1995).

b. Systèmes de restriction-modification (RM)/loci CRISPR

Ces systèmes peuvent empêcher le maintien de l'ADN sous forme libre dans la cellule réceptrice. Le système de restriction-modification implique une endonucléase qui coupe majoritairement l'ADN exogène non méthylé. La cellule hôte protège son propre ADN de la restriction par une méthylation de sites cibles grâce à une méthyltransférase (Chen *et al.*, 2005). Certains ICE, comme Tn5252 de *S. pneumoniae*, codent des méthyltransférases qui les protègent des endonucléases de l'hôte en méthylant de nombreux sites (Ayoubi *et al.*, 1991; Sampath & Vijayakumar, 1998). D'autres ICE portent eux-mêmes un système de restriction-modification comme c'est le cas d'ICES1 de *S. thermophilus* (Burrus *et al.*, 2001). Enfin, certains ICE, comme Tn916, codent des protéines d'anti-restriction capables d'interagir avec le complexe ADN exogène-endonucléase et d'inactiver l'endonucléase (Serfiotis-Mitsa *et al.*, 2008). Ces protéines sont codées par des gènes généralement situés près de l'*oriT* afin qu'ils soient transférés les premiers et que les protéines codées puissent agir dès le début du transfert conjugal (Serfiotis-Mitsa *et al.*, 2008).

Les loci CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) dégradent également l'ADN entrant (Bhaya *et al.*, 2011). Ils sont présents sur le génome de la bactérie réceptrice et contiennent des répétitions palindromiques de 21 à 48 pb séparées par des espaceurs de 26 à 72 pb. Ces séquences sous forme d'un grand ARNm auquel vont s'associer les protéines Cas (CRISPR Associated) qui sont également codées par ce locus. Ce complexe nucléoprotéique va s'apparier sur l'ADN exogène complémentaire de la séquence de l'espaceur et provoquer sa dégradation (Bhaya *et al.*, 2011). L'étude des génomes de souches de *S. agalactiae* montre que les souches dépourvues d'éléments TnGBS1 et TnGBS2 présentent des loci CRISPR ciblant ces éléments (Lopez-Sanchez *et al.*, 2012).

c. Immunité de cible

L'immunité de cible consiste à empêcher l'intégration de l'élément en occupant le site d'intégration *attB* (Sentchilo *et al.*, 2009). Par exemple, la fréquence de transfert d'*CESt3* de *S. thermophilus* diminue d'un facteur 12 lorsque son site d'intégration *fda* est occupé par un élément incomplet flanqué de sites *attL* et *attR* (Bellanger *et al.*, 2011).

III. Transfert conjugatif et tractus digestif, une synergie ?

Il existe des barrières au transfert conjugatif, mais à l'inverse, certaines situations favorisent ce transfert. Hausner & Wuertz (1999) ont ainsi montré chez plusieurs espèces bactériennes que le transfert de gènes est favorisé lors d'une croissance bactérienne en biofilm. Par exemple, le plasmide conjugatif *pAMβ1* porteur du gène de résistance à l'érythromycine se transfère à plus haute fréquence (10 000 fois plus) lorsque les cellules de *Lactococcus lactis* qui le code sont structurées en biofilms plutôt que planctonique (Luo *et al.*, 2005). Les notions de biofilm et d'adhésion seront décrites dans la suite de cette introduction pour ensuite évaluer leur impact sur le transfert conjugatif.

1. Biofilm : définition et formation

Un biofilm est défini comme une communauté bactérienne qui est enchâssée dans une matrice hydratée de polymères complexes (glucidiques et/ou protéiques) et qui adhère à une surface biotique ou abiotique (Sauer, 2003).

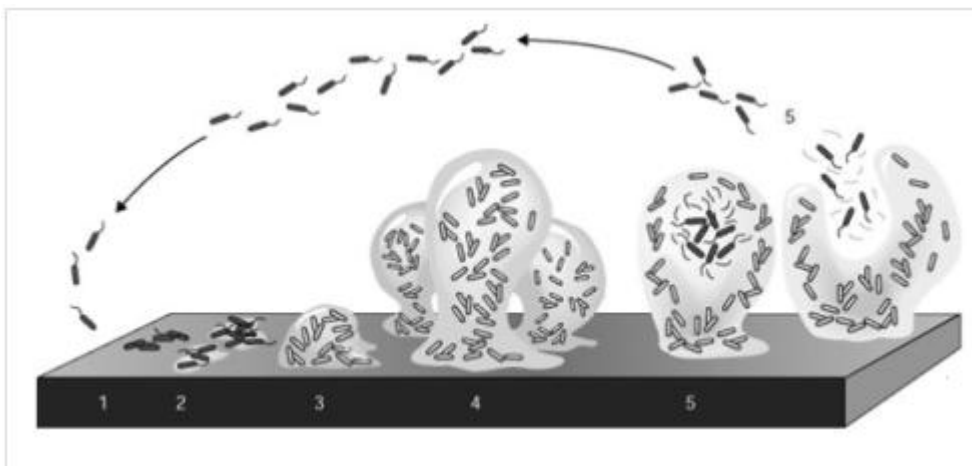


Figure 16 : Les différentes étapes de la formation d'un biofilm d'après Sauer (2003).

Un biofilm se développe en cinq étapes (figure 16) (Sauer, 2003). La première étape correspond à l'adhésion de la bactérie à une surface via des structures présentes à la surface de la bactérie comme des protéines de surface appelées adhésines, des flagelles... (étape 1 figure 16). Cet attachement réversible a lieu quand les conditions environnementales sont défavorables (manque de nutriments ou présence d'agents antimicrobien) mais la présence d'une source de carbone reste obligatoire

(Petrova & Sauer, 2012). La bactérie établit donc un biofilm pour contrecarrer ces conditions. Ensuite la bactérie se multiplie (étape 2, figure 16) et produit des composants exopolysaccharidiques (EPS) permettant la formation d'une matrice qui va piéger les bactéries en division mais également d'autres espèces bactériennes proches géographiquement (étape 3, figure 16). L'architecture du biofilm devient alors complexe et forme le biofilm mature (étape 4, figure 16). C'est une structure tridimensionnelle mono-ou pluri-espèces au sein de laquelle la disposition des bactéries permet la diffusion optimale des nutriments et assure une protection des couches inférieures du biofilm contre les attaques extérieures tels les antibiotiques. La dernière étape consiste en la dispersion des bactéries qui peuvent alors coloniser d'autres sites (étape 5, figure 16).

Les bactéries adaptent leur expression génique tout au long de ces étapes en fonction de leurs propres besoins mais également de ceux des autres espèces bactériennes du biofilm (Sauer, 2003). Pour réguler l'ensemble de ces phénomènes, les bactéries communiquent entre elles par quorum sensing, mécanisme dépendant de la densité de la population bactérienne (Cvitkovitch *et al.*, 2003; Suntharalingam & Cvitkovitch, 2005).

En effet, en fonction de l'étape de croissance du biofilm, la densité cellulaire est différente et induit des échanges différents entre les bactéries (Nobbs *et al.*, 2009). Les bactéries produisent des phéromones nommées « auto-inducteurs » qui sont peu concentrées dans la matrice extracellulaire du biofilm lorsque la population bactérienne y est faible. Lorsque la densité bactérienne augmente, la concentration en auto-inducteur augmente et finit par dépasser un seuil critique qui est perçu par les bactéries via un récepteur. Celui-ci permet l'activation de régulateurs transcriptionnels qui vont alors activer ou réprimer l'expression de certains gènes (Cvitkovitch *et al.*, 2003; Suntharalingam & Cvitkovitch, 2005). Par exemple, Vidal *et al.* (2011) ont montré que chez *S. pneumoniae* le système de quorum sensing LuxS-dépendant régule certaines étapes de la formation du biofilm de la souche D39 (étapes 2 et 3 figure 16). En effet, la transcription du gène *luxS* qui est impliqué dans la division cellulaire et la biosynthèse des parois est maximale pendant ces étapes.

Les échanges métaboliques mais également génétiques qui se produisent lors de la formation d'un biofilm (étapes 3 et 4, figure 16) sont également régulés par quorum sensing (Cvitkovitch *et al.*, 2003; Nobbs *et al.*, 2009). Par exemple, l'état de compétence de *S. pneumoniae* permettant la transformation peut être induit via un peptide de stimulation de compétence (CSP, Competence Stimulating Peptide). La synthèse de ce peptide est activée lorsque la densité bactérienne est suffisante (Cvitkovitch *et al.*, 2003).

2. L'adhésion au tractus gastro-intestinal

Des biofilms sont présents dans les deux écosystèmes de *S. salivarius*, le système buccal et le tractus gastro-intestinal (Aas *et al.*, 2005 ; Corredoira *et al.*, 2005), mais la suite de cette introduction se concentrera sur ce dernier.

La base de la formation d'un biofilm est constituée par l'adhésion entre une cellule bactérienne et un substrat puis entre les cellules bactériennes. L'adhésion est définie comme l'union mesurable entre une bactérie et un substrat (Ofek & Doyle, 1994). Une bactérie est dite adhérente quand il faut dépenser de l'énergie pour la séparer du substrat (Ofek & Doyle, 1994). L'adhésion dépend donc de la nature du substrat mais aussi des protéines de surface bactériennes, appelées adhésines, qui le lient (Nobbs *et al.*, 2009). La suite de cette introduction va se focaliser sur cette étape d'adhésion.

a. Le tractus gastro-intestinal : substrat d'adhésion du microbiote gastro-intestinal

Le tractus gastro-intestinal est divisé en quatre segments anatomiques : le duodénum, le jéjunum, l'iléum et le colon. Il forme une barrière physique et chimique qui protège l'hôte des attaques de microorganismes pathogènes (Liévin-Le Moal & Servin, 2006). A cette fin, il est constitué d'un microbiote et de cellules de plusieurs phénotypes formant un épithélium (Liévin-Le Moal & Servin, 2013).

La surface de l'épithélium gastro-intestinal est la plus grande surface du corps humain (200 à 300 m²) en contact avec l'environnement externe. Cet épithélium est replié pour former un grand nombre de villosités afin d'augmenter sa surface (figures 17B) (Liévin-Le Moal & Servin, 2006). Il est composé de cellules épithéliales très polarisées qui présentent des fonctions différentes à leurs deux extrémités. Ces cellules sont constamment régénérées depuis une source de cellules multipotentes localisées au sein des cryptes de Lieberkühnm (figure 17A) (King & Dekaney, 2013).

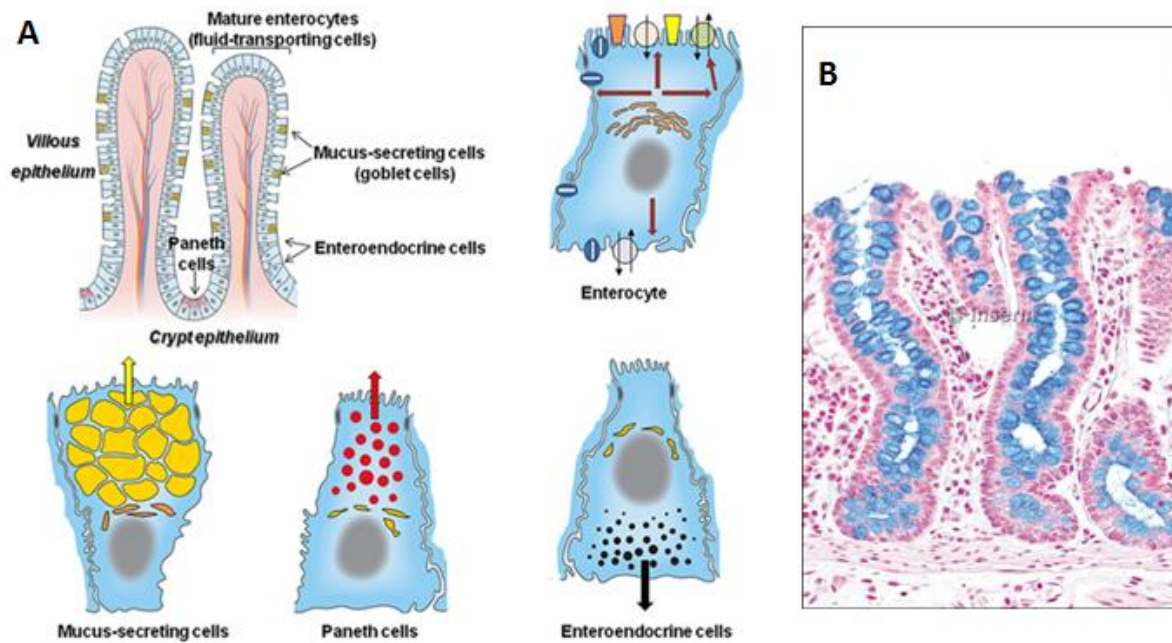


Figure 17 : A : La barrière épithéliale intestinale d'après Liévin-Le Moal & Servin (2013). Il s'agit d'un épithélium monocouche constitué de 4 types de cellules très polarisées, les entérocytes, les cellules sécrétrices de mucus (cellules caliciformes), les cellules de Paneth et les cellules entéro-endocrines. Un cinquième type de cellules est localisé au sein des cryptes de Lieberkühnm avec les cellules de Paneth. Les flèches épaisses montrent les sécrétions diverses de l'épithélium et les autres flèches montrent les échanges avec la lumière intestinale et le flux sanguin. B : Biopsie colique. Coupe transversale de 7 μm et coloration au bleu Alcyan. Inserm 2014. L'épithélium intestinal est visible en rose et bleu. Les sphères bleues sont des réserves de mucus sécrété par l'épithélium pour sa protection et sa lubrification.

La figure 17A, présente les quatre grands types cellulaires composant l'épithélium gastro-intestinal ainsi que les échanges qui ont lieu avec le système sanguin et la lumière intestinale dans laquelle circulent le bol alimentaire et le microbiote.

Les entérocytes sont les cellules majoritaires de cet épithélium. Elles comportent un réseau de microtubules permettant de réguler le trafic intracellulaire de vésicules chargées de protéines fonctionnelles. Pendant la migration des entérocytes depuis la crypte jusqu'en haut des villosités, les cellules acquièrent un haut degré de polarisation et présentent trois domaines. Le domaine apical est formé d'une bordure en brosse offrant une plus grande surface de contact avec la lumière intestinale. Le domaine latéral fonctionne comme une jonction serrée, permettant des liaisons optimales entre les différents types cellulaires constituant l'épithélium. Le domaine basal connecte les cellules polarisées avec la membrane intestinale et la circulation sanguine (Liévin-Le Moal & Servin, 2013).

Les cellules caliciformes, également très représentées dans l'épithélium gastro-intestinal, sont responsables de la sécrétion de mucus (figure 17A). Le mucus est une couche de glycoprotéines insolubles qui adhère aux cellules épithéliales. Il permet la lubrification et le maintien d'une couche hydratée sur l'épithélium. Il établit ainsi une barrière protectrice de l'épithélium et interagit avec le

microbiote gastro-intestinal (McGuckin *et al.*, 2011). Le mucus humain est composé de 17 mucines différentes (Juge, 2012). Il comporte principalement les mucines de type MUC5AC dans l'estomac et de type MUC2 et en moindre quantité MUC3 dans les intestins (McGuckin *et al.*, 2011).

Les cellules de Paneth sont des cellules pyramidales qui sécrètent en particulier des molécules antimicrobiennes comme le lysozyme ou des phospholipidases (figure 17A) (Liévin-Le Moal & Servin, 2013).

Enfin, les cellules entéro-endocrines sont les moins représentées au sein de l'épithélium gastro-intestinal (1%) (figure 17A). Elles sont divisées en plusieurs types cellulaires en fonction des hormones ou des molécules signal qu'elles sécrètent (sérotonine, cholécystokinine...) (Liévin-Le Moal & Servin, 2013).

b. Les lignées cellulaires épithéliales gastro-intestinales

La capacité d'adhésion au tractus gastro-intestinal est un prérequis pour une colonisation et une prolifération du microbiote naturel mais aussi de certaines bactéries pathogènes (Juge, 2012). L'étude de cette capacité d'adhésion est généralement réalisée sur des types cellulaires qui présentent des propriétés similaires aux cellules majoritaires de l'épithélium gastro-intestinal.

Ainsi, la lignée cellulaire Caco2 présente de nombreuses propriétés similaires aux entérocytes de l'intestin grêle. Il s'agit de cellules polarisées avec une bordure en brosse. Elles ne produisent pas de mucus et se développent en monocouche (Hilgendorf *et al.*, 2000). Ces cellules ne se polarisent que lorsqu'elles sont à confluence, c'est-à-dire lorsqu'elles forment un tapis cellulaire ne présentant aucun interstice entre les cellules et que leur division s'arrête, soit après 10 jours de culture (Liévin-Le Moal & Servin, 2013). Elles sont également utilisées comme modèle afin de comprendre les mécanismes de polarisation cellulaire et le rôle des protéines de structure dans l'assemblage de la bordure en brosse (Liévin-Le Moal & Servin, 2013).

Les cellules HT29 sont des cellules tumorales non productrices de mucus issues du côlon humain (Fogh *et al.*, 1977; Rousset, 1986). Elles ne sont pas différenciées et ne présentent pas de fonctions semblables aux cellules de l'épithélium gastro-intestinal (Liévin-Le Moal & Servin, 2013). Cependant, un traitement au méthotrexate conduit à leur différenciation en cellules HT29-MTX. Celles-ci sont caliciformes et produisent du mucus contenant principalement les mucines MUC3 et MUC5AC (Lesuffleur *et al.*, 1990; Liévin-Le Moal & Servin, 2013). De même, un traitement des cellules HT29 au butyrate de sodium permet leur différenciation en cellules HT29-CL16E. Ce sont des cellules caliciformes qui produisent du mucus contenant principalement la mucine MUC2 (Augeron & Labois, 1984). Ces deux types de cellules dérivées d'HT29 sont également utilisées pour comprendre la régulation du transport de mucus, la fonctionnalité des cellules humaines sécrétrices

de mucus ou encore le rôle des mucines humaines en tant que barrière à l'invasion bactérienne (Liévin-Le Moal & Servin, 2013).

c. Le mécanisme d'adhésion bactérienne sur des cellules épithéliales gastro-intestinales

Dans le cas d'une adhésion bactérienne aux cellules épithéliales gastro-intestinales, un mécanisme en deux étapes a été décrit en 1992 par Hasty *et al.* (Figure 18).

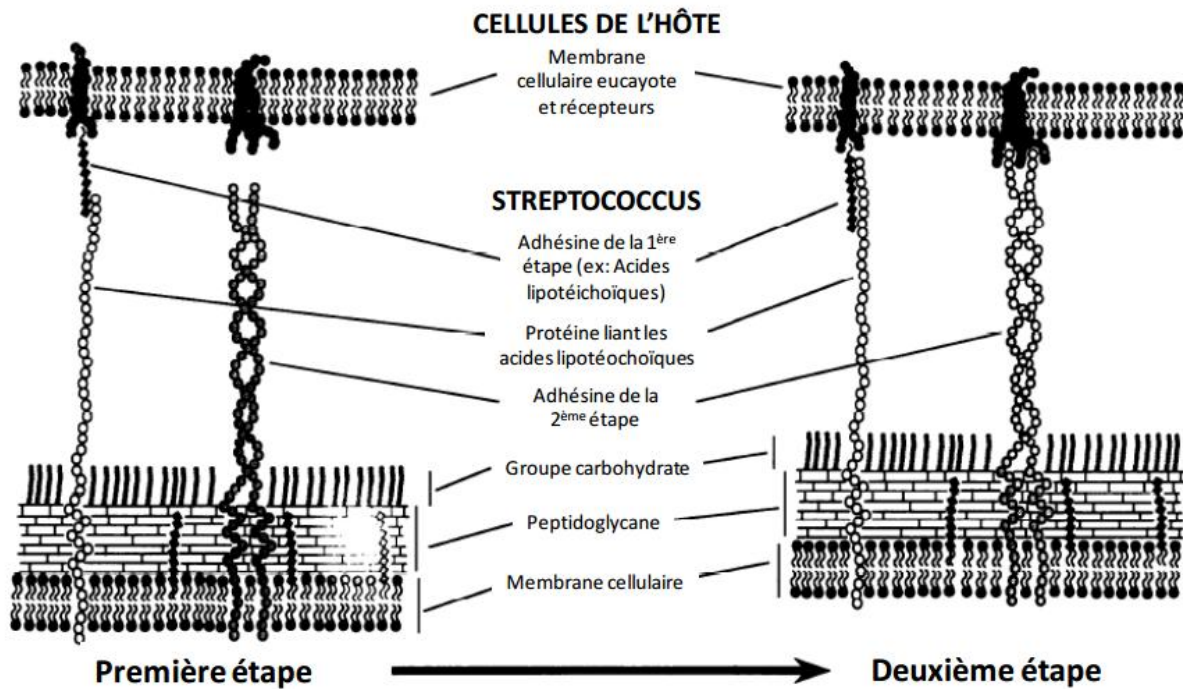


Figure 18 : Modèle en deux étapes de l'adhésion des streptocoques à des cellules épithéliales gastro-intestinales d'après Hasty *et al.* (1992).

La première étape est réversible. Elle est caractérisée par des interactions hydrophobes de faible spécificité entre des récepteurs membranaires des cellules épithéliales gastro-intestinales et des adhésines bactériennes non spécifiques, comme les acides lipotéichoïques (figure 18).

La deuxième étape est caractérisée par des liaisons stables, pouvant résister à plusieurs lavages, établies entre des récepteurs membranaires des cellules épithéliales gastro-intestinales et protéines de surface bactérienne (figure 18). (Hasty *et al.*, 1992).

d. Systèmes de sécrétion des adhésines des streptocoques

La capacité d'adhésion des streptocoques dépend des adhésines présentes à leur surface et parmi elles de protéines sécrétée et ancrées à leur surface (Nobbs *et al.*, 2009).

i. Les peptides signaux

La majorité des protéines de surface sécrétées présentent toutes un peptide signal en position N-terminale qui leur permet d'être adressées au système de sécrétion. Il existe plusieurs types de peptide signal, mais ceux qui sont reconnus par le système Sec ont la même structure (Rusch & Kendall, 2007). Ils se caractérisent, en effet, par une région N-terminale chargée positivement (n-domaine), une région centrale hydrophobe (h-domaine) et une région C-terminale polaire qui possède un site de clivage par une signal peptidase (c-domaine) (Bendtsen *et al.*, 2004; Freudl, 2013). Dès lors que l'adressage est terminé, le peptide signal est libéré pour ne pas affecter l'intégrité de la membrane et interférer avec la translocation de la protéine (Freudl, 2013).

Chez les streptocoques, deux motifs particuliers peuvent être présents au sein des peptides signaux. C'est le cas du motif YSIRK, dont la fonction n'est pas encore bien définie chez les streptocoques (Brega *et al.*, 2013). En revanche, chez *S. aureus*, il a été montré que le motif YSIRK est impliqué dans la sécrétion des protéines au niveau de la paroi cellulaire nouvellement formée entre les deux cellules filles lors de la division cellulaire (Frankel *et al.*, 2010; Yu & Götz, 2012).

Le deuxième motif est le motif KxYKxGKxW retrouvé au sein du n-domaine de protéines de surface. Son rôle précis n'a pas encore été déterminé. Les protéines contenant ce motif interagiraient avec le système SecA2/SecY2 (Bensing *et al.*, 2007)..

ii. Le système de sécrétion Sec

Le système Sec permet la translocation de pré-protéines sous forme dénaturées. Chez les bactéries Gram +, deux mécanismes faisant intervenir le système de sécrétion Sec sont décrits (figure 20) et diffèrent selon que la translocation ait lieu simultanément, ou non, à la traduction.

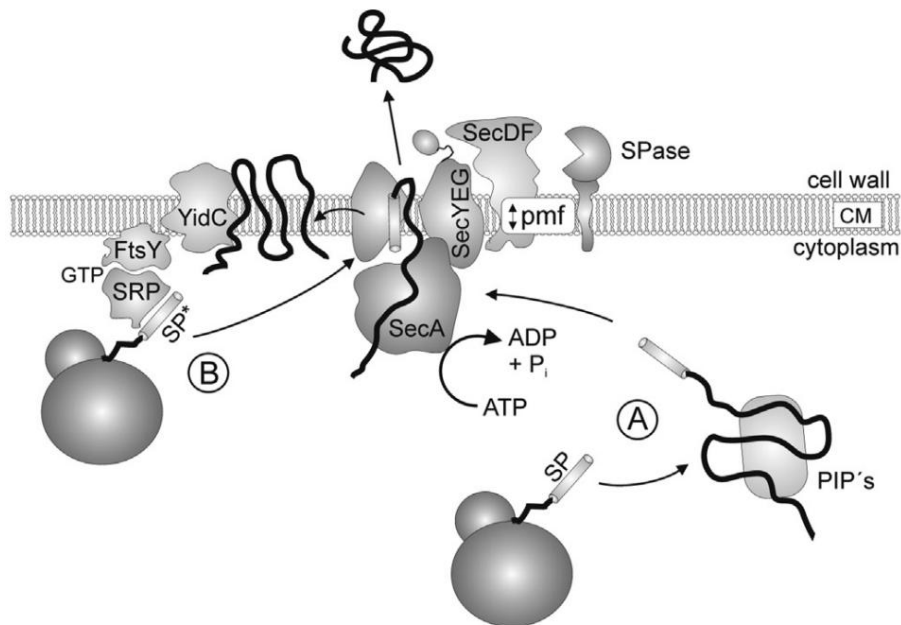


Figure 19 : Système de sécrétion Sec des bactéries Gram+ d'après Freudl (2013). CM pour membrane cytoplasmique, SP pour peptide signal, SRP pour Signal Recognition Particule, pmf pour force proton-motrice, PIP's pour Posttranslationally Interacting Proteins, GTP pour Guanosine TriPhosphate et SPase pour Signal Peptidase.

➤ Sécrétion simultanément à la traduction (figure 19B):

Certaines protéines transmembranaires sont sécrétées dès leur traduction. Dans ce cas, un complexe ribosome/pré-protéine est lié au pore de translocation (SecYEG) grâce au système de ciblage SRP/FtsY (SRP : Signal Recognition Particule) qui est lié au peptide signal de la pré-protéine. Ce complexe est maintenu à proximité du pore de translocation par la protéine YidC qui est ancrée dans la membrane à côté du pore SecYEG. De cette façon, la pré-protéine en cours d'élongation est localisée à proximité du pore de translocation et l'énergie nécessaire à la translocation est fournie par l'élongation de la pré-protéine naissante (du Plessis *et al.*, 2011; Freudl, 2013). Les rôles de FtsY et YidC n'ont pas encore été démontrés (Freudl, 2013).

Pendant la biosynthèse de la pré-protéine, les domaines hydrophobes α -hélicoïdaux sont insérés les premiers dans le pore SecYEG avant d'être dirigés dans la bicouche lipidique (Dalbey *et al.*, 2011).

➤ Sécrétion après la traduction (figure 19A) :

Ce mécanisme de sécrétion ne concerne que les protéines ne présentant pas de domaines hydrophobes. Après traduction de la totalité de la pré-protéine, celle-ci est reconnue par un facteur PIP's (Posttranslationally Interacting Proteins). Il permet de livrer la pré-protéine au complexe SecA/SecYEG où SecA est une ATPase de translocation. La pré-protéine est alors poussée au travers du pore par étapes ATP dépendantes (Freudl, 2013; Lycklama A Nijeholt & Driessen, 2012). Les facteurs accessoires SecD et SecF ou SecDF exercent également une force proton-motrice (pmf) qui tire la pré-protéine par le côté extracellulaire du pore (Tsukazaki *et al.*, 2011).

iii. SecA2/SecY2 : système de sécrétion des Streptocoques pathogènes

Un autre système de sécrétion a été identifié chez les streptocoques pathogènes : le système SecA2/SecY2. Il peut être présent en plus du système Sec et est spécifiquement impliqué dans l'export des facteurs de virulence et tout particulièrement des protéines riches en sérine (Bensing & Sullam, 2010; Bensing *et al.*, 2012). La glycosylation de ces protéines les empêche d'être exportées par le système Sec classique.

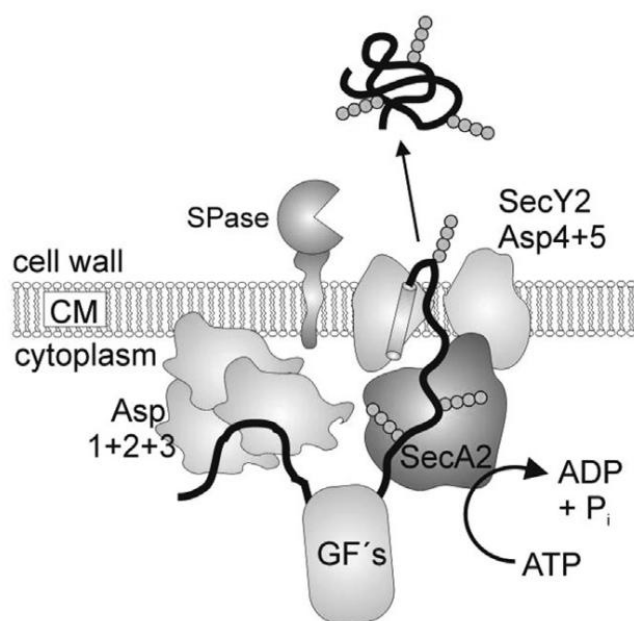


Figure 20 : Système de sécrétion accessoire SecA2/secY2 ou Sec2 d'après Freudl (2013). GF's pour facteurs de glycosylation et SPase pour Signal Peptidase. Les groupes de 4 points dessinés sur la protéine représentent la glycosylation de celle-ci.

Le système SecA2/SecY2 comporte cinq protéines de sécrétion accessoires Asp 1-5 (Accessory secretory protein) et les protéines SecA2 et SecY2 (figure 20). Les protéines Asp1+2+3 interagissent entre elles pour former un complexe de protéines chaperonnes. Celui-ci interagit d'une part avec le domaine riche en sérine de la pré-protéine avant sa glycosylation et d'autre part avec le pore de translocation formé par les protéines SecA2, SecY2 et Asp4+5 (Seepersaud *et al.*, 2010; Yen *et al.*, 2011).

Après glycosylation de la pré-protéine, son peptide signal est reconnu par le système SecA2/SecY2 pour adresser la protéine au pore de translocation (figure 20) (Bensing *et al.*, 2014; Bensing & Sullam, 2010; Freudl, 2013). Comme pour le système Sec, le passage de la pré-protéine est ATP dépendant mais contrairement au système Sec, aucune force proton-motrice n'a été décrite.

e. Systèmes d'ancrage des adhésines des streptocoques

Une fois les pré-protéines secrétées, leur peptide signal est clivé et elles prennent leur conformation 3D finale. Les protéines sont ensuite ancrées dans l'enveloppe cellulaire bactérienne. Chez les

bactéries Gram +, 4 systèmes d’ancrage sont décrits et présentés dans la figure 22 (Desvaux *et al.*, 2006).

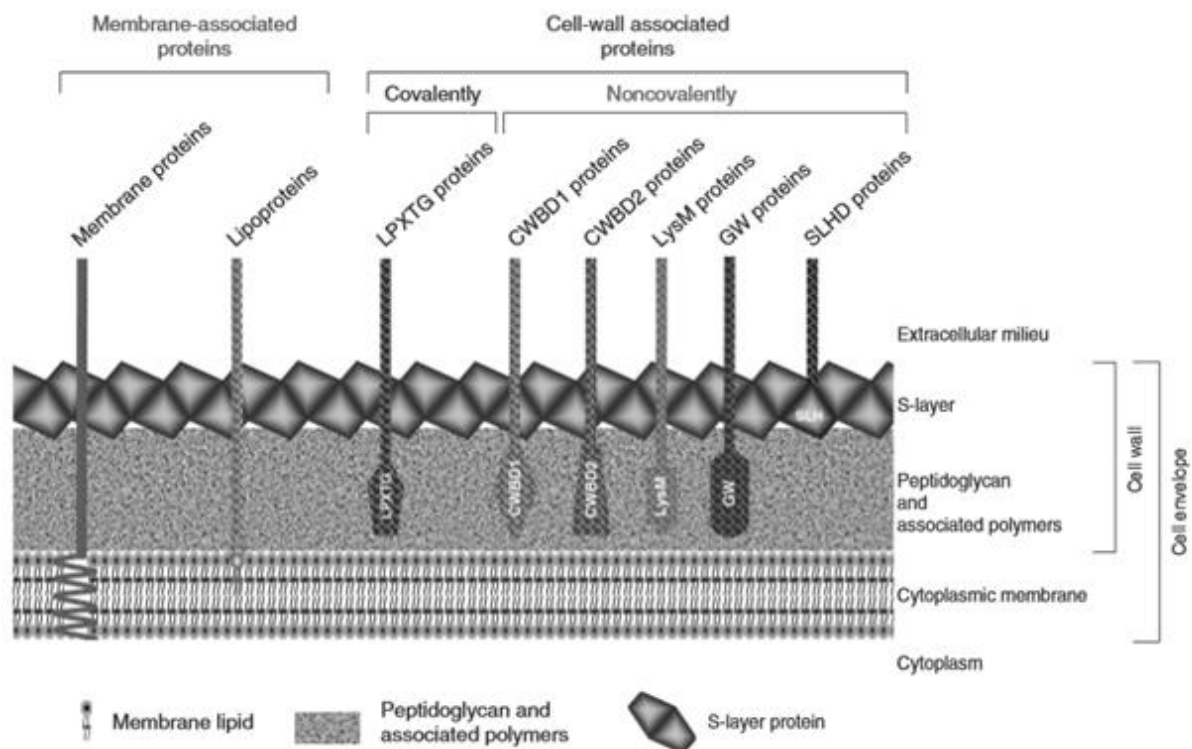


Figure 21 : Diversité des systèmes d'ancrage des protéines de surface chez les bactéries Gram + d'après Desvaux *et al.* (2006).

Dans les deux premiers systèmes, les protéines sont ancrées dans la membrane cytoplasmique soit via une hélice transmembranaire C- ou N-terminale (protéines transmembranaires), soit aux lipides de la membrane (lipoprotéines) (figure 21). Les protéines transmembranaires sont sécrétées par le système Sec simultanément à leur traduction et sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que la transduction de signaux ou la translocation de facteurs de virulence (Kovacs-Simon *et al.*, 2011; Zückert, 2014).

Les lipoprotéines, comme toutes les autres protéines de surface, sont sécrétées après leur traduction par les systèmes Sec ou SecA2/SecY2. Elles ont également des rôles importants dans l'adhésion aux cellules hôtes, la modulation des processus inflammatoires ainsi que dans la translocation de facteurs de virulence au sein de cellules hôtes (Kovacs-Simon *et al.*, 2011). Par exemple, la lipoprotéine cyclophiline SlrA PPIase est connue pour son rôle dans le processus de colonisation des voies respiratoires supérieures de la souris par *S. pneumoniae* (Hermans *et al.*, 2006).

Les autres protéines de surface sont ancrées au peptidoglycane de la paroi cellulaire (figure 21) de façon covalente grâce au domaine d'ancrage LPxTG ou de façon non covalente grâce à d'autres domaines d'ancrage (CWBD, LysM...) (Desvaux *et al.*, 2006; Kleerebezem *et al.*, 2010).

Chez les streptocoques, la majorité des adhésines décrites sont ancrées de façon covalente au peptidoglycane de la paroi cellulaire grâce à leur motif LPxTG (Nobbs *et al.*, 2009). Ce motif fait partie d'une région contenant un domaine hydrophobe et une queue chargée positivement en position C-terminale. Cette région permet de lier la protéine à la membrane cytoplasmique avant son ancrage au peptidoglycane (Hendrickx *et al.*, 2009).

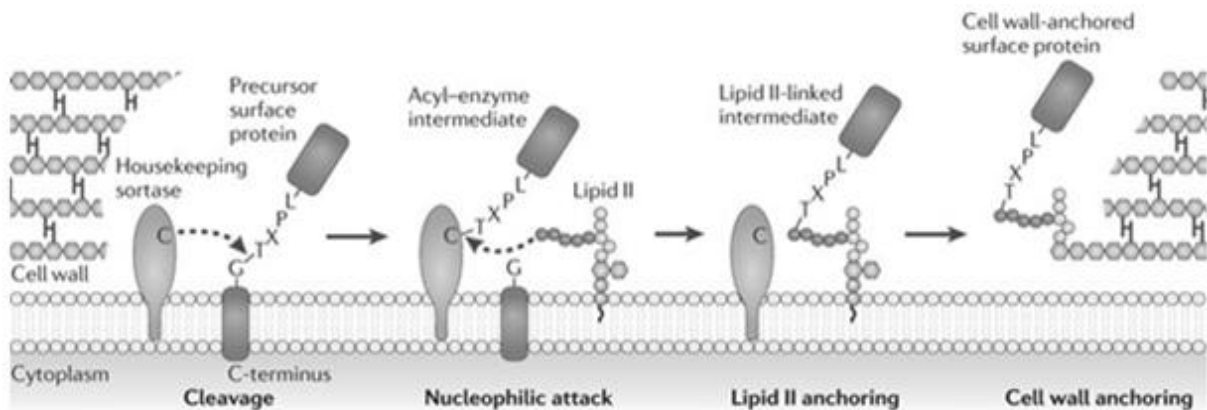


Figure 22 : Système d'ancrage covalent d'une protéine de surface à motif LPxTG au peptidoglycane via le motif LPxTG et la sortase d'après Hendrickx *et al.* (2011).

Le mécanisme d'ancrage de ces adhésines est assuré par la Sortase A (SrtA) qui reconnaît le motif LPxTG et le clive entre les résidus thréonine (T) et glycine (G) ce qui élimine le domaine hydrophobe et la queue chargée positivement (cleavage, figure 22). Un intermédiaire acyl-enzyme est ainsi formé entre la cystéine du site actif de l'enzyme et le groupe carboxyle de la thréonine de la protéine. L'attaque nucléophile du groupe amine du lipide II atteint cet intermédiaire au niveau de la liaison thioester et permet alors de former une liaison entre la thréonine de la protéine et le lipide II (nucleophilic attack et lipid II anchoring, figure 22). Enfin, l'ancrage au peptidoglycane a lieu grâce à des réactions de transglycosylation et de transpeptidation (cell wall anchoring, figure 22) (Hendrickx *et al.*, 2011; Schneewind & Missiakas, 2012).

f. Diversité des adhésines des streptocoques

Il existe une grande diversité des adhésines chez les streptocoques. D'après Hendrickx *et al.* (2009), le nombre de protéines de surface à domaine LPxTG exposées à la surface cellulaire des bactéries Gram + est extrêmement variable. Par exemple, le génome de la souche SK36 de *S. sanguinis* présente des gènes codant potentiellement 33 protéines ancrées via un motif LPxTG (Xu *et al.*, 2007) tandis que ceux de *S. agalactiae* NEM316 et *S. pyogenes* M1 n'en coderaient respectivement que 21 et 13 (Ferretti *et al.*, 2001; Glaser *et al.*, 2002).

Par ailleurs, les travaux de Nobbs *et al.* (2009) ont recensé plus d'une centaine de protéines de surface sont impliquées dans des mécanismes d'adhésion des streptocoques à un grand nombre de substrats. Parmi ces substrats sont retrouvés des constituants de la lame basale comme la laminine ou

le collagène, les composants de la salive, la fibronectine, les immunoglobulines ou encore les cellules épithéliales.

Des protéines homologues présentes chez plusieurs streptocoques peuvent adhérer au même substrat, comme les antigènes I/II qui permettent l'adhésion au collagène de *Streptococcus mutans* et *Streptococcus gordonii* (Jenkinson & Lamont, 1997; Love *et al.*, 1997). Ces adhésines permettent également l'adhésion à d'autres substrats comme la laminine et la fibronectine pour *S. mutans* et *Streptococcus intermedius* (Beg *et al.*, 2002; Busscher *et al.*, 2007; Jenkinson & Lamont, 1997; Petersen *et al.*, 2001; Petersen *et al.*, 2002) ou encore les composants de la salive pour *S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *S. gordonii*, *S. oralis* et *S. intermedius* (Jakubovics *et al.*, 2005; Jenkinson & Demuth, 1997; Jenkinson *et al.*, 1993; Russell & Mansson-Rahemtulla, 1989; Tamura *et al.*, 2008). De même, la protéine ScpB est impliquée dans l'adhésion de *S. agalactiae* à plusieurs substrats comme le complément C5a (une des protéines du sérum), la fibronectine et les cellules épithéliales de l'hôte (Cheng *et al.*, 2002; Chmouryguina *et al.*, 1996; Cleary *et al.*, 1992).

Enfin, l'adhésion à un substrat peut se faire via plusieurs protéines dont les systèmes d'ancrage peuvent être différents. Par exemple, chez *S. pyogenes* l'adhésion aux immunoglobulines G (IgG) peut se faire via la protéine FcRA qui est ancrée dans la paroi via un motif LPxTG (Heath & Cleary, 1989) ou via la protéine Sib35 qui présente un peptide signal en N-terminal, mais ne présente pas de domaine C-terminal prédit pour s'ancrer dans la membrane (Kawabata *et al.*, 2002).

3. Transfert conjugatif et biofilm : une synergie

L'adhésion est la première étape de la formation du biofilm, mais elle est aussi nécessaire pour établir le contact entre les cellules donatrice et réceptrice lors du transfert conjugatif chez les bactéries Gram+. Elle pourrait donc influencer sur le transfert conjugatif et la formation de biofilm.

En 1999, Hausner & Wuertz ont montré que la fréquence de transfert des plasmides conjugatifs est augmentée au sein des biofilms par rapport aux cellules planctoniques. En particulier, les plasmides pOLA52 et pMAS2027 d'*E. coli* codent un fimbriae de type 3 qui permet d'augmenter la fréquence de transfert conjugatif mais aussi de consolider le biofilm en liant les cellules bactériennes entre elles (Burmølle *et al.*, 2008; Ong *et al.*, 2009). En 2011, Król *et al.*, ont montré que la fréquence de transfert conjugatif du plasmide pB10 d'*E. coli* augmente au sein des biofilms en raison de la densité cellulaire du biofilm qui permet le rapprochement des cellules donatrices et réceptrices.

Chez les bactéries Gram +, il a été démontré que la présence d'un locus *bee* (Biofilm Enhancer in *Enterococcus*) sur un plasmide conjugatif permet d'augmenter la formation de biofilm par *E. faecalis* (Tendolkar *et al.*, 2006). De même, la protéine de surface CluA codée par le plasmide conjugatif de *L. lactis* MG1363 contribue à l'agrégation cellulaire impliquée dans la formation du biofilm mais aussi

au transfert d'ADN par conjugaison via son domaine Tra qui serait impliqué dans la formation du pore de conjugaison (Stentz *et al.*, 2006).

Ces exemples montrent donc qu'il y a une synergie entre le transfert conjugatif des plasmides et la formation de biofilm ; le transfert est favorisé dans le biofilm par rapport à l'état planctonique et les éléments conjugatifs codent des composants impliqués dans la formation de biofilm (Molin & Tolker-Nielsen, 2003).

Cette synergie pourrait également concerner les ICE qui sont eux aussi capables de se transférer au sein de biofilms. Par exemple, l'introduction dans un biofilm dentaire d'une souche de *B. subtilis* porteuse de Tn916 conduit à la diffusion de l'élément vers plusieurs espèces de streptocoques présentes dans le biofilm (Roberts *et al.*, 2001). De plus, certains ICE de streptocoques codent des protéines de surface qui pourraient d'une part être liées au pore de conjugaison et d'autre part permettre l'adhésion de la souche aux autres bactéries et la formation de biofilm (Thèse S. Chuzeville, 2012). Par exemple, la protéine SAL_2056 de l'ICE_515_tRNALys de *S. agalactiae* présente 29% d'identité avec la protéine codée par le gène *prgB* du plasmide pCF10 d'*E. faecalis* V583 (Thèse S. Chuzeville, 2012). Or, ce gène code une substance d'agrégation qui favorise le contact des bactéries entre-elles et est également impliquée dans le mécanisme de conjugaison du plasmide pCF10 (Waters *et al.*, 2004).

Objectifs de l'étude

S. salivarius est une bactérie commensale du système buccal et du tractus digestif (Aas *et al.*, 2005; Van den Bogert *et al.*, 2013). Le tractus digestif est décrit comme un lieu de transfert horizontal, notamment des plasmides conjugatifs au sein de biofilms (Feld *et al.*, 2008; Hausner & Wuertz, 1999; Licht & Wilcks, 2005; Liu *et al.*, 2012) mais rien n'a encore été montré pour les ICE. En revanche, l'écosystème buccal est décrit comme un lieu de transfert horizontal des ICE, en particulier des ICE de la famille Tn916 porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques (Roberts *et al.*, 2001). Cette thèse s'inscrit dans un objectif global de l'équipe ICE-TeA (ICE Transfert et Adaptation) du laboratoire DynAMic visant à étudier le transfert d'éléments intégratifs de type ICE ou IME au sein des écosystèmes digestif et buccal afin de comprendre leur rôle dans l'évolution des génomes et leur impact sur l'adaptation de *S. salivarius* à son environnement.

Mais avant d'envisager ces études de transfert *in vivo*, il était nécessaire de sélectionner des souches de *S. salivarius* porteuses d'ICE qui pourront être utilisées comme donatrices dans des expériences de conjugaison. Le premier objectif de ce travail de thèse a donc été d'étudier l'abondance et la diversité des éléments intégratifs chez *S. salivarius*. Cette étude décrite dans la première partie des résultats a été réalisée sur 212 souches de *S. salivarius* issues de la collection du laboratoire qui inclut 92 souches cliniques et 120 souches commensales. Une étude par MLST réalisée sur 6 gènes de ménage a permis de les classer en 96 groupes génotypiques ou ST (Sequence Type). Parmi ces souches, 138 ont été sélectionnées comme représentatives de la diversité de cette collection pour les études ultérieures. Les phénotypes de résistances aux antibiotiques connues pour être portées par des éléments intégratifs (Mingoia *et al.*, 2014; Roberts & Mullany, 2011) ont été caractérisés pour ces souches : résistance aux macrolides (érythromycine, streptomycine, lincomycine), aux antibiotiques phénicolés (chloramphénicol), aux tétracyclines (tétracycline) et aux aminosides (kanamycine). Les différents gènes de résistance à ces antibiotiques sont, dans la plupart des cas, portés par des éléments intégratifs. Ces éléments intégratifs porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques ont été recherchés chez les souches de *S. salivarius* d'abord par PCR puis dans les 19 génomes séquencés. Des ICE de la famille ICES_{t3}, famille modèle étudiée au laboratoire, ont également été recherchés. Ces données ont été utilisées pour sélectionner un panel de 24 souches donatrices potentielles qui portent des éléments de la famille ICES_{t3}.

Dans l'optique, à plus long terme, d'étudier les transferts de gènes au sein de la cavité buccale ou du tractus intestinal, il était intéressant de déterminer si la formation de biofilm a un impact sur le transfert de ces ICE. La formation des biofilms étant conditionnée par l'adhésion des souches à un

support, le second objectif de ma thèse était de sélectionner des souches présentant de fortes capacités d'adhésion à la salive (pour l'étude des transferts dans l'écosystème buccal) et aux cellules épithéliales gastro-intestinales (pour l'étude des transferts dans l'écosystème digestif). Cette étude a permis de sélectionner une souche d'intérêt, la souche F6-1. Une analyse de la séquence de son génome a conduit à la caractérisation de gènes codant des protéines de surface. Des mutants de quelques-unes de ces protéines ont alors été construits afin d'identifier celles qui ont un impact sur la capacité d'adhésion de F6-1 aux cellules épithéliales gastro-intestinales. Ce travail fait l'objet de la deuxième partie des résultats.

En parallèle de ce travail et afin d'étudier l'impact de cette adhésion sur le transfert des ICE, il était nécessaire de vérifier que ces éléments étaient capables de se transférer par conjugaison. Le troisième objectif de ma thèse, décrit dans la troisième partie des résultats, était de caractériser ICESt3 *F6-1 rpsI*, un ICE de la famille ICESt3 de la souche F6-1, et de réaliser des expériences de conjugaison de cet élément dans différentes conditions.

Résultats

I. Identification et caractérisation des éléments intégratifs chez *S. salivarius*

Pour étudier les transferts d'éléments intégratifs de type ICE et IME au sein des écosystèmes digestif et buccal, il est nécessaire de sélectionner des souches de *S. salivarius*, porteuses de ces éléments mobiles, qui pourront être utilisées comme donatrices dans des expériences de conjugaison. Le premier objectif de cette thèse a donc été d'étudier l'abondance et la diversité des éléments intégratifs (ICE et IME) chez *S. salivarius*. Pour cela, deux stratégies concourantes ont été choisies : la première a consisté en l'étude de la diversité génétique et phénotypique d'une collection de 212 souches de *S. salivarius* du laboratoire. Elle avait pour but de sélectionner un nombre réduit de souches représentatives de la diversité de la collection. Les résultats obtenus dans cette première étude ont fait l'objet d'une publication intitulée « Resistance Genes and Genetic Elements Associated with Antibiotic Resistance in Clinical and Commensal Isolates of *Streptococcus salivarius* » et publiée en juin 2015 par le journal AEM ainsi que d'une communication orale lors du Congrès National sur les Éléments Transposables CNET 2015 (Tours, France, 1^{er} au 3 juillet 2015). Ces résultats ont donc été rapidement exposés dans les sections 1 et 2 et l'article a été inséré après ces deux sections. La deuxième stratégie a consisté en l'analyse du contenu en éléments intégratifs des génomes des 24 souches sélectionnées ; elle a permis de renseigner l'abondance et la diversité de ces éléments.

1. Etude de la diversité de la collection de souches de *S. salivarius*

Le laboratoire DynAMic a constitué une collection de 1092 souches de *S. salivarius*, dont 1 000 dites « commensales » sont issues de la salive et des fèces de cinq individus sains et 92 dites « cliniques » sont issues de patients hospitalisés dans différents CHU français. Afin de réduire le nombre de souches à étudier, une sélection de 212 souches de cette collection a été réalisée. Ce panel de souches provient d'origines variées (origine géographique, issues de différents individus sains ou malades, issues de sites de prélèvements différents) et présente une diversité d'origine (92 souches cliniques et 120 souches commensales correspondant à 12 souches de chaque site de prélèvement de chaque individu).

Dans un premier temps, la diversité génétique des 212 souches sélectionnées a été évaluée par une analyse par MLST. Pour cela, les séquences de 6 gènes conservés chez *S. salivarius* ont été comparées selon la méthode de Delorme *et al.* (2007) afin de mettre en évidence la variabilité de ces loci. Cette étude a permis de classer les génomes de ces 212 souches en 96 « Sequence Type » (ST) distincts (cf Article « MLST analysis of *S. salivarius* isolates » p60 et table S1 p156). Selon cette classification, il

apparaît que les 92 souches cliniques se répartissent en 78 ST alors que les 120 souches commensales se répartissent en seulement 18 ST. Cependant, chaque individu sain porte des souches commensales qui présentent des ST différents. Chaque individu sain porte également des souches qui sont du même ST mais qui diffèrent par leurs sites de prélèvement (salive ou fèces). L'ensemble de ces résultats montre que cette collection de souches de *S. salivarius* présente une grande diversité, mais que cette diversité résulte principalement des souches cliniques. Afin de limiter le nombre de doublons correspondant aux souches commensales de même ST et issues du même site de prélèvement, le nombre de souches commensales a été réduit à 46 sur 120. C'est cette collection restreinte de 138 souches (92 cliniques et 46 commensales) qui a été utilisée pour les études ultérieures.

Les données de MLST obtenues sur cette collection restreinte ont été utilisées pour construire un arbre phylogénétique (cf FIG1 p61). Il montre que les souches commensales ne sont pas regroupées mais qu'au contraire, elles sont réparties dans tout l'arbre. Ces souches commensales présentent donc une grande diversité génétique. L'arbre phylogénétique a également montré que les souches issues d'un même hôpital ne sont pas clonales. L'ensemble de ces données confirme donc la diversité génétique de cette collection restreinte de 138 de souches de *S. salivarius*.

2. Détection des éléments intégratifs chez *S. salivarius* par PCR

Cette collection restreinte de 138 souches a été utilisée pour rechercher deux types d'éléments intégratifs par PCR. Dans un premier temps, ce sont les éléments intégratifs connus pour porter des gènes de résistance aux antibiotiques qui ont été recherchés. Dans un deuxième temps, d'autres éléments intégratifs qui ne portent pas de gènes de résistance aux antibiotiques comme les ICE de la famille ICESt3 et les IME de type IME*tRNA*^{Lys} ont été recherchés.

a. Détection d'éléments intégratifs porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques chez *S. salivarius*

La détection d'éléments intégratifs porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques a nécessité, dans un premier temps, de déterminer les phénotypes des souches de la collection pour leurs résistances à 6 antibiotiques connus pour être portés par des éléments intégratifs chez les streptocoques (érythromycine, streptomycine, lincomycine, chloramphénicol, tétracycline et kanamycine) (Mingoia *et al.*, 2014; Roberts & Mullany, 2011). L'étude par antibiogramme a révélé qu'une très large majorité des souches (65%) est résistante à au moins un antibiotique. Parmi ces souches, 98% sont résistantes à l'érythromycine et 25% à la tétracycline, deux antibiotiques dont les gènes de résistance sont le plus souvent portés par des ICE ou des IME (Mingoia *et al.*, 2014; Roberts & Mullany, 2011). La recherche par PCR des gènes codant ces résistances a montré que 95% des

souches résistantes à la tétracycline portent le gène *tet(M)* et que toutes les souches résistantes aux macrolides présentent l'un des gènes *mef(A/E)* ou *erm(B)* (cf table 1 p62 et table S1 p156). Ces analyses ont également montré que toutes les souches résistantes au chloramphénicol présentent le gène *catQ*.

Des analyses par PCR ont été réalisées pour déterminer si ces gènes de résistance aux antibiotiques sont portés par des éléments intégratifs. Elles ont révélé que quasiment tous les gènes codant une résistance aux macrolides (*erm(B)* et *mef(A/E)*) ou à la tétracycline (*tet(M)*) sont portés par divers éléments intégratifs conjugatifs (Tn916, Tn3872, Tn6002 et Tn2009) ou mobilisables (MEGA). Ces analyses ont également permis de mettre en évidence la présence, chez quatre souches, d'un élément IQ qui porte des gènes de résistance à l'érythromycine (*mef(E)*) et au chloramphénicol (*catQ*) (cf FIG2 p63).

b. Détection d'autres éléments intégratifs chez *S. salivarius*

D'autres éléments intégratifs qui ne portent pas de gènes de résistance aux antibiotiques ont également été recherchés. C'est le cas des éléments modèles du laboratoire que sont les ICE de la famille ICESt3 qui ont été décrits chez *S. thermophilus* (Pavlovic *et al.*, 2004), une espèce proche de *S. salivarius*, et qui sont abondants chez les streptocoques (Ambroset *et al.*, 2016) et les IME de type IME*tRNALys* qui sont présents en abondance chez *S. agalactiae* (Puymège *et al.*, 2015). Ainsi, la présence d'ICE de la famille ICESt3 a été détectée par amplification par PCR des gènes codant l'intégrase, la relaxase et la protéine de couplage des ICE de cette famille (cf table 2 p63 et table S1 p156). De même, des IME de type IME*tRNALys* ont été détectés par amplification par PCR des gènes codant l'intégrase et la relaxase des IME de ce type. Les résultats ont montré que des ICE de la famille ICESt3 sont présents chez 44% des souches de notre collection de souches de *S. salivarius* et que des IME de type IME*tRNALys* sont présents chez 36% de ces souches (données non montrées).

L'ensemble de ces résultats montre que 98% des souches analysées portent au moins un élément intégratif et que plus de 70% des souches de la collection présentent au moins un élément intégratif porteur d'au moins un gène de résistance aux antibiotiques. Seules 3 souches ne portent aucun des éléments intégratifs testés et sont sensibles à tous les antibiotiques testés (2 souches cliniques, L8 et L58, et la souche commensale S7-16).

Ces résultats montrent donc une très grande abondance et diversité des éléments intégratifs présents chez *S. salivarius*. Ils montrent également qu'un nombre élevé de ces éléments portent des gènes de résistance aux antibiotiques. *S. salivarius* est donc un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent être transférés par conjugaison. Ces résultats suggèrent que cette espèce

participe à la dissémination des résistances aux antibiotiques au sein des écosystèmes (buccal et digestif) qu'elle colonise.

Chaffanel, F., Charron-Bourgoin, F., Libante, V., Leblond-Bourget, N., & Payot, S. (2015). Resistance genes and genetic elements associated with antibiotic resistance in clinical and commensal isolates of *Streptococcus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.00415-15

Resistance Genes and Genetic Elements Associated with Antibiotic Resistance in Clinical and Commensal Isolates of *Streptococcus salivarius*

Fanny Chaffanel, Florence Charron-Bourgoin, Virginie Libante, Nathalie Leblond-Bourget, Sophie Payot

INRA, UMR1128 DynAMic, Faculté des Sciences et Technologies, Vandœuvre-lès-Nancy, France; Université de Lorraine, UMR1128 DynAMic, Faculté des Sciences et Technologies, Vandœuvre-lès-Nancy, France

The diversity of clinical ($n = 92$) and oral and digestive commensal ($n = 120$) isolates of *Streptococcus salivarius* was analyzed by multilocus sequence typing (MLST). No clustering of clinical or commensal strains can be observed in the phylogenetic tree. Selected strains (92 clinical and 46 commensal strains) were then examined for their susceptibilities to tetracyclines, macrolides, lincosamides, aminoglycosides, and phenicol antibiotics. The presence of resistance genes *tet(M)*, *tet(O)*, *erm(A)*, *erm(B)*, *mef(A/E)*, and *catQ* and associated genetic elements was investigated by PCR, as was the genetic linkage of resistance genes. High rates of erythromycin and tetracycline resistance were observed among the strains. Clinical strains displayed either the *erm(B)* (macrolide-lincosamide-streptogramin B [MLS_B]) phenotype or *mef(A/E)* (M phenotype) resistance determinant, whereas almost all the commensal strains harbored the *mef(A/E)* resistance gene, carried by a macrolide efflux genetic assembly (MEGA) element. A genetic linkage between a macrolide resistance gene and genes of Tn916 was detected in 23 clinical strains and 5 commensal strains, with a predominance of Tn3872 elements ($n = 13$), followed by Tn6002 ($n = 11$) and Tn2009 ($n = 4$) elements. Four strains harboring a *mef(A/E)* gene were also resistant to chloramphenicol and carried a *catQ* gene. Sequencing of the genome of one of these strains revealed that these genes colocalized on an IQ-like element, as already described for other viridans group streptococci. ICES₃-related elements were also detected in half of the isolates. This work highlights the potential role of *S. salivarius* in the spread of antibiotic resistance genes both in the oral sphere and in the gut.

Streptococcus salivarius is a Gram-positive commensal bacterium that is a major bacterial constituent of saliva and of biofilms found on the human tongue dorsum (1). It belongs to the early microbial community that colonizes the oral cavities of newborns (2) and persists in the adult oral flora (3). This species is considered to contribute to oral health by preventing the colonization of mucosal surfaces with pathogens involved in upper respiratory tract infections (4). For instance, *S. salivarius* strains have been reported to inhibit biofilm formation by *Streptococcus pyogenes* (5) and *Streptococcus mutans* (6) as well as adherence by *Candida albicans* (7). *S. salivarius* is also commonly detected as an inhabitant of the gastrointestinal tracts of healthy humans and has been described as a typical small intestine commensal species (8). However, some strains have been associated with opportunistic infections: a growing number of meningitis cases (9, 10), several cases of endocarditis (11), bacteremia in immunocompromised patients (12, 13), and invasion of the guts of patients with liver cirrhosis (14).

Macrolides and tetracyclines are commonly used for the treatment of streptococcal infections, but high rates of resistance to these antibiotics have been observed among pathogenic and commensal streptococci in the past decade (15–18). Two main mechanisms of macrolide resistance in viridans group streptococci have been described: target site modification and macrolide efflux systems. Target site modification occurs by methylation of 23S rRNA mediated by rRNA methylases, leading to a conformational change that reduces the binding of macrolides, lincosamides, and streptogramin B (MLS_B) to ribosomes, conferring coresistance to these antibiotics (19). This MLS_B phenotype may be expressed constitutively (cMLS_B) or inducibly (iMLS_B) and is encoded by *erm* (erythromycin ribosome methylation) genes, of which *erm(B)* is the most common

(15, 20). In contrast, the M phenotype mechanism is characterized by a lower level of resistance to erythromycin, and only macrolides with 14 or 15 carbons are expelled from the cell through efflux pumps encoded by *mef(A/E)* (transmembrane domain) and *msr(D)* (ATP-binding domain) genes (21). In viridans group streptococci, resistance to tetracycline is conferred mainly by ribosome protection genes [such as *tet(M)* and *tet(O)*], but efflux pumps encoded by various genes [such as *tet(K)* and *tet(L)*] have also been reported (15, 22).

Mobile genetic elements (MGE) contribute largely to the evolution and diversity of bacterial genomes through horizontal gene transfer (23, 24). Integrative and conjugative elements (ICEs) are MGE that promote their own excision, transfer by conjugation, and integration into a replicon of the recipient cell (25, 26). MGE usually encode adaptive functions that may cause drastic changes in the ecological and/or pathogenic properties of bacterial species. A variety of MGE conferring antibiotic resistance, particularly el-

Received 6 February 2015 Accepted 4 April 2015

Accepted manuscript posted online 10 April 2015

Citation Chaffanel F, Charron-Bourgoin F, Libante V, Leblond-Bourget N, Payot S. 2015. Resistance genes and genetic elements associated with antibiotic resistance in clinical and commensal isolates of *Streptococcus salivarius*. Appl Environ Microbiol 81:4155–4163. doi:10.1128/AEM.00415-15.

Editor: D. W. Schaffner

Address correspondence to Sophie Payot, payot@nancy.inra.fr.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00415-15>.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AEM.00415-15

ements of the Tn916 family, have been described for streptococci, especially for the two species *Streptococcus pneumoniae* and *S. pyogenes*, which have been studied intensively (27, 28). In contrast, little is known about the prevalence of MGE in commensal bacteria (15, 29), even if they likely act as a reservoir of antibiotic resistance genes transferable to pathogenic bacteria (30–32).

In this work, a large collection of *S. salivarius* strains comprising 120 commensal strains (half isolated from feces and half from saliva) and 92 clinical strains was analyzed by multilocus sequence typing (MLST). One hundred thirty-eight strains (46 commensal strains and the 92 clinical strains) were then selected to reflect the diversity of the collection and were analyzed for their susceptibilities to macrolides, lincosamides, tetracyclines, aminoglycosides, and phenicol antibiotics. PCR was then carried out to search for antibiotic resistance genes and MGE in these strains. For MGE, the focus was on elements described in other streptococci: Tn916 [and variants carrying the *erm*(B) and *mef*(A/E) resistance genes] (27, 28), ICES_{St3} (33, 34), the macrolide efflux genetic assembly (MEGA) element (28), and the IQ element (15, 35). In addition, some elements were tested by PCR for excision in order to evaluate their functionality.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains. Commensal bacterial strains were isolated from the oral cavities and feces of 5 healthy human individuals who had not received antibiotic treatment in the preceding 2 months (four children 15 to 33 months old whose parents gave written consent and one 38-year-old adult from whom written consent was obtained). An aliquot of fresh saliva was diluted in 5 ml M17 broth with 1% glucose (36) and was incubated overnight at 37°C under an anaerobic atmosphere. Feces (0.2 to 0.5 g) was diluted in 5 ml M17 broth with 1% glucose. Dilutions of both samples were then spread on selective mitis salivarius agar (MSA; Difco) plates containing a 1% (wt/vol) tellurite solution. Bacteria were grown at 37°C for 24 to 48 h under an anaerobic atmosphere. A total of 1,000 (100 from the saliva and 100 from the feces of each individual) presumptive *S. salivarius* colonies (i.e., smooth blue “gumdrop” colonies on the selective medium) were picked up and were subcultured 3 times on M17 agar supplemented with 1% glucose before being stored at –80°C. The first letter in the name of each commensal strain stands for the biological material from which it was collected (F for feces and S for saliva), and the first number identifies the human subject (see Table S1 in the supplemental material).

In addition, 92 human clinical strains of *S. salivarius* isolated from different body locations (blood, aortic valve, bones, etc.) were collected from 4 different French university hospitals: Besançon (*n* = 8), Limoges (*n* = 60), Nancy (*n* = 18), and Tours (*n* = 6) (see Table S1 in the supplemental material). The first letter in the name of each clinical strain indicates its geographical origin (B for Besançon, L for Limoges, N for Nancy, and T for Tours).

Multiplex PCR analysis of isolates. All strains (both clinical and commensal isolates) were tested by multiplex PCR, with a 492-bp fragment for the *ilvC* gene (encoding ketol-acid reductoisomerase and specific for *S. salivarius*), a 620-bp fragment for the 23S ribosomal gene (specific for *Streptococcus*), and a 100-bp fragment for the 16S ribosomal gene (positive control for PCRs) (C. Delorme, personal communication). The primers used are listed in Table S2 in the supplemental material. PCR amplifications were carried out in a 25- μ l volume containing 1 μ l of overnight bacterial culture, 0.4 μ M each deoxynucleoside triphosphate (dNTP) (Thermo Scientific, France), 0.8 μ M 16S rRNA-specific primers, 0.32 μ M 23S rRNA-specific primers, 0.4 μ M *ilvC*-specific primers, and 2.5 U of DreamTaq DNA polymerase in an appropriate buffer (Thermo Scientific, France). PCR amplifications were performed using the following cycling parameters: 10 min at 95°C (extended time to ensure proper lysis of bac-

terial cells and DNA release), followed by 30 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 53°C, and 1 min at 72°C, with a final 5-min extension at 72°C. Amplified products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel.

MLST analysis of isolates. One hundred twenty commensal isolates (12 oral and 12 fecal isolates per individual) identified as *S. salivarius* by multiplex PCR were selected by visual inspection of the broth cultures (for a phenotype of flocculation or sedimentation) to maximize the diversity of the strains. In total, 212 strains (120 commensal and 92 clinical strains) were analyzed by multilocus sequence typing (MLST). MLST indexes the diversity of the nucleotide sequences of internal fragments of a set of housekeeping genes. Analysis was performed using the *ilvC* (encoding ketol-acid reductoisomerase), *sodA* (encoding superoxide dismutase), *ddlA* (encoding D-alanine ligase), *thrS* (encoding threonyl-tRNA synthetase), *pyrE* (encoding orotate phosphoribosyltransferase), and *dnaE* (encoding DNA polymerase III) genes with the amplification conditions described previously by Delorme et al. (37). The primers used are listed in Table S2 in the supplemental material. The six PCR products (404 to 519 bp of internal gene fragments), obtained independently for each isolate, were examined on a 1.5% agarose gel before sequencing. For each locus, all the sequences were compared using the BioEdit program and Vector NTI software, and new allele numbers were arbitrarily assigned to the sequences if they had not already been described by Delorme et al. (37). For each strain, the combination of alleles at each locus defined an allelic profile, or sequence type (ST).

Phylogenetic analysis of the nucleotide sequences of each housekeeping gene both separately and in a concatenated sequence of 2,299 bp (excluding the *ilvC* gene) was performed using the neighbor-joining (NJ) method and SeaView software (38). A model of the Kimura 2-parameter distance was used to estimate distances for nucleotide sequences. The significance of the groups observed in constructed trees was determined by a bootstrap analysis with 1,000 replicates.

Pulsed-field gel electrophoresis. Pulsed-field gel electrophoresis experiments were carried out using a CHEF-DR III system (Bio-Rad) with SmaI as the restriction enzyme as described previously (39).

Susceptibility to antimicrobial agents and double-disk induction test (D-test). Clinical strains (*n* = 92) and commensal strains belonging to different STs (26 feces isolates and 20 saliva isolates, with a maximum of 2 strains with the same ST per sampling site per individual) were analyzed for their susceptibilities to five families of antibiotics, including tetracyclines (tetracycline, 30 μ g per disk), macrolides (erythromycin, 15 μ g per disk; spiramycin, 100 μ g per disk), lincosamides (lincomycin, 15 μ g per disk), aminoglycosides (kanamycin, 1,000 μ g per disk), and phenicol antibiotics (chloramphenicol, 30 μ g per disk). Antibiotic susceptibility was determined in accordance with the guidelines of the Antibiogram Committee of the French Society of Microbiology (CA-SFM) (http://www.sfm-microbiologie.org/page/page/showpage/page_id/90.html) by a standard disk diffusion assay on Mueller-Hinton agar supplemented with 5% horse blood. *S. pneumoniae* ATCC 49619 was used as the quality control in each assay. The zone diameters were measured to evaluate the susceptibility of each strain to each antibiotic. The 2014 CA-SFM breakpoints used were as follows: erythromycin, <19 mm; chloramphenicol, <23 mm; tetracycline, <21 mm; spiramycin, <19 mm; lincomycin, <19 mm; kanamycin, <11 mm.

D-tests were performed to determine the phenotypes of macrolide-lincosamide-streptogramin resistance (40). A bacterial suspension was adjusted to match the turbidity of a 0.5 McFarland standard and was streaked onto Mueller-Hinton agar supplemented with 5% horse blood. An erythromycin disk (15 μ g) and a lincomycin disk (15 μ g) were placed on the agar surface 15 mm apart. The plate was incubated for 18 h at 37°C. A “D”-shaped area of inhibition around the lincomycin disk was interpreted as indicating inducible resistance to lincosamides (40).

Detection of antibiotic resistance genes by PCR. The macrolide resistance genes *erm*(A), *erm*(B), and *mef*(A/E) and the tetracycline resistance genes *tet*(M) and *tet*(O) were detected by PCR amplification using the primers listed in Table S2 in the supplemental material and the con-

ditions previously described by Malhotra-Kumar et al. (41) for multiplex PCR [except for *erm*(B) primers, used at 0.8 μ M instead of 0.5 μ M]. The chloramphenicol resistance gene *catQ* was detected as described by Del Grosso et al. (42).

Detection of genetic elements and tests of excision. The integrase, relaxase, and coupling protein genes of ICES_{St3} from *Streptococcus thermophilus* (33) and the relaxase gene of Tn916 from *Enterococcus faecalis* (43) were detected by PCR amplification using the primers listed in Table S2 in the supplemental material. The linkage of *erm*(B) and *mef*(A/E) with genes of genetic elements (Tn3872, Tn6002, Tn2009, the MEGA element, and the IQ element) was also examined (for the primers used, see Table S2 in the supplemental material).

Tests of excision consisted of the detection of the *attI* site of the circular form of ICES_{St3}, Tn916, and Tn916-related elements) (see Table S2 in the supplemental material for the primers used). For ICES_{St3} elements, detection of an empty integration site (*attB*) was also performed.

PCR amplifications were carried out in a 25- μ l volume containing 1 μ l of overnight bacterial culture, 0.4 μ M each dNTP (Thermo Scientific, France), 0.5 μ M each primer, and 2.5 U of DreamTaq DNA polymerase in an appropriate buffer (Thermo Scientific, France). PCR amplifications were performed by using the following cycling parameters: 10 min at 95°C, followed by 30 to 35 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 50°C, and 1 min/kb at 72°C, with a final 5-min extension at 72°C. Amplified products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel.

DNA sequencing and sequence analysis. PCR products for the MLST analysis were sequenced by Beckman Coulter Genomics. The genome of *S. salivarius* strain F4-20 was sequenced using an Illumina HiSeq 2000 sequencer by Beckman Coulter Genomics (read length, 2 \times 100 bp after paired-end library construction; 60 \times coverage). *De novo* assembly was performed by using CLC Genomics Workbench (CLC bio) with default parameters. Contigs were annotated using the RAST annotation server (<http://rast.nmpdr.org/>) (44, 45). Pairwise comparisons of elements were performed with the Artemis Comparison Tool (46), provided by the Sanger Centre, using comparison files generated by Double Act (http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/pise/double_act.html). Comparison figures were manually edited using Inkscape.

Nucleotide sequence accession numbers. The sequences of all MLST alleles have been deposited in the European Nucleotide Archive under accession numbers LN811537 to LN811552 (*ilvC* fragment), LN811553 to LN811570 (*sodA* fragment), LN811571 to LN811614 (*ddlA* fragment), LN811615 to LN811648 (*dnaE* fragment), LN811649 to LN811675 (*pyrE* fragment), and LN811676 to LN811704 (*thrS* fragment). The sequence of the IQ-like element of *S. salivarius* strain F4-20 has been deposited in the European Nucleotide Archive and assigned accession number LN812955.

RESULTS

MLST analysis of *S. salivarius* isolates. Two hundred twelve isolates (60 fecal isolates, 60 oral isolates, and 92 clinical strains) were subjected to MLST analysis. The number of alleles detected was 20 for the *ilvC* gene, 25 for the *sodA* gene, 34 each for the *thrS* and *pyrE* genes, 43 for the *dnaE* gene, and 51 for the *ddlA* gene. Two kinds of *ilvC* genes were detected; thus, this gene was not used in the construction of the phylogenetic tree. Ninety-six different STs, all different from the 27 STs described by Delorme et al. (37), were identified (see Table S1 in the supplemental material). Three STs (ST82, ST83, and ST117) share 4 common alleles, and 13 STs (ST32, ST35, ST51, ST62, ST63, ST71, ST72, ST84, ST85, ST95, ST102, ST111, and ST122) share 3 common alleles, with previously described STs (37) (see Table S1 in the supplemental material). A high diversity of strains was observed, without clear clustering of the strains on the phylogenetic tree (Fig. 1). In particular, commensal and clinical strains did not appear in separate clusters.

The most common STs were ST83 (1 clinical and 22 commensal strains), ST57 (15 commensal strains), ST94 (4 clinical and 8

commensal strains), ST44 (12 commensal strains), and ST114 (11 commensal strains).

Some STs were found in 2 clinical strains isolated in the same hospital but not in the same year (ST40 and ST68) or in two different hospitals (ST72). No clonal relationship was observed, even between strains isolated in the same hospital in the same year (except for strains L28 and L33, strains L19 and L23, and strains L38 and L41).

Most of the individuals harbored multiple oral and fecal strains with different STs (as many as 5 STs for 12 strains analyzed per sampling site per individual). All individuals (except for individual 1) harbored strains belonging to the same ST at the two sampling sites analyzed (saliva and feces) (see Table S1 in the supplemental material).

Antimicrobial susceptibility and presence of antibiotic resistance genes. Clinical strains ($n = 92$) and commensal strains belonging to different STs (26 fecal isolates and 20 saliva isolates) were analyzed for their susceptibilities to 6 antibiotics (erythromycin, spiramycin, lincomycin, tetracycline, chloramphenicol, and kanamycin) (see Table S1 in the supplemental material).

The results indicated that only 41% of the clinical isolates and 24% of the commensal isolates were susceptible to all the antimicrobials tested (see Table S1 in the supplemental material). High rates of erythromycin resistance were found for both clinical isolates (56%; $n = 52$) and commensal isolates (76%; $n = 35$) (Table 1). No difference in erythromycin resistance was observed between strains isolated from the saliva or feces of healthy individuals. Among the 52 clinical strains that were resistant to erythromycin, 21 harbored only an *erm*(B) gene (cMLS_B phenotype, except for strain L31, with an iMLS_B phenotype), 29 carried only a *mef*(A/E) gene (M phenotype), and 2 (L29 and L57) carried both *erm*(B) and *mef*(A/E) genes (Table 1). Most of the erythromycin-resistant commensal strains harbored a *mef*(A/E) gene (M phenotype) ($n = 32$), and only three carried an *erm*(B) gene (cMLS_B phenotype) (Table 1). Eight strains (5 commensal and 3 clinical) were susceptible to spiramycin but resistant to lincomycin.

The second-highest resistance rates were those against tetracycline: 28% ($n = 26$) for the clinical strains and 17% ($n = 8$) for the commensal strains. Most of the tetracycline-resistant strains carried a *tet*(M) gene ($n = 32$) (see Table S1 in the supplemental material). No *tet*(M) or *tet*(O) tetracycline resistance determinant was detected in 2 strains (L29 and T80). Three clinical strains (L25, L31, and L57) carried a *tet*(M) gene but were susceptible to tetracycline.

Two clinical strains (L20 and N11) and two commensal strains (F3-10 and F4-20) were resistant both to chloramphenicol and to erythromycin. These four strains were found to carry a *mef*(A/E) and a *catQ* gene. In addition, only two clinical strains (T00 and T80) were resistant to kanamycin.

Strains with different antibiotic resistance patterns were isolated from the two sampling sites (oral and fecal) of the same individual. In addition, some fecal and oral isolates of the same individual belonged to the same ST (i.e., ST27, ST32, ST57, ST83, ST94, ST105, and ST114) and harbored the same antibiotic resistance profile (see Table S1 in the supplemental material).

Detection of genetic elements and tests of excision. We searched for four families of genetic elements: (i) the integrative and conjugative element ICES_{St3} (34) described for *S. thermophilus*, a species that is closely related to *S. salivarius*, (ii) the integrative and conjugative element Tn916 and its variants carrying either an



FIG 1 Phylogenetic tree based on the concatenated sequences of five housekeeping genes, *ddlA*, *dnaE*, *thrS*, *pyrE*, and *sodA*, obtained for the clinical and commensal isolates of *S. salivarius* included in this work ($n = 138$). Three strains of *S. salivarius* (JIM8777, CCHSS3, and 57.1) whose genomes have been sequenced were added to the phylogenetic tree as references. Commensal isolates are indicated in boldface. Bootstrap values that are >80% are given at the nodes.

erm(B) (Tn3872 and Tn6002) or a *mef(A/E)* gene (Tn2009) (28), (iii) the MEGA element, which carries a *mef(A/E)* gene, and (iv) the IQ element, recently identified in viridans group streptococci (15).

More than one-third of the clinical strains ($n = 36$) and half of the commensal strains ($n = 24$) were positive for the relaxase gene of ICES $t3$ (Table 2; see also Table S1 in the supplemental material). Among these strains, 23 clinical and 15 commensal strains were also positive for the integrase gene of ICES $t3$ (specific for integration in the *fdA* gene, encoding fructose-1,6-diphosphate aldolase). Sixteen strains were tested for excision of ICES $t3$, and in each case, a positive signal was obtained for both *attB* (empty integration site) and *attI* (circular form), indicating that these ICEs are functional for their excision (Table 2).

Thirty-one clinical strains and 30 commensal strains gave a positive signal for the MEGA element (Table 2; see also Table S1 in the supplemental material), and all were positive for the *mef(A/E)* gene. Two commensal strains (F3-10 and F4-20) carried a *mef(A/E)* gene but did not harbor a MEGA element. These strains were also resistant to chloramphenicol. The genome of strain F4-20 was sequenced in order to identify the chloramphenicol resistance gene and its genetic context. We found that this strain carries a *catQ* resistance gene, which colocalizes with a *mef(E)* gene on an IQ-like element of 12,038 bp (Fig. 2). This element differs from the IQ element described for *S. pneumoniae* strain 529 (47) in that it carries a *mef(E)* gene instead of a *mef(I)* gene. In addition, it lacks the right *tnp1* gene (and is thus a defective element) and 2 open reading frames (ORFs) located between the left *tnp1* gene and the trio of recombinase genes (Fig. 2). No other genetic element was detected in the vicinity of this genetic element. Two other chloramphenicol-resistant strains (L20 and N11) harbored a *mef(A/E)* and a *catQ* gene but also carried a MEGA element.

Forty-one clinical strains (44%) and 11 commensal strains (24%) carried the relaxase gene of Tn916 (Table 2; see also Table S1 in the supplemental material). Among these, 23 clinical and 6 commensal strains were also positive for the *tet(M)* gene. Twenty-three Tn916 elements were tested for excision, but no circular form was detected. A genetic linkage between the *erm(B)* gene and Tn916 genes was detected for 21 clinical strains (13 Tn3872 and 8 Tn6002 elements) and 3 commensal saliva strains (3 Tn6002 elements) (Table 2; see also Table S1 in the supplemental material). Two strains (L25 and L31) carried a Tn3872 element with a silent *tet(M)* gene. One clinical strain (T00) gave positive signals for both Tn3872 and Tn6002 elements. Thirteen Tn3872 and 11 Tn6002 elements were tested for excision, but no circular form was detected (Table 2; see also Table S1 in the supplemental material).

Among the 22 strains (12 clinical and 10 commensal) that carried a *mef(A/E)* gene and a Tn916 relaxase gene, 4 (2 clinical and 2 commensal) showed a genetic linkage between the *mef(A/E)* gene and the *tet(M)* gene, as in Tn2009 (Table 2; see also Table S1 in the supplemental material). These 4 Tn2009 elements were tested for excision, but no circular form was observed.

Thirty-two strains (13 clinical and 19 commensal) harbored both MEGA and ICES $t3$ elements; 22 strains (12 clinical and 10 commensal) carried both MEGA and Tn916 elements; and 8 strains (2 clinical and 6 commensal) carried all three of these genetic elements.

Strains with different genetic element contents were isolated from the two sampling sites (oral and fecal) of the same individual.

TABLE 1 Antimicrobial susceptibilities and resistance gene contents of *Streptococcus salivarius* isolates ($n = 138$)

Source	No. of isolates	No. (%) of isolates resistant to ^a :										No. of isolates positive for the following gene(s):					
		Ery	Spi	Lin	Tet	Ery + Tet	Chl	Kan	<i>erm(B)</i>	<i>mef(A/E)</i>	<i>tet(M)</i>	<i>catQ</i>	<i>erm(B)</i> + <i>mef(A/E)</i>	<i>erm(B)</i> + <i>tet(M)</i>	<i>mef(A/E)</i> + <i>tet(M)</i>	<i>erm(B)</i> + <i>mef(A/E)</i> + <i>tet(M)</i>	<i>mef(A/E)</i> + <i>catQ</i>
Clinical	92	52 (56)	23 (25)	16 (17)	26 (28)	24 (26)	2 (2)	2 (2)	23 ^b	31 ^b	27	2	2	19	7	1	2
Commensal																	
Feces	26	20 (77)	1 (4)	4 (15)	4 (15)	4 (15)	2 (8)	0 (0)	1	19	4	2	0	0	4	0	2
Saliva	20	15 (75)	2 (10)	4 (20)	4 (20)	4 (20)	0 (0)	0 (0)	2	13	4	ND ^c	0	2	2	0	ND

^a Ery, erythromycin; Spi, spiramycin; Lin, lincomycin; Tet, tetracycline; Chl, chloramphenicol; Kan, kanamycin.

^b Two strains carry a *mef(A/E)* gene and an *erm(B)* gene.

^c ND, not determined. The *catQ* gene was searched for only in chloramphenicol-resistant strains.

TABLE 2 Genetic element contents of *Streptococcus salivarius* isolates ($n = 138$)

Source	No. of isolates	No. with the following genetic element (excision, ^a no. of isolates tested for excision):						
		ICEST3 <i>rel</i> ^b	MEGA [<i>mef</i> (A/E) element]	Tn916 <i>rel</i> ^b	Tn3872 [<i>erm</i> (B) in <i>orf9</i> of Tn916]	Tn6002 [<i>erm</i> (B) in <i>rel</i> of Tn916]	Tn2009 [<i>mef</i> (A/E) in <i>orf6</i> of Tn916]	IQ-like element [<i>mef</i> (A/E) and <i>catQ</i> linkage]
Clinical	92	36 (yes, 13)	31	41 (no, 23)	13 (no, 13)	8 (no, 8)	2 (no, 2)	2
Commensal								
Feces	26	13 (yes, 2)	17	7	0	1 (no, 1)	2 (no, 2)	2
Saliva	20	11 (yes, 1)	13	4	0	2 (no, 2)	0	0

^a Occurrence (yes) or absence (no) of excision.

^b A positive signal in the PCR detecting the relaxase (*rel*) gene of the ICEST3 or Tn916 element was interpreted as the presence of this genetic element.

In addition, some fecal and oral isolates of the same individual that belonged to the same ST (i.e., ST27, ST32, ST57, ST83, ST94, ST105, and ST114) harbored the same genetic elements (see Table S1 in the supplemental material). These strains were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis and were found to harbor identical electrophoresis patterns (data not shown).

DISCUSSION

To our knowledge, this is the first study to examine the antimicrobial susceptibilities, antibiotic resistance genes, and genetic elements of *S. salivarius* strains recovered in human infections (clinical strains). This is also the first comparison of commensal strains isolated from different sampling sites (oral and fecal) of the same healthy individuals.

MLST of these isolates revealed a high diversity of strains irrespective of clinical or commensal origin. No clear clustering of the strains could be observed in the phylogenetic tree. Strains isolated in the same hospital were not usually clonal. In addition, clinical and commensal strains are distributed all over the branches of the phylogenetic tree. This is consistent with the occurrence of opportunistic infections following accidental introduction of *S. salivarius* into the patient's body (after surgery or another medical procedure), as reported in a previous study conducted by Delorme et al. (37). It is thus probable that strains found in the microbial flora of healthy individuals (referred to as "commensal strains" in this work) could cause disease symptoms if the opportunity arose (after injury, decrease of host defenses, etc.).

A high rate of erythromycin resistance was observed for clinical isolates and an even higher rate for commensal isolates ($\geq 75\%$ and 56% erythromycin resistance in commensal and clinical

strains, respectively). This is consistent with earlier studies reporting high pharyngeal carriage of erythromycin-resistant viridans group streptococci in healthy individuals (20, 48). Almost equal numbers of *erm*(B) (MLS_B phenotype) and *mef*(A/E) (M phenotype) erythromycin resistance determinants were detected in clinical strains, whereas commensal strains harbored the *mef*(A/E) gene almost exclusively. Previous studies conducted on commensal *S. salivarius* strains reported a dominance of either the *erm*(B) determinant (20, 49) or the *mef*(A/E) determinant (15, 48) in this species. One hypothesis to explain the difference in *erm*(B) and *mef*(A/E) distribution between clinical and commensal strains could be that strains isolated in cases of infection in hospitals are more exposed to high-level erythromycin [and thus to selection of the *erm*(B) determinant] than commensal strains. Except for one, all strains carrying an *erm*(B) gene displayed a constitutive MLS_B phenotype, as observed by other authors for viridans group streptococci (15).

Most of the strains that carried an *erm*(B) gene were positive for the Tn916 relaxase and *tet*(M) genes and were thus resistant to both erythromycin and tetracycline. A physical linkage between the *erm*(B) gene and Tn916 genes was proved for a large proportion of these strains. The most common insertion of the *erm*(B) gene occurs in the *orf9* gene of Tn916 (Tn3872 element), but a few insertions in the relaxase gene of Tn916 (Tn6002 elements) have also been detected. One clinical strain gave positive signals for both Tn3872 and Tn6002. The predominance of Tn3872 elements in *S. salivarius* was also noticed by Ciric et al. (49), but this is the first description of the presence of both elements in the same strain. To date, conjugal transfer of Tn3872 has been observed at

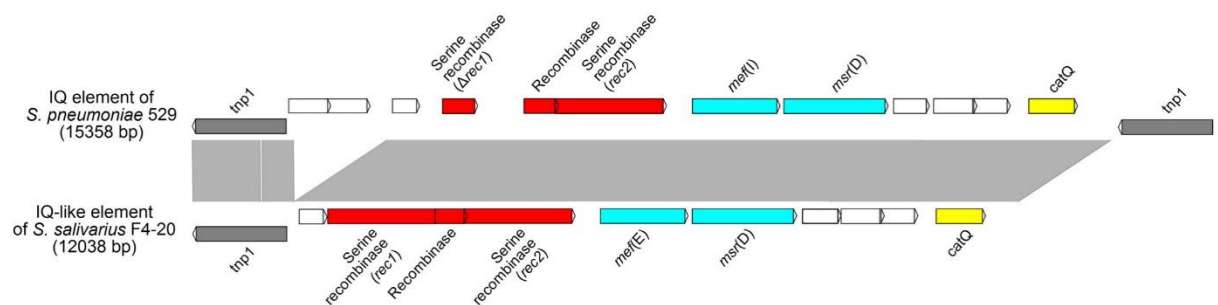


FIG 2 Schematic representation of the IQ-like element found in *S. salivarius* strain F4-20 compared to the IQ element described for *S. pneumoniae* 529 (47). ORFs appear as arrows. Genes are color-coded as follows: dark gray, transposase genes; red, recombination genes; blue, erythromycin resistance genes; yellow, the *catQ* gene. Nucleic acid identity higher than 80% between sequences is indicated by light shading.

very low frequencies and only between *S. pyogenes* strains (28, 29). Tn6002 was found to be able to transfer by conjugation between *S. pneumoniae* and *S. pyogenes*, albeit at a low frequency and in a recipient-dependent manner (50). Hence, conjugative transfer of these elements cannot be excluded if propitious conditions are encountered (adequate bacterial recipient cells in particular). Under the conditions tested in this work, no excision of these elements was detected, precluding any transfer of these elements by conjugation.

Most of the erythromycin-resistant strains that carried a *mef(A/E)* gene were also positive for the MEGA element. This genetic element has been reported by Brenciani et al. to be frequent in viridans group streptococci (15). It can contribute to the dissemination of erythromycin resistance genes, since conjugative mobilization of MEGA from viridans group streptococci to *S. pyogenes* and *S. pneumoniae* has been reported (51, 52). Forty-six strains that harbor a MEGA element also carry a conjugative element related to ICES_{t3} or Tn916 that could participate in the conjugative mobilization of MEGA. A physical linkage between *mef(A/E)* and *tet(M)* genes (Tn2009 element [28]) was detected in 4 strains (2 clinical and 2 commensal). To our knowledge, this is the first report of an association of the *mef(A/E)* and *tet(M)* genes on the same genetic element in *S. salivarius*. No conjugative transfer of Tn2009 has been observed to date, but its transfer was obtained by transformation in *S. pneumoniae* (29). Since many streptococcal species (in particular *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. thermophilus*, and *S. salivarius*) can acquire genes by natural transformation (53, 54), this mechanism of lateral gene transfer likely also plays a role in the dissemination of antibiotic resistance.

Four chloramphenicol-resistant strains harbored *mef(A/E)* and *catQ* genes. Sequencing of the genome of one of these strains revealed that erythromycin [*mef(E)* gene] and chloramphenicol (*catQ* gene) resistance determinants colocalized on a genetic element related to the IQ element described for *S. pneumoniae* (47) and *S. pyogenes* (42). The IQ_{F4-20} element is similar to those reported very recently for other viridans group streptococcal species (15) except for the deletion of the 2 ORFs downstream of the left *tnp1* gene. This is the first description of this variant and the first description of an IQ-like element in *S. salivarius*. In *S. pneumoniae* and *S. pyogenes*, the IQ element is carried by larger genetic elements that harbor a conjugative module of the ICE Tn5252 family and either a recombination module similar to that of ICES_{p23FST81} (integration in the *rplL* gene for ICES_{Spn529IQ} and ICES_{Spy029IQ}) or the recombination module of Tn5252 (for ICES_{Spy005IQ}) (35). ICES_{Spn529IQ} and ICES_{Spy029IQ} also carry a Tn916 fragment with a silent *tet(M)* gene. Only ICES_{Spy005IQ} was found to excise itself and transfer by conjugation (35). No ICE was detected in the vicinity of the *mef(E)* and *catQ* genes in the genome of the commensal strain F4-20 that was analyzed, ruling out acquisition of this genetic element by conjugation.

Tetracycline resistance correlated in most cases with the presence of a *tet(M)* gene carried by Tn916 or Tn916-related elements. This is consistent with previous studies that also described the predominance of this tetracycline resistance determinant in viridans group streptococci (15, 20). No *tet(M)* or *tet(O)* gene was identified in three of the tetracycline-resistant strains. These strains thus harbor an uncommon tetracycline resistance determinant that remains to be identified. A similar observation was made by Brenciani et al. in their recent survey of antibiotic resistance determinants in viridans group streptococci (15). Furthermore,

three silent *tet(M)* genes were detected in clinical strains, two of them carried by Tn3872 elements. This has already been reported for other streptococci (15, 28).

A large proportion of the clinical and commensal isolates of *S. salivarius* also harbored elements related to *S. thermophilus* ICES_{t3} (34). This is the first report of the presence of such elements in *S. salivarius*. One-third of these elements were negative for the *fdA* integrase, suggesting that the conjugative module of this family of elements can be associated with other recombination modules. It is likely that these elements participate in gene transfers (by conjugation or mobilization of other elements) between *S. salivarius* and pathogenic streptococci or streptococci used in the food industry.

High erythromycin and tetracycline resistance rates were observed in the clinical and commensal strains of *S. salivarius* analyzed in this study. In addition, most of the individuals harbored multiple oral and fecal strains of *S. salivarius* with different antibiotic resistance patterns and genetic element contents. This suggests that this species is a reservoir of antibiotic resistance genes and participates in lateral gene transfers with other species in both the oral and fecal spheres. This further confirms the role of commensal bacteria as a reservoir of antibiotic resistance genes (30–32).

ACKNOWLEDGMENTS

F.C. is the recipient of a scholarship from the Ministère de l'Éducation Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. This work received financial support from the Région Lorraine and the Université de Lorraine (2011 to 2013).

We are grateful to Christine Delorme (INRA UMR1319 MICALIS, Jouy-en-Josas, France) for helpful discussions on the isolation and species identification of *S. salivarius*. We are indebted to Marie-Cécile Ploy (Centre Hospitalier Universitaire, Limoges, France), Alain Lozniewski and Corentine Alauzet (Centre Hospitalier Universitaire, Nancy, France), Xavier Bertrand (Centre Hospitalier Universitaire, Besançon, France), and Laurent Mereghetti (Centre Hospitalier Universitaire, Tours, France) for providing the clinical strains used in this study. We thank Setha Ketavong, Maxime Toussaint, Pauline Maigrat, Mylène Maury, Alexis Durand, Yoann Perrin, Anthony Gauthier, and Stéphanie Gagne for technical help.

REFERENCES

1. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721–5732. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>.
2. Sampaio-Maia B, Monteiro-Silva F. 2014. Acquisition and maturation of oral microbiome throughout childhood: an update. *Dent Res J (Isfahan)* 11:291–301.
3. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. 2010. The human oral microbiome. *J Bacteriol* 192:5002–5017. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00542-10>.
4. Wescombe PA, Hale JD, Heng NC, Tagg JR. 2012. Developing oral probiotics from *Streptococcus salivarius*. *Future Microbiol* 7:1355–1371. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.12.113>.
5. Fiedler T, Riani C, Koczan D, Standar K, Kreikemeyer B, Podbielski A. 2013. Protective mechanisms of respiratory tract streptococci against *Streptococcus pyogenes* biofilm formation and epithelial cell infection. *Appl Environ Microbiol* 79:1265–1276. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.03350-12>.
6. Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H. 2009. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 24:152–161. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-302X.2008.00489.x>.
7. Ishijima SA, Hayama K, Burton JP, Reid G, Okada M, Matsushita Y,

- Abe S. 2012. Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on the *in vitro* growth of *Candida albicans* and its protective effect in an oral candidiasis model. *Appl Environ Microbiol* 78:2190–2199. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.07055-11>.
8. Van den Bogert B, Boekhorst J, Herrmann R, Smid EJ, Zoetendal EG, Kleerebezem M. 2013. Comparative genomics analysis of *Streptococcus* isolates from the human small intestine reveals their adaptation to a highly dynamic ecosystem. *PLoS One* 8:e83418. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0083418>.
 9. Shirokawa T, Nakajima J, Hirose K, Suzuki H, Nagaoka S, Suzuki M. 2014. Spontaneous meningitis due to *Streptococcus salivarius* subsp. *salivarius*: cross-reaction in an assay with a rapid diagnostic kit that detected *Streptococcus pneumoniae* antigens. *Intern Med* 53:279–282. <http://dx.doi.org/10.2169/internalmedicine.53.0803>.
 10. Wilson M, Martin R, Walk ST, Young C, Grossman S, McKean EL, Aronoff DM. 2012. Clinical and laboratory features of *Streptococcus salivarius* meningitis: a case report and literature review. *Clin Med Res* 10:15–25. <http://dx.doi.org/10.3121/cmr.2011.1001>.
 11. Kitten T, Munro CL, Zollar NQ, Lee SP, Patel RD. 2012. Oral streptococcal bacteremia in hospitalized patients: taxonomic identification and clinical characterization. *J Clin Microbiol* 50:1039–1042. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06438-11>.
 12. Corredoira JC, Alonso MP, Garcia JF, Casariego E, Coira A, Rodriguez A, Pita J, Louzao C, Pombo B, Lopez MJ, Varela J. 2005. Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and *Streptococcus bovis* bacteremia: a prospective 16-year study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:250–255. <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-005-1314-x>.
 13. Han XY, Kamana M, Rolston KV. 2006. Viridans streptococci isolated by culture from blood of cancer patients: clinical and microbiologic analysis of 50 cases. *J Clin Microbiol* 44:160–165. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.44.1.160-165.2006>.
 14. Qin N, Yang F, Li A, Prifti E, Chen Y, Shao L, Guo J, Le Chatelier E, Yao J, Wu L, Zhou J, Ni S, Liu L, Pons N, Batto JM, Kennedy SP, Leonard P, Yuan C, Ding W, Hu X, Zheng B, Qian G, Xu W, Ehrlich SD, Zheng S, Li L. 2014. Alterations of the human gut microbiome in liver cirrhosis. *Nature* 513:59–64. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13568>.
 15. Brenciani A, Tiberi E, Tili E, Mingoaia M, Palmieri C, Varaldo PE, Giovanetti E. 2014. Genetic determinants and elements associated with antibiotic resistance in viridans group streptococci. *J Antimicrob Chemother* 69:1197–1204. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkt495>.
 16. Doern CD, Burnham CA. 2010. It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. *J Clin Microbiol* 48:3829–3835. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01563-10>.
 17. ONERBA France. June 2014. Annual report, 2011–2012. http://www.onerba.org/IMG/pdf/onerba_rapport_2011_web.pdf.
 18. Wimmerstedt A, Kahlmeter G. 2008. Associated antimicrobial resistance in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Clin Microbiol Infect* 14:315–321. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01946.x>.
 19. Leclercq R. 2002. Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 34:482–492. <http://dx.doi.org/10.1086/324626>.
 20. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Martel A, Mallentjer C, Chapelle S, Verhoeven J, Wijdooghe M, Haesebrouck F, Goossens H. 2004. Oropharyngeal carriage of macrolide-resistant viridans group streptococci: a prevalence study among healthy adults in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 53:271–276. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkh026>.
 21. Sutcliffe J, Tait-Kamradt A, Wondrack L. 1996. *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrob Agents Chemother* 40:1817–1824.
 22. Rodriguez-Avial I, Rodriguez-Avial C, Culebras E, Picazo JJ. 2003. Distribution of tetracycline resistance genes *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(L)* and *tet(K)* in blood isolates of viridans group streptococci harbouring *erm(B)* and *mef(A)* genes. Susceptibility to quinupristin/dalfopristin and linezolid. *Int J Antimicrob Agents* 21:536–541. [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00062-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00062-1).
 23. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 3:722–732. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1235>.
 24. Gogarten JP, Townsend JP. 2005. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol* 3:679–687. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1204>.
 25. Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N, Guedon G. 2014. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol Rev* 38:720–760. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6976.12058>.
 26. Wozniak RA, Waldor MK. 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* 8:552–563. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2382>.
 27. Roberts AP, Mullany P. 2011. Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 35:856–871. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00283.x>.
 28. Varaldo PE, Montanari MP, Giovanetti E. 2009. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 53:343–353. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00781-08>.
 29. Santoro F, Vianna ME, Roberts AP. 2014. Variation on a theme; an overview of the Tn916/Tn1545 family of mobile genetic elements in the oral and nasopharyngeal streptococci. *Front Microbiol* 5:535. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00535>.
 30. Broaders E, Gahan CG, Marchesi JR. 2013. Mobile genetic elements of the human gastrointestinal tract: potential for spread of antibiotic resistance genes. *Gut Microbes* 4:271–280. <http://dx.doi.org/10.4161/gmic.24627>.
 31. Smillie CS, Smith MB, Friedman J, Cordero OX, David LA, Alm EJ. 2011. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature* 480:241–244. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10571>.
 32. Sommer MO, Dantas G, Church GM. 2009. Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* 325:1128–1131. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1176950>.
 33. Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guedon G. 2009. Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICES₁ and ICES₃ from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 191:2764–2775. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01412-08>.
 34. Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G. 2002. The ICES₁ element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. *Plasmid* 48:77–97. [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-619X\(02\)00102-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-619X(02)00102-6).
 35. Mingoaia M, Morici E, Morrioni G, Giovanetti E, Del Grosso M, Pantosti A, Varaldo PE. 2014. Tn5253 family integrative and conjugative elements carrying *mef(I)* and *catQ* determinants in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5886–5893. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.03638-14>.
 36. Terzaghi BE, Sandine WE. 1975. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Appl Microbiol* 29:807–813.
 37. Delorme C, Poyart C, Ehrlich SD, Renault P. 2007. Extent of horizontal gene transfer in evolution of streptococci of the salivarius group. *J Bacteriol* 189:1330–1341. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01058-06>.
 38. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27:221–224. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msp259>.
 39. Haenni M, Saras E, Bertin S, Leblond P, Madec JY, Payot S. 2010. Diversity and mobility of integrative and conjugative elements in bovine isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, and *S. uberis*. *Appl Environ Microbiol* 76:7957–7965. <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00805-10>.
 40. Seppälä H, Nissinen A, Yu Q, Huovinen P. 1993. Three different phenotypes of erythromycin-resistant *Streptococcus pyogenes* in Finland. *J Antimicrob Chemother* 32:885–891. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/32.6.885>.
 41. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Piessens J, Goossens H. 2005. Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* 49:4798–4800. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.49.11.4798-4800.2005>.
 42. Del Grosso M, Camilli R, Barbabella G, Blackman Northwood J, Farrell DJ, Pantosti A. 2011. Genetic resistance elements carrying *mef* subclasses other than *mef(A)* in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3226–3230. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01713-10>.
 43. Clewley DB, Jaworski DD, Flannagan SE, Zitzow LA, Su YA. 1995. The conjugative transposon Tn916 of *Enterococcus faecalis*: structural analysis and some key factors involved in movement. *Dev Biol Stand* 85:11–17.

44. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
45. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42: D206–D214. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
46. Carver TJ, Rutherford KM, Berriman M, Rajandream MA, Barrell BG, Parkhill J. 2005. ACT: the Artemis comparison tool. *Bioinformatics* 21: 3422–3423. <http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/bti553>.
47. Mingoia M, Vecchi M, Cochetti I, Tili E, Vitali LA, Manzin A, Varaldo PE, Montanari MP. 2007. Composite structure of *Streptococcus pneumoniae* containing the erythromycin efflux resistance gene *mef(I)* and the chloramphenicol resistance gene *catQ*. *Antimicrob Agents Chemother* 51: 3983–3987. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00790-07>.
48. Pérez-Trallero E, Vicente D, Montes M, Marimon JM, Pineiro L. 2001. High proportion of pharyngeal carriers of commensal streptococci resistant to erythromycin in Spanish adults. *J Antimicrob Chemother* 48:225–229. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/48.2.225>.
49. Ciric L, Ellatif M, Sharma P, Patel R, Song X, Mullany P, Roberts AP. 2012. Tn916-like elements from human, oral, commensal streptococci possess a variety of antibiotic and antiseptic resistance genes. *Int J Antimicrob Agents* 39:360–361. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2011.12.007>.
50. Cochetti I, Tili E, Vecchi M, Manzin A, Mingoia M, Varaldo PE, Montanari MP. 2007. New Tn916-related elements causing *erm(B)*-mediated erythromycin resistance in tetracycline-susceptible pneumococci. *J Antimicrob Chemother* 60:127–131. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkm120>.
51. Jönsson M, Swedberg G. 2006. Macrolide resistance can be transferred by conjugation from viridans streptococci to *Streptococcus pyogenes*. *Int J Antimicrob Agents* 28:101–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2006.02.023>.
52. Santagati M, Lupo A, Scillato M, Di Martino A, Stefani S. 2009. Conjugal mobilization of the mega element carrying *mef(E)* from *Streptococcus salivarius* to *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Lett* 290: 79–84. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01408.x>.
53. Fontaine L, Boutry C, de Frahan MH, Delplace B, Fremaux C, Horvath P, Boyaval P, Hols P. 2010. A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol* 192:1444–1454. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01251-09>.
54. Fontaine L, Wahl A, Flechard M, Mignolet J, Hols P. 16 September 2014. Regulation of competence for natural transformation in streptococci. *Infect Genet Evol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.010>.

3. Détection des éléments intégratifs chez *S. salivarius* par analyse de la séquence des génomes

Les données acquises précédemment ont permis d'identifier, parmi les souches de *S. salivarius* de la collection, celles portant potentiellement un ICE. Ces données ont été utilisées pour sélectionner un panel de 24 souches portant potentiellement un élément de la famille ICESt3 qui est la famille modèle étudiée au laboratoire. Les caractéristiques de ces 24 souches sont indiquées dans le tableau 1.

Les génomes de ces 24 souches ont été séquencés, mais seulement 19 des séquences obtenues étaient exploitables en terme de nombre de contigs et de taux de couverture. Elles sont désignées par un astérisque dans le tableau 1. Les 5 autres séquences présentaient des taux de couverture des contigs insuffisants pour réaliser leur assemblage. Les séquences de ces 19 génomes ont été assemblées au sein de l'équipe ICE-TeA du laboratoire DynAMic (N. Leblond-Bourget et S. Payot, com. pers.).

L'identification des ICE et des IME dans les séquences de ces génomes a été réalisée en utilisant une procédure développée au laboratoire DynAMic (Ambroset *et al.*, 2016). Brièvement, cette procédure se base sur la recherche, dans les génomes bactériens de CDS codant des protéines étiquettes des ICE (relaxase, protéine de couplage, protéine VirB4, intégrase) ou des IME (relaxase, protéine de couplage, intégrase). La co-localisation de CDS codant les différentes protéines étiquettes indique la présence potentielle d'ICE ou d'IME dont les limites ont ensuite été déterminées en recherchant des DR (ou IR) qui les flanquent. Chaque famille d'ICE présentant des protéines étiquettes spécifiques (Ambroset *et al.*, 2016), la détection de ces protéines permet de définir la famille à laquelle l'ICE appartient. Jusqu'à présent, 7 familles d'ICE ont été caractérisées chez les streptocoques, il s'agit des familles ICESt3 et Tn916 de la superfamille Tn916, les familles TnVanG, Tn5252, Tn1549 et TnGBS2 de la superfamille Tn5252 et la famille TnGBS1 de la superfamille TnGBS1 (Ambroset *et al.*, 2016). Pour les IME, des familles n'ayant pas encore été décrites, ils sont actuellement classés en fonction de leur site d'intégration.

Cette procédure a été appliquée à l'analyse des génomes des 19 souches de *S. salivarius* (19 chromosomes et 4 plasmides identifiés chez les souches B35, L11, L25 et N5). Elle révèle la présence de 27 ICE répartis sur 18 génomes car le séquençage de la souche B63 a révélé qu'elle ne porte finalement aucun ICE (figure 23). Deux de ces ICE sont portés par les plasmides des souches L25 et N5 (figure 23). 37 IME ont également été retrouvés sur les 19 génomes puisque la souche B63 en porte 2 (figure 23). Ce résultat montre que les ICE et les IME sont présents en abondance dans les souches de *S. salivarius* étudiées.

Tableau 1 : Caractéristiques des 24 souches d'intérêt, sélectionnées pour la présence potentielle d'éléments de la famille ICES_{t3}. L'origine des souches et leur contenu en éléments intégratifs (+ et 0 signifiant respectivement présence et absence de l'élément considéré) sont présentés. ST et ND signifiant respectivement Sequence Type (le numéro attribué lors de l'analyse par MLST est indiqué) et Non Déterminé. CHRU et CHU signifiant respectivement Centre Hospitalier Régional Universitaire et Centre Hospitalier Universitaire. Les souches dont la séquence du génome est exploitable sont désignées par un astérisque.

Souches	Origine	Site d'isolement	ST	ICES _{t3}	Mega élément	ICE Tn916	Elément dérivé de Tn916	IME <i>tRNA</i> ^{Lys}
B35*	CHRU de Besançon	Hémoculture	54	+	+	0	ND	+
B50*	CHRU de Besançon	Hémoculture	69	+	+	0	ND	+
B57*	CHRU de Besançon	Hémoculture	72	+	ND	0	ND	0
B63*	CHRU de Besançon	Hémoculture	41	0	ND	0	ND	+
F1-4*	Individu 1	Fèces	118	+	+	0	ND	0
F1-8*	Individu 1	Fèces	119	+	+	0	ND	+
F4-2*	Individu 4	Fèces	114	+	+	+	ND	+
F6-1*	Individu 6	Fèces	57	+	ND	0	ND	+
L10	CHU de Limoges	Liquide articulaire	72	+	ND	0	ND	+
L11*	CHU de Limoges	Hémoculture	49	+	ND	0	ND	+
L22*	CHU de Limoges	Hémoculture	68	+	ND	+	Tn6002	+
L25*	CHU de Limoges	Hémoculture	68	+	ND	+	Tn3872	+
L38	CHU de Limoges	Hémoculture	94	+	ND	+	ND	+
L39	CHU de Limoges	Hémoculture	78	+	ND	+	Tn6002	0
L45*	CHU de Limoges	Hémoculture	56	+	ND	0	ND	+
L50*	CHU de Limoges	Hémoculture	93	+	+	0	ND	+
L60*	CHU de Limoges	Hémoculture	52	+	ND	0	ND	+
L61*	CHU de Limoges	Hémoculture	78	+	+	+	ND	+
L64*	CHU de Limoges	Liquide pleural	70	+	+	0	ND	+
N20*	CHRU de Nancy	Liquide d'ascite	51	+	ND	+	Tn3872	0
N22	CHRU de Nancy	Liquide de dialyse	91	+	ND	0	ND	+
N5*	CHRU de Nancy	Abcès cérébral	101	+	+	0	ND	+
S6-13	Individu 6	Salive	30	+	+	0	ND	0
T93*	CHRU de Tours	Hémoculture	113	+	+	0	ND	+

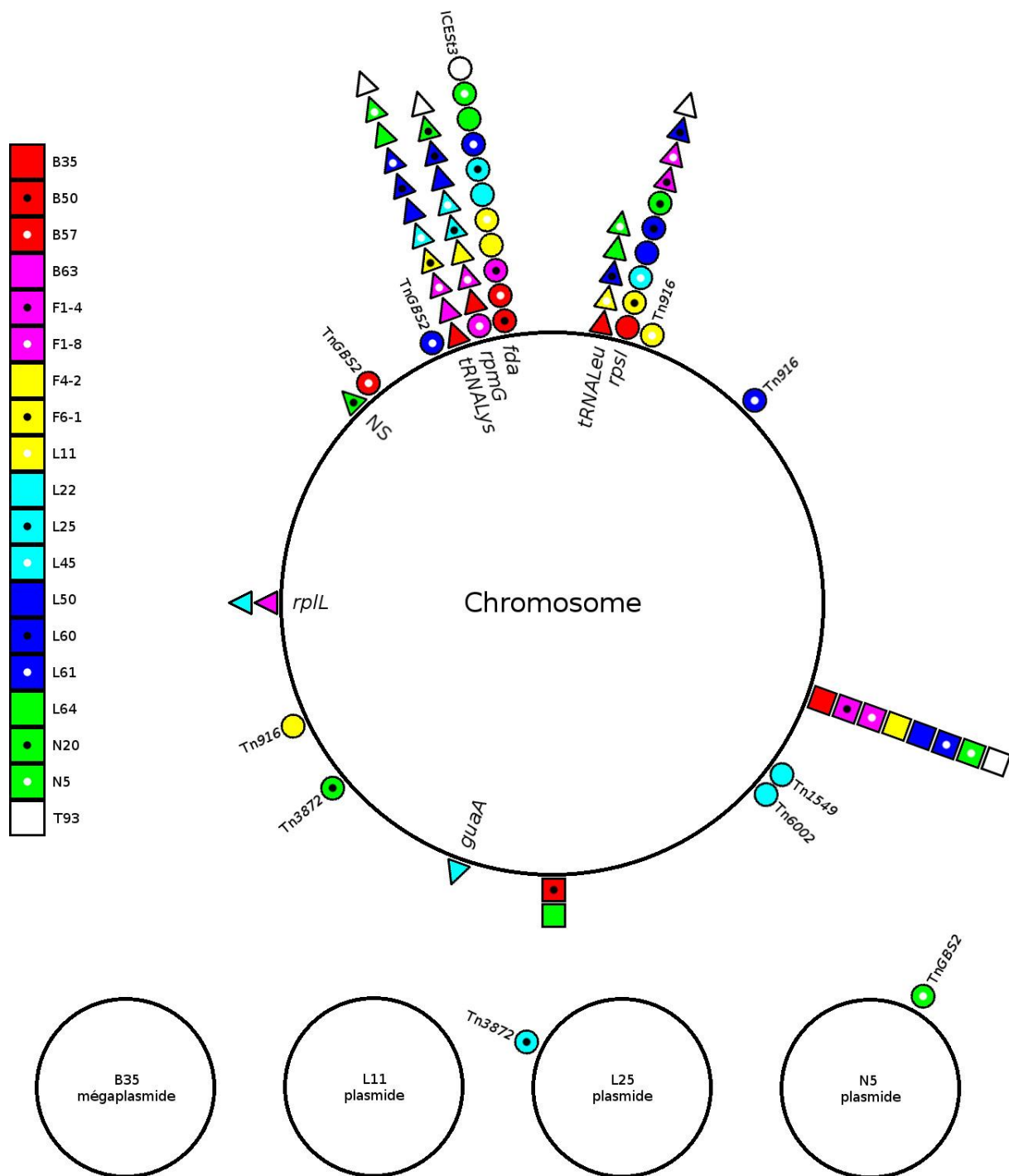


Figure 23 : Localisation des ICE, IME et éléments MEGA de *S. salivarius*. Le cercle noir correspond au chromosome circulaire de *S. salivarius* d'environ 2,2 Mb sur lequel sont représentés les différents sites d'intégration des éléments intégratifs identifiés chez les 19 souches étudiées. Les petits cercles noirs représentent les différents plasmides retrouvés dans les génomes des souches B35, L11, L25 et N5. Les sites d'intégration qui ne sont pas nommés correspondent à des gènes de fonction inconnue ou des régions intergéniques. Les ICE sont symbolisés par des ronds, les IME par des triangles et les éléments MEGA par des carrés. Tous les ICE qui ne sont pas nommés appartiennent à la famille ICESt3.

a. Détection des ICE chez *S. salivarius*

La détection des ICE montre que 18 des 19 souches dont le génome a été analysé présentent au moins un ICE de la famille ICESt3 sur leur chromosome (figure 23). Ceci n'est pas étonnant puisque

toutes ont été sélectionnées pour la présence d'un ICE putatif de cette famille. Par ailleurs, les plasmides des souches L25 et N5 portent un ICE (Tn3872 pour L25 et TnGBS2 pour N5) (figure 23).

Les résultats montrent également que le nombre d'ICE varie en fonction des souches. Il varie de 0 pour la souche B63 à 3 pour les deux souches L22 (ICESt3 L22 *fda*, Tn6002 et Tn1549) et L61 (ICESt3 L61 *fda*, Tn916, TnGBS2). Ainsi, la majorité des souches porte un ICE (10 souches) ou deux ICE (6 souches) (Figure 23). Les 27 ICE détectés sont regroupés en deux superfamilles décrites par Ambroset *et al.*, (2016) : la superfamille Tn916 (23 ICE) et la superfamille Tn5252 (4 ICE) (figure 23). Sur les 23 ICE de la superfamille Tn916, 18 appartiennent à la famille ICESt3. Les ICE de cette famille seront décrits ci-après. Les 5 autres ICE de cette superfamille appartiennent la famille Tn916 : Tn916 sur le chromosome des souches F4-2 et L61 ; Tn3872 sur le plasmide de L25 et le chromosome de N20 ; Tn6002 sur le chromosome de L22. Pour la superfamille Tn5252, la répartition se fait ainsi : un ICE de la famille Tn1549 (chromosome de L22) et 3 ICE de la famille TnGBS2 (chromosome de B57, L61 et plasmide de N5). Pour les souches qui portent plusieurs ICE, ceux-ci appartiennent à des familles différentes. Par exemple la souche L22 porte un ICE de la famille ICESt3 (ICESt3 L22 *fda*), un ICE de la famille Tn916 (Tn6002) et un ICE de la famille Tn1549 (Tn1549). Cette dernière observation suggère l'existence de systèmes d'exclusion.

Les 18 ICE de la famille ICESt3 sont intégrés de façon site-spécifique au sein de 3 sites d'intégration correspondant à l'extrémité 3' des gènes *fda* (fructose-1,6-bisphosphate aldolase), *rpsI* (30S ribosomal protein 9) et *rpmG* (50S ribosomal protein L33). Les ICE des familles Tn916 et TnGBS2 s'intègrent dans le chromosome de façon non spécifique au sein de gènes de fonction inconnue.

b. Détection des IME chez *S. salivarius*

La détection des IME montre que les 37 IME identifiés sont tous intégrés au sein des chromosomes séquencés ; il n'y a pas d'IME sur les plasmides (figure 23). Les résultats montrent que le nombre d'IME varie en fonction des souches. Il varie de 0 pour les souches B50 et B57 à 4 pour la souche L60. Dans le cas de L60, les 4 IME sont intégrés dans les sites *tRNA^{Lys}*, *tRNA^{Leu}*, *rpmG* et *rpsI*. Le nombre d'IME est de deux pour la majorité des souches (9 souches), de trois pour 4 autres souches et il n'y a qu'un seul IME pour 3 souches (figure 22). Ces résultats montrent que dans les génomes analysés, les IME sont encore plus abondants que les ICE.

À ce jour, aucun système de classement n'existe concernant les IME. J'ai donc choisi de les répertorier en fonction de leur site d'intégration. Ainsi, 36 de ces IME sont intégrés de façon site-spécifique au sein de 7 sites différents (figure 23). Pour l'ICE de N20, il n'a pas été possible de déterminer s'il est intégré dans un gène de fonction inconnue ou dans une région intergénique. Le gène-cible le plus fréquent pour l'intégration des IME est le gène *tRNA^{Lys}* (11 IME) puis viennent *rpmG*

(9 IME), *tRNA^{Leu}* (5 IME), *rpsI* (4 IME), *rplL* (2 IME) et enfin *guaA* (1 IME). Il existe une autre catégorie d'IME, les IME_{oriT}. Ce sont des IME intégrés au sein de l'origine de transfert d'un ICE de la famille ICE_{St3}. Ces IME_{oriT} ont été trouvés pour les souches L11, L25, L45 et L61, mais ils ne sont pas représentés dans la figure 23.

L'ensemble de ces résultats a révélé la présence de 37 IME et 27 ICE dans les génomes des 19 souches de *S. salivarius* étudiées. Les souches peuvent porter à la fois des ICE et des IME. Le nombre maximum d'éléments retrouvés dans une souche est de 5 pour les souches L22 et L61 avec 3 ICE et 2 IME et pour la souche L60 avec 1 ICE et 4 IME. Le nombre maximum d'ICE au sein d'une souche est de 3 alors qu'il atteint 4 pour les IME. Il est intéressant de noter que 48% des génomes analysés portent plus d'IME que d'ICE (B35, B63, F1-8, L11, L45, L50, L60, L64 et T93) alors que 26% des génomes présentent plus d'ICE que d'IME (B50, B57, F4-2, L22 et L61). Les 26% restants portent autant d'ICE que d'IME (F1-4, F6-1, L25, N20 et N5). Ces résultats montrent la prévalence des IME par rapport aux ICE bien que ces souches aient été sélectionnées sur leur contenu en ICE. De plus, deux sites d'intégration sont retrouvés aussi bien pour les ICE que pour les IME (*rpsI* et *rpmG*), mais tous les autres sites d'intégration sont spécifiques des ICE ou des IME.

c. Comparaison des ICE de la famille ICE_{St3} chez *S. salivarius*

Parmi les 27 ICE détectés, 23 font partie de la superfamille Tn916 dont 18 appartiennent à la famille ICE_{St3}. D'après la figure 23, ces 18 ICE s'intègrent de façon site-spécifique au sein des extrémités 3' des gènes *fda* (11 ICE), *rpsI* (6 ICE) et *rpmG* (1 ICE). Les relations phylogénétiques entre les intégrases de ces 18 ICE de la famille ICE_{St3} sont présentées dans la figure 24.

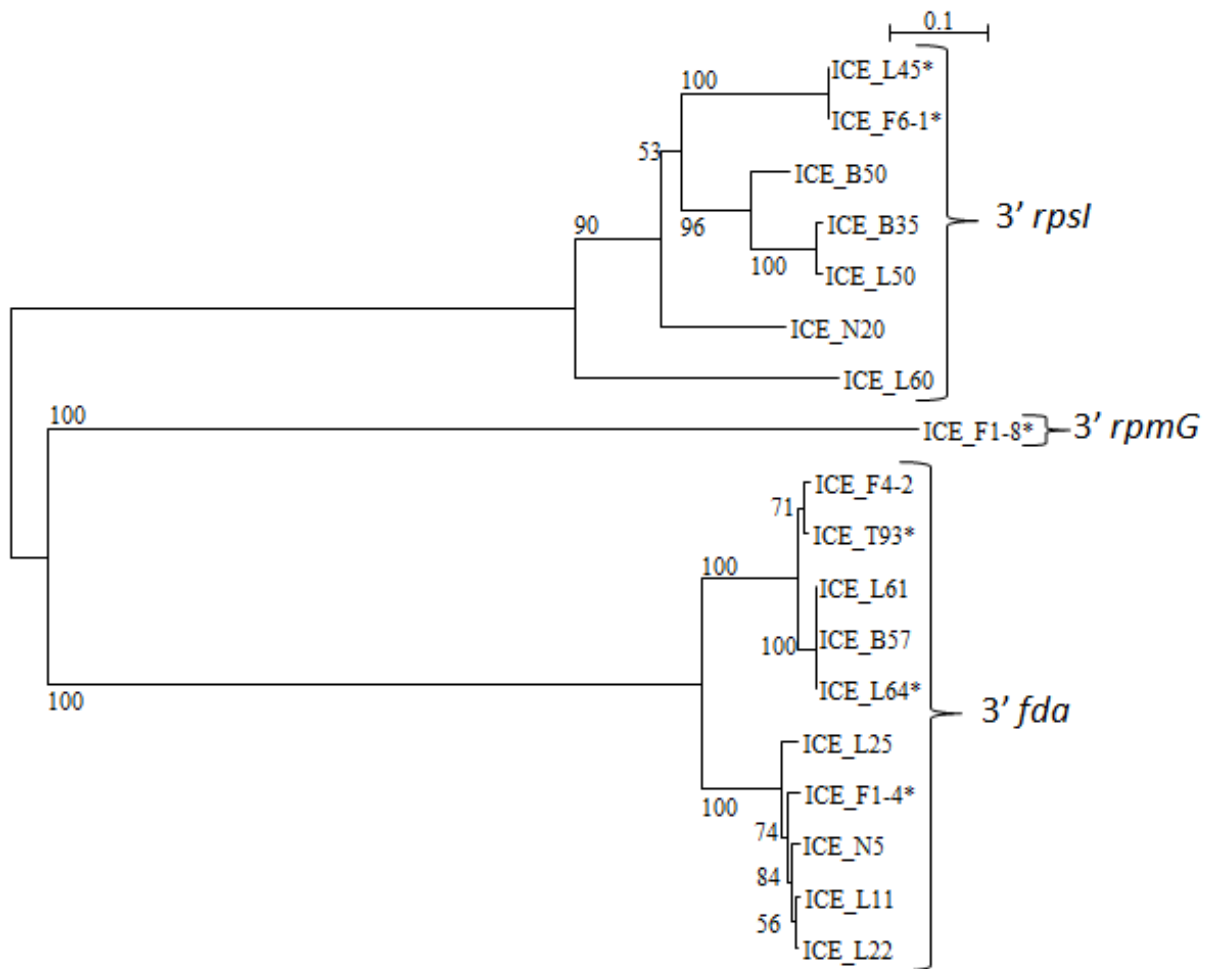


Figure 24 : Arbre phylogénétique des intégrases à tyrosine des 18 ICE de la famille ICESt3 détectés parmi les 19 génomes séquencés de *S. salivarius*. Chaque intégrase est représentée par le nom de la souche qui le porte. Les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalO. L'arbre a été réalisé avec la méthode BioNJ. Les valeurs de bootstraps indiquées ont été obtenues avec 1 000 répliques. Les sites d'intégration sont indiqués pour chaque accolade. Les astérisques désignent les six éléments comparés dans la suite de cette étude.

Les résultats présentés ci-dessus montrent que les intégrases des 18 ICE de la famille ICESt3 sont rassemblés en 3 groupes distincts. Les ICE dont les intégrases sont rassemblés dans un même groupe sont intégrés dans le même site d'intégration : un groupe de 11 intégrases dont les ICE sont intégrés à l'extrémité 3' du gène *fda*, un autre groupe de 7 intégrases dont les ICE sont intégrés à l'extrémité 3' du gène *rpsI* et 1 groupe pour l'intégrase de l'ICE de la souche F1-8 qui est intégré à l'extrémité 3' du gène *rpmG* (figure 24).

Les résultats présentés dans la figure 23 ont permis de sélectionner six ICE représentant les 3 groupes d'intégrases identifiés (indiqués par un astérisque sur la figure) : 3 ICE avec des intégrases *fda* (ICESt3 F1-4 *fda*, ICESt3 L64 *fda* et ICESt3 T93 *fda*), 2 ICE avec une intégrase *rpsI* (ICESt3 F6-1 *rpsI* et ICESt3 L45 *rpsI*) et 1 ICE avec une intégrase *rpmG* (ICESt3 F1-8 *rpmG*). Les séquences de ces 6 ICE ont été comparées et les résultats sont présentés dans la figure 25.

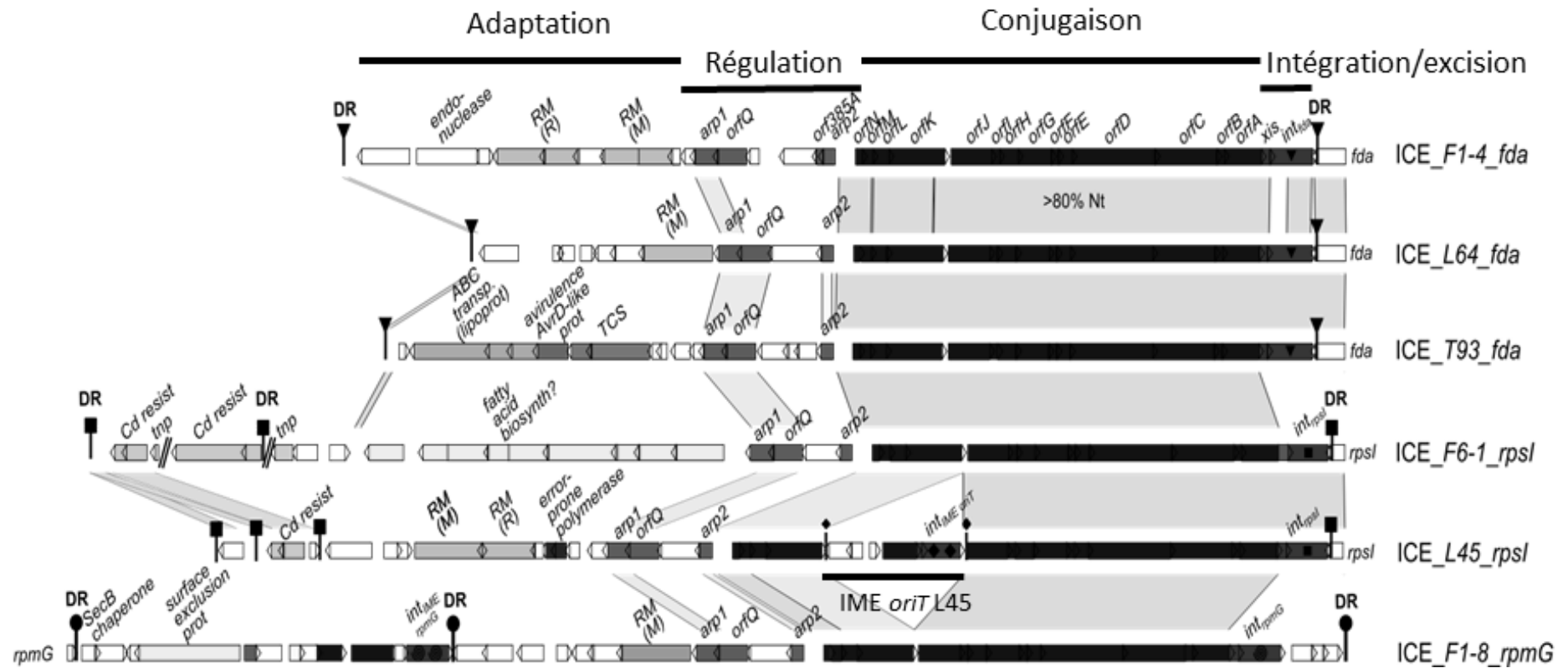


Figure 25 : Comparaison de 6 ICE de la famille ICESt3 portés par des souches différentes de *S. salivarius* et intégrés dans trois sites d'insertion différents (*fda*, *rpsI* et *rpmG*). Les zones grisées correspondent aux séquences présentant plus de 80% d'identité nucléotidique. Les différents modules sont indiqués par des lignes horizontales noires et désignés par leurs noms. Les répétitions directes bordant les éléments sont symbolisées par des barres verticales surmontées par un carré, un rond ou un triangle. Ces différents symboles désignent des répétitions directes (DR) qui sont différentes en fonction du site d'insertion. L'ICESt3 L45 *rpsI* contient un IME intégré au sein de son origine de transfert. Les répétitions directes qui bordent cet IME sont symbolisées par une barre verticale avec un losange. RM désigne un système de restriction modification avec (R) et (M) pour les gènes codant respectivement la restriction et la modification.

La figure 25 montre que les modules de conjugaison de ces 6 ICE présentent plus de 80% d'identité nucléotidique. C'est le cas en particulier pour les gènes codant les 3 protéines étiquettes, protéine de couplage (*orfK*), relaxase (*orfI*) et protéine VirB4 (*orfD*). Une analyse de ces séquences protéiques a montré qu'*OrfI* contient un domaine Rep_trans (PF02486) représentatif du groupe des relaxase « Rel-I », qu'*OrfK* contient un domaine catalytique FtsK_SpoIIIE (PF01580) caractéristique des protéines de couplage appartenant à la classe CP-I ou TcpA, et qu'*orfD* contient un domaine « AAA-10 » (PF12846) caractéristique des protéines VirB4. L'ensemble de ces caractéristiques étant spécifiques des ICE de la famille ICESt3 (Ambroset *et al.*, 2016), ces 6 éléments ont été classés dans cette famille.

Cette figure montre également que le module de conjugaison de l'ICESt3 L45 *rpsI* a la particularité de posséder un IME qui est intégré dans son origine de transfert. Cet IME *oriT* L45 code un module d'intégration/excision avec une excisionase et une intégrase à tyrosine permettant son intégration site-spécifique au sein de l'origine de transfert d'un ICE de la famille ICESt3. Il contient également un module de mobilisation qui code la relaxase et la protéine de couplage spécifique des IME ainsi qu'un module d'adaptation dont les gènes codent des protéines de fonctions inconnues (figure 25).

La figure 25 montre aussi que les modules de régulation de ces 6 ICE portent tous des gènes *arp1* qui présentent plus de 80% d'identité. En revanche, des gènes *arp2* présentant plus de 80% d'identité n'ont été retrouvés que pour ICESt3 L45 *rpsI* et ICESt3 F1-8 *rpmG*. De même, des gènes *orfQ* présentant plus de 80% d'identité ont été retrouvés seulement chez ICESt3 L64 *fda*, ICESt3 T93 *fda* et ICESt3 F6-1 *rpsI*. Ces résultats laissent penser à un ancêtre commun du module de régulation.

Enfin, la figure 25 montre que les modules d'adaptation de ces ICE sont très variables. Par exemple, les ICE portés par les souches F1-4, F1-8, L45 et L64 portent des gènes codant tout ou partie d'un système RM mais ces gènes présentent moins de 80% d'identité. En revanche, les éléments ICESt3 F6-1 *rpsI* et ICESt3 L45 *rpsI* possèdent des gènes codant une résistance au cadmium présentant plus de 80% d'identité.

d. Détection des éléments MEGA chez *S. salivarius*

Lors de la première partie de cette thèse, des éléments MEGA ont été détectés par PCR chez 61 souches de *S. salivarius* dont 10 ont eu leurs génomes séquencés. L'élément MEGA de *S. salivarius* a été décrit par Stadler & Teuber (2002) comme un élément intégratif comportant au moins les gènes *mefE*, *mel* ainsi que les *orf3* à *orf6* (figure 26). *mefE* et *mel* codent respectivement une résistance aux macrolides et un transporteur ABC. Les *orf3* à *orf5* sont homologues aux *orf6* à *orf8* de Tn1207.1 de *S. pneumoniae*. Les *orf 3*, *4* et *6* de MEGA codent des fonctions inconnues. L'*orf5* est troquée par rapport à l'*orf8* de Tn1207.1 qui code une résistance aux UV (Santagati *et al.*, 2000).

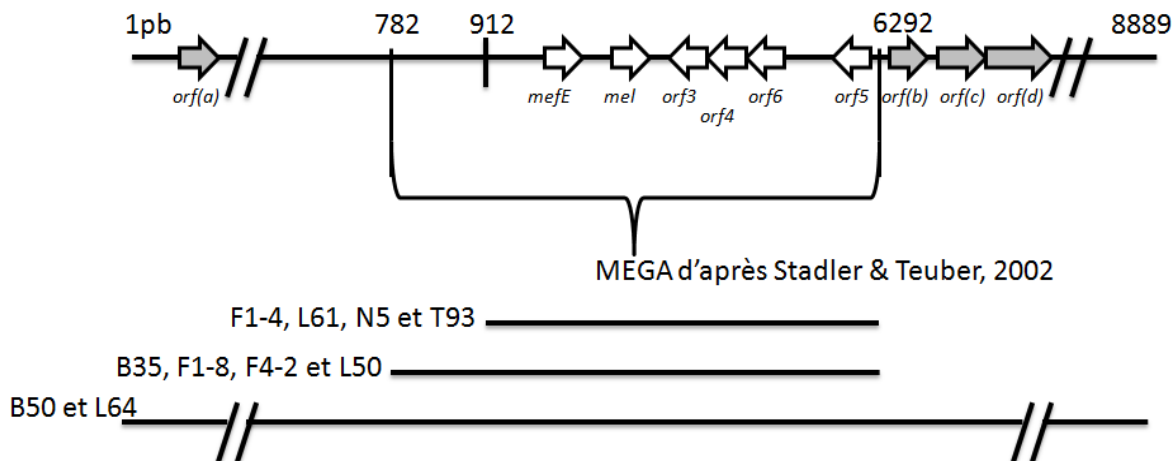


Figure 26 : Comparaison de l'élément MEGA décrit par Stadler & Teuber (2002) et de ceux identifiés chez 10 souches de *S. salivarius*. Les traits noirs correspondent aux séquences nucléotidiques présentant plus de 99 % d'identité chez les différentes souches. La séquence AJ318993 est représentée par le trait de 8889 pb. La séquence comprise entre 912 et 6292 pb comporte les ORF minimales de l'élément MEGA tandis que la séquence allant de 782 à 6292 pb est la séquence de l'élément MEGA décrite par Stadler & Teuber (2002). Les ORF de MEGA sont représentées par des flèches blanches tandis que les ORF en dehors de MEGA sont représentées par des flèches grises.

Cet élément ne présente pas de module de conjugaison ni d'intégration/excision, il n'a donc pas été détecté par la procédure de recherche des ICE et des IME utilisée précédemment. Des séquences homologues à la séquence de l'élément MEGA décrit par Stadler & Teuber (2002) (numéro d'accèsion AJ318993) ont donc été recherchées par BlastN dans les 19 génomes séquencés. Cette séquence comporte, en plus de l'élément MEGA, quatre ORF codant des protéines qui présentent des homologies avec une protéine régulatrice (*orf(b)*), un ABC transporteur (*orf(c)*), une protéine transmembranaire (*orf(d)*) et une protéine de fonction inconnue (*orf(a)*) (Stadler & Teuber, 2002). Les éléments décrits jusqu'alors présentaient plus de 99% d'identité avec cette séquence complète, ce qui est également le cas pour les souches B50 et L64 (figure 26). En revanche, pour les 4 souches B35, F1-8, F4-2 et L50, l'homologie de séquence concerne seulement la région allant de la position 782 à 6292 pb (figure 26). Enfin, la séquence minimale constituant l'élément MEGA allant de la position 912 à 6292 pb est retrouvée pour les 4 autres souches F1-4, L61, N5 et T93.

D'après la littérature, les éléments MEGA sont généralement intégrés dans des ICE de la famille Tn916 (Chancey *et al.*, 2015). Dans le cas de *S. salivarius*, aucun des 10 éléments MEGA détectés n'est intégré à proximité d'un élément de la famille Tn916.

L'ensemble des résultats de cette première partie montre l'abondance et la diversité des éléments intégratifs présents chez *S. salivarius* ainsi que la prévalence des IME sur les ICE dans les génomes de cette espèce. Il montre également que les éléments de la famille ICES_{t3} analysés portent des modules de conjugaison qui comportent a priori toutes les ORF nécessaires à leur transfert conjugatif, ce qui suggère qu'ils seraient fonctionnels.

II. Etude des capacités d'adhésion de *S. salivarius* aux cellules des écosystèmes digestif et buccal

Dans l'optique, à plus long terme, d'étudier les transferts de gènes au sein de la cavité buccale ou du tractus intestinal, il était intéressant de déterminer si la formation de biofilm a un impact sur le transfert des ICE. La formation des biofilms étant conditionnée par l'adhésion des souches à un support, le second objectif de ma thèse était de sélectionner des souches capables d'adhérer à la salive (pour l'étude des transferts dans l'écosystème buccal) et/ou aux cellules épithéliales gastro-intestinales (pour l'étude des transferts dans l'écosystème digestif). Pour cela, les capacités d'adhésion à la salive et aux cellules épithéliales gastro-intestinales ont été étudiées pour les 24 souches précédemment sélectionnées.

1. Etude des capacités d'adhésion à la salive de 24 souches de *S. salivarius*

La bouche est l'une des niches écologiques où *S. salivarius* est retrouvée en abondance (Aas *et al.*, 2005; Corredoira *et al.*, 2005). En particulier, il a été montré que l'adhésion de souches de *S. salivarius* à la salive implique des interactions protéiques entre les adhésines de *S. salivarius* et certaines protéines de la salive comme les glycoprotéines EP-GP (Schenkels *et al.*, 1993; Suljak *et al.*, 1995).

Les capacités d'adhésion à la salive des 24 souches de *S. salivarius* sélectionnées ont été analysées et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 27. La capacité d'adhésion à la salive a été mesurée selon le protocole décrit dans le matériel et méthode p127. Dans ce protocole, la densité optique lue à 600 nm donne une estimation du nombre de cellules ayant adhéré à la salive ; plus la valeur de DO est élevée, plus ce nombre est important.

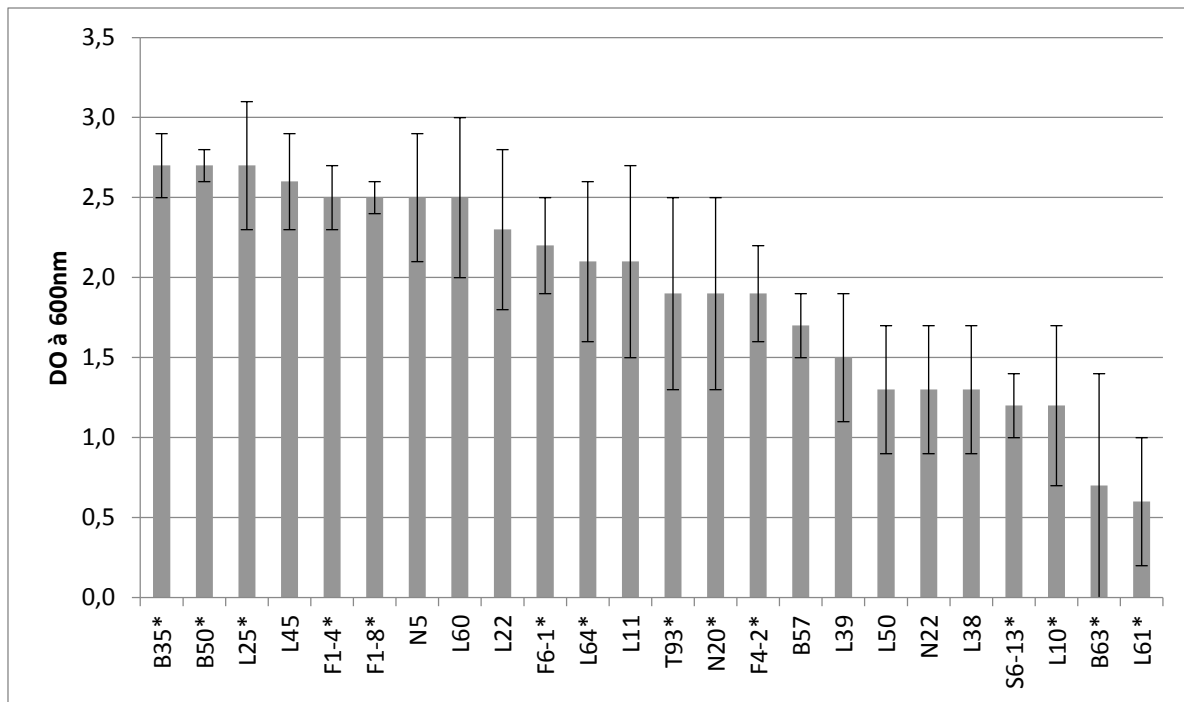


Figure 27 : Capacité d'adhésion à la salive des 24 souches de *S. salivarius* sélectionnées. Les résultats sont exprimés en densité optique lue à 600 nm. Les souches sélectionnées pour les expériences d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales décrites dans la partie 2 sont désignées par un astérisque. Les résultats correspondant sont présentés dans le tableau 2. Les barres d'erreurs-types (SEM) sont basées sur des triplicatas indépendants.

Les résultats présentés dans la figure 27 montrent que les souches de *S. salivarius* n'ont pas toutes la même capacité d'adhésion à la salive. La souche la plus adhérente est la souche B35 caractérisée par une DO de $2,7 \pm 0,2$ alors que la souche la moins adhérente est la souche L61 qui présente une DO de $0,6 \pm 0,4$ (figure 27 et tableau 2).

De plus, la seule souche isolée de la salive qui a été testée (S6-13) fait partie des souches les moins adhérentes avec une DO de $1,2 \pm 0,2$ alors que les 4 souches issues des fèces d'individus différents sont toutes plus adhérentes que la souche S6-13 (figure 26 et tableau 2).

Ces résultats montrent donc que la capacité d'adhésion à la salive dépend des capacités intrinsèques de la souche.

Tableau 2 : Capacité d'adhésion aux différents supports biotiques testés et pourcentage d'auto-agrégation de 14 souches de *S. salivarius*. *Lactobacillus rhamnosus GG* (LrGG) qui est considérée comme la référence en terme d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales pour les souches probiotiques (Gopal *et al.*, 2001) a été utilisée comme témoin positif (Kebouchi *et al.*, 2016). L'adhésion sur salive est exprimée en densité optique lue à 600 nm tandis que l'adhésion aux cellules Caco2 et HT29-MTX est exprimée en unités formant colonie (UFC) adhérentes par cellule épithéliale. La capacité d'auto-agrégation est exprimée en pourcentage de cellules auto-agrégées au bout de 5h. Les expériences ont été réalisées en triplicatas indépendants et les résultats sont présentés avec leur erreur-type (SEM).

Souches	Adhésion sur salive		Adhésion sur Caco2		Adhésion sur HT29-MTX		Auto-agrégation	
	Moyenne (DO à 600 nm)	SEM	Moyenne (UFC/Caco2)	SEM	Moyenne (UFC/HT29-MTX)	Erreur-type	% (5h)	SEM
B35	2,7	0,2	4,3	1,2	7,6	2,6	0,6	0,6
B50	2,7	0,1	19,1	5,1	4,5	0,4	68,0	0,4
B63	0,7	0,7	1,2	0,1	7,5	1,3	79,9	3,2
F1-4	2,5	0,2	6	0,9	39	6	67,8	9,4
F1-8	2,5	0,1	7,2	1,5	25,1	9,7	79,5	2,3
F4-2	1,9	0,3	16,2	7,7	52,1	1,5	80,3	1,0
F6-1	2,2	0,3	4,7	1,6	117,9	3,1	1,5	1,5
L10	1,2	0,5	2,2	0,6	4,8	0,1	81,5	0,7
L25	2,7	0,4	7,3	1,3	22,2	3,1	2,5	2,5
L61	0,6	0,4	5,6	1,1	5,3	0,9	87,8	2,5
L64	2,1	0,5	7,7	0,7	15,4	3,2	2,0	0,8
N20	1,9	0,6	17,1	1,2	8,5	1,7	53,9	9,5
S6-13	1,2	0,2	0,6	0,03	16,5	1,3	82,4	3,1
T93	1,9	0,6	0,2	0,02	19,1	5,1	59,0	0,6
LrGG	Non testée		65	14,1	92,1	15,1	Non testée	

2. Etude des capacités d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales de 14 souches de *S. salivarius*

S. salivarius est également présent dans le tractus gastro-intestinal (Qin *et al.*, 2010) où il est susceptible d'adhérer. La capacité d'adhésion de souches de *S. salivarius* a alors été caractérisée sur les deux types cellulaires principaux du tractus gastro-intestinal que sont les entérocytes représentés par la lignée cellulaire Caco2 et les cellules caliciformes productrices de mucus représentées par la lignée cellulaire HT29-MTX.

Afin de réduire les coûts d'expérimentation liés aux tests d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales, il a été nécessaire de réduire le nombre de souches étudiées pour ne sélectionner que 14 souches qui présentaient une diversité d'origine, de contenu en éléments intégratifs et de capacité d'adhésion à la salive. Elles sont présentées dans le tableau 2 et indiquées par un astérisque sur la figure 27. Ces tests d'adhésion ont été réalisés grâce à une collaboration avec l'équipe PB2P (Protéolyse et Biofonctionnalités des Protéines et des Peptides) du laboratoire UR AFPA (Unité de

Recherche Animal et Fonctionnalités des Produits Animaux) qui s'est chargée des cultures cellulaires. Cette équipe a également étudié dans les mêmes conditions que nos 14 souches de *S. salivarius* la souche GG de *Lactobacillus rhamnosus* (Kebouchi *et al.*, 2016). Cette souche a été introduite dans cette étude car elle est considérée comme la référence en terme d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales pour les souches probiotiques (Gopal *et al.*, 2001).

a. Etude des capacités d'adhésion aux cellules Caco2 de 14 souches de *S. salivarius*

Les résultats obtenus pour l'adhésion à la lignée cellulaire Caco2 des 14 souches de *S. salivarius* sélectionnées sont présentés sur la figure 28 et dans le tableau 2.

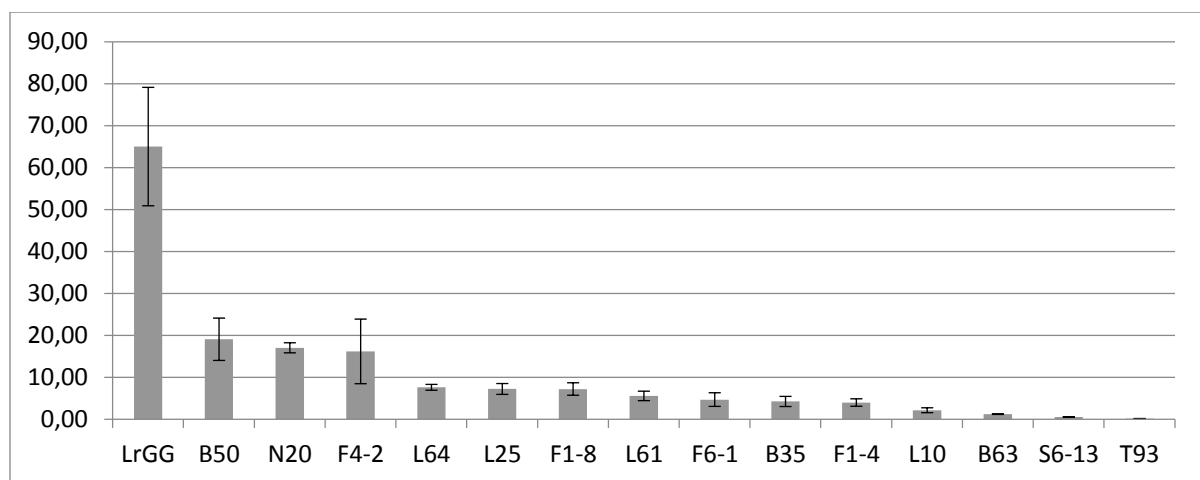


Figure 28 : Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales de la lignée Caco2 des 14 souches de *S. salivarius* sélectionnées. LrGG correspond à *L. rhamnosus* GG (Kebouchi *et al.*, 2016). Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant colonie adhérentes par cellule épithéliale (UFC/Caco2). Les expériences ont été réalisées en triplicatas indépendants et les résultats sont présentés avec leur barre d'erreur-type (SEM).

Les résultats qui sont exprimés en nombres de bactéries adhérentes/cellule eucaryote (ou UFC/cellule) montrent que la capacité d'adhésion obtenue pour les souches de *S. salivarius* testées est maximale pour la souche B50 avec 19,1 ± 5,1 unités formant colonie adhérentes par cellule Caco2 (UFC/Caco2) tandis que l'adhésion la plus faible est obtenue pour la souche T93 avec 0,2 ± 0,02 UFC/Caco2, ce qui correspond à une variation d'un facteur 10 entre les deux souches (figure 28 et tableau 2). Dans le cas de *L. rhamnosus* GG, sa capacité d'adhésion est de 65 ± 14,1 UFC/Caco2, ce qui est 3,4 fois plus élevé que pour la souche B50 (19,1 ± 5,1 UFC/Caco2) qui est la souche de *S. salivarius* la plus adhérente (figure 28 et tableau 2). Ces données révèlent une capacité d'adhésion des différentes souches de *S. salivarius* aux cellules Caco2 globalement faible par rapport à *L. rhamnosus* GG.

De plus, les souches F6-1 et F4-2, qui ont été isolées des fèces d'individus sains différents, adhèrent respectivement peu (4,7 ± 1,6 UFC/Caco2) et bien (16,2 ± 7,7 UFC/Caco2) aux cellules Caco2 (figure 28

et tableau 2). Parmi les souches cliniques, la souche B50 est la plus adhérente ($19,1 \pm 5,1$ UFC/Caco2) alors que la souche T93 est la moins adhérente ($0,19 \pm 0,2$ UFC/Caco2) (figure 28 et tableau 2).

Ces résultats montrent donc que la capacité d'adhésion aux cellules Caco2 est souche dépendante et qu'elle est totalement indépendante de l'origine de la souche, que celle-ci ait été ou non en contact avec le tractus digestif.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour l'adhésion à la salive montre que certaines souches sont adhérentes aux deux matrices (B50) alors que d'autres souches sont peu adhérentes aux deux matrices (B63) (tableau 2). En revanche, la souche F1-4 adhère peu aux cellules Caco2 ($4 \pm 0,9$ UFC/Caco2) mais fait partie des souches les plus adhérentes à la salive ($2,5 \pm 0,2$) (tableau 2). Ces résultats suggèrent que les composants de surface bactériens impliqués dans l'adhésion à la salive ne sont pas les mêmes que ceux impliqués dans l'adhésion aux cellules épithéliales Caco2.

b. Étude des capacités d'adhésion aux cellules HT29-MTX de 14 souches de *S. salivarius*

Les résultats obtenus pour l'adhésion à la lignée cellulaire HT29-MTX des 14 souches de *S. salivarius* sélectionnées sont présentés sur la figure 29 et dans le tableau 2.

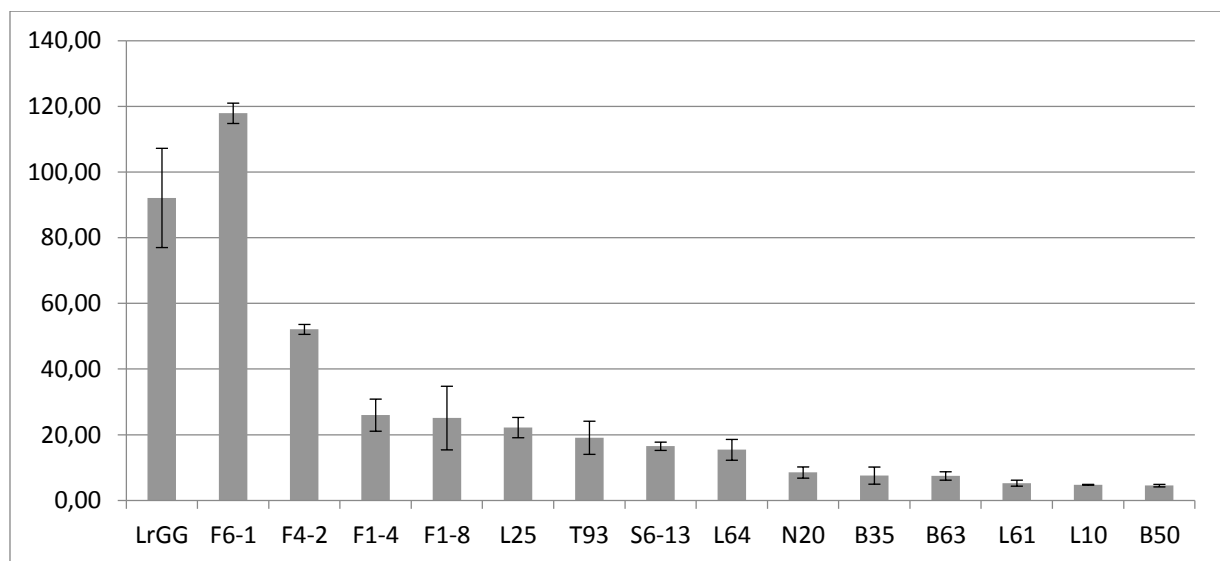


Figure 29 : Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales de la lignée HT29-MTX des 14 souches de *S. salivarius* sélectionnées. LrGG correspond à *L. rhamnosus GG* (Kebouchi *et al.*, 2016). Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant colonie adhérentes par cellule épithéliale (UFC/HT29-MTX). Les expériences ont été réalisées en triplicatas indépendants et les résultats sont présentés avec leur barre d'erreur-type (SEM).

Ces résultats montrent comme précédemment que le nombre de bactéries adhérentes par cellule épithéliale gastro-intestinale HT29-MTX varie d'une souche de *S. salivarius* à l'autre, avec un facteur de 26,2 entre les extrêmes. C'est la souche B50 qui adhère le moins ($4,5 \pm 0,4$ UFC/HT29-MTX) alors que la souche F6-1 est celle qui adhère le plus ($117,9 \pm 3,1$ UFC/HT29-MTX) (figure 29 et tableau 2).

Cette dernière présente aussi une capacité d'adhésion supérieure à celle de *L. rhamnosus* GG ($92,1 \pm 15,1$ UFC/HT29-MTX ; figure 29 et tableau 2). Ces résultats montrent donc que l'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales HT29-MTX dépendrait de l'origine de la souche.

Les résultats montrent également que les 4 souches les plus adhérentes sont toutes issues des fèces d'individus différents (F6-1, F4-2, F1-4 et F1-8), la capacité d'adhésion la plus basse étant observée pour la souche F1-8 ($25,1 \pm 9,7$ UFC/HT29-MTX). Toutes les autres souches qui adhèrent moins sont issues de salive (S6-13) ou de prélèvements hospitaliers. Ces résultats montrent donc que l'adhésion aux cellules HT29-MTX pourrait dépendre de l'origine de la souche. Sachant que les capacités d'adhésion les plus importantes caractérisent uniquement des souches issues de fèces, il est possible que la capacité d'adhésion aux cellules HT29-MTX soit augmentée lorsque la souche a été en contact avec le tractus gastro-intestinal.

La comparaison de ces résultats avec ceux obtenus pour l'adhésion à la salive montre que certaines souches sont adhérentes aux deux matrices (F1-4 et F1-8) alors que d'autres souches sont peu adhérentes aux deux matrices (B63 et L61) (tableau 2). En revanche, la souche B50 adhère peu aux cellules HT29-MTX ($4,5 \pm 0,4$ UFC/HT29-MTX) mais fait partie des souches les plus adhérentes à la salive ($2,7 \pm 0,1$) (tableau 2). Comme précédemment, ces résultats suggèrent que les composants de surface bactériens impliqués dans l'adhésion à la salive ne sont pas les mêmes que ceux impliqués dans l'adhésion aux cellules épithéliales Caco2.

La comparaison des capacités d'adhésion des 14 souches de *S. salivarius* aux deux types de cellules épithéliales gastro-intestinales montre que les souches testées adhèrent, dans leur ensemble, plus efficacement à la lignée HT29-MTX qu'à la lignée Caco2. Toutefois, plusieurs cas de figure sont observés. Le premier correspond à la souche B50 qui est la plus adhérente aux cellules Caco2 ($19,1 \pm 5,1$ UFC/Caco2) mais qui est la moins adhérente aux cellules HT29-MTX ($4,5 \pm 0,4$ UFC/HT29-MTX) (tableau 2), une différence d'un facteur 4,2 étant observé entre les deux types cellulaires. À l'inverse, la souche F6-1 présente une capacité d'adhésion aux cellules Caco2 assez basse ($4,7 \pm 1,6$ UFC/Caco2) alors qu'elle a la capacité d'adhésion aux cellules HT29-MTX la plus importante ($117,9 \pm 3,1$ UFC/HT29-MTX) (tableau 2), une différence d'un facteur 25 étant observée entre les deux types cellulaires. Enfin, la souche F4-2 fait partie des souches les plus adhérentes que ce soit aux cellules Caco2 ($16,2 \pm 7,7$ UFC/Caco2) ou HT29-MTX ($52,1 \pm 1,5$ UFC/HT29-MTX), même si elle adhère 3,2 fois mieux aux cellules HT29-MTX que Caco2 (figures 28 et 29 ; tableau 2).

L'ensemble de ces résultats a mis en évidence une diversité de la capacité d'adhésion des différentes souches de la collection sur une même lignée cellulaire gastro-intestinale. Ces différences pourraient s'expliquer par la diversité des protéines qui peuvent être exprimées à la surface des différentes

souches. L'ensemble de ces résultats a également mis en évidence une diversité de la capacité d'adhésion d'une même souche sur les deux lignées cellulaires épithéliales testées. Ces différences pourraient résulter de différentes propriétés de surface des cellules eucaryotes utilisées ou encore de la présence ou non de mucus.

c. Y-a-t-il un lien entre les capacités d'adhésion et d'auto-agrégation des 14 souches de *S. salivarius* ?

Certains auteurs mettent en avant un lien entre l'auto-agrégation des souches et leur adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus chez les lactocoques (Lukić *et al.*, 2012) et chez *S. salivarius* (Thèse Benoît Couvigny, 2014). Un test d'auto-agrégation a donc été réalisé pour les 14 souches utilisées précédemment et les résultats sont présentés dans la figure 30.

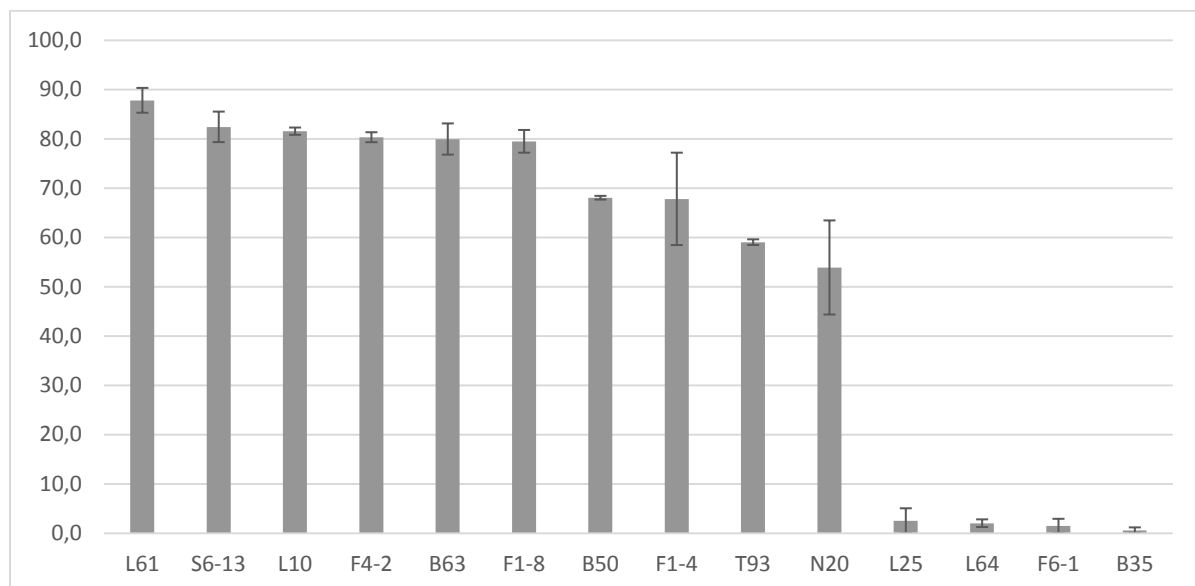


Figure 30 : Pourcentage d'auto-agrégation au bout de 5 heures des 14 souches de *S. salivarius* testées en adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales. L'expérience a été réalisée en duplicatas indépendants et les résultats sont présentés avec leur barre d'erreur-type (SEM).

Dans les conditions testées, 10 souches de *S. salivarius* (L61, S6-13, L10, F4-2, B63, F1-8, B50, F1-4, T93 et N20) présentent une forte capacité d'auto-agrégation avec des valeurs comprises entre 87,8 ± 2,5% et 53,9 ± 9,5%. Les 4 autres (L25, L64, B35 et F6-1) présentent très peu d'auto-agrégation (pourcentage d'auto-agrégation compris entre 0,6 ± 0,6% et 2,5 ± 2,5%). La souche L61 présente la meilleure capacité d'auto-agrégation (87,8 ± 2,5 %) alors que la souche B35 présente la moins bonne (0,6 ± 0,8%) (figure 30).

La comparaison des propriétés d'auto-agrégation et d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales HT29-MTX des 14 souches de *S. salivarius* montre différents cas de figure. Par exemple, la souche F6-1 présente une faible capacité d'auto-agrégation (1,5 ± 1,5%) alors que c'est la souche la

plus adhérente aux cellules épithéliales intestinales HT29-MTX (117,9 ±3,1 UFC/HT29-MTX). À l'inverse, les souches F4-2 et B63 qui ont une forte capacité d'auto-agrégation (respectivement 80,3 ±1% et 79,9 ±3,2%) adhèrent respectivement bien (52,1 ±1,5 UFC/HT29-MTX) et très peu (7,5 ±1,3 UFC/HT29-MTX) aux cellules HT29-MTX (figures 29 et 30). Ces données ne permettent donc pas d'établir de corrélation entre les capacités d'auto-agrégation et d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales HT29-MTX des souches de *S. salivarius* testées.

De même, la comparaison des capacités d'auto-agrégation et d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales Caco2 montre par exemple que la souche B63 présente une forte capacité d'auto-agrégation (79,9 ±3,2%) alors qu'elle adhère très peu aux cellules Caco2 (1,2 ±0,1 UFC/Caco2). Ces données montrent donc qu'il n'existe pas non plus de corrélation entre l'auto-agrégation et l'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales Caco2 des souches de *S. salivarius* testées.

3. Impact du mucus sur la capacité d'adhésion de *S. salivarius* F6-1 aux cellules épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus

Les résultats précédents ont montré que la souche F6-1 est la souche qui présente la plus forte capacité d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales HT29-MTX qui, contrairement aux cellules Caco2, produisent du mucus. Ils ont également montré que l'ensemble des souches de *S. salivarius* testées adhère globalement mieux sur ces cellules HT29-MTX et par conséquent en présence de mucus. Il était donc intéressant de comprendre pourquoi F6-1 adhère mieux aux cellules productrices de mucus, en se demandant par exemple si cette capacité dépend du type de mucus et quelles sont les protéines de surface bactériennes impliquées dans cette adhésion.

a. Etude des capacités d'adhésion à deux lignées cellulaires gastro-intestinales productrices de mucus de *S. salivarius* F6-1

À ce stade du travail, nous avons eu accès à la lignée cellulaire HT29-CL16E qui produit principalement la mucine MUC2 alors que la lignée HT29-MTX produit principalement les mucines MUC3 et MUC5AC (Augeron & Laboisse, 1984; Lesuffleur *et al.*, 1990). Tout au long du tractus gastro-intestinal, les cellules bactériennes sont en contact avec différents types de mucines produites par des cellules caliciformes (Liévin-Le Moal & Servin, 2013). Il nous a donc paru intéressant d'étudier l'impact de ces différentes mucines sur les capacités d'adhésion de la souche F6-1.

L'adhésion de la souche F6-1 a alors été testée sur les lignées cellulaires HT29-MTX et HT29-CL16E et les résultats obtenus sont présentés dans la figure 31.

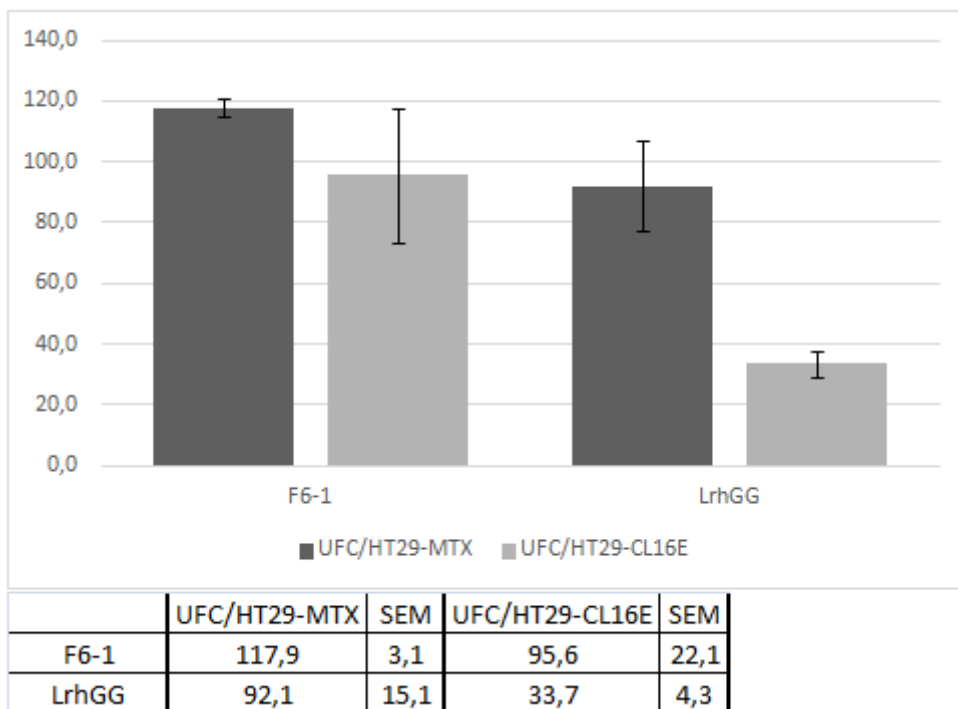


Figure 31 : Comparaison des capacités d'adhésion de la souche F6-1 sur les deux lignées cellulaires HT29-MTX et HT29-CL16E. LrhGG correspond à *L. rhamnosus GG* (Kebouchi *et al.*, 2016). Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant colonie adhérentes par cellule épithéliale (UFC/HT29-MTX et UFC/HT29-CL16E). Les expériences ont été réalisées en triplicatas indépendants et les résultats sont présentés avec leur barre d'erreur-type (SEM).

Les résultats ci-dessus indiquent que la capacité d'adhésion de la souche F6-1 aux deux lignées cellulaires n'est pas significativement différente ($95,6 \pm 22,1$ UFC/HT29-CL16E et $117,9 \pm 3,1$ UFC/HT29-MTX). Ils montrent également que, quelle que soit la lignée cellulaire étudiée, la capacité d'adhésion de la souche F6-1 est supérieure à celle de *L. rhamnosus GG*. Ainsi, la présence de mucus induit une forte capacité d'adhésion de la souche F6-1, mais la nature du mucus, c'est-à-dire le type de mucines (MUC2 pour HT29-CL16E et MUC3 et MUC5AC pour HT29-MTX), ainsi que les récepteurs membranaires différents entre les deux lignées cellulaires, n'influencent pas cette capacité.

b. Identification de protéines exprimées à la surface de *S. salivarius* F6-1

Les propriétés d'adhésion des bactéries sont notamment conférées par des protéines présentes à leur surface, les adhésines. Celles-ci participent aux interactions entre les bactéries et le support. Après avoir identifié les protéines exprimées à la surface de *S. salivarius* F6-1, certaines ont été sélectionnées pour déterminer leur impact sur les capacités d'adhésion de F6-1 aux cellules épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus.

Dans un premier temps, la séquence du génome de *S. salivarius* F6-1 a été analysée afin de mettre en évidence les gènes codant des protéines de surface. Pour cela, le génome de la souche F6-1 a d'abord été annoté grâce au logiciel RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) afin d'identifier les CDS et d'accéder aux séquences des protéines qu'elles codent (équipe ICE-TeA, laboratoire DynAMic). Les

protéines sécrétées ont alors été identifiées grâce au logiciel Signal P 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) qui reconnaît celles qui présentent un peptide signal. Ce logiciel est capable d'identifier le site de clivage du peptide signal mais il n'est pas capable de différencier les types de peptide signal.

Cette analyse a indiqué que la souche *S. salivarius* F6-1 code 42 protéines de surface potentielles. L'analyse des motifs de leurs peptides signal a permis de les classer en trois catégories (figure 32) :

- les protéines présentant un peptide signal avec le motif KxYKxGKxW : 15 protéines
- les protéines présentant un peptide signal avec le motif YSIRK : 13 protéines
- les protéines présentant un autre peptide signal (sans motif décrit) : 14 protéines.

Au sein de chaque catégorie, les protéines ont été réparties en deux groupes en fonction de la présence ou non du motif LPxTG d'ancrage au peptidoglycane de la paroi cellulaire (figure 32). Enfin, au sein de chaque groupe, les protéines ont été classées en fonction de leurs domaines protéiques. Les protéines présentant les mêmes domaines ont été regroupées (figure 32). La dénomination « autre(s) domaine(s) » regroupe des protéines présentant toutes des domaines différents qui n'ont pas été détaillés.

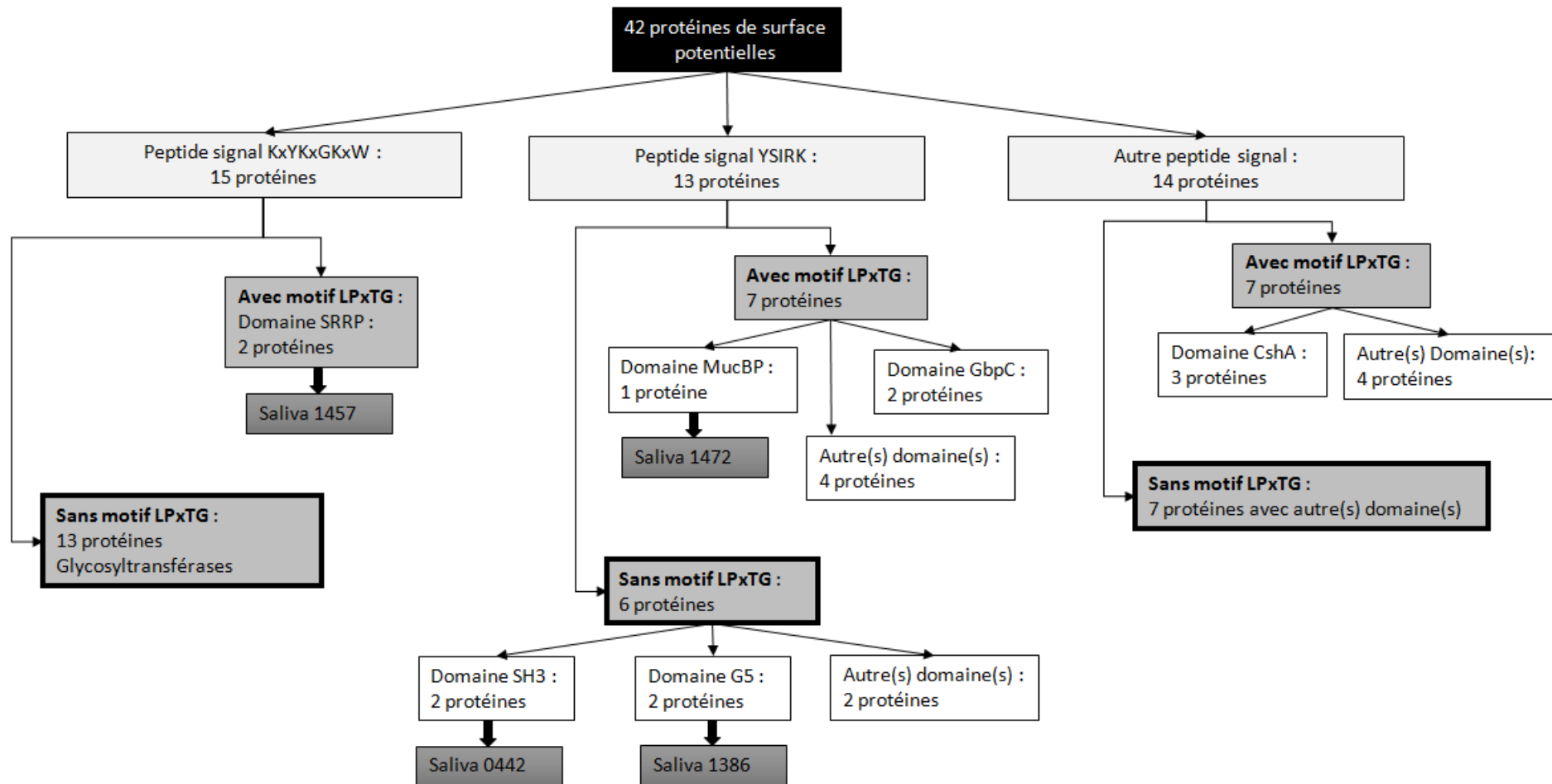


Figure 32 : Distribution des protéines de surface potentielles retrouvées par l'analyse *in silico* du génome de F6-1. Les protéines de surface sélectionnées pour l'étude sont nommées Saliva suivi d'un numéro.

c. Sélection des protéines de surface à étudier chez *S. salivarius* F6-1

Les coûts d'expérimentation liés à l'étude de l'impact de ces protéines de surface sur l'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales étant élevés en raison du coût de la culture cellulaire en insert, il a été nécessaire de limiter le nombre de protéines de surface à étudier. Cette sélection a été réalisée sur la base des données bibliographiques pour ne retenir que les protéines présentant des domaines connus pour leur implication plus ou moins directe dans l'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales. L'analyse présentée dans la figure 32 a permis de faire cette sélection.

Parmi les 42 protéines de surface identifiées, 16 présentent un motif LPxTG à leur extrémité C-terminale qui permet leur ancrage au peptidoglycane de la paroi cellulaire (Introduction III.2.e.). Cet ancrage implique la sortase A (SrtA) (Hendrickx *et al.*, 2011). Dans un premier temps, le gène codant cette protéine a été remplacé par un gène de résistance à l'érythromycine pour tester l'impact de l'ensemble des protéines à motif LPxTG sur la capacité d'adhésion de la souche F6-1 aux cellules épithéliales gastro-intestinales.

Ensuite, deux des protéines à motif LPxTG identifiées ont été sélectionnées. La protéine Saliva 1457 présente un peptide signal à motif KxYKxGKxW et c'est l'une des deux protéines présentant un motif SRRP (Serine Rich Repeat Protein). Chez les streptocoques, ce motif est impliqué dans la liaison avec la fibronectine qui permet une adhésion à la matrice extracellulaire et donc à un épithélium (Handley *et al.*, 2005).

La protéine Saliva 1472 présente un peptide signal à motif YSIRK et c'est la seule protéine possédant un domaine PF06458 appelé MucBP qui pourrait être impliqué dans la liaison au mucus. En effet, ce domaine est présent en quatre exemplaires dans la protéine MBF (Mucus-Binding Factor) de *L. rhamnosus* GG dont le rôle dans l'adhésion de cette bactérie au mucus intestinal humain a été démontré (von Ossowski *et al.*, 2011).

Les autres protéines présentant un motif LPxTG n'ont pas été retenues car elles ne portent pas de domaines connus chez les streptocoques pour être impliqués dans l'adhésion à un épithélium. Par exemple, les protéines présentant un domaine GbpC (glucan binding protein C) sont impliquées dans la liaison aux glucanes (Sato *et al.*, 1997). De même, celles présentant un domaine CshA sont impliquées seulement dans la première phase réversible de l'adhésion à la fibronectine chez *S. gordonii* (Jakubovics *et al.*, 2009). Cette phase nécessite aussi la présence d'une protéine avec un domaine Hsa. De plus, la mise en place de la deuxième phase de l'adhésion (non réversible) nécessite la présence d'une autre protéine avec un domaine SspA ou SspB (Jakubovics *et al.*, 2009). Ces protéines à domaine CshA n'ont pas été retenues au profit du système plus simple de la protéine

Saliva 1457 qui présente également un domaine de liaison à la fibronectine mais sans nécessiter la présence d'autres protéines.

Enfin, sur les 26 protéines sans motif LPxTG identifiées, deux ont été sélectionnées. Ces deux protéines présentent un peptide signal avec le motif YSIRK. La protéine Saliva 0442 est l'une des deux protéines qui portent des domaines SH3. Ses 6 domaines SH3 seraient impliqués dans des interactions avec des protéines possédant des séquences riches en proline comme cela a été montré pour plusieurs protéines contenant des domaines SH3. Les domaines SH3 seraient ainsi impliqués dans l'adhésion cellule-cellule et la formation d'agrégats (Machiyama *et al.*, 2015; Morton & Campbell, 1994; Pawson & Schlessingert, 1993). La protéine Saliva 0442 présente également deux domaines GBS-bsp connus pour leur implication dans la morphologie cellulaire chez *S. agalactiae* (Reinscheid *et al.*, 2002).

La protéine Saliva 1386 est l'une des 3 protéines qui contiennent des domaines G5. Ses deux domaines G5 pourraient être impliqués dans la formation de biofilm comme cela a été montré pour la peptidase IgA1 de *S. pneumoniae* (Bateman *et al.*, 2005). Elle possède également un domaine ZmpB suggérant qu'il s'agit d'une métalloprotéase à zinc. Les protéines présentant un domaine ZmpB sont peu décrites chez les streptocoques mais Novak *et al.* (2000) ont montré leur rôle dans l'adhésion de *S. pneumoniae* à l'épithélium nasopharyngé. Elles sont apparentées à la protéine ZmpC qui est impliquée dans l'adhésion aux mucines de l'œil (MUC16) et qui agit comme facteur de virulence chez *S. pneumoniae* (Govindarajan *et al.*, 2012; Menon & Govindarajan, 2013). ZmpC présente 31% d'identité avec la protéine Saliva 1386 et contient aussi un domaine G5.

Les autres protéines sans motif LPxTG n'ont pas été retenues car elles ne présentent pas de domaines connus chez les streptocoques comme étant impliqués dans l'adhésion à un épithélium. Par exemple, les glycosyltransférases sont impliquées dans la synthèse de la capsule (Oliver *et al.*, 2013).

Les gènes codant chacune des quatre protéines sélectionnées ont été remplacés par un gène de résistance à la spectinomycine chez la souche F6-1 pour générer les mutants F6-1 Δ 1472, F6-1 Δ 1457, F6-1 Δ 1386 et F6-1 Δ 0442. Les capacités d'adhésion de ces mutants aux lignées cellulaires épithéliales gastro-intestinales HT29-MTX et HT29-CL16E ont été évaluées et comparées à celles de la souche sauvage.

d. Impact de la sortase A sur les capacités d'adhésion de *S. salivarius* F6-1

L'impact de la délétion du gène de la sortase A sur les capacités d'adhésion de la souche F6-1 aux cellules épithéliales productrices de mucus (HT29-MTX et HT29-CL16E) a été étudié et les résultats sont présentés dans la figure 33.

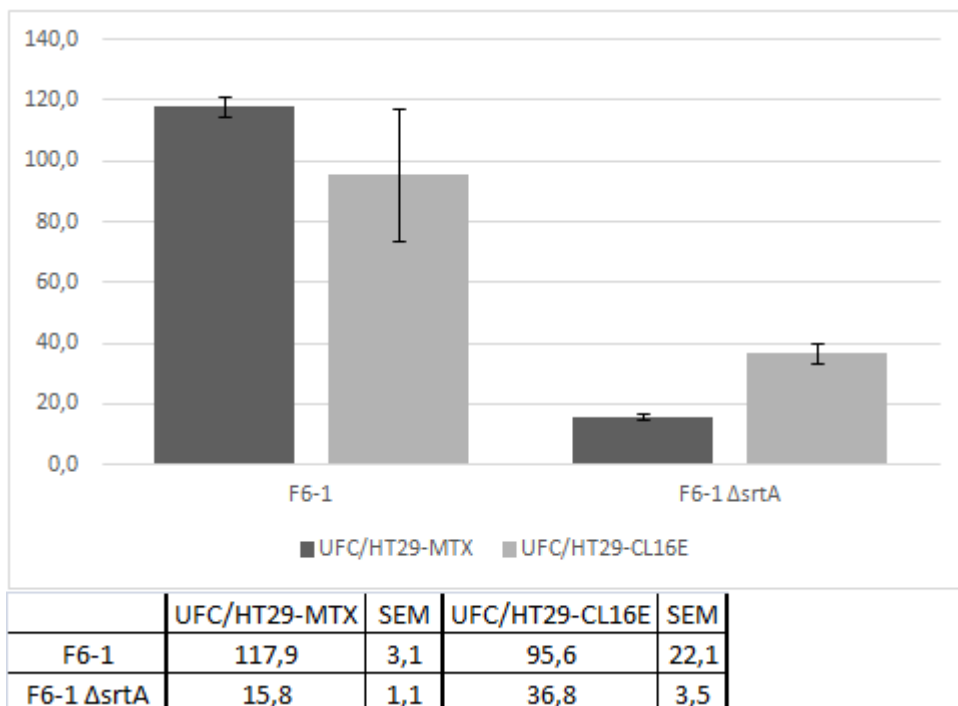


Figure 33 : Capacité d'adhésion de la souche sauvage F6-1 et de son mutant délété du gène *srtA* (F6-1 Δ srtA) aux cellules épithéliales gastro-intestinales des lignées cellulaires HT29-MTX et HT29-CL16E. Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant colonie adhérentes par cellule épithéliale (UFC/HT29-MTX et UFC/HT29-CL16E). Les expériences ont été réalisées en duplicatas indépendants et les résultats sont présentés avec leur barre d'erreur-type (SEM).

Les résultats ci-dessus montrent que la délétion du gène *srtA* induit une chute d'un facteur 7,5 de la capacité d'adhésion aux cellules HT29-MTX de F6-1 Δ srtA ($15,8 \pm 1,1$ UFC/HT29-MTX) par rapport à la souche F6-1 sauvage ($117,9 \pm 3,1$ UFC/HT29-MTX).

Cette délétion provoque également une baisse d'un facteur 2,6 de la capacité d'adhésion à la lignée cellulaire HT29-CL16E du mutant F6-1 Δ srtA ($36,8 \pm 3,5$ UFC/HT29-CL16E) par rapport à la souche F6-1 sauvage ($95,6 \pm 22,1$ UFC/HT29-CL16E) (figure 33).

Ces données permettent de conclure que des protéines de surface à motif LPxTG sont importantes pour l'adhésion de la souche F6-1 aux deux types de cellules épithéliales gastro-intestinales, HT29-MTX et HT29-CL16E. De plus, la différence observée entre ces deux types cellulaires pour l'adhésion de F6-1 Δ srtA par rapport à la souche sauvage (facteur 7,5 pour HT29-MTX et 2,6 pour HT29-CL16E) indique que l'implication des protéines à motif LPxTG dépend de la nature des mucines produites (MUC3 et MUC5AC pour HT29-MTX et MUC2 pour HT29-CL16E).

e. Impact de protéines de surface sur les capacités d'adhésion de *S. salivarius* F6-1

L'impact de la délétion des gènes codant les quatre protéines de surface sélectionnées sur la capacité d'adhésion de la souche F6-1 a été étudié sur les lignées cellulaires HT29-MTX et HT29-CL16E et les résultats sont présentés dans la figure 34.

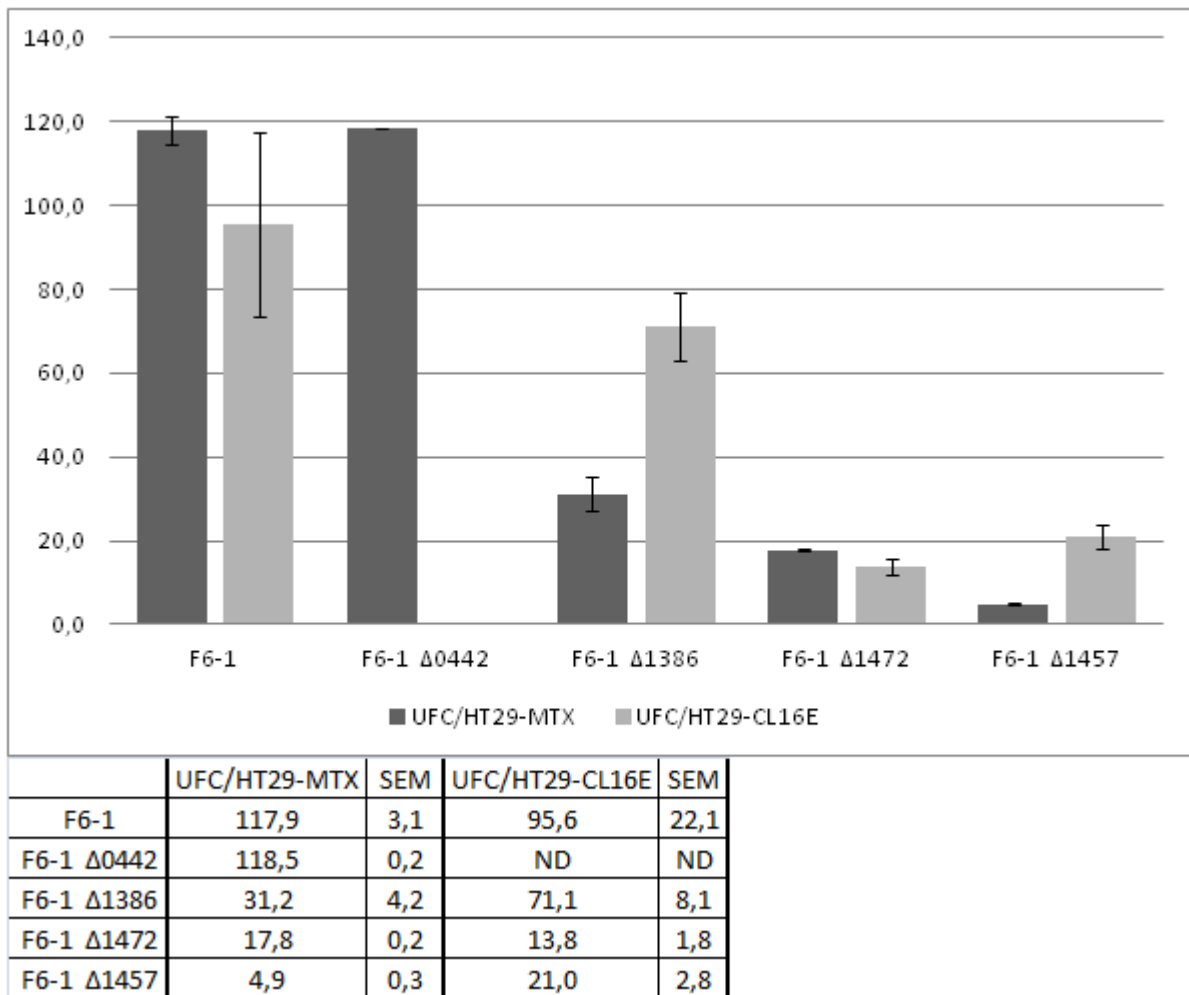


Figure 34 : Capacité d'adhésion aux cellules épithéliales intestinales des lignées HT29-MTX et HT29-CL16E de la souche sauvage F6-1 et de quatre mutants délétés des gènes codant les différentes protéines de surface sélectionnées. Les résultats sont exprimés en nombre d'unités formant colonie adhérentes par cellule épithéliale. ND signifie Non Déterminé. Ceci est dû à un problème de manipulation sur un des duplicatas (insert percé lors de l'étape de récupération du culot). L'expérience a été réalisée en duplicatas indépendants et présentés avec leur barre d'erreur-type (SEM).

Les résultats ci-dessus montrent que la délétion du gène codant la protéine de surface à motif LPxTG Saliva 1472 provoque une baisse d'un facteur 6,6 de l'adhésion aux cellules HT29-MTX du mutant F6-1 Δ1472 ($17,8 \pm 0,2$ UFC/HT29-MTX) par rapport à la souche sauvage F6-1 ($117,9 \pm 3,1$ UFC/HT29-MTX). De même, la délétion du gène codant la protéine de surface à motif LPxTG Saliva 1457 provoque une baisse d'un facteur 24 de l'adhésion aux cellules HT29-MTX du mutant F6-1 Δ1457 ($4,9 \pm 0,3$ UFC/HT29-MTX) par rapport à la souche sauvage F6-1 ($117,9 \pm 3,1$ UFC/HT29-MTX). Ces délétions induisent également une perte d'adhésion aux cellules HT29-CL16E des mutants d'un facteur 6,9 pour Saliva 1472 ($13,8 \pm 1,8$ UFC/HT29-CL16E) et 4,5 pour Saliva 1457 ($21,0 \pm 2,8$ UFC/HT29-CL16E) par rapport à la souche sauvage F6-1 ($95,6 \pm 22,1$ UFC/HT29-CL16E). Ces résultats montrent donc que ces deux protéines Saliva 1472 et Saliva 1457 participent à l'adhésion de *S. salivarius* à la surface des deux lignées cellulaires épithéliales gastro-intestinales testées.

La délétion du gène codant la protéine Saliva 1386 induit une baisse d'un facteur 3,8 de l'adhésion aux cellules HT29-MTX du mutant ($31,2 \pm 4,2$ UFC/HT29-MTX) par rapport à la souche sauvage F6-1 ($117,9 \pm 3,1$ UFC/HT29-MTX) (figure 33). La protéine Saliva 1386 serait donc impliquée dans l'adhésion de F6-1 aux cellules épithéliales gastro-intestinales HT29-MTX. Cette délétion induit également une baisse d'un facteur 1,3 de l'adhésion aux cellules HT29-CL16E du mutant ($71,1 \pm 8,1$ UFC/HT29-CL16E) par rapport à la souche sauvage F6-1 ($95,6 \pm 22,1$ UFC/HT29-CL16E) (figure 34). Cette diminution n'est pas suffisamment significative pour conclure à l'implication de cette protéine dans l'adhésion de F6-1 aux cellules épithéliales gastro-intestinales HT29-CL16E. La différence observée entre les deux types cellulaires pour l'adhésion de F6-1 Δ 1386 par rapport à la souche sauvage (facteur 3,8 pour HT29-MTX et 1,3 pour HT29-CL16E) suggère que l'adhésion de *S. salivarius* F6-1 pourrait être conditionnée, du moins en partie, par le type de mucines exprimées à la surface des cellules épithéliales gastro-intestinales. En effet, seul le type de mucines produites diffère entre ces deux lignées cellulaires.

Enfin, les résultats présentés dans la figure 34 montrent que la délétion du gène codant la protéine Saliva 0442 n'a aucun impact sur la capacité d'adhésion aux cellules HT29-MTX du mutant ($118,5 \pm 0,2$ UFC/HT29-MTX) par rapport à la souche sauvage ($117,9 \pm 3,1$ UFC/HT29-MTX). Ce résultat indique donc que la protéine Saliva 0442 ne participe pas à l'adhésion de *S. salivarius* F6-1 aux cellules épithéliales HT29-MTX.

L'ensemble des résultats de cette deuxième partie montre que les capacités d'adhésion aux cellules des écosystèmes digestif et buccal de *S. salivarius* dépendent à la fois de la souche bactérienne et des lignées cellulaires utilisées. Ces résultats ont également permis de sélectionner la souche F6-1 qui présente un phénotype d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus particulièrement élevé. Enfin, l'étude de mutants de la souche F6-1 a permis d'identifier trois protéines de surface (Saliva 1386, Saliva 1472 et Saliva 1457) qui contribuent à la forte adhésion de *S. salivarius* F6-1 aux cellules épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus.

III. Étude du transfert conjugatif d'ICESt3 F6-1 *rpsI* chez *S. salivarius*

Afin d'étudier l'impact de l'adhésion sur le transfert des ICE, un prérequis est de vérifier que ces éléments sont capables de se transférer par conjugaison dans des conditions de laboratoire. J'ai choisi d'étudier l'ICESt3 F6-1 *rpsI* qui est intégré au sein du gène *rpsI* chez la souche F6-1. Ce choix se justifie par le fait (i) qu'il appartient à la famille ICESt3, et (ii) qu'il est porté par la souche F6-1 qui présente la plus forte capacité d'adhésion sur cellules épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus. La séquence de cet ICE a alors été analysée *in silico* afin de caractériser les CDS (CoDing Sequence) qu'il code et de les comparer à celles de l'ICESt3 de *S. thermophilus* dont la fonctionnalité a déjà été démontrée (Bellanger *et al.*, 2009). Ensuite, l'excision étant la première étape du transfert conjugatif, sa capacité d'excision a été testée. Par la suite, afin de pouvoir suivre son transfert conjugatif, il a été marqué par une cassette de résistance à la kanamycine et de potentielles souches réceptrices ont été sélectionnées. Enfin, des expériences de conjugaison *in vitro* ont été réalisées dans différentes conditions pour tester son transfert.

1. Description d'ICESt3 F6-1 *rpsI* de *S. salivarius* F6-1

La souche F6-1 porte deux éléments intégratifs, un IME intégré dans le gène *tRNALys* et l'ICESt3 F6-1 *rpsI* (figure 23). Ce dernier élément de 38 444 pb est intégré à l'extrémité 3' du gène *rpsI*. Son intégration dans le génome bactérien par recombinaison site-spécifique provoque des répétitions directes (DR) de 51 pb qui bornent l'élément (figure 35) et qui font partie des sites *attL* et *attR*. Il présente également une copie de cette DR au sein de son module d'adaptation (figure 35).

La comparaison des séquences d'ICESt3 F6-1 *rpsI* et d'ICESt3 de *S. thermophilus* CNRZ385 est présentée sur la figure 35. Elle met en évidence que leurs modules de conjugaison présentent 93% d'identité nucléotidique et que l'ICESt3 F6-1 *rpsI* ne présente pas de pseudo-gènes. Le module de conjugaison d'ICESt3 F6-1 *rpsI* code en particulier pour les 3 protéines étiquettes sur lesquelles s'appuie la classification des ICE proposée par Ambroset *et al.* (2016), la relaxase (OrfJ), la protéine de couplage (OrfK) et la protéine VirB4 (OrfD). Les gènes codant ces 3 protéines sont homologues à ceux des éléments de la famille ICESt3 ce qui justifie le classement de cet ICE dans cette famille. L'ICESt3 de *S. thermophilus* étant capable de se transférer par conjugaison (Bellanger *et al.*, 2009), ces résultats suggèrent que le module de conjugaison de l'ICESt3 F6-1 *rpsI* serait fonctionnel.

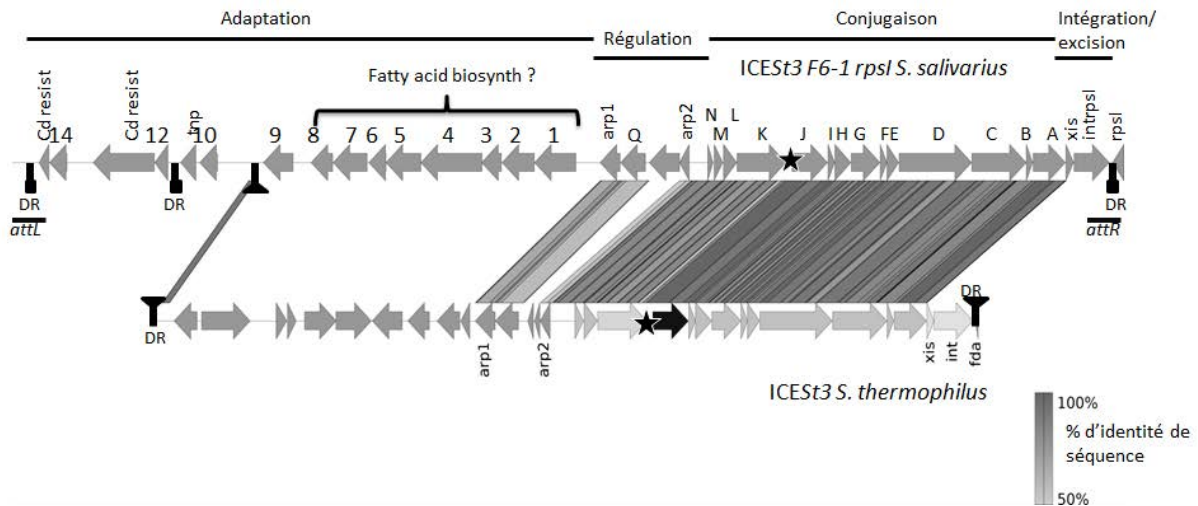


Figure 35 : Comparaison d'ICESt3 *F6-1 rpsl* de *S. salivarius* F6-1 et d'ICESt3 de *S. thermophilus* CNRZ385. Les différentes ORF sont nommées par une lettre ou par un diminutif de leur nom. Ainsi, *xis* code l'excisionase, *intrpsl* code l'intégrase, *Cd resist* code une résistance au cadmium, *fatty acid biosynth ?* code une potentielle voie de biosynthèse d'acides gras et DR désigne les répétitions directes représentées par des barre verticales avec triangles pour les DR *fda* et des barres verticales avec carré pour les DR *rpsl*. Les origines de transfert (*oriT*) des éléments sont symbolisées par une étoile. Les ORF sont représentées par des flèches horizontales. Les séquences présentant plus de 50% d'identité sont indiquées par des zones plus ou moins grisées. Les différents modules sont indiqués par des lignes horizontales noires et désignés par leurs noms.

La comparaison du module d'intégration des ICESt3 de *S. thermophilus* CNRZ385 et de *S. salivarius* F6-1 indique que leurs gènes *xis* codant l'excisionase présentent 94% d'identité. En revanche, il n'y a pas d'identité au niveau du gène codant l'intégrase (*intrpsl*, figure 35) ni au niveau de la séquence protéique qui explique leur insertion dans des sites différents. En effet, l'ICESt3 *F6-1 rpsl* code une intégrase à tyrosine qui catalyse une recombinaison site-spécifique avec l'extrémité 3' du gène *rpsl* alors qu'ICESt3 code aussi une intégrase à tyrosine, mais qui catalyse une recombinaison site-spécifique à l'extrémité 3' du gène *fda*.

Le module de régulation d'ICESt3 *F6-1 rpsl* présente également plus de 50% d'identité de séquences avec l'ICESt3 de *S. thermophilus*, en particulier pour les gènes *arp1* (88%), *arp2* (78%) et *orfQ* (84%) (figure 35). Ce résultat suggère qu'ICESt3 *F6-1 rpsl* présenterait une régulation analogue à celle d'ICESt3 de *S. thermophilus*.

Enfin, le module d'adaptation d'ICESt3 *F6-1 rpsl* ne présente aucune homologie de séquence avec celui d'ICESt3 de *S. thermophilus*, à l'exception d'une séquence de 23 pb qui correspond à la séquence d'une DR d'ICESt3 de *S. thermophilus*. Sa présence chez l'ICESt3 *F6-1 rpsl* suggère que cet élément aurait été, à un moment donné, plus court et intégré à l'extrémité 3' du gène *fda*. Les CDS 1 à 8 de ce module codent des protéines présentant des homologies de séquences avec des protéines pouvant être impliquées dans une voie de biosynthèse d'acides gras (*fatty acid biosynth ?*, figure 35). En particulier, le CDS 1 est homologue à un gène codant une protéine potentiellement impliquées dans la synthèse de l'oxononanoate et le CDS 2 est homologue à un gène codant une protéine

impliquée dans le transfert de méthyle. Enfin, les CDS 3 et 4 coderaient respectivement un ABC transporteur et une perméase putative. Les fonctions précises des CDS 5 à 8 ne sont pas connues mais il est possible que les CDS 1 à 8 codent des protéines d'une voie de biosynthèse d'acides gras. Cet ICE présente également deux gènes de résistance au cadmium (Cd resist, figure 35). Les 4 autres CDS de ce module codent des fonctions inconnues.

2. Test d'excision d'ICESt3 F6-1 *rpsI* de *S. salivarius* F6-1

L'excision étant la première étape du transfert conjugatif d'un ICE, un test d'excision d'ICESt3 F6-1 *rpsI* a été réalisé afin de vérifier si l'élément est capable de s'exciser dans des conditions analogues à celles utilisées dans les expériences de transfert conjugatif d'ICESt3 de *S. thermophilus*.

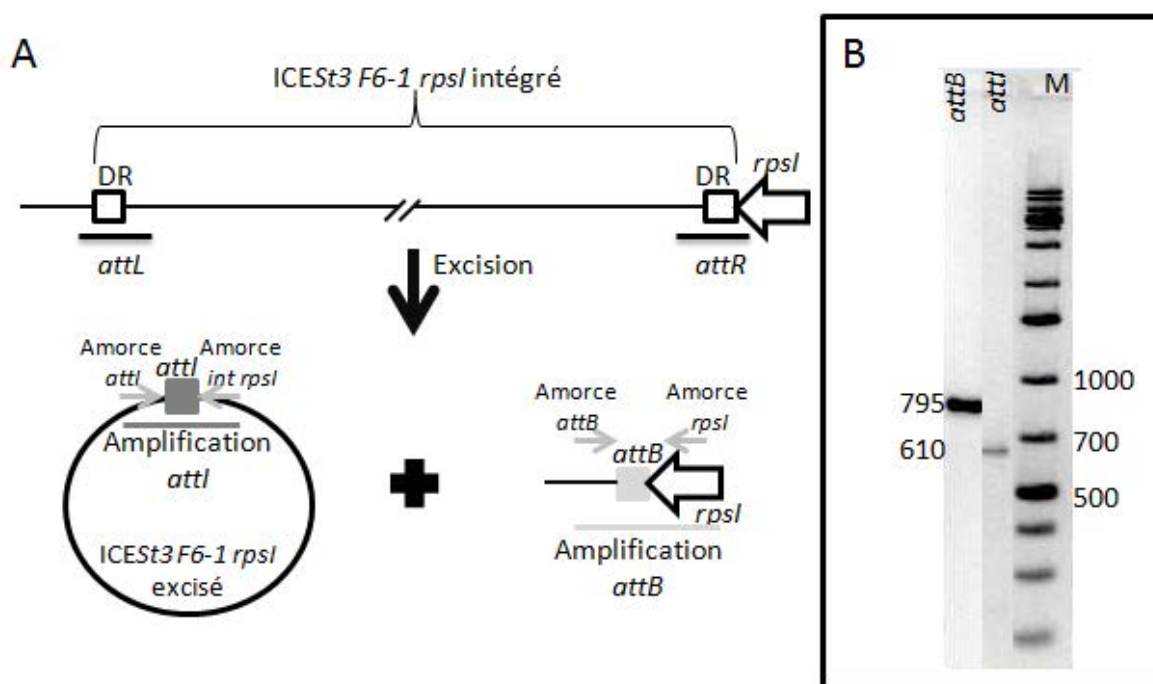


Figure 36 : Test d'excision d'ICESt3 F6-1 *rpsI*. A : schéma de l'excision d'ICESt3 F6-1 *rpsI* avec la localisation des amorces utilisées pour amplifier les sites *attI* et *attB* B : Gel d'électrophorèse des produits de PCR obtenus pour les amplifications *attB* (795 pb) et *attI* (610 pb). M désigne le marqueur de taille 1kb+. Les tailles sont indiquées en pb.

La figure 36A schématise l'excision d'ICESt3 F6-1 *rpsI* sous forme circulaire. La recombinaison site-spécifique entre les sites attL et attR génère un site attI sur l'élément circulaire et un site attB sur le chromosome bactérien. Ainsi, la recherche d'une part, de la forme circulaire de l'élément en amplifiant le site attI et d'autre part, du site d'intégration vide en amplifiant attB permet de savoir si l'élément est capable de s'exciser. Dans les deux cas, cette amplification par PCR implique des amorces s'hybridant de part et d'autre du site à amplifier et dont l'orientation et la position sont schématisées sur la figure 36A. La figure 36B présente les résultats obtenus lors de l'amplification des sites attI et attB de la souche F6-1. Des produits de PCR sont obtenus pour les deux amplifications avec des tailles compatibles à celles attendues, 610 pb pour attI et 795 pb pour attB. Ce résultat

montre donc qu'ICEst3 F6-1 rpsI est capable de s'exciser sous forme circulaire dans les conditions testées.

3. Etude du transfert conjugatif d'ICEst3 F6-1 rpsI chez *S. salivarius*

Afin de savoir si l'ICEst3 F6-1 rpsI est capable de se transférer, des expériences de conjugaison ont été réalisées en utilisant le protocole mis au point au laboratoire DynAMic pour le suivi du transfert d'ICEst3 chez *S. thermophilus* (Bellanger *et al.*, 2009). Dans cette expérience, les cellules donatrices et réceptrices sont déposées sur un filtre de nitrocellulose pour faciliter les contacts entre les cellules et ainsi favoriser les transferts. Les transferts par conjugaison sont suivis par la mesure de la fréquence des transconjugants, c'est-à-dire des cellules réceptrices ayant acquis l'ICE. Elle nécessite d'être capable de distinguer les transconjugants des cellules donatrices et réceptrices (figure 37). Pour cela, d'une part l'ICE de la souche donatrice est marqué par un gène de résistance à un antibiotique afin de pouvoir suivre son transfert, et d'autre part les souches réceptrices portent un gène de résistance à un antibiotique différent de celui de la souche donatrice afin de pouvoir les sélectionner.

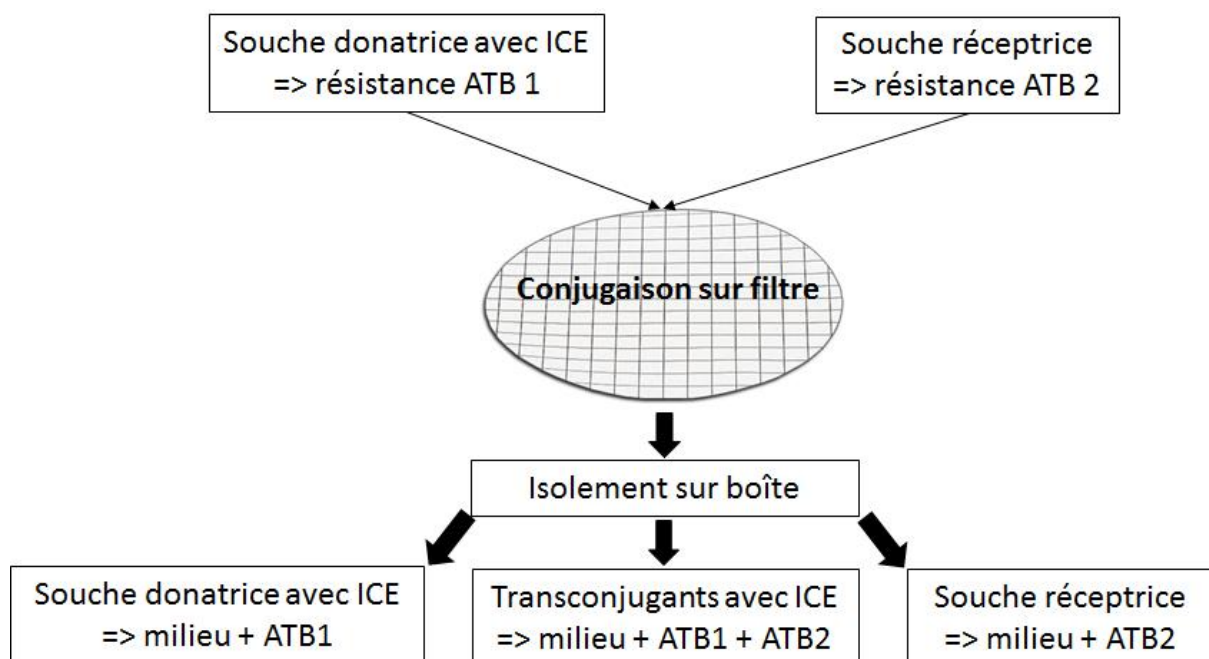


Figure 37 : Schéma de l'expérience de conjugaison sur filtre mise au point par Bellanger *et al.*, (2009) avec ATB pour antibiotique.

a. Marquage d'ICEst3 F6-1 rpsI

L'ICEst3 F6-1 rpsI a donc été marqué par un gène de résistance à la kanamycine (figure 38). Pour cela, une cassette de résistance à la kanamycine a été insérée dans une zone intergénique du module d'adaptation de l'ICEst3 F6-1 rpsI.



Figure 38 : Représentation schématique d'ICEst3 rpsI F6-1. Le site d'insertion du gène de résistance à la kanamycine est marqué d'un triangle noir et des lettres KAN.

La donatrice ainsi obtenue a été nommée F6-1K7 ICEst3 rpsI. Elle est donc résistante à la kanamycine mais elle est sensible à tous les autres antibiotiques testés dans ce travail (érythromycine, streptomycine, lincomycine, tétracycline et chloramphénicol).

b. Choix des souches réceptrices de *S. salivarius*

Un panel de 35 souches réceptrices potentielles a été sélectionné parmi les 138 souches de la collection de *S. salivarius* du laboratoire qui a été caractérisée dans la première partie de la thèse. Cette sélection a tenu compte de 3 critères développés ci-dessous. Les caractéristiques de ces 35 souches sont présentées dans le tableau 3.

i. Absence d'ICE de la famille ICEst3

Sachant que la présence d'un élément de la même famille pourrait diminuer la fréquence de transfert d'ICEst3 F6-1 rpsI par un mécanisme d'exclusion (Possoz *et al.*, 2003), les souches réceptrices potentielles sélectionnées ne présentent pas d'ICE de la famille ICEst3. En effet, elles ne présentent pas de produit de PCR pour aucun des gènes codant les trois protéines conservées chez les éléments de la famille ICEst3 (protéine de couplage, relaxase et intégrase) (tableau 3).

Tableau 3 : Souches réceptrices sélectionnées pour le transfert conjugatif d'ICESt3 F6-1 *rpsI*. Ery, Tet et Cm correspondent respectivement à l'érythromycine, la tétracycline et au chloramphénicol. R et S signifient respectivement résistant et sensible à l'antibiotique testé. Ces sensibilités aux antibiotiques ont été établies selon les normes 2014 du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de microbiologie (CA-SFM) par antibiogramme (Matériel et méthode article p59). 1 et 0 signifient respectivement que le gène indiqué a été détecté ou non par PCR. Pour le site *attB*, quand un produit de PCR a été observé, sa taille est indiquée. ND signifie Non Déterminé. *cpl*, *int* et *rlx* désignent respectivement les gènes codant la protéine de couplage, l'intégrase et la relaxase.

Souche	Résistance aux antibiotiques			Présence de gènes de résistance aux antibiotiques				Site <i>attB</i>	Détection élément famille ICESt3		
	Ery	Tet	Cm	<i>erm</i> (B)	<i>mef</i> (A/E)	<i>tet</i> (M)	<i>cat</i> Q	Taille du produit de PCR (pb)	<i>cpl</i>	<i>int</i>	<i>rlx</i>
B16	R	S	S	0	1	0	ND	0	0	0	0
F1-1	R	S	S	0	1	0	ND	0	0	0	0
F1-100	R	S	S	0	1	0	ND	0	0	0	0
F1-37	R	S	S	1	0	0	ND	5000	0	0	0
F4-20	R	S	R	0	1	0	1	1750	0	0	0
F7-7	R	R	S	0	1	1	ND	3500	0	0	0
L16	R	S	S	0	1	0	ND	0	0	0	0
L20	R	R	R	0	1	1	1	1750	0	0	0
L21	R	R	S	0	1	1	ND	795	0	0	0
L26	S	R	S	0	0	1	ND	1750	0	0	0
L28	R	R	S	1	0	1	ND	0	0	0	0
L29	R	R	S	1	1	0	ND	5000	0	0	0
L30	R	S	S	0	1	0	ND	3500	0	0	0
L31	R	S	S	1	0	1	ND	8500	0	0	0
L32	R	R	S	1	0	1	ND	0	0	0	0
L33	R	R	S	1	0	1	ND	0	0	0	0
L34	R	R	S	1	0	1	ND	0	0	0	0
L35	R	R	S	0	1	1	ND	6000	0	0	0
L40	R	S	S	1	0	0	ND	600	0	0	0
L43	R	R	S	1	0	1	ND	600	0	0	0
L44	R	R	S	1	0	1	ND	600	0	0	0
L47	R	S	S	0	1	0	ND	795	0	0	0
L56	R	S	S	0	1	0	ND	0	0	0	0
L57	R	S	S	1	1	1	ND	0	0	0	0
L67	R	S	S	0	1	0	ND	795	0	0	0
L70	R	S	S	0	1	0	ND	0	0	0	0
N10	R	R	S	1	0	1	ND	0	0	0	0
N11	R	S	R	0	1	0	1	8500	0	0	0
N13	R	S	S	0	1	0	ND	0	0	0	0
N14	R	R	S	1	0	1	ND	0	0	0	0
N16	R	S	S	0	1	0	ND	0	0	0	0
N17	R	R	S	0	1	1	ND	795	0	0	0
N2	R	R	S	1	0	1	ND	5000	0	0	0
N23	R	R	S	1	0	1	ND	5000	0	0	0
T29G	R	S	S	0	1	0	ND	2500	0	0	0

ii. Résistances à des antibiotiques autres que la kanamycine

La sélection des souches réceptrices potentielles a été réalisée en tenant compte du fait qu'à la fin d'une expérience de conjugaison, il est nécessaire de pouvoir sélectionner les transconjugants potentiels qui sont présents dans un mélange contenant aussi des cellules donatrices et réceptrices. Cette sélection se fait sur gélose supplémentée en antibiotiques appropriés qui sont dépendants des résistances aux antibiotiques des donatrices et réceptrices. La donatrice étant porteuse de l'ICESt3 F6-1 *rpsI* marqué avec un gène de résistance à la kanamycine, elle est résistante à la kanamycine. En revanche, la donatrice est sensible à tous les autres antibiotiques testés dans cette étude. Les souches réceptrices potentielles sélectionnées doivent donc être d'une part sensibles à la kanamycine et d'autre part résistantes à au moins un des antibiotiques testés, l'érythromycine (et autres macrolides), la tétracycline ou le chloramphénicol (tableau 3).

Parmi les 35 souches sélectionnées comme des réceptrices potentielles (tableau 3), 34 présentent une résistance à l'érythromycine conférée par la présence des gènes *erm*(B) ou *mef*(A/E). Chez toutes ces souches, ces gènes sont portés par des éléments conjugatifs de type MEGA, élément IQ, Tn2009, Tn3872 ou Tn6002 qui n'appartiennent pas à la famille ICESt3.

Parmi ces 34 souches résistantes à l'érythromycine, 17 sont aussi résistantes à la tétracycline (tableau 3). Elles présentent toutes le gène *tet*(M) qui est porté par un élément conjugatif de type Tn916 qui n'appartient pas à la famille ICESt3, sauf la souche L29 qui a toutefois été conservée dans la sélection. Parmi ces 34 souches résistantes à l'érythromycine, les souches F4-20, L20 et N11 sont aussi résistantes au chloramphénicol grâce au gène *catQ* porté par un élément IQ qui n'appartient pas à la famille ICESt3 (tableau 3).

La 35^e souche réceptrice potentielle sélectionnée est la souche L26 qui est résistante seulement à la tétracycline (tableau 3).

iii. Présence d'un site d'intégration *rpsI* vide

Pour éviter l'effet barrière d'immunité de cible, Bellanger *et al.* (2011) et G. Guédon (com. pers.) indiquent que le site *attB* de la souche réceptrice doit être entièrement vide. Ainsi, pour qu'ICESt3 F6-1 *rpsI* puisse s'intégrer dans la réceptrice, son site d'intégration localisé à l'extrémité 3' du gène *rpsI* doit être vide. La présence d'un site *attB* vide est révélée par un produit de PCR de 795 pb (figure 36). La détection du site *attB* a donc été réalisée chez les 35 souches précédemment sélectionnées comme indiqué dans la figure 36

Les résultats obtenus (tableau 3) montrent que :

- 15 souches ne présentent aucun signal PCR malgré les 3 expériences indépendantes réalisées. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées. D'une part, ces souches peuvent présenter un élément intégré dans ce site, empêchant ainsi l'obtention d'un produit de PCR puisque les conditions utilisées ne permettent pas d'obtenir des produits de PCR supérieurs à 9kb. D'autre part, l'extrémité 3' du gène *rpsI* peut être délétée ou les séquences correspondant aux amorces peuvent être dégénérées. Ces 15 souches ont donc été éliminées de la sélection.
- 13 autres souches présentent des produits de PCR de 1750 à 8500 pb indiquant la présence de séquences dans le site d'intégration *attB*. Ces 13 souches ont donc également été éliminées de la sélection.
- Pour les trois souches L40, L43 et L44, un produit de PCR de 600 pb a été détecté. Sa taille indique une délétion d'environ 200 pb qui peut défavoriser la recombinaison site-spécifique permettant l'insertion de l'ICE dans le génome de la souche réceptrice (X. Bellanger et G. Guédon, com. cers.).
- Seules les quatre souches L21, L47, L67 et N17 présentent le signal de PCR de 795 pb attendu qui correspond à un site *attB* vide. Ces souches peuvent donc être utilisées comme réceptrices dans des expériences de conjugaison.

Des tests complémentaires ont été effectués pour valider le choix de ces 4 souches. En particulier, leur résistance à l'érythromycine a été vérifiée dans les conditions utilisées en conjugaison. En effet, celle-ci est conférée par le gène *mef(A/E)* qui provoque un phénotype de résistance bas niveau. Les quatre souches ne se développent qu'au bout de 48h d'incubation sur milieu GM17 additionné d'érythromycine à 5 µg/mL (concentration de référence pour les streptocoques selon le CA-SFM (Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de microbiologie)). Toutefois, après ces 48h d'incubation, les potentielles réceptrices L47 et L67 présentent des mutants spontanés à une fréquence moyenne de 10^{-6} sur milieu GM17 additionné de kanamycine (1200 µg/mL), gênant ainsi la différenciation entre les transconjugants potentiels et les réceptrices lors des tests de conjugaison. Ces 2 souches étant sensibles à tous les autres antibiotiques testés, elles ont donc été éliminées de la sélection. En revanche, pour les souches L21 et N17, aucun mutant spontané n'a été détecté sur milieu GM17 additionné de kanamycine (1200 µg/mL) même après 48h d'incubation. Par ailleurs, elles sont bien résistantes à la tétracycline à 20 µg/mL. Cet antibiotique pourra donc être utilisé pour leur sélection et celle des transconjugants.

Les produits de PCR correspondant à l'amplification du site *attB* des souches L21, N17 et F6-1K7 *ICEst3 rpsI* ont été séquencés. L'*ICEst3 F6-1 rpsI* étant capable de s'exciser, la présence du site *attB* vide chez F6-1K7 *ICEst3 rpsI* a été détectée par un produit de PCR de 795 pb (figure 35). Les séquences des 3 produits de PCR présentant 100% d'identité entre elles (résultat non montré), les deux souches réceptrices L21 et N17 ont donc été sélectionnées pour réaliser les expériences de transfert conjugatif d'*ICEst3 F6-1 rpsI*.

c. Tests de transfert conjugatif d'*ICEst3 F6-1 rpsI* vers *S. salivarius* L21 et N17

Dans un premier temps, le transfert conjugatif d'*ICEst3 cm* (*ICEst3* marqué par un gène de résistance au chloramphénicol) de *S. thermophilus* CNRZ385 a été réalisé vers *S. thermophilus* LMG18311 pMG36e selon le protocole de Bellanger *et al.* (2009) afin de servir de témoin positif (figure 39A). Ce transfert a été réalisé avec une fréquence de $3,6 \cdot 10^{-6} \pm 0,5 \cdot 10^{-6}$ transconjugants/donatrice qui est équivalente à celle publiée (Bellanger *et al.*, 2009).

Le transfert conjugatif d'*ICEst3 F6-1 rpsI* a ensuite été réalisé de la souche F6-1K7 *ICEst3 rpsI* vers les souches L21 et N17 selon le protocole de Bellanger *et al.* (2009), c'est-à-dire avec toutes les incubations à 42°C et dans du milieu LM17 contenant du lactose comme source de carbone (figure 39A). Cette expérience a été réalisée 3 fois, mais aucun transconjugant n'a été obtenu sur milieu supplémenté en lactose (10%), tétracycline (20 µg/mL) et kanamycine (1200 µg/mL).

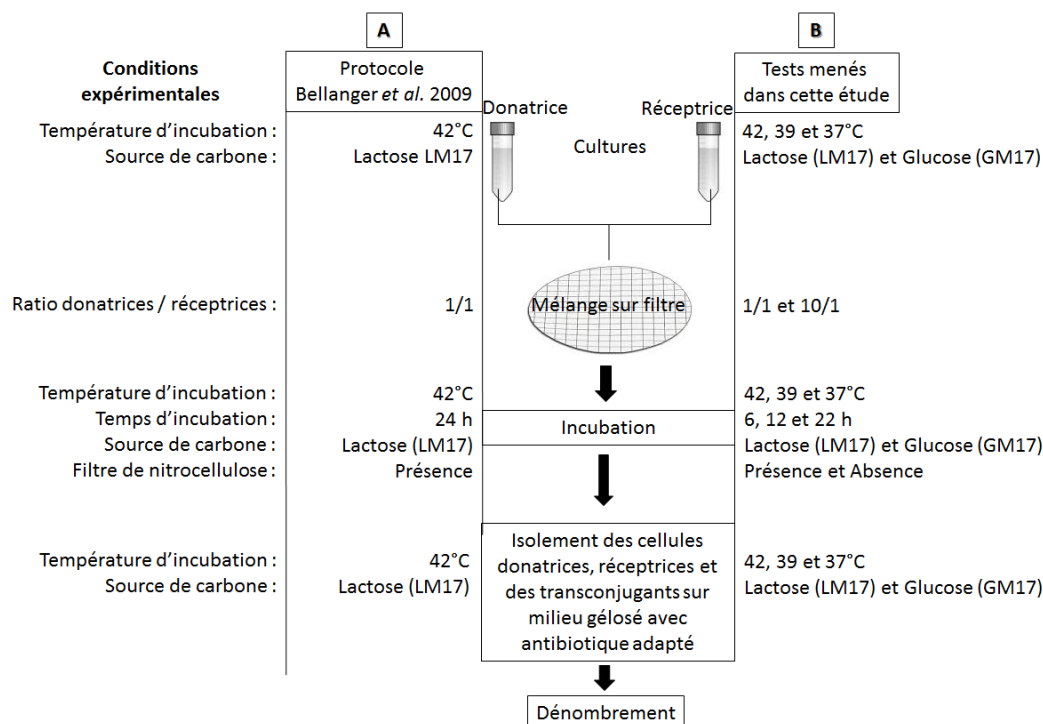


Figure 39 : Principales étapes de l'expérience de conjugaison avec le protocole de Bellanger *et al.* (2009) (A) et les modifications testées dans cette étude (B).

Des tests de conjugaison ont alors été réalisés en faisant varier différents facteurs afin d'optimiser les conditions de transfert (figure 39B). Le premier facteur testé a été la température de toutes les incubations (incubation sur filtre et isolement). Des expériences de conjugaison ont alors été reproduites 3 fois en réalisant toutes les incubations à 39°C qui est un compromis entre 42°C, la température utilisée par Bellanger et al. (2009) et 37°C, la température optimale de croissance de *S. salivarius*. Aucun transconjugant n'ayant été obtenu sur milieu supplémenté en lactose (10%), tétracycline (20 µg/mL) et kanamycine (1200 µg/mL), deux nouveaux essais de conjugaison ont été réalisés avec des incubations à 37°C. Malheureusement, aucun transconjugant n'a été obtenu sur le même milieu de sélection.

Des tests de conjugaison ont également été réalisés en faisant varier la source de carbone du milieu (figure 39B). Des expériences de conjugaison ont alors été reproduites 3 fois en utilisant du milieu M17 additionné de glucose 10% pour la culture initiale, l'incubation sur filtre et l'isolement. En effet, le glucose est une source de carbone métabolisable par *S. salivarius*. Bien que toutes les incubations aient été réalisées à 42, 39 et 37°C, aucun transconjugant n'a été obtenu sur milieu supplémenté en glucose (10%), tétracycline (20 µg/mL) et kanamycine (1200 µg/mL).

Lors de ces différentes expériences de conjugaison, la réceptrice et la donatrice sont mélangées en concentrations identiques (en moyenne 2.10^8 UFC/mL). Cependant, après incubation sur filtre, il a été observé environ 10 fois moins de cellules donatrices par rapport aux réceptrices (en moyenne moins de 1.10^8 UFC/mL pour la donatrice et plus de 3.10^9 UFC/mL pour la réceptrice quelle que soit la source de carbone utilisée (lactose ou glucose) et quelle que soit la réceptrice, N17 ou L21). Or il a été démontré par Lorenzo-Díaz & Espinosa (2009) que le ratio entre cellules donatrices et réceptrices a un impact sur la conjugaison du plasmide pMV158 chez *S. pneumoniae* : une augmentation de la quantité de donatrices par rapport aux cellules réceptrices au moment de la mise en contact sur le filtre induit une augmentation de la fréquence de transfert. Un test de conjugaison a alors été réalisé en mélangeant 10 fois plus de cellules donatrices (en moyenne 2.10^9 UFC/mL) que de cellules réceptrices (en moyenne 2.10^8 UFC/mL) (figure 37B). Ces expériences de conjugaison ont été réalisées 3 fois, mais aucune n'a pas permis d'obtenir une augmentation de la concentration de cellules donatrices après l'incubation sur filtre (en moyenne $9,1.10^7$ UFC/mL). Ces expériences n'ont pas permis non plus d'obtenir de transconjugants sur milieu M17 supplémenté en glucose tétracycline (20 µg/mL) et en kanamycine (1200 µg/mL).

Il a également été démontré que recouvrir le filtre de gélose molle permettait d'augmenter la fréquence de transfert conjugatif du plasmide pIP501 chez *S. pneumoniae* (Smith & Guild, 1980). Enfin, il a été montré que le temps d'incubation sur filtre impacte la fréquence de transfert. En effet,

les données publiées sur *S. thermophilus* montrent que la fréquence de transfert d'ICESt3 est maximale après 24h d'incubation sur filtre (Bellanger *et al.*, 2009), mais d'autres données ont montré que ce même temps d'incubation a un impact négatif sur la fréquence de transfert d'ICE chez *S. agalactiae* où le temps d'incubation optimum est de 8h (S. Payot et A. Puymège, Com. Pers.).

Pour tester l'hypothèse d'une inhibition de croissance de la souche donatrice sur filtre, des expériences de conjugaison d'ICESt3 F6-1 *rpsI* vers les souches L21 et N17 de *S. salivarius* ont été réalisées en faisant varier le temps d'incubation sur filtre (6h, 12h et 22h) ainsi que la présence ou non du filtre (figure 39B). Dans ces différentes expériences, toutes les incubations ont été réalisées à 37°C et le glucose a été utilisé comme source de carbone pour toutes les cultures de l'expérience. Les concentrations en cellules donatrices et réceptrices au moment de la mise en contact étaient équivalentes (environ 5.10^8 UFC/mL). Les souches donatrice et réceptrices ont ensuite été dénombrées après incubation sur filtre lorsqu'elles étaient cultivées seules ou en mélange afin de comprendre l'impact des conditions testées sur la croissance de ces deux souches.

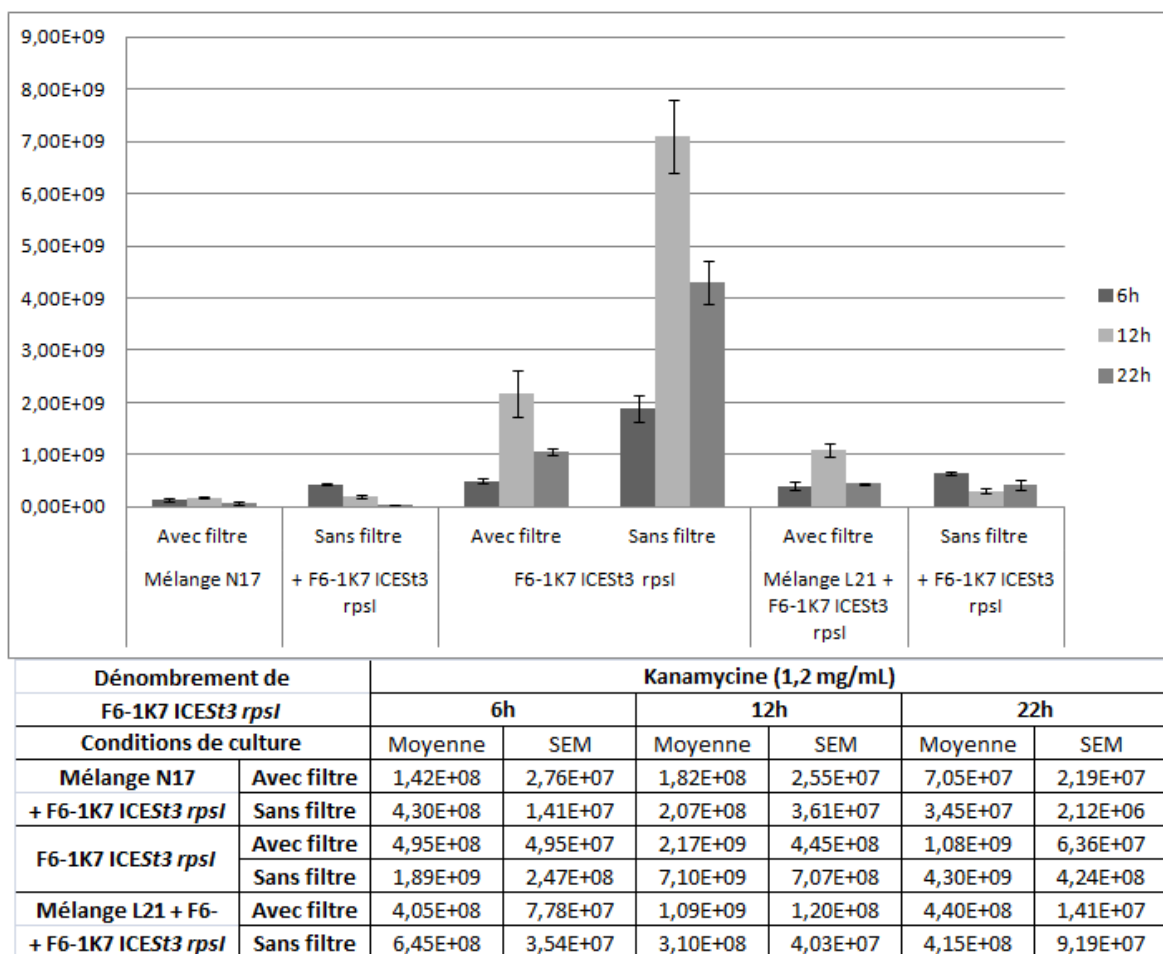


Figure 40 : Concentration cellulaire de la donatrice F6-1K7 ICESt3 *rpsI* (UFC/mL) sur milieu GM17 additionné de kanamycine à 1,2 mg/ml dans les différentes conditions de conjugaison testées. Les expériences ont été réalisées en duplicatas indépendants et les résultats sont présentés avec leur barre d'erreur-type (SEM).

Les résultats du dénombrement de la souche donatrice seule (F6-1K7 ICESt3 *rpsI*) présentés dans la figure 40 montrent que la concentration bactérienne de F6-1K7 ICESt3 *rpsI* varie selon le temps d'incubation sur filtre. La concentration de F6-1K7 ICESt3 *rpsI* maximale est observée pour 12h d'incubation sur filtre, alors que pour 6h et 22h, les concentrations sont beaucoup plus faibles. Ces résultats montrent donc que le temps de mise sur filtre a un impact sur le développement de la souche donatrice et que les conditions optimales seraient de 12h au lieu des 24h utilisées lors des premières expériences de conjugaison réalisées. Les mêmes résultats sont observés en l'absence de filtre. Cependant, en l'absence de filtre, les concentrations bactériennes de F6-1K7 ICESt3 *rpsI* sont deux fois plus élevées qu'en présence du filtre, ce qui indique donc qu'il y aurait un impact négatif du filtre sur la croissance de la souche donatrice.

La présence des souches réceptrices L21 ou N17 a également un impact sur la croissance de F6-1K7 ICESt3 *rpsI* (figure 40). En effet, en présence de N17, la concentration bactérienne de F6-1K7 ICESt3 *rpsI* est 10 fois plus faible qu'en absence de réceptrice après 12h et 22h d'incubation sur filtre. Cette différence est d'autant plus marquée en absence de filtre. En présence de L21, la croissance de F6-1K7 ICESt3 *rpsI* est peu impactée en présence de filtre quel que soit le temps d'incubation. En revanche, en absence de filtre, elle est fortement diminuée pour les temps d'incubation de 12 et 22h.

Les résultats présentés dans la figure 41 montrent l'influence de ces mêmes paramètres sur la croissance des deux souches réceptrices N17 et L21 seules ou en mélange avec la souche donatrice F6-1K7 ICESt3 *rpsI*. La comparaison des figures 40 et 41 montre que quelles que soient les conditions testées, la concentration en cellules donatrices est toujours inférieure à la concentration en cellules réceptrices (facteur 10). Les conditions testées n'ont donc pas permis de régler ce problème.

Concernant la souche L21, deux différences sont notables. En effet, lors du test avec filtre en absence de la donatrice, la concentration cellulaire de L21 la plus élevée est constatée à 12h avec une différence d'un facteur 2 par rapport à 6h et 22h. Il en va de même pour le test avec filtre en présence de la donatrice, la concentration bactérienne de L21 la plus élevée étant observée pour 12h d'incubation. Pour tous les autres tests, les différences de concentration bactériennes de L21 observées ne sont pas suffisamment significatives (figure 41).

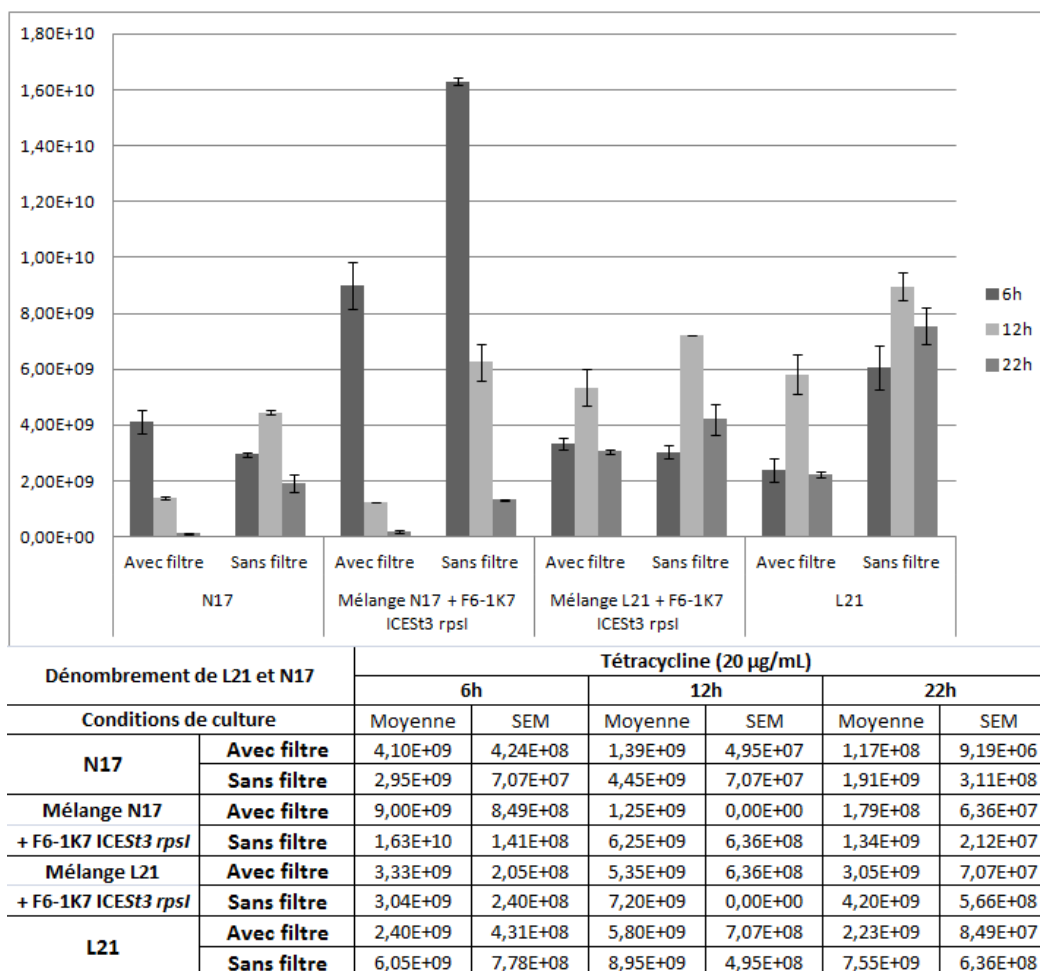


Figure 41 : Concentration cellulaire des réceptrices N17 et L21 (UFC/mL) sur milieu GM17 additionné de tétracycline à 20 µg/ml dans les différentes conditions de conjugaison testées. Les expériences ont été réalisées en duplicatas indépendants et les résultats sont présentés avec leur barre d'erreur-type (SEM).

Pour la souche N17, certains des paramètres testés ont un impact. En effet, la croissance de la souche N17 seule sur filtre ou en mélange avec la donatrice avec et sans filtre est optimale pour 6h d'incubation alors que pour 12h et 22h d'incubation, les concentrations bactériennes de N17 sont beaucoup plus faibles. Par ailleurs, la présence de la souche donatrice F6-1K7 ICES3 rpsI optimise le développement de la souche N17 à 6h d'incubation avec ou sans filtre (figure 41).

Lors de toutes ces expériences de transfert conjugatif, aucun transconjugant n'a jamais été obtenu sur milieu M17 supplémenté en glucose tétracycline (20 µg/mL) et en kanamycine (1200 µg/mL) et la concentration en cellules donatrices a toujours été inférieure à celle des cellules réceptrices. Un test de production de bactériocines (Matériel et méthodes p129) par L21 et N17 a montré qu'aucune des deux souches ne produit de bactériocine affectant la croissance de la souche F6-1K7 ICES3 rpsI (résultat non montré).

Enfin, il a été démontré que la fréquence de transfert conjugatif d'ICES3 de *S. thermophilus* augmente en présence de Mitomycine C (MMC) (Bellanger *et al.*, 2009). L'impact d'un traitement de

la donatrice à la MMC (CMI/2, 1h d'incubation à 37°C) avant son mélange avec les réceptrices a été testé sur la conjugaison de l'ICESt3 F6-1 *rpsI*. Cette expérience a été réalisée en triplicatas indépendants, avec une incubation sur filtre de 12h à 37°C en présence de glucose et en utilisant les souches N17 et L21 comme réceptrices. Malheureusement, aucun transconjugant n'a été obtenu sur milieu M17 supplémenté en glucose tétracycline (20 µg/mL) et en kanamycine (1200 µg/mL).

L'ensemble des résultats de cette troisième partie montre donc qu'ICESt3 F6-1 *rpsI* est capable de s'exciser et que, selon l'étude *in silico*, son module de conjugaison est complet et serait fonctionnel. Cependant, malgré les nombreuses conditions testées, cet ICE n'a pas été capable de se transférer *in vitro* vers les deux souches réceptrices choisies. Les conditions nécessaires au transfert de cet élément ICESt3 F6-1 *rpsI* de *S. salivarius* n'ont donc pas encore été trouvées.

Discussion

L'objectif de ce travail était de caractériser la diversité génétique et phénotypique de *S. salivarius* afin de sélectionner des souches d'intérêt pour le transfert conjugatif. Pour cela, *S. salivarius* doit présenter une diversité génétique et phénotypique qui permette d'avoir un large panel de souches d'étude qui ne sont pas clonales. Les potentielles souches donatrices et réceptrices nécessaires aux expériences de conjugaison seront choisies au sein de ce panel. Celles-ci doivent pouvoir être différenciées facilement phénotypiquement, en particulier par leur profil de résistance aux antibiotiques.

Pour étudier les transferts conjugatifs d'éléments intégratifs, il est nécessaire que les souches donatrices soient porteuses d'ICE et/ou IME. *S. salivarius* doit donc présenter une diversité des éléments intégratifs permettant de choisir les couples de souches donatrices et réceptrices nécessaires aux expériences de conjugaison.

Pour étudier ces transferts conjugatifs au sein des écosystèmes digestif et buccal, il est nécessaire que les souches de *S. salivarius* donatrices et/ou réceptrices soient capables de vivre dans ces écosystèmes et en particulier d'adhérer aux cellules de ces écosystèmes.

Enfin, il est nécessaire que les souches donatrices soient porteuses d'un ICE capable de se transférer en conditions de laboratoire.

Ce sont ces différents points qui vont être abordés dans cette discussion.

I. Diversité génétique et phénotypique de la collection de souches de *S. salivarius*

1. Diversité génétique de la collection de souches de *S. salivarius*

Les génotypes de 212 souches issues des 1092 souches de *S. salivarius* de la collection du laboratoire DynAMic ont été étudiés par MLST au cours de ma thèse. Pour cela, les séquences de 6 gènes de ménage ont été comparées, ce qui a permis de classer ces souches en 96 ST (Sequence Type). La diversité des souches provient essentiellement des 92 souches cliniques qui se répartissent en 78 ST tandis que les 120 souches commensales se répartissent en seulement 18 ST. Qu'elles soient cliniques ou commensales, les souches sont réparties dans les différents ST, elles ne sont pas regroupées dans des ST spécifiques. Ces résultats indiquent qu'il n'est pas possible de distinguer les souches cliniques et commensales sur la base de l'analyse MLST. Ils sont concordants avec une étude

réalisée par Delorme *et al.* (2007) sur 27 souches comprenant 7 souches commensales isolées de la salive de deux individus, une souche issue de lait maternel et 19 souches cliniques.

Dans la mesure où la méthodologie utilisée dans ces deux études est identique, il est possible de comparer les résultats. En 2007, l'analyse par MLST des 27 souches de *S. salivarius* a permis leur classement en 26 ST démontrant ainsi leur diversité. Mon travail de thèse a confirmé ce résultat et a complété le travail précédent puisque les 96 ST identifiés sont tous différents de ceux de Delorme *et al.* (2007) et pour chaque gène les nouveaux allèles identifiés sont nombreux (16 nouveaux allèles sur les 20 identifiés pour *ilvC*, 18 sur 25 pour *sodA*, 44 sur 51 pour *thrS*, 29 sur 34 pour *pyrE*, 34 sur 43 pour *dnaE* et 27 sur 34 pour *ddlA*). Ainsi, l'accroissement du nombre de souches de *S. salivarius* a conduit à une vision plus large de leur diversité. Il est donc légitime de se demander si la collection de souches du laboratoire reflète toute la diversité de *S. salivarius*.

Des analyses par MLST réalisées sur des souches de *S. pneumoniae* ont permis d'apporter une réponse à cette question. En effet, une étude réalisée par Gopi *et al.* (2016) a permis de classer 40 souches isolées d'enfants indiens de moins de 5 ans en 28 ST, indiquant la forte variabilité génotypique de *S. pneumoniae*. Parallèlement, une autre étude menée sur 1551 souches isolées en Catalogne montre qu'elles se répartissent en 249 ST (del Amo *et al.*, 2016). Ces deux études confirment donc que l'augmentation du nombre de souches analysées permet d'accroître la diversité des souches étudiées. Toutefois, l'augmentation de la diversité n'est pas proportionnelle au nombre de souches étudiées, ce qui suggère l'existence d'un nombre seuil de souches à étudier qui représenteraient la diversité totale de l'espèce bactérienne.

Par ailleurs, une étude de la diversité de souches de *S. pyogenes* a permis d'apporter une autre réponse. En effet, Takahashi *et al.* (2016) ont analysé par MLST des souches de cette espèce isolées à partir de prélèvements buccaux de patients hospitalisés en Corée et au Japon. Leurs résultats montrent que les 44 souches isolées au Japon se répartissent en 10 ST tandis que les 168 souches isolées en Corée se répartissent en seulement 9 ST. Ces résultats indiquent que le nombre de souches n'est pas le seul paramètre à prendre en compte pour augmenter la diversité d'une collection de souches, mais que l'origine géographique des souches semble également importante.

La même conclusion peut être apportée par l'étude de la diversité de souches de *S. thermophilus*, une espèce très proche phylogénétiquement de *S. salivarius*. Ainsi, Delorme *et al.* (2010) ont étudié par MLST 27 souches de *S. thermophilus* issues de produits laitiers industriels et artisanaux dont 25 souches sont d'origine européenne, une souche est d'origine indienne et une souche est originaire de Mongolie. Ces 27 souches ont été classées en 21 ST. Toutefois, la divergence entre les allèles pour les différents gènes est faible (valeur moyenne de 0,2%), ce qui pousse les auteurs à conclure à une

faible diversité de ces souches (Delorme et al., 2010). Plus récemment, l'analyse par MLST de 239 souches de *S. thermophilus* isolées de produits laitiers fermentés de fabrication artisanale provenant de 18 régions différentes de Mongolie et de Chine a permis de les regrouper en 119 ST, indiquant une importante diversité (Yu et al., 2015). L'ensemble de ces résultats indiquent que l'origine géographique mais aussi les pratiques artisanales et/ou industrielles ont un impact sur la diversité des souches.

Au cours de ce travail, le nombre de souches commensales a été limité à 12 par site de prélèvement (buccal ou fèces) et par individu. Le plus souvent, les souches classées dans le même ST proviennent du même individu et du même site de prélèvement. Ces résultats indiquent donc que la diversité des souches de *S. salivarius* pour un individu donné et dans un site de prélèvement donné est relativement faible. Par contre, les souches issues de la salive et des fèces d'un seul individu peuvent appartenir jusqu'à 6 ST différents. Ces données suggèrent que pour augmenter la diversité des souches commensales, il n'est pas nécessaire d'augmenter le nombre de souches issues de cette collection de 1092 souches mais plutôt d'augmenter le nombre d'individus et/ou le nombre de sites de prélèvement dont sont issues les souches.

Les données obtenues au cours de ma thèse indiquent que la diversité génétique observée vient principalement des souches cliniques à cause d'un biais dans la collection de souche. Pour accroître cette diversité, il serait donc intéressant d'augmenter la collection de souches cliniques avec des prélèvements non plus centrés sur des CHU français mais élargis à des hôpitaux tout autour du globe et donc issus d'individus d'origines très différentes.

Pour conclure, l'espèce *S. salivarius* présente une grande diversité génétique. Celle-ci est caractérisée par un grand nombre de ST différents mais aussi par la forte divergence observée entre les allèles pour les différents gènes étudiés lors de la MLST. En effet, cette divergence varie de 5 à 32 % selon les gènes, ce qui est l'une des plus hautes observées chez les streptocoques. Cette diversité s'explique par le fait que cette espèce évolue dans différents environnements (digestif et buccal) exigeants, avec une forte compétitivité pour les nutriments essentiels. Ainsi, *S. salivarius* doit posséder un arsenal génétique diversifié lui permettant de s'adapter à ses différentes niches écologiques. Cet arsenal diversifié lui est apporté par les éléments génétiques mobiles et la recombinaison.

Cette première étude a donc permis d'identifier 96 ST pour les 212 souches étudiées. Une collection restreinte de 138 de ces souches (les 92 souches cliniques et 46 des souches commensales) a ensuite été utilisée dans le travail de caractérisation de ces souches. En effet, en fonction de leurs caractéristiques (résistance aux antibiotiques, présence d'éléments intégratifs (ICE ou IME), capacité

d'adhésion à différents substrats biologiques), elles pourront être choisies comme souches donatrices ou réceptrices dans les expériences de conjugaison.

2. Diversité phénotypique des résistances aux antibiotiques de la collection de souches de *S. salivarius*

L'étude des profils de résistance à six antibiotiques (érythromycine, spiramycine, lincomycine, tétracycline, chloramphénicol et kanamycine) des 138 souches de la collection de *S. salivarius* étudiées a montré que 65% de ces souches sont résistantes à au moins l'un de ces antibiotiques. Une proportion encore plus grande de ces souches résistantes (98%) est résistante à l'érythromycine de la famille des macrolides. La forte prévalence de la résistance à l'érythromycine est une caractéristique également partagée par des souches de streptocoques viridans pharyngées (Malhotra-Kumar *et al.*, 2004; Pérez-Trallero *et al.*, 2001).

76% des souches de *S. salivarius* commensales de notre étude sont résistantes à l'érythromycine et celles-ci codent presque toutes le gène *mef(A/E)*. Ces résultats sont en accord avec ceux des études de Brenciani *et al.* (2014) et Pérez-Trallero *et al.* (2001,) mais ils diffèrent de ceux d'autres études où il a été montré la prédominance du gène *erm(B)* chez les souches commensales (Ciric *et al.*, 2012; Malhotra-Kumar *et al.*, 2004). Par ailleurs, 56% des souches cliniques de *S. salivarius* de notre étude sont résistantes à l'érythromycine et celles-ci codent à parts égales les gènes de résistance *erm(B)* et *mef(A/E)*. Cette différence de distribution des gènes *erm(B)* et *mef(A/E)* entre les souches cliniques et commensales étudiées pendant ma thèse pourrait s'expliquer par le fait que les souches cliniques isolées dans les hôpitaux sur des patients sont plus exposées à de fortes concentrations en érythromycine que les souches commensales. Cette exposition provoquerait la sélection de souches porteuses du gène *erm(B)* qui code un phénotype MLSB correspondant à une résistance à plusieurs macrolides et à de fortes concentrations de ces macrolides (Leclercq, 2002).

Cette étude a également montré un grand nombre de souches résistantes à la tétracycline, aussi bien chez les souches commensales que cliniques. De forts taux de résistance à cet antibiotique ont également été observés chez les streptocoques pathogènes ces 10 dernières années (Brenciani *et al.*, 2014; Doern & Burnham, 2010). Parmi les souches résistantes à la tétracycline de notre étude, 3 ne présentent aucun des gènes de résistance à la tétracycline recherchés (*tet(M)* et *tet(O)*). Elles porteraient donc d'autres gènes de résistance comme *tet(L)*, *tet(Q)*, *tet(S)* ou *tet(K)* qui ont été observés à faible fréquence chez d'autres streptocoques (Brenciani *et al.*, 2014). Les autres souches résistantes à la tétracycline de notre étude portent toutes le gène *tet(M)*. Cette fréquence importante du gène *tet(M)* a également été rapportée chez d'autres streptocoques (Brenciani *et al.*, 2014; Malhotra-Kumar *et al.*, 2004).

Enfin, parmi les 138 souches de notre collection, quatre portent un gène *catQ* qui code une résistance au chloramphénicol. Cette résistance est fréquemment retrouvée chez *S. pneumoniae* et *S. pyogenes* (Del Grosso *et al.*, 2011; Mingoia *et al.*, 2007).

D'une manière générale, la présence des gènes de résistance chez des souches cliniques peut être expliquée par une forte pression de sélection en milieu hospitalier résultant de la forte consommation d'antibiotiques par les patients. En effet, les macrolides (érythromycine) et la tétracycline sont les deux catégories d'antibiotiques les plus utilisées pour traiter des infections aux streptocoques (Brenciani *et al.*, 2014; Doern & Burnham, 2010). Par contre, la diversité des gènes de résistance aux antibiotiques portés par des souches commensales est inquiétante puisqu'elle révèle que des individus jeunes et encore peu soumis à l'antibiothérapie (prélèvements effectués majoritairement sur des enfants de moins de 36 mois) possèdent des bactéries qui portent ces gènes et qui peuvent donc être des réservoirs de gènes de résistance.

II. Abondance et diversité des éléments intégratifs chez *S. salivarius*

1. Abondance et diversité des éléments intégratifs porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques chez *S. salivarius*

De nombreux éléments intégratifs des streptocoques sont connus pour porter des gènes de résistance aux antibiotiques (Mingoia *et al.*, 2014; Roberts & Mullany, 2011). Il était donc intéressant de savoir si les gènes de résistance à l'érythromycine, à la tétracycline et au chloramphénicol retrouvés chez les souches de la collection sont portés par des éléments mobiles. Notre étude a montré que 83% des souches de la collection portent au moins un élément intégratif codant un gène de résistance à un de ces trois antibiotiques.

Parmi ces gènes, *mef(A/E)* conférant la résistance à l'érythromycine est connu pour être porté par un élément MEGA, notamment chez les streptocoques dont *S. salivarius* et *S. pneumoniae* (Gay & Stephens, 2001; Roberts & Mullany, 2011; Stadler & Teuber, 2002). Notre étude indique que la fréquence de l'élément MEGA au sein des génomes de *S. salivarius* (44%) est aussi importante que chez les autres streptocoques, en particulier chez les streptocoques viridans (Brenciani *et al.*, 2014). Cet élément est mobilisable si la souche qui le contient porte également un élément 'helper'. Celui-ci peut être un ICE ou un plasmide conjugatif qui code un pore de conjugaison au travers duquel l'élément mobilisable pourra passer et ainsi être transporté d'une cellule à une autre. Parmi les 61 souches de *S. salivarius* porteuses de l'élément MEGA de notre étude, 46 souches portent également un ICE qui pourrait le mobiliser. En effet, l'élément MEGA participe à la dissémination des gènes de

résistance à l'érythromycine puisqu'il peut être mobilisé en *trans* par d'autres éléments conjugatifs tels que l'ICE Tn3872 (Jönsson & Swedberg, 2006; Santagati *et al.*, 2009).

Les génomes de 10 souches de *S. salivarius* portant un élément MEGA ont été séquencés. La comparaison des séquences de leurs 10 éléments MEGA montre qu'ils sont identiques à l'élément décrit chez *S. salivarius* Sp6 par Stadler & Teuber (2002). En revanche, les séquences nucléotidiques flanquant cet élément ne sont identiques que pour 2 des souches de notre étude. Chez les 8 autres souches ces séquences sont différentes, ce qui indique que ces éléments sont intégrés dans un site différent de celui décrit chez *S. salivarius* Sp6 par Stadler & Teuber (2002) ou chez *S. pneumoniae* GA3488 (Gay & Stephens, 2001). Chez *S. salivarius*, il existe donc deux sites d'intégration différents de l'élément MEGA (figure 23 p69).

L'élément MEGA est également connu pour être intégré dans des éléments de la famille Tn916, comme Tn2009 ou Tn2010 chez *S. pneumoniae* (Roberts & Mullany, 2011), mais ce n'est pas le cas pour les 10 éléments de *S. salivarius* séquencés. En revanche, au cours de notre étude, quatre éléments Tn2009 ont été détectés par PCR chez des souches dont le génome n'a pas été séquencé. Il s'agit donc de la première détection d'un élément Tn2009 chez *S. salivarius*. Bien que le transfert par conjugaison des éléments Tn2009 n'ait actuellement pas été démontré, il a été montré que cet élément participe à la dissémination de la résistance aux macrolides via la transformation naturelle, notamment chez *S. pneumoniae* (Santoro *et al.*, 2014).

En plus de Tn2009 et MEGA, les ICE Tn3872, Tn6002 et Tn916 sont aussi connus pour être porteurs de gènes de résistance à l'érythromycine et à la tétracycline chez les streptocoques (Brenciani *et al.*, 2014). Ces éléments sont retrouvés à des fréquences variables en fonction de l'origine commensale ou clinique de la souche. En effet, Ciric *et al.* (2012) ont montré la prévalence de Tn3872 par rapport à Tn916 chez les 21 souches commensales de *S. salivarius* testées tandis que Zhou *et al.* (2012) ont montré la prédominance de Tn6002 par rapport aux autres éléments dérivés de Tn916 chez les 140 souches pathogènes de *S. pneumoniae* testées. Dans notre étude, les 13 éléments Tn3872 détectés sont présents uniquement chez des souches cliniques de *S. salivarius* tandis que les 11 éléments Tn6002 détectés sont présents chez 8 souches cliniques et 3 souches commensales de *S. salivarius*. De même, Tn916 est présent chez 20 souches cliniques et 8 souches commensales de *S. salivarius*. En particulier, la souche clinique T00 possède les deux éléments Tn3872 et Tn6002. Cependant, ces deux éléments ne participeraient que faiblement à la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques puisque leurs capacités de transfert sont réduites (Cochetti *et al.*, 2007; Del Grosso *et al.*, 2004). En revanche Tn916, qui est l'élément le plus représenté chez *S. salivarius* parmi ces 3 éléments, est capable de se transférer et sa fréquence de transfert est augmentée en présence de

tétracycline (Celli & Trieu-Cuot, 1998). Ainsi *S. salivarius* est un réservoir de gènes de résistances potentiellement transférables.

Enfin, l'analyse de la séquence du génome de *S. salivarius* F4-20 a montré qu'elle porte un élément IQ qui a également été détecté par PCR chez 3 autres souches (F3-10, L20 et N11). Cet élément est très similaire à ceux décrits chez *S. pneumoniae* (Mingoia *et al.*, 2007) et *S. pyogenes* (Del Grosso *et al.*, 2011), mais l'ORF présente en aval du gène *tnp1* est absente chez cet élément F4-20. Chez *S. pyogenes* et *S. pneumoniae*, l'élément IQ est inséré dans un élément comprenant des modules de conjugaison et d'intégration/excision apparentés à ceux des ICE de la famille Tn5252 qui permettent son transfert conjugatif *en cis* (Del Grosso *et al.*, 2011; Mingoia *et al.*, 2007; Mingoia *et al.*, 2014; Nielsen *et al.*, 2010). Or aucun ICE n'a été détecté à proximité de l'élément IQ de F4-20, ce qui suggère que cet élément ne serait pas mobilisable *en cis*. Il ne serait pas non plus mobilisé *en trans* puisque la souche F4-20 ne porte pas d'élément conjugatif. En revanche, pour les 3 autres souches porteuses d'un élément IQ, les données de PCR indiquent la présence de Tn916 chez la souche L20. Celui-ci pourrait donc mobiliser *en trans* l'élément IQ de cette souche.

Pour conclure, *S. salivarius* est un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques dont la plupart sont portés par des éléments intégratifs. Cette espèce participerait donc à la dissémination des résistances aux antibiotiques dans les sphères buccale et intestinale.

2. Abondance et diversité d'autres éléments intégratifs chez *S. salivarius*

➤ Éléments intégratifs conjugatifs (ICE)

Au cours de ma thèse, l'analyse de 19 génomes de *S. salivarius* a permis d'identifier 27 ICE. L'analyse de leurs modules de conjugaison a permis de les classer en familles définies par Ambroset *et al.* (2016). La famille d'ICESt3 est la plus abondante dans les génomes analysés avec un total de 18 éléments. L'abondance des éléments de cette famille était attendue dans la mesure où les génomes séquencés ont été choisis pour leur contenu en ICE de la famille ICESt3. Des éléments de cette famille ont également été retrouvés dans les génomes d'autres espèces de streptocoques comme par exemple *S. pyogenes*, *S. agalactiae* et *S. gallolyticus* (Ambroset *et al.*, 2016).

Chez *S. salivarius*, les éléments de la famille ICESt3 sont intégrés dans l'extrémité 3' de trois gènes différents, *fda*, *rpsl* et *rpmG*. Ces gènes avaient déjà été décrits comme des sites d'intégration d'ICE de cette famille. Ainsi, *fda* est le site d'intégration du premier ICE de cette famille identifié, ICESt3 de *S. thermophilus* CNRZ385 (Pavlovic *et al.*, 2004) tandis que *rpsl* et *rpmG* ont été décrits par Ambroset *et al.* (2016) comme des sites d'intégration d'ICE de la famille ICESt3 chez d'autres streptocoques (*rpsl* par exemple chez *S. gallolyticus* et *S. dysgalactiae* et *rpmG* par exemple chez *S. parauberis* et *S.*

gallolyticus). L'étude d'Ambroset *et al.* (2016) a également montré que des ICE de cette famille s'intègrent à l'extrémité 3' des gènes *tRNA* et à l'extrémité 5' du gène *fstK* qui code une translocase d'ADN impliquée dans la division cellulaire.

L'analyse de la séquence de 6 des 18 ICE de la famille ICESt3 de cette étude a également montré que le contenu en gènes de leurs modules de conjugaison est identique à celui d'ICESt3 de *S. thermophilus* CNRZ385 dont le transfert conjugatif a été démontré (Bellanger *et al.*, 2009). Ces éléments étant également capables de s'exciser dans les conditions testées, ils pourraient être fonctionnels.

En plus des ICE de la famille ICESt3, 9 ICE appartenant aux familles Tn916 (5 éléments), Tn1549 (1 élément) et TnGBS2 (3 éléments) ont été identifiés dans les génomes étudiés de *S. salivarius*. Ces familles sont fréquemment retrouvées chez les streptocoques (Ambroset *et al.*, 2016). En effet, la recherche d'ICE dans 124 génomes de streptocoques a révélé la présence de 27 ICE de la famille Tn916, 14 ICE de la famille Tn1549 et 15 ICE de la famille TnGBS2. Ces données confirment la prévalence des ICE de la famille Tn916 par rapport aux éléments des familles Tn1549 et TnGBS2 dans les génomes de *S. salivarius* et plus largement chez les streptocoques. L'analyse des ICE présents chez les streptocoques a montré également que 31% des génomes portent plusieurs ICE, le nombre le plus important étant observé chez une souche de *S. anginosus* qui contient 7 éléments (Ambroset *et al.*, 2016). De même, un tiers des génomes de *S. salivarius* contiennent plusieurs ICE (6 sur les 19 génomes). Le nombre maximum d'ICE retrouvés est de trois, comme par exemple dans le génome de la souche L61 (figure 23, p69). Dans le cas où un génome de *S. salivarius* comporte plusieurs ICE, ceux-ci appartiennent systématiquement à des familles différentes, ce qui suggère la présence de mécanismes d'exclusion. En revanche, chez les streptocoques, il existe quelques souches qui portent plusieurs ICE de la même famille, comme par exemple la souche NEM316 de *S. agalactiae* qui porte 3 ICE de la famille TnGBS1 ainsi qu'un ICE de la famille TnGBS2 et un ICE de la famille Tn5252 (Ambroset *et al.*, 2016).

Tous les génomes de *S. salivarius* analysés ne contiennent qu'un seul ICE de la famille ICESt3. De la même façon, Ambroset *et al.* (2016) ont montré que tous les génomes de streptocoques ne portent au maximum qu'un seul élément de cette famille. Seul celui de *S. agalactiae* 43143 en contient 3 mais ils sont intégrés dans 3 gènes différents (*rpsI*, *tRNA^{Lys}* et *ftsK*). Ces données suggèrent que les ICE de la famille ICESt3 portent des gènes codant une immunité de cible qui empêcherait l'intégration d'un autre élément dans un même site d'intégration. Par ailleurs, les travaux de Bellanger *et al.* (2011) ont montré qu'ICESt3 de *S. thermophilus* CNRZ385 est capable de se transférer

et de s'intégrer dans un site d'intégration déjà occupé par un élément ICESt3 mais à des fréquences beaucoup plus faibles qu'en absence d'élément intégré dans ce site.

Dans le cas des ICE de la famille Tn916, les intégrases qu'ils codent catalysent le plus souvent une intégration non spécifique (A. P. Roberts & Mullany, 2009). Les données de la littérature indiquent que le plus souvent, Tn916 est présent en un seul exemplaire dans les génomes. Toutefois, dans quelques rares cas, comme par exemple dans le génome de *S. pneumoniae* GA41565, deux éléments qui appartiennent à la famille Tn916 sont présents (Tn916 et Tn2009), mais ils sont intégrés dans des sites différents. Dans la mesure où ces éléments s'intègrent de façon non spécifique, une immunité de cible ne peut pas expliquer l'absence d'intégration au même site, suggérant l'existence d'un autre système de barrière au transfert. Il ne peut pas s'agir d'un système RM codé par la cellule réceptrice puisque Tn916 est connu pour coder des protéines d'anti-restriction capables d'inactiver la mise en place du système RM (Serfiotis-Mitsa *et al.*, 2008). Par contre, il pourrait s'agir d'un système CRISPR mis en place par la cellule réceptrice. En effet, les loci CRISPR dégradent l'ADN entrant et pourraient ainsi bloquer le transfert de l'élément (Bhaya *et al.*, 2011). Des loci CRISPR n'ont pas encore été décrits chez *S. salivarius*, mais ils sont présents chez *S. agalactiae* (Lopez-Sanchez *et al.*, 2012).

➤ Éléments intégratifs mobilisables (IME)

En plus des 27 ICE déjà décrits, 37 IME ont été identifiés dans les 19 génomes séquencés de *S. salivarius*, montrant ainsi leur prévalence sur les ICE. Actuellement les IME sont encore peu décrits dans la littérature et les données sont peu nombreuses chez les streptocoques. L'analyse de 255 génomes de *S. agalactiae* a toutefois démontré la présence d'un grand nombre d'IME (69) et leur prévalence par rapport aux ICE (57) (Puymège *et al.*, 2015). 33 des 37 IME identifiés chez *S. salivarius* sont intégrés à l'extrémité 3' de 6 gènes cibles : *tRNA^{Lys}*, *tRNA^{Leu}*, *rpmG*, *rpsI*, *rplL* et *guaA*. Ces gènes d'intégration sont identiques à ceux des IME et des ICE identifiés dans les génomes des autres streptocoques (Ambroset *et al.*, 2016; Puymège *et al.*, 2015). Les 4 autres IME ne sont pas insérés à l'extrémité 3' d'un gène mais au niveau de l'origine de transfert (*oriT*) d'ICE de la famille ICESt3. Cette spécificité d'insertion n'est pas une caractéristique des IME de *S. salivarius*, puisque des IME *oriT* ont également été détectés chez *S. agalactiae* (Puymège *et al.*, 2015).

Pour conclure, *S. salivarius*, à l'image des streptocoques, code un grand nombre d'éléments intégratifs de différents types, des ICE porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques, des ICE de la famille ICESt3 ou encore des IME. Les connaissances sur les ICE se développent et permettent de révéler cette grande diversité, alors que celles sur les IME sont encore insuffisantes et génèrent probablement une sous-estimation de leur diversité.

III. Diversité des capacités d'adhésion de *S. salivarius* aux cellules des écosystèmes digestif et buccal

1. Diversité des capacités d'adhésion à la salive chez *S. salivarius*

L'étude de la capacité d'adhésion à la salive de 24 souches de *S. salivarius* a indiqué qu'elle varie en fonction des souches. Cette variabilité pourrait s'expliquer par la diversité des constituants de la salive auxquels *S. salivarius* est capable d'adhérer. En effet, les données de la littérature ont montré que *S. salivarius* peut adhérer aux glycoprotéines EP-GP (Extra-Parotide GlycoProtein), aux immunoglobulines sécrétées IgA, aux mucines de faible poids moléculaire MG-2 (Schenkels *et al.*, 1993) ou aux fibrilles (Weerkamp *et al.*, 1987). Cependant, les mécanismes impliqués dans ces adhésions n'ont pas été décrits.

Cette variabilité pourrait également s'expliquer par la diversité des adhésines présentes à la surface des différentes souches. Cette diversité des adhésines impliquées dans l'adhésion à la salive est une caractéristique des streptocoques (Nobbs *et al.*, 2009). En effet, certaines adhésines sont substrat-spécifiques comme par exemple la protéine AbpA (Amylase Binding Protein A) qui est exprimée à la surface de *S. gordonii* et qui permet son adhésion à l'amylase, une enzyme salivaire (Rogers *et al.*, 1998). C'est le cas également de la protéine FimA qui permet l'adhésion de *S. parasanguinis* au SCHA (Saliva-Coated HydroxyApatite) (Oligino & Fives-Taylor, 1993). A l'inverse, certaines adhésines des streptocoques ne sont pas spécifiques d'un substrat, comme par exemple les antigènes I/II qui jouent un rôle dans l'adhésion de *S. mutans* à de multiples substrats biologiques (composants salivaires, fibronectine, collagène, laminine...) (Nobbs *et al.*, 2009).

2. Diversité des capacités d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales chez *S. salivarius*

L'adhésion de *S. salivarius* aux cellules épithéliales gastro-intestinales a été testée sur deux lignées cellulaires différentes. Les résultats obtenus ont montré que la capacité d'adhésion de *S. salivarius* est souche-dépendante et ce, quelle que soit la lignée cellulaire testée. Ces résultats concordent avec ceux de la thèse de Benoît Couvigny (2014) qui a porté sur les capacités d'adhésion aux cellules épithéliales HT29 de 28 souches de *S. salivarius*. En effet, ces souches présentent des capacités d'adhésion variant d'un facteur 30 000 en fonction des souches.

Notre étude a également montré que les souches de *S. salivarius* sont globalement plus adhérentes à la lignée HT29-MTX qu'à la lignée Caco2. La lignée cellulaire Caco2 représente les entérocytes qui ne produisent pas de mucus tandis que la lignée HT29-MTX correspond à des cellules caliciformes productrices de mucus (Liévin-Le Moal & Servin, 2013) (Introduction III.2.b.). La présence de mucus

sécrété par les cellules épithéliales gastro-intestinales pourrait favoriser l'adhésion de *S. salivarius* mais il pourrait aussi s'agir d'une différence de récepteurs due à la différence de lignée cellulaire. Pour cela, certaines souches exprimeraient à leur surface des adhésines spécifiques de l'adhésion au mucus de l'intestin et de l'estomac produit par la lignée HT29-MTX. Cette hypothèse est confortée par les études concernant *L. rhamnosus* GG qui adhère également plus efficacement à HT29-MTX qu'à Caco2 (Gopal et al., 2001; von Ossowski et al., 2011). von Ossowski *et al.* (2011) ont d'ailleurs montré l'existence chez cette souche d'un facteur de liaison au mucus (MBF) qui est impliqué dans l'adhésion au mucus. De même, la capacité d'adhésion des lactocoques aux mucines gastro-intestinales produites par les cellules HT29-MTX fait intervenir des adhésines présentant un motif MucBP (Van Tassell & Miller, 2011). Néanmoins une autre étude de Laparra & Sanz en 2009, montre une meilleure adhésion de *L. rhamnosus* GG aux cellules Caco2 qu'aux cellules HT29-MTX de part une expression différente des résultats. Ainsi, les mécanismes d'adhésion sont complexes et il est difficile de comparer les résultats entre laboratoires.

Par ailleurs, la comparaison de la capacité des souches de *S. salivarius* à adhérer, d'une part à la salive et d'autre part aux cellules épithéliales gastro-intestinales, montre que ce ne sont pas les mêmes souches qui adhèrent le mieux à ces deux substrats. Il y aurait donc à la surface de certaines souches de *S. salivarius* des adhésines spécifiques de l'adhésion à la salive et à la surface d'autres souches des adhésines spécifiques de l'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales. De la même façon chez *S. gordonnii* Challis la protéine AbpA permet son adhésion à l'amylase, une enzyme salivaire (Rogers *et al.*, 1998) tandis qu'une autre protéine, la GtfG (une glycosyltransférase) permet son adhésion aux cellules endothéliales humaines (Vacca-Smith *et al.*, 1994).

3. Impact d'adhésines sur les capacités d'adhésion de *S. salivarius* F6-1 aux cellules épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus

Les capacités d'adhésion aux cellules épithéliales HT29-CL16E et HT29-MTX de *S. salivarius* F6-1 sont particulièrement importantes puisqu'elles sont respectivement similaire et supérieure à celle de *L. rhamnosus* GG sur ces mêmes lignées cellulaires. Les mucines sécrétées par HT29-MTX (MUC5AC et MUC3) sont principalement retrouvées dans l'estomac alors que celles de HT29-CL16E (MUC2) sont retrouvées dans le petit intestin (Juge, 2012). Ainsi, il semble que la diversité des protéines de surface de la souche F6-1 lui permette d'adhérer aux cellules de l'épithélium quelles que soient les mucines qu'elles produisent.

Notre étude est la première comparaison de l'adhésion de *S. salivarius* aux cellules HT29-CL16E et HT29-MTX, mais une telle étude a déjà été réalisée chez *S. thermophilus* LMD9 par Kebouchi *et al.* (2016). Les auteurs de cette étude ont montré que cette souche présente des capacités d'adhésion

inférieures à *L. rhamnosus* GG et ce, quelle que soit la lignée cellulaire (Caco2, HT29-MTX et HT29-CL16E). En effet, *S. thermophilus* LMD9 présente une capacité d'adhésion aux cellules HT29-CL16E qui est 15 fois inférieure à celle de *L. rhamnosus* GG alors que celle de *S. salivarius* F6-1 est 2,8 fois supérieure à celle de *L. rhamnosus* GG. Cette différence d'adhésion entre ces deux espèces bactériennes du groupe salivarius pourrait venir du fait que *S. thermophilus* présente moins de gènes codant des adhésines que *S. salivarius* (Lecomte *et al.*, 2014). *S. thermophilus* LMD9 est une bactérie utilisée en industrie laitière qui a évolué par perte de gènes résultant d'une spécialisation au milieu lait. À l'inverse, *S. salivarius* étant un hôte habituel du tractus digestif, elle est confrontée à différents types de surfaces à coloniser. Elle possède donc un arsenal génétique plus divers qui lui permet de s'adapter à tous ces environnements. *S. salivarius* F6-1 est donc la première souche de streptocoque décrite avec de telles capacités d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus.

Chez *S. salivarius* F6-1, la délétion du gène *srtA* codant la sortase A qui permet l'ancrage de toutes les protéines de surface à motif LPxTG (Hendrickx *et al.*, 2011) diminue l'adhésion du mutant aux cellules HT29-MTX et HT2-CL16E. *S. salivarius* étant naturellement présente dans le système gastro-intestinal, certaines de ses protéines présentant un motif LPxTG sont impliquées dans son adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales. À l'inverse, la même mutation chez *S. thermophilus* LMD9 n'induit aucune perte d'adhésion du mutant aux cellules HT29-MTX et HT29-CL16E (Kebouchi *et al.*, 2016). Le système gastro-intestinal n'étant pas un écosystème naturel de *S. thermophilus*, celle-ci ne présente probablement pas à sa surface de protéines présentant un motif LPxTG impliquées dans l'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales.

Chez *S. salivarius* F6-1, la délétion du gène codant la protéine Saliva 1457 a montré que la protéine Saliva 1457 aurait une implication dans l'adhésion aux deux lignées cellulaires épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus de F6-1. Cette protéine présente un motif LPxTG et un domaine SRRP (Serine Rich Repeat Protein) connu, chez les streptocoques, pour être impliqué dans la liaison à la fibronectine (Handley *et al.*, 2005). Cette protéine à domaine SRRP pourrait permettre à *S. salivarius* F6-1 d'adhérer à la matrice extracellulaire et à l'épithélium puisque la fibronectine est présente dans cette matrice.

Chez *S. salivarius* F6-1, la délétion du gène codant la protéine Saliva 1472 a montré qu'elle serait impliquée dans l'adhésion de F6-1 aux deux lignées cellulaires épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus. Cette protéine présente un domaine MucBP connu pour son implication dans l'adhésion à l'épithélium gastro-intestinal de *L. rhamnosus* GG (von Ossowski *et al.*, 2011). En revanche, les tests d'adhésion réalisés sur un tel mutant chez *S. thermophilus* LMD9 ont montré que

le domaine MucBP n'est impliqué que dans la liaison aux cellules HT9-CL16E (Kebouchi *et al.*, 2016). Les auteurs expliquent cette différence par la nature des mucines produites par les deux lignées cellulaires (MUC5AC ou MUC3 pour HT29-MTX ou MUC2 pour HT29-CL16E). Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer la différence entre *S. salivarius* F6-1 et *S. thermophilus* LMD9 : la protéine Saliva 1472 de *S. salivarius* peut présenter un domaine MucBP qui est capable d'adhérer aux mucines des deux types cellulaires ou bien *S. thermophilus* LMD9 présente, en plus de sa protéine au motif MucBP, une autre protéine capable d'adhérer aux cellules HT29-MTX et non aux cellules HT29-CL16E.

Chez *S. salivarius* F6-1, La délétion du gène codant la protéine Saliva 1386 a montré que cette protéine serait impliquée dans l'adhésion de F6-1 à la lignée cellulaire HT29-MTX uniquement. Elle pourrait être impliquée dans l'adhésion plus spécifiquement aux mucines MUC5AC ou MUC3 qui sont les principales mucines sécrétées par ces cellules. Cette protéine comporte deux types de domaines intéressants, deux domaines G5 et un domaine ZmpB. Le domaine G5 a été décrit comme impliqué dans la formation de biofilm chez *S. pneumoniae* (Bateman *et al.*, 2005). Le domaine ZmpB est lui présenté comme le domaine principal de la métalloprotéine à zinc ZmpB qui a un rôle dans l'adhésion de *S. pneumoniae* à l'épithélium nasopharyngé (Novak *et al.*, 2000). De plus, les protéines ZmpB des streptocoques sont apparentées à la protéine ZmpC qui est impliquée dans l'adhésion aux mucines de l'œil (MUC16) (Govindarajan *et al.*, 2012; Menon & Govindarajan, 2013). Ainsi, l'un et/ou l'autre des deux domaines de cette protéine serai(en)t impliqué(s) dans l'adhésion aux cellules HT29-MTX.

Enfin, la délétion du gène codant la protéine Saliva 0442 de *S. salivarius* F6-1 a montré que cette protéine contenant 6 domaines SH3 connus pour leurs interactions avec les séquences riches en Proline (Machiyama *et al.*, 2015; Morton & Campbell, 1994; Pawson & Schlessingert, 1993) n'est pas impliquée dans l'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales productrices de mucus.

Il était intéressant de se demander si les protéines de surface impliquées dans l'adhésion aux cellules gastro-intestinales seraient impliquées dans l'auto-agrégation. En effet, l'auto-agrégation est un facteur qui pourrait influencer le transfert conjugatif en favorisant le contact entre cellules donatrices et réceptrices. Les résultats ont montré que la capacité d'auto-agrégation de *S. salivarius* dépend des souches et n'est pas corrélée à leur capacité d'adhésion aux cellules gastro-intestinales. Par exemple, la souche F6-1 qui adhère fortement aux cellules HT29-MTX et HT29-CL16E n'est pas auto-agrégative. Les protéines de surface impliquées dans l'adhésion aux cellules gastro-intestinales ne seraient donc pas impliquées dans l'auto-agrégation.

IV. Transfert conjugatif d'ICESt3 F6-1 *rpsI* chez *S. salivarius*

La souche F6-1 présente une capacité d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales très élevée et porte un élément de la famille ICESt3 intégré à l'extrémité 3' de son gène *rpsI*. Cet élément ICESt3 F6-1 *rpsI* étant capable de s'exciser et présentant un module de conjugaison qui pourrait être fonctionnel d'après les analyses *in silico*, il a été sélectionné pour les tests de conjugaison.

1. Choix des souches réceptrices de *S. salivarius*

Le transfert conjugatif nécessite deux souches : d'une part, la souche donatrice F6-1K7 ICESt3 *rpsI* qui contient l'élément marqué avec le gène *aphA-3* codant pour une résistance à la kanamycine et d'autre part, une souche réceptrice. Plusieurs souches réceptrices ont été testées car il a été montré pour certains ICE dérivés de Tn916 que l'efficacité de transfert dépend de la souche réceptrice (Cochetti *et al.*, 2007). Seules deux souches parmi les 138 souches de la collection présentaient les critères compatibles avec la souche donatrice, c'est-à-dire (i) ne pas porter d'élément de la famille ICESt3 afin d'éviter la mise en place d'un système d'exclusion (Possoz *et al.*, 2003), (ii) être sensible à la kanamycine, (iii) être résistante à un antibiotique (tétracycline) permettant de différencier les potentiels transconjugants et la souche donatrice et (iv) avoir un site d'intégration *rpsI* ne contenant aucune séquence afin d'éviter une immunité de cible (Bellanger *et al.*, 2011).

Pour les 3 premiers critères, la recherche de souches réceptrices s'est appuyée sur la caractérisation des souches de la collection présentée dans la première partie des résultats. Parmi les 35 souches sélectionnées, certaines présentaient des fragments de plusieurs kb insérés dans le site *rpsI* suggérant la présence d'un élément incomplet qui peut empêcher ou diminuer la fréquence de transfert selon Bellanger *et al.* (2011). La majorité des souches testées présentait des fragments de quelques centaines de paires de bases insérés dans le site *rpsI* et n'a pas été sélectionnée. En effet, des tests de transfert d'ICESt3 de *S. thermophilus* vers d'autres souches de *S. thermophilus* présentant des fragments de quelques centaines de paires de bases intégrés au site *fda* ont montré que le transfert conjugatif n'avait pas lieu ou avait lieu à des fréquences trop faibles pour être détectables (G. Guédon, com. pers.). Seules deux souches de la collection de *S. salivarius* répondaient à l'ensemble des critères de sélection : les souches N17 et L21.

2. Transfert conjugatif d'ICESt3 F6-1 *rpsI* chez *S. salivarius*

Le transfert conjugatif d'ICESt3 F6-1 *rpsI* a donc été testé indépendamment vers *S. salivarius* L21 et N17 selon le protocole de Bellanger *et al.* (2009). Toutefois aucun transconjugant n'a été obtenu. De nombreux tests ont alors été réalisés en modifiant les conditions de culture par rapport au protocole original : températures d'incubation à 37 et 39°C au lieu de 42°C, glucose comme source de carbone

au lieu du lactose, traitement de la souche donatrice à la MMC. Ces nombreuses expériences n'ont cependant jamais permis d'obtenir de transconjugants. Ces résultats ont donc montré que le transfert d'ICESt3 F6-1 *rpsI* vers d'autres souches de *S. salivarius* n'est pas possible dans les différentes conditions utilisées ou qu'il s'effectue à une fréquence trop faible pour être observable. Dans toutes ces expériences, il a été observé que le ratio cellules donatrices/réceptrices après incubation sur le filtre était plus faible que celui utilisé lors du mélange initial. En effet, le ratio initial cellules donatrices/réceptrices était de 1/1 alors qu'après la période d'incubation sur filtre, il était en moyenne de 1/10. Lors de l'expérience témoin de transfert d'ICESt3 entre deux souches de *S. thermophilus*, il a été noté que ce ratio reste stable à 1/1 tout au long de l'expérience.

En 2009, Lorenzo-Díaz & Espinosa ont montré que la fréquence de transfert du plasmide conjugatif pMV158 de *S. pneumoniae* augmentait quand le ratio cellules donatrices/réceptrices était augmenté lors du mélange. Cependant, les expériences de conjugaison d'ICESt3 F6-1 *rpsI* vers les deux souches de *S. salivarius* N17 et L21 réalisées avec un ratio cellules donatrices/réceptrices de 10/1 au lieu de 1/1 n'ont pas non plus permis d'obtenir de transconjugants.

D'autres facteurs pourraient avoir un impact sur la croissance de la donatrice, empêchant ainsi le transfert. Un de ces facteurs concerne la présence du filtre ou le temps d'incubation sur filtre. En effet, Smith & Guild (1980) ont montré que recouvrir le filtre de gélose molle permet d'augmenter la fréquence de transfert du plasmide conjugatif pIP501 chez *S. pneumoniae*. Cependant, tester cette hypothèse étant difficile à mettre en œuvre, c'est l'impact de la présence du filtre sur la croissance de la donatrice qui a été testé. Les tests ont montré que celle-ci se développe mieux en absence de filtre et en absence des souches réceptrices. Par contre, en présence des réceptrices, la croissance de la donatrice est favorisée en présence du filtre. L'impact observé n'est peut-être pas dû à la présence ou non du filtre mais plutôt à sa composition. En effet, il a été montré que le transfert du plasmide conjugatif pAMβ1 d'*E. faecalis* vers des souches de *Lactobacillus plantarum* était impacté par la nature du filtre (Sasaki *et al.*, 1988). Cette hypothèse n'a pas pu être testée dans le temps imparti, mais elle pourra faire l'objet de tests futurs au laboratoire.

Selon Carraro *et al.* (2011), l'ICESt3 de *S. thermophilus* présente une fréquence d'excision maximum en phase stationnaire de croissance. Il est donc possible que ce soit durant cette phase que la fréquence de transfert soit maximum. Le protocole de conjugaison de Bellanger *et al.* (2009) implique un temps d'incubation sur filtre de 24h pour permettre au transfert conjugatif de se dérouler pendant la phase stationnaire. En revanche, quand les souches sont mises en contact sur le filtre, elles sont en phase exponentielle de croissance pour qu'elles puissent s'y développer.

Des données non publiées indiquent que c'est après un temps d'incubation du filtre de 24h que la fréquence de transfert est la plus importante pour l'ICESt3 de *S. thermophilus* CNRZ385 (X. Bellanger, com. pers.). Cependant, des tests menés sur le transfert des ICE de *S. agalactiae* ont montré que le temps optimal d'incubation sur filtre pour favoriser ce transfert était de 8h (S. Payot et A. Puymège, com. pers.). Ainsi l'impact du temps d'incubation du filtre sur le transfert et la croissance d'F6-1K7 ICESt3 *rpsI* a été testé. Les résultats ont montré que le temps d'incubation impacte la croissance de la souche donatrice : le temps utilisé de 24h est trop long alors qu'un temps de 12h serait plus approprié. Des expériences de conjugaison ont donc été réalisées avec ce temps d'incubation sur filtre, mais aucun transconjugant n'a été obtenu. Le temps d'incubation sur filtre n'est donc pas le seul facteur incriminé.

L'impact de la souche réceptrice sur la fréquence de transfert peut aussi être envisagé. En effet, lorsque la souche F6-1K7 ICESt3 *rpsI* est cultivée en présence des souches réceptrices N17 ou L21, dans les mêmes conditions que lors de la conjugaison, sa capacité de croissance diminue. Certaines souches de *S. salivarius* étant connues pour produire des bactériocines (Dempster & Tagg, 1982; Dierksen *et al.*, 2000; Heng *et al.*, 2011), des tests de production de bactériocines ont été réalisés. Ils ont montré que les souches réceptrices N17 et N20 ne produisent pas de bactériocines capables d'affecter la croissance de la souche F6-1K7 ICESt3 *rpsI*.

Il n'est pas exclu que les souches réceptrices utilisées dans cette étude présentent des systèmes de barrière ne permettant pas cette conjugaison. Leur génome pourrait par exemple porter des loci CRISPR ou coder des systèmes RM qui sont connus pour impacter négativement les transferts conjugatifs (Bhaya *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2005). Cependant, comme les génomes des souches réceptrices L21 et N17 n'ont pas été séquencés, aucune donnée n'est disponible à ce jour.

Les souches L21 et N17 sont des souches cliniques isolées respectivement de liquide céphalo-rachidien et d'os sur des patients malades. La souche donatrice F6-1K7 ICESt3 *rpsI* est, quant à elle, issue de la souche F6-1 qui est une souche commensale isolée des fèces d'un individu sain. Or, Liu *et al.* (2012) ont montré qu'au sein du microbiote humain, il existe des communautés bactériennes généralement calquées sur la zone géographique d'origine de la souche. Aussi, la souche gastro-intestinale F6-1K7 ICESt3 *rpsI* pourrait transférer des gènes plus facilement vers des souches issues de sa communauté microbienne ou d'autres communautés gastro-intestinales plutôt que vers des souches ne faisant pas partie de ces communautés. Ainsi, un transfert conjugatif d'ICESt3 F6-1 *rpsI* vers une souche également issue de fèces et idéalement de l'individu n°6 est à privilégier.

V. Conclusions et perspectives

L'ensemble de cette étude montre que les génomes de *S. salivarius* portent une diversité des éléments intégratifs conjugatifs et/ou mobilisables. Parmi eux, un certain nombre porte des gènes de résistance aux antibiotiques. Toutefois, l'analyse systématique des gènes cargo portés par les ICE et les IME de *S. salivarius* identifiés n'a pas fait l'objet de ce travail. Il serait donc intéressant de continuer leur analyse pour identifier les différents gènes qui constituent leurs modules d'adaptation.

La présence d'ICE au sein des génomes de *S. salivarius* suggère qu'à l'origine, ils ont été acquis par transfert horizontal et probablement par conjugaison. Il est donc probable qu'au moins un certain nombre de ces éléments soient encore fonctionnels, c'est-à-dire capables de se transférer d'une bactérie à l'autre par conjugaison. Les différentes conditions testées dans cette étude n'ont pas permis de visualiser le transfert conjugatif d'ICESt3 F6-1 *rpsI*. Toutefois, un changement d'autres paramètres utilisés lors de l'expérience de conjugaison (milieu de culture, type de filtre, atmosphère ou température d'incubation...) ou de souches réceptrices pourrait permettre de résoudre cette difficulté. En cas d'échec, il serait possible d'utiliser une autre souche donatrice de *S. salivarius*, porteuse d'un autre ICE de la famille ICESt3. Une alternative serait la souche F4-2 qui porte non seulement un élément de la famille ICESt3 intégré à l'extrémité 3' du gène *fda* mais qui présente également une forte capacité d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales Caco2 et HT29-MTX.

À moyen terme, et dès que les conditions du transfert conjugatif auront été mises au point chez *S. salivarius*, il sera possible (i) de calculer les fréquences de transfert entre différentes souches de *S. salivarius* et (ii) de déterminer si les transferts inter-espèces sont possibles et de calculer leurs fréquences. Il serait également intéressant d'étudier les paramètres environnementaux qui influencent ces transferts conjugatifs, en particulier si la structuration en biofilms des streptocoques favorise ces transferts. Dans ce contexte, il serait intéressant de déterminer si l'adhésion de *S. salivarius* aux cellules gastro-intestinales favorise ou non les transferts conjugatifs.

S. salivarius étant une bactérie commensale du tractus digestif, il est probable que des transferts conjugatifs aient lieu dans cet écosystème. Dans un premier temps, ces transferts pourront être testés dans un digesteur artificiel qui permet d'imiter les fonctions digestives principales de l'estomac et de l'intestin grêle (Blanquet-Diot *et al.*, 2012). Il pourra être inoculé avec quelques espèces bactériennes du microbiote humain. Avec ce système, il sera également possible de faire varier les conditions de culture (pH, sels biliaires, antibiotiques...) et donc de préciser quels sont les paramètres qui augmentent ou au contraire qui inhibent les transferts conjugatifs. Des expériences

de conjugaison *in vivo* utilisant des souris axéniques inoculées avec les souches bactériennes d'intérêt pourront également être envisagées.

L'ensemble de ce travail permettra de mieux comprendre quels sont les signaux environnementaux du tractus digestif qui impactent les fréquences des transferts conjugatifs. De cette façon, il sera possible d'envisager des stratégies permettant de limiter la conjugaison de certains éléments, notamment de ceux porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi leur dissémination, qui représente un problème majeur de santé publique, pourra être limitée.

Matériel et méthodes

I. Matériel

1. Souches bactériennes

La collection de souches de *S. salivarius* disponible au laboratoire UMR 1128 UL-INRA DynAMic comporte 1092 souches cliniques et commensales. Les souches cliniques ont été isolées des hôpitaux de Nancy (N), Tours (T), Limoges (L) et Besançon (B) et les souches commensales ont été isolées des fèces (F) et de la salive (S) de 5 individus sains différents (notés de 1 à 5). Toutes les souches de *S. salivarius* de cette collection utilisées au cours de ce travail sont présentées dans le tableau S1 de l'article p156. Les autres souches de *S. salivarius* et celles de *S. thermophilus* utilisées pour les expériences d'adhésion et de conjugaison sont présentées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Caractéristiques des souches utilisées dans ce travail. Les autres souches utilisées sont décrites dans le tableau S1 de l'article p156.

Souches	Caractéristiques génotypiques ou phénotypiques	Source ou référence
<i>S. salivarius</i>		
F6-1 K7 ICESt3 rpsI	Souche F6-1 portant ICESt3 F6-1 rpsI intégré au site rpsI et marqué avec un gène de résistance à la kanamycine	Ce travail
F6-1 ΔSrtA	Souche F6-1 K7 dont le gène codant la sortase A est remplacé par un gène de résistance à l'érythromycine	Ce travail
F6-1 Δ0442	Souche F6-1 K7 dont le gène codant la protéine Saliva 0442 est remplacé par un gène de résistance à la spectinomycine	Ce travail
F6-1 Δ1386	Souche F6-1 K7 dont le gène codant la protéine Saliva 1386 est remplacé par un gène de résistance à la spectinomycine	Ce travail
F6-1 Δ1472	Souche F6-1 K7 dont le gène codant la protéine Saliva 1472 est remplacé par un gène de résistance à la spectinomycine	Ce travail
F6-1 Δ1457	Souche F6-1 K7 dont le gène codant la protéine Saliva 1457 est remplacé par un gène de résistance à la spectinomycine	Ce travail
<i>S. thermophilus</i>		
CNRZ385 ICESt3 Cm	Souche CNRZ385 portant ICESt3 intégré au site fda et marqué par un gène de résistance au chloramphénicol	Bellanger <i>et al.</i> (2009)
LMG18311 pMG36e	Souche LMG18311 avec le plasmide pMG36e portant un gène de résistance à l'érythromycine	Bellanger <i>et al.</i> (2009)

2. Matériel biologique

➤ Salive

La salive utilisée dans les expériences d'adhésion correspond à un mélange de salives prélevées chez 5 à 8 individus consentants et sains. Les donneurs n'ont pas mangé ou fumé 1h avant leur don et se sont rincés la bouche à l'eau 10 min avant le don. Du dithiothréitol à 2,5 mM (Sigma Aldrich) a été ajouté à l'échantillon avant une centrifugation à 13 000 g pendant 10 min. Après centrifugation, le surnageant a été dilué 10 fois dans de l'eau stérile puis il a été passé sur filtre de nitrocellulose 0,2 µm (Sartorius Stedim Biotech). Les échantillons ainsi préparés ont été conservés à -20°C.

➤ Cellules épithéliales gastro-intestinales

Trois lignées cellulaires ont été utilisées dans les expériences d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales. La lignée Caco2 est représentative des entérocytes intestinaux et forme une monocouche polarisée de cellules différenciées présentant une bordure en brosse (Hilgendorf *et al.*, 2000). Les cellules HT29-MTX et HT29-CL16E dérivent toutes deux des cellules HT29 qui sont des cellules épithéliales intestinales humaines indifférenciées (Rousset, 1986). Après un traitement au méthotrexate (MTX), elles se différencient en cellules HT29-MTX qui sont caliciformes et productrices de mucus contenant essentiellement les mucines MUC5AC et MUC3 (Lesuffleur *et al.*, 1990). En revanche, un traitement au butyrate de sodium de ces cellules HT29 permet leur différenciation en cellules HT29-C16E productrices de mucus contenant essentiellement les mucines MUC2 (Augeron & Laboisse, 1984).

3. Conditions de culture

a. Conditions de culture des streptocoques

Les milieux de sélection de *S. salivarius* ayant servi à l'établissement de la collection de souches du laboratoire sont décrits dans l'article (Article Matériel et Méthodes p59).

Les pré-cultures et cultures liquides de *S. salivarius* et *S. thermophilus* ont été réalisées en aérobiose tandis que les cultures sur milieu solide ont été réalisées en conditions d'anaérobiose obtenues grâce au système Genbox (BioMérieux). Les incubations ont été réalisées à 42°C pour *S. thermophilus* et à 37°C pour *S. salivarius* sauf lors de certaines expériences de conjugaison sur filtre où des incubations de *S. salivarius* ont été réalisées à 39°C ou à 42°C. Les cultures ont été réalisées dans du milieu M17 dont la composition est détaillée dans le tableau 5. De l'agar (Bacterio Agar, BD) a été ajouté pour solidifier le milieu (20 g/L pour le milieu solide et 8 g/L pour le milieu soft). Le milieu a été stérilisé à l'autoclave pendant 20 min à 120°C avant d'ajouter la source de carbone à 1%. Le glucose a été ajouté pour le milieu GM17 qui a été utilisé pour les cultures de *S. salivarius*. Le lactose a été ajouté

pour le milieu LM17 qui a été utilisé pour les cultures de *S. salivarius* et *S. thermophilus*. Les solutions de glucose et de lactose (Fischer Chemicals) ont été préparées à 10% dans de l'eau distillée puis stérilisées à l'autoclave pendant 20 min à 110°C.

Tableau 5 : Composition du milieu M17 d'après Terzaghi & Sandine, (1975). BD est utilisé pour désigner le fournisseur «Becton, Dickinson and Company ». Le pH du milieu a été ajusté à 6,9. Le milieu a été stérilisé à l'autoclave pendant 20 min à 120°C.

Produit	Fournisseur	Pour 1L (g)
Tryptone	BD	5
Peptone de soja	BD	5
Extrait de bœuf déshydraté	BD	5
Extrait de levure	BD	2,5
Acide L-Ascorbique	Sigma	0,5
Sulfate de magnésium à 7 molécules d'eau purifié	Prolabo	0,25
Glycérophosphate disodique	VWR GPR Rectapur	19
Eau distillée		Qsp 1L

Les milieux de culture de *S. salivarius* et *S. thermophilus* ont été supplémentés avec les antibiotiques suivants (Sigma-Aldrich) lorsque ceux-ci étaient requis : chloramphénicol (16 µg/mL pour *S. salivarius* et 4 µg/mL pour *S. thermophilus*), érythromycine (5 µg/mL), kanamycine (1200 µg/mL), spectinomycine (500 µg/mL) et tétracycline (20 µg/mL).

b. Conditions de culture des cellules épithéliales gastro-intestinales

Après décongélation, les cellules épithéliales gastro-intestinales Caco2, HT29-MTX et HT29-CL16E ont été cultivées 4 jours en boîte T75 (Sarstedt) dans du milieu DMEM GlutaMAX™ (Invitrogen, Fischer Scientific). Il a été supplémenté en sérum de veau fœtal (Invitrogen, Fischer Scientific) à 20% pour les cellules Caco2 et à 10% pour les cellules HT39MTX et HT29CL16E. Il a également été complémenté en antibiotiques pénicilline/streptomycine à 1% (Invitrogen, Fischer Scientific).

Les cellules ont ensuite été traitées avec 2 mL de trypsine 0,05% (Invitrogen, Fischer Scientific) pendant 5 min à 37°C. Puis elles ont étéensemencées à $2,4 \cdot 10^4$ cellules/cm² dans des inserts de 4,2 cm² contenant une membrane de PCF (polycarbonate) de porosité 0,4 µm (Millipore) en milieu DMEM GlutaMAX™ supplémenté en sérum de veau fœtal et en antibiotiques comme précédemment.

48h avant l'expérience d'adhésion, le milieu DMEM utilisé n'est plus supplémenté en antibiotiques pour éviter toute interférence avec les souches bactériennes utilisées. Avant d'ajouter les cellules bactériennes, chaque insert est délicatement lavé deux fois au HBSS (Hank's Balanced Salt Solution,

Gibco®) contenant du calcium 1,6 mM et du magnésium 1 mM (ThermoFischer Scientific) afin d'éliminer les cellules mortes et/ou en suspension.

II. Méthodes

Les méthodes suivantes ont été décrites dans l'article (Article Matériel et Méthode p59) : détection des phénotypes de résistance aux antibiotiques, détection par PCR des gènes de résistance aux antibiotiques et des éléments intégratifs, test d'excision des ICE des familles Tn916 et ICEst3, analyse par MLST, séquençage du génome des souches et analyse des séquences. Les séquences des amorces utilisées sont décrites Table S2 p172.

1. Test d'adhésion à la salive

➤ Inoculation de la microplaque

Les puits d'une microplaque ont étéensemencés avec 200 µL de salive puis incubés pendant 13h à 4°C. Après incubation, la salive non adhéree aux puits a été éliminée et la microplaque a été séchée pendant 30 min à 30°C. Ensuite les puits ont été inoculés avec 180 µL de la suspension bactérienne à DO_{600nm} de 0,1. Celle-ci a été obtenue par dilution d'une pré-culture réalisée dans 5 mL de milieu GM17 à partir des cultures congelées stockées à -80°C puis incubée pendant 14h à 37°C. La DO_{600nm} de chaque puits a alors été mesurée par l'appareil Synergy HT de Biotek.

➤ Révélation de la microplaque

Après 3h d'incubation de la microplaque à 37°C en jarre anaérobie, la DO à 600 nm a de nouveau été mesurée par l'appareil Synergy HT de Biotek.

Les cellules en suspension ont ensuite été éliminées par deux lavages avec 1 mL de tampon PBS 1X (Phosphate Buffered Saline, composition tableau 6). Après un séchage de 30 min (plaque ouverte en conditions stériles à température ambiante) puis de 1h (plaque fermée à 37°C pour bien fixer les bactéries sur la salive), une coloration au cristal violet (Merck Millipore) à 0,04% a été réalisée pendant 45 min à température ambiante. Après cette incubation, le surplus de colorant a été éliminé par 3 à 4 lavages très doux au tampon PBS 1X. Puis l'ajout d'une solution d'éthanol/acétone (80:20) a permis de décoller le biofilm coloré pour mesurer la DO à 600 nm avec le Synergy HT de Biotek.

Tableau 6 : Composition du tampon PBS. Le pH du tampon a été ajusté à 7,2. Le tampon a été stérilisé à l'autoclave pendant 20 min à 120°C.

Composant	Fournisseur	Quantité pour 1L (g)
Phosphate de potassium monobasique	Acros organics	0,2
Phosphate de sodium dibasique dihydraté	Sigma Aldrich	2,88
Chlorure de potassium	Sigma Aldrich	0,2
Chlorure de sodium	Sigma Aldrich	8
Eau distillée		Qsp 1L

2. Test d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales

➤ Inoculation des inserts

Chaque insert contenant les cellules épithéliales a été inoculé avec 2 mL de culture bactérienne de sorte à avoir plus de 1000 bactéries par cellule épithéliale. Cette culture bactérienne à environ 5.10^9 cellules/mL a été obtenue en ensemençant 50 ml de milieu de GM17 à partir de cultures congelées conservées à -80°C et en les incubant pendant 13h à 37°C. Après cette incubation, la culture a été lavée avec 10 mL de HBSS puis concentrée dans 10 mL de DMEM GlutaMAX™ préalablement chauffé à 37°C.

Les inserts ont ensuite été incubés à 37 °C en présence de 10% de CO₂ et 90% d'humidité pendant 2 heures.

➤ Récupération des bactéries

Après cette incubation, le surnageant de chaque insert a été récupéré dans un tube. Le tapis cellulaire a ensuite été délicatement lavé 4 fois avec 1 ml d'HBSS afin d'éliminer toutes les cellules bactériennes n'ayant pas adhéré. Les 4 lavages ont été récupérés et mélangés au surnageant précédemment récupéré. Enfin, le tapis cellulaire a été décollé de l'insert par ajout de 1 mL de triton 0,1% (Sigma-Aldrich) et gratté avec un grattoir stérile (Dominique Dutscher). La solution contenant le tapis cellulaire a été récupérée dans un autre tube. Cette opération a été répétée 3 fois et toutes les solutions récupérées ont été mélangées. La solution obtenue a ensuite été passée dans une seringue >21G (Gauge) avec trois aller-retour. Après 30 min d'incubation à température ambiante, la solution a été diluée au 1/10^{ème} dans de l'eau peptonnée 1X (Peptones de caséines (Merck) 0,1% (P/V), solution stérilisée à l'autoclave pendant 20 min à 120°C).

Les bactéries présentes dans les solutions contenant d'une part le surnageant/lavages (bactéries non adhérentes aux cellules épithéliales gastro-intestinales) et d'autre part le tapis cellulaire gratté (bactéries adhérentes aux cellules épithéliales gastro-intestinales) ont été dénombrées sur milieu GM17.

3. Test d'auto-agrégation

Une culture de 5 mL de GM17 en phase stationnaire a été lavée 3 fois avec 1 mL d'eau peptonnée 1X afin d'éliminer le milieu de culture. Elle est ensuite diluée dans 5 mL d'eau peptonnée 1X pour obtenir une suspension bactérienne avec une DO_{600nm} de 0,8. Cette suspension bactérienne a alors été incubée à 37°C pendant 5h sans bouger les tubes. Pendant ces 5h, la DO_{600nm} a été lue toutes les 30 min (spectrophotomètre Genesys 20 de Thermo Spectronic).

4. Conjugaison sur filtre

Le protocole de la conjugaison sur filtre mis en place par Bellanger *et al.* (2009) chez *S. thermophilus* est détaillé ici. Les cultures des 2 souches (donatrice et réceptrice) ont étéensemencées à partir de cultures stockées à -80°C sur du milieu LM17 solide contenant l'antibiotique approprié. Après une nuit d'incubation à 42°C en anaérobiose, 1 colonie isolée a été mise en pré-culture dans 5 ml de milieu LM17 liquide supplémenté avec l'antibiotique approprié. Après une incubation en anaérobiose à 42°C pendant 7 heures, des dilutions des pré-cultures des souches donatrice et réceptrice ont été réalisées dans 5 mL de milieu LM17 liquide sans antibiotique pour avoir une suspension bactérienne avec une DO_{600nm} initiale de 0,05. Quand la DO_{600nm} de chaque culture a atteint 0,4, chaque culture a été concentrée dans 1 mL de milieu LM17. Les 2 cultures ont alors été mélangées à volume égal et 150 μ L du mélange ont été déposés sur un filtre de nitrocellulose 0,45 μ m (Sartorius Stedim Biotech), préalablement déposé sur du milieu LM17 soft.

Après une incubation à 42°C en anaérobiose pendant une nuit, les filtres ont été transférés dans 10 mL de LM17 liquide. Après passage au vortex pendant 30 secondes afin de décrocher les bactéries du filtre, des dénombrements des cellules donatrices, réceptrices et des transconjugants ont été réalisés sur des milieux LM17 solides supplémentés avec les antibiotiques appropriés pour sélectionner chaque type de cellules (figure 37 p95).

5. Test de production de bactériocines

Le test de production de bactériocines permet de savoir si les souches N17 ou L21 de *S. salivarius* produisent des bactériocines inhibant la croissance de la souche F6-1. Pour cela, la souche potentiellement productrice a étéensemencée en profondeur dans du milieu GM17 solide avec 1 ml d'une pré-culture en phase exponentielle réalisée en milieu GM17 ($DO_{600nm} = 0,4$). Une couche de milieu GM17 soft a été coulée par-dessus puis elle a étéensemencée au râteau avec 100 μ L de pré-culture en phase exponentielle de la souche F6-1 réalisée en milieu GM17 ($DO_{600nm} = 0,4$). La lecture se fait après une incubation de 24h à 37°C en anaérobiose. Si la souche ne produit pas de bactériocines ayant un impact sur la croissance

de la souche F6-1, celle-ci présentera un tapis bactérien. Au contraire, si la souche produit des bactériocines inhibant la croissance de la souche F6-1, celle-ci ne présentera pas de tapis bactérien ou présentera des zones d'inhibition de croissance.

6. Construction de mutants et marquage d'ICESt3 F6-1 *rpsI*

Les mutants utilisés dans ce travail ont été construits par remplacement du gène d'intérêt par un fragment d'ADN linéaire contenant une cassette de résistance à un antibiotique. La même stratégie a été utilisée pour marquer l'ICESt3 F6-1 *rpsI* par un gène de résistance à la kanamycine. Cette stratégie est décrite dans la figure 42.

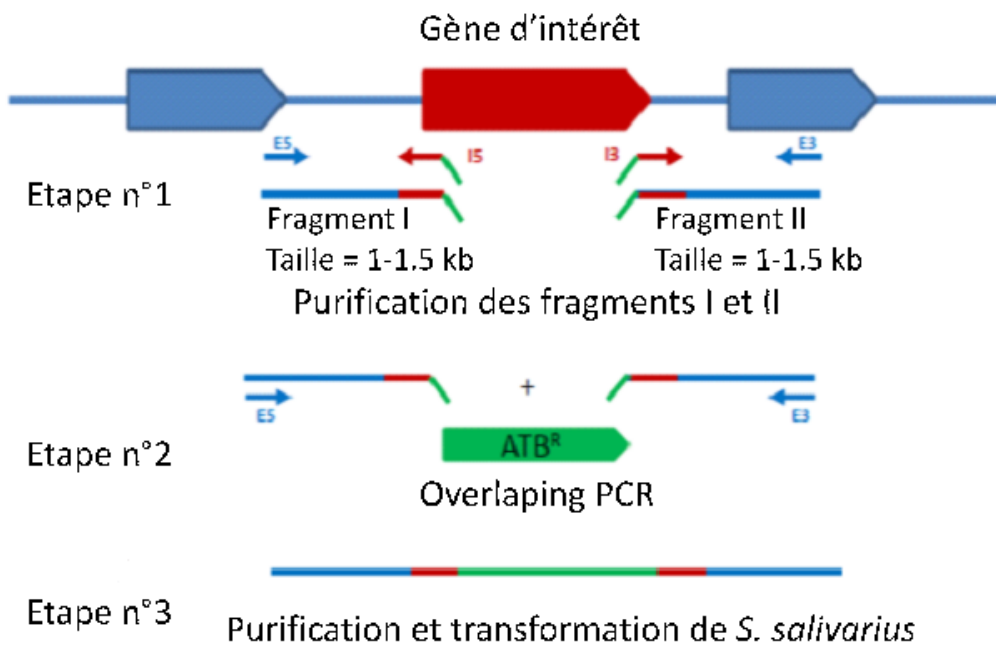


Figure 42 : Construction de mutants par remplacement d'un gène d'intérêt (en rouge) par une cassette de résistance à un antibiotique (ATB^R en vert).

Cette stratégie implique que, dans une première étape, les fragments I et II qui contiennent les séquences bordant le gène d'intérêt ont été amplifiés par PCR. Les amorces I3 et I5 utilisées comportent des séquences complémentaires des extrémités du gène de résistance à l'antibiotique choisi. Les produits de PCR obtenus ont ensuite été purifiés avec le kit « Gene Jet Gel Extraction Kit » (Thermo Scientific). Dans une deuxième étape, ces produits ont été liés par une « overlapping » PCR au produit de PCR correspondant au gène de résistance à l'antibiotique choisi. Enfin, dans une troisième étape, le grand fragment de PCR généré a été dialysé. Cette dialyse a été réalisée sur un filtre Millipore 0,025 µM (Merck Milipore) déposé sur 5 ml d'eau distillée pendant 10 min à température ambiante.

Le produit de l'overlapping PCR a alors été introduit chez *S. salivarius* par transformation naturelle. Pour cela, 10 µL du produit de PCR dialysé a été mélangé à 200 µL d'une culture de *S. salivarius* à $DO_{600nm} = 0,05$ en milieu chimiquement défini (MCD) (Otto *et al.*, 1983) et à du peptide de compétence (CSP pour Competence Stimulating Peptide) à 1 µM. Ce CSP présente la séquence peptidique suivante : H₂N – LPYFTGCL – COOH (Proteogenix). Ce mélange a ensuite été incubé pendant 3h à 37°C. Enfin, les transformants ont été sélectionnés sur milieu GM17 solide supplémenté avec l'antibiotique adéquat. Ils ont ensuite été vérifiés par plusieurs PCR permettant d'amplifier le gène de résistance à l'antibiotique (ATB^R de la figure 42), le fragment contenant l'association « fragment I - gène ATB^R », le fragment contenant l'association « gène ATB^R- fragment II » et le fragment d'overlapping PCR.

Les amorces utilisées pour les différentes amplifications par PCR ont été fournies par Eurogentec et sont présentées dans le tableau 7. Toutes les amplifications par PCR ont été réalisées dans le thermocycleur C1000 (Biorad).

L'amplification des fragments I, II et du gène de résistance à l'antibiotique ont nécessité les mélanges réactionnels suivants :

ADN matrice	50 ng
Taq buffer X5 phusion (Thermo Scientific)	10 µl
dNTP (2 mM) (Thermo Scientific)	4 µl
Amorces forward (20 µM)	2,5 µl
Amorce reverse (20 µM)	2,5 µl
Enzyme Phusion (2 U/µL) (Thermo Scientific)	0,4 µl
H2O UP	qsp 50 µl

L'amplification par PCR a été réalisée avec une phase de dénaturation initiale de 5 min à 95°C suivie par 30 cycles. Chaque cycle comprenait une phase de dénaturation de 30 s à 95°C suivie d'une phase d'hybridation des amorces de 30 s à 58°C et enfin d'une phase d'élongation d'une minute à 72°C. Ces cycles ont été suivis par une phase d'élongation finale de 5 min à 72°C.

L'amplification des grands fragments de l'overlapping PCR a nécessité les mélanges réactionnels suivants :

Amplicon fragment I purifié	50ng
Amplicon fragment II purifié	50ng
Amplicon gène de résistance à l'antibiotique	50ng
Taq buffer X5 phusion (Thermo Scientific)	10µl
dNTP (2mM) (Thermo Scientific)	4µl
Amorce forward E5 (20 µM)	2,5 µl
Amorce reverse E3 (20 µM)	2,5 µl
Enzyme pHusion (2 U/µL) (Thermo Scientific)	0,4µl
H2O UP	qsp 50 µl

L'amplification par PCR a été réalisée en deux étapes successives permettant d'abord la ligation des différents produits de PCR puis l'amplification du fragment de l'overlapping PCR. Pour la ligation des différents produits de PCR, une phase initiale de dénaturation de 3 min à 98°C a été suivie de 15 cycles. Chaque cycle comprenait une phase de dénaturation 10 s à 98°C, suivie d'une phase d'hybridation des fragments entre eux de 30 s à une température variant de 45 à 60°C (augmentation d'un degré à chaque cycle) et enfin d'une phase d'1,5 min à 72°C. Pour l'amplification du fragment de l'overlapping PCR, 30 cycles ont été réalisés, chacun comprenant une phase de dénaturation de 10 s à 98°C puis une phase d'hybridation des amorces de 30 s à une température de 58°C et enfin d'une phase d'élongation d'1 min 30s à 72°C. Ces cycles ont été suivis par une phase d'élongation finale de 10 min à 72°C.

Les amplifications réalisées pour vérifier les transformants ont nécessité les mélanges réactionnels suivants :

Culture cellulaire matrice	1 µL
Dream Taq Buffer 10X (Thermo Scientific)	5 µl
dNTPs (2 mM) (Thermo Scientific)	5 µl
Amorces forward (20 µM)	2,5 µl
Amorce reverse (20 µM)	2,5 µl
Dream Taq (5 U/µL) (Thermo Scientific)	0,25 µl
H2O UP	qsp 50 µl

La culture cellulaire matrice utilisée correspond à une culture de 15h à 37°C dans 5 mL de milieu GM17 additionné de l'antibiotique correspondant au gène ATB^R du transformant.

L'amplification par PCR a été réalisée avec une phase de dénaturation initiale de 5 min à 98°C suivie par 30 cycles. Chaque cycle comprenait une phase de dénaturation de 30 s à 98°C suivie d'une phase d'hybridation des amorces de 30 s à 58°C et enfin d'une phase d'élongation d'une minute à 72°C. Ces cycles ont été suivis par une phase d'élongation finale de 5 min à 72°C.

Tableau 7 : Liste des amorces utilisées pour le marquage d'ICEST3 F6-1 *rpsI* et la construction des mutants de *S. salivarius* F6-1.

Nom	Séquence de l'amorce (5' -3')	Tm (°C)	Amplicon (pb)	Utilisation
F6-1 CDS4_1	ATCTCGTACCTGGGACTC	58	1064	Amplification fragment I pour le marquage de l'ICEST3 F6-1 <i>rpsI</i>
F6-1 CDS4_2	AACAAGATCCAGAAAGGATCTTGTTTTCTAGAATACCTGAAAGTTCCTGTC	58		
F6-1 CDS4_3	AATCTGCCTCCTCATCCTCTTCATCCTCTCTAGACATACTGGGATGAATAC	58	1024	Amplification fragment I pour le marquage de l'ICEST3 F6-1 <i>rpsI</i>
F6-1 CDS4_4	CAGCAAGGTCAGTACTGC	58		
aphaA3.for	GCGATCCTAGAGAGGATGAAGAGGATGAGGAGGCAG	64	1474	Amplification cassette de résistance à la kanamycine
aphaA3.revTerm	GCGACTCTAGAAAAACACGATCCTTTCTGGATCTTGTTTTGCTTTTAGAC ATCTAAATCTAGG	64		
F6-1sortase_1	GCATGTTTCGATACCAAGTG	56	1029	Amplification fragment I pour construction du mutant F6-1 Δ srtA
F6-1sortase_2	CCAGTCACGTTACGATAACTTCGGCAAGTTCAGATATTATTGAGG	62		
F6-1sortase_3	TAGTTGTCACCACTTTCTTGA	43	1093	Amplification fragment II pour construction du mutant F6-1 Δ srtA
f6-1sortase_2	TAAGAAAGGGGCCCTCGG	58		
gyr-eryF	TCAAGAAAGTGGTGACAATAATGAACAAAAATATAAAATATTCTCA	56	800	Amplification cassette de résistance à l'érythromycine
eryRlyase	CCGAGGGCCCTTTCTTATTCTCCCGTTAAATAATAG	61		
SALIVA_1472.1	CGTTTACTGGCAATTGTTTCAT	44	1026	Amplification fragment I pour construction du mutant F6-1 Δ 1472
SALIVA_1472.2	TATTTAATATTTGGGAAATATTCATTCTAATTGGAACCAGGAACACCAATCTA	59		
SALIVA_1472.3	AATTTAGTTTATTTATAGATTTTCATTGGCTTCTACCACTTGTTTCAGGCTA	60	1274	Amplification fragment II pour construction du mutant F6-1 Δ 1472
SALIVA_1472.4	GAACTTCCACCAGTACCAGC	62		
F6-1CDS1386_1	CTTCGGCTACTGCTGTTGAG	62	997	Amplification fragment I pour construction du mutant F6-1 Δ 1386
F6-1CDS1386_2	CCAGTCACGTTACGATAACTTCGGGTGTCACAAGCCATACG	64		
F6-1CDS1386_3	TTGGGAAATATTCATTCTAATTGGGGAGCACAGCCATAGTCG	61	1013	Amplification fragment II pour construction du mutant F6-1 Δ 1386
F6-1CDS1386_4	GAGGAGATTTACAGGGAGCG	30		
SALIVA_1457.1	GAATCCGTCTGACTTACTGAT	45	996	Amplification fragment I pour construction du mutant F6-1 Δ 1457
SALIVA_1457.2	TATTTAATATTTGGGAAATATTCATTCTAATTGGCCAAGCGCTTCTAAGACT	60		
SALIVA_1457.3	AATTTAGTTTATTTATAGATTTTCATTGGCTTCTACCGTCATTTGCTACTTTCA	60	1020	Amplification fragment II pour construction du mutant F6-1 Δ 1457
SALIVA_1457.4	GAAACTGATCGCGTGACTCG	62		
SpecRev	CCAATTAGAATATTTCCC	54	997	Amplification cassette de résistance à la spectinomycine
Spec Fwd_bis	CGAAGTTATCGTAACGTGAC	58		

7. Electrophorèse

Les différents produits de PCR obtenus dans ce travail ont été déposés sur gel d'agarose à 0,8% et en TBE (Tris Borate EDTA) 1X. La solution de TBE 10X utilisée comportait du Trizma base (108 g/L), de l'acide borique (55 g/L) et de l'EDTA 0,5 M pH8 (40 mL). Les dépôts comportaient 3 µL du produit de PCR et 3 µL du tampon de charge Green 0,5X (Thermo Scientific).

La migration a été réalisée pendant 1h30 à 100 V. La révélation du gel a nécessité un bain de 15 min dans une solution diluée de bromure d'éthidium (Sigma Aldrich) puis un bain de 5 min dans de l'eau distillée. L'image a été captée grâce à une caméra UV et au logiciel Gel Doc (Biorad).

Références bibliographiques

- Aas, J. a, Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I., & Dewhirst, F. E. (2005). Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(11), 5721–32. doi:10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005
- Ambroset, C., Coluzzi, C., Guédon, G., Devignes, M.-D., Loux, V., Lacroix, T., Leblond-Bourget, N. (2016). New Insights into the Classification and Integration Specificity of Streptococcus Integrative Conjugative Elements through Extensive Genome Exploration. *Frontiers in Microbiology*, 6. doi:10.3389/fmicb.2015.01483
- Augeron, C., & Labois, C. L. (1984). Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Research*, 44(9), 3961–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6744312>
- Ayoubi, P., Kilic, A. O., & Vijayakumar, M. N. (1991). Tn5253, the pneumococcal omega (cat tet) BM6001 element, is a composite structure of two conjugative transposons, Tn5251 and Tn5252. *Journal of Bacteriology*, 173(5), 1617–22. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=207310&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bateman, A., Holden, M. T. G., & Yeats, C. (2005a). The G5 domain: A potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics*, 21(8), 1301–1303. doi:10.1093/bioinformatics/bti206
- Bateman, A., Holden, M. T. G., & Yeats, C. (2005b). The G5 domain: a potential N-acetylglucosamine recognition domain involved in biofilm formation. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 21(8), 1301–3. doi:10.1093/bioinformatics/bti206
- Beaber, J. W., Hochhut, B., & Waldor, M. K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature*, 427(6969), 72–4. doi:10.1038/nature02241
- Beg, A. M., Jones, M. N., Miller-Torbert, T., & Holt, R. G. (2002). Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 298(1), 75–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12379222>
- Bellanger, X., Morel, C., Decaris, B., & Guédon, G. (2007). Derepression of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus* by DNA damage response: implication of a *ci*-related repressor. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1478–81. doi:10.1128/JB.01125-06
- Bellanger, X., Morel, C., Gonot, F., Puymège, A., Decaris, B., & Guédon, G. (2011). Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to *cis* mobilization and gene capture. *Molecular Microbiology*, 81(4), 912–25. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07737.x
- Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N., & Guédon, G. (2014). Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(4), 720–60. doi:10.1111/1574-6976.12058
- Bellanger, X., Roberts, A. P., Morel, C., Choulet, F., Pavlovic, G., Mullany, P., Guédon, G. (2009). Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Bacteriology*, 191(8), 2764–75. doi:10.1128/JB.01412-08

- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G., & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of Molecular Biology*, 340(4), 783–95. doi:10.1016/j.jmb.2004.05.028
- Bensing, B. A., Seepersaud, R., Yen, Y. T., & Sullam, P. M. (2014). Selective transport by SecA2: an expanding family of customized motor proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(8), 1674–86. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.10.019
- Bensing, B. A., Siboo, I. R., & Sullam, P. M. (2007). Glycine residues in the hydrophobic core of the GspB signal sequence route export toward the accessory Sec pathway. *Journal of Bacteriology*, 189(10), 3846–54. doi:10.1128/JB.00027-07
- Bensing, B. A., & Sullam, P. M. (2010). Transport of preproteins by the accessory Sec system requires a specific domain adjacent to the signal peptide. *Journal of Bacteriology*, 192(16), 4223–32. doi:10.1128/JB.00373-10
- Bensing, B. A., Yen, Y. T., Seepersaud, R., & Sullam, P. M. (2012). A Specific interaction between SecA2 and a region of the preprotein adjacent to the signal peptide occurs during transport via the accessory Sec system. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(29), 24438–47. doi:10.1074/jbc.M112.378059
- Beres, S. B., & Musser, J. M. (2007). Contribution of exogenous genetic elements to the group A Streptococcus metagenome. *PloS One*, 2(8), e800. doi:10.1371/journal.pone.0000800
- Bhatty, M., Laverde Gomez, J. A., & Christie, P. J. (2013). The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Research in Microbiology*, 164(6), 620–39. doi:10.1016/j.resmic.2013.03.012
- Bhaya, D., Davison, M., & Barrangou, R. (2011). CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review of Genetics*, 45, 273–97. doi:10.1146/annurev-genet-110410-132430
- Bik, E. M., Long, C. D., Armitage, G. C., Loomer, P., Emerson, J., Mongodin, E. F., Relman, D. A. (2010). Bacterial diversity in the oral cavity of 10 healthy individuals. *The ISME Journal*, 4(8), 962–74. doi:10.1038/ismej.2010.30
- Blanquet-Diot, S., Denis, S., Chalancon, S., Chaira, F., Cardot, J.-M., & Alric, M. (2012). Use of artificial digestive systems to investigate the biopharmaceutical factors influencing the survival of probiotic yeast during gastrointestinal transit in humans. *Pharmaceutical Research*, 29(6), 1444–53. doi:10.1007/s11095-011-0620-5
- Bose, B., Auchtung, J. M., Lee, C. A., & Grossman, A. D. (2008). A conserved anti-repressor controls horizontal gene transfer by proteolysis. *Molecular Microbiology*, 70(3), 570–82. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06414.x
- Bose, B., & Grossman, A. D. (2011). Regulation of horizontal gene transfer in *Bacillus subtilis* by activation of a conserved site-specific protease. *Journal of Bacteriology*, 193(1), 22–9. doi:10.1128/JB.01143-10
- Brega, S., Caliot, E., Trieu-Cuot, P., & Dramsi, S. (2013). SecA Localization and SecA-Dependent Secretion Occurs at New Division Septa in Group B Streptococcus. *PLoS ONE*, 8(6), e65832. doi:10.1371/journal.pone.0065832
- Brenciani, A., Tiberi, E., Tili, E., Mingoia, M., Palmieri, C., Varaldo, P. E., & Giovanetti, E. (2014). Genetic determinants and elements associated with antibiotic resistance in viridans group streptococci. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(5), 1197–204. doi:10.1093/jac/dkt495

- Brochet, M., Couvé, E., Glaser, P., Guédon, G., & Payot, S. (2008). Integrative conjugative elements and related elements are major contributors to the genome diversity of *Streptococcus agalactiae*. *Journal of Bacteriology*, *190*(20), 6913–7. doi:10.1128/JB.00824-08
- Brochet, M., Da Cunha, V., Couvé, E., Rusniok, C., Trieu-Cuot, P., & Glaser, P. (2009). Atypical association of DDE transposition with conjugation specifies a new family of mobile elements. *Molecular Microbiology*, *71*(4), 948–59. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06579.x
- Burmølle, M., Bahl, M. I., Jensen, L. B., Sørensen, S. J., & Hansen, L. H. (2008). Type 3 fimbriae, encoded by the conjugative plasmid pOLA52, enhance biofilm formation and transfer frequencies in *Enterobacteriaceae* strains. *Microbiology (Reading, England)*, *154*(Pt 1), 187–95. doi:10.1099/mic.0.2007/010454-0
- Burrus, V., Bontemps, C., Decaris, B., & Guédon, G. (2001). Characterization of a novel type II restriction-modification system, Sth368I, encoded by the integrative element ICEst1 of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368. *Applied and Environmental Microbiology*, *67*(4), 1522–8. doi:10.1128/AEM.67.4.1522-1528.2001
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., & Guédon, G. (2002a). Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Molecular Microbiology*, *46*(3), 601–610. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03191.x
- Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B., & Guédon, G. (2002b). The ICEst1 element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. *Plasmid*, *48*(2), 77–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12383726>
- Burrus, V., Roussel, Y., Decaris, B., & Guédon, G. (2000). Characterization of a novel integrative element, ICEst1, in the lactic acid bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(4), 1749–53. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=92057&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Burrus, V., & Waldor, M. K. (2003). Control of SXT integration and excision. *Journal of Bacteriology*, *185*(17), 5045–54. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=181012&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Burton, J. P., Wescombe, P. a, Macklaim, J. M., Chai, M. H. C., Macdonald, K., Hale, J. D. F., Cadieux, P. a. (2013). Persistence of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* M18 is dose dependent and megaplasmid transfer can augment their bacteriocin production and adhesion characteristics. *PloS One*, *8*(6), e65991. doi:10.1371/journal.pone.0065991
- Busscher, H. J., van de Belt-Gritter, B., Dijkstra, R. J. B., Norde, W., Petersen, F. C., Scheie, A. A., & van der Mei, H. C. (2007). Intermolecular forces and enthalpies in the adhesion of *Streptococcus mutans* and an antigen I/II-deficient mutant to laminin films. *Journal of Bacteriology*, *189*(8), 2988–95. doi:10.1128/JB.01731-06
- Carlsson, J., Grahnén, H., Jonsson, G., & Wikner, S. (1970). Early establishment of *Streptococcus salivarius* in the mouth of infants. *Journal of Dental Research*, *49*(2), 415–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5264606>
- Carraro, N., Libante, V., Morel, C., Decaris, B., Charron-Bourgoin, F., Leblond, P., & Guédon, G. (2011). Differential regulation of two closely related integrative and conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*. *BMC Microbiology*, *11*(1), 238. doi:10.1186/1471-2180-11-238
- Celli, J., & Trieu-Cuot, P. (1998). Circularization of Tn916 is required for expression of the transposon-

- encoded transfer functions: characterization of long tetracycline-inducible transcripts reading through the attachment site. *Molecular Microbiology*, 28(1), 103–17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593300>
- Chaffanel, F., Charron-Bourgoin, F., Libante, V., Leblond-Bourget, N., & Payot, S. (2015). Resistance genes and genetic elements associated with antibiotic resistance in clinical and commensal isolates of *Streptococcus salivarius*. *Applied and Environmental Microbiology*. doi:10.1128/AEM.00415-15
- Chancey, S. T., Agrawal, S., Schroeder, M. R., Farley, M. M., Tettelin, H., & Stephens, D. S. (2015). Composite mobile genetic elements disseminating macrolide resistance in *Streptococcus pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, 6, 26. doi:10.3389/fmicb.2015.00026
- Chen, I., Christie, P. J., & Dubnau, D. (2005). The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 310(5753), 1456–60. doi:10.1126/science.1114021
- Cheng, Q., Staflieni, D., Purushothaman, S. S., & Cleary, P. (2002). The group B streptococcal C5a peptidase is both a specific protease and an invasins. *Infection and Immunity*, 70(5), 2408–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=127948&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chmouryguina, I., Suvorov, A., Ferrieri, P., & Cleary, P. P. (1996). Conservation of the C5a peptidase genes in group A and B streptococci. *Infection and Immunity*, 64(7), 2387–90. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=174087&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Chuzeville, S., Puymège, A., Madec, J.-Y., Haenni, M., & Payot, S. (2012). Characterization of a new CAMP factor carried by an integrative and conjugative element in *Streptococcus agalactiae* and spreading in Streptococci. *PLoS One*, 7(11), e48918. doi:10.1371/journal.pone.0048918
- Ciric, L., Ellatif, M., Sharma, P., Patel, R., Song, X., Mullany, P., & Roberts, A. P. (2012). Tn916-like elements from human, oral, commensal streptococci possess a variety of antibiotic and antiseptic resistance genes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 39(4), 360–1. doi:10.1016/j.ijantimicag.2011.12.007
- Cleary, P. P., Prahbu, U., Dale, J. B., Wexler, D. E., & Handley, J. (1992). Streptococcal C5a peptidase is a highly specific endopeptidase. *Infection and Immunity*, 60(12), 5219–23. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=258300&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Clewell, D. B., Jaworski, D. D., Flanagan, S. E., Zitzow, L. A., & Su, Y. A. (1995). The conjugative transposon Tn916 of *Enterococcus faecalis*: structural analysis and some key factors involved in movement. *Developments in Biological Standardization*, 85, 11–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8586160>
- Cochetti, I., Tili, E., Vecchi, M., Manzin, A., Mingoia, M., Varaldo, P. E., & Montanari, M. P. (2007). New Tn916-related elements causing *erm(B)*-mediated erythromycin resistance in tetracycline-susceptible pneumococci. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60(1), 127–31. doi:10.1093/jac/dkm120
- Corredoira, J. C., Alonso, M. P., García, J. F., Casariego, E., Coira, A., Rodriguez, A., Varela, J. (2005). Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and *Streptococcus bovis* bacteremia: a prospective 16-year study. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases: Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 24(4), 250–5. doi:10.1007/s10096-005-1314-x

- Cosseau, C., Devine, D. a, Dullaghan, E., Gardy, J. L., Chikatamarla, A., Gellatly, S., Hancock, R. E. W. (2008). The commensal *Streptococcus salivarius* K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis. *Infection and Immunity*, 76(9), 4163–75. doi:10.1128/IAI.00188-08
- Croucher, N. J., Walker, D., Romero, P., Lennard, N., Paterson, G. K., Bason, N. C., ... Mitchell, T. J. (2009). Role of conjugative elements in the evolution of the multidrug-resistant pandemic clone *Streptococcus pneumoniae* Spain23F ST81. *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1480–9. doi:10.1128/JB.01343-08
- Cvitkovitch, D. G., Li, Y.-H., & Ellen, R. P. (2003). Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *Journal of Clinical Investigation*, 112(11), 1626–1632. doi:10.1172/JCI200320430
- Dalbey, R. E., Wang, P., & Kuhn, A. (2011). Assembly of bacterial inner membrane proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 80, 161–87. doi:10.1146/annurev-biochem-060409-092524
- Davies, M. R., Shera, J., Van Domselaar, G. H., Sriprakash, K. S., & McMillan, D. J. (2009). A novel integrative conjugative element mediates genetic transfer from group G *Streptococcus* to other {beta}-hemolytic *Streptococci*. *Journal of Bacteriology*, 191(7), 2257–65. doi:10.1128/JB.01624-08
- de la Cruz, F., Frost, L. S., Meyer, R. J., & Zechner, E. L. (2010). Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34(1), 18–40. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00195.x
- del Amo, E., Esteve, C., Hernandez-Bou, S., Galles, C., Navarro, M., Sauca, G., Muñoz-Almagro, C. (2016). Serotypes and Clonal Diversity of *Streptococcus pneumoniae* Causing Invasive Disease in the Era of PCV13 in Catalonia, Spain. *PLOS ONE*, 11(3), e0151125. doi:10.1371/journal.pone.0151125
- Del Grosso, M., Camilli, R., Barbabella, G., Blackman Northwood, J., Farrell, D. J., & Pantosti, A. (2011). Genetic resistance elements carrying *mef* subclasses other than *mef(A)* in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3226–30. doi:10.1128/AAC.01713-10
- Del Grosso, M., Scotto d'Abusco, A., Iannelli, F., Pozzi, G., & Pantosti, A. (2004). Tn2009, a Tn916-like element containing *mef(E)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(6), 2037–42. doi:10.1128/AAC.48.6.2037-2042.2004
- Delorme, C., Abraham, A.-L., Renault, P., & Guédon, E. (2014). Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. *Infection, Genetics and Evolution*. doi:10.1016/j.meegid.2014.10.001
- Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S. D., & Renault, P. (2010). Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(2), 451–60. doi:10.1128/AEM.01018-09
- Delorme, C., Poyart, C., Ehrlich, S. D., & Renault, P. (2007). Extent of horizontal gene transfer in evolution of *Streptococci* of the *salivarius* group. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1330–41. doi:10.1128/JB.01058-06
- Dempster, R. P., & Tagg, J. R. (1982). The production of bacteriocin-like substances by the oral bacterium *Streptococcus salivarius*. *Archives of Oral Biology*, 27(2), 151–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7044350>
- Desvaux, M., Dumas, E., Chafsey, I., & Hébraud, M. (2006). Protein cell surface display in Gram-positive bacteria: from single protein to macromolecular protein structure. *FEMS Microbiology Letters*, 256(1), 1–15. doi:10.1111/j.1574-6968.2006.00122.x

- Dierksen, K. P., Inglis, M., & Tagg, J. R. (2000). High pharyngeal carriage rates of *Streptococcus pyogenes* in Dunedin school children with a low incidence of rheumatic fever. *The New Zealand Medical Journal*, 113(1122), 496–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11198543>
- Doern, C. D., & Burnham, C.-A. D. (2010). It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(11), 3829–35. doi:10.1128/JCM.01563-10
- du Plessis, D. J. F., Nouwen, N., & Driessen, A. J. M. (2011). The Sec translocase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1808(3), 851–65. doi:10.1016/j.bbamem.2010.08.016
- Eckburg, P. B., Bik, E. M., Bernstein, C. N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Relman, D. A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5728), 1635–8. doi:10.1126/science.1110591
- Enright, M. C., & Spratt, B. G. (1999). Multilocus sequence typing. *Trends in Microbiology*, 7(12), 482–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10603483>
- Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M., & Akkermans, A. D. L. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 219–26. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=126580&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Feld, L., Schjørring, S., Hammer, K., Licht, T. R., Danielsen, M., Krogfelt, K., & Wilcks, A. (2008). Selective pressure affects transfer and establishment of a *Lactobacillus plantarum* resistance plasmid in the gastrointestinal environment. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(4), 845–52. doi:10.1093/jac/dkn033
- Ferretti, J. J., McShan, W. M., Ajdic, D., Savic, D. J., Savic, G., Lyon, K., McLaughlin, R. (2001). Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(8), 4658–63. doi:10.1073/pnas.071559398
- Fogh, J., Fogh, J. M., & Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 59(1), 221–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/327080>
- Fontaine, L., Boutry, C., de Frahan, M. H., Delplace, B., Fremaux, C., Horvath, P., Hols, P. (2010). A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *Journal of Bacteriology*, 192(5), 1444–54. doi:10.1128/JB.01251-09
- Fontaine, L., Wahl, A., Fléchar, M., Mignolet, J., & Hols, P. (2015). Regulation of competence for natural transformation in streptococci. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 33, 343–60. doi:10.1016/j.meegid.2014.09.010
- Franke, A. E., & Clewell, D. B. (1981). Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of “conjugal” transfer in the absence of a conjugative plasmid. *Journal of Bacteriology*, 145(1), 494–502. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=217299&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Frankel, M. B., Wojcik, B. M., DeDent, A. C., Missiakas, D. M., & Schneewind, O. (2010). ABL domain-

- containing proteins contribute to surface protein display and cell division in *Staphylococcus aureus*. *Molecular Microbiology*, 78(1), 238–52. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07334.x
- Freudl, R. (2013). Leaving home ain't easy: protein export systems in Gram-positive bacteria. *Research in Microbiology*, 164(6), 664–74. doi:10.1016/j.resmic.2013.03.014
- Gay, K., & Stephens, D. S. (2001). Structure and dissemination of a chromosomal insertion element encoding macrolide efflux in *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of Infectious Diseases*, 184(1), 56–65. doi:10.1086/321001
- Geng, J., Huang, S.-C., Li, S., Hu, S., & Chen, Y.-Y. M. (2011). Complete genome sequence of the ureolytic *Streptococcus salivarius* strain 57.I. *Journal of Bacteriology*, 193(19), 5596–7. doi:10.1128/JB.05670-11
- Ghinet, M. G., Bordeleau, E., Beaudin, J., Brzezinski, R., Roy, S., & Burrus, V. (2011). Uncovering the prevalence and diversity of integrating conjugative elements in actinobacteria. *PLoS One*, 6(11), e27846. doi:10.1371/journal.pone.0027846
- Glaser, P., Rusniok, C., Buchrieser, C., Chevalier, F., Frangeul, L., Msadek, T., Kunst, F. (2002). Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Molecular Microbiology*, 45(6), 1499–513. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12354221>
- Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Keller, W., & Grohmann, E. (2013). Conjugative type IV secretion systems in Gram-positive bacteria. *Plasmid*, 70(3), 289–302. doi:10.1016/j.plasmid.2013.09.005
- Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Keller, W., & Grohmann, E. (2014). Conjugation in Gram-Positive Bacteria. *Microbiology Spectrum*, 2(4), PLAS-0004–2013. doi:10.1128/microbiolspec.PLAS-0004-2013
- Goessweiner-Mohr, N., Grumet, L., Arends, K., Pavkov-Keller, T., Gruber, C. C., Gruber, K., Keller, W. (2013). The 2.5 Å structure of the enterococcus conjugation protein TraM resembles VirB8 type IV secretion proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(3), 2018–28. doi:10.1074/jbc.M112.428847
- Gopal, P. K., Prasad, J., Smart, J., & Gill, H. S. (2001). In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology*, 67(3), 207–16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11518430>
- Govindarajan, B., Menon, B. B., Spurr-Michaud, S., Rastogi, K., Gilmore, M. S., Argüeso, P., & Gipson, I. K. (2012). A metalloproteinase secreted by *Streptococcus pneumoniae* removes membrane mucin MUC16 from the epithelial glycocalyx barrier. *PLoS ONE*, 7(3), 1–12. doi:10.1371/journal.pone.0032418
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *The Journal of Hygiene*, 27(2), 113–59. Retrieved from http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2167760&tool=pmcentrez&render_type=abstract
- Groth, A. C., & Calos, M. P. (2004). Phage integrases: biology and applications. *Journal of Molecular Biology*, 335(3), 667–78. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14687564>
- Guérillot, R., Da Cunha, V., Sauvage, E., Bouchier, C., & Glaser, P. (2013). Modular evolution of TnGBSs, a new family of integrative and conjugative elements associating insertion sequence transposition, plasmid replication, and conjugation for their spreading. *Journal of Bacteriology*, 195(9), 1979–90. doi:10.1128/JB.01745-12

- Guglielmini, J., Néron, B., Abby, S. S., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F., & Rocha, E. P. C. (2014). Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. *Nucleic Acids Research*, *42*(9), 5715–27. doi:10.1093/nar/gku194
- Guglielmini, J., Quintais, L., Garcillán-Barcia, M. P., de la Cruz, F., & Rocha, E. P. C. (2011). The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genetics*, *7*(8), e1002222. doi:10.1371/journal.pgen.1002222
- Haenni, M., Saras, E., Bertin, S., Leblond, P., Madec, J.-Y., & Payot, S. (2010). Diversity and mobility of integrative and conjugative elements in bovine isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae subsp. dysgalactiae*, and *S. uberis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *76*(24), 7957–65. doi:10.1128/AEM.00805-10
- Hakalehto, E., Vilpponen-Salmela, T., Kinnunen, K., & von Wright, A. (2011). Lactic Acid bacteria enriched from human gastric biopsies. *ISRN Gastroenterology*, *2011*, 109183. doi:10.5402/2011/109183
- Han, X. Y., Kamana, M., & Rolston, K. V. I. (2006). Viridans streptococci isolated by culture from blood of cancer patients: clinical and microbiologic analysis of 50 cases. *Journal of Clinical Microbiology*, *44*(1), 160–5. doi:10.1128/JCM.44.1.160-165.2006
- Handley, P. S., Correia, F. F., Russell, K., Rosan, B., & DiRienzo, J. M. (2005). Association of a novel high molecular weight, serine-rich protein (SrpA) with fibril-mediated adhesion of the oral biofilm bacterium *Streptococcus cristatus*. *Oral Microbiology and Immunology*, *20*(3), 131–40. doi:10.1111/j.1399-302X.2004.00190.x
- Hao, W.-L., & Lee, Y.-K. (2004). Microflora of the gastrointestinal tract: a review. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *268*(3), 491–502. doi:10.1385/1-59259-766-1:491
- Hartl, D. L., & Jones, E. W. (2003). *Génétique, Les grands principes*. (Dunod, Ed.). Retrieved from <http://www.dunod.com/sciences-techniques/sciences-fondamentales/sciences-de-la-vie-et-sante/licence/genetique-les-grands-principes>
- Hasty, D. L., Ofek, I., Courtney, H. S., & Doyle, R. J. (1992). Multiple adhesins of streptococci. *Infection and Immunity*, *60*(6), 2147–2152. Retrieved from <http://iai.asm.org/content/60/6/2147>
- Hausner, M., & Wuertz, S. (1999). High Rates of Conjugation in Bacterial Biofilms as Determined by Quantitative In Situ Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, *65*(8), 3710–3713. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91555/>
- Heath, D. G., & Cleary, P. P. (1989). Fc-receptor and M-protein genes of group A streptococci are products of gene duplication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *86*(12), 4741–5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=287349&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Heather, Z., Holden, M. T. G., Steward, K. F., Parkhill, J., Song, L., Challis, G. L., Waller, A. S. (2008). A novel streptococcal integrative conjugative element involved in iron acquisition. *Molecular Microbiology*, *70*(5), 1274–92. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06481.x
- Hendrickx, A. P. A., Budzik, J. M., Oh, S.-Y., & Schneewind, O. (2011). Architects at the bacterial surface - sortases and the assembly of pili with isopeptide bonds. *Nature Reviews. Microbiology*, *9*(3), 166–76. doi:10.1038/nrmicro2520
- Hendrickx, A. P. A., Willems, R. J. L., Bonten, M. J. M., & van Schaik, W. (2009). LPxTG surface proteins of enterococci. *Trends in Microbiology*, *17*(9), 423–30. doi:10.1016/j.tim.2009.06.004

- Heng, N. C. K., Haji-Ishak, N. S., Kalyan, A., Wong, A. Y. C., Lovric, M., Bridson, J. M., Tagg, J. R. (2011). Genome sequence of the bacteriocin-producing oral probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18. *Journal of Bacteriology*, 193(22), 6402–3. doi:10.1128/JB.06001-11
- Hermans, P. W. M., Adrian, P. V, Albert, C., Estevão, S., Hoogenboezem, T., Luijendijk, I. H. T., Hammerschmidt, S. (2006). The streptococcal lipoprotein rotamase A (SlrA) is a functional peptidyl-prolyl isomerase involved in pneumococcal colonization. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(2), 968–76. doi:10.1074/jbc.M510014200
- Hilgendorf, C., Spahn-Langguth, H., Regårdh, C. G., Lipka, E., Amidon, G. L., & Langguth, P. (2000). Caco-2 versus Caco-2/HT29-MTX co-cultured cell lines: permeabilities via diffusion, inside- and outside-directed carrier-mediated transport. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(1), 63–75. doi:10.1002/(SICI)1520-6017(200001)89:1<63::AID-JPS7>3.0.CO;2-6
- Hirt, H., Manias, D. A., Bryan, E. M., Klein, J. R., Marklund, J. K., Staddon, J. H., Dunny, G. M. (2005). Characterization of the pheromone response of the *Enterococcus faecalis* conjugative plasmid pCF10: complete sequence and comparative analysis of the transcriptional and phenotypic responses of pCF10-containing cells to pheromone induction. *Journal of Bacteriology*, 187(3), 1044–54. doi:10.1128/JB.187.3.1044-1054.2005
- Horodniceanu, T., Bougueleret, L., El-Solh, N., Bouanchaud, D. H., & Chabbert, Y. A. (1979). Conjugative R plasmids in *Streptococcus agalactiae* (group B). *Plasmid*, 2(2), 197–206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/109871>
- Hyink, O., Wescombe, P. A., Upton, M., Ragland, N., Burton, J. P., & Tagg, J. R. (2006). Salivaricin A2 and the Novel Lantibiotic Salivaricin B Are Encoded at Adjacent Loci on a 190-Kilobase Transmissible Megaplasmid in the Oral Probiotic Strain *Streptococcus salivarius* K12. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(4), 1107–1113. doi:10.1128/AEM.02265-06
- Ilangovan, A., Connery, S., & Waksman, G. (2015). Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. *Trends in Microbiology*, 23(5), 301–10. doi:10.1016/j.tim.2015.02.012
- Jakubovics, N. S., Brittan, J. L., Dutton, L. C., & Jenkinson, H. F. (2009). Multiple adhesin proteins on the cell surface of *Streptococcus gordonii* are involved in adhesion to human fibronectin. *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 11), 3572–80. doi:10.1099/mic.0.032078-0
- Jakubovics, N. S., Kerrigan, S. W., Nobbs, A. H., Strömberg, N., van Dolleweerd, C. J., Cox, D. M., Jenkinson, H. F. (2005). Functions of cell surface-anchored antigen I/II family and Hsa polypeptides in interactions of *Streptococcus gordonii* with host receptors. *Infection and Immunity*, 73(10), 6629–38. doi:10.1128/IAI.73.10.6629-6638.2005
- Jenkinson, H. F., & Demuth, D. R. (1997). Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. *Molecular Microbiology*, 23(2), 183–90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9044252>
- Jenkinson, H. F., & Lamont, R. (1997). Streptococcal Adhesion and Colonization. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 8(2), 175–200. doi:10.1177/10454411970080020601
- Jenkinson, H. F., Terry, S. D., McNab, R., & Tannock, G. W. (1993). Inactivation of the gene encoding surface protein SspA in *Streptococcus gordonii* DL1 affects cell interactions with human salivary agglutinin and oral actinomyces. *Infection and Immunity*, 61(8), 3199–208. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=280988&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jönsson, M., & Swedberg, G. (2006). Macrolide resistance can be transferred by conjugation from viridans streptococci to *Streptococcus pyogenes*. *International Journal of Antimicrobial Agents*,

28(2), 101–3. doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.02.023

- Juge, N. (2012). Microbial adhesins to gastrointestinal mucus. *Trends in Microbiology*, 20(1), 30–9. doi:10.1016/j.tim.2011.10.001
- Kaci, G., Goudercourt, D., Dennin, V., Pot, B., Doré, J., Ehrlich, S. D., Delorme, C. (2014). Anti-inflammatory properties of *Streptococcus salivarius*, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(3), 928–34. doi:10.1128/AEM.03133-13
- Kawabata, S., Tamura, Y., Murakami, J., Terao, Y., Nakagawa, I., & Hamada, S. (2002). A novel, anchorless streptococcal surface protein that binds to human immunoglobulins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(5), 1329–33. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12207920>
- Kebouchi, M., Galia, W., Genay, M., Soligot, C., Lecomte, X., Awussi, A. A., Le Roux, Y. (2016). Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salt tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s00253-016-7322-1
- King, S. L., & Dekaney, C. M. (2013). Small intestinal stem cells. *Current Opinion in Gastroenterology*, 29(2), 140–5. doi:10.1097/MOG.0b013e32835cf253
- Kitten, T., Munro, C. L., Zollar, N. Q., Lee, S. P., & Patel, R. D. (2012). Oral streptococcal bacteremia in hospitalized patients: taxonomic identification and clinical characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3), 1039–42. doi:10.1128/JCM.06438-11
- Kleerebezem, M., Hols, P., Bernard, E., Rolain, T., Zhou, M., Siezen, R. J., & Bron, P. a. (2010). The extracellular biology of the lactobacilli. *FEMS Microbiology Reviews*, 34, 199–230. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00208.x
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Periasamy, S., & Jakubovics, N. S. (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell-cell distance. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(7), 471–80. doi:10.1038/nrmicro2381
- Kovacs-Simon, A., Titball, R. W., & Michell, S. L. (2011). Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infection and Immunity*, 79(2), 548–61. doi:10.1128/IAI.00682-10
- Krah, E. R., & Macrina, F. L. (1991). Identification of a region that influences host range of the streptococcal conjugative plasmid pIP501. *Plasmid*, 25(1), 64–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1903546>
- Krishnan, V., & Narayana, S. V. L. (2011). Crystallography of gram-positive bacterial adhesins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 715, 175–95. doi:10.1007/978-94-007-0940-9_11
- Król, J. E., Nguyen, H. D., Rogers, L. M., Beyenal, H., Krone, S. M., & Top, E. M. (2011). Increased transfer of a multidrug resistance plasmid in *Escherichia coli* biofilms at the air-liquid interface. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5079–88. doi:10.1128/AEM.00090-11
- Kurenbach, B., Bohn, C., Prabhu, J., Abudukerim, M., Szewzyk, U., & Grohmann, E. (2003). Intergeneric transfer of the *Enterococcus faecalis* plasmid pIP501 to *Escherichia coli* and *Streptomyces lividans* and sequence analysis of its tra region. *Plasmid*, 50(1), 86–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12826062>
- Leclercq, R. (2002). Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clinical Infectious Diseases: An Official*

Publication of the Infectious Diseases Society of America, 34(4), 482–92. doi:10.1086/324626

- Lecomte, X., Gagnaire, V., Briard-Bion, V., Jardin, J., Lortal, S., Dary, A., & Genay, M. (2014). The naturally competent strain *Streptococcus thermophilus* LMD-9 as a new tool to anchor heterologous proteins on the cell surface. *Microbial Cell Factories*, 13, 82. doi:10.1186/1475-2859-13-82
- Lederberg, J. (1998). Plasmid (1952-1997). *Plasmid*, 39(1), 1–9. doi:10.1006/plas.1997.1320
- LEDERBERG, J., & TATUM, E. L. (1946). Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature*, 158(4016), 558. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21001945>
- Lesuffleur, T., Barbat, A., Dussaulx, E., & Zweibaum, A. (1990). Growth adaptation to methotrexate of HT-29 human colon carcinoma cells is associated with their ability to differentiate into columnar absorptive and mucus-secreting cells. *Cancer Research*, 50(19), 6334–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2205381>
- Licht, T. R., & Wilcks, A. (2005). Conjugative Gene Transfer in the Gastrointestinal Environment. *Advances in Applied Microbiology*, 58C, 77–95. doi:10.1016/S0065-2164(05)58002-X
- Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2006). The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(2), 315–37. doi:10.1128/CMR.19.2.315-337.2006
- Liévin-Le Moal, V., & Servin, A. L. (2013). Pathogenesis of human enterovirulent bacteria: lessons from cultured, fully differentiated human colon cancer cell lines. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 77(3), 380–439. doi:10.1128/MMBR.00064-12
- Liu, L., Chen, X., Skogerbø, G., Zhang, P., Chen, R., He, S., & Huang, D.-W. (2012). The human microbiome: a hot spot of microbial horizontal gene transfer. *Genomics*, 100(5), 265–70. doi:10.1016/j.ygeno.2012.07.012
- Lopez-Sanchez, M.-J., Sauvage, E., Da Cunha, V., Clermont, D., Ratsima Hariniaina, E., Gonzalez-Zorn, B., ... Glaser, P. (2012). The highly dynamic CRISPR1 system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome. *Molecular Microbiology*, 85(6), 1057–71. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08172.x
- Lorenzo-Díaz, F., & Espinosa, M. (2009). Large-scale filter mating assay for intra- and inter-specific conjugal transfer of the promiscuous plasmid pMV158 in Gram-positive bacteria. *Plasmid*, 61(1), 65–70. doi:10.1016/j.plasmid.2008.09.005
- Love, R. M., McMillan, M. D., & Jenkinson, H. F. (1997). Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infection and Immunity*, 65(12), 5157–64. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=175743&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Lukić, J., Strahinić, I., Jovčić, B., Filipić, B., Topisirović, L., Kojić, M., & Begović, J. (2012). Different roles for lactococcal aggregation factor and mucin binding protein in adhesion to gastrointestinal mucosa. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(22), 7993–8000. doi:10.1128/AEM.02141-12
- Luo, H., Wan, K., & Wang, H. H. (2005). High-frequency conjugation system facilitates biofilm formation and pAMBeta1 transmission by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(6), 2970–8. doi:10.1128/AEM.71.6.2970-2978.2005
- Lycklama A Nijeholt, J. A., & Driessen, A. J. M. (2012). The bacterial Sec-translocase: structure and

- mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367(1592), 1016–28. doi:10.1098/rstb.2011.0201
- Machiyama, H., Yamaguchi, T., Sawada, Y., Watanabe, T. M., & Fujita, H. (2015). SH3 domain of c-Src governs its dynamics at focal adhesions and the cell membrane. *The FEBS Journal*. doi:10.1111/febs.13404
- Malhotra-Kumar, S., Lammens, C., Martel, A., Mallentjer, C., Chapelle, S., Verhoeven, J., Goossens, H. (2004). Oropharyngeal carriage of macrolide-resistant viridans group streptococci: a prevalence study among healthy adults in Belgium. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(2), 271–6. doi:10.1093/jac/dkh026
- Marrero, J., & Waldor, M. K. (2005). Interactions between inner membrane proteins in donor and recipient cells limit conjugal DNA transfer. *Developmental Cell*, 8(6), 963–70. doi:10.1016/j.devcel.2005.05.004
- McGuckin, M. A., Lindén, S. K., Sutton, P., & Florin, T. H. (2011). Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews. Microbiology*, 9(4), 265–78. doi:10.1038/nrmicro2538
- Menon, B. B., & Govindarajan, B. (2013). Identification of an atypical zinc metalloproteinase, ZmpC, from an epidemic conjunctivitis-causing strain of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Pathogenesis*, 56, 40–6. doi:10.1016/j.micpath.2012.11.006
- Millar, M. R., Linton, C. J., Cade, A., Glancy, D., Hall, M., & Jalal, H. (1996). Application of 16S rRNA gene PCR to study bowel flora of preterm infants with and without necrotizing enterocolitis. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(10), 2506–10. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=229306&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Mingoa, M., Morici, E., Brenciani, A., Giovanetti, E., & Varaldo, P. E. (2014). Genetic basis of the association of resistance genes *mef(I)* (macrolides) and *catQ* (chloramphenicol) in streptococci. *Frontiers in Microbiology*, 5, 747. doi:10.3389/fmicb.2014.00747
- Mingoa, M., Morici, E., Morroni, G., Giovanetti, E., Del Grosso, M., Pantosti, A., & Varaldo, P. E. (2014). Tn5253 family integrative and conjugative elements carrying *mef(I)* and *catQ* determinants in *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(10), 5886–93. doi:10.1128/AAC.03638-14
- Mingoa, M., Vecchi, M., Cochetti, I., Tili, E., Vitali, L. A., Manzin, A., Montanari, M. P. (2007). Composite structure of *Streptococcus pneumoniae* containing the erythromycin efflux resistance gene *mefI* and the chloramphenicol resistance gene *catQ*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(11), 3983–7. doi:10.1128/AAC.00790-07
- Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 255–261. doi:10.1016/S0958-1669(03)00036-3
- Morton, C. J., & Campbell, I. D. (1994). SH3 Domains: Molecular “Velcro.” *Current Biology*, 4(7), 615–617. doi:10.1016/S0960-9822(00)00134-2
- Mullany, P., Roberts, A. P., & Wang, H. (2002). Mechanism of integration and excision in conjugative transposons. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 59(12), 2017–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12568327>
- Nielsen, K. L., Hammerum, A. M., Lambertsen, L. M., Lester, C. H., Arpi, M., Knudsen, J. D., Frimodt-Møller, N. (2010). Characterization and transfer studies of macrolide resistance genes in *Streptococcus pneumoniae* from Denmark. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 42(8),

586–93. doi:10.3109/00365541003754451

- Nobbs, A. H., Lamont, R. J., & Jenkinson, H. F. (2009). Streptococcus adherence and colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 73(3), 407–50, Table of Contents. doi:10.1128/MMBR.00014-09
- Novak, R., Charpentier, E., Braun, J. S., Park, E., Murti, S., Tuomanen, E., & Masure, R. (2000). Extracellular targeting of choline-binding proteins in *Streptococcus pneumoniae* by a zinc metalloprotease. *Molecular Microbiology*, 36(2), 366–76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10792723>
- Ofek, I., & Doyle, R. J. (1994). Bacterial Adhesion to Cells and Tissues. Boston, MA: Springer US. doi:10.1007/978-1-4684-6435-1
- Oligino, L., & Fives-Taylor, P. (1993). Overexpression and purification of a fimbria-associated adhesin of *Streptococcus parasanguis*. *Infection and Immunity*, 61(3), 1016–22. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=302833&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Oliver, M. B., van der Linden, M. P. G., Küntzel, S. A., Saad, J. S., & Nahm, M. H. (2013). Discovery of *Streptococcus pneumoniae* serotype 6 variants with glycosyltransferases synthesizing two differing repeating units. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(36), 25976–85. doi:10.1074/jbc.M113.480152
- Olmsted, S. B., Kao, S., Putte, L. J. V. A. N., Gallo, J. C., & Dunny, G. M. (1991). Role of the Pheromone-Inducible Surface Protein AsclO in Mating Aggregate Formation and Conjugal Transfer of the *Enterococcus faecalis* Plasmid pCF10, 173(23), 7665–7672.
- Ong, C.-L. Y., Beatson, S. A., McEwan, A. G., & Schembri, M. A. (2009). Conjugative plasmid transfer and adhesion dynamics in an *Escherichia coli* biofilm. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6783–91. doi:10.1128/AEM.00974-09
- Otto, R., Brink, B., Veldkamp, H., & Konings, W. N. (1983). The relation between growth rate and electrochemical proton gradient of *Streptococcus cremoris*. *FEMS Microbiology Letters*, 16(1), 69–74. doi:10.1111/j.1574-6968.1983.tb00261.x
- Park, H.-K., Shim, S.-S., Kim, S.-Y., Park, J.-H., Park, S.-E., Kim, H.-J., Kim, C.-M. (2005). Molecular analysis of colonized bacteria in a human newborn infant gut. *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*, 43(4), 345–53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16145549>
- Patras, K. A., Wescombe, P. A., Rösler, B., Hale, J. D., Tagg, J. R., & Doran, K. S. (2015). *Streptococcus salivarius* K12 Limits Group B Streptococcus Vaginal Colonization. *Infection and Immunity*, 83(9), 3438–3444. doi:10.1128/IAI.00409-15
- Pavlovic, G., Burrus, V., Gintz, B., Decaris, B., & Guédon, G. (2004). Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICES₁-related elements from *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology (Reading, England)*, 150(Pt 4), 759–74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073287>
- Pawson, T., & Schlessingert, J. (1993). SH2 and SH3 domains. *Current Biology*, 3(7), 434–442. doi:10.1016/0960-9822(93)90350-W
- Pérez-Trallero, E., Vicente, D., Montes, M., Marimon, J. M., & Piñeiro, L. (2001). High proportion of pharyngeal carriers of commensal streptococci resistant to erythromycin in Spanish adults. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(2), 225–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11481292>

- Petersen, F. C., Assev, S., van der Mei, H. C., Busscher, H. J., & Scheie, A. A. (2002). Functional variation of the antigen I/II surface protein in *Streptococcus mutans* and *Streptococcus intermedius*. *Infection and Immunity*, *70*(1), 249–56. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=127646&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Petersen, F. C., Pasco, S., Ogier, J., Klein, J. P., Assev, S., & Scheie, A. A. (2001). Expression and functional properties of the *Streptococcus intermedius* surface protein antigen I/II. *Infection and Immunity*, *69*(7), 4647–53. doi:10.1128/IAI.69.7.4647-4653.2001
- Petrova, O. E., & Sauer, K. (2012). Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of Bacteriology*, *194*(10), 2413–25. doi:10.1128/JB.00003-12
- Possoz, C., Gagnat, J., Sezonov, G., Guérineau, M., & Pernodet, J.-L. (2003). Conjugal immunity of *Streptomyces* strains carrying the integrative element pSAM2 is due to the pif gene (pSAM2 immunity factor). *Molecular Microbiology*, *47*(5), 1385–93. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12603742>
- Puymège, A., Bertin, S., Guédon, G., & Payot, S. (2015). Analysis of *Streptococcus agalactiae* pan-genome for prevalence, diversity and functionality of integrative and conjugative or mobilizable elements integrated in the tRNA(Lys CTT) gene. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*. doi:10.1007/s00438-015-1031-9
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Wang, J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, *464*(7285), 59–65. doi:10.1038/nature08821
- Rajeev, L., Malanowska, K., & Gardner, J. F. (2009). Challenging a paradigm: the role of DNA homology in tyrosine recombinase reactions. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, *73*(2), 300–9. doi:10.1128/MMBR.00038-08
- Rauch, P. J., & De Vos, W. M. (1992). Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *Journal of Bacteriology*, *174*(4), 1280–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=206422&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Reinscheid, D. J., Stößer, C., Ehlert, K., Jack, R. W., Möller, K., Eikmanns, B. J., & Chhatwal, G. S. (2002). Influence of proteins Bsp and FemH on cell shape and peptidoglycan composition in group B streptococcus. *Microbiology*, *148*, 3245–3254.
- Richards, V. P., Palmer, S. R., Pavinski Bitar, P. D., Qin, X., Weinstock, G. M., Highlander, S. K., Stanhope, M. J. (2014). Phylogenomics and the Dynamic Genome Evolution of the Genus *Streptococcus*. *Genome Biology and Evolution*, *6*(4), 741–753. doi:10.1093/gbe/evu048
- Roberts, A. P., Cheah, G., Ready, D., Pratten, J., Wilson, M., & Mullany, P. (2001). Transfer of Tn916-Like Elements in Microcosm Dental Plaques. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *45*(10), 2943–2946. doi:10.1128/AAC.45.10.2943-2946.2001
- Roberts, A. P., & Mullany, P. (2009). A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends in Microbiology*, *17*(6), 251–8. doi:10.1016/j.tim.2009.03.002
- Roberts, A. P., & Mullany, P. (2011). Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, *35*(5), 856–71. doi:10.1111/j.1574-6976.2011.00283.x
- Roberts, M. C. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*,

- Roche, D., Fléchar, M., Lallier, N., Répérant, M., Brée, A., Pascal, G., Germon, P. (2010). ICEEc2, a new integrative and conjugative element belonging to the pKLC102/PAGI-2 family, identified in *Escherichia coli* strain BEN374. *Journal of Bacteriology*, 192(19), 5026–36. doi:10.1128/JB.00609-10
- Rogers, J. D., Haase, E. M., Brown, A. E., Douglas, C. W., Gwynn, J. P., & Scannapieco, F. A. (1998). Identification and analysis of a gene (*abpA*) encoding a major amylase-binding protein in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology (Reading, England)*, 144 (Pt 5, 1223–33. doi:10.1099/00221287-144-5-1223
- Ross, K. F., Ronson, C. W., & Tagg, J. R. (1993). Isolation and characterization of the lantibiotic salivaricin A and its structural gene *salA* from *Streptococcus salivarius* 20P3. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(7), 2014–21. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=182229&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Rousset, M. (1986). The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie*, 68(9), 1035–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3096381>
- Rusch, S. L., & Kendall, D. A. (2007). Interactions that drive Sec-dependent bacterial protein transport. *Biochemistry*, 46(34), 9665–73. doi:10.1021/bi7010064
- Russell, M. W., & Mansson-Rahemtulla, B. (1989). Interaction between surface protein antigens of *Streptococcus mutans* and human salivary components. *Oral Microbiology and Immunology*, 4(2), 106–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2762013>
- Sampath, J., & Vijayakumar, M. N. (1998). Identification of a DNA cytosine methyltransferase gene in conjugative transposon Tn5252. *Plasmid*, 39(1), 63–76. doi:10.1006/plas.1997.1316
- Santagati, M., Iannelli, F., Oggioni, M. R., Stefani, S., & Pozzi, G. (2000). Characterization of a genetic element carrying the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2585–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=90116&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Santagati, M., Lupo, A., Scillato, M., Di Martino, A., & Stefani, S. (2009). Conjugal mobilization of the mega element carrying *mef(E)* from *Streptococcus salivarius* to *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiology Letters*, 290(1), 79–84. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01408.x
- Santoro, F., Vianna, M. E., & Roberts, A. P. (2014). Variation on a theme; an overview of the Tn916/Tn1545 family of mobile genetic elements in the oral and nasopharyngeal streptococci. *Frontiers in Microbiology*, 5, 535. doi:10.3389/fmicb.2014.00535
- Sasaki, Y., Taketomo, N., & Sasaki, T. (1988). Factors affecting transfer frequency of pAM beta 1 from *Streptococcus faecalis* to *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Bacteriology*, 170(12), 5939–42. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=211709&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sato, Y., Yamamoto, Y., & Kizaki, H. (1997). Cloning and sequence analysis of the *gbcC* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 65(2), 668–75. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=176112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

ype=abstract

- Sauer, K. (2003). The genomics and proteomics of biofilm formation.
- Schaberg, D. R., Clewell, D. B., & Glatzer, L. (1982). Conjugative transfer of R-plasmids from *Streptococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22(2), 204–7. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=183711&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schenkels, L. C., Ligtenberg, A. J., Veerman, E. C., & Van Nieuw Amerongen, A. (1993). Interaction of the salivary glycoprotein EP-GP with the bacterium *Streptococcus salivarius* HB. *Journal of Dental Research*, 72(12), 1559–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8254122>
- Schneewind, O., & Missiakas, D. M. (2012). Protein secretion and surface display in Gram-positive bacteria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 367(1592), 1123–39. doi:10.1098/rstb.2011.0210
- 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. *Molecular Microbiology*, 51(3), 837–48. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14731283>
- Schwarz, S., Kehrenberg, C., Doublet, B., & Cloeckert, A. (2004). Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews*, 28(5), 519–42. doi:10.1016/j.femsre.2004.04.001
- Seepersaud, R., Bensing, B. A., Yen, Y. T., & Sullam, P. M. (2010). Asp3 mediates multiple protein-protein interactions within the accessory Sec system of *Streptococcus gordonii*. *Molecular Microbiology*, 78(2), 490–505. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07346.x
- Sentchilo, V., Czechowska, K., Pradervand, N., Minoia, M., Miyazaki, R., & van der Meer, J. R. (2009). Intracellular excision and reintegration dynamics of the ICE_{clc} genomic island of *Pseudomonas knackmussii* sp. strain B13. *Molecular Microbiology*, 72(5), 1293–306. doi:10.1111/j.1365-2958.2009.06726.x
- Serfiotis-Mitsa, D., Roberts, G. A., Cooper, L. P., White, J. H., Nutley, M., Cooper, A., Dryden, D. T. F. (2008). The Orf18 gene product from conjugative transposon Tn916 is an ArdA antirestriction protein that inhibits type I DNA restriction-modification systems. *Journal of Molecular Biology*, 383(5), 970–81. doi:10.1016/j.jmb.2008.06.005
- Shirokawa, T., Nakajima, J., Hirose, K., Suzuki, H., Nagaoka, S., & Suzuki, and M. (2014). Spontaneous Meningitis Due to *Streptococcus salivarius* Subsp. *salivarius* : Cross-reaction in an Assay with a Rapid Diagnostic Kit that Detected *Streptococcus pneumoniae* Antigens. *Internal Medicine*, 53: 279-28. Retrieved from https://www.jstage.jst.go.jp/article/internalmedicine/53/3/53_53.0803/_pdf
- Sliepen, I., Van Damme, J., Van Essche, M., Loozen, G., Quirynen, M., & Teughels, W. (2009). Microbial interactions influence inflammatory host cell responses. *Journal of Dental Research*, 88(11), 1026–30. doi:10.1177/0022034509347296
- Sliepen, I., Van Essche, M., Loozen, G., Van Eldere, J., Quirynen, M., & Teughels, W. (2009). Interference with *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: colonization of epithelial cells under hydrodynamic conditions. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(5), 390–5. doi:10.1111/j.1399-302X.2009.00531.x

- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P. C., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 74(3), 434–52. doi:10.1128/MMBR.00020-10
- Smith, M. D., & Guild, W. R. (1980). Improved method for conjugative transfer by filter mating of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 144(1), 457–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=294685&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Stadler, C., & Teuber, M. (2002). The macrolide efflux genetic assembly of *Streptococcus pneumoniae* is present in erythromycin-resistant *Streptococcus salivarius*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(11), 3690–1. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=128751&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Stentz, R., Gasson, M., & Shearman, C. (2006). The Tra domain of the lactococcal CluA surface protein is a unique domain that contributes to sex factor DNA transfer. *Journal of Bacteriology*, 188(6), 2106–2114. doi:10.1128/JB.188.6.2106-2114.2006
- Suljak, J. P., Reid, G., Wood, S. M., McConnell, R. J., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (1995). Bacterial adhesion to dental amalgam and three resin composites. *Journal of Dentistry*, 23(3), 171–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7782529>
- Suntharalingam, P., & Cvitkovitch, D. G. (2005). Quorum sensing in streptococcal biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 13(1), 3–6. doi:10.1016/j.tim.2004.11.009
- Sutcliffe, J., Tait-Kamradt, A., & Wondrack, L. (1996). *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* resistant to macrolides but sensitive to clindamycin: a common resistance pattern mediated by an efflux system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(8), 1817–24. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=163423&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tagg, J. R., & Dierksen, K. P. (2003). Bacterial replacement therapy: adapting “germ warfare” to infection prevention. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 217–23. doi:10.1016/S0167-7799(03)00085-4
- Tamura, H., Yamada, A., & Kato, H. (2008). Identification and characterization of an antigen I/II homologous gene, pah, from *Streptococcus downei*. *Current Microbiology*, 56(5), 518–23. doi:10.1007/s00284-008-9117-9
- Tang, F., & Lu, C. (2015). [Lytic phages and prophages of *Streptococcus suis*--a review]. *Wei Sheng Wu Xue Bao = Acta Microbiologica Sinica*, 55(4), 389–94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26211312>
- Tendolkar, P. M., Baghdayan, A. S., & Shankar, N. (2006). Putative surface proteins encoded within a novel transferable locus confer a high-biofilm phenotype to *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 188(6), 2063–72. doi:10.1128/JB.188.6.2063-2072.2006
- Terzaghi, B. E., & Sandine, W. E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29(6), 807–13. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=187084&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Tettelin, H., Massignani, V., Cieslewicz, M. J., Eisen, J. a, Peterson, S., Wessels, M. R., Fraser, C. M. (2002). Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human

- pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(19), 12391–6. doi:10.1073/pnas.182380799
- Thompson, J. K., & Collins, M. A. (1988). Evidence for the conjugal transfer of the broad host range plasmid pIP501 into strains of *Lactobacillus helveticus*. *The Journal of Applied Bacteriology*, 65(4), 309–19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3146566>
- Toussaint, A., & Merlin, C. (2002). Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid*, 47(1), 26–35. doi:10.1006/plas.2001.1552
- Tsukazaki, T., Mori, H., Echizen, Y., Ishitani, R., Fukai, S., Tanaka, T., Nureki, O. (2011). Structure and function of a membrane component SecDF that enhances protein export. *Nature*, 474(7350), 235–8. doi:10.1038/nature09980
- Vacca-Smith, A. M., Jones, C. A., Levine, M. J., & Stinson, M. W. (1994). Glucosyltransferase mediates adhesion of *Streptococcus gordonii* to human endothelial cells in vitro. *Infection and Immunity*, 62(6), 2187–94. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=186496&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Van den Bogert, B., Boekhorst, J., Herrmann, R., Smid, E. J., Zoetendal, E. G., & Kleerebezem, M. (2013). Comparative genomics analysis of *Streptococcus* isolates from the human small intestine reveals their adaptation to a highly dynamic ecosystem. *PLoS One*, 8(12), e83418. doi:10.1371/journal.pone.0083418
- Van Hoogmoed, C. G., Geertsema-Doornbusch, G. I., Teughels, W., Quirynen, M., Busscher, H. J., & Van der Mei, H. C. (2008). Reduction of periodontal pathogens adhesion by antagonistic strains. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(1), 43–8. doi:10.1111/j.1399-302X.2007.00388.x
- Van Tassel, M. L., & Miller, M. J. (2011). *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients*, 3(5), 613–36. doi:10.3390/nu3050613
- Verani, J. R., McGee, L., & Schrag, S. J. (2010). Prevention of perinatal group B streptococcal disease--revised guidelines from CDC, 2010. *MMWR. Recommendations and Reports : Morbidity and Mortality Weekly Report. Recommendations and Reports / Centers for Disease Control*, 59(RR-10), 1–36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21088663>
- Vidal, J. E., Ludewick, H. P., Kunkel, R. M., Zähler, D., & Klugman, K. P. (2011). The LuxS-dependent quorum-sensing system regulates early biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strain D39. *Infection and Immunity*, 79(10), 4050–4060. doi:10.1128/IAI.05186-11
- von Ossowski, I., Satokari, R., Reunanen, J., Lebeer, S., De Keersmaecker, S. C. J., Vanderleyden, J., Palva, A. (2011). Functional characterization of a mucus-specific LPXTG surface adhesin from probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(13), 4465–72. doi:10.1128/AEM.02497-10
- Wan, F., & Lenardo, M. J. (2010). The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Research*, 20(1), 24–33. doi:10.1038/cr.2009.137
- Wang, H., Smith, M. C. M., & Mullany, P. (2006). The conjugative transposon Tn5397 has a strong preference for integration into its *Clostridium difficile* target site. *Journal of Bacteriology*, 188(13), 4871–8. doi:10.1128/JB.00210-06
- Wang, M., Ahrne, S., Jeppsson, B., & Molin, G. (2005). Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes. Retrieved May 1, 2015, from <http://femsec.oxfordjournals.org/content/femsec/54/2/219.full.pdf>

- Waters, C. M., & Dunny, G. M. (2001). Analysis of functional domains of the *Enterococcus faecalis* pheromone-induced surface protein aggregation substance. *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5659–67. doi:10.1128/JB.183.19.5659-5667.2001
- Waters, C. M., Hirt, H., McCormick, J. K., Schlievert, P. M., Wells, C. L., & Dunny, G. M. (2004). An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. *Molecular Microbiology*, 52(4), 1159–71. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04045.x
- Waters, C. M., Wells, C. L., & Dunny, G. M. (2003). The aggregation domain of aggregation substance, not the RGD motifs, is critical for efficient internalization by HT-29 enterocytes. *Infection and Immunity*, 71(10), 5682–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=201072&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Weerkamp, A. H., van der Mei, H. C., & Slot, J. W. (1987). Relationship of cell surface morphology and composition of *Streptococcus salivarius* K+ to adherence and hydrophobicity. *Infection and Immunity*, 55(2), 438–45. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=260347&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Wescombe, P. A., Burton, J. P., Cadieux, P. A., Klesse, N. A., Hyink, O., Heng, N. C. K., Tagg, J. R. (2006). Megaplasmids encode differing combinations of lantibiotics in *Streptococcus salivarius*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 90(3), 269–280. doi:10.1007/s10482-006-9081-y
- Wescombe, P. A., Upton, M., Dierksen, K. P., Ragland, N. L., Sivabalan, S., Wirawan, R. E., Tagg, J. R. (2006). Production of the lantibiotic salivaricin A and its variants by oral streptococci and use of a specific induction assay to detect their presence in human saliva. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(2), 1459–66. doi:10.1128/AEM.72.2.1459-1466.2006
- Wescombe, P. A., Upton, M., Renault, P., Wirawan, R. E., Power, D., Burton, J. P., Tagg, J. R. (2011). Salivaricin 9, a new lantibiotic produced by *Streptococcus salivarius*. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 5), 1290–9. doi:10.1099/mic.0.044719-0
- Wilson, M., Martin, R., Walk, S. T., Young, C., Grossman, S., McKean, E. L., & Aronoff, D. M. (2012). Clinical and laboratory features of *Streptococcus salivarius* meningitis: a case report and literature review. *Clinical Medicine & Research*, 10(1), 15–25. doi:10.3121/cmr.2011.1001
- Wozniak, R. a F., Fouts, D. E., Spagnoletti, M., Colombo, M. M., Ceccarelli, D., Garriss, G., Waldor, M. K. (2009). Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genetics*, 5(12), e1000786. doi:10.1371/journal.pgen.1000786
- Wozniak, R. a F., & Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(8), 552–63. doi:10.1038/nrmicro2382
- Xu, P., Alves, J. M., Kitten, T., Brown, A., Chen, Z., Ozaki, L. S., Buck, G. A. (2007). Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *Journal of Bacteriology*, 189(8), 3166–75. doi:10.1128/JB.01808-06
- Yen, Y. T., Seepersaud, R., Bensing, B. A., & Sullam, P. M. (2011). Asp2 and Asp3 interact directly with GspB, the export substrate of the *Streptococcus gordonii* accessory Sec System. *Journal of Bacteriology*, 193(13), 3165–74. doi:10.1128/JB.00057-11
- Yu, J., Sun, Z., Liu, W., Xi, X., Song, Y., Xu, H., Sun, T. (2015). Multilocus sequence typing of *Streptococcus thermophilus* from naturally fermented dairy foods in China and Mongolia. *BMC*

Microbiology, 15, 236. doi:10.1186/s12866-015-0551-0

- Yu, W., & Götz, F. (2012). Cell wall antibiotics provoke accumulation of anchored mCherry in the cross wall of *Staphylococcus aureus*. *PloS One*, 7(1), e30076. doi:10.1371/journal.pone.0030076
- Zhou, L., Ma, X., Gao, W., Yao, K.-H., Shen, A.-D., Yu, S.-J., & Yang, Y.-H. (2012). Molecular characteristics of erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* from pediatric patients younger than five years in Beijing, 2010. *BMC Microbiology*, 12, 228. doi:10.1186/1471-2180-12-228
- Zückert, W. R. (2014). Secretion of bacterial lipoproteins: through the cytoplasmic membrane, the periplasm and beyond. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1843(8), 1509–16. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.04.022
- Zúñiga, M., Pardo, I., & Ferrer, S. (2003). Conjugative plasmid pIP501 undergoes specific deletions after transfer from *Lactococcus lactis* to *Oenococcus oeni*. *Archives of Microbiology*, 180(5), 367–73. doi:10.1007/s00203-003-0599-3

Annexes

Supplemental Table S1 de l'article

Table S1. Source, MLST data, antimicrobial susceptibility, antibiotic resistance gene and genetic element contents of the clinical and commensal isolates of *S. salivarius* studied (n=138).

NA: not available; ND: not determined. Ery, erythromycin; Spi, spiramycin; Lin, lincomycin; Tet, tetracycline; Chl, chloramphenicol; Kan, kanamycin. S, susceptibility; R, resistance; Ri inducible resistance (iMLS_B).

- ^a MLST allele previously identified by Delorme *et al.* (37).
- ^b The presence of the *ermA* gene was also investigated but no signal was detected.
- ^c The presence of the *tetO* gene was also investigated but no signal was detected.
- ^d The presence of MEGA was examined only in *mef(A/E)* positive strains.
- ^e A linkage between *mef(A/E)* and *catQ* genes was examined only in *catQ* positive strains.
- ^f A linkage between *tet(M)* and *erm(B)* genes (Tn3872-like element) was examined only in *erm(B)-rel* Tn916 positive strains.
- ^g A linkage between *erm(B)* gene and relaxase gene of Tn916 (Tn6002-like element) was examined in all *erm(B)* positive strains.
- ^h A linkage between *tet(M)* and *mef(A/E)* genes (Tn2009-like element) was examined only in *mef(A/E)-rel* Tn916 positive strains.
- ⁱ Number of commensal isolates with this ST (including this isolate).

Isolate	B16	B20	B35	B50	B57	B63	B74	B97
Source	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical
Sampling site	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture
Origin	Besaçon Hospital	Besaçon Hospital	Besaçon Hospital	Besaçon Hospital	Besaçon Hospital	Besaçon Hospital	Besaçon Hospital	Besaçon Hospital
Year	2010	2009	2010	2009	2009	2011	2010	2010
ST	94	92	54	69	72	41	84	77
Number ¹								
<i>ilvC</i>	28	28	21	26	27	16 ^a	28	27
<i>sodA</i>	21	21	12 ^a	29	21	32	21	21
<i>ddlA</i>	59	58	54	47	24 ^a	40	3 ^a	39
<i>thrS</i>	25	25	42	28	36	47	14 ^a	36
<i>dnaE</i>	38	52	51	43	20 ^a	46	45	20 ^a
<i>pyrE</i>	34	34	2 ^a	26	11 ^a	28	12 ^a	27
Ery	R	R	R	R	S	S	S	S
Spi	S	R	S	S	S	S	S	S
Lin	S	R	S	S	S	S	S	S
Tet	S	R	S	S	S	S	S	S
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	+	0	0	0	0	0	0
<i>mef(A/E)</i>	+	0	+	+	0	0	0	0
<i>tet(M)</i> ^c	0	+	0	0	0	0	0	0
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{t3}</i>	0	0	0	+	+	0	+	0
<i>rel ICES_{t3}</i>	0	+	+	+	+	0	+	0
<i>CP ICES_{t3}</i>	0	+	+	+	+	0	+	0
excision ICE <i>St3</i>	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND
MEGA ^d	+	ND	+	+	ND	ND	ND	ND
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	0	+	0	0	0	0	0	0
excision Tn916	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn3872-like ^f	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn3872	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn6002-like ^g	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn2009-like ^h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	F1-1	F1-100	F1-14	F1-2	F1-25	F1-37	F1-4	F1-8
Source	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal
Sampling site	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces
Origin	Individual 1	Individual 1	Individual 1	Individual 1	Individual 1	Individual 1	Individual 1	Individual 1
Year	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011
ST	28	29	118	28	119	85	118	119
Number ⁱ	4	2	3	4	2	1	3	2
<i>ilvC</i>	12 ^a	12 ^a	31	12 ^a	31	28	31	31
<i>sodA</i>	27	27	22	27	23	21	22	23
<i>ddlA</i>	35	35	31	35	57	3 ^a	31	57
<i>thrS</i>	22	27	21	22	21	24	21	21
<i>dnaE</i>	15 ^a	15 ^a	37	15 ^a	48	20 ^a	37	48
<i>pyrE</i>	31	31	16 ^a	31	46	11 ^a	16 ^a	46
Ery	R	R	R	R	R	R	R	R
Spi	S	S	S	S	S	R	S	S
Lin	S	S	S	S	S	R	S	S
Tet	S	S	S	S	S	S	S	S
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	0	0	0	+	0	0
<i>mef(A/E)</i>	+	+	+	+	+	0	+	+
<i>tet(M)</i> ^c	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICESt3</i>	0	0	+	0	0	0	+	0
<i>rel ICESt3</i>	0	0	+	0	+	0	+	+
<i>CP ICESt3</i>	0	0	+	0	+	0	+	+
excision ICE St3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
MEGA ^d	+	+	+	+	+	ND	+	+
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	+	0	0	+	0	+	0	0
excision Tn916	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn3872-like ^f	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND
excision Tn3872	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn6002-like ^g	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND
Tn2009-like ^h	0	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	F1-99	F3-10	F3-2	F3-3	F3-7	F3-8	F4-1	F4-11
Source	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal
Sampling site	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces
Origin	Individual 1	Individual 3	Individual 3	Individual 3	Individual 3	Individual 3	Individual 4	Individual 4
Year	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011
ST	29	47	94	94	32	32	27	105
Number ⁱ	2	5	3	3	4	4	1	2
<i>ilvC</i>	12 ^a	17 ^a	28	28	14 ^a	14 ^a	12 ^a	29
<i>sodA</i>	27	30	21	21	11 ^a	11 ^a	27	25
<i>ddlA</i>	35	37	59	59	32	32	34	36
<i>thrS</i>	27	1 ^a	25	25	21	21	27	21
<i>dnaE</i>	15 ^a	58	38	38	24 ^a	24 ^a	15 ^a	37
<i>pyrE</i>	31	26	34	34	30	30	31	51
Ery	R	R	S	S	R	R	R	R
Spi	S	S	S	S	S	S	S	S
Lin	S	S	S	S	S	S	S	S
Tet	S	S	S	S	S	S	S	S
Chl	S	R	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>mef(A/E)</i>	+	+	0	0	+	+	+	+
<i>tet(M)</i> ^c	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>catQ</i>	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICESt3</i>	0	0	0	0	+	+	+	0
<i>rel ICESt3</i>	0	+	0	0	+	+	0	+
<i>CP ICESt3</i>	0	+	0	0	+	+	0	+
excision ICE St3	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MEGA ^d	+	0	ND	ND	+	+	+	+
IQ element ^e	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
excision Tn916	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn3872-like ^f	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn3872	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn6002-like ^g	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn2009-like ^h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	F4-14	F4-2	F4-20	F4-3	F6-1	F6-2	F7-1	F7-11	F7-2	F7-7
Source	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal
Sampling site	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces	Feces
Origin	Individual 4	Individual 4	Individual 4	Individual 4	Individual 6	Individual 6	Individual 7	Individual 7	Individual 7	Individual 7
Year	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011
ST	105	114	115	114	57	57	83	83	102	102
Number ¹	2	8	1	8	12	12	10	10	2	2
<i>ilvC</i>	29	30	30	30	22	22	28	28	29	29
<i>sodA</i>	25	30	30	30	30	30	21	21	12 ^a	12 ^a
<i>ddlA</i>	36	2 ^a	7 ^a	2 ^a	33	33	3 ^a	3 ^a	2 ^a	2 ^a
<i>thrS</i>	21	26	45	26	23	23	14 ^a	14 ^a	27	27
<i>dnaE</i>	37	14 ^a	12 ^a	14 ^a	15 ^a	15 ^a	24 ^a	24 ^a	41	41
<i>pyrE</i>	51	30	44	30	39	39	12 ^a	12 ^a	16 ^a	16 ^a
Ery	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R
Spi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lin	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S
Tet	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R
Chl	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>mef(A/E)</i>	+	+	+	+	0	0	0	0	+	+
<i>tet(M)</i> ^c	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+
<i>catQ</i>	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	+	0	+	0	0	0	0	0	0
<i>rel ICES_{St3}</i>	+	+	0	+	+	+	0	0	0	0
<i>CP ICES_{St3}</i>	+	+	0	+	+	+	0	0	0	0
excision ICE <i>St3</i>	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MEGA ^d	+	+	0	+	ND	ND	ND	ND	+	+
IQ element ^e	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	0	+	0	+	0	0	0	0	+	+
excision Tn916	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn3872-like ^f	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn3872	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn6002-like ^g	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn2009-like ^h	ND	0	ND	0	ND	ND	ND	ND	+	+
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0

Isolate	L1	L10	L11	L12	L13	L15	L16	L17
Source	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical
Sampling site	Lung biopsy	Joint fluid	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Ascitic fluid
Origin	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital
Year	2002	2003	2003	2004	2004	2004	2004	2004
ST	97	72	49	98	106	112	35	71
Number ¹								
<i>ilvC</i>	28	27	19	28	29	30	14 ^a	27
<i>sodA</i>	32	21	33	32	25	24	29	21
<i>ddlA</i>	38	24 ^a	2 ^a	42	61	7 ^a	44	3 ^a
<i>thrS</i>	47	36	29	39	16 ^a	34	2 ^a	36
<i>dnaE</i>	44	20 ^a	39	41	35	32	55	20 ^a
<i>pyrE</i>	11 ^a	11 ^a	16 ^a	12 ^a	51	16 ^a	16 ^a	12 ^a
Ery	S	S	R	S	S	R	R	S
Spi	S	S	R	S	S	S	S	S
Lin	S	S	R	S	S	R	S	S
Tet	S	S	R	S	S	S	S	S
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	+	0	0	0	0	0
<i>mef(A/E)</i>	0	0	0	0	0	+	+	0
<i>tet(M)</i> ^c	0	0	+	0	0	0	0	0
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	+	+	0	0	+	0	0
<i>rel ICES_{St3}</i>	0	+	+	0	0	+	0	0
<i>CP ICES_{St3}</i>	0	+	+	0	0	+	0	0
excision ICE <i>St3</i>	ND	+	+	ND	ND	+	ND	ND
MEGA ^d	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	ND
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	+	0	0	+	+	0	+	0
excision <i>Tn916</i>	0	ND	ND	0	0	ND	0	ND
<i>Tn3872</i> -like ^f	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision <i>Tn3872</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Tn6002</i> -like ^g	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND
excision <i>Tn6002</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Tn2009</i> -like ^h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND
excision <i>Tn2009</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	L18	L19	L20	L21	L22	L23	L24	L25
Source	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical
Sampling site	Kidney preserving liquid	Blood culture	Blood culture	Bone	Blood culture	Blood culture	Aortic valve	Blood culture
Origin	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital
Year	2004	2004	2004	2004	2004	2004	2004	2005
ST	75	78	116	43	68	78	55	68
Number ¹								
<i>ilvC</i>	27	27	30	17 ^a	26	27	21	26
<i>sodA</i>	21	21	30	24	29	21	13 ^a	29
<i>ddlA</i>	39	41	7 ^a	46	37	41	53	37
<i>thrS</i>	36	24	45	21	28	24	26	28
<i>dnaE</i>	45	33	14 ^a	53	43	33	57	43
<i>pyrE</i>	11 ^a	32	44	43	26	32	16 ^a	26
Ery	S	S	R	R	R	S	S	R
Spi	S	S	S	S	R	S	S	R
Lin	S	S	R	S	R	S	S	R
Tet	S	S	R	R	S	S	S	S
Chl	S	S	R	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	0	0	+	0	0	+
<i>mef(A/E)</i>	0	0	+	+	0	0	0	0
<i>tet(M)</i> ^c	0	0	+	+	0	0	0	+
<i>catQ</i>	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	+	0	0	+	+	0	+
<i>rel ICES_{St3}</i>	+	+	0	0	+	+	0	+
<i>CP ICES_{St3}</i>	+	0	0	0	+	0	0	+
excision ICE <i>St3</i>	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	+
MEGA ^d	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND
IQ element ^e	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	0	0	+	+	+	0	0	+
excision Tn916	ND	ND	0	0	ND	ND	ND	ND
Tn3872-like ^f	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND	+
excision Tn3872	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
Tn6002-like ^g	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	0
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND
Tn2009-like ^h	ND	ND	0	0	ND	ND	ND	ND
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	L26	L27	L28	L29	L30	L31	L32	L33
Source	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical
Sampling site	Ascitic fluid	Blood culture	Aortic valve	Blood culture	Aortic valve	Peritoneal dialysis fluid	Aortic valve	Bone
Origin	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital
Year	2005	2005	2005	2005	2005	2005	2005	2005
ST	48	42	36	96	117	58	37	36
Number ¹								
<i>ilvC</i>	18	17 ^a	14 ^a	28	31	22	14 ^a	14 ^a
<i>sodA</i>	3 ^a	3 ^a	29	31	12 ^a	30	29	29
<i>ddlA</i>	62	45	50	39	2 ^a	43	50	50
<i>thrS</i>	30	21	21	14 ^a	27	23	21	21
<i>dnaE</i>	26	29	31	54	17 ^a	15 ^a	31	31
<i>pyrE</i>	52	42	26	12 ^a	16 ^a	39	39	26
Ery	S	R	R	R	R	R	R	R
Spi	S	S	R	R	S	R	R	R
Lin	S	S	S	S	S	R ¹	S	S
Tet	R	R	R	R	S	S	R	R
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	+	+	0	+	+	+
<i>mef(A/E)</i>	0	+	0	+	+	0	0	0
<i>tet(M)</i> ^c	+	+	+	0	0	+	+	+
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	+	0	0	0	0	0	0
<i>rel ICES_{St3}</i>	0	+	0	0	0	0	0	0
<i>CP ICES_{St3}</i>	0	0	0	0	0	0	0	0
excision ICE <i>St3</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MEGA ^d	ND	+	ND	+	+	ND	ND	ND
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	+	0	+	+	0	+	+	0
excision Tn916	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn3872-like ^f	ND	ND	0	0	ND	+	0	ND
excision Tn3872	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND
Tn6002-like ^g	ND	ND	+	+	ND	0	+	+
excision Tn6002	ND	ND	0	0	ND	ND	0	0
Tn2009-like ^h	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	L34	L35	L37	L38	L39	L4	L40	L41
Source	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical
Sampling site	Pleural fluid	Blood culture	Peritoneal dialysis fluid	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture
Origin	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital
Year	2005	2007	2006	2006	2006	2003	2006	2006
ST	40	60	120	94	78	76	79	94
Number ¹								
<i>ilvC</i>	14 ^a	22	31	28	27	27	27	28
<i>sodA</i>	34	30	26	21	21	21	21	21
<i>ddlA</i>	23 ^a	63	2 ^a	59	41	39	41	59
<i>thrS</i>	31	37	27	25	24	36	36	25
<i>dnaE</i>	32	15 ^a	41	38	33	21 ^a	33	38
<i>pyrE</i>	30	32	16 ^a	34	32	12 ^a	30	34
Ery	R	R	S	S	R	S	R	S
Spi	R	S	S	S	R	S	R	S
Lin	R	S	S	S	R	S	R	S
Tet	R	R	S	R	S	S	S	S
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	+	0	0	0	+	0	+	0
<i>mef(A/E)</i>	0	+	0	0	0	0	0	0
<i>tet(M)</i> ^c	+	+	0	+	0	0	0	0
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	0	0	+	+	0	0	0
<i>rel ICES_{St3}</i>	0	0	+	+	+	0	0	0
<i>CP ICES_{St3}</i>	0	0	+	+	0	0	0	0
excision ICE <i>St3</i>	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND
MEGA ^d	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	+	+	0	+	+	+	+	0
excision Tn916	ND	0	ND	0	ND	0	ND	ND
Tn3872-like ^f	+	ND	ND	ND	0	ND	0	ND
excision Tn3872	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn6002-like ^g	0	ND	ND	ND	+	ND	+	ND
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	0	ND	0	ND
Tn2009-like ^h	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	L42	L43	L44	L45	L46	L47	L49	L5
Source	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical
Sampling site	Bone	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Drain excess liquid
Origin	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital
Year	2006	2007	2007	2007	2007	2007	2008	2003
ST	40	63	121	56	104	99	34	78
Number ¹								
<i>ilvC</i>	14 ^a	23	32	21	29	29	14 ^a	27
<i>sodA</i>	34	30	30	28	25	4 ^a	23	21
<i>ddlA</i>	23 ^a	7 ^a	64	54	25 ^a	66	54	41
<i>thrS</i>	31	38	32	2 ^a	40	45	26	24
<i>dnaE</i>	32	17 ^a	28	30	36	34	18 ^a	33
<i>pyrE</i>	30	15 ^a	15 ^a	30	51	48	34	32
Ery	S	R	R	S	S	R	S	S
Spi	S	R	R	S	S	S	S	S
Lin	S	S	S	S	S	S	S	S
Tet	S	R	R	S	S	S	S	S
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	+	+	0	0	0	0	0
<i>mef(A/E)</i>	0	0	0	0	0	+	0	0
<i>tet(M)</i> ^c	0	+	+	0	0	0	0	0
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>rel ICES_{St3}</i>	0	0	0	+	+	0	0	+
<i>CP ICES_{St3}</i>	0	0	0	+	+	0	0	+
excision ICE <i>St3</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
MEGA ^d	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	0	+	+	0	0	0	0	0
excision Tn916	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn3872-like ^f	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn3872	ND	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
Tn6002-like ^g	ND	0	0	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn2009-like ^h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	L50	L51	L52	L53	L55	L56	L57	L58
Source	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical
Sampling site	Blood culture	Blood culture	Ascitic fluid	Blood culture	Joint fluid	Blood culture	Blood culture	Blood culture
Origin	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital
Year	2009	2009	2009	2009	2010	2010	2010	2010
ST	93	65	31	94	38	103	100	50
Number ¹								
<i>ilvC</i>	28	24	14 ^a	28	14 ^a	29	29	20
<i>sodA</i>	21	36	8 ^a	21	30	24	8 ^a	23
<i>ddlA</i>	59	48	65	59	67	52	68	49
<i>thrS</i>	25	2 ^a	35	25	29	33	49	45
<i>dnaE</i>	38	17 ^a	42	38	39	39	18 ^a	24 ^a
<i>pyrE</i>	33	40	36	34	35	47	45	3 ^a
Ery	R	S	R	R	S	R	R	S
Spi	S	S	S	S	S	S	R	S
Lin	S	S	S	S	S	S	S	S
Tet	S	S	S	S	S	S	S	S
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	0	0	0	0	+	0
<i>mef(A/E)</i>	+	0	+	+	0	+	+	0
<i>tet(M)</i> ^c	0	0	0	0	0	0	+	0
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	0	0	+	0	0	0	0
<i>rel ICES_{St3}</i>	+	0	+	+	+	0	0	0
<i>CP ICES_{St3}</i>	+	0	+	+	+	0	0	0
excision ICE <i>St3</i>	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND
MEGA ^d	+	ND	+	+	ND	+	+	ND
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	0	0	0	0	0	0	+	0
excision Tn916	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn3872-like ^f	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND
excision Tn3872	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn6002-like ^g	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn2009-like ^h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	L59	L60	L61	L62	L63	L64	L65	L67
Source	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical
Sampling site	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Kidney preserving liquid	Blood culture	Pleural fluid	Pleural fluid	Peritoneal dialysis fluid
Origin	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital
Year	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2010	2011
ST	86	52	78	64	45	70	46	107
Number ¹								
<i>ilvC</i>	28	21	27	23	17 ^a	26	17 ^a	29
<i>sodA</i>	21	12 ^a	21	30	29	30	29	35
<i>ddlA</i>	3 ^a	54	41	53	51	37	51	69
<i>thrS</i>	36	2 ^a	24	38	33	28	41	32
<i>dnaE</i>	25	30	33	17 ^a	48	43	40	56
<i>pyrE</i>	33	37	32	15 ^a	38	26	38	49
Ery	S	S	R	R	R	R	R	R
Spi	S	S	S	S	R	S	R	S
Lin	S	S	S	S	S	S	R	S
Tet	S	S	S	S	R	S	R	S
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	0	0	+	0	+	0
<i>mef(A/E)</i>	0	0	+	+	0	+	0	+
<i>tet(M)</i> ^c	0	0	0	0	+	0	+	0
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	0	+	0	+	+	+	0
<i>rel ICES_{St3}</i>	0	+	+	+	+	+	+	0
<i>CP ICES_{St3}</i>	0	+	0	+	0	+	0	0
excision ICE <i>St3</i>	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND
MEGA ^d	ND	ND	+	+	ND	+	ND	+
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	+	0	+	0	0	0	+	+
excision Tn916	0	ND	0	ND	ND	ND	ND	0
Tn3872-like ^f	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
excision Tn3872	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND
Tn6002-like ^g	ND	ND	ND	ND	0	ND	0	ND
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn2009-like ^h	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND	0
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	L69	L70	L8	L9	N10	N11	N12	N13
Source	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical
Sampling site	Pleural fluid	NA	Pleural fluid	Blood culture	Drain excess liquid	Mandible osteitis	Dental cellulite	Otolaryngology
Origin	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Limoges Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital
Year	2011	2011	2003	2003	2011	2010	2010	2010
ST	73	110	67	62	90	111	108	122
Number ¹								
<i>ilvC</i>	27	29	25	23	28	30	29	33
<i>sodA</i>	21	38	24	30	21	12 ^a	37	3 ^a
<i>ddlA</i>	38	70	60	7 ^a	56	2 ^a	57	29 ^a
<i>thrS</i>	36	36	21	26	43	1 ^a	44	20 ^a
<i>dnaE</i>	44	13 ^a	27	17 ^a	20 ^a	37	34	47
<i>pyrE</i>	27	46	50	15 ^a	33	46	18 ^a	30
Ery	S	R	S	S	R	R	R	R
Spi	S	S	S	S	R	S	S	S
Lin	S	S	S	S	S	S	S	S
Tet	S	S	S	S	R	S	R	S
Chl	S	S	S	S	S	R	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	0	0	+	0	0	0
<i>mef(A/E)</i>	0	+	0	0	0	+	+	+
<i>tet(M)</i> ^c	0	0	0	0	+	0	+	0
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	0	0	0	0	0	+	0
<i>rel ICES_{St3}</i>	0	0	0	0	0	0	+	0
<i>CP ICES_{St3}</i>	0	0	0	0	0	0	+	0
excision ICE <i>St3</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MEGA ^d	ND	+	ND	ND	ND	+	+	+
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	0	0	0	0	+	0	+	+
excision <i>Tn916</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0
<i>Tn3872</i> -like ^f	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
excision <i>Tn3872</i>	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND
<i>Tn6002</i> -like ^g	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND
excision <i>Tn6002</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Tn2009</i> -like ^h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	0
excision <i>Tn2009</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND

Isolate	N14	N15	N16	N17	N18	N2	N20	N22	N23
Source	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical
Sampling site	Tonsils	Blood culture	Dialysis fluid	Cerebrospinal fluid	Blood culture	Drain lymphadenopathy	Ascitic fluid	Dialysis fluid	Dental pus
Origin	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital
Year	2011	2010	2010	2011	2011	2011	2010	2010	2010
ST	39	81	74	109	89	83	51	91	82
Number ¹									
<i>ilvC</i>	14 ^a	27	27	29	28	28	21	28	28
<i>sodA</i>	34	21	21	37	21	21	5 ^a	21	21
<i>ddlA</i>	23 ^a	73	38	74	56	3 ^a	48	58	3 ^a
<i>thrS</i>	31	36	36	44	36	14 ^a	48	25	14 ^a
<i>dnaE</i>	32	21 ^a	44	34	38	24 ^a	17 ^a	38	17 ^a
<i>pyrE</i>	27	12 ^a	46	34	34	12 ^a	15 ^a	11 ^a	12 ^a
Ery	R	S	R	R	S	R	R	S	R
Spi	R	S	S	S	S	R	R	S	R
Lin	R	S	S	S	S	S	R	S	R
Tet	R	S	S	R	S	R	R	S	R
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	+	0	0	0	0	+	+	0	+
<i>mef(A/E)</i>	0	0	+	+	0	0	0	0	0
<i>tet(M)</i> ^c	+	0	0	+	0	+	+	0	+
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	0	0	0	0	0	0	+	0
<i>rel ICES_{St3}</i>	0	0	0	0	+	0	+	+	0
<i>CP ICES_{St3}</i>	0	0	0	0	0	0	+	+	0
excision ICE <i>St3</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MEGA ^d	ND	ND	+	+	ND	ND	ND	ND	ND
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	+	+	+	+	0	+	+	0	+
excision Tn916	ND	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn3872-like ^f	+	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	+
excision Tn3872	0	ND	ND	ND	ND	0	0	ND	0
Tn6002-like ^g	0	ND	ND	ND	ND	0	0	ND	0
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn2009-like ^h	ND	ND	0	+	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn2009	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	N3	N5	N6	N7	N9	S1-11	S1-7	S3-1	S3-12	S3-16
Source	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal
Sampling site	Digestive abscess	Cerebral abscess	Blood culture	Blood culture	Bone	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva
Origin	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Nancy Hospital	Individual 1	Individual 1	Individual 3	Individual 3	Individual 3
Year	2010	2011	2011	2010	2010	2011	2011	2011	2011	2011
ST	95	101	80	33	53	44	44	32	94	94
Number ¹						12	12	3	6	6
<i>ilvC</i>	28	29	27	14 ^a	21	17 ^a	17 ^a	14 ^a	28	28
<i>sodA</i>	31	8 ^a	21	11 ^a	12 ^a	29	29	11 ^a	21	21
<i>ddlA</i>	39	71	56	54	54	51	51	32	59	59
<i>thrS</i>	14 ^a	49	43	46	42	22	22	21	25	25
<i>dnaE</i>	20 ^a	18 ^a	46	49	50	40	40	24 ^a	38	38
<i>pyrE</i>	12 ^a	45	32	29	2 ^a	38	38	30	34	34
Ery	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S
Spi	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
Lin	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
Tet	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0
<i>mef(A/E)</i>	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0
<i>tet(M)</i> ^c	0	0	0	0	0	+	+	0	0	0
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	+	0	0	0	+	+	+	0	0
<i>rel ICES_{St3}</i>	0	+	0	0	0	0	+	+	0	0
<i>CP ICES_{St3}</i>	0	+	0	0	0	0	0	+	0	0
excision ICE <i>St3</i>	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MEGA ^d	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0
excision Tn916	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn3872-like ^f	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn3872	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Tn6002-like ^g	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	ND	ND	ND
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	ND	ND	ND
Tn2009-like ^h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	S3-2	S3-5	S3-7	S4-1	S4-10	S4-2	S4-3	S4-4	S6-1	S6-13	S6-3
Source	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal	commensal
Sampling site	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva
Origin	Individual 3	Individual 3	Individual 3	Individual 4	Individual 4	Individual 4	Individual 4	Individual 4	Individual 6	Individual 6	Individual 6
Year	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011	2011
ST	32	59	59	114	27	105	114	27	30	30	29
Number ¹	3	3	3	3	6	3	3	6	3	3	6
<i>ilvC</i>	14 ^a	22	22	30	12 ^a	29	30	12 ^a	12 ^a	12 ^a	12 ^a
<i>sodA</i>	11 ^a	30	30	30	27	25	30	27	27	27	27
<i>ddlA</i>	32	63	63	2 ^a	34	36	2 ^a	34	37	37	35
<i>thrS</i>	21	23	23	26	27	21	26	27	27	27	27
<i>dnaE</i>	24 ^a	15 ^a	15 ^a	14 ^a	15 ^a	37	14 ^a	15 ^a	15 ^a	15 ^a	15 ^a
<i>pyrE</i>	30	16 ^a	16 ^a	30	31	51	30	31	31	31	31
Ery	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Spi	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Lin	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
Tet	S	S	S	R	S	S	R	S	S	S	S
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>mef(A/E)</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>tet(M)</i> ^c	0	0	0	+	0	0	+	0	0	0	0
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	+	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+
<i>rel ICES_{St3}</i>	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0
<i>CP ICES_{St3}</i>	+	+	+	+	0	+	+	0	+	+	0
excision ICE <i>St3</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
MEGA ^d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	0	+	+	+	0	0	+	0	0	0	0
excision <i>Tn916</i>	ND	0	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Tn3872</i> -like ^f	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision <i>Tn3872</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Tn6002</i> -like ^g	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision <i>Tn6002</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>Tn2009</i> -like ^h	ND	0	0	0	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND
excision <i>Tn2009</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Isolate	S6-4	S6-6	S7-1	S7-16	T00	T29G	T29p	T67	T80	T93
Source	commensal	commensal	commensal	commensal	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical	clinical
Sampling site	Saliva	Saliva	Saliva	Saliva	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture	Blood culture
Origin	Individual 6	Individual 6	Individual 7	Individual 7	Tours Hospital	Tours Hospital	Tours Hospital	Tours Hospital	Tours Hospital	Tours Hospital
Year	2011	2011	2011	2011	2005	2006	2006	2006	2007	2003
ST	57	29	83	83	66	78	88	87	61	113
Number ¹	3	6	12	12						
<i>ilvC</i>	22	12 ^a	28	28	25	27	28	28	22	30
<i>sodA</i>	30	27	21	21	24	21	21	21	30	24
<i>ddlA</i>	33	35	3 ^a	3 ^a	57	41	55	55	72	7 ^a
<i>thrS</i>	23	27	14 ^a	14 ^a	21	24	36	36	23	34
<i>dnaE</i>	15 ^a	15 ^a	24 ^a	24 ^a	48	33	45	45	15 ^a	32
<i>pyrE</i>	39	31	12 ^a	12 ^a	41	32	28	11 ^a	35	50
Ery	S	R	S	S	R	R	S	S	R	R
Spi	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S
Lin	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
Tet	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
Chl	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Kan	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S
<i>erm(B)</i> ^b	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
<i>mef(A/E)</i>	0	+	0	0	0	+	0	0	+	+
<i>tet(M)</i> ^c	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0
<i>catQ</i>	ND	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND
<i>int ICES_{St3}</i>	0	+	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>rel ICES_{St3}</i>	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+
<i>CP ICES_{St3}</i>	+	0	0	0	0	0	0	0	0	+
excision ICE <i>St3</i>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+
MEGA ^d	ND	+	ND	ND	ND	+	ND	ND	+	+
IQ element ^e	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>rel Tn916</i>	0	0	0	0	+	0	+	+	0	0
excision Tn916	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	ND	ND
Tn3872-like ^f	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn3872	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND
Tn6002-like ^g	ND	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn6002	ND	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	ND	ND
Tn2009-like ^h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
excision Tn2009	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table S2. Primers used in this work.

Procedure and target genes	Primer designation	Sequence (5' to 3')	Product size (bp)	Reference or source
PCR multiplex for <i>S. salivarius</i> identification				
16S	16S up 16S dn	GTAGCGGGGGATAACTATTG ACCTACGTATTACCGCGGCT	100	Delorme, pers. comm.
23S	23S up 23S dn	GAAGTTTGTAGTAGCGAAGTTA TTAGAGTAGCCATAACACAA	620	Delorme, pers. comm.
<i>ilvC</i>	<i>ilvC</i> up <i>ilvC</i> dn	GATACAGGTCACGATGTTAT GGTGCATATCCAGCTTCAGT	492	(1)
MLST				
<i>ilvC</i>	<i>ilvC</i> up <i>ilvC</i> dn	GATACAGGTCACGATGTTAT GGTGCATATCCAGCTTCAGT	492	(1)
<i>sodA</i>	<i>sodA</i> up <i>sodA</i> dn	GATGCTGAAACAATGACTC ATAGGAGTGTCTTGGTTAG	404	(1)
<i>ddlA</i>	<i>ddlA</i> up <i>ddlA</i> dn	TCAAGTGTGGCTATGGA GTAGATGGCTCCATCCTC	459	(1)
<i>thrS</i>	<i>thrS</i> up <i>thrS</i> dn	ATCACTGAAGATGGAAGC CCAAGTTTACGGTGGTCA	497	(1)
<i>pyrE</i>	<i>pyrE</i> up 1 <i>pyrE</i> dn 1	AGCATCACAAATCGCATCTG TTTCACACCAGCATCCGC	519	This study
<i>dnaE</i>	<i>dnaE</i> up <i>dnaE</i> dn <i>dnaE</i> up 2 <i>dnaE</i> dn 2	GGACTGGGAGCCTGGGAT ACTCCCTGCAGCAGACCC CCTTCCRAGTGAAGACTGGGA GCCACCCAAGCTTCCTGCAGCA	497 575	(1) This study

Resistance genes				
<i>catQ</i>	catQ1 catQ2	TAGAAAGCCATACTTTGAGC CATGATGCACCTGTACAGAC	536	(2)
Multiplex PCR				
16S (positive control for multiplex)	16S Fwd 16S Rev	GAGTACGACCGCAAGGTTGA CTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG	100	(3)
<i>erm(A)</i>	ermA Fwd ermA Rev	CCCGAAAAATACGCAAAATTTTCAT CCCTGTTTACCCATTATAAACG	590	(3)
<i>erm(B)</i>	ermB Fwd ermB Rev	TGGTATTCCAAATGCGTAATG CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	745	(3)
<i>mef(A/E)</i>	mefAE Fwd mefAE Rev	CAATATGGGCAGGGCAAG AAGCTGTTCCAATGCTACGG	317	(3)
<i>tet(M)</i>	tetM Fwd tetM Rev	GTGGACAAAGGTACAACGAG CGGTAAAGTTCGTCACACAC	406	(3)
<i>tet(O)</i>	tetO Fwd tetO Rev	AACTTAGGCATTCTGGCTCAC TCCCCTGTTCCATATCGTCA	515	(3)
Detection of genetic elements				
Tn916 relaxase gene	rel Tn916 Fwd rel Tn916 Rev	GAACGCTTCAATCCCGAC TTGTCTGCACCCACGACC	246	(4)
ICES₃ integrase <i>fda</i>	intSt3 Fwd intSt3 Rev	AGGGCTTTCTGACGAATTAG GAGTTCTAATAACTGAGGCTA	227	This work
relaxase	rlxSt3 Fwd rlxSt3 Rev	CTCATGAACTATACCCGATT ACCAAAAATCTCAAGGATTC	713	This work
coupling protein	cplSt3 Fwd cplSt3 Rev	CGTGACTATAGCCTACAATC CCTTGTCCTAGCCCATGAT	507	This work

MEGA	MEGA orf7 Fwd mefAE Rev	CCAGAGCGTTACAGTCTATG AAGCTGTTCCAATGCTACGG	807	This work
Tn3872 (<i>erm</i>(B) element in <i>orf9</i> of Tn916)	tetM Fwd ermB Rev	GTGGACAAAGGTACAACGAG CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	3458	This work
Tn6002 (<i>erm</i>(B) element in <i>rel</i> of Tn916)	rel Tn916 Fwd ermB Rev	GAACGCTTCAATCCCGAC CTGTGGTATGGCGGGTAAGT	2030	This work
Tn2009 (<i>mef</i>(A/E) element in <i>orf6</i> of Tn916)	tetM Fwd mefAE Fwd	GTGGACAAAGGTACAACGAG CAATATGGGCAGGGCAAG	6304	This work
IQ element (<i>mef</i>(E)-<i>catQ</i> linkage)	mefAE Fwd catQ2	CAATATGGGCAGGGCAAG CATGATGCACCTGTACAGAC	5429	This work
Excision of genetic elements				
ICES_{t3} Empty <i>fda</i> site	attB _{fda} Ssal attB ST3 Rev	GCCCAACCAAATAACACTAAA CTCTTCGACCCACGTAAATTC	464 (JIM8777)	This work
ICES_{t3} Circular form	intST3 For attI ST3 Rev	AGGTCTTTCTGACGAATTAG CGGCGTAATGGGAAGTATGG	894 (ICES _{t3})	This work
Tn916 and related elements Circular form	OTR1R OTL3	GGATAAATCGTCGTATCAAAGC CTCGAAAGCACATAGAATAAGGC	202	(5)

References Table S2

1. **Delorme C, Poyart C, Ehrlich SD, Renault P.** 2007. Extent of horizontal gene transfer in evolution of Streptococci of the salivarius group. *J Bacteriol* **189**:1330-41.
2. **Del Grosso M, Camilli R, Barbabella G, Blackman Northwood J, Farrell DJ, Pantosti A.** 2011. Genetic resistance elements carrying *mef* subclasses other than *mef(A)* in *Streptococcus pyogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:3226-30.
3. **Malhotra-Kumar S, Lammens C, Piessens J, Goossens H.** 2005. Multiplex PCR for simultaneous detection of macrolide and tetracycline resistance determinants in streptococci. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4798-800.
4. **Haenni M, Saras E, Bertin S, Leblond P, Madec JY, Payot S.** 2010. Diversity and mobility of integrative and conjugative elements in bovine isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, and *S. uberis*. *Appl Environ Microbiol* **76**:7957-65.
5. **Marra D, Pethel B, Churchward GG, Scott JR.** 1999. The frequency of conjugative transposition of Tn916 is not determined by the frequency of excision. *J Bacteriol* **181**:5414-8.

Streptococcus salivarius est une bactérie commensale présente dans la cavité buccale et tout au long du tractus digestif (Eckburg *et al.*, 2005; Hao & Lee, 2004). Elle est fréquemment retrouvée attachée à la langue ou aux parois stomacales et intestinales au sein de biofilms (Cvitkovitch *et al.*, 2003). Dans un biofilm, la densité cellulaire implique une proximité physique entre les bactéries de différentes espèces propice aux échanges de gènes entre elles. Ces transferts horizontaux permettent l'acquisition par les bactéries de gènes d'adaptation tels que des gènes de résistance aux antibiotiques et de virulence (Kolenbrander *et al.*, 2010; Molin & Tolker-Nielsen, 2003). Largement répandus dans les génomes bactériens, bien que peu étudiés, les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) et les éléments intégratifs mobilisables (IME) jouent probablement un rôle majeur dans ces transferts et dans l'adaptation des souches à leur environnement. L'objectif de ce travail de thèse est d'étudier chez *S. salivarius* les éléments intégratifs (prévalence, diversité et transfert d'un ICE) ainsi que les capacités d'adhésion aux cellules des écosystèmes digestif et buccal. Une étude par MLST (MultiLocus Sequence Type) a permis de classer 212 souches de la collection de *S. salivarius* du laboratoire DynAMic en 96 Sequence Types et de révéler la diversité de ces souches. Parmi celles-ci, 138 ont été sélectionnées comme représentatives de la diversité de la collection pour les études ultérieures. La recherche par PCR d'éléments intégratifs parmi ces souches a permis de montrer que plus de 70% d'entre elles présentent au moins un élément intégratif porteur d'au moins un gène de résistance aux antibiotiques. Ainsi la diversité des phénotypes de résistance aux antibiotiques observée a pu être corrélée à la diversité des éléments intégratifs retrouvés (Tn916, Tn3872, Tn6002, Tn2009, MEGA) ou décrits pour la première fois (IQ element) chez *S. salivarius*. La diversité et la prévalence des ICE et des IME chez *S. salivarius* a été caractérisée au sein des génomes entièrement séquencés de 19 souches. Cette analyse a permis de détecter 27 ICE appartenant à 2 superfamilles (Tn916 et Tn5252) et 4 familles distinctes (ICESt3, Tn916, Tn1549 et TnGBS2) qui sont intégrés dans 12 sites d'intégration différents. Elle a également permis de détecter 37 IME qui sont intégrés dans 7 sites différents ainsi que 10 éléments MEGA intégrés dans deux gènes différents. L'étude des ICE de la famille ICESt3 qui sont décrits pour la première fois chez *S. salivarius* dans ce travail montre qu'ils sont intégrés dans le site déjà décrit (à l'extrémité 3' du gène *fda*), mais aussi dans deux nouveaux sites (à l'extrémité 3' des gènes *rpsl* et *rpmG*). En parallèle de ces travaux, la capacité d'adhésion de souches de *S. salivarius* à la salive et aux cellules épithéliales gastro-intestinales a été étudiée. Les résultats ont montré que la capacité d'adhésion à la salive de 24 souches est très variée et souche dépendante. De même, la capacité d'adhésion aux cellules épithéliales gastro-intestinales Caco2 et HT29-MTX de 14 de ces souches est souche dépendante mais aussi lignée cellulaire dépendante. Ces résultats ont permis de sélectionner la souche F6-1 dont le phénotype d'adhésion aux cellules HT29-MTX et HT29-CL16E est particulièrement élevé et dépendant de la sécrétion de mucus. L'étude de mutants de cette souche a montré que sa capacité d'adhésion dépend à la fois de certaines de ses protéines de surface et de la lignée cellulaire épithéliale gastro-intestinale. Enfin, des expériences de transfert conjugatif d'ICESt3 F6-1 *rpsl* ont été réalisées dans différentes conditions. Cependant, bien que sa capacité d'excision ait été démontrée et qu'une analyse *in silico* indique que cet ICE serait fonctionnel, aucun transconjugant n'a pu être obtenu dans les différentes conditions testées.

Streptococcus salivarius is a commensal bacterium present in the oral cavity and all along the digestive tract (Eckburg *et al.*, 2005; Hao & Lee, 2004). It is frequently found attached to tongue or to stomach and intestinal walls within biofilms (Cvitkovitch *et al.*, 2003). In a biofilm, the cellular density implies a physical proximity between bacteria of different species which is favorable for genetic exchange between them. These horizontal transfers permit the bacteria to acquire genes of adaptation such as virulence and antibiotic resistance genes (Kolenbrander *et al.*, 2010; Molin & Tolker-Nielsen, 2003). Largely present in the bacterial genomes, although not widely studied, the integrative conjugative elements (ICEs) and the integrative mobilizable elements (IMEs) probably play a major role in these transfers and in the adaptation of strains to their environment. The objective of this thesis is to study within *S. salivarius* the integrative elements (prevalence, diversity and transfer of one ICE) as well as the adhesion capacity to the cells of the oral and digestive ecosystems. A MLST study (MultiLocus Sequence Type) has allowed the classification of 212 strains of the *S. salivarius* collection from the DynAMic laboratory in 96 Sequence Types and to reveal the diversity of these strains. Among these, 138 were selected as representative of the diversity of the collection for ulterior studies. PCR research of integrative elements of these strains has shown that more than 70% of these strains present at least one integrative element carrying at least one antibiotic resistance gene. Therefore the diversity of the antibiotic resistance phenotypes observed were able to be correlated to the diversity of the integrative elements found (Tn916, Tn3872, Tn6002, Tn2009, MEGA) or described for the first time (IQ element) in *S. salivarius*. The diversity and prevalence of the ICE and IME in *S. salivarius* were characterized within the completely sequenced genomes of 19 strains. This analysis has allowed the detection of 27 ICE belonging to 2 superfamilies (Tn916 and Tn5252) and 4 distinctive families (ICESt3, Tn916, Tn1549 and TnGBS2) which are integrated into 12 different integration sites. The analysis also allowed the detection of 37 IME which are integrated in 7 different sites as well as 10 MEGA elements integrated in two different genes. The study of the ICE of the ICESt3 family which are described for the first time in *S. salivarius* in this work showed that they are integrated in the site already described (at the 3' end of the *fda* gene), but also in 2 new sites (at the 3' end of the *rpsl* and *rpmG* genes). In parallel to these studies, the adhesion capacity of *S. salivarius* strains to saliva and gastro-intestinal epithelial cells has been studied. The results have shown that adhesion capacity to the saliva of 24 strains are much diversified and strain dependent. Likewise, the capacity of adhesion to gastro-intestinal epithelial cell lines Caco2 and HT29-MTX of 14 of these strains is strain dependent but also cellular line dependent. These results have allowed the selection of the F6-1 strain of which the adhesion phenotype to HT29-MX and HT29-CL16E cells is particularly high and dependent on the secretion of mucus. The study of mutants of this strain has shown that its adhesion capacity is dependent both on some of their surface proteins and on the gastro-intestinal epithelial cell lines. Finally, conjugative transfer experiments of the ICESt3 F6-1 *rpsl* were performed under different conditions. Its excision capacity has been shown and an *in silico* analysis indicates that this ICE could be functional. However, no transconjugant has been obtained whatever the tested conditions.