



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 Technologies

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention « Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystème »

par **Aurore PUYMEGE**

Le 5 septembre 2013

**Diversité, dynamique et mobilité des éléments intégratifs conjugatifs (ICE)
de *Streptococcus agalactiae* intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un
ARNt Lysine**

Membres du jury :

Rapporteurs : Mme Christine CITTI, Directrice de recherches (HDR), INRA,
Toulouse

Mr Philippe GLASER, Chef de laboratoire Institut Pasteur, Paris

Examineurs : Mr Benoît DOUBLET, Chargé de recherche, INRA, Nouzilly
Mme Nathalie LEBLOND, Professeur des Universités, Université
de Lorraine, Nancy

Mme Sophie PAYOT LACROIX, Chargée de recherches (HDR),
INRA, Nancy, **directrice de thèse**

Mr Gérard GUEDON, Maître de Conférences (HDR), Université
de Lorraine, Nancy, **co-directeur de thèse**

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

Collegium Sciences et Technologies

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention « Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystème »

par **Aurore PUYMEGE**

Le 5 septembre 2013

**Diversité, dynamique et mobilité des éléments intégratifs conjugatifs (ICE)
de *Streptococcus agalactiae* intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un
ARNt Lysine**

Membres du jury :

Rapporteurs : Mme Christine CITTI, Directrice de recherches (HDR), INRA,
Toulouse

Mr Philippe GLASER, Chef de laboratoire Institut Pasteur, Paris

Examineurs : Mr Benoît DOUBLET, Chargé de recherche, INRA, Nouzilly
Mme Nathalie LEBLOND, Professeur des Universités, Université
de Lorraine, Nancy

Mme Sophie PAYOT LACROIX, Chargée de recherches (HDR),
INRA, Nancy, **directrice de thèse**

Mr Gérard GUEDON, Maître de Conférences (HDR), Université
de Lorraine, Nancy, **co-directeur de thèse**

Je tiens à remercier Monsieur le professeur Pierre Leblond de m'avoir accueillie au sein du laboratoire Dynamic.

Je tiens à remercier Madame le docteur Sophie Payot-Lacroix pour son encadrement, sa patience infinie, pour tout ce que j'ai appris à ses côtés et ses merveilleux cannelés.

Merci à Monsieur le docteur Gérard Guédon pour son encadrement et toutes ces discussions, sur les ICE et tant d'autres sujets.

Je remercie également Madame le docteur Christine Citti et Monsieur le docteur Philippe Glaser pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail, ainsi que Madame le professeur Nathalie Leblond-Bourget et Monsieur le docteur Benoît Doublet d'avoir accepté de le juger.

Merci à Stéphane, pour son aide et son soutien technique. Toutes ces discussions autour des cure-dents et nos chants qui resteront à jamais gravés (dans les pauvres oreilles d'autres personnes aussi... désolée).

Je tiens également à remercier tout particulièrement Xavier, Le Grand Ninja Blanc, d'avoir eu l'infinie patience de me former.

Mylène, merci de ta participation à ce travail et de m'avoir supportée lors de ton stage.

Merci à toutes ces personnes qui m'ont soutenue pendant ces années de thèse.

Merci à tous les membres du laboratoire pour leur amitié et leurs marques de sympathie.

Merci à mes collègues de déjeuners et de pauses, d'avoir supporté les coups de blues et pour toute cette bonne humeur.

Merci aux personnes du « bureau d'à côté » Bertrand, Justine, et Laurence d'avoir toujours eu un chocolat, un conseil ou un sourire.

Merci à Florent et Manu d'avoir compris les retards et annulations de dernière minute et de ne m'en avoir jamais voulu. Romain, Nico, Maxime, Janek et P'tit Manu merci également pour le soutien, les crises de rire et tous ces bons moments.

Emilie, Sarah et Manue cette thèse n'aurait pas été la même sans vous trois. Pour tous ces bons moments partagés et les autres : Together forever.

Enfin, un grand merci tout particulier à ma famille. Merci à vous de m'avoir tant épaulé, de m'avoir sorti du lit lorsqu'il le fallait, de m'avoir porté, de m'avoir écouté parler de « mes bestioles ». Je vous dois tant. Cette thèse est un peu la vôtre. Je remercie particulièrement mes parents qui m'ont supportée lors de toutes ces années et l'homme de ma vie qui a survécu à la période de rédaction avec une abnégation digne d'un chevalier Jedi.

Merci encore à tous

Abréviations

aa : acides aminés

ADNg : ADN génomique

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

ARNt : ARN de transfert

ATCC : Collection de souches bactériennes (American Type Culture collection)

attL : site de recombinaison *att* gauche (Left)

attR : site de recombinaison *att* droit (Right)

BET : Bromure d'ETHidium

BHI : milieu de culture cœur-cerveau (Brain Heart Infusion)

CAMP : Facteur de virulence (Christie Atkins Munch Peterson)

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

CIP : Phosphatase d'intestin de veau (Calf Intestinal Phosphatase)

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

CTn : transposon conjugatif

Com. pers. : communication personnelle

dNTP : DesoxyriboNucléotide TriPhosphate

DNase I : Désoxyribonucléase I

DO : densité optique

EDTA : EthyleneDiamineTetaracetic Acid

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

Hfr : haute fréquence de recombinaison (High Frequency of Recombination)

IHF : Facteur d'intégration de l'hôte (Integration Host Factor)

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

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

INRA : Institut National de Recherche Agronomique

IS : séquence d'insertion (Inserting Sequence)

kb : kilobases

LMG : Collection de souches bactériennes (Laboratory of Microbiology Gent)

Mb : mégabases

MCD : Milieu Chimiquement Défini

MGI : îlot génomique mobilisable (Mobilizable Genomic Island)

MMC : MitoMycine C

NBU : Non-replicating Bacteroides Units

oriT : origine de transfert permettant l'initiation de la conjugaison d'un élément génétique mobile

pb : paire de bases

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

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

RM : Restriction Modification

TA : Toxine-Antitoxine

T_m : température d'hybridation

U : unité

UFC : Unité Formant Colonie

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
1. Transfert horizontal de gènes chez les bactéries.....	3
1.1 Mécanismes de transfert de gènes.....	3
1.1.1 Transformation.....	4
1.1.2 Transduction	5
1.1.3 Conjugaison	6
1.1.4 Nanotubes.....	7
1.2 Maintien dans la descendance de l'information génétique transférée	7
1.2.1 Intégration dans un réplicon de la cellule	8
1.2.2. Réplication et ségrégation	9
1.3 Maintien dans la population de l'information génétique transférée.....	10
2. Eléments génétiques mobiles et transfert horizontal.....	11
2.1 Eléments génétiques mobiles.....	11
2.1.1 Eléments transposables.....	11
2.1.2 Plasmides	12
2.1.3 Prophages	12
2.2 Ilots génomiques.....	13
2.3 Structure modulaire des éléments.....	14
2.4 Nouvelle nomenclature et description des ICE	15
3. Transfert conjugatif des ICE	23
3.1 Excision/intégration.....	23
3.1.1 Recombinase à tyrosine	24
3.1.2 Recombinase à sérine	26
3.1.3 Transposase à DDE.....	27
3.2 Transfert d'ADN par conjugaison.....	27
3.2.1 Transfert simple brin	27
3.2.1.1 Contact entre cellules donatrice et réceptrice.....	27
3.2.1.2 Pore de conjugaison	28

3.2.1.3 Transfert d'ADN.....	30
3.2.2 Transfert double brin	33
4. Mobilisation d'ADN.....	35
4.1 Mobilisation en <i>trans</i>.....	35
4.2 Mobilisation en <i>cis</i>	37
4.3 Modèle d'évolution des ICE par accrétion/mobilisation	38
5. Mécanismes de maintien des ICE	40
5.1 Maintien des ICE dans la cellule réceptrice et sa descendance	41
5.1.1 Maintien grâce à des fonctions codées par l'ICE	41
5.1.1.1 Recombinases.....	41
5.1.1.2 Réplication.....	42
5.1.2. Maintien grâce à des fonctions codées par la cellule réceptrice	44
5.1.3 Barrières au maintien et au transfert d'ADN.....	44
5.1.3.1 Système d'exclusion.....	44
5.1.3.2 Dégradation de l'ADN entrant.....	45
5.1.3.2.1 Système de restriction modification.....	46
5.1.3.2.2 Loci CRISPR.....	47
5.1.3.3 Répression de l'activité de l'élément	50
5.1.3.4 Immunité de cible.....	51
5.2 Maintien des ICE dans la population	51
5.2.1 Impact de la fonctionnalité des ICE	52
5.2.2 Modules poison-antipoison	52
5.2.3 Fonctions avantageuses.....	54
6. Régulation des ICE.....	55
6.1 Régulation par bistabilité et stochasticité.....	56
6.2 Régulation par des agents endommageant l'ADN.....	58
6.3 Régulation par quorum sensing	60
6.4 Régulation en phase stationnaire	62

6.5 Autres mécanismes de régulation	63
7. Interactions avec l'hôte.....	66
7.1 Impact de l'hôte sur la régulation des éléments	66
7.2 Impact de l'ICE sur la régulation de la cellule.....	67
8. <i>Streptococcus agalactiae</i>	69
8.1 <i>Streptococcus agalactiae</i> , bactérie commensale ou pathogène	69
8.2 Transfert et polymorphisme chez <i>S. agalactiae</i>	71
8.3 Ilots de <i>S. agalactiae</i> intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN _t ^{Lys} CIT	75
OBJECTIFS	81
MATERIELS ET METHODES.....	85
1. Souches bactériennes et conditions de culture.....	87
2. Plasmides et vecteurs utilisés	92
3. Extraction, dosage, restriction enzymatique, électrophorèse et ligation de l'ADN	95
3.1 Extraction d'ADN	95
3.2 Restriction enzymatique de l'ADN et électrophorèse.....	95
3.3 Ligation des fragments d'ADN.....	96
4. Amplification par PCR, PCR haute fidélité, PCR nichée et PCR long-range.....	96
5. Électroporation chez <i>E. coli</i> et <i>S. agalactiae</i>	101
6. Séquençage	102
7. Marquage des éléments.....	102
8. Sélection des cellules réceptrices résistantes à la rifampicine et à la streptomycine.....	103
9. Conjugaison.....	103
10. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)	104
11. Analyse/comparaison de séquences	105
RESULTATS.....	107

1. Recherche et prévalence des éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{tLys} CTT chez <i>Streptococcus agalactiae</i>.....	109
1.1 Analyses des souches totalement ou partiellement séquencées	111
1.1.1 Souches portant un CIME putatif ou un CIME tronqué	115
1.1.2 Souche portant un élément dérivant d'un ICE.....	122
1.1.3 Souches portant un IME putatif	123
1.1.4 Souche portant un ICE putatif.....	124
1.2 Analyses de 234 autres génomes disponibles de <i>S. agalactiae</i>	127
1.2.1 Méthodologie employée	127
1.2.2.1 Souches portant les gènes caractéristiques des ICE	129
1.2.2.2 Souches portant uniquement les gènes caractéristiques d'IME_2603_tRNA ^{Lys}	131
1.2.2.3 Souches portant des dérivés d'ICE ou IME	131
2. Transfert conjugatif des ICE putatifs intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{tLys}	135
2.1 Excision des ICE putatifs.....	135
2.2 Test de transfert conjugatif intra-espèce.....	137
2.2.1 Sélection de cellules réceptrices.....	137
2.2.2 Test de transfert d'ICE_515_tRNA ^{Lys}	138
2.2.3 Transfert conjugatif d'un ICE ou autre mécanisme possible ?	140
2.2.3.1 Test à la désoxyribonucléase I	140
2.2.3.2 Blocage entre cellules donatrice et réceptrice.....	140
2.2.3.3 Test de re-transfert	141
2.2.3.4 Test de caractérisation de certaines fonctions codées par l'ICE	142
2.2.4 Tests de transfert des autres ICE putatifs intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN ^{tLys}	143
2.3 Test de transfert conjugatif inter-espèces	145
3. Accrétion et mobilisation.....	148

3.1 Accrétion site-spécifique entre ICE_515_tRNA ^{Lys} et des éléments apparentés	148
3.2 Mobilisation en <i>cis</i> de CIME_Nem_tRNA ^{Lys} par ICE_515_tRNA ^{Lys}	151
DISCUSSION	155
1. Ubiquité et diversité des éléments intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt ^{Lys} CTT chez <i>S. agalactiae</i>	157
1.1 Prévalence des éléments.....	157
1.2 Nature des éléments.....	157
1.2.1 Une famille d'ICE très répandue	158
1.2.2 Une famille d'IME très répandue	158
1.2.3 Une famille d'IME présentant une spécificité d'intégration originale : l'origine de transfert de différents ICE ?.....	159
1.2.4 Vestiges d'éléments : témoins de la richesse des remaniements génétiques liés aux éléments génétiques mobiles.....	161
2. Mobilité des éléments	163
2.1 Excision des éléments	163
2.2 Transfert conjugatif intra-spécifique des ICE putatifs	165
2.2.1. ICE_515_tRNA ^{Lys} et ICE_FSL S3-026_tRNA ^{Lys} : deux ICE fonctionnels chez <i>S. agalactiae</i>	165
2.2.2. Impact de la souche réceptrice utilisée : barrières s'opposant au transfert	167
2.2.2.1 Systèmes de restriction-modification	167
2.2.2.2 Système CRISPR	167
2.2.2.3 Mise en place du pore de conjugaison	168
2.3 Transfert conjugatif inter-spécifique des ICE	169
3. Maintien des éléments	170
3.1 Maintien dans la cellule réceptrice	170
3.1.1 Intégration par recombinaison site-spécifique	170
3.1.2 Réplication	172

3.2 Maintien dans la population	173
3.2.1 Système toxine-antitoxine	173
3.2.2 Fonctions avantageuses.....	174
4. Accrétion et mobilisation.....	174
4.1 Accrétion en tandem	174
4.2 Accrétion interne.....	176
4.3 Mobilisation en <i>cis</i> des CIME	178
4.4. Plasticité des tandems ICE-IME.....	179
4.5. Accrétion IME-ICE : mobilisation en <i>cis</i> ou en <i>trans</i> des IME ?	180
5. Conclusion et perspectives	180
BIBLIOGRAPHIE.....	185
ANNEXES	213
Annexe 1 : Article Journal of Bacteriology	214
Annexe 2 : Listes et caractéristiques des souches dont les génomes ont été étudiés lors de cette étude	225
RESUMES	235

INTRODUCTION

1. Transfert horizontal de gènes chez les bactéries

L'analyse des génomes bactériens révèle une grande diversité entre différentes souches de la même espèce bien que la reproduction sexuée n'existe pas chez les bactéries. Les mutations ponctuelles, les réarrangements du génome et les événements de recombinaison intragénomique concourent à l'évolution bactérienne, mais la transmission verticale de ces mutations (cellule mère-cellule fille), qui est une reproduction clonale, ne permet pas le brassage des gènes contrairement à la reproduction sexuée des eucaryotes. Cependant, un mécanisme majeur de l'évolution bactérienne est le transfert horizontal de gènes (Lawrence 1999; Ochman et al. 2000). Celui-ci correspond à l'acquisition par un organisme d'ADN provenant d'un autre organisme sans en être le descendant direct. Ce mécanisme d'évolution rapide, joint à la sélection, contribue à l'adaptation des bactéries à leur environnement, voire peut conduire à un changement de niche écologique d'un organisme ou une spéciation (Lawrence 1999; Ochman et al. 2000).

Le transfert horizontal peut se produire non seulement entre souches de la même espèce ou d'espèces proches, mais également entre deux bactéries extrêmement éloignées phylogénétiquement. Des transferts entre bactéries et eucaryotes ont même été observés (Keeling and Palmer 2008). Ainsi, le transfert horizontal de gènes des bactéries vers les micro-organismes eucaryotiques joue un rôle important dans leur évolution. De même, les bactéries peuvent acquérir des gènes à partir des eucaryotes. Ainsi, certaines cyanobactéries marines ont acquis de l'ADN d'organismes eucaryotes (Rogers et al. 2007).

Le transfert horizontal implique trois étapes : le transfert d'ADN d'une cellule à une autre, le maintien de l'ADN dans la descendance de la cellule et enfin le maintien de cet ADN dans la population généralement par sélection (Lawrence 1999; Ochman et al. 2000).

1.1 Mécanismes de transfert de gènes

Il existe trois mécanismes bien connus de transfert d'ADN : la transduction, la transformation et la conjugaison (Thomas and Nielsen 2005). Un autre mécanisme, proposé récemment, permettrait également l'échange d'information génétique par des prolongements cytoplasmiques ou nanotubes (Dubey and Ben-Yehuda 2011).

Le support de l'information échangée peut être chromosomique ou extra-chromosomique. Les fonctions nécessaires au transfert peuvent être codées par la cellule donatrice, la cellule réceptrice ou l'ADN transféré (éléments génétiques mobiles).

1.1.1 Transformation

La transformation correspond à l'acquisition d'ADN exogène provenant du milieu extracellulaire ainsi qu'à son incorporation dans un réplicon de la cellule réceptrice (Figure 1). La présence d'ADN libre dans le milieu peut être due à une sécrétion active d'ADN ou découler de la lyse cellulaire (Lorenz and Wackernagel 1994; Hamilton and Dillard 2006).

Chez la plupart des bactéries, la transformation est un processus accidentel et peu efficace. Cependant, chez d'autres bactéries comme *Bacillus subtilis* ou divers streptocoques, la transformation est un processus actif et très efficace permettant le remplacement d'allèle ou de locus par recombinaison homologue (Cvitkovitch 2001; Hamilton and Dillard 2006; Johnsborg et al. 2007). Dans ce cas, un état physiologique particulier, la compétence naturelle, permet à la bactérie réceptrice de mettre en place les systèmes nécessaires à la capture de l'ADN et la recombinaison entre cet ADN et l'ADN cellulaire. Pour la plupart des bactéries transformables naturellement, cet état de compétence est transitoire et régulé par des signaux environnementaux et cellulaires.

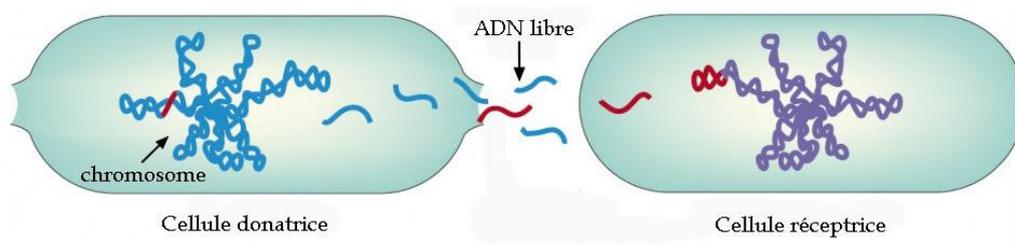


Figure 1 : Représentation schématique du mécanisme de la transformation (Furuya and Lowy 2006)

La transformation correspond à l'internalisation d'ADN présent dans l'environnement par la bactérie réceptrice. L'ADN peut ensuite être intégré dans un réplicon de la cellule.

1.1.2 Transduction

La transduction est un mécanisme où l'ADN bactérien est transféré via une capsidie protéique, généralement, celle d'un phage (Figure 2). La capsidie permet une protection de l'ADN et sa transmission. Après une première infection, de l'ADN chromosomique adjacent (transduction spécialisée) ou non (transduction généralisée) au site d'intégration du prophage peut être encapsidé et transmis en même temps que le phage. Les phages sont présents au sein de tous les genres bactériens, ce qui fait de la transduction un mécanisme important du transfert horizontal (Skippington and Ragan 2011).

Par ailleurs, bien que cela ne soit pas toujours considéré comme de la transduction, beaucoup de bactéries portent des prophages qui sont transmis à la descendance et doivent donc être considérés comme faisant partie du génome de la cellule. Ces prophages peuvent être transmis à d'autres bactéries par encapsidation, lyse de la donatrice et lysogénéisation de la réceptrice, ce qui constitue un transfert horizontal.

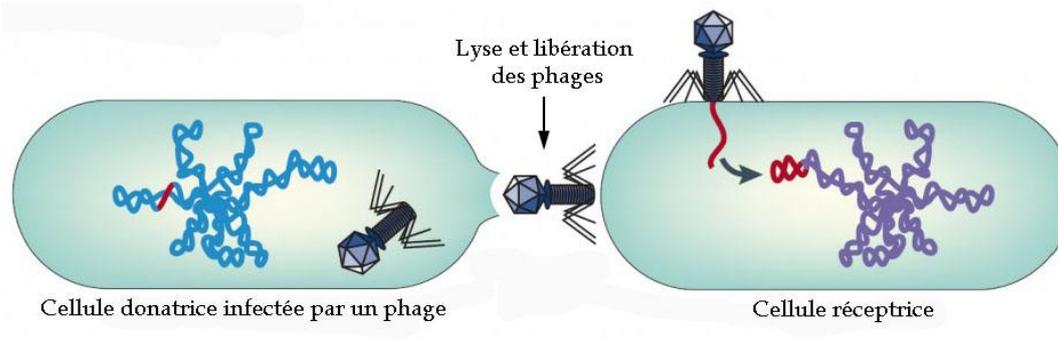


Figure 2 : Représentation schématique du mécanisme de la transduction (Furuya and Lowy 2006)

La transduction correspond au transfert d'ADN d'une cellule donatrice vers une cellule réceptrice via une capsidie phagique. Le bactériophage peut être virulent ou tempéré.

Bien que la majorité des capsides soient codées par de l'ADN phagique, certaines peuvent l'être par le chromosome. Ainsi, chez de nombreuses protéobactéries, le GTA (Gene Transfer Agent) permet la production d'une capsidie similaire à celle des phages. Des fragments aléatoires d'ADN chromosomiques sont

ensuite encapsidés puis transférés vers d'autres cellules (Lang and Beatty 2001; Lang and Beatty 2007; Stanton 2007).

1.1.3 Conjugaison

La conjugaison est le seul des trois mécanismes cités à nécessiter un contact direct entre les bactéries donatrice et réceptrice (Figure 3). Le lien physique est assuré par un pilus chez les bactéries Gram négatives. Chez les bactéries Gram positives, la nature du contact n'est pas définie, mais certains gènes de conjugaison codent des protéines d'adhésion. Le transfert implique la formation d'un pore de conjugaison, apparenté au système de sécrétion de type IV, un transfert d'ADN simple brin à travers ce pore et une réplication simultanée par le mécanisme du cercle roulant (Llosa et al. 2002; Grohmann et al. 2003; Juhas et al. 2008). Dans la plupart des cas décrits, l'élément transféré (élément conjugatif) code toutes les fonctions nécessaires à leur transfert. D'autres éléments, les éléments mobilisables, ne codent qu'une partie de ces fonctions et utilisent les structures formées par les éléments conjugatifs (Davison 1999; Smillie et al. 2010). L'analyse de la répartition de ces éléments au sein des génomes bactériens suggère le rôle majeur de la conjugaison dans l'adaptation bactérienne (Guglielmini et al. 2011). L'élément conjugatif peut également s'intégrer dans le chromosome et mobiliser l'ADN chromosomique adjacent à l'élément (transfert de type Hfr).

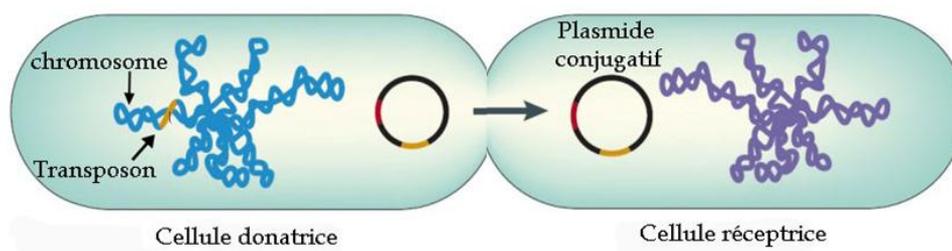


Figure 3 : Représentation schématique du mécanisme de la conjugaison (Furuya and Lowy 2006)

La conjugaison implique un contact physique entre cellules donatrice et réceptrice, la formation d'un pore de conjugaison et le transfert d'un élément conjugatif (ici un plasmide conjugatif).

1.1.4 Nanotubes

Un nouveau système de communication bactérien a été mis en évidence récemment. Des nanotubes intercellulaires permettraient en effet le passage de protéines et d'ADN (plasmide) et donc l'échange d'information entre bactéries voisines, appartenant ou non à la même espèce (Figure 4) (Dubey and Ben-Yehuda 2011). Ce nouveau mécanisme ouvre de nouvelles perspectives d'étude sur les échanges d'information génétique entre les différents organismes d'une communauté microbienne.

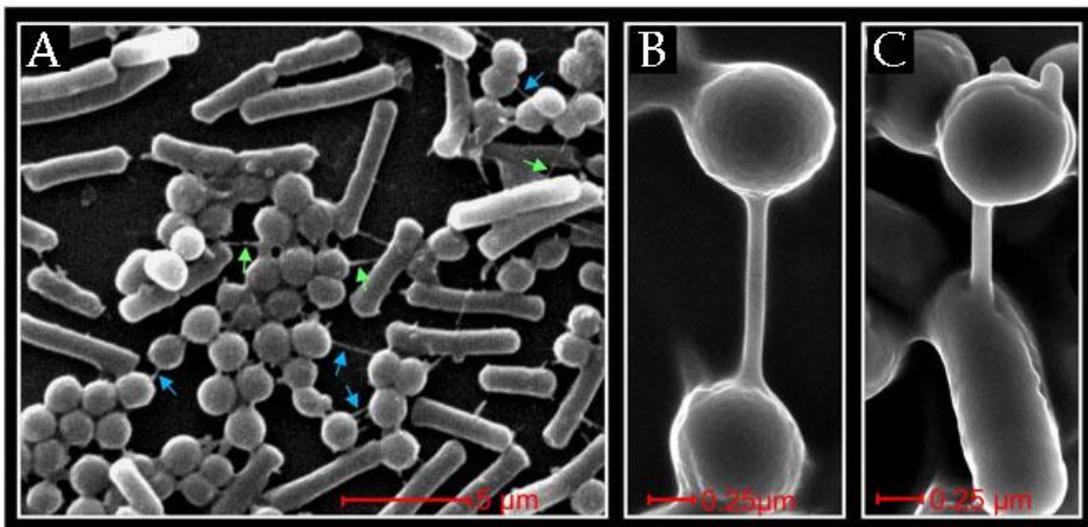


Figure 4 : Nanotubes inter-espèces connectant *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* (Dubey and Ben-Yehuda 2011)

A. Grossissement 12000X d'une population de *B. subtilis* et de *S. aureus*. Les flèches bleues indiquent les prolongements cytoplasmiques ou nanotubes reliant deux *S. aureus*. Les flèches vertes montrent les nanotubes formant une liaison entre *S. aureus* et *B. subtilis*.

B. Grossissement 50000X d'un nanotube reliant deux *S. aureus*.

C. Grossissement 50000X d'un nanotube reliant *S. aureus* et *B. subtilis*.

1.2 Maintien dans la descendance de l'information génétique transférée

Le transfert horizontal implique non seulement le transfert de l'ADN mais également son maintien et sa propagation dans la descendance de l'hôte. Plusieurs mécanismes de maintien ont été décrits. L'ADN acquis peut ainsi soit s'intégrer dans un réplicon de la cellule, soit se répliquer de manière autonome.

1.2.1 Intégration dans un réplicon de la cellule

L'ADN acquis par transfert horizontal intégré dans un réplicon de la cellule sera répliqué et transmis aux cellules filles en même temps que le chromosome. L'intégration peut être codée par la cellule réceptrice (recombinaison homologue ou illégitime) ou par l'élément génétique mobile acquis (transposition ou recombinaison site-spécifique).

La recombinaison homologue joue un rôle majeur dans la réparation des lésions sur l'ADN mais également dans le maintien de l'ADN chromosomique acquis par transformation, transduction et parfois même conjugaison. La recombinaison homologue fait intervenir la protéine RecA, qui va catalyser l'échange de brin, et nécessite des séquences identiques ou presque identiques entre l'ADN entrant et celui de la bactérie réceptrice (Brigulla and Wackernagel 2010). Chez les bactéries naturellement transformables, l'expression du gène *recA* est induite lors de la mise en place de la compétence. De plus, l'entrée de l'ADN simple brin dans la cellule favorise l'action de la protéine RecA et donc l'intégration de l'ADN par recombinaison homologue (Johnsborg et al. 2007). Toutefois, la nécessité de séquences identiques ou presque identiques limite la diversité de l'ADN acquis.

Par opposition à la recombinaison homologue, la recombinaison illégitime sensu stricto correspond à des remaniements entre séquences sans ressemblance particulière ou présentant de très courtes séquences identiques. L'intégration d'ADN par recombinaison illégitime a été rarement décrite quel que soit le mécanisme de transfert. Toutefois, dans de rares cas, après transformation naturelle la recombinaison illégitime a permis l'intégration d'ADN exogène. La fréquence d'intégration est alors beaucoup plus faible qu'avec la recombinaison homologue (Richardson and Park 1997; Hulter and Wackernagel 2008). Il existe cependant un mécanisme appelé « recombinaison illégitime facilitée par l'homologie » (« homology-facilitated illegitimate recombination » ou HFIR). Dans ce cas, une séquence bordée par un fragment présentant une identité ou quasi-identité avec le génome de la réceptrice et un autre sans ressemblance particulière ou avec une courte séquence identique peut être intégrée. Un événement de recombinaison homologue sur le fragment présentant l'homologie s'accompagne d'une recombinaison illégitime sur l'autre. Ce phénomène plus fréquent a été observé chez

des bactéries Gram positives et négatives (de Vries and Wackernagel 2002; Harms and Wackernagel 2008).

La transposition est un mécanisme d'intégration codé par l'ADN acquis, généralement catalysée par une transposase présentant un motif à DDE. Deux modes de transposition existent, non répliquative ou répliquative, qui respectivement déplace ou duplique un élément génétique mobile. Ils impliquent tous les deux une synthèse d'ADN avec la duplication du site cible aux bornes de la séquence intégrée (Polard and Chandler 1995; Toussaint and Merlin 2002).

La recombinaison site spécifique permet l'intégration de la majorité des prophages, dont le génome du phage λ , et des éléments intégratifs conjugatifs. Elle implique des échanges de brins entre de courtes séquences identiques via des clivages et des religations d'ADN sans synthèse d'ADN et sans cofacteur énergétique. Elle est catalysée par des recombinases à tyrosine ou à sérine (Toussaint and Merlin 2002; Brigulla and Wackernagel 2010).

1.2.2. Réplication et ségrégation

Les plasmides se maintiennent en se répliquant sous forme extra-chromosomique en utilisant la machinerie de réplication de l'hôte. Plusieurs mécanismes de réplication nécessitant des séquences et des fonctions codées par l'élément tels que l'origine de réplication ont été décrits. Certaines fonctions apportées par l'élément acquis, telles que le contrôle de l'initiation de la réplication, peuvent permettre une plus grande indépendance vis-à-vis de l'hôte et ainsi faciliter le maintien et la propagation de l'élément (del Solar et al. 1998).

Après réplication, afin de ne pas être perdu lors de la division cellulaire, le plasmide doit être ségrégué dans chacune des cellules filles. Le mécanisme de ségrégation est différent selon le nombre de copies par cellule. Ainsi, les plasmides à haut nombre de copies ont une ségrégation aléatoire. En revanche, les plasmides à bas nombre de copies codent un mécanisme de partition active, similaire à celle du chromosome, permettant une bonne distribution et un maintien du plasmide dans la population (Ghosh et al. 2006). De plus, lors de la réplication, des multimères peuvent être créés ce qui peut induire la perte du plasmide dans certaines cellules filles. Ces co-intégrats sont généralement résolus par une recombinase site spécifique

qui participe ainsi au maintien de l'élément dans la descendance (Figure 5) (Summers 1998).

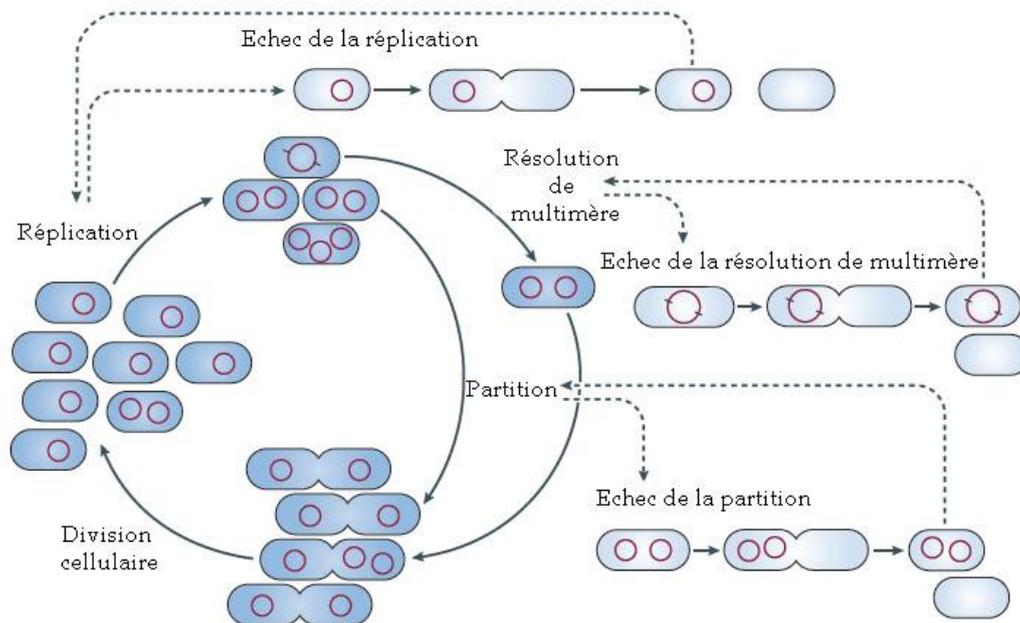


Figure 5 : Système de maintien extrachromosomique par répliation et partition (Pinto et al. 2012)

Le maintien des plasmides dans la descendance nécessite leur répliation impliquant des protéines plasmidiques et de l'hôte. Des multimères peuvent être résolus par l'action de recombinases. Enfin, la partition des plasmides permet une ségrégation correcte dans l'ensemble des cellules filles. Des échecs lors de ces différentes étapes induisent la perte du plasmide dans une partie de la descendance.

1.3 Maintien dans la population de l'information génétique transférée

Pour que le transfert soit considéré comme un succès évolutif, l'information nouvellement acquise doit se répandre au sein de la population. Ceci est généralement dû non seulement au transfert lui-même mais aussi, à un avantage sélectif apporté par l'ADN exogène. Les transferts horizontaux permettent de ce fait aux bactéries de s'adapter à de nouveaux environnements ou de modifier leur mode de vie (Ochman et al. 2000; Gogarten and Townsend 2005). De nombreux transferts impliquent ainsi des gènes de résistance (aux antibiotiques, aux métaux lourds, aux bactériophages), des gènes codant de nouvelles capacités métaboliques ou encore des gènes d'interaction avec un hôte (symbiose, pathogénicité). *Yersinia pestis* est une bactérie pathogène de l'homme, responsable de la peste. Cette bactérie, transmise à l'homme par les puces de rat, provoque des septicémies et le plus souvent la mort (Perry and Fetherston 1997). *Y. pestis* serait un clone issu, il y a moins de 20 000 ans,

de *Yersinia pseudotuberculosis* (Achtman et al. 1999), espèce responsable de gastro-entérites transmise par voie alimentaire. Cette évolution résulterait principalement de l'acquisition par transfert horizontal de deux plasmides pFra et pPla et de l'îlot de pathogénicité HPI. Les 2 plasmides facilitent la transmission par les puces. L'îlot HPI est nécessaire à la croissance dans le sang et est, de ce fait, nécessaire à la transmission par les puces et responsable du caractère hautement pathogène de la bactérie (Schubert et al. 2004b; Williamson and Oyston 2012).

2. Eléments génétiques mobiles et transfert horizontal

2.1 Eléments génétiques mobiles

Les éléments génétiques mobiles sont les acteurs essentiels du transfert horizontal chez les bactéries. Ces éléments sont capables de se transférer entre cellules et/ou de se maintenir après transfert. Traditionnellement, ces éléments étaient classés en trois catégories : les éléments transposables, les plasmides et les prophages. Ces catégories non exclusives se définissent par une capacité spécifique à se maintenir dans les cellules par transposition (éléments transposables), à se maintenir sous forme extrachromosomique (plasmides) ou à se propager par capsid (prophages). De plus, les éléments génétiques mobiles codent souvent des fonctions pouvant conférer un avantage sélectif à l'hôte dans certaines conditions.

2.1.1 Eléments transposables

Les éléments transposables sont capables de se déplacer vers un ou de multiples sites d'intégration et de se maintenir de manière autonome. Ce mouvement peut avoir lieu au sein d'un même réplicon ou de deux réplicons différents, dans le même génome ou entre génomes différents. Deux types principaux d'éléments transposables sont traditionnellement distingués chez les bactéries : les séquences d'insertion (ou IS) et les transposons.

Les IS sont les plus petits éléments génétiques connus capables de transposer de manière autonome. Elles ne codent aucune autre fonction que celle impliquée dans leur mobilité. Pour la majorité des IS, la transposition est codée par une transposase à DDE qui reconnaît les répétitions terminales inversées de l'IS et catalyse la réaction (Mahillon and Chandler 1998; Mahillon et al. 1999; Siguier et al.

2006). Les IS jouent un rôle majeur dans la plasticité des génomes procaryotes. Elles ont été caractérisées dans la plupart des génomes de bactéries ou d'archées.

Les transposons, comme les IS, codent les fonctions nécessaires à leur transfert mais à la différence des séquences d'insertion, ils codent également d'autres fonctions qui peuvent apporter un avantage sélectif à l'hôte. Les transposons sont très répandus au sein des génomes bactériens et très divers, tant au point de vue de l'organisation génétique que du mécanisme de transposition ou des gènes qu'ils portent. Les transposons autonomes sont classés en deux catégories : les transposons composites, flanqués d'IS, et les transposons unitaires (Roberts et al. 2008).

2.1.2 Plasmides

Les plasmides se maintiennent de manière autonome sous forme extra-chromosomique par réplication. La quasi-totalité possède une structure circulaire, mais des plasmides linéaires existent (Mochizuki et al. 2003). Trois mécanismes de réplication existent pour les plasmides circulaires : la réplication θ , similaire au mécanisme de réplication du chromosome, la réplication par cercle roulant et la réplication par échange de brin (del Solar et al. 1998; Lederberg 1998).

Les plasmides sont des acteurs majeurs du transfert horizontal et de l'évolution bactérienne. Ils peuvent en effet porter en plus des gènes de maintien, des gènes apportant un avantage sélectif à l'hôte, comme des gènes de virulence ou de résistance à des antibiotiques. Les plasmides peuvent se transférer par transduction ou par transformation, mais le mécanisme le plus courant semble être la conjugaison. Une grande partie des gros plasmides codent toutes les fonctions nécessaires à leur transfert par conjugaison (plasmides conjugatifs). De nombreux plasmides plus petits codent une partie seulement de ces fonctions et utilisent alors toutes ou une partie des protéines codées par un autre élément conjugatif (plasmides mobilisables). D'autres ne codent que les fonctions impliquées dans la réplication et seront mobilisables seulement sous forme de co-intégrat avec un autre élément conjugatif (del Solar et al. 1998; Smillie et al. 2010).

2.1.3 Prophages

Les prophages codent leur propre transfert via une capsid. Après infection par un phage tempéré, le génome du phage s'intègre généralement dans le

chromosome de la cellule réceptrice par recombinaison site spécifique. L'élément est alors répliqué en même temps que le chromosome et transmis de manière verticale. Certains stimuli, comme les dommages à l'ADN, induisent le cycle lytique du phage avec son excision, sa répllication, son encapsidation puis sa libération de la cellule hôte (Oppenheim et al. 2005). D'autres prophages se maintiennent en se répliquant sous forme de plasmides. Certains prophages, appelés satellites, ne codant qu'une partie des fonctions nécessaires à leur transfert, utilisent des fonctions codées par d'autres phages (Briani et al. 2001).

2.2 Îlots génomiques

Le séquençage des génomes bactériens montre que les gènes acquis par transfert horizontal ne sont pas distribués de manière homogène dans le génome. En dehors des plasmides, prophages et éléments transposables, ces séquences sont regroupées au sein de régions chromosomiques, appelées îlots génomiques (Hacker and Kaper 2000; Juhas et al. 2009). Les îlots génomiques sont définis comme des segments d'ADN chromosomiques de plus de 10 kb acquis par transfert horizontal et codant des fonctions avantageuses pour l'hôte.

Le mécanisme d'acquisition est presque toujours inconnu. Cependant, les îlots sont présents chez certaines souches et absents chez d'autres souches de la même espèce, ce qui implique une acquisition récente par transfert horizontal. De même, ces séquences présentent généralement un pourcentage en GC ou une fréquence d'usage de codons différents du reste du génome de la bactérie hôte. Les îlots génomiques sont fréquemment intégrés dans l'extrémité 3' d'un gène codant un ARN de transfert et sont bordés de répétitions directes, ce qui suggère une intégration site spécifique. Les îlots portent souvent des gènes de mobilité comme des recombinases site spécifique ou des gènes codant des fonctions impliquées dans le transfert conjugatif (Hacker and Kaper 2000; Hacker and Carniel 2001; Hanssen and Ericson Sollid 2006; Manson and Gilmore 2006; Juhas et al. 2009).

La présence fréquente de gènes de mobilité suggère que les îlots génomiques pourraient être des éléments génétiques mobiles ou en dérivant. Certains îlots génomiques sont d'ailleurs capables de s'exciser par recombinaison site spécifique. Le transfert par conjugaison ou transduction a été démontré dans quelques cas (Juhas et al. 2009; Novick et al. 2010).

Les îlots génomiques portent des gènes permettant l'adaptation de microorganismes à leur environnement allant parfois jusqu'à la conquête de nouvelles niches écologiques. Les îlots sont d'ailleurs généralement classés selon le type de fonctions qu'ils codent. Ainsi, les îlots de pathogénicité portent des gènes de virulence. Bien d'autres sous-types ont été décrits tels que les îlots de symbiose, les îlots métaboliques, de résistance, ... (van der Meer and Sentchilo 2003; Dobrindt et al. 2004; Juhas et al. 2009).

2.3 Structure modulaire des éléments

Les éléments génétiques mobiles peuvent être considérés comme une combinaison de différents modules. Chaque module correspond à un groupe de gènes ou de séquences impliqués dans la même fonction biologique telle que la recombinaison, la réplication, la conjugaison, la pathogénicité. Les IS sont composées d'un seul module, le module de transposition. Les prophages, la plupart des plasmides, les transposons et les éléments conjugatifs sont composés d'un ensemble de modules plus complexe, de mobilité intra et/ou inter-cellulaire, de stabilité, de régulation et souvent d'adaptation permettant de conférer un avantage sélectif à l'hôte qui les porte (Toussaint and Merlin 2002).

Les éléments génétiques mobiles évoluent par échange, acquisition et délétion de modules (Toussaint and Merlin 2002). C'est ainsi le cas de phages et de plasmides (Berg et al. 1998; Dougherty et al. 1998; Lucchini et al. 1999; Blatny et al. 2004). Les îlots génomiques présentent souvent des caractéristiques traditionnellement associées à différents types d'éléments mobiles tels que des éléments transposables, des prophages et des plasmides. Après acquisition d'un îlot génomique, la perte des modules d'adaptation conférant un avantage sélectif à l'hôte serait contre-sélectionnée. En revanche, les modules de mobilité ne posséderaient aucune valeur adaptative pour l'hôte et les mutations ou délétions ne seraient pas contre-sélectionnées (Hacker and Kaper 2000; Hacker et al. 2004), ce qui pourrait entraîner la formation d'un îlot non mobile.

Cette structuration en modules ne présente aucun avantage pour la cellule hôte, mais serait avantageuse pour l'élément génétique mobile (Lawrence and Roth 1996). En effet, elle favorise l'échange de blocs de gènes conférant une fonction biologique. Le transfert d'un gène unique, sans les autres gènes impliqués dans la même fonction, n'apporte que rarement une fonction biologique sélectionnable. Le

transfert d'un module permet l'acquisition de fonctions impliquées dans le transfert ou le maintien dans la descendance et peut être avantageuse pour l'élément et/ou l'organisme. L'organisation modulaire participe donc au maintien de l'élément dans la population.

2.4 Nouvelle nomenclature et description des ICE

La nomenclature traditionnelle des éléments mobiles est incohérente car déterminée par le module de maintien pour les plasmides et les transposons et par le module de transfert pour les prophages. De plus, elle ne reflète plus la diversité des éléments caractérisés. Ainsi, certains éléments sont inclus dans deux classes généralement perçues comme distinctes. Par exemple, le génome du phage Mu peut se transmettre grâce à une capsid, c'est donc un prophage. Mais il porte également un gène codant pour une transposase à DDE, cet élément est donc également un transposon (Harshey 2012). De même, le génome du phage N15 porte des caractéristiques de plasmide et de prophage (Ravin 2011). Une classification, basée à la fois sur le mode de transfert de l'ADN (capsid ou conjugaison, autonome ou passif) et le maintien de l'ADN dans la descendance (réplication, ou transposition/intégration) serait plus cohérente. Ainsi, un plasmide conjugatif est un élément qui se transfère par conjugaison et se maintient dans la descendance par réplication.

Les éléments capables de se transférer par conjugaison et de s'intégrer étaient regroupés sous les termes transposons conjugatifs, îlots de symbiose ou de pathogénicité, plasmides intégratifs ou n'étaient pas classés. Ces éléments sont aujourd'hui regroupés sous le nom d'ICE pour éléments intégratifs conjugatifs (« Integrative and Conjugative Element ») (Burrus et al. 2002a; Burrus et al. 2002b). Les ICE sont définis comme l'ensemble de tous les éléments qui codent leur propre transfert par conjugaison et leur maintien par intégration dans un réplicon de la cellule, quels que soient les mécanismes de conjugaison et d'intégration ou la spécificité d'intégration. Les ICE peuvent se répliquer avant ou après le transfert, et ce mécanisme peut être impliqué dans la stabilité de l'élément. De plus, les ICE codent des fonctions qui n'interviennent ni dans le transfert, ni dans le maintien de l'élément mais peuvent apporter un avantage sélectif à l'hôte. Ces fonctions sont très diverses et peuvent entraîner jusqu'à la modification du mode de vie de l'organisme porteur (Tableau 1).

Les ICE, comme les autres éléments génétiques mobiles, sont structurés et évoluent par échange, acquisition et délétion de modules avec d'autres ICE mais également avec des plasmides ou des prophages (Burrus et al. 2002a). Ainsi, les ICE Tn916 (*Enterococcus faecalis*), Tn5801 (*Staphylococcus aureus*) et ICE $_{Lm1}$ (*Listeria monocytogenes*) portent des modules de conjugaison et de régulation apparentés. En revanche, le module de recombinaison est très différent entre Tn916 et les deux autres éléments. Tn916 s'intègre dans de multiples sites chez *E. faecalis* alors que ICE $_{Lm1}$ et Tn5801 s'intègrent spécifiquement dans l'extrémité 3' d'un gène codant la GMP synthase. L'échange du module de recombinaison a conduit au changement de spécificité d'intégration de l'ICE (Figure 6) (Burrus et al. 2002a). De même, Tn916 et Tn5801 portent un module de résistance à la tétracycline tandis qu'ICE $_{Lm1}$ porte un module de résistance aux ions Cd⁺⁺.

Tableau 1 : Exemples d'éléments intégratifs conjugatifs ou ICE

Élément ^a	Espèce (division) ^b	Taille (kb)	Enzyme d'intégration ^c	Site d'intégration ^d	Fonctions portées par l'élément ^e	Référence
pSAM2 ^f	<i>Streptomyces ambofaciens</i> (actinobactéries)	11	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant un ARN ^{tPro}	ND	(Pernodet et al. 1984)
SLP1	<i>Streptomyces coelicolor</i> (actinobactéries)	17	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant un ARN ^{tTyr}	ND	(Bibb et al. 1981)
îlot de pathogénicité	<i>Streptomyces turgidiscabies</i> (actinobactéries)	660	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant une lipide kinase	Pathogénicité	(Kers et al. 2005)
CTnDOT ^e	<i>Bacteroides</i> sp (bacteroidetes)	65	Tyr	Quelques sites (GTTNNTTGG)	Tet ^R Em ^R	(Cheng et al. 2000)
CTnBST	<i>Bacteroides</i> sp (bacteroidetes)	100	Tyr	Un site préférentiel plus des sites multiples	Em ^R	(Wesslund et al. 2007)
<u>Pam100G</u>	<i>Protochlamydia amoebophila</i> (chlamydiaceae)	100	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant un ARN ^{tGly}	ND	(Greub et al. 2004)
ICE_515_tRNA ^{Lys} ^e	<i>Streptococcus agalactiae</i> (firmicutes)	43	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant un ARN ^{tLys}	Facteur CAMP	(Brochet et al. 2008a)
Tn916 ^e	<i>Enterococcus faecalis</i> (firmicutes) <i>Clostridium difficile</i> (firmicutes)	18	Tyr	Site riche en A+T Un site préférentiel	Tet ^R	(Clewell et al. 1995b) (Wang et al. 2000)
<u>Tn5801</u> ^e	<i>Staphylococcus aureus</i> (firmicutes)	25	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant une GMP synthase	Tet ^R	(Kuroda et al. 2001)

Tableau 1 (suite)

Élément ^a	Espèce (division) ^b	Taille (kb)	Enzyme d'intégration ^c	Site d'intégration ^d	Fonctions portées par l'élément ^e	Référence
Tn5397 ^e	<i>Clostridium difficile</i> (firmicutes) <i>Bacillus subtilis</i> (firmicutes)	21	Ser	Site unique	Tet ^R	(Wang et al. 2000)
ICES _{t3} ^e	<i>Streptococcus thermophilus</i> (firmicutes)	28	Tyr	Extrémité 3' du gène codant une fructose 1,6-disphosphate aldolase	Système de restriction modification putatif	(Burrus et al. 2002a)
ICEBs1	<i>Bacillus subtilis</i> (firmicutes)	21	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant un ARN ^t _{Leu}	ND	(Burrus et al. 2002a)
ICE_6180-RD.2	<i>Streptococcus pyogenes</i> (firmicutes)	37	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant un ARN ^t _{Thr}	Protéines putatives, sécrétées et impliquées dans la relation hôte - pathogène	(Sitkiewicz et al. 2011)
TnGBS2 ^e	<i>Streptococcus agalactiae</i> (firmicutes)	34	DDE	Un site préférentiel et des sites multiples, localisés 15-16 pb en amont de la boîte -30 de promoteurs	ND	(Brochet et al. 2008a)
Tn5276	<i>Lactococcus lactis</i> (firmicutes)	70	Tyr	Plusieurs sites dont un préférentiel	Utilisation du saccharose et synthèse d'une bactériocine (nisine)	(Rauch and De Vos 1992)
Tn1549 ^e	<i>Enterococcus</i> sp (firmicutes)	34	Tyr	Régions riches en A+T	Van ^R	(Garnier et al. 2000)

Tableau 1 (suite)

Élément ^a	Espèce (division) ^b	Taille (kb)	Enzyme d'intégration ^c	Site d'intégration ^d	Fonctions portées par l'élément ^e	Référence
Tn5252 ^e	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (firmicutes)	47	Tyr	Extrémité 5' du gene <i>rbgA</i> (GTPase impliquée dans la biogénèse du ribosome)	Résistance aux UV	(Ayoubi et al. 1991)
<u>ICeSe2</u>	<i>Streptococcus equi</i> (firmicutes)	63	Ser	ND	Prélèvement du fer par sidérophore (pathogénicité)	(Heather et al. 2008)
<u>ICELm1e</u>	<i>Listeria monocytogenes</i> (firmicutes)	21	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant une GMP synthase	Résistance aux ions Cd ²⁺	(Burrus et al. 2002a)
ICESde3396 ^e	<i>Streptococcus dysgalactiae subsp. equisimilis</i> (firmicutes)	64	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant la protéine ribosomique L12	Résistance à l'arsenic et aux ions Cd ²⁺	(Davies et al. 2009)
CTn5 ^e	<i>Clostridium difficile</i> (firmicutes)	45	Ser	Site unique dans un gène codant une protéine de surface putative	Transporteur ABC	(Sebahia et al. 2006)
pRS01/facteur sexuel ^f	<i>Lactococcus lactis</i> (firmicutes)	48	ND	Site unique intergénique	Résistance au tellure	(Gasson et al. 1995)
<u>ICEF</u>	<i>Mycoplasma fermentans PG18</i> (firmicutes)	23	ND	Plusieurs sites	ND	(Calcutt et al. 2002)
<u>ICEA</u>	<i>Mycoplasma agalactiae 5632</i> (firmicutes)	27	ND	Plusieurs sites	ND	(Marenda et al. 2006)
ICEMISym ^{R7Ae}	<i>Mesorhizobium loti R7A</i> (protéobactérie α)	502	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant un ARN ^t ^{Phe}	Fixation de N ₂ et nodulation (symbiose)	(Sullivan et al. 2002)

Tableau 1 (suite)

Élément ^a	Espèce (division)	Taille (kb)	Enzyme d'intégration ^b	Site d'intégration ^c	Fonctions portées par l'élément ^d	Référence
<u>Tn4371</u> ^e	<i>Ralstonia sp. A5</i> (protéobactérie β)	55	Tyr	Site principal d'intégration TTTTTCAT	Dégradation du biphenyl	(Springael et al. 1993)
SXT ^e	<i>Vibrio cholerae</i> (protéobactérie γ)	100	Tyr	Extrémité 5' du gène codant la protéine RF3 (terminaison de la traduction)	Suf ^R , Trm ^R , Cam ^R , et Str ^R	(Hochhut and Waldor 1999)
R391 ^e	<i>Providencia rettgeri</i> (protéobactérie γ)	94	Tyr	Extrémité 5' du gène codant la protéine RF3 (terminaison de la traduction)	Kan ^R , Hg ^R	(Boltner et al. 2002)
ICE _{clc} ^e	<i>Pseudomonas knackmussii</i> (protéobactérie γ)	103	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant un ARNt ^{Gly}	Dégradation du 3-chlorobenzoate et du 2-aminophénol	(Ravatn et al. 1998)
ICE _{Ec1}	<i>Escherichia coli</i> (protéobactérie γ)	70	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant un ARNt ^{Asn}	Prélèvement de fer par sidérophore (pathogénicité)	(Schubert et al. 2004a)
ICE _{Hin1056} ^e	<i>Haemophilus influenza</i> (protéobactérie γ)	35	ND	Extrémité 3' d'un gène codant un ARNt ^{Leu}	Amp ^R	(Dimopoulou et al. 1997)
<u>SPI-7</u> ^e	<i>Salmonella enterica</i> (protéobactérie γ)	134	Tyr	Extrémité 3' d'un gène codant un ARNt ^{Phe}	Synthèse d'une capsule (pathogénicité)	(Pickard et al. 2003)
<u>pKLC102</u> ^e	<i>Pseudomonas earoginosa</i> (protéobactérie γ)	104	Tyr	Extrémité 3' de deux gènes codant des ARNt ^{Lys}	Sul ^R , Bet ^R , Spc ^R	(Kiewitz et al. 2000)

Tableau 1 (suite)

Élément ^a	Espèce (division) ^b	Taille (kb)	Enzyme d'intégration ^c	Site d'intégration ^d	Fonctions portées par l'élément ^e	Référence
CTnscr94	<i>Salmonella enterica</i> (protéobactérie γ)	100	ND	Extrémité 3' de deux gènes codant des ARNt ^{Phe}	Utilisation du saccharose	(Hochhut et al. 1997)

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

^b : DDE, transposase à DDE ; ND, non déterminé ; Ser, recombinase à Sérine ; Tyr, recombinase à Tyrosine.

^c : ND, non déterminé.

^d : Amp, ampicilline ; Bet, bromure d'éthidium ; Cam, chloramphénicol ; Em, érythromycine ; Kan, kanamycine ; ND, non déterminé ; Str, streptomycine ; Spc, spectinomycine ; Suf, sulfaméthoxazole ; Sul, sulfonamide ; Tet, tétracycline ; Trm, triméthoprim ; Van, vancomycine.

^e : Divers ICE étroitement apparentés ne sont pas indiqués dans ce tableau.

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

Les échanges de modules entre éléments pourraient être expliqués notamment par l'intégration d'un élément dans un autre, puis par recombinaison, délétion, mutation. Ainsi, Tn5253 est un ICE composite provenant de l'intégration d'un élément de type Tn916 (Tn5251) dans un élément de type Tn5252 (Ayoubi et al. 1991).

Par ailleurs, des ICE comme SXT peuvent se transférer vers une souche possédant déjà un ICE apparenté et s'intégrer en tandem avec l'ICE résident et/ou se recombiner avec celui-ci. De plus, SXT et les ICE apparentés codent 3 protéines homologues aux protéines phagiques Exo-Bet impliquées dans la réparation ou la recombinaison (Garriss et al. 2009; Chen et al. 2011). Les protéines SXT-Exo et SXT-Bet participeraient à l'échange de gènes, par recombinaison homologue, entre deux éléments apparentés intégrés en tandem au sein d'une même cellule. Ce mécanisme pourrait être l'un des moteurs de l'évolution modulaire des ICE (Garriss et al. 2009).

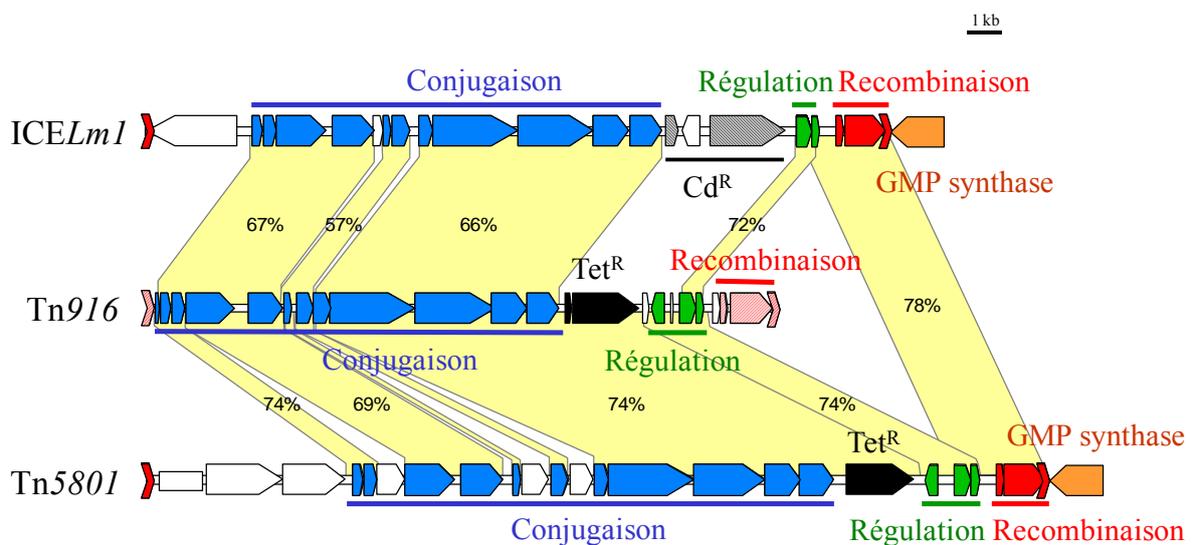


Figure 6 : Structure modulaire des éléments génétiques mobiles ICE $Lm1$, Tn916 et Tn5801

Ces trois éléments présentent une structure modulaire. Chaque module comprend un groupe de gènes ou de séquences impliqués dans la même fonction biologique comme le module de conjugaison (bleu), le module de régulation (vert), de recombinaison (rouge) et d'adaptation (noir). Les trois éléments portent des modules de conjugaison et de régulation apparentés mais Tn916 et ICE $Lm1$ contiennent soit un module de recombinaison différent, soit un module d'adaptation différent. Cette différence explique la différence de spécificité entre les éléments et souligne une évolution par échange de modules des éléments génétiques mobiles. Les surfaces jaunes représentent les identités nucléotidiques.

Tet^R, résistance à la tétracycline ; Cd^R, résistance aux ions cadmium.

Des analyses de génomes effectuées sur les grandes divisions bactériennes avaient suggéré que ces éléments sont extrêmement répandus. Des ICE putatifs ont en effet été caractérisés au sein des firmicutes (Burrus et al. 2002a; Auchtung et al. 2005), des actinobactéries (de Poele et al. 2008), des bacteroidetes (Cheng et al. 2000) et des protéobactéries (Sullivan et al. 2002; van der Meer and Sentchilo 2003; Schubert et al. 2004a; Burrus et al. 2006; Roberts and Mullany 2009). Une analyse globale récente de plus de mille génomes procaryotiques a montré que les modules de conjugaison chromosomiques sont plus répandus que les modules de conjugaison plasmidiques, suggérant ainsi que les ICE seraient très répandus dans la communauté bactérienne et seraient les éléments conjugatifs les plus abondants dans tous les clades bactériens (Guglielmini et al. 2011). Ces éléments sont même isolés au sein de bactéries à petit génome et/ou intracellulaires obligatoires telles que *Mycoplasma fermentans* (Calcutt et al. 2002), *Mycoplasma agalactiae* (Marenda et al. 2006), *Rickettsia massiliae* (Blanc et al. 2007) ou encore *Protochlamidia amoebophila* (Greub et al. 2004) alors qu'il était admis que ces bactéries n'évoluaient pas par transfert horizontal. Chez la bactérie intracellulaire obligatoire *Orientia tsutsugamushi* 185 copies d'ICE putatifs partiellement délétées ont été mises en évidence, soit environ 700 kb d'éléments ce qui représente plus du tiers du génome de cette bactérie (Nakayama et al. 2008).

3. Transfert conjugatif des ICE

Le transfert des ICE se réalise en quatre étapes : l'excision du chromosome sous forme circulaire, le transfert par conjugaison puis l'intégration dans un réplicon de la cellule hôte. Ensuite, l'élément doit se maintenir dans la descendance de la cellule réceptrice.

3.1 Excision/intégration

L'excision et l'intégration des ICE sont catalysées par une intégrase codée par l'élément. Comme pour les prophages, ces intégrases appartiennent à trois familles, le plus souvent une recombinase à tyrosine, plus rarement une recombinase à sérine ou transposase à DDE (Burrus et al. 2002b; Brochet et al. 2009).

3.1.1 Recombinase à tyrosine

Les intégrases à tyrosine catalysent les réactions d'excision et d'intégration des éléments génétiques mobiles grâce à un résidu tyrosine. Elles réalisent des coupures décalées des deux brins et des religations successives afin de procéder à l'échange de brin. De ce fait, elles catalysent une recombinaison site spécifique entre de courtes séquences identiques contenues dans le site *attI* porté par la forme circulaire de l'ICE (*attP* pour les phages) et dans le site chromosomique d'insertion *attB*. Cela aboutit à l'intégration de l'élément dans un réplicon de la cellule qui est alors bordé par les deux copies d'une répétition directe appartenant aux sites *attL* et *attR* créés par la recombinaison (Figure 7) (Smith and Thorpe 2002; Groth and Calos 2004; Grindley et al. 2006).

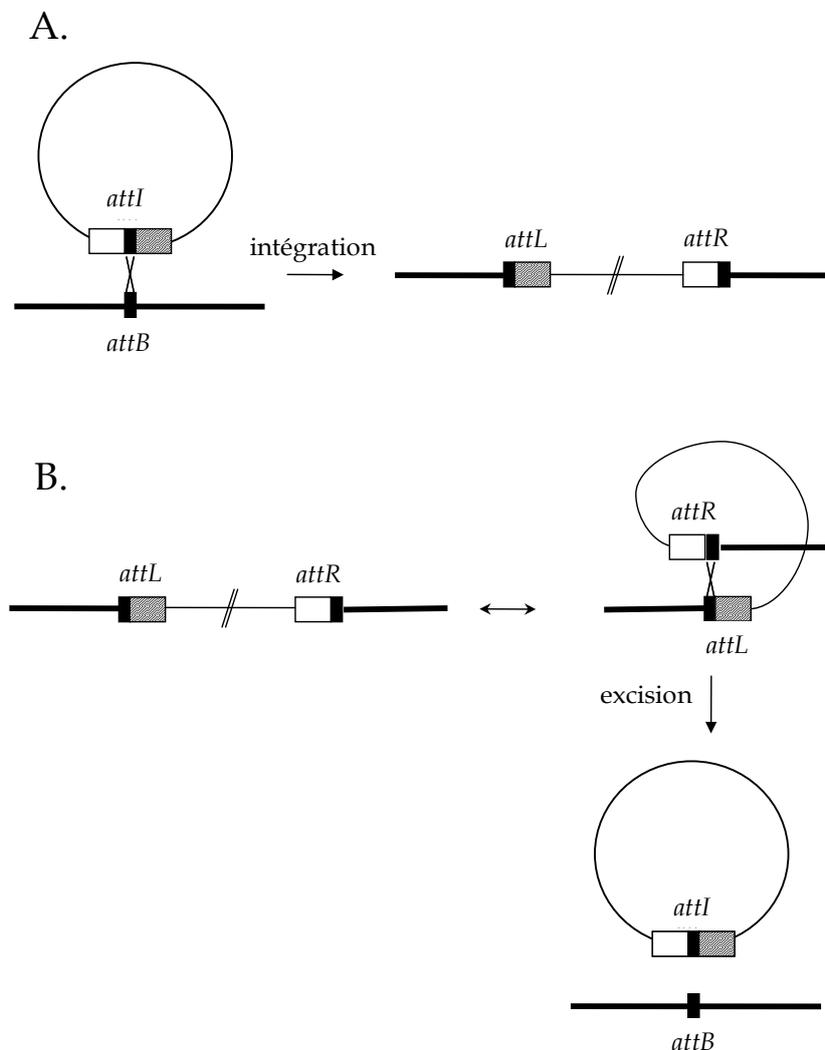


Figure 7 : Représentation schématique de l'intégration et de l'excision des ICE catalysées par les recombinases à tyrosine

A. Intégration

L'intégrase seule catalyse la recombinaison entre les séquences identiques des sites *attI* et *attB* (rectangles noirs) ce qui aboutit à l'intégration de l'ICE dans le réplicon. L'élément est alors bordé des sites *attL* et *attR*.

B. Excision

Une recombinaison catalysée par l'intégrase entre les séquences identiques des sites *attR* et *attL* portés par la même molécule et orientés dans le même sens conduit à l'excision de l'ICE sous forme circulaire ainsi qu'à la formation des sites *attB* et *attI*. Des cofacteurs codés par l'élément et par l'hôte, participent à la réaction d'excision, notamment en courbant l'ADN.

Les rectangles blancs et hachurés représentent respectivement les bras des sites *attR* et *attL* et leurs équivalents dans le site *attI*.

La structure des sites de recombinaison *att* est très bien définie chez les prophages, notamment λ . Ils comportent une région core contenant les séquences identiques où a lieu la recombinaison. Les sites *attL* et *attR* portent également des séquences, dénommées bras, contenant des sites de fixation de la recombinase à tyrosine, ainsi que des cofacteurs protéiques codés par l'élément ou par l'hôte, viennent se fixer. Ces bras sont retrouvés de part et d'autre de la séquence core du site *attP* mais sont absents du site *attB* (Figure 8) (Gottfried et al. 2000; Groth and Calos 2004). Chez les ICE, la nature exacte des sites *attL* et *attR* n'est pas encore caractérisée.

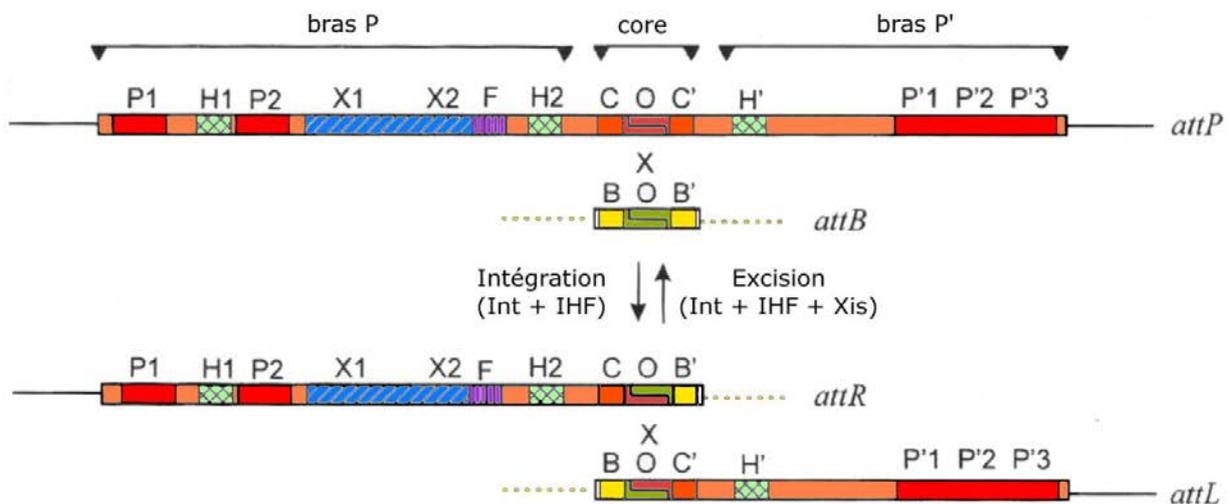


Figure 8 : Structure des sites de recombinaison site-spécifique du phage λ (Gottfried et al. 2000)

Le site O correspond à la séquence à l'intérieur de laquelle s'opère l'échange de brins. Les sites B, B', C et C' sont les séquences de fixation à faible affinité reconnues par l'intégrase. Elle se fixe en revanche avec une forte affinité sur les sites P. Les sites H, X et F symbolisent respectivement les sites de fixation des protéines accessoires IHF, Xis et Fis.

L'excision d'un phage ou d'un ICE par une intégrase implique une recombinaison site-spécifique entre les sites *attL* et *attR* (Figure 7). Chez les phages codant une recombinase à tyrosine, l'excision est dépendante, en plus de l'intégrase, d'un co-facteur protéique RDF (« recombination directionality factor »). Ce co-facteur, codé par l'élément, est presque toujours une petite protéine basique appelée excisionase, qui va déterminer la proportion d'éléments se trouvant sous forme intégrée et sous forme libre (Lewis and Hatfull 2001). La majorité des ICE codant une intégrase nécessitent également la présence d'un RDF lors de leur excision (Raynal et al. 1998; Cheng et al. 2001; Connolly et al. 2002; Mullany et al. 2002; Burrus and Waldor 2003; Sutanto et al. 2004; Ramsay et al. 2006; Lee et al. 2007).

De même, des facteurs d'hôte peuvent intervenir dans la réaction d'excision ou d'intégration. Ainsi, l'intégration de CTnDOT chez *E. coli* nécessite le facteur d'hôte IHF (« integrated host factor ») (Cheng et al. 2002). De même, l'excision de Tn916 est stimulée par le facteur d'hôte Hu (« heat unstable ») (Connolly et al. 2002).

3.1.2 Recombinase à sérine

Les recombinases à sérine constituent la seconde famille des recombinases sites spécifiques. Elles catalysent une recombinaison entre des sites *attI* et *attB*. Cependant, l'acide aminé catalytique est une sérine et le mécanisme de recombinaison est différent de celui des recombinases à tyrosine. En effet, les recombinases à sérine vont réaliser des coupures simples brin décalées sur l'ensemble des brins avant de procéder à l'échange de brin et à la religation (Grindley et al. 2006).

Tn5397 de *Clostridium difficile* est le seul ICE bien caractérisé qui code une recombinase à sérine. Cette enzyme est nécessaire et suffisante pour réaliser l'intégration et l'excision de cet ICE (Wang and Mullany 2000; Wang et al. 2000). D'autres ICE de cette espèce bactérienne (CTn5, CTn2 et CTn7), ICES_{e2} de *Streptococcus equi*, ICES_{Sp2905} et ICES_{Sp1108} de *S. pyogenes* ainsi que Tn1806 de *S. pneumoniae* codent une recombinase à sérine putative (Sebahia et al. 2006; Camilli et al. 2008; Heather et al. 2008; Brenciani et al. 2011). Parmi ces éléments, CTn2, CTn5, CTn7 et ICES_{Sp2905} s'excisent et se transfèrent (Brouwer et al. 2011; Giovanetti et al. 2012).

3.1.3 Transposase à DDE

Les transposases à DDE catalysent la transposition de la plupart des IS et transposons. Les éléments sont bordés de répétitions inversées et les trois acides aminés catalytiques de la transposase (deux aspartates et un glutamate) vont permettre les coupures et échanges de brins. L'intégration provoque une duplication de la séquence cible (Polard and Chandler 1995). Les deux ICE TnGBS1 et TnGBS2 de *S. agalactiae* codent une transposase à DDE qui est nécessaire et suffisante pour leur excision et leur intégration (Brochet et al. 2009). ICE6013 de *Staphylococcus aureus* code également une transposase à DDE (Smyth and Robinson 2009). Enfin, ICEF de *Mycoplasma fermentans* et les éléments apparentés ne codent pas de recombinase à tyrosine ou à sérine. De plus, la présence de répétitions inverses terminales ainsi que la duplication de courtes séquences de la cible, différentes selon le lieu d'intégration, laissent à penser que ces éléments pourraient coder des transposases à DDE (Calcutt et al. 2002; Marendia et al. 2006).

L'excision des ICE est la première étape avant le transfert conjugatif et est donc indispensable pour que ce dernier se réalise. Chez Tn916 et les ICE apparentés, l'expression des gènes du module de conjugaison est induite par la circularisation, cette étape d'excision apparaît donc comme un pré-requis important au transfert conjugatif (Celli and Trieu-Cuot 1998).

3.2 Transfert d'ADN par conjugaison

3.2.1 Transfert simple brin

3.2.1.1 Contact entre cellules donatrice et réceptrice

Le transfert conjugatif nécessite un contact entre les cellules donatrice et réceptrice. Pour les plasmides conjugatifs des bactéries Gram négatives, le contact est établi par l'intermédiaire d'un pilus. Le pilus est un appendice tubulaire principalement constitué de piline. Deux types de pili existent : ceux produits par le plasmide F et les plasmides apparentés qui sont longs et souples et ceux produits par les plasmides de la famille IncP qui sont petits et rigides. Le pilus s'attacherait à la membrane externe de la cellule réceptrice et permettrait ainsi un contact entre les

deux cellules. Le pilus, produit par le plasmide F, se rétracterait après contact par dépolymérisation des sous-unités de pilines, fonctionnant ainsi comme un grappin attirant la cellule réceptrice. Cette rétraction est impossible avec l'autre type de pilus qui serait plutôt éliminé par cassage. Après le rapprochement, le pore de conjugaison peut être mis en place entre les deux partenaires permettant le transfert de l'ADN (Chen et al. 2005; Schroder and Lanka 2005). Deux études démontrent également que le pilus du plasmide F permettrait déjà le transfert d'ADN simple brin entre deux bactéries distantes avant rétraction (Babic et al. 2008; Shu et al. 2008).

Les ICE SXT de *V. cholerae*, PAPI-1 de *P. aeruginosa* et BTF-37 de *Bacteroides fragilis* codent tous les trois un système de mise en place de pilus (Beaber et al. 2002; Vedantam and Hecht 2002; Carter et al. 2010).

Pour la majorité des bactéries Gram positives, les éléments conjugatifs ne codent pas de pilus et la nature du contact n'est pas établie (Burrus et al. 2002b; Grohmann et al. 2003). Toutefois, chez les entérocoques, certains plasmides conjugatifs codent un système d'agrégation particulier. Les cellules réceptrices synthétisent et diffusent des phéromones spécifiques. Les plasmides conjugatifs, en réponse aux phéromones, synthétisent à la surface cellulaire des adhésines ou protéines d'agrégation qui facilitent le contact entre cellules donatrice et réceptrice (Clewell 1993). L'ICE pRS01 de *Lactococcus lactis* code une protéine d'agrégation apparentée à celles des plasmides conjugatifs des entérocoques (Godon et al. 1994).

3.2.1.2 Pore de conjugaison

Le transfert de l'ADN est assuré par deux systèmes, le pore de conjugaison et le relaxosome, reliés entre eux par une protéine de couplage. La structure et la mise en place du pore de conjugaison ont été particulièrement étudiées chez les plasmides conjugatifs des bactéries Gram négatives, notamment pour le plasmide F d'*E. coli*. La structure du pore permettant le transfert d'ADN par *Agrobacterium tumefaciens* a également été très étudiée. Le pore de conjugaison est apparenté au système de sécrétion de type IV ou T4SS. Le pore de conjugaison est un complexe multiprotéique constitué d'ATPases fournissant une partie de l'énergie au système, de protéines formant le pore et d'une protéine dite de couplage qui fera le lien entre l'ADN à transférer et le pore, et fournira également de l'énergie au système (Figure 9) (Cascales and Christie 2003; Chen et al. 2005; Christie et al. 2005).

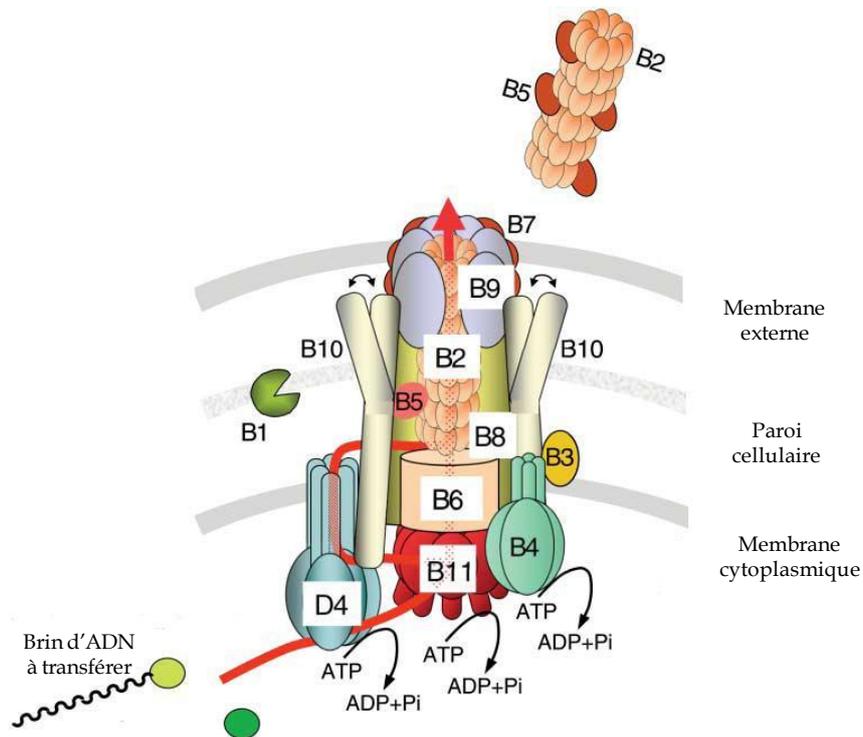


Figure 9 : Transfert conjugatif de l'ADN par le système VirB/D4 d'*Agrobacterium tumefaciens* (Chen et al. 2005)

La protéine de couplage, VirD4, ainsi que les deux ATPases VirB11 et VirB4 sont localisées sur la face cytoplasmique de la membrane interne. La protéine de couplage, grâce à un peptide signal chargé positivement, va recruter puis diriger vers le système d'export certains composants du pore. La protéine VirB1 est une hydrolase du peptidoglycane qui va faciliter la mise en place de certains constituants du pore situé dans le périplasma ou la membrane externe. Les protéines VirB6 et VirB10 pourraient servir d'échafaudage pour l'assemblage du système, en particulier le complexe constitué d'une imbrication des protéines VirB7, VirB9 et VirB10. Les protéines VirB6 et VirB8, en contact avec le substrat à transporter, seraient de bons candidats pour la constitution du pore dans la membrane interne. La protéine VirB2 est le composant majeur du pilus

Lors du transfert, la relaxase et le brin d'ADN liés covalamment (formant avec d'autres facteurs protéiques le relaxosome) se fixe sur la protéine de couplage. Le transfert met en jeu des échanges vers les différents composants du pore, les différentes ATPases fournissant l'énergie nécessaire. La chaîne comprenant les pilines (VirB2) et les protéines apparentées aux sécrétines (VirB9) permet la translocation de l'ADN.

La nature du pore de conjugaison des ICE a été peu étudiée. Les analyses bioinformatiques suggèrent que, pour les ICE présents chez les bactéries Gram négatives, elle pourrait être identique à celle des plasmides conjugatifs (Wozniak and Waldor 2010). Les ICE coderaient comme les plasmides conjugatifs la totalité des

protéines du T4SS. ICE*Ec1* de *E. coli* code ainsi un système de sécrétion de type 4 complet impliqué dans le transfert de l'élément (Schubert et al. 2004a). ICE*MISym*^{R7A} de *Mesorhizobium loti* contient lui aussi un T4SS, apparenté à ceux du plasmide Ti ou RP4 (Sullivan et al. 2002). Les éléments de la famille SXT code un système T4SS apparenté à ceux des plasmides conjugatifs IncA/C (Wozniak et al. 2009a). Par ailleurs, les éléments appartenant à la famille d'ICE*Hin1056*, ICE*clc* ou PAPI-1 code un T4SS appartenant à une nouvelle classe, qui n'avait jamais été identifié auparavant chez les plasmides (Mohd-Zain et al. 2004; Juhas et al. 2007; Juhas et al. 2008; Carter et al. 2010).

Les pores de conjugaison des ICE des bactéries Gram positives sont mal connus. Toutefois, 1 à 4 gènes appartenant aux modules de conjugaison des ICE ou plasmides conjugatifs des firmicutes sont homologues aux gènes *virB1*, *virB4*, *virB11* ou *virD4* des T4SS des bactéries Gram négatives (Figure 9) (Burrus et al. 2002a; Grohmann et al. 2003; Wozniak and Waldor 2010). La protéine VirD4 est la protéine de couplage du système, VirB4 et VirB11 sont deux ATPases, la protéine VirB1 est une hydrolase du peptidoglycane localisée dans la membrane externe et le périplasme et qui facilite la mise en place des protéines du pore de conjugaison. ICE*Bs1* de *B. subtilis* porte un gène codant une protéine homologue à la protéine de couplage VirB4 de l'élément Ti. Cette protéine nécessaire au transfert conjugal est localisée aux pôles de la cellule (Berkmen et al. 2010). D'autres protéines de conjugaison de différents plasmides conjugatifs de bactéries Gram positives ou négatives sont également détectées aux pôles suggérant une mise en place localisée du pore (Judd et al. 2005; Li et al. 2005; Bauer et al. 2011).

3.2.1.3 Transfert d'ADN

Le transfert a été particulièrement étudié pour les plasmides conjugatifs. La relaxase initie le transfert conjugal de l'ADN en se fixant au niveau de l'origine de transfert (*oriT*) de l'élément (Byrd and Matson 1997; de la Cruz et al. 2010). Des protéines accessoires codées par l'hôte (telles qu'IHF) et par l'élément vont également se fixer sur l'*oriT*, formant ainsi le relaxosome. La fixation de ces protéines permettra à l'*oriT* d'être dans la bonne conformation, de stabiliser le complexe ADN-relaxase et d'activer ou d'augmenter l'activité ou la spécificité de cette dernière. La relaxase réalise, au niveau du site *nic* de l'*oriT*, une coupure site et brin spécifique qui permettra d'initier la réplication par cercle roulant de l'élément, nécessaire au

transfert (Howard et al. 1995; Karl et al. 2001; Ragonese et al. 2007; Wong et al. 2012). Cette réaction de trans-estérification est réalisée par une tyrosine catalytique de la relaxase. Elle aboutit à la formation d'une liaison covalente entre l'extrémité 5'-phosphate de l'ADN et la protéine. Le monomère de relaxase fixé à l'ADN simple brin est alors reconnu par la protéine de couplage qui va faire le lien entre le pore de conjugaison et le relaxosome. Une activité hélicase portée ou non par la relaxase va dérouler l'ADN et permettre la réplication par cercle roulant de l'élément chez la cellule donatrice (Figure 10) (Byrd and Matson 1997; Matson et al. 2001; Llosa et al. 2002; de la Cruz et al. 2010; Lucas et al. 2010).

En plus du rôle d'intermédiaire entre les deux complexes, relaxosome et pore de conjugaison, la protéine de couplage fournit l'énergie nécessaire au transfert via son activité ATPasique (Llosa et al. 2002). Cette protéine appartient à la famille des protéines SpoIIIE/FtsK impliquées dans de nombreux processus de transfert de l'ADN entre compartiments cellulaires (Kaimer and Graumann 2011). D'autres ATPases du pore permettront la translocation de l'ADN et de la relaxase vers les composants structuraux du pore de conjugaison et donc le transfert vers la cellule réceptrice (Chen et al. 2005). Après transfert d'une copie complète de l'ADN sous forme simple brin vers la cellule réceptrice, un second résidu tyrosine de la relaxase catalyse la re-circularisation de l'élément transféré (Grandoso et al. 2000). La réplication de l'ADN à partir de l'extrémité 3' par cercle roulant dans la cellule donatrice permet à l'élément d'être présent, après transfert, à la fois chez les cellules réceptrice et donatrice. L'ADN simple brin de la cellule réceptrice est quant à lui répliqué grâce à des primases, codées ou non par l'élément, qui permettent l'initiation de la synthèse d'ADN à partir d'amorces ARN (Wilkins and Thomas 2000; Parker and Meyer 2005).

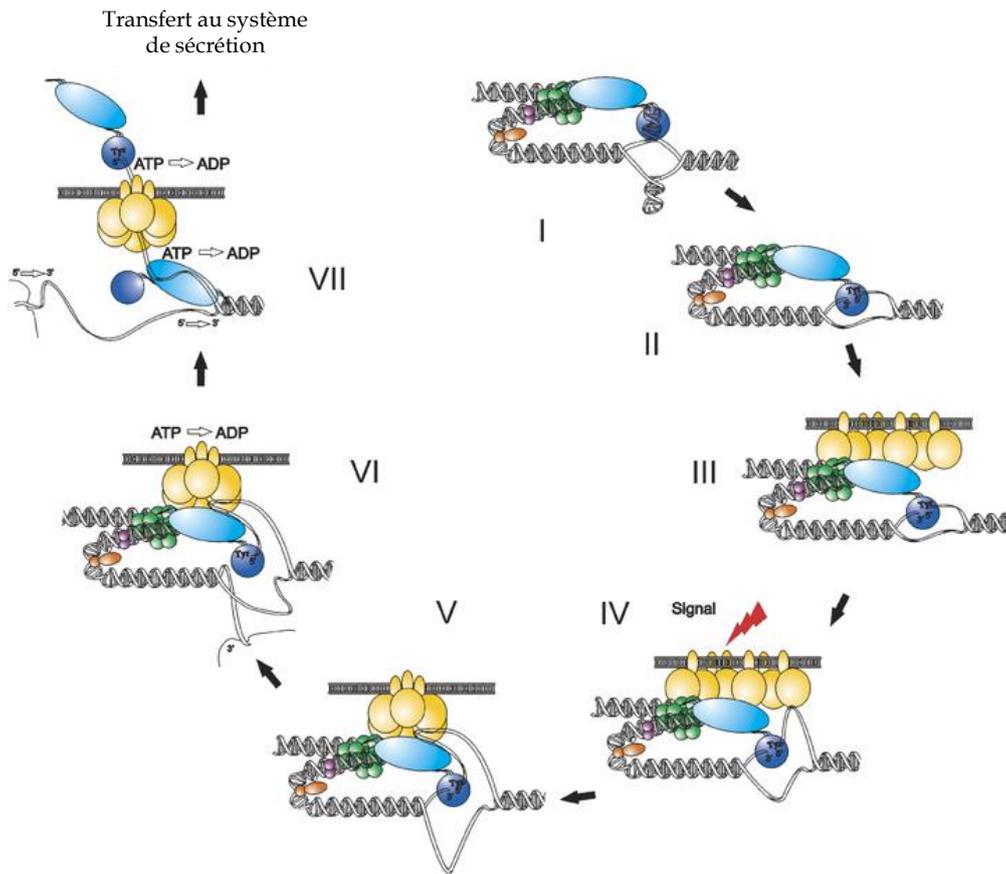


Figure 10 : Représentation schématique du processus de transfert du plasmide F de *E. coli* (de la Cruz et al. 2010)

- I. Formation du relaxosome. La relaxase et d'autres protéines se fixent au niveau de l'origine de transfert qui prend une configuration adéquate pour le clivage.
- II. La tyrosine catalytique de la relaxase réalise une coupure simple brin au niveau du site *nic*.
- III. La relaxase vient se lier à la protéine de couplage.
- IV. Signaux permettant d'induire le transfert du brin d'ADN.
- V. Déroulement de l'ADN par le domaine hélicase de la relaxase.
- VI. Utilisation de l'ATP pour pomper l'ADN vers le pore de conjugaison.
- VII. Passage de l'ADN et de la relaxase à travers le pore de conjugaison vers la cellule réceptrice.

Le mécanisme de transfert des ICE semble similaire à celui des plasmides conjugatifs. L'origine de transfert d'un petit nombre d'ICE a été décrite (Scott et al. 1994; Jaworski and Clewell 1995; Li et al. 1995a; Srinivas et al. 1997; Mills et al. 1998; Lee et al. 2007; Ceccarelli et al. 2008; Miyazaki and van der Meer 2011). ICE_{clc} est le seul ICE connu et l'un des très rares éléments conjugatifs possédant deux origines de transfert fonctionnelles. Les deux *oriT* sont dépendants de la même relaxase codée par l'élément et permettent le transfert de l'ICE avec la même efficacité. La délétion de l'un des deux *oriT* entraîne une diminution de la fréquence de transfert de l'ICE d'un facteur 4. La présence des deux *oriT* semble donc apporter un avantage sélectif à

l'élément. Toutefois, le fait que les deux *oriT* soient fonctionnelles ne signifie pas qu'elles soient utilisées en même temps au sein d'un même élément (Miyazaki and van der Meer 2011).

Un gène codant une relaxase putative a été identifié chez tous les ICE autres que ceux des actinobactéries, toutefois les relaxases et les coupures simple brin qu'elles catalysent n'ont été caractérisées que dans quelques cas (Srinivas et al. 1997; Rocco and Churchward 2006; Lee et al. 2007; Miyazaki and van der Meer 2011). De plus, le transfert de l'ADN simple brin n'a été démontré que chez Tn916 (Scott et al. 1994). Les protéines formant le relaxosome des ICE ont également été peu étudiées. La protéine de l'hôte IHF (integrated host factor) de SXT est nécessaire au transfert conjugatif de cet élément à partir de *V. cholerae* (McLeod et al. 2006). Une protéine de couplage putative est toujours identifiée au sein du module de conjugaison des différents ICE, toutefois leur impact sur le transfert conjugatif n'a jamais été étudié. La protéine de couplage d'ICEBs1 se trouve concentrée, avec d'autres protéines du module de conjugaison au pôle des cellules (Berkmen et al. 2010). Par ailleurs, des primases ont été identifiées chez les ICE CTn341 de *Bacteroides* et ICE-A de *Mycoplasma agalactiae* mais leur rôle dans la répllication de l'élément n'a pas été étudié (Bacic et al. 2005; Marendia et al. 2006).

3.2.2 Transfert double brin

Le processus de conjugaison est très différent pour la majorité des plasmides et des ICE des actinobactéries (Figure 11). L'un des transferts les mieux connus est celui de l'ICE pSAM2 de *Streptomyces ambofaciens*. pSAM2 s'excise du chromosome puis se réplique de manière autonome par cercle roulant (Hagege et al. 1993; Possoz et al. 2001). Ensuite, cet élément se transfère vers la cellule réceptrice sous forme double brin (Possoz et al. 2001). Le pore de conjugaison des actinobactéries est très différent de celui précédemment décrit. Il ne nécessite qu'une seule protéine Tra (encore appelée TraB ou TraSA) qui est une translocase à ADN apparentée aux protéines FtsK ou SpoIIIE. Ces deux dernières sont des pompes à ADN impliquées notamment dans la répartition des chromosomes lors de la sporulation ou de la division cellulaire (Kaimer and Graumann 2011). La protéine Tra se fixe non covalamment sur une région non codante *clt* (*cis* acting locus of *t*ransfer) de l'élément conjugatif (Reuther et al. 2006; Vogelmann et al. 2011). Des hexamères de protéines Tra formeraient un pore et permettraient via son domaine ATPasique la translocation

de l'ADN de la cellule donatrice vers la cellule réceptrice. Après transfert, l'élément se réplique de nouveau avant d'envahir le mycélium et de s'intégrer dans le chromosome (Possoz et al. 2001).

Si le transfert intermycélien ne nécessite que le gène *tra*, la dissémination intramycélienne de l'élément requiert entre trois et sept protéines supplémentaires. Ces protéines formeraient un complexe multiprotéique avec la protéine Tra et permettraient la translocation de l'ADN au niveau des septa (Hagege et al. 1993; Grohmann et al. 2003; Thoma and Muth 2012). L'envahissement du mycélium permet de mettre en évidence une autre caractéristique du transfert conjugatif des actinobactéries. L'échange génétique est en effet visible à l'œil nu via la formation de « pocks » qui correspondent au retard de croissance dû à la dissémination rapide de l'élément conjugatif. L'expression des protéines de transfert et particulièrement de Tra provoque en effet une inhibition de croissance et un retardement de différenciation (Hagege et al. 1993; Grohmann et al. 2003; Thoma and Muth 2012).

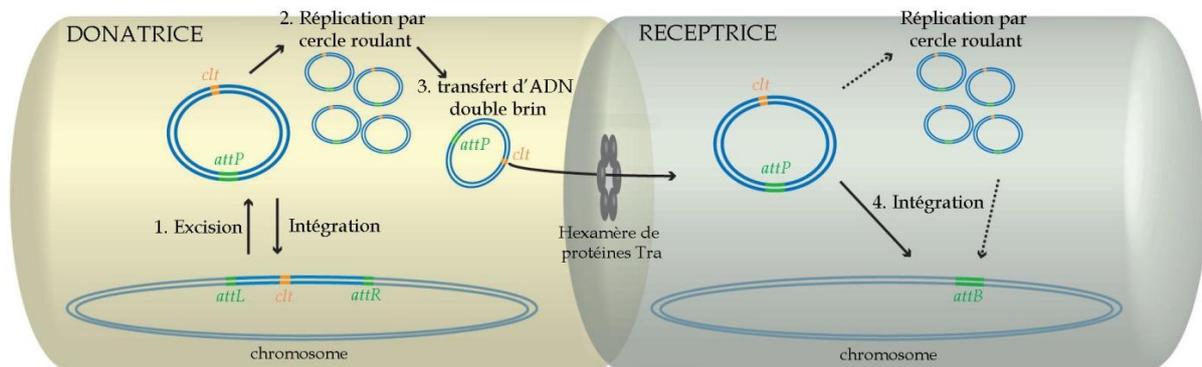


Figure 11 : Modèle de transfert des plasmides conjugatifs et des ICE chez les Streptomyces (Bordeleau et al. 2012)

1. L'ICE s'excise du chromosome via une recombinaison site spécifique entre les sites *attL* et *attR*.
2. L'ICE se réplique par cercle roulant dans la cellule donatrice.
3. L'élément se transfère sous forme double brin. La seule protéine nécessaire est Tra, qui sous forme d'hexamère crée le pore de conjugaison. Elle reconnaît l'élément à transférer via la région non codante *cIt*. La protéine Tra porte un domaine ATPasique nécessaire à la translocation de l'ADN.
4. Après transfert, l'ICE se réplique par cercle roulant puis va envahir le mycélium par conjugaison. Cette étape nécessite, en plus de la protéine Tra, 3 à 7 protéines qui formeront un complexe protéique avec Tra. Pour se maintenir, l'ICE s'intègre dans le chromosome de la cellule réceptrice.

L'analyse des génomes des actinobactéries révèle que les ICE se transférant sous forme double brin avec une protéine de transfert apparentée à FtsK sont courants (te Poele et al. 2008; Ghinet et al. 2011; Bordeleau et al. 2012). Une recherche sur 275 génomes d'actinomycètes a en effet mis en évidence 144 ICE de ce type. La grande majorité de ces éléments se trouve dans le sous-groupe des actinomycètes. Cela s'expliquerait par le fait que le mécanisme de transfert des ces ICE est adapté à la croissance en hyphe des actinomycètes, hyphes composés de cellules présentant des copies multiples de génomes. Chez les autres actinobactéries, ce type d'élément conjugatif ne se transfère pas efficacement et ne persiste pas dans la population.

4. Mobilisation d'ADN

Les ICE, comme les plasmides conjugatifs, permettent le transfert d'autres séquences d'ADN. On dit que ces séquences sont mobilisées. La mobilisation sera active, si l'élément mobilisé code des fonctions impliquées dans son transfert. Elle peut aussi être passive si l'élément mobilisé n'apporte aucune fonction nécessaire au transfert. On classe les événements de mobilisation en deux catégories : (i) mobilisation en *trans* où la molécule mobilisée n'a pas besoin d'être co-intégrée avec l'élément mobilisateur et (ii) mobilisation en *cis* dans le cas où une co-intégration est nécessaire.

4.1 Mobilisation en *trans*

Certains plasmides ou éléments intégratifs portent des séquences ou/et codent des fonctions leur permettant d'être mobilisés à distance par des éléments conjugatifs (mobilisation en *trans*). Ces éléments, qualifiés de mobilisables, portent leur propre origine de transfert (*oriT*) (Salyers et al. 1995b; Rawlings and Tietze 2001). La grande majorité des éléments mobilisables connus codent une relaxase et souvent une à quatre protéines impliquées dans la formation du relaxosome (Rawlings and Tietze 2001). L'analyse de plus de 1000 génomes de procaryotes a permis de mettre en évidence 402 gènes chromosomiques isolés codant une relaxase et n'appartenant pas à un module de conjugaison, suggérant ainsi que la mobilisation en *trans* d'éléments chromosomiques serait très répandue (Guglielmini et al. 2011).

Les éléments intégratifs, mobilisables en *trans*, ont été regroupés sous le nom d'éléments intégratifs mobilisables ou IME (Integrative and Mobilizable Elements) (Burrus et al. 2002a). Les IME s'excisent de manière autonome sous forme circulaire. Ils sont ensuite mobilisés en *trans* par des plasmides conjugatifs ou des ICE. Enfin, ils s'intègrent dans le génome de la réceptrice.

Ainsi, chez *Bacteroides*, les IME NBU (Non replicating Bacteroides Units) codent leur propre excision ainsi que leur relaxase qui va aller cliver leur origine de transfert. Toutefois, ils utilisent le pore de conjugaison d'ICE CTnDOT (Li et al. 1995b; Salyers et al. 1995b) ou de plasmides conjugatifs. Le transfert de divers IME de *Bacteroides* et de *Clostridium* codant leur propre relaxase a été démontré. Leur intégration est catalysée par une recombinase à tyrosine ou à sérine. Elle peut être site spécifique ou non.

Les éléments de type SGI1 de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium sont mobilisés par les plasmides du groupe d'incompatibilité IncA/C (Mulvey et al. 2006; Douard et al. 2010). La relaxase n'a pas été identifiée.

Par ailleurs, les ICE de la famille SXT/R391 mobilisent en *trans* des îlots intégrés dans le chromosome. Ces éléments portent leur propre origine de transfert apparentée à celle de SXT, ainsi qu'un module de recombinaison, mais ne codent aucune protéine de conjugaison. Toutefois, pour s'exciser, ils requièrent une activation par les régulateurs d'ICE SXT/R391. Ils utilisent ensuite la relaxase et la machinerie de conjugaison de l'ICE. Le transfert de ces IME est donc induit, comme SXT ou R391, par les agents endommageant l'ADN comme les UV ou la mitomycine C (voir la partie 6) (Hochhut et al. 2000; Daccord et al. 2010; Daccord et al. 2012).

Enfin, MTnSag1 est l'IME le plus atypique identifié à l'heure actuelle. Cet élément de 1,7 kb est le plus petit IME connu. Il ne porte que 2 gènes codant une transposase à DDE et la résistance aux lincosamides. De plus, son origine de transfert se situe dans ce gène de résistance et n'est pas apparentée à celle de l'élément mobilisateur, Tn916 (Achard and Leclercq 2007). L'élément tISCpe8 de *Clostridium perfringens* apparenté à MTnSag1 est mobilisé de façon similaire par Tn916 (Lyras et al. 2009)

Les relaxases initient toutes la réplication par cercle roulant de l'élément cible. Cependant, certaines, les relaxases répliquatives, sont impliquées dans le maintien par réplication des plasmides dans la descendance de la cellule (réplication

intracellulaire) tandis que d'autres, les relaxases conjugatives, sont impliquées dans le transfert conjugatif (réplication intercellulaire d'un brin dans la cellule donatrice et de l'autre dans la cellule réceptrice). Jusqu'à des temps très récents, l'on croyait que les relaxases répliquatives et conjugatives appartenaient à des types différents de relaxases et que les fonctions de mobilisation et de réplication étaient toujours distinctes. Toutefois, la relaxase conjugative d'*ICEBs1* est aussi impliquée dans la réplication intracellulaire de l'élément (voir par ailleurs partie 5.1.1.2) (Lee et al. 2010). De plus, *ICEBs1* mobilise en *trans* trois plasmides qui étaient auparavant considérés comme non mobilisables. En effet, ces plasmides se répliquent par cercle roulant mais ne contiennent pas d'origine de transfert distincte de l'origine de réplication et ne codent pas de relaxase conjugative distincte de la relaxase répliquative, (Lee et al. 2012). Leur mobilisation nécessite la protéine de couplage et la machinerie de conjugaison d'*ICEBs1*. La relaxase utilisée est la relaxase répliquative des plasmides. Ainsi, des plasmides à réplication par cercle roulant, considérés jusque là comme non mobilisables, sont mobilisables en *trans* par certains ICE. L'impact des ICE sur la diversité et la plasticité des génomes bactériens serait donc encore plus important que celui évalué initialement.

4.2 Mobilisation en cis

Contrairement à la mobilisation en *trans*, la mobilisation en *cis* résulte de la co-intégration d'une séquence d'ADN avec un élément conjugatif. Elle ne requiert que l'expression du système de transfert de l'élément mobilisateur. Les séquences d'ADN mobilisées ne présentent donc pas nécessairement de caractéristiques particulières.

Ainsi, le plasmide conjugatif p42a de *Rhizobium etli* mobilise le plasmide pSym après fusion (Brom et al. 2004). De même, des séquences chromosomiques peuvent être mobilisées en *cis* par un plasmide conjugatif après formation d'un co-intégrat. Ainsi, l'intégration du plasmide F dans le chromosome d'*E. coli* par recombinaison homologue ou illégitime aboutit à la mobilisation à haute fréquence des gènes adjacents au plasmide (mobilisation de type Hfr). Dans ce cas, l'origine de transfert de l'élément sous forme intégré est reconnue par la relaxase puis clivée ce qui va initier le transfert. Les régions situées en 5' de l'*oriT* seront ainsi transférées vers la cellule réceptrice, dont la région chromosomique adjacente à l'élément. Le transfert est donc unidirectionnel. L'intégration dans la cellule réceptrice de l'ADN transféré

se fera par recombinaison homologue ou illégitime (Haas et al. 1981; Singer et al. 1989).

Certains ICE peuvent mobiliser des séquences d'ADN chromosomique en *cis*. Ainsi, SXT de *Vibrio cholerae* mobilise jusqu'à 500 kb d'ADN chromosomique de manière Hfr (Hochhut et al. 2000). De plus, les îlots mobilisés en *trans* par SXT peuvent à leur tour mobiliser en *cis* des séquences chromosomiques (Daccord et al. 2010). De même, les échanges de larges fragments chromosomiques via les îlots génomiques de *S. agalactiae* jouent un rôle majeur dans la dynamique des génomes de cette bactérie (Brochet et al. 2008b).

Certains ICE vont également mobiliser en *cis* des plasmides dans lesquels ils se sont intégrés tel que les ICE de *Bacteroides* ou ICE_{PdaSpa1} présent chez un pathogène de poisson (Salyers et al. 1995a; Osorio et al. 2008). A l'inverse, Tn916 ne mobilise ni le chromosome, ni les plasmides dans lesquels il s'intègre. Cela s'explique par le fait que cet ICE doit être sous forme circulaire pour exprimer les gènes de transfert et de mobilisation. En effet, le promoteur du module de conjugaison n'est présent que sous forme extra-chromosomique (Celli and Trieu-Cuot 1998).

Enfin, l'analyse de certains ICE démontre qu'il s'agit d'éléments composites contenant d'autres éléments qu'ils vont donc mobiliser en *cis* lors de leur transfert. Ainsi, CTnDOT contient un IME (Whittle et al. 2001) et l'ICE SPI-7 de *Salmonella enterica* contient un prophage (Pickard et al. 2003). L'ICE Tn5253, de type Tn5252, contient Tn5251 apparenté à Tn916 (Ayoubi et al. 1991). De même, CTn12256 de *Bacteroides* contient CTnDOT, les deux ICE étant fonctionnels (Wang et al. 2011). De plus, de nombreux ICE portent des IS ou des transposons qui sont transférés en même temps qu'eux et sont donc mobilisés en *cis*.

4.3 Modèle d'évolution des ICE par accrétion/mobilisation

L'analyse des éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène *fda* de *S. thermophilus* dans diverses souches a révélé la présence d'ICE_{St1}, d'ICE_{St3} ou d'éléments dépourvus de module de régulation, de recombinaison ou de conjugaison, mais bordés de sites *att* apparentés à ceux des ICE. De plus, ICE_{St1}, intégré dans ce site chez *S. thermophilus* CNRZ368, possède un site *attL* interne (*attL'*). L'élément compris entre les sites *attR* et *attL'* (ICE_{St2}) s'excise seul alors que l'élément compris entre *attL*

et *attL'* ne code aucune fonction nécessaire à la recombinaison ou au transfert et ne s'excise pas seul. Cependant, *ICESt1* s'excise par recombinaison entre *attL* et *attR*. *ICESt1* est ainsi un élément composite formé d'*ICESt2* et d'un élément mobilisable en *cis*. Ce nouveau type d'élément mobilisable a été nommé CIME (Cis Mobilizable Element) (Pavlovic et al. 2004).

De plus, *ICESt3* se transfère vers des souches de *S. thermophilus* qu'elles contiennent ou non des ICE ou CIME apparentés intégrés dans *fda* (Bellanger et al. 2009) Dans ce dernier cas, *ICESt3* s'intègre en tandem avec l'élément résident. De plus, à partir de cette structure en tandem, *ICESt3* peut mobiliser un CIME en *cis* et permettre ainsi le transfert par conjugaison des deux éléments (Bellanger et al. 2011).

Les données ainsi obtenues suggèrent que les ICE de *S. thermophilus* évoluent selon un modèle d'accrétion-mobilisation (Figure 12) (Pavlovic et al. 2004; Bellanger et al. 2011). Les CIME apparaissent par délétion totale ou partielle des modules de régulation, de recombinaison et de conjugaison d'un ICE, mais gardent des sites *att* flanquants. Une souche porteuse d'un CIME peut ensuite acquérir un ICE apparenté par conjugaison. L'ICE s'intégrerait alors par recombinaison site-spécifique dans un des sites *att* flanquant le CIME. Cette intégration conduit à l'accrétion de l'ICE et du CIME et génère un nouvel élément composite porteur d'un site *att* interne et de nouveaux modules. Le nouvel ICE ainsi formé peut ensuite s'exciser et se transférer par conjugaison. Le CIME est alors mobilisé en *cis* par l'ICE. Le site *att* interne pourra ensuite évoluer par délétion partielle ou totale, les éléments composites ne portent généralement pas de site de recombinaison interne fonctionnel (Pavlovic et al. 2004).

D'autres ICE putatifs seraient impliqués dans les accrétions sites-spécifiques avec des CIME. Ainsi, l'analyse génomique des différents îlots de *S. agalactiae* révèle la présence de nombreux sites *att* internes ainsi que de nombreux ICE ou CIME putatifs (Brochet et al. 2008a). L'exemple le plus frappant est l'îlot ISL3-MIT-9312 de la cyanobactérie marine *Prochlorococcus* (Coleman et al. 2006). Cet élément contient en effet 13 répétitions qui pourraient correspondre à des sites *att* ou à des vestiges de sites *att*. Il pourrait ainsi être composé de 12 éléments intégrés en tandem. Ainsi, l'accrétion et la mobilisation joueraient un rôle essentiel dans l'évolution des ICE et plus généralement des îlots génomiques.

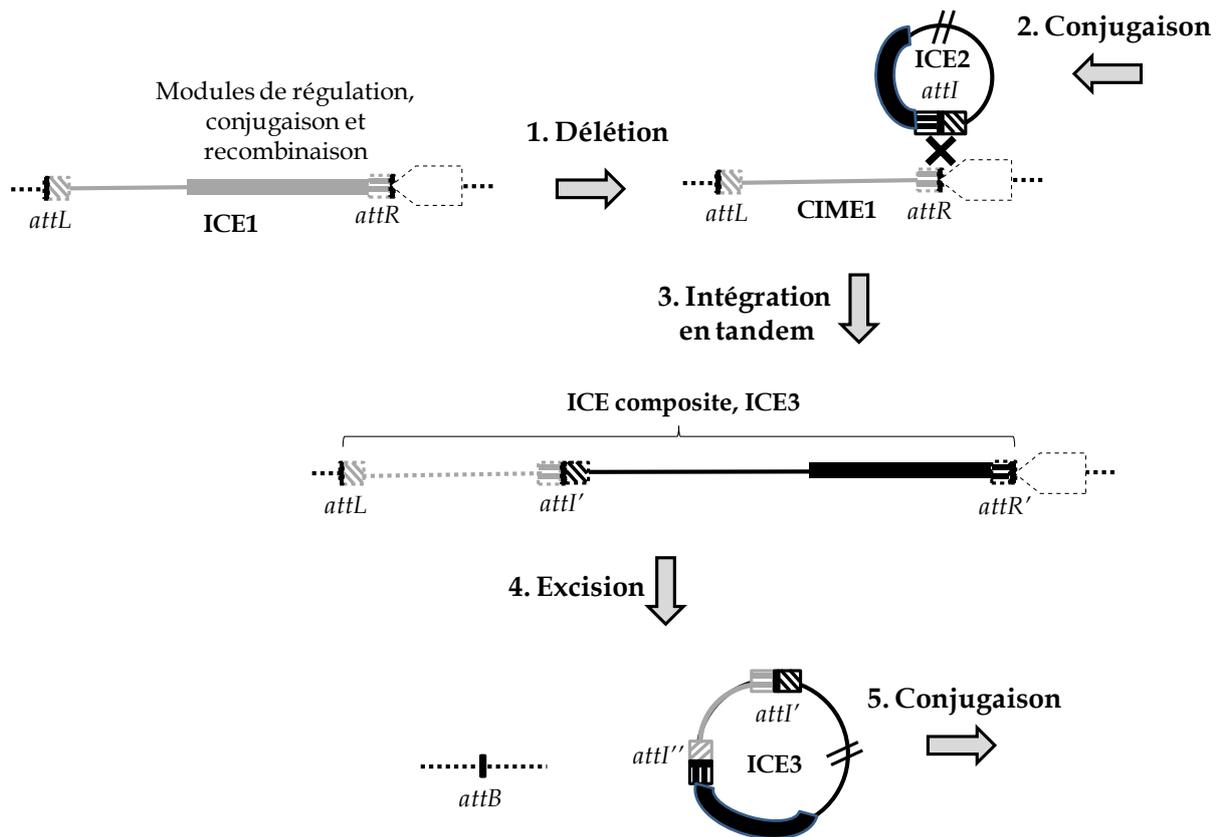


Figure 12 : Modèle d'évolution des ICE et des CIME par délétion, accrétion site-spécifique et mobilisation en *cis* (Pavlovic et al. 2004; Bellanger et al. 2011).

La séquence d'ICE1 et les séquences en dérivant sont représentées en gris. La séquence d'ICE2 est représentée en noir. La séquence identique entre les différents sites *att* est représentée par un rectangle noir. Les séquences spécifiques aux sites *attL* et *attR* sont représentées par des carrés hachurés respectivement de manière oblique et horizontale.

Un CIME apparaît par délétion totale ou partielle des modules de régulation, recombinaison et conjugaison d'un ICE (ICE1). Une cellule porteuse d'un CIME peut acquérir par un nouvel événement de conjugaison un second ICE (ICE2). Ce dernier s'intégrera par recombinaison site-spécifique dans un site *att* flanquant le CIME (ici *attR*). L'intégration aboutit à la formation d'un site *attI* interne (ici *attI'*) de structure similaire à celle présente sur la forme circulaire d'un ICE. L'ensemble ainsi formé constitue un nouvel ICE (ICE3) qui peut s'exciser par recombinaison site spécifique entre *attR'* et *attL* et se transférer par conjugaison. ICE3 résulte de l'accrétion d'ICE2 et de CIME1. ICE2 mobilise en *cis* CIME1.

5. Mécanismes de maintien des ICE

Pour que le transfert soit détectable, il faut que l'élément acquis par conjugaison se maintienne dans la descendance de la cellule réceptrice en étant transmis aux cellules filles lors de la division cellulaire. Pour ce faire, l'ICE peut

utiliser des fonctions qu'il code ou bien des mécanismes codés par la cellule réceptrice. De même, afin de se maintenir dans la cellule réceptrice, l'ADN ne doit pas être dégradé.

Enfin, pour que le transfert soit considéré comme un succès évolutif, l'élément doit se maintenir et se répandre dans la population.

5.1 Maintien des ICE dans la cellule réceptrice et sa descendance

5.1.1 Maintien grâce à des fonctions codées par l'ICE

5.1.1.1 Recombinases

Dans la grande majorité des cas, l'ICE code une recombinase à tyrosine qui, après transfert, catalyse l'intégration site spécifique de l'élément dans un réplicon, ce qui assure son maintien dans la descendance de la cellule réceptrice (voir paragraphe 3.1) (Wozniak and Waldor 2010).

Dans ce cas, l'intégration ne modifie généralement pas la séquence du gène cible car la recombinaison se produit entre des séquences identiques portées par le site *attI* et le site *attB*, ce dernier contenant le plus souvent l'extrémité 3' du gène cible. L'intégration de l'élément reconstitue un gène entier au niveau du site d'intégration. De nombreux ICE s'intègrent dans un site unique, généralement dans l'extrémité 3' de gènes très conservés comme des gènes codant un ARNt ou une protéine ribosomique (Dimopoulou et al. 2002; Williams 2002; Lee et al. 2007; te Poele et al. 2008; Brochet et al. 2008a; Bellanger et al. 2009). Certains ICE présentent cependant d'autres spécificités d'insertion. Ainsi l'ICE SXT s'intègre dans l'extrémité 5' du gène *prfC* codant une protéine impliquée dans la terminaison de la traduction. Il modifie la séquence en acides aminés de la protéine codée par *prfC*, mais cette dernière reste cependant fonctionnelle (Hochhut and Waldor 1999). L'ICE Tn916, s'intègre de façon spécifique dans une région intergénique chez *Clostridium difficile* (Wang et al. 2000). TnGBS1 et TnGBS2 s'intègrent toujours à 15-16 pb en amont de la boîte -35 de promoteurs mais sans influencer significativement la transcription des gènes en aval (Brochet et al. 2009). Globalement, l'intégration de ces ICE ne diminuerait pas la valeur adaptative de l'hôte.

D'autres ICE ont une spécificité moindre et vont s'intégrer dans de multiples sites. L'ICE CTnBST de *Bacteroides* s'intègre préférentiellement dans 50% des cas dans une région intergénique où il ne modifie ainsi pas la séquence de gènes de l'hôte. En

revanche, il possède de nombreux sites secondaires d'intégration dont certains sont dans des gènes. L'intégration de CTnBST ne reconstitue pas les gènes et l'élément et l'intégration est donc mutagène (Wesslund et al. 2007). D'autres éléments, tels que Tn916 ou Tn1549 s'intègrent dans des régions d'ADN riches en A+T, présentant une courbure naturelle, chez la quasi-totalité de leurs hôtes (Lu and Churchward 1995; Clewell et al. 1995b; Garnier et al. 2000). Contrairement aux ICE à intégration site spécifique, ces éléments interrompent de nombreux gènes. L'ICE Tn916 est d'ailleurs fréquemment utilisé afin de réaliser des mutagenèses insertionnelles aléatoires (Hosking et al. 1998; Smidt et al. 1999; Whetzel et al. 2003; Cookson et al. 2011). Ce type d'intégration peut être contre-sélectionné par la cellule hôte et aboutir à la perte de l'élément au sein de la population.

5.1.1.2 Réplication

Selon la définition originelle (Burrus et al. 2002a), les ICE se transmettent à la descendance uniquement sous forme intégrée, la réplication n'intervenant que pendant le transfert simple brin ou dans les périodes précédant et suivant le transfert double brin.

Les ICE présents chez les actinomycètes pluricellulaires, s'excisent, se répliquent dans la cellule donatrice puis se transfèrent sous forme double brin. Ils se répliquent également dans la cellule réceptrice après le transfert, cellule contenant de nombreuses copies du génome. Ils se transfèrent ensuite par un autre mécanisme vers les autres cellules du mycélium avant de s'intégrer dans chacune des copies du chromosome de chaque cellule. La réplication de l'ICE après son transfert assure donc l'invasion de l'organisme par l'élément (Possoz et al. 2001; te Poele et al. 2008).

Toutefois, des études de plus en plus nombreuses tendent à prouver que la réplication intracellulaire joue également un rôle notable dans le maintien des ICE se transférant sous forme simple brin. Divers éléments, ICE ou IME, tels que ICE_{6180_RD.2} de *S. pyogenes*, pP36 de *Legionella pneumophila*, ICESt3 de *S. thermophilus* ou NBU1 des *Bacteroides* sont ainsi présents, dans certaines conditions, en multicopies sous forme extra-chromosomique (Wang et al. 2001; Doleans-Jordheim et al. 2006; Carraro et al. 2011; Sitkiewicz et al. 2011).

Les ICE de la famille ICE_{Hin1056}-pKLC102, très répandus chez les protéobactéries γ , sont également présents sous forme extra-chromosomique dans certaines conditions (Dimopoulou et al. 1997; Leaves et al. 2000; Klockgether et al.

2007). Ainsi, *ICEHin1056* est trouvé chez les transconjugants non seulement sous forme intégrée mais aussi sous forme circulaire (Dimopoulou et al. 1997; Leaves et al. 2000). De même, jusqu'à trente formes circulaires de *pKLC102* ont été observées par cellule. La réplication intracellulaire et sa participation au maintien de ces éléments sous forme extra-chromosomique n'ont pas été démontrés. Cependant, ils portent tous des gènes codant des protéines homologues à celles impliquées dans le maintien de plasmides sous forme extrachromosomique, en particulier des homologues de la protéine ParA impliquée dans la partition des plasmides ou de l'hélicase DnaB (Mohd-Zain et al. 2004; Juhas et al. 2007; Klockgether et al. 2007).

Le mécanisme de réplication intracellulaire n'a cependant été étudié que pour trois ICE. L'îlot de symbiose *ICEMISym^{R7A}* de *Mesorhizobium loti* pourrait se maintenir sous forme circulaire via une réplication par cercle roulant impliquant la relaxase et l'origine de transfert (Ramsay et al. 2006). De même, *ICEBs1* peut se répliquer sous forme extra-chromosomique par cercle roulant de manière autonome (Lee et al. 2010). Cette réplication s'initie au niveau de l'origine de transfert et implique deux protéines codées par l'élément, la relaxase et un facteur stimulant une hélicase codée par l'hôte. La réplication requiert d'autres protéines codées par l'hôte telles que la polymérase PolC (Lee et al. 2010; Thomas et al. 2013). Enfin, les ICE de la famille *TnGBS1* et *TnGBS2* se répliquent sous forme extra-chromosomique chez les cellules donatrice et réceptrice. Toutefois, contrairement à *ICEBs1*, la réplication utilise un mécanisme similaire à la réplication thêta des plasmides des firmicutes (Guerillot et al. 2013). De plus, ces deux éléments, contrairement à tous les autres ICE connus se transférant sous forme simple brin, possèdent un module de réplication distinct du module de transfert.

La réplication d'un ICE permettrait son maintien dans la cellule donatrice et participe donc à la stabilité de l'élément. En effet, la cinétique de ré-intégration d'un ICE après une étape d'excision n'est pas instantanée et peut être lente. La réplication permet aux éléments de se maintenir sous forme circulaire dans une population en croissance (Lee et al. 2010). Par ailleurs, lorsqu'un ICE se transfère vers une nouvelle cellule hôte, il est fort probable que, dans la population ou biofilm, de très nombreuses cellules soient dépourvues de cet élément. La réplication et la présence d'un nombre élevé de copies circulaires pourrait favoriser son transfert et ainsi l'envahissement de la population par l'élément, de façon similaire à l'invasion d'un mycélium par les ICE à transfert double brin.

5.1.2. Maintien grâce à des fonctions codées par la cellule réceptrice

Les ICE par définition codent leur propre maintien principalement par intégration et potentiellement par réplication. Aucun cas ne fait clairement référence à un ICE s'intégrant par recombinaison illégitime.

L'intégration des ICE par recombinaison homologue est rare. Elle n'a été observée que pour ICEBs1, dans des conditions de laboratoire. En effet, lorsque l'intégrase d'ICEBs1 est remplacée par un gène de résistance au chloramphénicol, l'élément peut s'exciser si un plasmide exprime l'intégrase dans la cellule donatrice. Si l'intégrase n'est pas exprimée chez la cellule réceptrice, la fréquence de conjugaison est très faible. L'ICE s'intègre alors par un mécanisme *recA* dépendant dans une séquence homologue à l'élément (Lee et al. 2007). De même, le transposon conjugatif CTn4-*bt* des *Bacteroides*, dont le transfert nécessite l'induction par les gènes régulateurs de CTnDOT, s'intègre dans un réplicon de la cellule réceptrice par recombinaison homologue. Tn5385, élément composite d'*Enterococcus faecalis*, s'excise par recombinaison entre les 2 copies d'IS1216 flanquantes, se transfère par conjugaison et s'intègre dans un réplicon de la cellule réceptrice par recombinaison homologue (Rice and Carias 1998).

5.1.3 Barrières au maintien et au transfert d'ADN

5.1.3.1 Système d'exclusion

Les interactions entre cellules donatrice et réceptrice n'aboutissent pas toujours à un transfert d'ADN. En effet, des protéines codées par des éléments résidents peuvent neutraliser ce processus. Ainsi, la plupart des plasmides conjugatifs code au moins un système d'exclusion qui réduit la fréquence d'acquisition de plasmides apparentés. Deux types d'exclusion sont décrits : une exclusion de surface et une exclusion d'entrée. Ces mécanismes ont été très étudiés pour les plasmides mais restent mal connus pour les ICE.

Le plasmide F code les 2 types d'exclusion, qui agissent indépendamment et inhibent la capacité d'une cellule à acquérir un nouvel élément apparenté à celui qu'elle porte déjà. La protéine TraT est responsable d'une exclusion de surface. Elle est localisée dans la membrane externe et inhibe la stabilisation du pore de conjugaison (Achtman et al. 1977). La protéine TraS est quand à elle impliquée dans

une exclusion d'entrée. Elle est localisée dans la membrane interne et interagit avec la protéine TraG de la cellule donatrice pour inhiber le transfert d'ADN dans les cellules déjà porteuses du plasmide F (Achtman et al. 1977; Anthony et al. 1999; Audette et al. 2007).

Bien que peu d'ICE aient été étudiés dans cette perspective, plusieurs d'entre eux présentent une immunité de surconjugaison. Ainsi, les ICE de la famille SXT/R391 codent un système d'exclusion d'entrée dépendant de l'interaction des protéines Eex (« entry exclusion ») et TraG codées respectivement par les cellules réceptrice et donatrice. Les analyses des couples d'allèles Eex/TraG ont montré l'existence de 2 groupes d'exclusion différents : S (SXT) et R (R391) (Marrero and Waldor 2007). Ce système réduit spécifiquement la fréquence d'acquisition d'un élément de même groupe mais non celle d'un élément de l'autre groupe (Hochhut et al. 2001; Marrero and Waldor 2005).

De même, l'ICE pSAM2 porte un gène codant une protéine impliquée dans l'immunité de surconjugaison (Possoz et al. 2003). Il s'agit de la protéine Pif (pour « pSAM2 immunity factor ») qui réduit la fréquence d'acquisition d'une nouvelle copie de l'élément d'un facteur 2000 lorsqu'elle est présente chez la cellule réceptrice. Le mode d'action de cette protéine est cependant inconnu.

Bien que les ICE soient souvent intégrés en tandem avec des éléments non apparentés ou des éléments apparentés dépourvus de modules de conjugaison ou de régulation, la quasi-totalité des ICE n'est présente qu'en copie unique dans les génomes, suggérant l'existence de mécanismes d'exclusion. Cependant, certains ICE présentant une faible spécificité d'insertion peuvent être retrouvés en copies multiples dans le même génome, intégrées dans des sites différents. Ainsi, l'ICE le mieux connu Tn916 s'intègre de façon peu spécifique, ne possède pas de système d'exclusion et est parfois trouvé en copies multiples (Clewell et al. 1995a). L'ICE TnGBS1 code une transposase à DDE, a une spécificité d'intégration faible et est souvent observés en trois copies dans *S. agalactiae* Nem316, suggérant l'absence de tels systèmes (Brochet et al. 2009). De même, ICEF de *Mycoplasma fermentans* est observé en copies multiples intégrées dans des sites différents (régions intergéniques, gène codant une sous-unité ATPase d'un transporteur ABC, gène codant la transposase d'une IS) (Calcutt et al. 2002).

5.1.3.2 Dégradation de l'ADN entrant

5.1.3.2.1 Système de restriction modification

Les systèmes de restriction-modification ou systèmes RM sont très répandus chez les bactéries et les archées. Ils sont généralement codés par des modules de 2 à 3 gènes adjacents. Plusieurs types de système RM existent. Les systèmes RM de type I sont constitués de protéines multimériques composées de trois polypeptides un assurant la spécificité, un autre la modification (méthylation) et le dernier possédant une activité endonucléasique. La méthylation va rendre l'ADN résistant à l'endonucléase (Wilson and Murray 1991; Chen et al. 2005; Ishikawa et al. 2005). Les systèmes RM constituent un mécanisme de défense cellulaire clivant l'ADN étranger double brin non modifié. La majorité des éléments conjugatifs se transfère sous forme simple brin, l'ADN entrant est donc protégé de la restriction. Par la suite, l'ADN est ensuite répliqué et peut alors devenir la cible d'un système RM. Toutefois, les ADN exogènes peuvent occasionnellement être méthylés après leur entrée dans la cellule, les protégeant ainsi de la restriction (Korona et al. 1993; Murray 2000; Kobayashi 2001).

Les phages, les plasmides conjugatifs et les ICE ont développé de nombreuses stratégies pour échapper aux systèmes RM. Ainsi, certains ICE comme Tn5252 de *S. pneumoniae* codent une méthyltransférase à large spectre. Cette enzyme, méthylant de nombreux sites, pourrait protéger l'élément contre diverses endonucléases (Ayoubi et al. 1991; Sampath and Vijayakumar 1998).

Beaucoup de plasmides conjugatifs ou d'ICE codent une protéine d'anti-restriction ou Ard (« alleviation of restriction of DNA »). Ainsi, Tn916 code une protéine ArdA (Serfiotis-Mitsa et al. 2008). De même, de nombreux ICE apparentés à Tn916 et plusieurs ICE de *S. agalactiae*, intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys}, codent une protéine ArdA putative (Rice et al. 2007; Brochet et al. 2008a; Roberts and Mullany 2009). Les gènes *ardA* sont très souvent situés à proximité de l'origine de transfert de l'élément et font de ce fait partie des gènes transférés en premier chez la cellule réceptrice lors de la conjugaison (Chilley and Wilkins 1995). De plus, ils sont contrôlés par un promoteur créé dans une structure secondaire qui ne se forme que lorsque l'ADN est sous forme simple brin. L'expression de la protéine ArdA est ainsi rapide et transitoire et a lieu lors du transfert conjugatif (Althorpe et al. 1999; Bates et al. 1999). Les protéines ArdA inhibent spécifiquement les systèmes RM de type I. Elles se fixent sur l'enzyme, en mimant une molécule d'ADN. Cette fixation perturbe l'intégrité du complexe protéique et inhibe son

activité de restriction (Wilkins 2002; Nekrasov et al. 2007; Serfiotis-Mitsa et al. 2008; McMahon et al. 2009).

Les protéines d'anti-restriction ArdC constituent un autre système d'échappement aux systèmes RM de type I. La protéine ArdC du plasmide pSa présente une homologie avec le domaine N-terminal de la primase TraC1 du plasmide RP4. Ce domaine permet la liaison de la protéine sur l'ADN simple brin. Ainsi, les protéines ArdC sont probablement produites chez la cellule donatrice, puis transportées par le pore de conjugaison chez la cellule réceptrice. Ces protéines protègent l'ADN simple brin (mais non double brin) contre les systèmes RM de type I (Belogurov et al. 2000; Wilkins 2002). Des protéines ArdC putatives sont codées par de nombreux ICE tel que ICE*Ec1* (*E. coli*), ICE*Kpn1* (*Klebsiella pneumoniae*), ICE*MISym*^{R7A} (*Mesorizobium loti*) ou ICEA (*Mycoplasma agalactiae*) (Achtman et al. 1977; Sullivan et al. 2002; Schubert et al. 2004a; Marendia et al. 2006; Lin et al. 2008).

5.1.3.2.2 Loci CRISPR

Au moins 90% des génomes d'archées et près de 40% des génomes bactériens contiennent des loci CRISPR (« Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »). Ces loci, groupés avec des gènes codant les protéines Cas (« crispr associated »), confèrent une résistance aux éléments génétiques mobiles exogènes (Deveau et al. 2010; Marraffini and Sontheimer 2010; Dyll-Smith 2011).

Les loci CRISPR sont composés de répétitions directes (de 21 à 48 nucléotides suivant le locus) séparées par une région variable de longueur constante appelée espaceur (entre 26 et 72 nucléotides suivant le locus étudié). Ils contiennent également, en amont du cluster, une région leader, riche en A-T, qui inclut le promoteur responsable de la transcription du locus (Deveau et al. 2010).

Les loci CRISPR agissent en 3 grandes étapes (Figure 13). Lors de la première étape (immunisation ou adaptation), la cellule acquiert de nouveaux espaceurs dérivant d'ADN étranger. L'ADN étranger, venant de pénétrer dans la cellule, est reconnu puis une nouvelle unité répétition-espaceur est produite et intégrée dans le locus CRISPR. L'intégration a lieu dans la première position du locus, juste en aval de la séquence leader. Ainsi, les espaceurs les plus récents seront transcrits en premiers. Des pertes d'espaceurs sont également observées, ce qui permet une adaptabilité du locus sans croissance infinie. Le mécanisme d'intégration des nouveaux espaceurs est très mal connu. Il implique toutefois des protéines Cas

(Deveau et al. 2010; Marraffini and Sontheimer 2010; Bhaya et al. 2011; Wiedenheft et al. 2012).

Lors de la seconde étape, le locus est transcrit à partir du promoteur de la séquence leader sous forme d'un grand ARNm ou pré-ARNcr. Généralement, un niveau basal de protéine Cas et de pré-ARNcr est observé, permettant une défense constitutive. Toutefois, ces niveaux sont régulés, notamment en cas d'infection phagique, ce qui permet une défense accrue lorsqu'elle est nécessaire (Bhaya et al. 2011). Ensuite, le pré-ARNcr est mûri en petits fragments appelés ARNcr. La maturation est effectuée soit par certaines protéines Cas qui sont des endoribonucléases, soit par la RNaseIII et un petit ARN (tracrRNA) divergent du locus et partiellement complémentaire aux répétitions (Deltcheva et al. 2011).

Lors de la dernière étape (interférence), les ARNcr associés à des protéines Cas forment un complexe ribonucléoprotéique. Les ARNcr s'apparient avec des séquences homologues présentes sur de l'ADN étranger (proto-espaces) ce qui entraîne la dégradation de l'ADN étranger par les protéines Cas (Bhaya et al. 2011).

De petites séquences flanquant le proto-espaceur, les séquences PAM (« proto-spacer associated motif ») servent de guides pour l'acquisition des espaces lors de l'étape d'immunisation. Toutefois, elles ne sont pas intégrées dans le locus CRISPR. De ce fait, en plus de leur implication dans l'acquisition des espaces, elles permettent de prévenir toute auto-immunité. En effet, les protéines Cas ne clivent pas sans présence de cette séquence (Bhaya et al. 2011; Lopez-Sanchez et al. 2012).

La majorité des séquences cibles des systèmes CRISPR semble être de l'ADN. Toutefois, certains systèmes CRISPR cibleraient des ARN, notamment chez l'archée *Pyrococcus furiosus* (Bhaya et al. 2011). La dégradation des ARNm de la cible empêcherait l'expression des fonctions nécessaires au maintien de l'élément et donc entraînerait sa perte.

Le système CRISPR et le système des ARNpi des eucaryotes possèdent des similitudes mécanistiques. Tous les deux reconnaissent et détruisent le non soi avec une évolution rapide. Toutefois, il existe des différences entre les deux systèmes. Les acteurs protéiques ne sont pas homologues et la construction de la bibliothèque des ARNpi est passive chez les eucaryotes. Contrairement au système CRISPR, les ARNpi développent une boucle d'amplification. Ainsi, lorsque les protéines piwi dégrade l'ARN cible, elles créent des ARNpi dit secondaires qui pourront à leur tour se fixer l'ARN cible. Enfin, le système eucaryote contrôle les éléments déjà présents

dans la cellule alors que le système CRISPR protège la cellule contre l'arrivée de nouveaux éléments (Karginov and Hannon 2010; Marraffini and Sontheimer 2010).

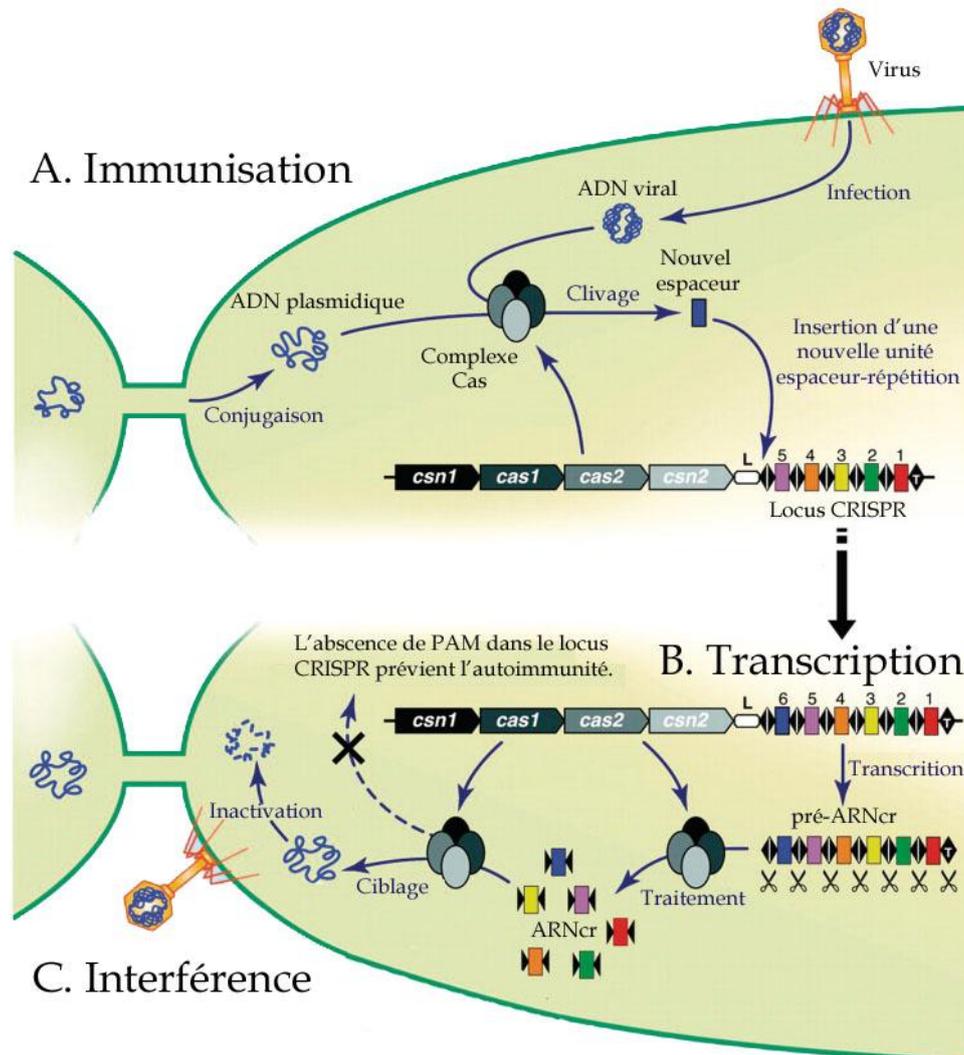


Figure 13 : Mécanisme d'action du système CRISPR/Cas (Horvath and Barrangou 2010)

A. Immunisation Lors de l'entrée dans la cellule d'ADN étranger, un complexe formé par des protéines Cas crée et introduit un nouvel espaceur dans le locus CRISPR.

B. Transcription Le locus CRISPR est transcrit en un grand ARNm (pré-crARN), puis traité par un complexe constitué de protéines Cas et clivé au niveau des répétitions pour former de petites unités (ARNcr).

C. Interférence Les ARNcr, liés à des protéines Cas dans un complexe nucléoprotéique, servent de guides. La complémentarité entre un espaceur et un fragment d'ADN entrant aboutira à la dégradation de ce dernier par les protéines Cas. Des séquences particulières PAM (« protospacer associated motif ») préviennent toute auto-immunité.

L : leader ; T : terminateur ; les losanges correspondent aux répétitions et les rectangles de couleur aux espaceurs.

Les systèmes CRISPR confèrent une immunité contre les phages et les plasmides. En effet, de nombreux espaceurs ciblent ces éléments. De plus, on observe que les plasmides ou les phages ne se transmettent plus vers des souches portant des espaceurs les ciblant (Mojica et al. 2005; Marraffini and Sontheimer 2010).

L'analyse de souches de *S. agalactiae* a permis de mettre en évidence 2 loci CRISPR chez cette espèce. Le locus CRISPR1 est ubiquitaire et très dynamique. Beaucoup de ces espaceurs ciblent des ICE ou des phages rencontrés chez *Streptococcus agalactiae*. La diversité des espaceurs semble d'ailleurs représentative de la diversité des éléments génétiques mobiles présents chez cette espèce. Certains îlots semblent toutefois plus ciblés que d'autres. Ainsi, sur les quarante quatre espaceurs ciblant des îlots de la souche Nem316 identifié dans le locus CRISPR1, vingt-cinq ciblent TnGBS1 ou TnGBS2. Enfin, un espaceur de TnGBS2 présent chez les souches A909 et 2603V/R provoque une diminution drastique de la fréquence de conjugaison de cet élément vers ces deux souches (Lopez-Sanchez et al. 2012), ce qui est la première démonstration que les loci CRISPR constituent une barrière au transfert des ICE.

5.1.3.3 Répression de l'activité de l'élément

Un autre type d'immunité est lié à la répression des gènes de l'élément entrant. En effet, de nombreuses études ont montré que les répresseurs centraux de prophages qui peuvent appartenir à deux familles non apparentées, les types cI et cI-like, rendent la souche immune envers des phages proches par des mécanismes similaires (Madsen et al. 1999; Oppenheim et al. 2005). Ainsi, le répresseur cI du prophage λ résident se fixe sur les promoteurs du phage entrant et du prophage résident ce qui inhibe leur expression. L'expression de l'intégrase est faible, cela limite la capacité d'intégration du nouveau phage et donc la formation d'un double lysogène.

De nombreux ICE sont également régulés par des répresseurs de type cI ou cI-like. Ainsi, l'activité de l'ICE SXT est contrôlée par un régulateur de type cI. Toutefois, aucune immunité liée à ce régulateur n'a pu être mise en évidence (Beaber et al. 2002; Marrero and Waldor 2005). En revanche, ICEBs1 de *Bacillus subtilis* possède un système d'immunité comparable à celui des bactériophages. En effet, le régulateur ImmR de type cI-like codé par cet élément est responsable d'une immunité de surconjugaison, en plus de son rôle de régulateur central. La présence

d'une copie d'*ICEBs1* ou simplement du gène *immR* chez la cellule réceptrice induit une diminution de la fréquence de l'acquisition de l'ICE car ImmR prévient l'expression de l'intégrase et donc le maintien de l'élément entrant (Auchtung et al. 2007).

5.1.3.4 Immunité de cible

L'immunité pouvant être liée à l'occupation du site *attB* a rarement été décrite pour les ICE. Ceci est probablement dû au fait que les transferts ont été testés vers des souches ne possédant pas d'élément résident ou vers des souches possédant un ICE complet. L'immunité observée est alors attribuée entièrement aux phénomènes décrits précédemment. Deux exemples sont cependant connus à ce jour. Chez *S. thermophilus*, l'occupation du site *attB* par un îlot flanqué de sites *att* mais ne codant qu'une résistance inhibe partiellement le transfert d'*ICESt3* (Bellanger et al. 2011). De même, *ICEclc* peut être présent en plusieurs copies au sein d'une même cellule. Toutefois, il a été démontré que l'intégration au niveau d'un site *attR* est plus efficace lorsque celui-ci est en partie tronqué (Sentchilo et al. 2009). Ces données suggèrent l'existence d'un mécanisme d'immunité de cible chez les ICE. Bien que le mécanisme de ce système d'immunité soit inconnu, ces données suggèrent que la fixation d'intégrase, d'excisionase ou de co-facteurs sur des séquences portées par les sites *attR* ou *attL* interférerait avec l'intégration de l'élément entrant.

5.2 Maintien des ICE dans la population

Un ICE, comme toute autre molécule d'ADN, est soumis à la sélection. Les modules de conjugaison, de régulation, et de maintien déjà évoqués ne sont cependant utiles qu'à l'ICE et non à la cellule hôte, et peuvent en conséquence être qualifiés « d'égoïstes ». En l'absence de contre-sélection, ces gènes et donc l'ICE lui-même peuvent être éliminés sous l'action conjointe des mutations et de la dérive génétique.

La fonctionnalité même de l'ICE, sa fréquence d'excision et de transfert peuvent avoir un rôle sur le maintien ou la dissémination de l'élément dans la population. De plus, en dehors des modules de conjugaison, recombinaison et régulation intervenant dans ce transfert, d'autres modules de l'ICE peuvent

contribuer au maintien de celui-ci dans la population bien qu'ils n'augmentent pas, voire diminuent, le nombre de descendants des cellules hôtes.

Par ailleurs, si l'ICE code des fonctions avantageuses pour l'hôte, les souches portant l'élément pourront se multiplier de façon plus efficace contribuant ainsi à l'invasion de la population et/ou au maintien de l'ICE dans celle-ci. Ainsi, en plus des fonctions impliquées dans le transfert conjugatif et le maintien à court terme, les ICE portent des modules pouvant conférer un avantage adaptatif à l'hôte.

5.2.1 Impact de la fonctionnalité des ICE

Si la cellule se divise alors que l'élément est excisé, l'ICE peut être perdu. En effet, s'il ne s'est pas répliqué et/ou des problèmes de partition sont survenus, il peut n'être présent que dans une des deux cellules filles. Ainsi, *Tn916* se transfère vers *E. coli* mais sa trop haute fréquence d'excision chez cet organisme entraîne sa perte (Scott et al. 1988). Cependant, une régulation fonctionnelle réduisant l'excision chez les autres organismes permet le maintien de l'élément.

Par ailleurs, chez divers plasmides conjugatifs, comme pKJK5 de la famille IncP1, une haute fréquence de transfert à partir des tranconjugants a été observée (Bahl et al. 2007; Bahl et al. 2007). De plus, à partir de la cellule venant d'acquérir l'élément, ICEBs1 envahit rapidement la totalité de la chaînette de cellules (Babic et al. 2011). Globalement, la dérégulation dans le transconjugant venant d'acquérir l'ICE ou le plasmide pourrait permettre l'invasion d'une chaînette, d'un biofilm ou d'une nouvelle population dépourvue de l'élément avec une très haute efficacité, l'élément passant de cellule en cellule jusqu'à ce que toutes les cellules sensibles soient envahies.

5.2.2 Modules poison-antipoison

De nombreux plasmides conjugatifs portent des modules, appelés systèmes poison-antipoison, systèmes toxine-antitoxine ou systèmes d'addiction, qui codent une mort programmée. Ces systèmes sont composés de deux éléments : une toxine qui reconnaît une cible cellulaire spécifique et une antitoxine, protéine ou ARN, qui abolit l'action de la toxine. Le mécanisme moléculaire peut varier suivant les systèmes considérés mais repose toujours sur une différence de stabilité entre la toxine et l'antitoxine. La toxine est en effet très stable alors que l'antitoxine est labile

(Van Melderen and Saavedra De Bast 2009). Si une cellule fille perd l'élément, et donc le module, l'antitoxine va être progressivement perdue. En revanche, la toxine, plus stable et dont l'action n'est plus abolie pourra provoquer la mort cellulaire (Makarova et al. 2009; Van Melderen and Saavedra De Bast 2009; Bukowski et al. 2011). La perte de l'élément et du module égoïste aboutit à la mort de la quasi-totalité des cellules l'ayant perdu. Ceci contribuerait au maintien de l'élément dans la population en réduisant le nombre des cellules ayant perdu spontanément le plasmide et/ou en empêchant la perte d'un plasmide par une souche en raison de l'invasion de celle-ci par un plasmide conjugatif incompatible. L'analyse de séquence suggère que ces modules sont présents chez divers ICE où ils ont cependant rarement étudiés. Ainsi, l'ICE SXT posséderait deux systèmes toxine-antitoxine. Le premier, de type Tad-Ata, est homologue à ceux du plasmide pAMI2 de *Paracoccus aminophilus* et du bactériophage N15. L'expression de ce système chez *E. coli* a permis de démontrer qu'il était capable de promouvoir la stabilité d'un plasmide à faible nombre de copies sans pression de sélection (Dziewit et al. 2007). Toutefois, la délétion de ce système n'augmente pas la fréquence de perte de l'élément SXT, relativisant ainsi son rôle dans la stabilité de l'élément (Wozniak and Waldor 2009b). En revanche, une étude plus récente démontre que le système codé par les gènes *mosT* et *mosA* promeut la stabilité de l'ICE SXT. Ce système toxine antitoxine est exprimé lorsque l'élément est sous forme circulaire, c'est à dire lorsque l'ICE est le plus vulnérable à la perte (Wozniak and Waldor 2009b).

Divers ICE, comme ICES*t1* ou des éléments apparentés, codent des systèmes RM de type II (Burrus et al. 2002a; Pavlovic et al. 2004). Ainsi, ICES*t1* code un système RM de type II qui lui confère une résistance au bactériophage ST84 (Burrus et al. 2001). Les systèmes RM de type II sont composés de deux protéines distinctes, une méthyltransférase et une endonucléase, qui reconnaissent les mêmes sites. En plus de la résistance aux phages, les systèmes RM de type II sont des systèmes toxine-antitoxine (Kobayashi 2001). En effet, tous les sites reconnus par le système doivent être méthylés sur au moins un brin pour assurer une protection de l'ADN face à l'enzyme de restriction. En revanche, la coupure de seulement quelques sites non méthylés provoque la destruction d'une molécule d'ADN par l'endonucléase. Si un élément portant un système RM de type II est perdu, la méthyltransférase et l'endonucléase seront diluées au cours des divisions cellulaires. Cela conduira à une déméthylation progressive des sites chromosomiques. L'endonucléase pourra alors

reconnaître et cliver ces sites, aboutissant à la destruction du chromosome et à la mort cellulaire (Kobayashi 2001).

5.2.3 Fonctions avantageuses

Les ICE portent tous un ou plusieurs modules non impliqués dans le transfert et le maintien de l'élément dans la descendance à court et à long terme. Ces modules confèrent des phénotypes très variés à l'hôte qui sont susceptibles d'augmenter leur valeur adaptative et donc de contribuer au maintien de l'hôte et en conséquence de l'élément dans la population (Tableau 1) (Wozniak and Waldor 2010).

Ainsi, de très nombreux ICE portent des gènes de résistance aux agressions chimiques, physiques ou biologiques. Les ICE de la famille SXT/R391 de *Vibrio cholerae* portent de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds. L'ICE SXT code par exemple des résistances au sulfaméthoxazole, au triméthoprime, au chloramphénicol et à la streptomycine (Beaber et al. 2002; Beaber et al. 2002). ICES_{de3396} de *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* porte quant à lui des gènes de résistance aux ions cadmium et à l'arsenic (Davies et al. 2009). Les ICE R391 et Tn5252 de *S. pneumoniae* possèdent des gènes qui confèrent à leur hôte une résistance accrue aux UV (Kulaeva et al. 1995; Munoz-Najar and Vijayakumar 1999). Enfin, ICE_{St1} de *S. thermophilus* code un système RM protégeant la bactérie hôte contre des bactériophages (Burrus et al. 2001).

Les ICE peuvent également coder des fonctions métaboliques. Ainsi, l'ICE CTn_{scr94} permet à l'hôte qui le porte d'utiliser le saccharose comme unique source de carbone (Hochhut et al. 1997). Certains éléments vont, de la même manière, coder des fonctions impliquées dans la dégradation des polluants organiques chlorés. Ainsi, ICE_{clc} de *Pseudomonas knackmussii* sp. B13 permet la dégradation du 3-chlorobenzoate via l'oxydation du chlorochatécol (Ravatn et al. 1998). Cet élément se transfère vers de nombreuses espèces. Son transfert a notamment été démontré vers des espèces évoluant dans des réacteurs de traitement des eaux polluées (Springael et al. 2002; Muller et al. 2003). L'avantage sélectif apporté par ces éléments permettrait ainsi un maintien de l'ICE dans la population ainsi que sa dissémination. Dans ce cas, la structure modulaire des éléments génétiques mobiles apporte encore un nouvel avantage. En effet, les échanges de modules pourront permettre la création de nouvelles voies cataboliques, dégradant de nouvelles molécules. Ces nouvelles voies

peuvent même être utilisées pour la dépollution des sols ou des eaux contaminées (Top et al. 2002).

Du fait de la présence de ces modules d'adaptation, l'acquisition d'un ICE peut conduire à des évolutions majeures du mode de vie de l'hôte. Certains éléments seront ainsi totalement ou partiellement responsables du caractère symbiotique de leur hôte. L'acquisition de l'îlot de symbiose de la souche *Mesorhizobium loti* R7A rend des souches qui ne l'étaient pas symbiotiques envers différentes espèces de *Lotus* incluant *Lotus corniculatus* (Sullivan and Ronson 1998; Kaneko et al. 2000; Sullivan et al. 2001; Sullivan et al. 2002). De même, de nombreux éléments codent des facteurs de virulence conférant parfois intégralement les propriétés pathogènes d'une souche. Ainsi, l'acquisition d'un ICE de *Streptomyces turgidiscabies* (îlot de pathogénicité) permet en un seul événement de conjugaison un changement de niche écologique en transformant *Streptomyces diastatochromogenes* (non pathogène) en pathogène de plante (Kers et al. 2005). L'acquisition du fer est particulièrement importante pour les microorganismes pathogènes. Les mammifères séquestrent le fer et de nombreux sidérophores, permettant l'acquisition de fer, sont portés par des ICE ou des éléments en dérivant. Ainsi, les ICE ICEEc1 d'*E. coli*, ICEKp1 de *Klebsiella pneumoniae*, ICESp23FST81 de *Streptococcus pneumoniae* ou ICESe2 de *S. equi* codent des sidérophores (Schubert et al. 2004a; Heather et al. 2008; Lin et al. 2008; Croucher et al. 2009; Holden et al. 2009). De plus, l'îlot de pathogénicité HPI de *Yersinia pestis*, responsable de la peste, dérive très probablement d'ICEEc1. L'îlot HPI code un sidérophore qui permet la croissance de cette bactérie dans le sang et directement responsable de l'extrême pathogénicité de cette bactérie.

6. Régulation des ICE

Les ICE codent des systèmes de maintien très efficaces. Toutefois, excision et de transfert doivent être bien régulés. En effet, les éléments dérégulés présentent une grande instabilité ce qui amène souvent à la perte de l'ICE dans la population. Tn916 s'excise à forte fréquence chez *E. coli*, ce qui entraîne sa perte dans la population par dilution lors des divisions cellulaires successives (Scott et al. 1988). De même, l'expression constitutive de l'excisionase RdfS d'ICEMISym^{R7A} ou de l'excisionase et l'intégrase d'ICES_{t1} conduit à la perte de l'élément (Ramsay et al. 2006; Bellanger et al. 2011). La régulation des ICE est donc déterminante dans leur maintien et leur

propagation. La régulation de l'excision et du transfert a été étudiée chez très peu d'ICE mais présente des mécanismes variés et une très grande complexité (Wozniak and Waldor 2010).

6.1 Régulation par bistabilité et stochasticité

Les systèmes de régulation bactériens sont très divers mais reposent souvent sur un mécanisme bistable. La cellule oscille entre deux états stables, en passant par des états transitoires et instables. Une population bactérienne, génétiquement identique, pourra être décomposée en 2 sous-populations présentant des états différents. En effet, l'expression d'un même gène ou d'un groupe de gènes varie en raison de fluctuations aléatoires ce qui conduit à des états d'expression différents au sein de la population (Dubnau and Losick 2006; Losick and Desplan 2008). Un système de régulation peut modifier la probabilité des deux états (Losick and Desplan 2008). Le système bistable le plus connu correspond au système de régulation phagique qui permet de passer de l'état lysogène à l'état lytique. Un système bistable est également impliqué dans l'entrée en état de compétence de *Bacillus subtilis* (Dubnau and Losick 2006).

ICE_{clc} est actuellement le seul ICE pour lequel une régulation bistable a été mise en évidence. L'excision et le transfert de cet élément de *Pseudomonas knackmussii* sont la conséquence d'un changement d'état stochastique réalisé dans 3% de la population en phase stationnaire (Figure 14A) (Minoia et al. 2008). RpoS, un facteur sigma de l'ARN polymérase impliqué dans la régulation de gènes, présente un niveau élevé en phase stationnaire de croissance, mais pouvant varier entre cellules. Dans les cellules présentant la plus grande concentration de protéine RpoS, le promoteur du gène *inrR* sera utilisé par l'ARN polymérase. La protéine régulatrice InrR (INtegRase Regulator) va à son tour activer le promoteur de l'intégrase et des gènes impliqués dans le transfert d'ICE_{clc}. RpoS agit également directement sur le promoteur de l'intégrase. InrR s'autorégule positivement ce qui permet la mise en place d'une boucle de rétroaction positive. Globalement, les cellules présenteront une concentration en RpoS supérieure ou inférieure à une valeur seuil, ce qui entraînera, ou non, le transfert conjugatif de l'ICE (Figure 14B) (Miyazaki et al. 2012).

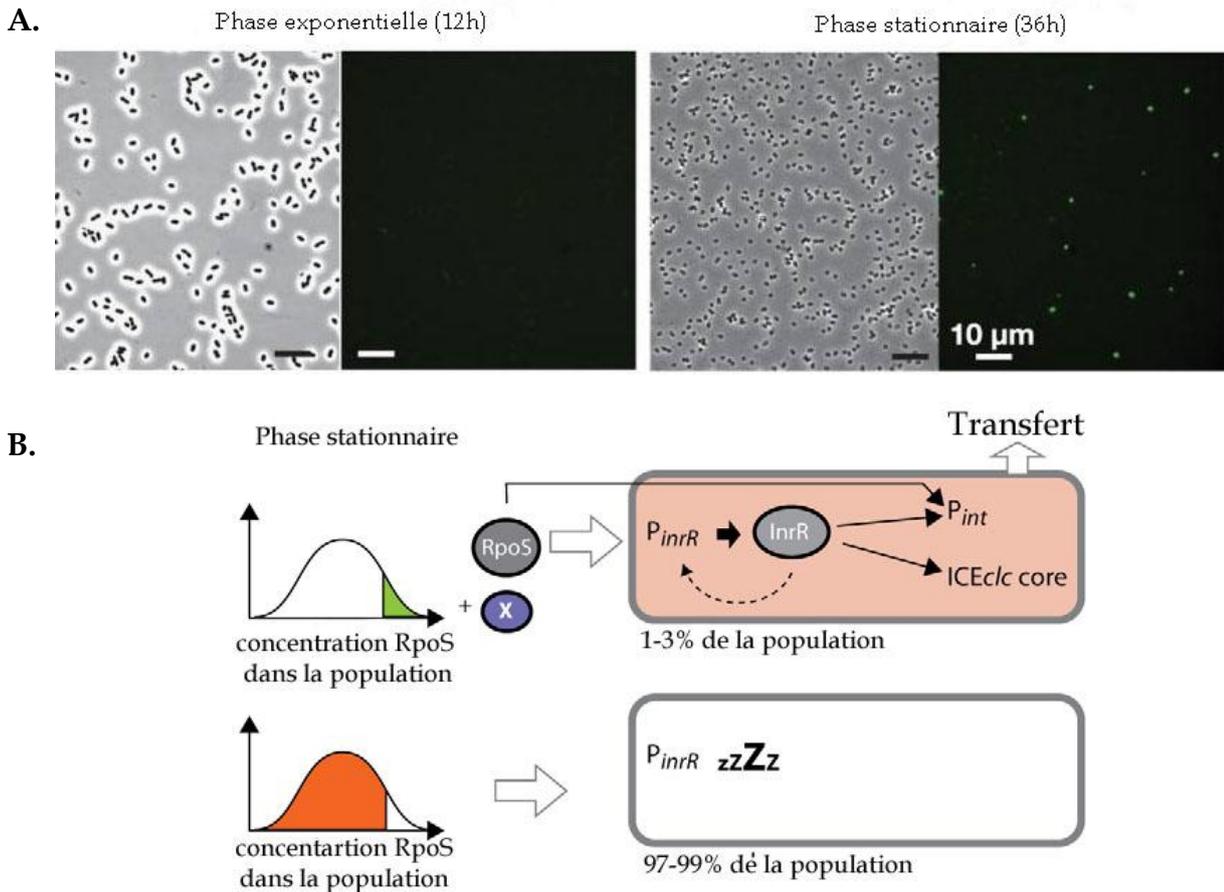


Figure 14 : Régulation bistable chez ICEclc

A. Expression stochastique chez ICEclc (Minoia et al. 2008)

Le gène codant la protéine fluorescente Gfp (Green Fluorescent Protein) est sous le contrôle du promoteur de l'activateur transcriptionnel InrR. Des observations en microscopie à contraste de phase et à fluorescence de cellules de *P. knackmussii* B13 montrent l'expression du gène *gfp* en phase exponentielle et stationnaire de croissance. Une expression est également observée dans certaines cellules en phase stationnaire.

B. Représentation schématique de la régulation bistable d'ICEclc en phase stationnaire (Miyazaki et al. 2012)

Lors de l'entrée en phase stationnaire, la protéine régulatrice RpoS est produite. Dans certaines cellules de la population, sa concentration est plus importante et dépasse un seuil. Elle va alors permettre la transcription à partir du promoteur P_{inrR} . La protéine produite va elle-même activer positivement le promoteur de l'intégrase et des gènes de transfert d'ICEclc. La protéine InrR s'autorégule et permet d'amplifier et de stabiliser le phénomène. RpoS agit également directement sur le promoteur de l'intégrase. Dans le reste de la population, la protéine RpoS n'atteint pas le seuil critique. La transcription des gènes de l'ICE n'est pas activée et l'élément ne se transfère pas. Il s'agit d'une régulation bistable, la cellule pouvant se trouver de manière aléatoire dans deux états.

Ce mode de régulation n'a pas été étudié chez d'autres éléments. Toutefois, de nombreux ICE code des régulateurs de types phagiques de types cI ou cI-like (voir par ailleurs chapitre 6.2). En effet, on trouve un répresseur de type cI chez les ICE appartenant à la famille SXT (Burrus et al. 2006) et un répresseur de type cI-like contrôle le transfert d'ICEBs1 (Auchtung et al. 2007). Les ICE ICES_{t1} et ICES_{t3} de *S. thermophilus* coderaient ces deux types de répresseurs (Bellanger et al. 2007; Carraro et al. 2011). Ces deux types de régulation constituent la base des systèmes bistables chez les phages. Les régulateurs des ICE semblent donc adaptés à ce type de réponse et ce mode de régulation est probablement répandu.

6.2 Régulation par des agents endommageant l'ADN

De nombreux prophages et au moins certains ICE sont dérèprimés lorsque la protéine RecA est activée. Cette activation a lieu lorsque l'ADN d'une cellule subit des dommages, par exemple à la suite d'une irradiation aux UV, d'un traitement par certains antibiotiques (quinolones, bêta-lactamines ou triméthoprime) ou par des agents endommageant l'ADN tel que la mitomycine C (Goerke et al. 2006; Kelley 2006; Maiques et al. 2006; Wozniak and Waldor 2010). Le phage lambda possède le système de régulation le mieux caractérisé. Le passage d'un état lysogène à un état lytique de cet élément est sous le contrôle du système cI/Cro. A l'état lysogène, la protéine cI réprime la transcription des gènes lytiques, incluant le gène *cro*, et active sa propre transcription. Si l'ADN de la cellule hôte subit des dommages, RecA s'associe à l'ADN simple brin produit du fait de ceux-ci, est activé (complexe RecA*) et stimule l'autoprotéolyse de cI. Lorsque suffisamment de protéines cI sont inactivées, la répression est levée. L'activateur Cro est alors exprimée et va permettre l'expression des gènes du développement lytique (Dodd et al. 2005).

La fréquence de transfert de l'ICE SXT de *Vibrio cholerae* augmente 300 fois en présence de mitomycine C, un agent endommageant l'ADN (Beaber et al. 2004a). De même, la fréquence d'excision de l'ICE R391 de *Providencia rettgeri* augmente 4500 fois lors d'un traitement aux UV (McGrath et al. 2005). Ces deux éléments apparentés codent un répresseur de type cI, SetR. La protéine SetR porte un domaine hélice-tour-hélice ainsi qu'un domaine protéasique. Elle réprime la transcription de gènes impliqués dans l'excision et le transfert de l'élément et active sa propre transcription (Beaber et al. 2004a). La répression se ferait via une fixation sur la région promotrice de ces gènes conduisant à une inhibition de la fixation de l'ARN polymérase (Beaber

and Waldor 2004b). Les agents endommageant l'ADN provoquent la formation de RecA* ce qui entraîne l'autoprotéolyse de SetR, et la dérégulation des gènes *setC* et *setD*. Ces deux gènes codent des activateurs transcriptionnels qui régulent positivement la transcription des gènes impliqués dans le transfert et l'excision de l'élément, notamment l'intégrase (Beaber et al. 2002; Burrus and Waldor 2003; Beaber et al. 2004a) (Figure 15).

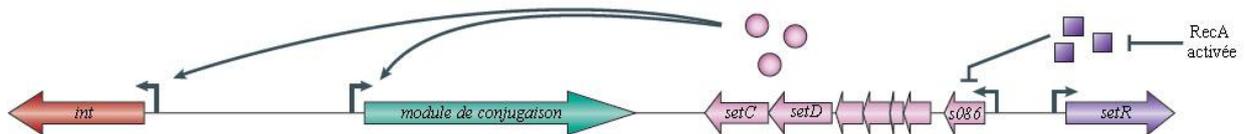


Figure 15 : Représentation schématique de la régulation de SXT de *Vibrio cholerae* (Wozniak and Waldor 2010)

Le répresseur SetR inhibe la transcription des gènes impliqués dans l'excision et le transfert de l'élément. Les agents endommageant l'ADN, par l'intermédiaire de RecA*, induisent l'autoprotéolyse de ce répresseur. La levée de la répression va permettre, notamment, l'expression des activateurs transcriptionnels SetC et SetD. Ces activateurs vont stimuler l'expression des gènes de l'intégrase et de l'excisionase ainsi que les gènes du module de conjugaison.

Les flèches indiquent une activation et les barres perpendiculaires une répression.

Par ailleurs, de nombreux prophages, comme TP901-1 ou Φ 105, ainsi que divers ICE putatifs ne codent pas de régulateurs cI mais un régulateur dit de type cI-like non apparenté à cI (Madsen et al. 1999; Bose et al. 2008; Brochet et al. 2008a). Comme les protéines cI, les protéines cI-like jouent un rôle de répresseur dont l'action est levée par les agents endommageant l'ADN, mais contrairement à cI, les cI-like sont dépourvus d'activité autopeptidase. Un seul répresseur de type cI-like est bien caractérisé. Il s'agit de la protéine ImmR codée par ICEBs1 de *Bacillus subtilis* (Auchtung et al. 2007; Bose et al. 2008). La protéine ImmR est la seule protéine codée par ICEBs1 nécessaire et suffisante pour réprimer la transcription du gène codant l'excisionase. Du fait de la faible transcription du gène *xis*, l'ICE se maintient sous forme intégrée (Auchtung et al. 2007). L'anti-répresseur ImmA codé par ICEBs1, en présence de RecA*, clive de manière site-spécifique ImmR conduisant à sa dégradation et à la dérégulation de l'ICE (Bose et al. 2008) (Figure 16).

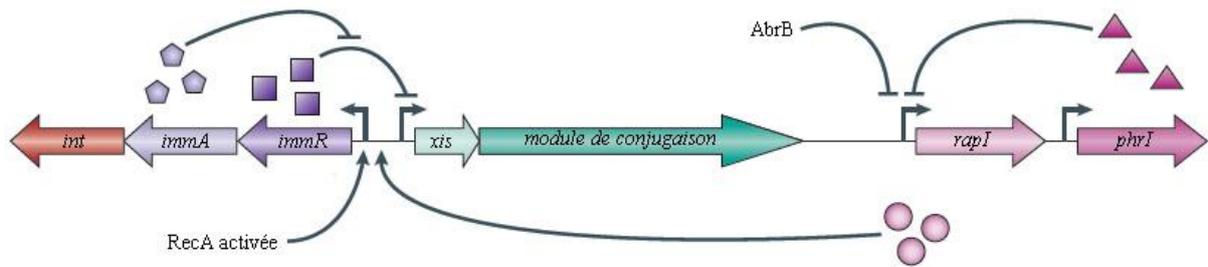


Figure 16 : Représentation schématique de la régulation d'ICEBs1 de *Bacillus subtilis* (Wozniak and Waldor 2010)

ImmR est le répresseur d'ICEBs1. Sa fixation inhibe l'expression du gène de l'excisionase et de ceux du module de conjugaison. La protéase ImmA clive de manière site spécifique ImmR et ainsi permet la dérégulation de l'élément. ImmA est activée par les dommages à l'ADN ou par la protéine RapI. Le gène *rapI* est exprimé lorsque la concentration en protéine PhrI ou AbrB est faible. Les flèches indiquent une induction, les barres perpendiculaires une répression.

Enfin, ICESt1 et ICESt3 de *S. thermophilus*, codent des homologues des régulateurs cI et cI-like. Il a été démontré que ces éléments sont induits par les dommages à l'ADN (Bellanger et al. 2007; Carraro et al. 2011). Des analyses *in silico* ont également montré que tous les ICE proches de ces éléments rencontrés chez les streptocoques, tel qu'ICESpn8140 de *S. pneumoniae*, possèdent une organisation similaire au niveau du module de régulation. Dans ces éléments, le gène codant la protéase est adjacent au gène codant le régulateur cI et non à celui codant le régulateur cI-like. Cela suggère que la régulation impliquant ces deux systèmes est différente de ce que l'on observe chez ICEBs1 ou SXT (Carraro et al. 2011).

6.3 Régulation par quorum sensing

Le quorum sensing est un système permettant de coordonner l'expression des gènes en fonction de la densité cellulaire. Il permet à la bactérie de capter des informations provenant d'autres cellules et de communiquer avec elles grâce à des molécules signal (Deep et al. 2011). De nombreux plasmides conjugatifs sont régulés par des mécanismes de quorum sensing (Tun-Garrido et al. 2003; Dunny 2007).

Parmi les ICE prouvés ou putatifs, certains codent un mécanisme de quorum sensing. ICEBs1 code un système de quorum sensing de type Rap-Phr, qui peut conduire à la levée de la répression de l'excision et du transfert de cet élément. Les facteurs de transcription Rap sont impliqués dans de nombreux mécanismes tels que

la sporulation ou la compétence (Solomon et al. 1996). Dans le cas d'ICEBs1, le peptide PhrI est exporté par un transporteur inconnu sous forme maturée. Lorsque sa concentration extracellulaire est suffisamment élevée, il est réimporté par le transporteur d'oligopeptide Opp. Une fois dans la cellule, il va inhiber l'activité du facteur de transcription RapI (Auchtung et al. 2005). RapI stimule l'excision et le transfert d'ICEBs1 en activant la protéine ImmA. Cela permet de lever la répression de l'ICE en induisant la dégradation du répresseur ImmR (Auchtung et al. 2005; Bose et al. 2008); (Bose and Grossman 2011). Ainsi, lorsque la majorité des cellules d'une population est dépourvue d'ICEBs1, la quantité de PhrI est faible dans le milieu extracellulaire. RapI est actif et permet le transfert de l'élément qui se propage dans la population. En revanche, lorsque la majorité des cellules possède ICEBs1, la concentration en PhrI augmente et va alors réprimer l'action de RapI. L'ICE ne se transfère plus. Ce système est donc être sensible à la densité d'ICE présent dans la population et l'élément réprime sa mobilité dans un contexte où son transfert est inutile (Auchtung et al. 2005) (Figure 17).

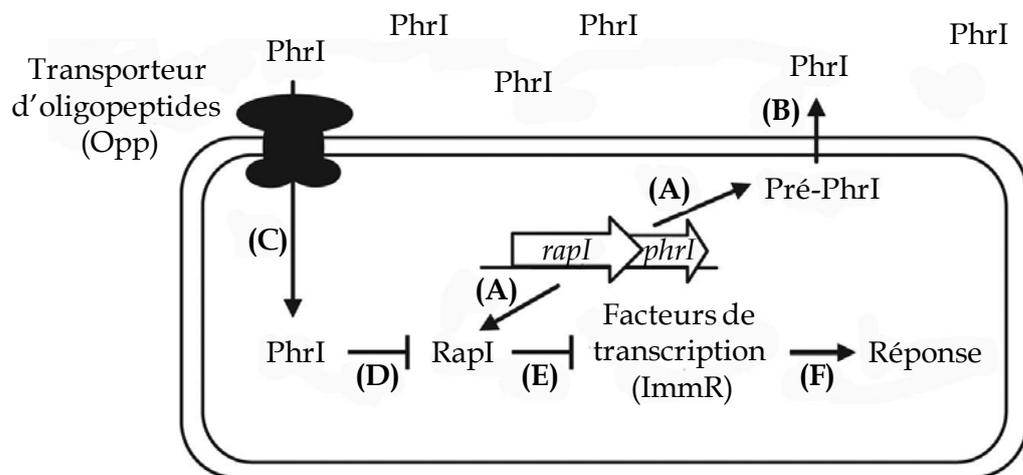


Figure 17 : Représentation schématique de la régulation d'ICEBs1 par le système de quorum sensing RapI-PhrI (Auchtung et al. 2005)

- (A) Transcription des gènes *rapI* et *phrI*
 - (B) Le peptide PhrI maturé est exporté
 - (C) Lorsque la concentration extracellulaire est suffisamment élevée, PhrI est réimporté dans la cellule via le transporteur d'oligopeptide Opp.
 - (D) PhrI inhibe le régulateur RapI
 - (E) RapI inhibe l'activité du régulateur ImmR en activant le clivage de cette dernière par la protéine ImmA
 - (F) L'inactivation de la protéine ImmR va induire une excision et un transfert d'ICEBs1
- Les flèches indiquent une activation et les barres perpendiculaires une répression.

Par ailleurs, ICE*MlSym*^{R7A} de *Mesorhizobium loti* est régulé par un mécanisme de quorum sensing appartenant à la famille LuxRI qui induit l'excision et le transfert de l'ICE à haute densité cellulaire (Sullivan et al. 2002; Ramsay et al. 2006; Ramsay et al. 2009; Bellanger et al. 2011). Ce système de quorum sensing est lui-même régulé par un système à deux composants qui limite son activation au sein de la population (Ramsay et al. 2012).

6.4 Régulation en phase stationnaire

Les systèmes complexes de régulation des ICE peuvent également impliquer une régulation dépendante de la phase de croissance.

Comme nous l'avons vu précédemment (paragraphe 6.1), ICE*clc* est activé en phase stationnaire. Cette activation fait intervenir la protéine RpoS, facteur sigma impliqué dans la phase stationnaire. Elle va permettre l'expression du gène codant le régulateur positif InrR. Ce dernier va agir sur le promoteur de l'intégrase et permettre l'excision de l'élément (Minoia et al. 2008; Miyazaki et al. 2012) (Figure 18).

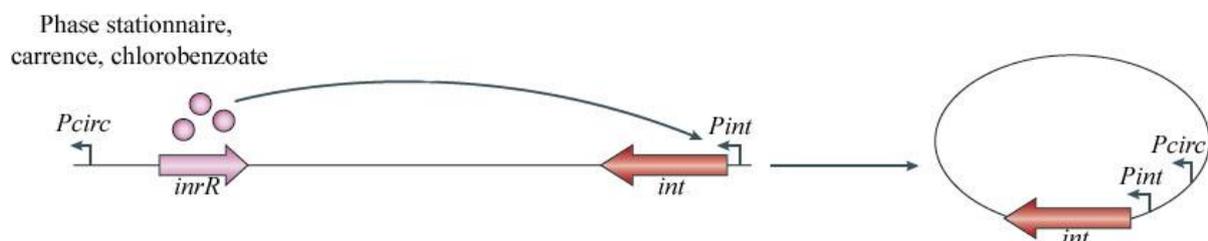


Figure 18 : Représentation schématique de la régulation d'ICE*clc* par les facteurs environnementaux et la phase de croissance (Wozniak and Waldor 2010)

Le régulateur InrR d'ICE*clc* régule positivement l'expression du gène codant l'intégrase. Lors de la phase stationnaire, le facteur sigma RpoS initie la transcription du gène *inrR*. La production du régulateur positif contrôlant la transcription du gène de l'intégrase permet l'excision de l'ICE. De même, l'expression du gène *inrR* et du gène codant l'intégrase augmente lors d'une croissance de la bactérie hôte sur du chlorobenzoate en comparaison avec une croissance sur du fructose ou du glucose.

Lorsque l'élément est intégré, le promoteur faible *Pint* contrôle l'expression du gène de l'intégrase. La circularisation de l'élément va permettre au promoteur fort *Pcirc* de se trouver proche du gène de l'intégrase. Il conduira à la réintégration d'ICE*clc* dans la cellule hôte ou dans la cellule réceptrice.

De même, la protéine RapI, codée par *ICEBs1* et responsable de l'activation de l'excision et du transfert de l'ICE, est réprimée par la protéine AbrB (Auchtung et al. 2005; Bose et al. 2008) (Figure 17). AbrB réprime de nombreux gènes lors de la phase exponentielle de croissance mais est inactive en phase stationnaire (Phillips and Strauch 2002). Ainsi, lorsque les cellules entrent en phase stationnaire de croissance, le gène *rapI* est déréprimé ce qui entraîne l'excision et le transfert d'*ICEBs1* (Auchtung et al. 2005).

Par ailleurs, chez *S. thermophilus*, les niveaux d'excision et de transcription des modules de conjugaison et de recombinaison d'*ICESt1* et d'*ICESt3* sont plus élevés en phase stationnaire qu'en phase exponentielle (Carraro et al. 2011).

6.5 Autres mécanismes de régulation

En plus des mécanismes de régulation induits par les dommages à l'ADN, liés à un système de quorum sensing ou contrôlés par la phase de croissance, certains éléments sont activés par des conditions environnementales où la possession de l'ICE confère un avantage sélectif à l'hôte.

Ainsi, *ICEclc* permet à la cellule hôte de dégrader le chlorobenzoate et d'utiliser ce dernier comme unique source de carbone (Ravatn et al. 1998). L'expression des gènes, l'excision et le transfert d'*ICEclc* sont très fortement augmentés lors d'une croissance sur chlorobenzoate (Sentchilo et al. 2003a; Sentchilo et al. 2003b; Gaillard et al. 2010). Cette augmentation est dépendante de la source de carbone et est moindre en présence de glucose, de fructose ou de succinate (Gaillard et al. 2010). La régulation par le chlorobenzoate n'est pas contrôlée directement par le composé lui-même mais par un intermédiaire. L'augmentation de la transcription du régulateur InrR et de l'intégrase indique qu'il fait intervenir les mêmes acteurs que lors de la régulation par la phase stationnaire de croissance (Gaillard et al. 2008) (Figure 18).

Les ICE *Tn916* et *CTnDOT*, ICE codant une résistance à la tétracycline, sont quant à eux régulés par la tétracycline (Wozniak and Waldor 2010). Chez *Tn916*, l'induction du transfert est basée sur un mécanisme d'atténuation transcriptionnelle (Su et al. 1992). Le système de régulation de cet ICE par la tétracycline est présenté en figure 19. Le gène *orf12* est situé en amont du gène *tetM* codant la résistance à la

tétracycline. Ce gène code un petit peptide composé d'acides aminés rares ralentissant la traduction. En absence de tétracycline, la traduction et la transcription sont découplées. La transcription va alors s'arrêter au niveau d'un terminateur situé en amont de *tetM*. Ce dernier sera exprimé à un niveau basal faible. En présence de l'antibiotique, la majorité des ribosomes est inactivée. Les ARN de transfert vont s'accumuler dans la cellule, y compris ceux portant des acides aminés rares. Le peptide Orf12 sera alors traduit plus rapidement par les quelques ribosomes restés actifs grâce au produit du gène *tetM*. Cela prévient ou détruit la structure terminale et permet la transcription d'un plus long transcrit. Ce dernier comprend le gène *tetM* mais aussi les gènes *orf7* et *orf8* codant des régulateurs transcriptionnels (Su et al. 1992; Celli and Trieu-Cuot 1998). Ces derniers permettront d'augmenter la transcription à partir du promoteur P_{orf7} . Cela entraîne l'expression des gènes de recombinaison mais également des gènes de transfert lorsque Tn916 est excisé (Celli and Trieu-Cuot 1998; Roberts and Mullany 2009). Lorsque TetM protège une majorité des ribosomes, *orf12* est de nouveau traduit plus lentement, *tetM*, *orf7* et *orf8* sont moins transcrits et la fréquence de transfert diminue. Cela permet une réponse rapide et efficace en fonction de la concentration en tétracycline (Roberts and Mullany 2009). Enfin, le gène *orf9* coderait un répresseur du système. En absence de tétracycline, il réprimerait la transcription à partir du promoteur P_{orf7} . En présence de tétracycline, l'activation transcriptionnelle en amont de *tetM* permettrait la synthèse d'un ARN antisens qui réduirait l'expression d'*orf9* (Celli and Trieu-Cuot 1998; Roberts and Mullany 2009).

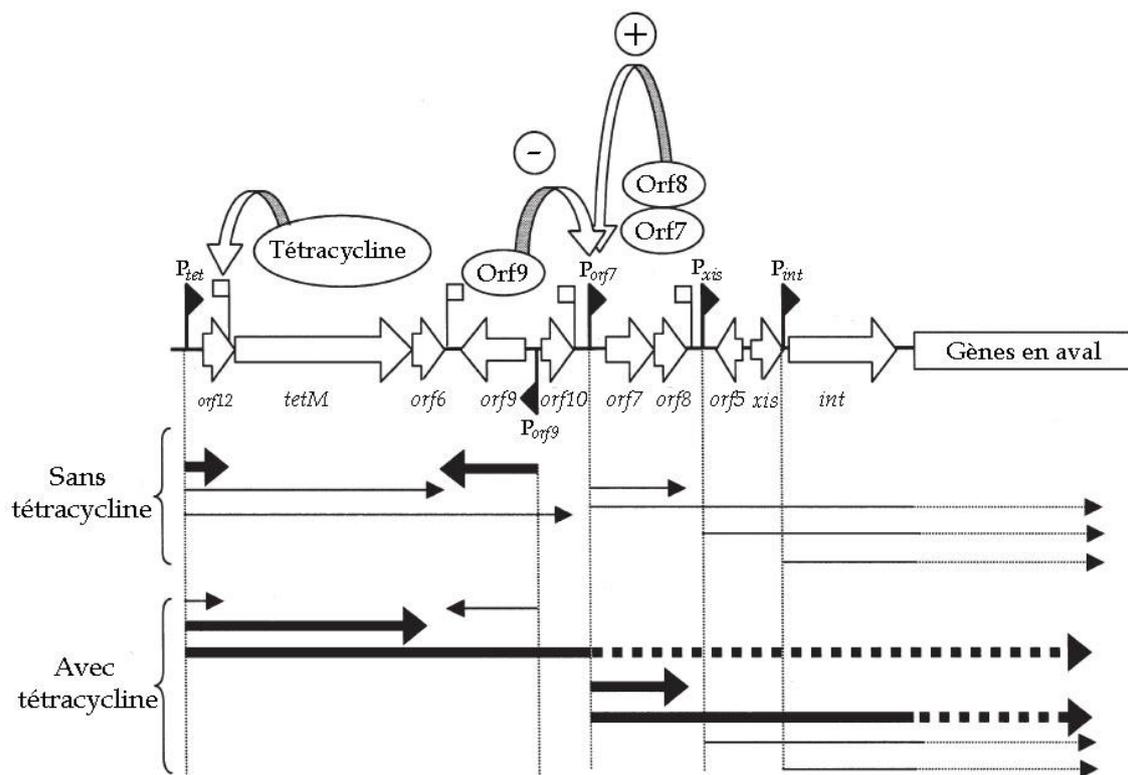


Figure 19 : Représentation schématique de la régulation de Tn916 par la tétracycline (Mullany et al. 2002)

En absence de tétracycline, la transcription à partir de P_{tet} est stoppée en aval d'*orf12*. Orf9 réprime la transcription d'*orf7* et d'*orf8*. L'élément est inactif. En présence de tétracycline, le terminateur situé en aval d'*orf12* est inactif ou détruit et permet ainsi la transcription d'un plus long transcrit à partir du promoteur P_{tet} . Les protéines Orf7 et Orf8 sont produites à un plus haut niveau. Ces deux régulateurs vont permettre l'expression des gènes adjacents via P_{orf7} et donc des gènes du module de conjugaison après excision de Tn916.

Les triangles noirs représentent des promoteurs et les carrés blancs des terminateurs. Les flèches noires indiquent une transcription des gènes schématisés par les flèches blanches. Enfin, les flèches bombées indiquent que la protéine a une action positive (+) ou négative (-) sur le promoteur considéré.

L'ICE CTnDOT de *Bacteroides* est également régulé par un mécanisme d'atténuation transcriptionnelle induit par la tétracycline mais structurellement et mécaniquement très différent de celui observé chez Tn916. Dans le cas d'ICE CTnDOT, la tétracycline induit la transcription du gène de résistance à la tétracycline et d'un système à deux composants. Ce dernier va stimuler un régulateur qui pourra induire directement les gènes impliqués dans l'excision de l'élément et indirectement

ceux impliqués dans le transfert (Whittle et al. 2002; Wang et al. 2004; Moon et al. 2005; Wang et al. 2005; Jeters et al. 2009; Park and Salyers 2011; Keeton et al. 2012).

7. Interactions avec l'hôte

7.1 Impact de l'hôte sur la régulation des éléments

Bien que les ICE codent l'ensemble des fonctions nécessaires à leur maintien et à leur propagation, différentes études ont montré que l'activité de certains ICE peut être modulée par la cellule hôte. Ainsi, les taux d'excision et de réplication d'ICES_{t3} sont différents en fonction de la souche de *S. thermophilus* (Carraro et al. 2011). Cela indique que certains facteurs d'hôte peuvent jouer un rôle dans la fonctionnalité des ICE.

Certaines protéines associées au nucléoïde comme IHF (« Integrated Host Factor »), Fis (« Factor for inversion stimulation ») ou HU (« heat unstable » ou encore « histone-like protein ») (Swinger and Rice 2004), modulent la structure du chromosome et peuvent influencer l'activité de divers plasmides et bactériophages. Ainsi, la protéine IHF est requise pour l'intégration et l'excision du phage λ tandis que Fis stimule son excision (Freundlich et al. 1992; Esposito and Gerard 2003; Ortega and Catalano 2006; Papagiannis et al. 2007). De même, IHF stimule la coupure au niveau d'*oriT* par la relaxase et participe à la régulation du module de conjugaison chez le plasmide F (Nelson et al. 1995).

SXT se transfère à plus haute fréquence entre deux souches d'*E. coli* qu'entre deux souches de *V. cholerae*. De plus, la protéine IHF est requise pour le transfert de SXT entre deux souches de *V. cholerae*, mais non pour un transfert entre souches d'*E. coli* (McLeod et al. 2006). La protéine IHF pourrait ainsi faciliter le transfert de nombreux ICE.

De même, Tn916 se transfère vers *Lactococcus lactis* mais est incapable de s'exciser ou de se transférer à partir de cet hôte. Cela suggère que chez cette bactérie, des facteurs d'hôte importants manquent (Marra et al. 1999). L'excision de Tn916 chez *E. coli* est stimulée par la protéine HU (Connolly et al. 2002).

La majorité des séquences d'ADN acquises par transfert horizontal présente un taux en A+T supérieur au reste du génome. Certaines bactéries produisent des protéines qui vont cibler spécifiquement ces régions et réprimer leur expression. Les protéines de la famille H-NS des protéobactéries ou de la famille Lsr2 des actinobactéries régulent ainsi les éléments nouvellement acquis (Will and Frost 2006; Ali et al. 2012).

Chez *B. subtilis*, la protéine Rok, analogue fonctionnel des protéines H-NS, est un répresseur de la mise en place de la compétence et de diverses fonctions extracellulaires (Hoa et al. 2002; Albano et al. 2005). Rok se fixe sur les régions riches en A+T en particulier sur *ICEBs1*, ce qui réprime son excision. La délétion du gène *rok* induit une augmentation d'un facteur 4 de l'excision d'*ICEBs1* (Smits and Grossman 2010). Ainsi, Rok maintient *ICEBs1* quiescent dans le génome contribuant ainsi à sa stabilité.

Le complexe protéasique ClpPX, très conservé chez les bactéries, joue un rôle dans de nombreux processus cellulaires tels que la dégradation de protéines endommagées ou le contrôle de la stabilité et de l'activité de certains régulateurs transcriptionnels (Frees et al. 2007). Elle joue de fait un rôle dans la régulation de divers prophages. (Laachouch et al. 1996; Frees et al. 2007). De même, de nombreux ICE possèdent des régulateurs de type cI ou cI-like dont la régulation pourrait être modulée par le complexe ClpXP. Une étude globale du génome de *S. mutans* a montré une modulation de l'activité transcriptionnelle de l'ICE putatif *TnSmu1* dans un contexte mutant ClpPX (Chattoraj et al. 2010). De plus, des travaux préliminaires chez *B. subtilis*, ont montré que, dans un contexte mutant *clpP*, la quantité de protéase ImmA augmente (Bose and Grossman 2011). L'augmentation de la quantité de cette protéine cause la dérégulation de l'expression des gènes d'*ICEBs1*.

7.2 Impact de l'ICE sur la régulation de la cellule

ICEclc ne possède pas de régulation croisée avec les réseaux de régulation de son hôte *P. aeruginosa* (Gaillard et al. 2008). Toutefois, d'autres ICE vont, par leur présence ou en codant des fonctions spécifiques, influencer la régulation de la cellule qui les porte.

Ainsi, les ICE de la famille de Tn916 peuvent augmenter les zones hémolytiques des cellules lorsqu'ils sont intégrés dans le plasmide pAD1. Ce plasmide code en effet une propriété hémolytique basée sur un système à deux composants (Clewell et al. 1988; Ike et al. 1992). Une étude menée sur la souche *Bacteroides thetaiotaomicron* 5482 montre que l'ICE CTnDOT régule de nombreux gènes chromosomiques via les protéines régulatrices RteA et RteB codées par l'élément (Moon et al. 2007).

Par ailleurs, chez *E. coli* et *V. cholerae*, le transfert simple brin de trois plasmides conjugatifs et d'ICE SXT provoque l'activation de la protéine RecA qui clive alors LexA et induit la réponse SOS (Wozniak and Waldor 2010). La réponse SOS va avoir un impact non seulement sur l'élément lui-même en permettant notamment de créer des éléments hybrides via l'échange de modules mais aura également un impact sur les intégrons (Cambray et al. 2011). Le clivage de LexA dérègle l'intégrase des intégrons ce qui amène à la capture de nouvelles cassettes et à la modification de l'ordre des cassettes présentes et donc modifie le profil de résistance de la cellule. Enfin, la réponse SOS a un impact direct sur la cellule en induisant de larges réarrangements chromosomiques ou des mutagénèses.

Enfin, certains ICE vont produire des messagers intracellulaires qui vont induire un changement de style de vie de la bactérie. Chez de nombreuses bactéries, dont *V. cholerae*, la transition entre un mode de vie libre où la bactérie est mobile et une vie en biofilm est contrôlée par un second messager ubiquitaire, le dimère cyclique de guanosine monophosphate (di-c-GMP). Le niveau de di-c-GMP est régulé par un réseau complexe impliquant des diguanylate cyclases (DGC) qui produisent le composé et par des phosphodiesterases qui le dégradent (Jenal and Malone 2006). Trois ICE de *V. cholerae* ou *V. fluvialis*, appartenant à la famille SXT/R391, codent deux DGC chacun, DgcK et DgcL. La délétion de ces gènes augmente la mobilité de l'hôte. Au contraire, la surexpression des deux protéines réduit la mobilité cellulaire et favorise la formation de biofilm. Cette régulation aurait un impact sur la survie de l'hôte en augmentant sa capacité à former des biofilms lorsque nécessaire. De même elle confère un avantage à l'élément, car la croissance en biofilm favorise le contact entre cellules et la propagation de l'ICE (Bordeleau et al. 2010).

8. Streptococcus agalactiae

Le nom *Streptococcus* provient du grec strepto (tressé) et du latin coccus (sphérique). Il a été donné à des bactéries dont les cellules sont positives pour la coloration de Gram et qui poussent en chaînettes d'un minimum de deux cellules. Ce genre regroupe plus de cent espèces. Presque toutes les souches et espèces vivent en association avec l'homme ou les animaux en tant que commensales, pathogènes opportunistes ou pathogènes strictes. Historiquement, les streptocoques étaient classés selon le titrage de Lancefield, qui les regroupait selon la composition en antigènes de leur paroi. Les différents groupes étaient nommés avec des lettres capitales allant de A à W. Aujourd'hui, les streptocoques sont regroupés en six groupes taxonomiques suivant la séquence de leur ARN 16S (pyogénique, mutans, salivarius, bovis, mitis, anginosus) (Lancefield 1933; Nobbs et al. 2009).

8.1 Streptococcus agalactiae, bactérie commensale ou pathogène

Streptococcus agalactiae (streptocoque sans lait) correspond au groupe B du titrage de Lancefield et appartient au groupe des streptocoques pyogéniques suivant la séquence de son ARN 16S. *S. agalactiae* a tout d'abord été reconnue comme la cause principale des mammites chez les bovins, d'où son nom. Elle provoque ainsi d'importantes pertes économiques, du fait de la diminution de la qualité et la quantité du lait. Toutefois, la contamination se fait principalement d'animal à animal et une hygiène renforcée permet de diminuer grandement les risques. D'autres bactéries peuvent contaminer et infecter le pis, provoquant des mammites telles que *S. uberis* ou *S. dysgalactiae* (Keefe 1997; Zadoks et al. 2011).

Dans les années 60, *S. agalactiae* a été identifiée comme un pathogène humain (Anthony and Okada 1977). Elle est aujourd'hui reconnue comme la cause majeure des infections néonatales chez l'homme, même si les traitements des personnes à risques ont diminué son incidence. Cependant, dans la plupart des cas, c'est une bactérie commensale qui colonise le tractus intestinal et les voies vaginales d'environ 30% de la population. Lors de l'accouchement, 50 à 70% des femmes porteuses vont transmettre la bactérie à l'enfant, ce qui n'aboutira à des infections graves que dans 1 ou 2% des cas. Il existe deux types d'infection : (i) une infection précoce se déclarant dans les premiers jours de vie de l'enfant et caractérisée principalement par une pneumonie ou une septicémie et (ii) une infection dite tardive plutôt caractérisée par une méningite (Doran and Nizet 2004). *S. agalactiae* est également un pathogène

opportuniste pour les personnes âgées et les personnes immunodéprimées (Tazi et al. 2011).

Occasionnellement, *S. agalactiae* colonise également d'autres vertébrés comme les crocodiles, des poissons, les grenouilles ou divers mammifères (dauphins, chameaux, chiens, chats, souris...) (Elliott et al. 1990; Evans et al. 2006; Bishop et al. 2007; Mian et al. 2009).

Le caractère pathogène de *S. agalactiae* est lié à de nombreux facteurs de virulence (Figure 20). Certains, comme les protéines riches en résidus sérine ou encore les protéines se liant au fibrinogène ou à la laminine, vont lui permettre de se lier aux cellules épithéliales vaginales, pulmonaires ou encore aux cellules de la barrière endothéliale du cerveau (Doran and Nizet 2004; Rajagopal 2009). *S. agalactiae* possède également des pili qui lui confèrent une meilleure adhérence aux cellules épithéliales (Konto-Ghiorghi et al. 2009). Lors des infections, *S. agalactiae* doit passer différentes barrières : placentaire, pulmonaire ou cérébrale. Pour cela, elle possède des toxines qui forment des pores dans les cellules et provoquent la lyse cellulaire comme la β -hémolysine/cytolysine ou le facteur CAMP. De même, la hyaluronate lyase dégrade l'acide hyaluronique, composant majeur des tissus humains (Doran and Nizet 2004; Rajagopal 2009).

S. agalactiae possède également des caractères qui lui permettent de se protéger des défenses de l'hôte. *S. agalactiae* est entourée d'une capsule polysaccharidique. Un des composants de la capsule est l'acide sialique qui est également très présent, dans la même configuration, sur la surface des cellules de mammifères. La présence de ce sucre rend difficile la reconnaissance de la bactérie par le système immunitaire. La capsule inhibe la fixation du facteur C3 du complément et donc la phagocytose. Elle va également, entre autres coder une C5a peptidase qui clive le facteur de complément C5a impliqué dans le recrutement des neutrophiles. D'autres protéines vont se lier aux anticorps et inhiber leur action (Doran and Nizet 2004; Rajagopal 2009). De plus, *S. agalactiae* peut survivre à l'intérieur des macrophages et peut y persister entre 24 et 48 h (Cornacchione et al. 1998). Pour ce faire, la superoxyde dismutase est une défense efficace contre le stress oxydant. De même, *S. agalactiae* produit un pigment caroténoïde orange qui neutralise le peroxyde d'hydrogène. Curieusement, la synthèse de ce pigment est

associée à celle de la β -hémolysine/cytolysine (Doran and Nizet 2004; Rajagopal 2009).

Des réponses transcriptionnelles rapides ont été observées à la suite de modifications de température ou lorsque *S. agalactiae* doit survivre dans le sang (Mereghetti et al. 2008; Mereghetti et al. 2008). Ainsi, *S. agalactiae* met en place des régulations lui permettant de s'adapter à l'environnement dans lequel elle se trouve tout en exprimant de façon adéquate ses facteurs de virulence.

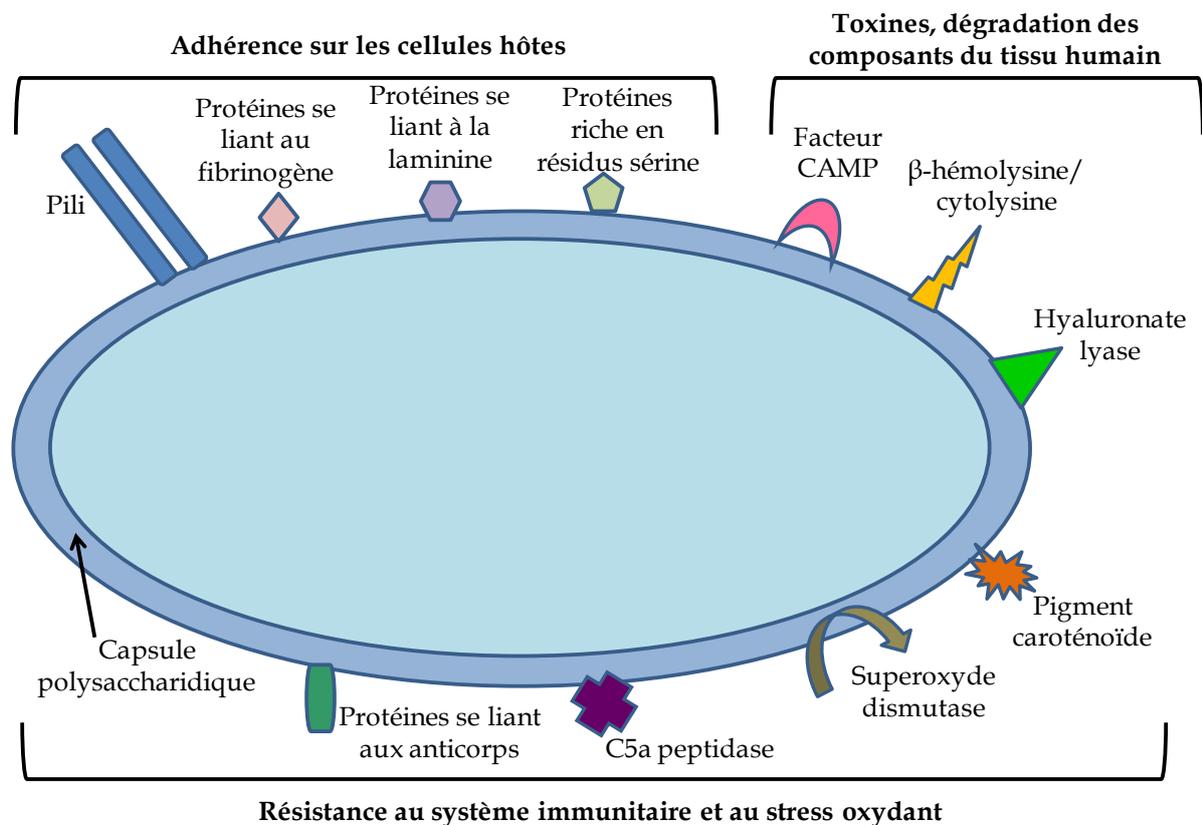


Figure 20 : Facteurs impliqués dans la virulence de *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae, pathogène de l'homme et des animaux, possède de nombreux facteurs de virulence. Parmi eux, certains vont permettre l'adhésion et l'invasion des cellules de l'hôte. D'autres permettront de détruire des cellules de l'hôte. Enfin, certains facteurs codés par la bactérie permettent d'échapper au système immunitaire, notamment via la résistance au stress oxydant.

8.2 Transfert et polymorphisme chez *S. agalactiae*

S. agalactiae colonise de nombreux hôtes et s'adapte à différents environnements. Les premières analyses comparatives réalisées sur des souches

humaines et bovines révèlent que les deux populations sont clairement distinctes. En effet, les protéines de surface produites par les souches humaines et bovines sont très différentes et souvent spécifiques (Wanger and Dunny 1987; Wibawan and Lammler 1990). Des analyses moléculaires et phylogénétiques basées notamment sur des ribotypages et sur des MLST (« multi locus sequentyping ») ont confirmé cette différence entre populations (Bisharat et al. 2004; Dogan et al. 2005; Sukhnanand et al. 2005).

Les analyses comparatives des huit génomes totalement ou partiellement séquencés de *S. agalactiae* d'origine humaine ont permis de mettre en évidence que cette dernière possède un pan-génome ouvert. Ce pangénome inclut un génome stable composé de gènes présents chez toutes les souches et d'un génome variable contenant des gènes présents seulement chez certaines souches. Chaque nouvelle souche séquencée apporte son lot de nouveaux gènes. Le pool de gènes flexibles inclut en particulier des gènes codant des protéines de surface, des protéines sécrétées ou de la capsule et la majorité des gènes de virulence connus, donc des gènes ayant des rôles dans l'interaction avec l'hôte (Tettelin et al. 2005a).

Les 11 à 14 régions variables décrites chez huit souches séquencées sont en fait des îlots génomiques et/ou des éléments génétiques mobiles. Parmi ces régions, 48 correspondent à des ICE, IME ou des éléments en dérivant (Brochet et al. 2008a). Ces îlots peuvent être présents chez plusieurs souches, dans une seule souche ou encore en plusieurs copies au sein du même génome. Ils représentent les deux tiers de la diversité observée lors de la génomique comparative. Au total, 35 éléments différents, ICE, IME ou dérivés, ont été identifiés, répartis dans 15 sites d'intégration différents. La grande majorité de ces sites correspond à l'extrémité 3' d'un gène codant un ARN de transfert (Leucine, Thréonine ou Lysine) ou d'une protéine ribosomique (gènes *rpsI*, *rplL* ou *rpmG*). La majorité des éléments est intégrée dans un site spécifique, seuls Tn916, TnGBS1 et TnGBS2 s'intègrent dans différents sites (Figure 21) (Brochet et al. 2008a). Le séquençage récent d'une souche d'origine bovine a confirmé que le transfert horizontal est un facteur majeur de la diversité et de la plasticité observé sur le génome de *S. agalactiae*. Ainsi, les 183 gènes spécifiques à la souche d'origine bovine sont concentrés dans huit îlots génomiques (Richards et al. 2011). La diversité observée entre les souches humaines et bovines proviendrait donc en grande partie des éléments génétiques mobiles.

Des analyses *in silico* et *in vitro* ont permis de mettre en évidence des échanges de larges fragments chromosomiques de 21 à 334 kb. Ils proviendraient, notamment,

de la mobilisation en *cis* ou en *trans* de fragments chromosomiques via des éléments conjugatifs et seraient en partie responsables de la diversité observée chez *S. agalactiae*. Cela augmente encore l'importance des ICE dans la dynamique des génomes bactériens (Brochet et al. 2006; Brochet et al. 2008b; Sorensen et al. 2010).

Avant ce travail, le transfert de 2 ICE de *S. agalactiae* avait déjà été démontré. Ainsi, TnGBS2 se transfère de manière intraspécifique par conjugaison. Avec l'élément TnGBS1, il s'agit à l'heure actuelle des seuls éléments conjugatifs caractérisés portant une transposase à DDE catalysant la transposition. Cette nouvelle classe d'éléments génétiques mobiles semble très répandue chez *S. agalactiae* (Brochet et al. 2009; Guerillot et al. 2013). De même, l'élément Tn916 se transfère par conjugaison non seulement vers d'autres souches de *S. agalactiae* mais aussi vers des souches de *S. dysgalactiae* et *S. uberis* (Haenni et al. 2010). A l'inverse, un transfert d'ICESde3397 de *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* vers des souches de *S. agalactiae* avait déjà été observé (Davies et al. 2009).

S. agalactiae présente deux loci CRISPR au sein de son génome. L'un d'entre eux, le locus CRISPR1, très dynamique possède des espaceurs contre des îlots génomiques de *S. agalactiae*. Il permettrait en fait de moduler la diversité des éléments génétiques mobiles au sein de la population (Lopez-Sanchez et al. 2012).

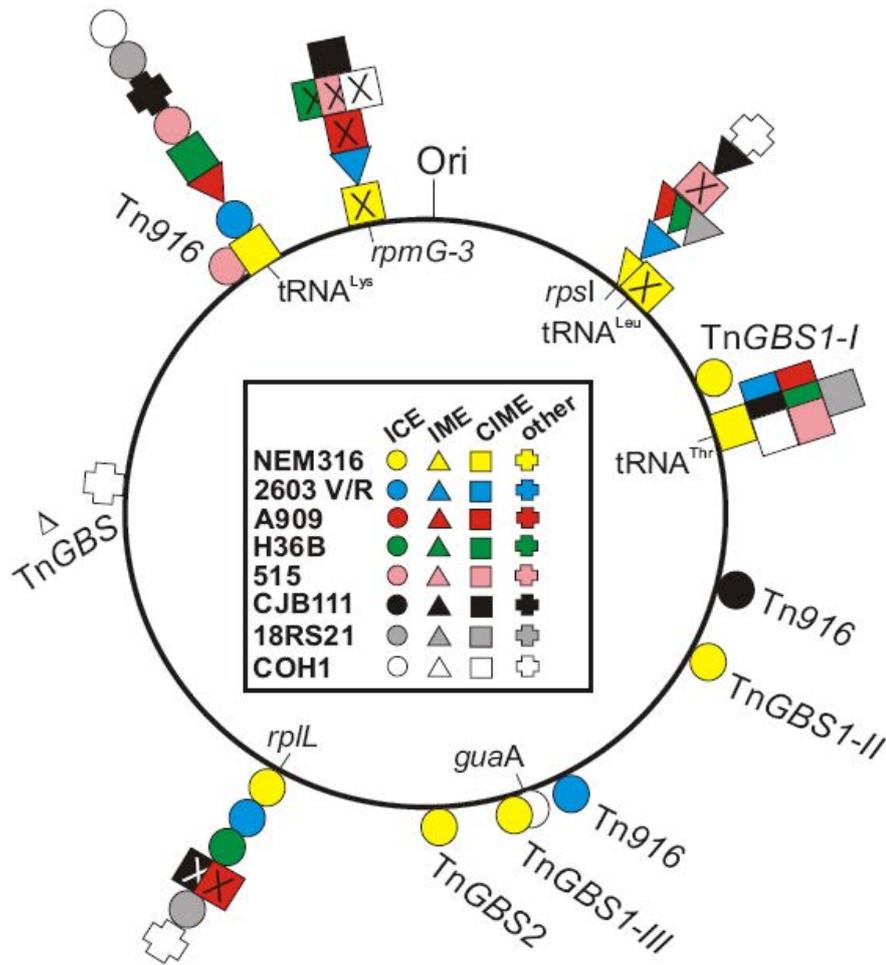


Figure 21: ICE, IME et îlots génomiques en dérivant de *S. agalactiae* (Brochet et al. 2008a)

L'analyse bioinformatique de huit génomes séquencés de *S. agalactiae* d'origine humaine a permis de mettre en évidence 35 éléments différents dont 12 ICE putatifs, 6 IME putatifs et 13 CIME putatifs. Ces éléments sont insérés dans 15 sites d'insertions différents, principalement à l'extrémité d'ARN de transfert ou de gènes codant des protéines ribosomales.

Le symbole indique le type d'élément (rond ICE, triangle IME, carré CIME, croix autre), la couleur indique la souche qui porte l'élément (jaune Nem316, bleu 2603 V/R...). Les éléments identiques dans plusieurs souches apparaissent sur la même ligne.

S. agalactiae n'a jamais été démontrée comme étant une bactérie compétente. Toutefois, elle possède dans son génome tous les gènes orthologues de *S. pneumoniae* nécessaires pour la mise en place de la compétence, à l'exception des gènes régulateurs de l'induction (Glaser et al. 2002).

De même, les phages sont des véhicules importants du transfert horizontal chez les streptocoques (Canchaya et al. 2004; Brenciani et al. 2010). Bien que leur rôle

semble mineur chez *S. agalactiae* en comparaison aux éléments conjugatifs, ils ont un rôle dans la plasticité de son génome.

8.3 Ilots de *S. agalactiae* intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un $\text{ARN}_{\text{t}}^{\text{Lys CTT}}$

Les éléments intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un $\text{ARN}_{\text{t}}^{\text{Lys CTT}}$ illustrent particulièrement la plasticité et la diversité des éléments génétiques mobiles de *S. agalactiae*. En effet, les huit souches humaines étudiées portent toutes un élément intégré à ce locus, différent pour chaque souche (Brochet et al. 2008a). Une analyse a également démontré que ces éléments étaient répandus chez les souches bovines de *S. agalactiae* (Haenni et al. 2010). Ainsi, l'extrémité 3' du gène codant un $\text{ARN}_{\text{t}}^{\text{Lys}}$ serait un point chaud d'intégration pour les éléments génétiques mobiles chez *S. agalactiae*.

Des éléments très proches intégrés dans le même locus sont également présents chez certaines souches de *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, de *S. bovis* et *S. equisimilis* (Haenni et al. 2010; Chuzeville et al. 2012). Par ailleurs, les modules de conjugaison d'ICE*St1* et d'ICE*St3* de *S. thermophilus* sont apparentés à ceux des ICE putatifs de *S. agalactiae* intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un $\text{ARN}_{\text{t}}^{\text{Lys}}$ (35 à 67% d'identité protéique) (Burrus et al. 2002a; Pavlovic et al. 2004). De même, ces quatre ICE sont apparentés à ICE_6180-RD.2 de *S. pyogenes* et de l'ICE putatif Tn*Smu1* de *S. mutans* (Burrus et al. 2002a; Sitkiewicz et al. 2011). Cette famille d'éléments serait donc répandue chez l'ensemble des streptocoques.

Les éléments intégrés au locus considéré chez les 8 souches de *S. agalactiae* analysées ont une taille comprise entre 8 et 43 kb. Ils sont flanqués de répétitions directes de 11 pb. Si l'on prend en compte chaque îlot, on retrouve quatre ICE putatifs (souches 515, COH1, 18RS21 et 2603V/R), trois IME putatifs (souches A909, ainsi que deux IME putatifs en accréation avec un ICE dans les souches 2603V/R et 18RS21), deux CIME (souches Nem316 et H36B) et un îlot génomique dépourvu du site *attL* (souche CJB111) (Figure 22) (Brochet et al. 2008a).

L'élément présent chez la souche A909 (IME_A909_ *tRNA*^{Lys}) porte deux gènes codant une intégrase putative dont un semble tronqué ainsi que deux sites *attI* internes. Il présente par ailleurs de nombreuses duplications de séquence. C'est un

élément composite qui a dû subir de nombreux réarrangements. *CIME_H36B_tRNA^{Lys}*, présent chez la souche H36B, correspond à la partie gauche d'*IME_A909_tRNA^{Lys}*. Il s'agit également d'un élément composite présentant un site *attI* interne. La souche Nem316 porte quant à elle *CIME_Nem_tRNA^{Lys}*. Ce CIME comprend quatorze ORF homologues à celles d'*IME_A909_tRNA^{Lys}*. Cet élément porte également un site *attI* interne et semble donc avoir subi un événement d'accrétion (Figure 22).

Parmi les quatre ICE putatifs, *ICE_515_tRNA^{Lys}* et *ICE_COH1_tRNA^{Lys}*, ne diffèrent que par huit ORF. *ICE_515_tRNA^{Lys}* contient cinq gènes homologues à des régulateurs suggérant une régulation de l'excision et du transfert de cet élément très complexe. *ICE_2603_tRNA^{Lys}* et *ICE_18RS21_tRNA^{Lys}* portent deux modules de recombinaison et deux gènes codant une relaxase putative. *ICE_2603_tRNA^{Lys}* porte un site *attI* interne et résulterait de l'accrétion en tandem par intégration site-spécifique d'un IME et d'un ICE putatifs (Figure 22). *ICE_18RS21_tRNA^{Lys}* ne porte pas de site *att* interne ; sa structure résulterait de l'intégration d'un IME dans l'origine de transfert d'un ICE (données non publiées). *ICE_515_tRNA^{Lys}* semble cependant être le seul des quatre ICE à porter un module de conjugaison complet. Chez les trois autres souches, au moins une protéine serait inactive. Ainsi, *orfD* de COH1 présente un décalage de cadre de lecture conduisant à l'apparition d'un codon stop précoce. De plus, *orfD* d'*ICE_2603_tRNA^{Lys}* et *ICE_18RS21_tRNA^{Lys}* ainsi qu'*orfL* d'*ICE_18RS21_tRNA^{Lys}* sont tronqués.

En plus des gènes nécessaires aux fonctions de recombinaison, de conjugaison ou de régulation, les éléments considérés portent des gènes pouvant conférer un avantage sélectif. Ainsi, les quatre ICE putatifs portent un opéron *mer* codant une réductase et un système de transport des ions mercure, ce qui constitue le principal mécanisme de défense des bactéries contre les ions mercure (Barkay et al. 2003). Chez les souches COH1 et 515, les ICE putatifs codent également un facteur CAMP, facteur de virulence, qui est fonctionnel chez la souche 515 (Chuzeville et al. 2012). Ces quatre ICE putatifs codent également un système toxine-antitoxine putatif, des protéines de surface à motif LPxTG pouvant jouer un rôle dans les interactions avec l'hôte (Ton-That et al. 2004) ou encore des facteurs pouvant conférer une résistance au stress notamment au stress oxydant (protéine de la famille NRAMP et glutaredoxine) ce qui pourrait jouer un rôle dans la survie dans les macrophages (Cellier et al. 2007; Stroher and Millar 2012). Enfin, les quatre ICE putatifs portent un

opéron homologue à *yvdFGHIJ* de *B. subtilis* codant une bactériocine putative (Butcher et al. 2007). Chez *B. subtilis*, cet opéron est composé de cinq gènes. Le premier code un petit peptide, les deux suivant codent deux protéines de modification et les derniers les deux sous-unités d'un transporteur ABC. Seule la souche COH1 porte l'opéron en entier. Pour les trois autres souches, les deux gènes codant les protéines modificatrices manquent. Cet opéron ne serait donc plus fonctionnel chez ces trois éléments.

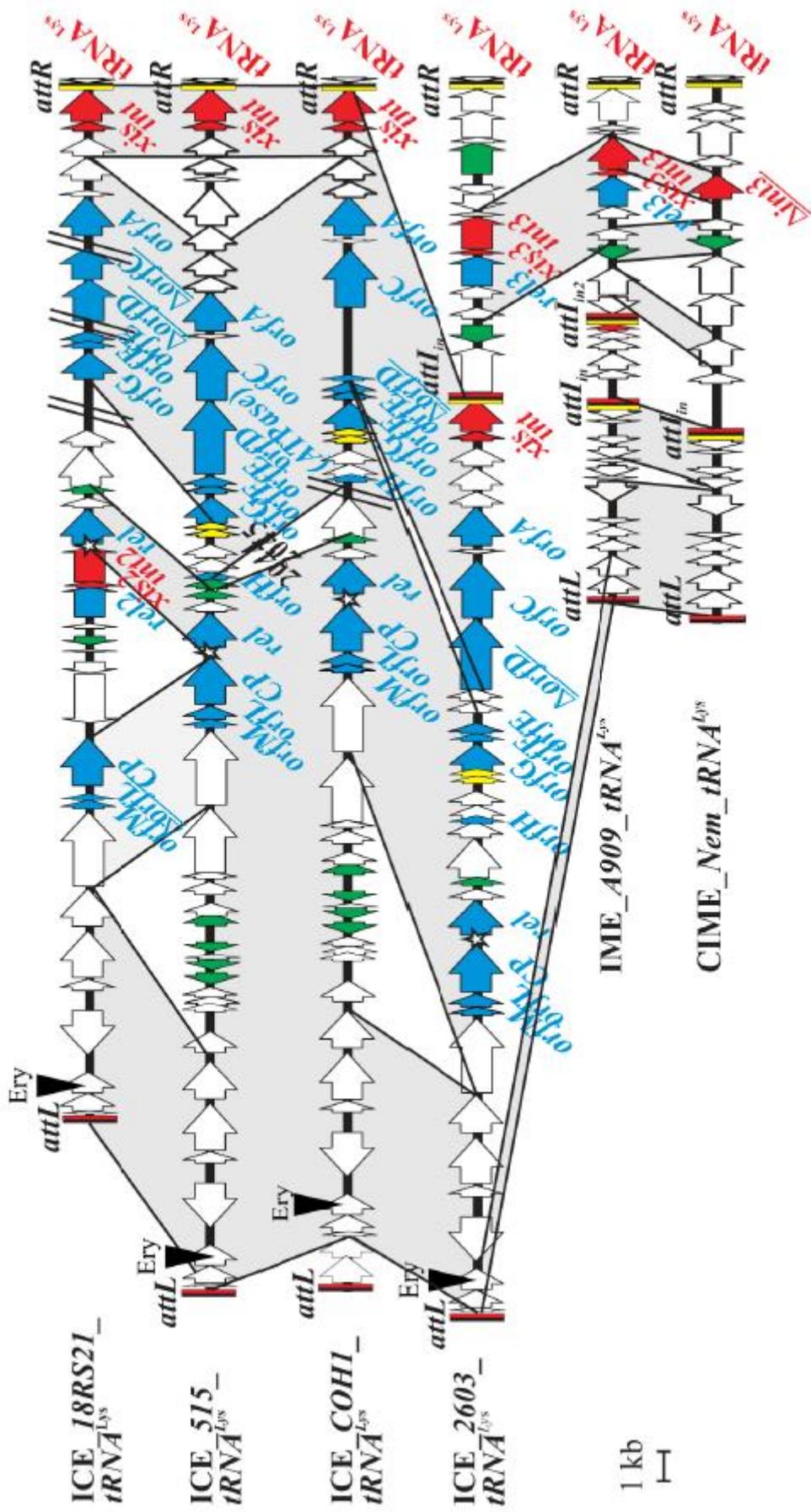


Figure 22 : Organisation et comparaison des éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} de *S. agalactiae* (Brochet et al. 2008a)

Les flèches représentent les ORF. Les gènes tronqués sont soulignés et leur nom est précédé d'un delta. Le nom du gène où l'élément est intégré apparaît en rouge. Les gènes du module de conjugaison apparaissent en bleu, ceux du module de recombinaison en rouge et ceux probablement impliqués dans la régulation de l'ICE en vert. Les noms des gènes proviennent soit d'un domaine putatif trouvé sur ce dernier ou d'une fonction putative associée au produit du gène. Les termes *int*, *xis*, *rel*, *CP* ou *ATPase* représentent respectivement l'intégrase, l'excisionase, la relaxase, la protéine de couplage et l'ATPase putative. Lorsque l'élément présente plusieurs gènes impliqués dans une même fonction, un numéro permet de les différencier. D'autres gènes ont été nommés en fonction de leur homologie avec ICESt1 et ICESt3 de *S. thermophilus*. Le système toxine/antitoxine est représenté par des ORF jaunes (SAL2044/SAL2045 chez la souche 515 et homologues chez les autres éléments). L'*oriT* putative des éléments est représentée par une étoile. Les sites de recombinaison sont schématisés par des rectangles, en noir séquences de recombinaison, en jaune bras du site *attR* et apparenté au niveau des sites *attI*, en rouge bras du site *attL* et apparenté au niveau des sites *attI*. Les surfaces grisées indiquent les séquences présentant une identité protéique supérieure à 80%. La position du gène SAG2026 dans lequel a été introduit un gène de résistance à l'érythromycine est indiqué par un triangle noir. Enfin, les doubles barres obliques indiquent les trous dans les séquences du génome dus à des contigs manquants. Pour plus de lisibilité seules les souches utilisées lors de ces travaux sont représentées.

OBJECTIFS

Le transfert horizontal de gènes est un mécanisme clé de l'évolution bactérienne (Lawrence et Ochman). Il est notamment responsable de la grande diversité génétique observée au sein des espèces bactériennes et contribue à l'adaptation des bactéries à différents environnements grâce à l'acquisition de gènes codant de nouvelles fonctions tels que des gènes de pathogénicité, de symbiose, de résistance ou de nouvelles capacités métaboliques. Cette acquisition de gènes serait principalement due à des éléments génétiques mobiles qui codent tout ou partie des fonctions impliquées dans leur propre transfert. Parmi eux, les études les plus récentes suggèrent que les îlots génomiques conjugatifs (ICE), mobilisables en trans (IME) ou en *cis* (CIME), bien que rarement identifiés et méconnus, seraient extrêmement répandus au sein des génomes bactériens (Burrus et al. 2002a; Guglielmini et al. 2011).

S. agalactiae est une bactérie pathogène opportuniste de l'homme et des animaux. Elle est ainsi adaptée à de nombreux hôtes et environnements. Les analyses génomiques révèlent que le pan-génome de *S. agalactiae*, composé d'un génome stable présent chez toutes les souches et d'un génome variable, est ouvert (Tettelin et al. 2005a). Les ICE, IME et éléments apparentés (CIME) pourraient être en grande partie responsables de la diversité observée au sein des génomes de *S. agalactiae*. Ainsi, chez les huit souches humaines séquencées, 35 ICE, IME ou CIME ont été identifiés, répartis dans 15 sites d'intégration différents (Brochet et al. 2008a).

L'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} semble en particulier être un point chaud d'intégration d'îlot transmissible par conjugaison chez *S. agalactiae* à la fois pour les souches d'origine humaine et bovine (Brochet et al. 2008a; Haenni et al. 2010). De plus, des éléments étroitement apparentés semblent également représentés chez d'autres espèces de streptocoques tels que *S. dysgalactiae*, *S. uberis*, *S. bovis* et *S. equisimilis* (Haenni et Sarah). Des éléments plus éloignés sont également décrits chez de nombreuses espèces de streptocoques (Burrus et al. 2002a; Pavlovic et al. 2004; Carraro et al. 2011; Sitkiewicz et al. 2011).

L'analyse de séquence des îlots génomiques intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} chez les 8 génomes séquencés de *S. agalactiae* suggère que

ces éléments présentent une évolution complexe impliquant conjugaison autonome et mobilisation en *trans* ou en *cis*, ce qui en ferait un outil idéal pour analyser l'impact du transfert par conjugaison des îlots génomiques au moins dans cette espèce. En plus des gènes impliqués dans la mobilité, ils portent des fonctions pouvant contribuer à l'adaptation de l'hôte à son environnement notamment la présence d'un facteur de virulence (facteur CAMP) (Chuzeville et al. 2012) et de protéines de surface (Chuzeville com. pers.).

De nombreux génomes de *S. agalactiae* sont aujourd'hui disponibles dans les banques. Un objectif de ces travaux de thèse a été d'exploiter cette opportunité pour évaluer la prévalence et la diversité des éléments intégrés dans ce locus chez *S. agalactiae* et de déterminer leur nature.

Le transfert d'aucun de ces éléments n'avait été démontré, bien que les données suggéraient que certains de ces éléments pouvaient être des ICE fonctionnels. Dans un premier temps, l'excision a été testée. Puis, le transfert autonome de ces éléments a été testé non seulement entre souches de *S. agalactiae* mais également vers d'autres espèces de streptocoques, puisque la présence d'éléments apparentés chez ces derniers suggérait que ces ICE pourraient se transférer vers d'autres espèces.

Enfin, de nombreux ICE mobilisent d'autres éléments génétiques mobiles en *trans* ou en *cis* (Bellanger et al. 2011). Ainsi, ICESt3 de *S. thermophilus*, ICE appartenant à la même famille mais de spécificité d'intégration différente (extrémité 3' du gène *fda*), s'intègre au niveau du site *att* d'un autre élément (accrétion) et le mobilise en *cis*. Ce type d'évolution d'îlot génomique et de mobilisation n'avait été recherché et démontré que pour cet ICE, bien que diverses données suggèrent que cette accrétion et mobilisation pourrait jouer un rôle important voir essentiel dans l'évolution des îlots génomiques, en particulier dans les îlots intégrés dans le gène d'ARNt^{Lys} de *S. agalactiae*. L'un des objectifs de ce travail était de démontrer ce mécanisme d'évolution et de mobilisation chez ces éléments de *S. agalactiae*, qui présentent une spécificité d'intégration totalement différente de celle d'ICESt3.

MATERIELS ET METHODES

1. Souches bactériennes et conditions de culture

Les différentes souches de *S. agalactiae* utilisées au cours de ce travail ainsi que leurs caractéristiques sont exposées dans le tableau 2. Les précultures et cultures ont été effectuées à 37°C en aérobiose, excepté les expériences de conjugaison qui ont été réalisées en anaérobiose. Les conditions d'anaérobiose ont été obtenues par incubation des cultures grâce au système Genbox (BioMérieux). Les précultures et cultures ont été réalisées dans du milieu d'infusion cœur-cerveau (BHI pour « brain heart infusion »), du milieu Todd Hewitt pour la préparation de cellules électrocompétentes ou sur du milieu gélosé trypticase soja composé de cœur de bovin, de digestion tryptique de tissus animaux et de 5% de sang de cheval défibriné (AES chemunex). Les souches transformées par des plasmides recombinants présentant une origine de répllication thermosensible ont été cultivées en milieu trypticase soja ou BHI à 30°C. Les souches possédant un plasmide recombinant intégré dans leur chromosome ont été cultivées à 37°C dans les mêmes milieux. La souche FSL S3-026 de *S. agalactiae* provient de la collection bactérienne BCCM™/LMG et est accessible sous le numéro LMG26500 (Universiteit Gent, Belgium).

Les souches d'autres streptocoques ou d'entérocoques utilisées comme cellules réceptrices lors des tests de conjugaison interspécifiques sont présentées dans le tableau 2. *Streptococcus uberis* et *Streptococcus dysgalactiae* ont été cultivés en milieu BHI à 37°C en conditions aérobies (avec une agitation de 150 rpm). *Streptococcus pyogenes* et *Enterococcus faecalis* ont été cultivés dans les mêmes conditions mais en anaérobiose. L'ensemble de ces espèces a été cultivé sur gélose trypticase soja supplémentée avec du sang de cheval défibriné (5%). Les précultures de *Streptococcus thermophilus* ont été réalisées dans du lait écrémé reconstitué à 10% (p/vol), tandis que les cultures ont été effectuées dans du milieu M17 supplémenté avec 0,5% de lactose (LM17). Les précultures et cultures de *S. thermophilus* ont été réalisées à 42°C sans agitation ou en anaérobiose dans des jarres grâce au système GasPak (bioMérieux). *Streptococcus salivarius* a été cultivé dans du milieu M17 supplémenté avec 0,5% de glucose (GM17) à 37°C en anaérobiose. Les cultures de *Streptococcus mutans* ont été effectuées en milieu Todd Hewitt supplémenté avec 0,1% d'extrait de levure (THY) à 37°C en anaérobiose.

Toutes les cultures de streptocoques ou d'entérocoques ont été supplémentées avec les antibiotiques suivants lorsque ceux-ci étaient requis : chloramphénicol

(16 µg/mL), érythromycine (50 µg/mL), rifampicine (75 µg/mL), spectinomycine (500 µg/mL) ou streptomycine (250 µg/mL).

Les souches d'*E. coli* EC101 (Stratagene) ou DH5α ont été employées comme hôte pour les plasmides recombinants. Elles présentent respectivement les génotypes suivants : *supE, hsd-5, thi-1, (lac-proAB), (F traD36, proAB, lacIqZ M15), repA⁺* et *supE44 lacU169 (Φ80 lacZ M15) hdsR17 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*. Les souches portant les plasmides recombinants ont été cultivées sous agitation, à 37°C en milieu LB (Luria-Bertani) en présence d'érythromycine (150 µg/mL), de spectinomycine (50 µg/mL), de chloramphénicol (16 µg/mL) ou d'ampicilline (150 µg/mL).

Tableau 2 : Listes et caractéristiques des souches utilisées dans ce travail

Souches	Caractéristiques génotypiques ou phénotypiques ^a	Source ou référence
<i>S. agalactiae</i>		
515	Souche sauvage portant un ICE putatif (<i>ICE_515_tRNA^{Lys}</i>)	(Tettelin et al. 2005a)
2603V/R	Souche sauvage portant un élément composite ICE-IME putatif (<i>ICE_2603_tRNA^{Lys}</i>) codant une protéine de transfert putative OrfD tronquée (homologue à l'ATPase VirB4)	(Tettelin et al. 2002b)
COH1	Souche sauvage portant un ICE putatif (<i>ICE_COH1_tRNA^{Lys}</i>) codant une protéine de transfert putative OrfD tronquée (homologue à l'ATPase VirB4)	(Tettelin et al. 2005a)
18RS21	Souche sauvage portant un ICE putatif (<i>ICE_18RS21_tRNA^{Lys}</i>) codant trois protéines de transfert putatives tronquées (OrfC, OrfD et OrfL)	(Tettelin et al. 2005a)
FSL S3-026	Souche sauvage portant un ICE putatif (<i>ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys}</i>)	(Richards et al. 2011)
Nem316	Souche sauvage portant un CIME putatif (<i>CIME_Nem_tRNA^{Lys}</i>)	(Glaser et al. 2002)
A909	Souche sauvage portant un IME putatif (<i>IME_A909_tRNA^{Lys}</i>)	(Tettelin et al. 2005a)
515 (<i>ICE_515_tRNA^{Lysery}</i>)	Souche portant <i>ICE_515_tRNA^{Lys}</i> marqué par une cassette de résistance à l'érythromycine, Ery ^r	Ce travail
515 (<i>ICE_515_tRNA^{Lyscat}</i>)	Souche portant <i>ICE_515_tRNA^{Lys}</i> marqué par une cassette de résistance au chloramphénicol, Cm ^r	Ce travail
2603V/R (<i>ICE_2603_tRNA^{Lysery}</i>)	Souche portant <i>ICE_2603_tRNA^{Lys}</i> marqué par une cassette de résistance à l'érythromycine, Ery ^r	Ce travail
COH1 (<i>ICE_COH1_tRNA^{Lysery}</i>)	Souche portant <i>ICE_COH1_tRNA^{Lys}</i> marqué par une cassette de résistance à l'érythromycine, Ery ^r	Ce travail
18RS21 (<i>ICE_18RS21_tRNA^{Lysery}</i>)	Souche portant <i>ICE_18RS21_tRNA^{Lys}</i> marqué par une cassette de résistance à l'érythromycine, Ery ^r	Ce travail
FSL S3-026 (<i>ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lysery}</i>)	Souche portant <i>ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lysery}</i> marqué par une cassette de résistance à l'érythromycine, Ery ^r	Ce travail
Nem316 (<i>CIME_Nem_tRNA^{Lyscat}</i>)	Souche portant <i>CIME_Nem_tRNA^{Lys}</i> marqué par une cassette de	Ce travail

COH1 Rif ^r Str ^r	résistance au chloramphénicol, Cat ^r	
Nem316 Rif ^r Str ^r	Mutant spontané résistant à la rifampicine et à la streptomycine	Ce travail
A909 Rif ^r Str ^r	Mutant spontané résistant à la rifampicine et à la streptomycine	Ce travail
<i>S. mutans</i>		
UA159	Souche sauvage, pas d'élément intégré à l'extrémité du gène ARNt ^{Lys} CUU	(Ajdic et al. 2002)
UA159 Rif ^r Str ^r	Mutant spontané résistant à la rifampicine et à la streptomycine	Ce travail
<i>S. salivarius</i>		
CIP102503	Souche sauvage	Collection Institut Pasteur
JIM8777	Souche sauvage portant un IME putatif intégré à l'extrémité du gène ARNt ^{Lys} CUU	(Guedon et al. 2011)
CIP102503 Rif ^r Str ^r	Mutant spontané résistant à la rifampicine et à la streptomycine	Ce travail
JIM8777 Rif ^r Str ^r	Mutant spontané résistant à la rifampicine et à la streptomycine	Ce travail
<i>S. thermophilus</i>		
LMG18311	Souche sauvage portant un élément composite CIME-IME putatif intégré à l'extrémité du gène ARNt ^{Lys} CUU	(Bolotin et al. 2004)
LMG18311 Rif ^r Str ^r	Mutant spontané résistant à la rifampicine et à la streptomycine	Ce travail
<i>S. uberis</i>		
20388	Souche sauvage	(Haenni et al. 2010)
21458	Souche sauvage	(Haenni et al. 2010)
20388 Rif ^r Str ^r	Mutant spontané résistant à la rifampicine et à la streptomycine	Ce travail
21458 Rif ^r Str ^r	Mutant spontané résistant à la rifampicine et à la streptomycine	Ce travail
<i>S. dysgalactiae</i>		
14998	Souche sauvage	(Haenni et al. 2010)
16192	Souche sauvage	(Haenni et al. 2010)
14998 Rif ^r Str ^r	Mutant spontané résistant à la rifampicine et à la streptomycine	Ce travail
16192 Rif ^r Str ^r	Mutant spontané résistant à la rifampicine et à la streptomycine	Ce travail
<i>S. pyogenes</i>		

ATCC 12202 ATCC 12202 Rif ^r <i>E. faecalis</i> JH2-2	Souche sauvage Mutant spontané résistant à la rifampicine Rif ^r , Fus ^r	ATCC (Bellanger et al. 2009) (Jacob and Hobbs 1974)
JH2-2 Rif ^r Str ^r <i>E. coli</i> EC101	Mutant spontané résistant à la rifampicine et à la streptomycine <i>supE hsd-5 thi (lac-proAB) F (traD6 proAB lacI^q lacZ M15) repA,</i> dérivant de la souche TG1	Ce travail (Law et al. 1995)
DH5α	<i>supE44 lacU169 (ϕ80 lacZ M15) hsdR17 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Sambrook and Russell 2001)

^a Abbreviations: Cm^r, résistance au chloramphénicol; Ery^r, résistance à l'érythromycine; Fus^r, résistance à l'acide fusidique; Rif^r, résistance à la rifampicine; Str^r, résistance à la streptomycine

2. Plasmides et vecteurs utilisés

Les caractéristiques des différents plasmides sont présentées dans le tableau 3.

Tableau 3 : Listes et caractéristiques des plasmides utilisés au cours de ce travail

Plasmide	Caractéristiques ^a	Source ou référence
pG+host9	Origine de réplication thermosensible de type pWV01 provenant de pVE6002, Ery ^r	(Maguin et al. 1992)
pG+host9spc	Plasmide dérivant de pG+host9, spc ^r	Bellanger (com. pers.)
pSL1180	Origine de réplication pMB1, site multiple de clonage, Amp ^r	(Brosius 1989)
pSET4s	Origine de réplication thermosensible de type pWV01 provenant de pVE6002, Spc ^r	(Takamatsu et al. 2001)
pSET5s	Origine de réplication thermosensible de type pWV01 provenant de pVE6002, Cm ^r	(Takamatsu et al. 2001)
pIB184	Plasmide d'expression, porteur du promoteur P23, Ery ^r	(Biswas et al. 2008)
pIB185	Plasmide d'expression, porteur du promoteur Pveg, Ery ^r	(Biswas et al. 2008)
pORI23	Plasmide d'expression, origine de réplication ColE1, porteur du promoteur P23, Ery ^r	(Que et al. 2000)
pG+host9-SAG2026 ::ery	Plasmide dérivant de pG+host9spc, porteur d'insert homologue au gène SAG2026, Ery ^r	Ce travail
pG+host9-SAG2026 ::cat	Plasmide dérivant de pG+host9spc, porteur d'insert homologue au gène SAG2026, Cm ^r	Ce travail
pIB184- <i>int-xis-attR</i>	Plasmide dérivant de pIB184, porteur du site <i>attR</i> et des gènes <i>xis</i> et <i>int</i> d'ICE_515_tRNA ^{Lys} , Ery ^r	Ce travail
pIB185- <i>int-xis-attR</i>	Plasmide dérivant de pIB185, porteur du site <i>attR</i> et des gènes <i>xis</i> et <i>int</i> d'ICE_515_tRNA ^{Lys} , Ery ^r	Ce travail

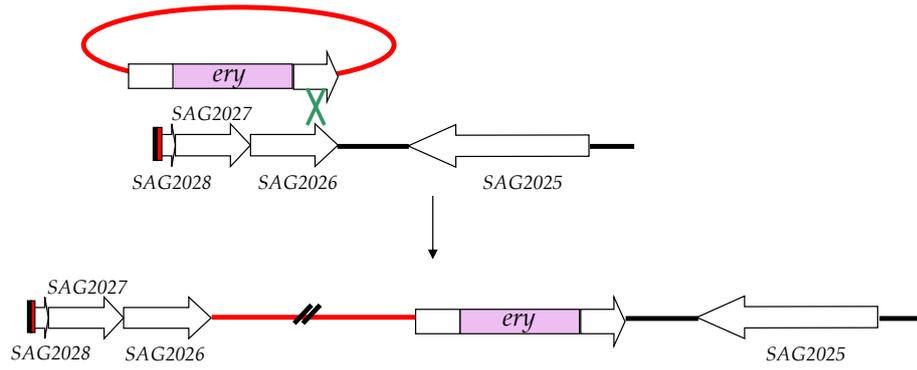
^a Abréviations: Amp^r, résistance à l'ampicilline; Cm^r, résistance au chloramphénicol; Ery^r, résistance à l'érythromycine; Spc^r, résistance à la spectinomycine

Le plasmide pG+host9, ou ses dérivés (Tableau 3), a été employé en tant que vecteur de clonage (Maguin et al. 1992). Il porte le gène *ermB* conférant une résistance à l'érythromycine chez *E. coli* (150 µg/mL) et chez *S. agalactiae* (10 µg/mL). Il possède une origine de réplication qui dérive de celle du plasmide pWV01 de *Lactococcus lactis* (Leenhouts et al. 1991) et permet la réplication du plasmide par un mécanisme de cercle roulant chez *E. coli* et les bactéries lactiques. Ce plasmide, en raison d'une mutation dans le gène *repA*, ne peut pas se répliquer à 37°C (température restrictive) mais se réplique à 30°C (température permissive). Toutefois, la réplication reste

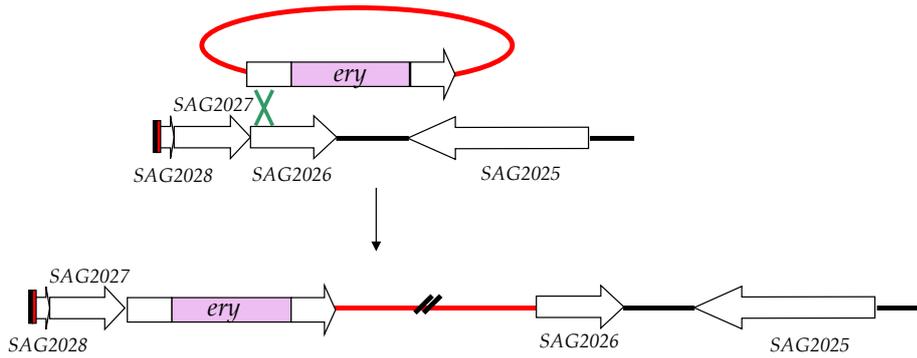
possible à 37°C chez *E. coli* EC101 car cette souche possède le gène *repA* non muté provenant du plasmide pWVO1, permettant une complémentation en *trans*. Le principe de l'utilisation du plasmide pG+host9 pour construire des souches modifiées est exposé figure 23. Après avoir obtenu le plasmide recombinant contenant deux régions homologues du gène à remplacer bordant un gène de résistance, celui-ci a été électroporé chez *Streptococcus agalactiae*. Les transformants ont ensuite été incubés en présence des antibiotiques appropriés à 30°C (température permissive permettant la répllication et le maintien du plasmide sous forme libre), puis à 37°C (température restrictive à laquelle le plasmide ne peut pas se répliquer). Cette étape permet de sélectionner l'intégration par recombinaison homologue entre un des inserts (droit ou gauche) et la région chromosomique correspondante. Le plasmide peut s'intégrer en copie unique ou en tandem (Figure 23A). Finalement, afin d'obtenir des bactéries ayant perdu les séquences plasmidiques par recombinaison homologue avec remplacement du gène cible, trois passages successifs à 30°C puis à 37°C ont été réalisés. A 30°C, le plasmide intégré se réplique par cercle roulant provoquant la formation d'ADN simple brin fortement recombino-gène. Ceci va favoriser la recombinaison entre séquences répétées entraînant l'excision du plasmide à haute fréquence. Dans un premier cas, la recombinaison se produira dans la même région que la première et aboutira à un retour à la souche d'origine. Dans un second cas, la recombinaison aura lieu dans l'autre région clonée et aboutira au remplacement du gène cible par un gène de résistance. Les passages à 37°C en présence de l'antibiotique approprié éliminent les cellules qui possèdent un plasmide porteur du gène de résistance sous forme libre (Figure 23B).

Pour toutes les étapes de construction, un sous-clonage dans le plasmide pSL1180 a été réalisé chez *E. coli* (Brosius 1989). Ce plasmide est en effet plus facilement manipulable que le plasmide pG+host9. Il possède contrairement à ce dernier un nombre élevé de copies et une origine de répllication non thermosensible.

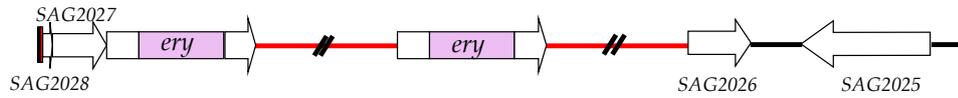
A. I.



II.



III.



B.



I.

II.

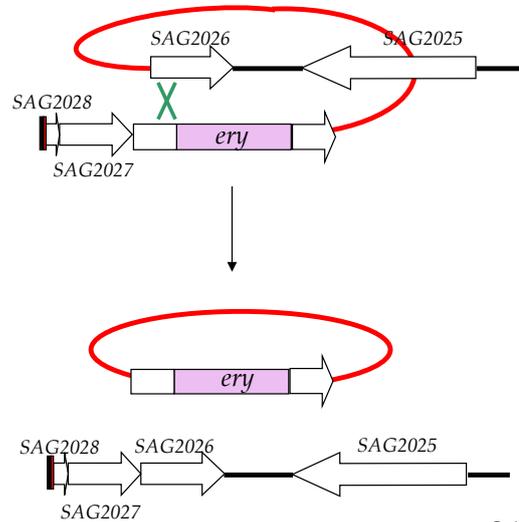
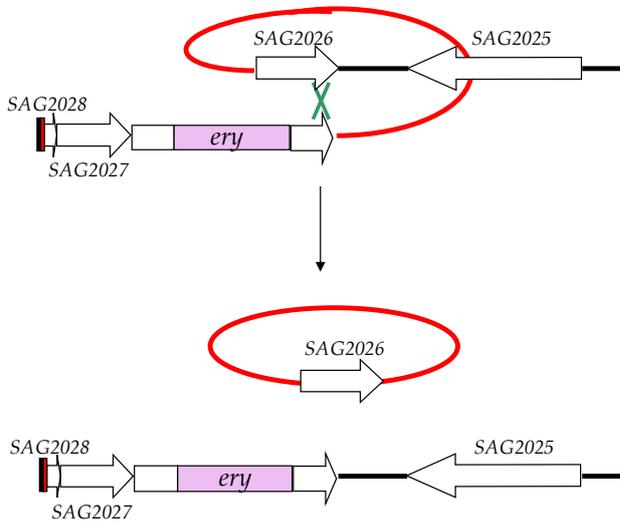


Figure 23 : Principe de construction des souches mutantes par le plasmide pG+host9 et ses dérivés

A. Intégration par recombinaison homologue du plasmide pG+host9-SAG2026 ::ery dans le chromosome de *S. agalactiae*. L'intégration du plasmide en simple copie, soit dans la région droite (I) soit dans la région gauche (II), aboutit à deux conformations chromosomiques distinctes. Le plasmide peut également s'intégrer en multiple copie, ou tandem (III).

B. Structures observées après recombinaison et excision du plasmide pG+host9-SAG2026 ::ery. Le second événement de recombinaison dans le second insert provoque le remplacement du gène cible par le gène de résistance à l'antibiotique (I). Cet événement peut également avoir lieu dans l'insert du premier événement provoquant un retour à la souche sauvage (II).

Le principe est similaire pour tous les plasmides dérivés de pG+host9.

Ery, erythromycine.

Les plasmides pIB184 et pIB185 ont été utilisés pour surproduire l'intégrase et l'excisionase (Biswas et al. 2008). Ils portent le promoteur constitutif P23 (pIB184) ou Pveg (pIB185) et permettent la surexpression de gènes chez les streptocoques.

3. Extraction, dosage, restriction enzymatique, électrophorèse et ligation de l'ADN

3.1 Extraction d'ADN

Les extractions d'ADN plasmidique d'*E. coli* ont été réalisées par lyse alcaline, soit selon le protocole décrit par Sambrook *et al.* (Sambrook and Russell 2001), soit à l'aide du kit Gen Elute™ Plasmid Miniprep (SIGMA) lorsque les conditions nécessitaient une pureté plus importante. L'ADN génomique total de *S. agalactiae* a été extrait par lyse enzymatique selon la méthode de Colmin *et al.* (Colmin et al. 1991).

Les solutions d'ADN chromosomique et plasmidique ainsi que les produits de PCR ont été dosés par mesure de la DO à 260 nm à l'aide de l'appareil Nanodrop (Labtech) selon les recommandations du fournisseur.

3.2 Restriction enzymatique de l'ADN et électrophorèse

L'ADN génomique ou plasmidique a été digéré pendant au moins 1 h 30 par des enzymes de restriction à raison de 5 UE d'enzyme/μg d'ADN. Les enzymes ont

été utilisées dans les conditions de température et de tampon recommandées par le fournisseur (New England Biolabs).

Les fragments ont été séparés par électrophorèse en gel d'agarose dans du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 1X (Tris/Acétate 40 mM - EDTA 1 mM - pH 8) ou Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X (Tris/Borate 40 mM - EDTA 1 mM - pH 8) (Sambrook and Russell 2001). La concentration en agarose du gel, le voltage et la durée de migration ont été ajustés en fonction de la taille des fragments à discriminer. Après immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET, 0,5 µg/mL) durant 20 minutes, les profils de restriction ont été visualisés grâce au Gel Doc 1000 (Biorad) sous UV.

3.3 Ligation des fragments d'ADN

Le kit High Pure PCR Product Purification (Roche Applied Science) a été utilisé pour extraire du gel et purifier les fragments d'ADN séparés par électrophorèse ainsi que les fragments amplifiés par PCR. Les différents vecteurs, digérés par la ou les enzymes de restrictions appropriées, ont été déphosphorylés grâce à l'action de la phosphatase alcaline d'intestin de veau (New England Biolabs) permettant ainsi d'éviter la religation du plasmide sur lui-même. Enfin, la ligation a été réalisée entre le plasmide digéré et les fragments à insérer à l'aide de la DNA ligase du phage T4 (1 UE d'enzyme/µg d'ADN) selon les conditions préconisées par le fournisseur (New England Biolabs) à 16°C pendant une nuit. Après un contrôle de la ligation par électrophorèse, les cellules appropriées ont été électroporées par le mélange de ligation.

4. Amplification par PCR, PCR haute fidélité, PCR nichée et PCR long-range

Les PCR classiques ont été réalisées avec l'ADN polymérase dérivant de celle de *Thermus aquaticus* YT-1 et clonée chez *E. coli* et (Biolabs). Cette enzyme ne possède aucune activité exonucléasique 3'-5' ce qui permet d'augmenter le rendement de la réaction. Elle présente de ce fait un taux d'erreur de 3.10^{-4} substitutions.position⁻¹.réplication⁻¹. Ceci permet d'amplifier des fragments allant jusqu'à une taille d'environ 2 kb. En effet, les erreurs provoquées par l'enzyme induisent des arrêts fréquents de la synthèse ce qui empêche l'amplification efficace

de plus grands fragments. Le mélange réactionnel (volume final de 25 μL) comprenait l'ADN matrice (100 ng), les dNTP (250 μM), les oligonucléotides servant d'amorces (0,8 μM pour chacun), le tampon 1X et 0,25 unité d'ADN polymérase.

Les PCR nichées ont été réalisées en deux étapes. La première correspond à une PCR classique, excepté pour le nombre de cycles qui est réduit à 25. Ensuite, une seconde PCR est réalisée utilisant comme matrice le produit de la première ; les amorces utilisées sont internes au premier fragment. Cette technique permet d'amplifier des fragments d'ADN à partir de quantités d'ADN beaucoup plus petites qu'une PCR classique tout en évitant la présence d'amplicons indésirables liée au nombre de cycle trop important après une PCR classique. Tous les fragments obtenus par PCR nichée ont été vérifiés par séquençage.

Les conditions de PCR utilisées au cours de ce travail ont été les suivantes. Après une dénaturation initiale de 4 min de l'ADN à 95°C, 30 cycles ont été réalisés. Chacun de ces cycles comprenait une dénaturation de l'ADN pendant 30 s à 95°C, une fixation de amorces sur l'ADN matrice pendant 30 s à une température dépendant du couple d'oligonucléotides (5°C en dessous du T_m ou température de fusion des amorces). Chaque cycle se terminait par une extension à 72°C dont la durée dépendait de la taille du fragment à amplifier et de la processivité de la polymérase (1 kb/min). A la suite des 30 cycles, une extension finale de 7 min à 72°C a été effectuée, permettant l'élongation des brins partiellement synthétisés.

Enfin, l'ADN polymérase Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) enzyme de *Pyrococcus* sur laquelle a été ajouté un domaine de processivité amélioré, a été utilisée pour les amplifications à haute fidélité. Elle possède une activité exonucléasique de 3' vers 5' ce qui diminue son taux d'erreur ($4,4 \cdot 10^{-7}$). Ceci augmente la fidélité de la répllication et permet l'amplification de fragments plus longs. Le mélange réactionnel (volume final de 50 μL) comprenait l'ADN matrice (200 ng), les dNTP (200 μM pour chaque), les amorces (0,5 μM pour chacune), Phusion HF Buffer 1X (tampon haute fidélité) et 1 U d'enzyme.

Les conditions de PCR utilisées avec la Phusion DNA Polymerase étaient les suivantes : après une dénaturation initiale de 30 s de l'ADN à 98°C, 30 cycles ont été réalisés. Chacun de ces cycles comprenait une dénaturation de l'ADN de 10 s à 98°C, une fixation de amorces sur l'ADN matrice pendant 30 s à une température dépendant du couple d'oligonucléotides (3°C au dessus du T_m ou température de fusion des amorces). Chaque cycle se terminait par une extension à 72°C dont la

durée dépendait de la taille du fragment à amplifier et de la processivité de la polymérase (30 s/kb). A la suite des 30 cycles, une extension finale de 10 min à 72°C a été effectuée, permettant l'élongation des brins partiellement synthétisés.

Les séquences des différentes amorces de synthèse, choisies pour avoir des températures de fusion proches, sont présentées dans le tableau 4. Toutes les amorces ont été dessinées grâce au logiciel Vector NTI version 10. Les températures de fusion, l'auto-complémentarité et la formation des dimères d'amorces lors des PCR ont été estimées via le même logiciel.

Tableau 4 : Caractéristiques des oligonucléotides utilisés au cours de ce travail

Amorce ^b	Séquence ^a (5'-3')	Utilisation
ICE2603Lys1 (A)	CAACTCTCTTAGTCATCGGT	Détection du site <i>attI</i> d'ICE_2603_ <i>tRNA</i> ^{Lys} (PCR nichée)
ICE2603Lys2 (B)	GAGTAATACCTGAACCAACAA	Détection du site <i>attI</i> d'ICE_2603_ <i>tRNA</i> ^{Lys} (PCR nichée)
ICE2603Lys3 (C)	AGGAATATGAAACGGTCAG	Détection du site <i>attI</i> pour les 5 ICE putatifs et pour le tandem CIME-ICE (PCR nichée)
ICE2603Lys4 (D)	GTCATATCATTTAGAATTGGT	Détection du site <i>attI</i> pour 4 ICE putatifs (PCR nichée)
ICE2603Lys5 (E)	GAAAGCCAAATCCTAAGTG	Détection du site <i>attI</i> d'ICE_2603_ <i>tRNA</i> ^{Lys} (PCR nichée)
ICE2603Lys6 (F)	CACTAGTTCTIGTCCTCATCT	Détection du site <i>attI</i> d'ICE_2603_ <i>tRNA</i> ^{Lys} (PCR nichée)
ICE2603Lys7 (G)	CTTCTAGAACAAATCTGCTGA	Détection du site <i>attI</i> d'ICE_2603_ <i>tRNA</i> ^{Lys} (PCR nichée)
ICE2603Lys8 (H)	CAGACAGCAACCTATCCA	Détection du site <i>attI</i> pour les 5 ICE putatifs (PCR nichée)
attRtRNA ^{Lys} 515 (I)	GAACAAATCTGCTGAAAC	Détection du site <i>attI</i> des ICE intégrés à l'extrémité 3' de l'ARN ^{tLys} des souches 515, COH1 et 18RS21 ainsi que pour le tandem CIME-ICE (PCR nichée)
attL LMG1 (H')	CAATTGATGACACTACTTAAAC	Détection du site <i>attI</i> d'ICE_2603FSL S3-026_ <i>tRNA</i> ^{Lys} (PCR nichée)
attL LMG2 (D')	CCCTCTTAAACACCTAATCAC	Détection du site <i>attI</i> d'ICE_2603FSL S3-026_ <i>tRNA</i> ^{Lys} (PCR nichée)
SAG2026-1- <i>Hind</i> III (J)	AAAAAAAGCTTCATTCATTTAATAACC ATC	Amplification d'un fragment du gène SAG2026 de <i>S. agalactiae</i> , détection du site d'intégration d'ICE_515_ <i>tRNA</i> ^{Lys} et test des transconjugants putatifs
SAG2026-2- <i>Avr</i> II	AAAAACCTAGGTCACTCGTTGTTCTACA GTA	Amplification d'un fragment du gène SAG2026 de <i>S. agalactiae</i>
SAG2026-3- <i>Avr</i> II (T)	AAAAACCTAGGAAATAGTGAATATCCCC A	Amplification d'un fragment du gène SAG2026 de <i>S. agalactiae</i>

SAG2026-4- <i>EcoRI</i>	AAAAAGA <u>ATTCT</u> GTTAGGATTGGAGTTT AG	Amplification d'un fragment du gène SAG2026 de <i>S. agalactiae</i> et test des transconjugants putatifs
intICESa03 Fwd (K)	AAGCGTGAAGCTATGAATGA	Détection du site d'intégration d'ICE_515_ <i>tRNA^{Lys}</i>
SAG1986 Fwd (L)	TCTCAAATCAGACCTAGTGA	Détection du site d'intégration d'ICE_515_ <i>tRNA^{Lys}</i>
SAG1986 Rev (M)	CCTTATCAGCAATAGCCA	Détection du site d'intégration d'ICE_515_ <i>tRNA^{Lys}</i>
SAK1967Rev (N)	GGAAAGCTCGACAAGGATATCT	Détection du site <i>attB</i> chez <i>S. agalactiae</i> (PCR nichée)
attBRev (O)	CCAATACAGCTTCCTAGCC	Détection du site <i>attB</i> chez <i>S. agalactiae</i> (PCR nichée)
Gbs1987Fwd (P)	CAAGGAGAATACCAATCAGC	Détection du site <i>attB</i> chez <i>S. agalactiae</i> (PCR nichée)
tRNA ^{Lys} (Q)	TCTTAATCTATGGGTCACAG	Détection du site <i>attB</i> chez <i>S. agalactiae</i> (PCR nichée)
attICIMENem (R)	ATTACAATTGTTCTTGGGCT	Détection du site <i>attI</i> des tandems CIME-ICE (PCR nichée)
attI2CIMENem (S)	TCTTCATTCCATCTCCACT	Détection du site <i>attI</i> des tandems CIME-ICE (PCR nichée)
gbst014-064 Fwd	CAGTTGGTAGAGCAATTGACTT	Détection du site d'intégration d'ICE_515_ <i>tRNA^{Lys}</i>
tRNAMet Rev	GTATGAACCGGACGCTCT	Détection du site d'intégration d'ICE_515_ <i>tRNA^{Lys}</i>
tRNA16S Rev	TCAGCGTTCTACTTGCATG	Détection du site d'intégration d'ICE_515_ <i>tRNA^{Lys}</i>
Sod-d1	CCITAYICITAYGAYGCIYTIGARCC	Amplification du gène <i>sodA</i>
Sod-d2	ARRTARTAIGCRTGYTCCCAIACRTC	Amplification du gène <i>sodA</i>
Ery Fwd	TCAGGATCCTCTAGAGTCGC	Amplification du gène <i>ery</i>
Ery Rev Ter	GCGACTCTAGAAAAACAAGATCCTTTCT <i>GGATCTTGTTTTGCTAGGGACCTCTTTAG</i> CTC	Amplification du gène <i>ery</i> , le terminateur est en italique

^a Les sites de restriction introduits dans les oligonucléotides sont soulignés

^b Les lettres indiquent la position des oligonucléotides dans les figures 27, 33, 34 et 35.

5. Électroporation chez *E. coli* et *S. agalactiae*

Les cellules d'*E. coli* EC101, DH5 α et C41(DE3) électrocompétentes ont été préparées selon le protocole proposé par Dower *et al.* (Dower *et al.* 1988). L'électroporation a été effectuée sur des échantillons de 50 μ L de cellules compétentes avec 250 ng de mélange de ligation, à l'aide de l'appareil Electroporator 2510 (Eppendorf) sous un voltage de 2,5 kV, une résistance de 600 Ω et une capacité de 10 μ F. Après transformation, les cellules ont été reprises dans 1 mL de SOC et incubées 1 h à 37°C afin de permettre la régénération cellulaire. Les cellules ont été ensuite cultivées sur milieu LB gélosé additionné de l'antibiotique adapté afin de sélectionner celles ayant acquis le plasmide.

Les cellules électrocompétentes de *S. agalactiae* ont été préparées selon la méthode proposée par Framson *et al.* (Framson *et al.* 1997). Des précultures de *S. agalactiae* ont été incubées une nuit à 37°C en milieu BHI. A partir de la préculture, 100 mL de milieu Todd-Hewitt ont étéensemencés au centième. Lorsque la culture a atteint la phase exponentielle (DO_{600nm} comprise entre 0,4 et 0,5), 100 mL de solution I (glycine 5%, saccharose 1M) ont été rajoutés et les cellules ont été incubées 1 h à 37°C. Les cellules ont été centrifugées puis reprises par 100 mL de tampon d'électroporation (NaH₂PO₄ 7 mM, MgCl₂ 1 mM, saccharose 500 mM pH 7,4). Après un second lavage dans 50 mL de tampon d'électroporation additionné d'une solution de glycérol 15% (mélange volume à volume), le culot de cellules compétentes a été repris dans 500 μ L de tampon d'électroporation additionné de glycérol 15% (mélange volume à volume). Des aliquotes de 80 μ L de cellules compétentes ont été électroporées en présence d'ADN plasmidique (250 ng d'ADN) à l'aide de l'appareil Electroporator 2510 (Eppendorf) sous un voltage de 2,4 kV, une résistance de 600 Ω et une capacité de 10 μ F. Les cellules électroporées ont été reprises dans 1 mL de milieu Todd-Hewitt et incubées durant 3 h à température adaptée afin de permettre leur régénération. Elles ont ensuite été étalées sur gélose trypticase soja additionnée de sang en présence de l'antibiotique adapté puis incubées en anaérobiose à température adéquate pendant 18 h environ. Les transformants ont ensuite été repris dans du BHI contenant les antibiotiques appropriés puis incubés une nuit à la température requise.

6. Séquençage

Tous les séquençages ont été effectués par un prestataire externe (société Beckman Coulter Genomics). Les plasmides préalablement purifiés ont été envoyés à une concentration comprise entre 75 et 125 ng/ μ L, les produits de PCR ne nécessitaient pas de purification (effectuée par Beckman Coulter Genomics) et la quantité minimale d'ADN était de 200 ng. Les amorces de synthèse étaient concentrées à 0,2 pmol/ μ L par réaction. Enfin, les séquences ont été analysées par les logiciels Sequencher 4.1.4 et BioEdit (version 7.0.5.2).

7. Marquage des éléments

Les différents éléments ont été marqués à l'extrémité gauche de l'élément par un gène de résistance à l'érythromycine ou au chloramphénicol. Le gène cible choisi est le gène SAG_2026 présent chez tous les ICE ou éléments apparentés étudiés au cours de cette étude. Ce gène code une sous-unité ATPasique d'un transporteur ABC. Il appartient à un opéron homologue à *yydFGHIJ* de *Bacillus subtilis* codant pour une bactériocine putative (Butcher et al. 2007).

Le plasmide utilisé pour faire ces clonages est pG+host9spc un dérivé de pG+host9 porteur d'une cassette de résistance à la spectinomycine (Bellanger, comm. pers.). La digestion du plasmide pSET4s par *SpeI* a permis d'isoler le gène de résistance à la spectinomycine. En parallèle, le plasmide pG+host9 a été digéré par *XbaI*. Le gène de résistance et la cassette ont ensuite été ligués (Bellanger, comm. pers.).

Dans un premier temps, les extrémités 5' et 3' du gène SAG_2026 ont été amplifiées par PCR à haute fidélité. L'extrémité 3' a été amplifiée en utilisant les oligonucléotides SAG2026-1-*HindIII* et SAG2026-2-*AvrII* contenant respectivement les sites de restriction *HindIII* et *AvrII*. L'extrémité 5' a quant à elle été amplifiée en utilisant les oligonucléotides SAG2026-3-*AvrII* et SAG2026-4-*EcoRI* contenant respectivement les sites de restriction *AvrII* et *EcoRI*. Ces deux produits de PCR ont été digérés par les enzymes appropriées et ligués au plasmide de sous-clonage pSL1180 préalablement digéré par *HindIII* et *EcoRI*. Le plasmide obtenu, pSL1180-SAG2026, a ensuite été digéré par *AvrII* et ligué avec le produit de PCR *ery*, contenant le gène *ery* et digéré par *XbaI*. Ce plasmide, pSL1180-SAG2026::*ery* contient les deux extrémités du gène SAG2026 séparées par un gène de résistance à l'érythromycine. Ce fragment a été extrait du plasmide pSL1180-SAG2026::*ery* et cloné dans le

plasmide pG+host9, auparavant digéré par ces mêmes enzymes. Cette construction, pG+host9-SAG2026 ::ery, a finalement été utilisée pour transformer *S. agalactiae* par électroporation (Framson et al. 1997). Les étapes de remplacement du gène cible par le gène de résistance ont été décrites précédemment lors de la description du plasmide pG+host9 et de ses dérivés.

Le principe du marquage des éléments par le gène de résistance au chloramphénicol est identique. La cassette de résistance a été isolée à partir du plasmide pSTE5s digéré par l'enzyme *SpeI*. Le clonage a été réalisé avec le plasmide pG+host9.

8. Sélection des cellules réceptrices résistantes à la rifampicine et à la streptomycine

Lors d'une première étape, des mutants résistants spontanés à la rifampicine ont été sélectionnés en étalant, à forte concentration, les souches parentales sur un milieu approprié contenant cet antibiotique ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Lors d'une seconde étape, des mutants résistants spontanés à la rifampicine et la streptomycine ont été sélectionnés en étalant les mutants obtenus lors de la première étape sur un milieu adapté contenant de la streptomycine ($250 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

9. Conjugaison

Les expériences de conjugaison ont été réalisées selon le protocole de Bellanger *et al.* (Bellanger et al. 2009). Brièvement, des précultures des cellules donatrices et réceptrices ont été incubées une nuit, à 37°C , dans du milieu BHI en présence des antibiotiques adéquats. Des cultures de 15 mL en milieu BHI ont ensuite été inoculées au centième à partir des précultures puis incubées à température adéquate jusqu'à atteindre la DO souhaitée. Les cellules ont alors été centrifugées 15 minutes à 37°C et 4500 rpm et reprises dans un milieu préchauffé. Les cellules donatrices et réceptrices (10 mL de chaque culture) ont ensuite été mélangées dans un même tube afin de permettre la conjugaison puis centrifugées 15 minutes à 37°C et 4500 rpm. Les culots cellulaires ont alors été repris dans 1 mL de milieu préchauffé sans antibiotique avec ou sans DNase ($50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Christie et al. 1987). Enfin, 150 μL ont été étalés sur un filtre de nitrocellulose ($0,45 \mu\text{m}$, Sartorius) sur une boîte épaisse de milieu adapté. Les filtres ont été incubés à 37°C en anaérobiose entre 12 et 14 h puis les cellules ont été reprises dans 10 mL de milieu BHI en mélangeant

durant 30 secondes. Des dilutions variées ont ensuite été étalées sur boîtes supplémentées avec les antibiotiques appropriés et les boîtes ont été incubées 24 h afin de pouvoir dénombrer les UFC des cellules donatrices, des cellules réceptrices et des transconjugants.

Les fréquences de conjugaison ont été calculées en divisant le nombre de transconjugants par le nombre de cellules donatrices. Les fréquences de conjugaison ont été calculées à partir de la moyenne d'un minimum de trois répétitions indépendantes.

10. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)

Les souches d'intérêts ont été mises en culture à partir d'une pré-culture dans le milieu approprié. Après avoir atteint une DO_{600nm} d'environ 0,6, 20 mL de cellules ont été centrifugées (5000 rpm, 4°C, 10 min), lavées dans une solution de TE-saccharose froid (25mM TrisHCL, 25mM EDTA (pH 8,0), 10%(p/v) saccharose) puis reprises dans la même solution dans un volume permettant d'atteindre une DO_{600nm} de 2. Un volume équivalent de cellule et de LMPA (Seakem agarose) ont été mélangés dans un puits, sur glace, afin de former une lamelle. Une fois solidifiées, les lamelles ont été incubées 6h à 37°C dans une solution de lyse (solution de lysozyme à 2 mg/mL de TE-sucrose), puis la nuit à 50°C dans une solution de déprotéinisation (0,5M EDTA (pH 8,0), 1% (p/v) SDS, 2,5mg/mL de protéase de *Streptomyces griseus* (Sigma)). Les lamelles ont ensuite été lavées 4 fois dans une solution de TE 1X (1 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM TrisHCl) 1 h à 50°C, puis stockées à 4°C dans ce tampon.

Les lamelles ont alors été incubées 3 h à 25°C avec 60 unités d'enzyme de restriction SmaI dans 300µL de volume réactionnel, suivant les recommandations du fournisseur (New England Biolabs). La séparation des fragments d'ADN a ensuite eu lieu par électrophorèse en champ pulsé dans un gel PFGE 1% (Seakem agarose). Les réglages de l'électrophorèse étaient 6 V/cm à 14°C avec un temps de pulse initial d'une seconde et un temps de pulse final de 20 s selon un angle de 120°C pendant 20 h. Enfin, les profils de restriction ont été visualisés après immersion du gel dans une solution de bromure d'éthidium (BET, 0,5 µg/mL) durant 20 minutes, grâce au Gel Doc 1000 (Biorad) sous UV.

11. Analyse/comparaison de séquences

Au cours de ce travail, les génomes de 246 souches ont été analysés. Les noms, numéros d'accèsion, profils MLST (quand ils sont disponibles) ainsi que les types d'élément putatif portés par les souches sont indiqués dans le tableau en annexe 2.

Les séquences nucléotidiques et protéiques disponibles ont été collectées à dans les bases de données GenBank et GenPept. Une analyse systématique par comparaison de séquences nucléotidiques a été réalisée sur ces 246 génomes. Pour les 138 génomes dont les séquences étaient disponibles à la fois sous formes nucléotidique et protéique, les analyses ont également été réalisées par comparaison de séquences protéiques. Les résultats se sont montrés cohérents avec ceux obtenus lors des comparaisons nucléotidiques. Les comparaisons nucléotidiques ont été effectuées avec le logiciel BLASTN tandis que les comparaisons des séquences protéiques ont été réalisées à l'aide du logiciel BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Dix gènes caractéristiques des ICE ou IME intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} de *S. agalactiae*, ainsi que les protéines correspondantes, ont été choisis pour ces analyses de séquences : 3 gènes codant des intégrases putatives *SAL_2029*, *SAG1986* et *SAJ_1914*, 3 gènes codant des relaxases putatives *SAL_2052*, *SAG1988* et *SAJ_1916*, un gène codant une protéine de couplage de la famille FtsK, *SAL_2053*, un gène codant une protéine de conjugaison putative *SAL_2040*, ainsi que deux gènes codant les deux sous-unités d'un transporteur ABC *SAL_2079-SAL_2080*. Un gène était considéré comme présent lorsque le pourcentage d'identité entre la requête et le gène détecté était supérieur à 90%. Lors des comparaisons protéiques le pourcentage d'identité devait être supérieur à 80%.

Les sites de recombinaison des différents éléments ont également été recherchés (*attR* ICE, *attR* A909, *attR''* A909, *attR* Nem, *attR'* Nem, *attR* IME2603V/R, *attL* ICE, *attL* FSL S3-026, *attL'* A909 et *attL''* A909). La séquence a été considérée comme présente lorsque la séquence détectée contenait la fin du gène d'ARN^t lysine ou une répétition directe de celle-ci et qu'elle présentait au moins 90% d'identité (sur une longueur minimale de 60 pb) avec la requête. Les alignements présentaient une valeur E toujours inférieure ou égale à 10⁻¹¹ pour les sites *attL* et à 10⁻²⁶ pour les sites *attR*.

Enfin, les éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} de 12 souches de *S. agalactiae* ont été caractérisés en détail par comparaison des séquences

protéiques (BLASTP) codées par tous les gènes se trouvant entre les sites *attL* et *attR* selon les procédures identiques à celles décrites précédemment.

RESULTATS

1. Recherche et prévalence des éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} CTT chez *Streptococcus agalactiae*

Préalablement à ce travail, les génomes séquencés de 8 souches invasives humaines de *S. agalactiae* avaient été analysées (Brochet et al. 2008a). Ils contiennent tous des ICE, IME ou CIME en dérivant, intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} (anticodon CTT) (Figure 24). Certains de ces éléments sont composites et résultent d'accrétions en tandem. Ainsi, celui de la souche 2603V/R est composé d'un ICE et d'un IME séparé par un site *attI*. Par ailleurs, l'ICE de la souche 18RS21 résulterait d'un événement d'accrétion interne (intégration site-spécifique d'un IME dans l'origine de transfert d'un ICE) (données non publiées).

Des éléments apparentés aux ICE de *S. agalactiae* intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} ont été décrits chez d'autres espèces de streptocoques. En effet, des ICE très proches ou de la même famille sont retrouvés chez de nombreuses espèces de streptocoques : *S. uberis*, *S. dysgalactiae* (Haenni et al. 2010; Chuzeville et al. 2012), *S. bovis*, *S. equisimilis* (Chuzeville et al. 2012), *S. mutans*, *S. thermophilus* (Burrus et al. 2002a; Brochet et al. 2008a), *S. pyogenes* (Brochet et al. 2008a; Sitkiewicz et al. 2011), *S. parasanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. infantis*, *S. australis*, *S. gallolyticus*, *S. downei* (Carraro et al. 2011). Les éléments apparentés aux ICE intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} semblent donc répandus chez les streptocoques.

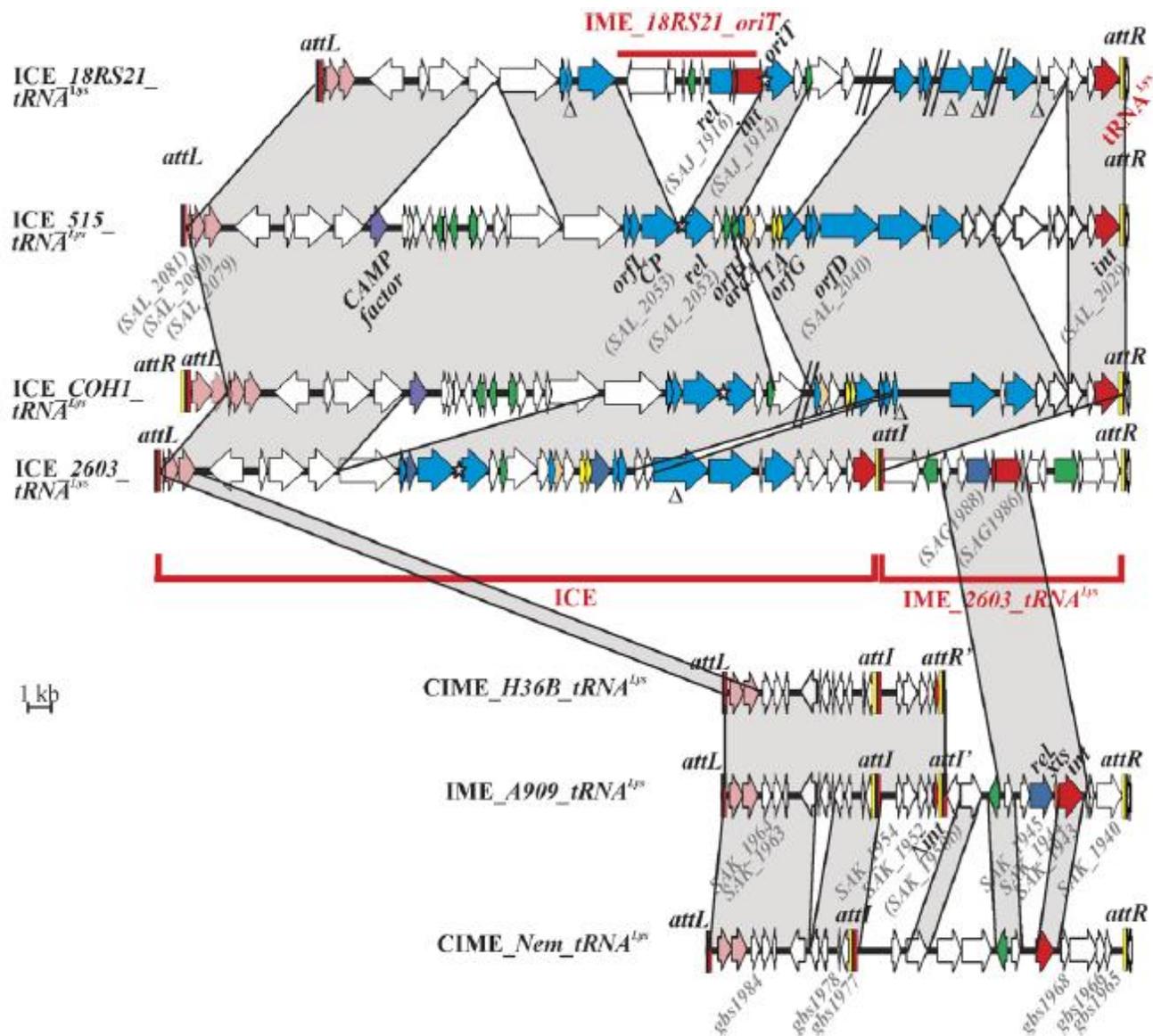


Figure 24 : Organisation et comparaison des éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} de *S. agalactiae* (Brochet et al. 2008a)

Les traits rouges indiquent la position des éléments composant les îlots composites ; leur nature ou leur nom sont indiqués au dessus. Les flèches représentent les ORF. Les noms des différents gènes utilisés lors des analyses de séquences sont indiqués en gris. Le nom des gènes tronqués est précédé d'un delta. Les gènes du module de conjugaison apparaissent en bleu, ceux du module de recombinaison en rouge et ceux probablement impliqués dans la régulation de l'ICE en vert. Les gènes codant un système toxine-antitoxine putatif apparaissent en jaune, celui codant une protéine d'antirestriction putative *ArdA* en saumon, le gène codant le facteur CAMP en violet et les gènes en rose appartiennent à l'opéron homologue à l'opéron *yjdFGHIJ* de *B. subtilis*. Les termes *int*, *xis*, *rel*, *CP*, *T* et *A* représentent respectivement les gènes codant l'intégrase, l'excisionase, la relaxase, la protéine de couplage, la toxine et l'antitoxine. L'*oriT* putative des éléments est représentée par une étoile. Les sites de recombinaison sont schématisés par des rectangles, en noir séquences de recombinaison, en jaune bras du site *attR* et apparenté au niveau des sites *attL*, en rouge bras du site *attL* et apparenté au niveau des sites *attL*. Les surfaces grisées indiquent les séquences présentant une identité protéique supérieure à 80%. Les doubles barres obliques indiquent les trous dans les séquences du génome dus à des contigs manquants.

Le génome d'autres souches de *S. agalactiae*, provenant d'origines diverses (Homme, bovin, poisson, grenouille, chien, phoque gris et dauphin) a été depuis totalement ou partiellement séquencé et leur analyse devrait permettre de déterminer la prévalence et la diversité de cette famille d'éléments au sein de cette espèce.

1.1 Analyses des souches totalement ou partiellement séquencées

Douze nouvelles souches de *S. agalactiae*, dont le génome a été séquencé, ont été analysées par comparaison de séquences au cours de ce travail. Trois d'entre elles (GD20 1008-001, SA20-06 et 2.22), isolées à partir de poisson, présentent un génome totalement séquencé et assemblé. Pour les 9 autres souches analysées, les séquences sont sous forme de contigs (entre 8 et 131 suivant les souches), mais ils sont annotés. L'une d'entre elles est la souche FSL S3-026, isolée à partir d'un bovin et utilisée par Richard et al (Richards et al. 2011) lors d'une analyse comparative entre les souches d'origine humaine et bovine. Enfin, 6 autres souches ont été isolées à partir de poisson et 2 autres chez l'Homme. L'analyse a révélé que toutes portent un élément intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} dénommé suivant la

nomenclature de Brochet *et al.* (Brochet et al. 2008a) : type d'élément_souche_site d'intégration (Tableau 5).

Tableau 5 : Récapitulatif des souches de *S. agalactiae* analysées lors de ce travail, de leur origine et du type d'élément putatif détecté.

Souche	Origine	Elément putatif	Taille de l'élément	Composition en gènes						Composition en sites <i>att</i>		
				ICE				IME_2603V/R_ARN ^{tLys}		<i>attL</i>	<i>attR</i>	<i>attI</i>
				SAL_2053 (FtsK)	SAL_2052 (relaxase)	SAL_2040 (OrfD)	SAL_2029 (intégrase)	SAG1988 (2 ^{ème} relaxase 2603V/R)	SAG1986 (2 ^{ème} intégrase 2603V/R)			
SS1014	P	CIME	ND	-	-	-	-	-	-	<i>attL</i> ICE	<i>attR</i> ' A909	<i>attI</i> A909
SA20-06	P	CIME	3,7 kb	-	-	-	-	-	-	<i>attL</i> ICE	<i>attR</i> ' A909	-
STIR CD-17	P	CIME	3,7 kb	-	-	-	-	-	-	<i>attL</i> ICE	<i>attR</i> ' A909	-
SS1219	P	CIME	3,7 kb	-	-	-	-	-	-	<i>attL</i> ICE	<i>attR</i> ' A909	-
LADL-90-503	P	CIME	3,7 kb	-	-	-	-	-	-	<i>attL</i> ICE	<i>attR</i> ' A909	-
2.22	P	CIME	1,6 kb	-	-	-	-	-	-	<i>attL</i> ICE	<i>attR</i> ' Nem316	-
GB00112	H	ΔCIME	4,3 kb	-	-	-	-	-	-	Pas de site <i>attL</i>	<i>attR</i> Nem316	-
ATCC 13813	H	Elément dérivé d'un ICE	ND	-	-	-	+	-	-	ND	<i>attR</i> ICE	-
GD20 1008-001	P	IME	19,3 kb	-	-	-	-	+	+	<i>attL</i> ICE	<i>attR</i> A909	<i>attI</i> et <i>attI</i> ' A909

ZQ 0910	P	IME	18,4 kb	-	-	-	-	+	+	<i>attL</i> ICE	<i>attR</i> A909	<i>attI</i> et <i>attI'</i> A909
CF01173	P	IME	ND	-	-	-	-	+	+	<i>attL</i> ICE	<i>attR</i> A909	<i>attI</i> et <i>attI'</i> A909
FSL S3-026	B	ICE	42,8 kb	+	+	+	+	-	-	<i>attL</i> FSL S3-026	<i>attR</i> ICE	-

Les sites *att* présentent une identité d'au moins 90% avec les sites *att* indiqués. Le site *attR'* d'IME A909 correspond à la moitié *attR* du *attI* de cet élément. Le site *attL* est commun à tous les éléments (ICE-CIME et IME) excepté celui d'ICE_FSL S3-026_ *tRNA^{Lys}* (seulement 45% d'identité avec les autres).

ND, non déterminé ; H, humain, B, bovin ; P, poisson. Les signes + dans les cases grisées signifient que l'élément considéré code la protéine avec une identité entre la requête et le gène cible de plus de 80%

1.1.1 Souches portant un CIME putatif ou un CIME tronqué

Les CIME sont des îlots génomiques dérivant d'ICE ou d'IME par perte des modules de recombinaison, régulation et conjugaison (Pavlovic et al. 2004). Ils doivent être flanqués de sites *att* et être apparentés à un ICE ou un IME qui pourra s'intégrer en tandem avec le CIME et le mobiliser en *cis*.

Les souches SS1014, SA20-06, SS1219, LADL-90-503, STIR CD-17, 2.22 et GB00112 portent toutes un élément intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys}. Ces 7 éléments ne portent aucun gène codant une protéine impliquée dans l'intégration/excision ou le transfert de l'élément. En revanche, ils possèdent tous des sites *attR* et *attL* les bordant, excepté GB00112 qui semble dépourvu de site *attL* (Figure 25). Les six premiers pourraient donc être des éléments mobilisables en *cis* ou CIME tandis que le dernier pourrait dériver d'un CIME par délétion du site *attL*.

Parmi eux, seul le CIME porté par la souche SS1014 présente un site *attI* interne apparenté au site *attI* d'IME_A909_tRNA^{Lys}. Son site *attL* est apparenté au site *attL* des autres éléments. Le site *attR* du CIME de la souche SS1014 est quant à lui identique à la moitié *attR* du site *attI*' d'IME_A909_tRNA^{Lys} (Figure 25). Cet élément composite, très proche de CIME_H36B_tRNA^{Lys}, a été dénommé CIME_SS114_tRNA^{Lys}. La séquence de l'élément recouvre 10 contigs non chevauchants, ce qui rend sa reconstitution complète impossible.

Les 4 souches SA20-06, SS1219, LADL-90-503 et STIR CD-17 isolées de poissons, présentent de petits éléments quasiment identiques (CIME_SA20-06_tRNA^{Lys}, CIME_SS1219_tRNA^{Lys}, CIME_LADL_tRNA^{Lys} et CIME_STIR_tRNA^{Lys}). Le site *attL* de ces éléments est apparenté au site *attL* porté par les autres éléments caractérisés au locus considéré. Les sites *attR* de ces éléments, tous identiques entre eux, présentent plus de 99% d'identité avec la moitié *attR* du site *attI* d'IME_A909_tRNA^{Lys} (*attR'*) (Figure 25). Aucun de ces 4 éléments ne présente de site *attI* et ne semble composite.

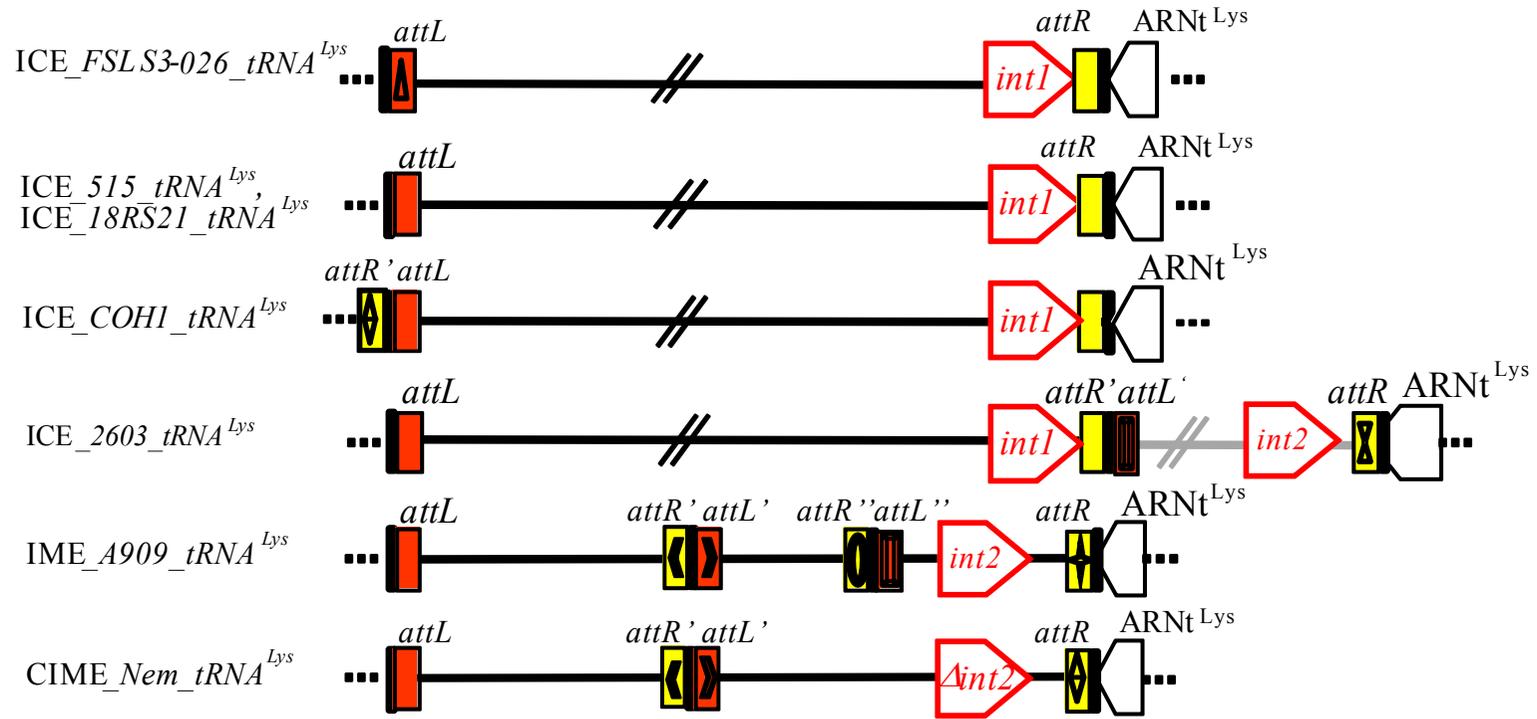
Ces 4 souches possèdent des gènes homologues aux gènes *gbs1984* (partiel chez les souches SS1219 et LADL-90-503), *gbs1977* (sauf SA20-06) et *gbs1978* présents chez CIME_Nem_tRNA^{Lys} codant des protéines putatives de fonction inconnue (plus

de 90% d'identité protéique pour les protéines correspondantes) (Figure 24). De même, toutes portent des gènes quasiment identiques à *SAL_2079* et *SAL_2080*, qui codent un transporteur ABC putatif. Les souches STIR-CD-17 et SA20-26 portent en plus un gène codant un petit peptide (100% d'identité protéique avec *SAL_2081*). Ces gènes font partie d'un opéron homologue à l'opéron *yydFGHIJ* porté par ICEBs1 de *B. subtilis* qui permettrait la synthèse et l'export d'un peptide antimicrobien ou de signalisation (Butcher et al. 2007). Il est composé de 5 gènes codant le peptide, le système d'export (transporteur ABC) et deux protéines de maturation. Chez les 8 souches de *S. agalactiae* dont le génome avait été analysé préalablement à ce travail, seul ICE_COH1_tRNA^{Lys} possède l'opéron complet. Les éléments intégrés au même site dans les 11 autres souches analysées au cours de ces travaux ne présentent que les gènes codant le transporteur ABC associé ou non au gène codant peptide.

La souche 2.22 également isolée d'un poisson possède un petit élément, CIME_2.22_tRNA^{Lys} bordé de sites *attL* et *attR* présentant respectivement 98% d'identité nucléotidique avec les sites *attL* et *attR'* de CIME_Nem_tRNA^{Lys} (Figure 25). Cet élément est composé de deux gènes, présentant 99% d'identité nucléotidique avec *gbs1977* et *gbs1978* codant deux protéines de fonction inconnue.

La seconde souche humaine, GB00112, possède CIME tronqué dépourvu de site *attL* ou de site *att* interne. Son site *attR* est identique à celui de CIME_Nem_tRNA^{Lys} (Figure 25). Il porte des gènes presque identiques aux gènes *gbs1965* et *gbs1966* de CIME_Nem_tRNA^{Lys} ainsi qu'à ceux se trouvant entre les sites *attI* et *attI'* de ICE_A909_tRNA^{Lys}, excepté celui codant une intégrase putative tronquée (*SAK_1950b*). Enfin, ce CIME possède un gène apparemment tronqué de séquence très proche du gène *SAK_1964*. Tous ces gènes codent des protéines de fonction inconnue, à l'exception de deux d'entre eux qui permettraient la synthèse de lipases putatives.

A.



	(287)	287	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	426							
18RS21 attL(261)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAA	ATATT	CAGAGAGAAGTA	AAACCAATTCTAAATGATA	TGAGCTTTGC	AAAAGTCTAACTAAGAAAAATAAAT	TAGACA													
2603 V/I attL(261)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAA	ATATT	CAGAGAGAAGTA	AAACCAATTCTAAATGAT																
COH1 attL(262)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAAA	CATTAGGAGTATAATG	TGAATGTTTGAACA	GATTTAATTTATTTAATATG	TAGGAGGAATT															
515 attL(261)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAA	ATATT	CAGAGAGAAGTA	AAACCAATTCTAAATGAT																
Sa20-26 attL(260)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA																				
STIR CD-17 attL(260)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAA	ATATT	CAGAGAGAAGTA	AAACCAATTCTAAATGAT																
SS1219 attL(260)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAA	ATATT	CAGAGAGAAGTA	AAACCAATTCTAAATGATA	TGAGCTTTGC	AAAAGTCTAACTAAGAAAAATAAAT	TAGACA													
LADL-90-503 attL(260)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAA	ATATT	CAGAGAGAAGTA	AAACCAATTCTAAATGATA	TGAGCTTTGC	AAAAGTCTAACTAAGAAAAATAAAT	TAGACA													
SS1014 attL(262)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAAA	ATTCAGAGAGAAGTA	AAACTAATTC	AAATGATA	TGAGCTTTGC	AAAAGTCTAACTAAGAAAAATAAAT	TAGACA													
GD20 attL(269)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAAA	ATTCAGAGAGAAGTA	AAACTAATTC	AAATGATA	TGAGCTTTGC	AAAAGTCTAACTAAGAAAAATAAAT	TAGACA													
ZQ0910 attL(262)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAAA	ATTCAGAGAGAAGTA	AAACTAATTC	AAATGAT																
CF01173 attL(261)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAAA	ATTCAGAGAGAAGTA	AAACTAATTC	AAATGATA	TGAGCTTTGC	AAAAGTCTAACTAAGAAAAATAAAT	TAGACA													
2.22 attL(260)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAA	ATATT	CAGAGAGAAGTA	AAACCAATTCTAAATGATA	TGAGCTTTGC	AAAAGTCTAACTAAGAAAAATAAAT	TAGACA													
A909 attL(261)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAAA	ATTCAGAGAGAAGTA	AAACTAATTC	AAATGATA	TGAGCTTTGC	AAAAGTCTAACTAAGAAAAATAAAT	TAGACA													
Nem316 attL(261)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAA	ATATT	CAGAGAGAAGTA	AAACCAATTCTAAATGATA	TGAGCTTTGC	AAAAGTCTAACTAAGAAAAATAAAT	TAGACA													
FSI_S3-026 attL(276)	CCTAGTCTGCGTTAACAAAT	TTTGAAGCTATTGGTCTAA	ATCTAATCTGATGTACAAG	TTTATAATTGATTTTGTAG	ATGATTC	CCGTC	CATTATAATCGTATAT	TATCGATGTATCTGCTTCTAT	TTTTTTAAG													
SS1014 attL(250)	TTTATTATAATAGAAATGAGG	TAATCAACTAATTTAAAAG	AAGTTATCTATATTTGAAT	GGTATAGAAAAACAGAGG	TTTATTTGCTTATGAAAAAC	CGTATATGGTAT																
GD20 attL(255)	TTTATTATAATAGAAATGAGG	TAATCAACTAATTTAAAAG	AAGTTATCTATATTTGAAT	GGTATAGAAAAACAGAGG	TTTATTTGCTTATGAAAAAC	CGTATATGGTATTTGATA	ATAATAATCACAGTAAT	TTTAGGA														
ZQ0910 attL(249)	TTTATTATAATAGAAATGAGG	TAATCAACTAATTTAAAAG	AAGTTATCTATATTTGAAT	GGTATAGAAAAACAGAGG	TTTATTTGCTTATGAAAAAC	CGTATATGGTATTTGATA	ATAATAATCACAGTAAT	TTTAGGA														
CF01173 attL(250)	TTTATTATAATAGAAATGAGG	TAATCAACTAATTTAAAAG	AAGTTATCTATATTTGAAT	GGTATAGAAAAACAGAGG	TTTATTTGCTTATGAAAAAC	CGTATATGGTATTTGATA	ATAATAAT															
A909 attL(252)	TTTATTATAATAGAAATGAGG	TAATCAACTAATTTAAAAG	AAGTTATCTATATTTGAAT	GGTATAGAAAAACAGAGG	TTTATTTGCTTATGAAAAAC	CGTATATGGTATTTGATA	ATAATAATCACAGTAAT	TTTAGGA														
Nem316 attL(251)	TTTATTATAATAGAAATGAGG	TAATCAACTAATTTAAAAG	AAGTTATCTATATTTGAAT	GGTATAGAAAAACAGAGG	TTTATTTGCTT																	
GD20 attL(260)	GTTG--ATGCTTCAAGAATTA	ACTGTTTCGAATTC	AATGGTGCAGTACCATT	TGCAGTGATA	AGATTCTTGCTTTTACT	TGCTTGTCAAAATTTAAAGT	CATTTTATTTGAATA	TAAATTC	AAAATTTATCCATAA													
ZQ0910 attL(267)																						
CF01173 attL(260)	GTTG--ATGCTTCAAGAATTA	ACTGTTTCGAATTC	AATGGTGCAGTACCATT	TGCAGTGATA	AGATTCTTGCTTTTACT	TGCTTGTCAAAATTTAAAGT	CATTTTATTTGAATA	TAAATTC	AAAATTTATCCATAA													
2603 V/R attL(249)	CTA																					
A909 attL(260)	GTTG--ATGCTTCAAGAATTA	ACTGTTTCGAATTC	AATGGTGCAGTACCATT	TGCAGTGATA	AGATTCTTGCTTTTACT	TGCTTGTCAAAATTTAAAGT	CATTTTATTTGAATA	TAAATTC	AAAATTTATCCATAA													
Consensus(287)	TTTATTTTAAATATATTTT	TAGTTGTTATATAAAGTAA	TTTGACTATTGAAATAAAA	ATATT	AGAGA	AGT	AACT	TT	TA	ATGATA	G	T	G	A	T	A	A	A	T	A	T	A

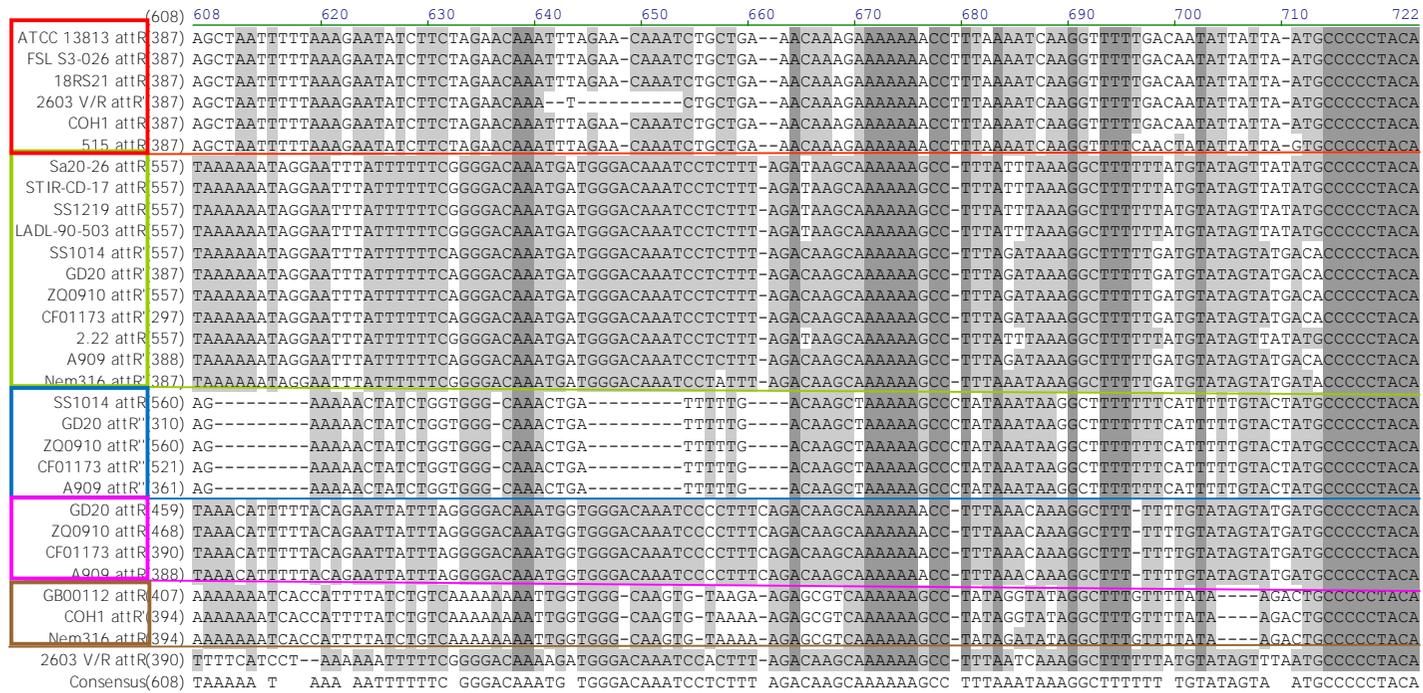


Figure 25 : Alignement des sites de recombinaison des éléments intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{Lys}.

A. Représentation schématique des éléments et de leurs sites de recombinaison

La combinaison de sites *att* retrouvés dans les différents types d'éléments est représentée sur le schéma. Les rectangles noirs correspondent aux séquences de recombinaison, les rectangles jaunes et rouges représentent respectivement aux bras des sites *attR* et *attL*. Les sites *attI* sont composés d'un site de recombinaison et de deux bras *attL* et *attR*. Les noms des sites internes sont incrémentés par des apostrophes. Des sites homologues portent le même nom et sont représentés de manière identique.

Les flèches représentent les ORF. *int* ; gène codant l'intégrase

B. Alignement des différents sites *attL*

L'alignement des différents sites *attL* de tous les éléments caractérisés permet d'observer la présence de 4 types de sites *attL* différents : *attL* porté par les ICE (sauf celui de FSL S3-026), les CIME et les IME, *attL'* d'IME_A909_ *tRNA^{Lys}*, *attL''* d'IME_A909_ *tRNA^{Lys}* et 1 site *attL* caractéristique de l'ICE porté par la souche FSL S3-026

C. Alignement des différents sites *attR*

L'alignement des différents sites *attR* de tous les éléments caractérisés permet d'observer la présence de 6 sites types d'*attR* différents : *attR* porté par tous les ICE, *attR* d'IME_A909_ *tRNA^{Lys}*, *attR''* d'IME_A909_ *tRNA^{Lys}*, *attR* d'IME_2603_ *tRNA^{Lys}*, *attR* de CIME_Nem_ *tRNA^{Lys}* et *attR'* de CIME_Nem_ *tRNA^{Lys}*.

1.1.2 Souche portant un élément dérivant d'un ICE

La souche humaine ATCC 13813, d'origine humaine, possède également un élément intégré dans le locus considéré. Un site *attR* et un gène codant une intégrase putative tous deux presque identiques à ceux d'*ICE_515_tRNA^{Lys}* ont été détectés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{t^{Lys}} (100% d'identité protéique pour le gène de l'intégrase et 93% d'identité nucléique pour le site *attR*). Toutefois, l'analyse n'a pas permis de détecter de site *attL* et donc de déterminer la position précise de l'extrémité gauche de l'élément et donc sa taille. En effet, le dernier gène identifié comme appartenant à l'élément se trouve à l'extrémité d'un contig et ainsi le site *attL* n'est pas détectable à ce niveau. Toutefois, le site *attL* des 8 éléments préalablement décrits se trouve à proximité d'un gène codant une aminoglycoside-6-adényltransférase. Chez la souche ATCC 13813, deux gènes codant une transposase, deux gènes codant un transporteur ABC, et deux autres gènes codant une protéine qui pourrait se fixer à la laminine ainsi qu'une protéine présentant une triade histidine se trouvent à proximité de ce locus. Dans ce contig, aucun site *attL* n'a pu être identifié.

Cet élément coderait également 3 protéines pouvant être impliquées dans le transfert conjugatif : OrfH, OrfG et OrfL. OrfH et OrfG présentent 99% d'identité protéique avec les protéines identifiées chez *ICE_515_tRNA^{Lys}*. Cependant, la taille d'OrfL n'est que de 40 acides aminés chez la souche ATCC 13813 alors qu'elle est de 153 chez *ICE_515_tRNA^{Lys}* (identité de 100% sur cette faible couverture). L'élément de la souche ATCC 13813 ne porte par ailleurs aucun homologue des autres gènes du module de conjugaison d'*ICE_515_tRNA^{Lys}*.

Ainsi, l'élément intégré au locus considéré chez la souche ATCC 13813 dériverait d'un ICE et aurait subi de larges délétions internes, notamment au niveau du module de conjugaison. Il pourrait correspondre à un CIME si le site *attL* est situé dans une région non séquencée. Le site *attL* pourrait également avoir été délété conduisant à un îlot génomique non mobilisable.

Enfin, cet élément porte des homologues d'autres gènes codant des systèmes de maintien tel qu'un système toxine-antitoxine putatif et une protéine d'anti-restriction ArdA putative présents chez *ICE_515_tRNA^{Lys}* (respectivement 100% et 98% d'identité protéique) (Figure 24). Il code également 3 protéines identiques à

SAL_2079 et SAL2080, qui coderaient un transporteur ABC et à SAL_2081 codant le petit peptide associé à cet opéron.

1.1.3 Souches portant un IME putatif

Les trois souches provenant de poisson, GD20 1008-001, ZQ 0910 et CF01173 portent toutes des éléments très proches d'IME_A909_tRNA^{Lys}, distincts les uns des autres et intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys}.

Ces trois éléments sont bordés par des sites *att* et codent une intégrase et une excisionase identiques à celles d'IME_A909_tRNA^{Lys} (codées respectivement par les gènes *SAK_1943*, et *SAK_1944*, Figure 24). Ils codent une relaxase putative présentant 100 ou 99% d'identité avec celle d'IME_A909_tRNA^{Lys} (codée par le gène *SAK_1945*) mais ne semblent pas coder d'autre protéine de conjugaison. Ils possèdent donc les fonctions et séquences leur permettant de s'exciser et de s'intégrer de manière autonome ainsi qu'une relaxase qui pourrait être impliquée dans une mobilisation en *trans*. Ces trois éléments sont donc des IME putatifs.

Comme IME_A909_tRNA^{Lys}, ces 3 IME sont composites et portent deux sites *attI* internes apparentés à ceux portés par IME_A909_tRNA^{Lys} (Figure 25). Ceux portés par l'élément de la souche GD20 1008-001 sont parfaitement identiques à ceux d'IME_A909_tRNA^{Lys}. IME_ZQ0910_tRNA^{Lys} et IME_A909_tRNA^{Lys} ont une taille équivalente d'environ 18,4 kb, l'élément porté par la souche GD20 1008-001 est légèrement plus grand ce qui s'explique par la présence de deux gènes supplémentaires (Tableau 6).

L'IME putatif de la souche GD20 1008-001 ne diffère d'IME_A909_tRNA^{Lys} que par la présence de deux gènes supplémentaires codant des protéines de fonction inconnue et d'une IS de type IS1381 comprenant deux ORF.

Les protéines codées par l'élément porté par la souche ZQ 0910 présentent toutes plus de 96% d'identité avec celles codées par IME_A909_tRNA^{Lys}. Cependant, deux protéines semblent tronquées (homologues de *SAK_1963* et *SAK_1964*).

L'IME_CF01173_tRNA^{Lys} chevauche 8 contigs. Le génome de la souche n'étant pas assemblé, la taille de l'élément n'a donc pas pu être calculée. Cet IME semble posséder tous les gènes de l'élément de la souche A909 (excepté l'homologue du

gène *SAK_1954*) mais certains ne sont que partiels en raison du séquençage incomplet du génome.

1.1.4 Souche portant un ICE putatif

La souche FSL S3-026 est la première souche de *S. agalactiae*, isolée à partir d'une vache ayant contracté un cas de mammite, dont le génome est entièrement séquencé. Une étude comparative de ce génome avec celui des souches humaines réalisée par Richards et al (Richards et al. 2011) avait révélé, comme pour les souches humaines, la présence de nombreux îlots génomiques dont 2 îlots apparentés à *TnGBS1* des souches humaines et un ICE putatif intégré dans l'extrémité 3' du gène *rplL*. Aucun élément intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} n'avait été précisément décrit dans cette étude.

Les analyses de séquences révèlent qu'un élément est intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} de cette souche. Il possède un module de recombinaison complet codant une intégrase et une excisionase putatives présentant respectivement un pourcentage d'identité de 97 et 100% avec celles d'ICE_515_tRNA^{Lys} et est bordé par des sites *attL* et *attR*. Le site *attR* de l'élément porté par la souche FSL S3-026 est identique à 93% à celui d'ICE_515_tRNA^{Lys} et à 100% à ceux d'ICE_COH1_tRNA^{Lys} et d'ICE_18RS21_tRNA^{Lys}. En revanche, le site *attL* ne présente que 45% avec ceux des autres ICE intégrés au locus considéré (Figure 25).

Cet élément possède un module de conjugaison quasiment identique à celui des 4 ICE putatifs précédemment décrits. Ces gènes codent ainsi des protéines présentant une identité de 99 ou 100% par rapport à ceux d'ICE_515_tRNA^{Lys}, excepté la protéine de couplage putative qui ne présente que de 94% d'identité. Comme pour les 4 ICE putatifs déjà caractérisés, une origine de transfert putative est détectée entre les gènes codant la relaxase et la protéine de couplage putatives. La région contenant le site de coupure *nic* possède une identité nucléotidique de 100% avec celle d'ICE_515_tRNA^{Lys} et d'ICEst1 de *S. thermophilus* et de 96% avec celle d'ICE_6180_RD.2 (Figure 26). Cette région semble donc conservée chez les ICE de streptocoques.

	1	10	site <i>nic</i> d'ICEBs1	24
<i>oriT</i> ICEBs1 (<i>B. subtilis</i>)	A	C C C C C	C T A A C	A G G G G G G T
<i>oriT</i> ICE_6180_RD.2 (<i>S. pyogenes</i>)	A	C C C C C	G A T I I C I A A T	A G G G G G G T
<i>oriT</i> ICEst1 (<i>S. thermophilus</i>)	A	C C C C C	G T T I I C I A A T	A G G G G G G T
<i>oriT</i> Tn916 2603V/R	A	C C C C C	C G T A I C I A A C	A G G G G G G T
<i>oriT</i> ilot famille Tn916 GB00984	T	C C C A C	T A T I I C A A A C	A G G G G G G T
<i>oriT</i> ICE_18RS21_ <i>tRNA</i> ^{Lys}	T	C C C A C	T A T I I C I A A T	A G G G G G G T
<i>oriT</i> ICE_515_ <i>tRNA</i> ^{Lys}	A	C C C C C	G T T I I C I A A T	A G G G G G G T
<i>oriT</i> ICE_COH1_ <i>tRNA</i> ^{Lys}	A	C C C C C	G T T I I C I A A T	A G G G G G G T
<i>oriT</i> ICE_2603_ <i>tRNA</i> ^{Lys}	A	C C C C C	G T T I I C I A A T	A G G G G G G T
<i>oriT</i> élément de FSL S3-026	A	C C C C C	G T T I I C I A A T	A G G G G G G T
Consensus	A	C C C C C	G T T T T C T A A T	A G G G G G G T

Figure 26 : Alignement de la région conservée de l'origine de transfert d'ICEBs1 avec les *oriT* putatives d'ICE et de l'élément de la souche FSL S3-026, de *S. agalactiae* ou d'autres streptocoques

La région conservée de l'origine de transfert d'ICE_FSL S3-026_ *tRNA*^{Lys} est identique à celle d'ICE_515_ *tRNA*^{Lys} et d'ICEst1 de *S. thermophilus*. Un seul nucléotide est différent entre ces régions d'ICE_FSL S3-026_ *tRNA*^{Lys} et d'ICE_6180_RD.2. Cette région de l'origine de transfert est donc conservée entre les éléments des différents streptocoques.

L'origine de transfert de Tn916 est également représentée. La répétition directe du site de recombinaison des éléments de type IME_18RS21_ *oriT* est soulignée et en gras. Elle se situe au niveau du site *nic* de l'origine de transfert.

L'origine de transfert d'ICEBs1, ICE apparenté de façon très éloignée, sert de référence car il s'agit de la seule bien caractérisée (Lee et al. 2007).

L'ilot intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{Lys}, possède donc un module de recombinaison et de conjugaison complets. Cet élément pourrait donc être un ICE et a été dénommé ICE_FSL S3-026_ *tRNA*^{Lys}. Sa taille (42,8 kb) est similaire à celle des 4 autres ICE putatifs déjà décrits. Il contient 48 gènes dont un seul semble spécifique de cette souche ce qui explique que cet ICE n'ait pas été décrit lors de l'analyse comparative effectuée par Richards et al (Richards et al. 2011) visant à comparer les souches d'origines humaines et bovines (Figure 27). ICE_FSL S3-026_ *tRNA*^{Lys} ne porte pas de site *att* interne.

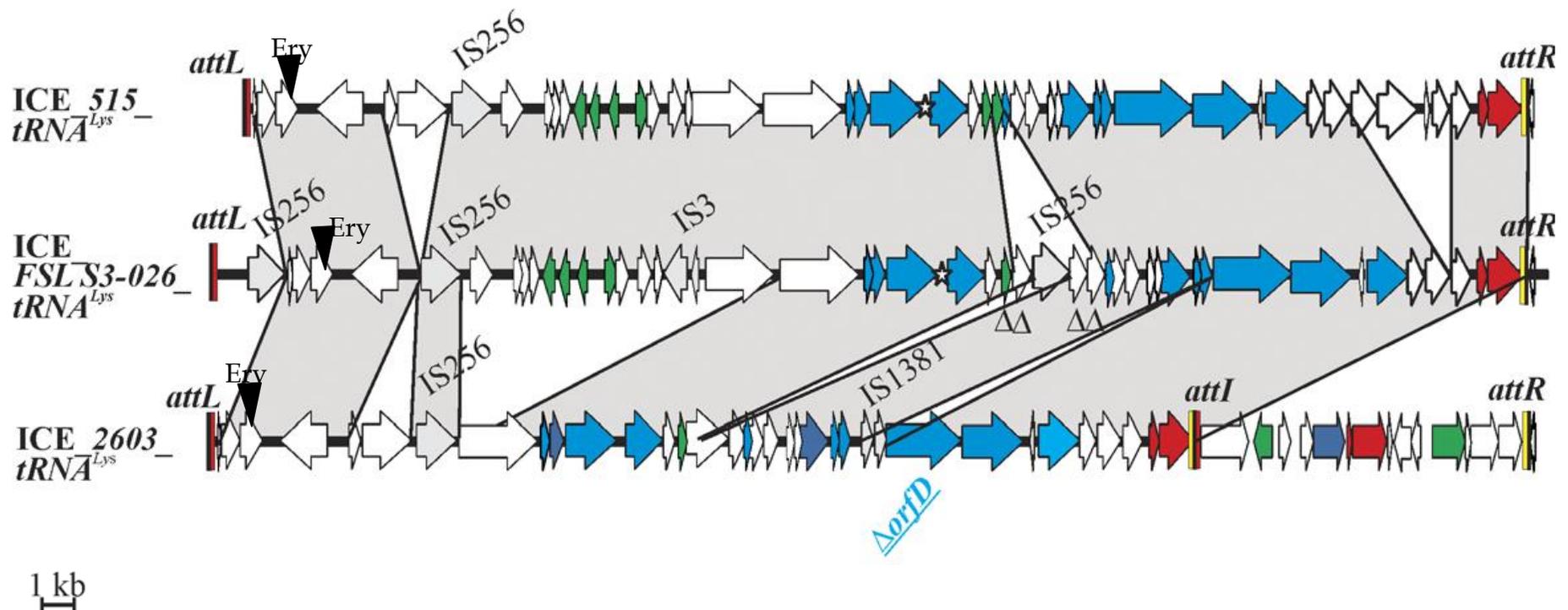


Figure 27 : Organisation et comparaison d'ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} et de deux autres éléments intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{tLys}

Les flèches représentent les ORF. Les gènes tronqués présentent un delta. Les gènes du module de conjugaison apparaissent en bleu, ceux du module de recombinaison en rouge et ceux probablement impliqués dans la régulation de l'ICE en vert. Les noms des gènes proviennent soit d'un domaine putatif trouvé sur ce dernier ou d'une fonction putative associée au produit du gène. L'*oriT* putative des éléments est représentée par une étoile. Les sites de recombinaisons sont schématisés par des rectangles, en noir séquences de recombinaison, en jaune bras du site *attR* et bras apparenté du site *attI*, en rouge bras du site *attL* et bras apparenté au niveau du site *attI*. Les surfaces grisées indiquent les séquences présentant une identité protéique supérieure à 80%. La position du gène SAG2026 dans lequel a été introduit un gène de résistance à l'érythromycine est indiqué par un triangle noir.

En plus des gènes impliqués dans l'excision et le transfert de l'élément, ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} code, comme l'ICE de la souche COH1, 3 régulateurs putatifs, soit un de moins que l'ICE de la souche 515 mais un de plus que celui de l'élément composite de la souche 2603V/R. Les régulateurs sont caractérisés par la présence d'un domaine hélice-tour-hélice caractéristique de protéines liant l'ADN, de type HTH_CRO-cl (PS50943) retrouvé chez les répresseurs de phages. L'un des régulateurs d'ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} présenterait un décalage du cadre de lecture précoce (après 12 acides aminés seulement).

Comme les autres ICE putatifs précédemment décrits, ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} contient également des gènes qui pourraient être impliqués dans le maintien de l'élément dans la souche ou la population, tels que des gènes codant un facteur CAMP, un système toxine-antitoxine ou des protéines de surface.

Enfin, ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} code 4 transposases à DDE dont trois appartiennent à la famille d'IS256 et une à la famille d'IS3. Ainsi, cet élément porterait deux fois plus d'IS que l'ICE de la souche 2603V/R et quatre fois plus que celui de la souche 515. Cette donnée corrobore l'enrichissement en IS observé dans le génome de la souche bovine comparé à celui des souches humaines (Richards et al. 2011).

Les 12 souches analysées au cours de cette étude portent donc, comme les 8 précédemment analysées, un élément intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARN_t^{Lys}.

1.2 Analyses de 234 autres génomes disponibles de *S. agalactiae*

1.2.1 Méthodologie employée

De nombreux autres génomes de *S. agalactiae* sont disponibles : 236 au total. Toutefois, deux génomes, présentant des données de séquences trop partielles, n'ont pas pu être analysés et ont été retirés de l'étude (LDS 610 et LMG14747). Une analyse systématique par comparaison de séquences en réalisant des BlastP ou des BlastN, a été effectuée les 234 souches restantes. Pour 126 génomes, les séquences disponibles sont à la fois nucléotidiques et protéiques. Dans ce cas, les comparaisons de

séquences ont été réalisées par des BlastP. La protéine recherchée était considérée comme présente lorsqu'elle présentait un pourcentage d'identité supérieur à 80% entre la requête et la protéine détectée. Pour les génomes restants, seules les séquences nucléotidiques étaient disponibles. Les analyses ont alors été réalisées par des BlastN. Le gène recherché était considéré comme présent lorsque le pourcentage d'identité entre la requête et le gène détecté était supérieur à 90%.

Les souches étudiées ont été isolées chez l'homme (165), le boeuf (45), des poissons (14), une grenouille (1), le chien (3), le phoque gris (5) ou chez un dauphin (1) (Tableau 6).

Dix gènes, ainsi que les protéines correspondantes, ont été choisis pour ces analyses de séquences (Figure 24).

Les 4 ICE putatifs intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} précédemment décrits possèdent tous des gènes codant une intégrase (SAL_2029), une relaxase (SAL_2052), une protéine de couplage de famille FtsK (SAL_2053) ainsi qu'une protéine du pore de conjugaison OrfD de famille VirB4 (SAL_2040). Ces quatre protéines sont probablement impliquées dans la mobilité de l'élément, soit dans son excision pour l'intégrase, soit dans le transfert conjugatif pour les 3 autres. La protéine OrfD possède un domaine ATPase et pourrait fournir l'énergie nécessaire lors de la translocation de l'ADN vers la cellule réceptrice. Ces quatre gènes ou les protéines correspondantes ont été recherchés. La présence de ces 4 gènes ou protéines pourrait révéler la présence d'un ICE ou d'un dérivé d'ICE apparentés à ceux déjà caractérisés.

ICE_2603_tRNA^{Lys} est un élément composite. Il est issu d'un événement d'accrétion en tandem d'un ICE et d'un IME. Cet IME (appelé dans ces travaux IME_2603_tRNA^{Lys}) est intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} chez la souche 2603V/R (Figure 24), à droite de l'ICE. IME_2603_tRNA^{Lys} code une seconde relaxase et une seconde intégrase (respectivement SAG1988 et SAG1986). Ces protéines ont été également été recherchées dans cette étude afin de mettre en évidence les éléments apparentés à cet IME.

ICE_18RS21_tRNA^{Lys} est également un élément composite. Il est issu d'un événement d'accrétion interne entre un ICE et un IME. Cet IME (appelé dans ces travaux IME_18RS21_oriT) est intégré dans l'origine de transfert de l'ICE. La relaxase et l'intégrase de cet élément (respectivement SAJ_1916 et SAJ_1914) ont été

recherchées dans cette étude afin de mettre en évidence les éléments apparentés à cet IME.

Enfin, les gènes *SAL_2079-SAL_2080*, portés par tous les îlots génomiques intégrés dans le locus considéré précédemment décrits chez *S. agalactiae*, excepté celui de la souche CJB111, ont également été recherchés. Ils codent deux protéines constituant les deux sous-unités d'un transporteur ABC et appartiennent à un opéron homologue à l'opéron *yydFGHIJ*, qui permettrait la modification et l'export d'un peptide signal ou antimicrobien chez *B. subtilis* (Butcher et al. 2007).

Tous les génomes analysés présentent des données de séquences sous forme de contigs. Il est donc possible que l'absence de certains gènes soit en fait due à une absence de séquences dans la base de données.

Les différents types de sites de recombinaison (*attR* ICE, *attR* A909, *attR''* A909, *attR* Nem, *attR'* Nem, *attR* IME2603V/R, *attL* ICE, *attL* FSL S3-026, *attL'* A909 et *attL''* A909) ont également été recherchés par BlastN pour l'ensemble des souches testées. Un site a été considéré comme présent lorsque l'on retrouvait la répétition directe de la fin du gène d'ARNt lysine et que la séquence présentait au moins 90% d'identité (sur une longueur minimale de 60 pb). Toutefois on ne peut pas exclure que l'absence de détection de certains sites de recombinaison ne soit due au séquençage incomplet de certains génomes.

1.2.2 Analyses des génomes par BlastN et BlastP

1.2.2.1 Souches portant les gènes caractéristiques des ICE

Quatre-vingt dix neuf génomes (soit 42%) des génomes analysés possèdent au moins un des gènes ou protéines caractéristiques des ICE intégrés dans ce site (Tableau 6A). Toutefois, seulement 84 souches (36%) portent les 4 gènes associés (Tableau 6) et pourraient donc correspondre à des ICE qui s'excisent et se transfèrent de façon autonome, s'ils codent les autres protéines nécessaires à l'excision et au transfert conjugatif et sont flanqués de sites *attL* et *attR*. Toutes ces souches, excepté 3, portent les sites *attR* et *attL* bordant les autres ICE intégrés au locus considéré déjà caractérisés (Figure 25). De plus, 35 d'entre elles portent 1 à 3 sites de recombinaison supplémentaires.

Parmi les 84 souches portant les 4 gènes de mobilité caractéristiques des ICE, seulement 3 ne portent pas la paire de gènes *SAL_2080-SAL_2079*. La majorité de ces souches sont d'origine humaine (58) mais 22 sont d'origine bovine, 2 ont été isolées de phoques gris et les deux dernières de chiens (Tableau 6).

Quinze souches possèdent, en plus des 4 gènes caractéristiques des ICE, deux gènes caractéristiques d'*IME_2603_tRNA^{Lys}* (Tableau 6), indiquant la présence d'un élément composite ICE-IME. Des analyses complémentaires ont été réalisées afin de déterminer la structure de ces éléments composites putatifs. Cinq de ces souches (toutes d'origine humaine) possède la même organisation qu'*ICE_2603_tRNA^{Lys}*, c'est-à-dire un IME intégré au niveau du site *attR* de l'ICE qui le jouxte (Figure 24). En effet, elles portent toutes un site *attR* quasi identique à celui de l'IME en amont du gène codant un ARNt^{Lys} CTT. Pour les 10 autres souches, le gène codant l'intégrase de l'ICE est à proximité directe du gène codant un ARNt^{Lys} CTT, suggérant un tandem IME-ICE et non ICE-IME. Chez quatre souches d'origine bovine, l'IME semble intégré à proximité du gène *SAL_2080* soit à l'extrémité gauche de l'ICE (tandem IME-ICE) et non à l'extrémité droite (tandem ICE-IME). Toutefois, chez la souche BSU188, l'IME ne semble pas intégré à proximité de l'ICE. En effet, les gènes caractéristiques de l'ICE ainsi que ceux qui bordent habituellement les éléments (gènes codant un ARNt^{Lys} et une aminoglycoside-6-adényltransférase) sont sur un contig différent des gènes d'IME-ARNt^{Lys}. Pour cette souche, le site *attR* d'*IME_2603_tRNA^{Lys}* n'a pas été retrouvé. Pour les cinq souches restantes, la structuration en contig des séquences empêche une détermination précise du site d'intégration de l'IME.

Enfin, 3 souches, d'origine humaine, portent, en plus des 4 gènes caractéristiques des ICE, les gènes *SAJ_1914* (intégrase) et *SAJ_1916* (relaxase) caractéristiques d'*IME_18RS21_oriT* (Tableau 6 et Figure 24). Dans les 3 cas, le gène codant l'intégrase de l'ICE (homologue de *SAL_2029*) est localisé à proximité directe du gène codant un ARNt^{Lys}. Chez la souche 18RS21, un IME porteur des gènes *SAJ_1914* et *SAJ_1916* est intégré dans l'origine de transfert de l'ICE qui est intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys}. Deux des trois souches présentent la même organisation. Il s'agirait donc d'éléments composites de structure similaire à celle d'*ICE_18RS21_tRNA^{Lys}*. Toutefois, chez la souche GB00984, l'élément est intégré dans l'origine de transfert d'un élément de type Tn916. Le gène situé en aval de l'élément présente 99% d'identité avec le gène de la relaxase de Tn916 de la souche 2603V/R. Le gène situé en amont de l'élément présente 100% d'identité avec le gène

de la protéine de couplage de Tn916 de la souche 2603V/R. La répétition directe des sites de recombinaison de cet élément est TCTAA, séquence localisée dans la région conservée de l'origine de transfert à proximité du site *nic* (Figure 26).

Dans les 66 cas où l'ICE ne semble pas associé à un IME, le gène codant l'intégrase se trouve à proximité directe du gène codant un ARN^t_{Lys} codon CTT.

1.2.2.2 Souches portant uniquement les gènes caractéristiques d'IME_2603_tRNA^{Lys}

Quarante-quatre souches, soit 19% des souches testées, possèdent les 2 gènes caractéristiques d'IME_2603_tRNA^{Lys} (*SAG1986* et *SAG1988*) mais non ceux des ICE. Chez 36 de ces souches, ils sont associés avec la paire *SAL_2079-SAL2080*. Trente de ces souches sont d'origine humaine, 2 d'origine bovine, 9 ont été isolées de poisson, 1 de grenouille, 1 de chien et 1 de dauphin (Tableau 6). Trente-cinq présentent une organisation similaire à IME_A909_tRNA^{Lys} (présence de la paire de gènes *SAL2080-SAL2079* et du gène *SAK_2040*). Ces éléments sont intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys}, ce dernier et le gène de l'intégrase (de type *SAG1986*) étant séparés d'environ 2 kb.

Ces éléments codant une intégrase et une relaxase portent l'ensemble des sites *att* d'IME_A909_tRNA^{Lys} (présence de deux sites internes *attI* et *attI'*, Figure 24), à l'exception de 2 souches pour lesquels 1 ou 2 sites *att* ne sont pas détectés. Il semble donc que ces éléments soient des IME composites.

1.2.2.3 Souches portant des dérivés d'ICE ou IME

Quinze souches d'origine humaine ou bovine ou isolées de poisson semblent porter des éléments dérivés d'ICE. En effet, ils ne portent pas les 4 gènes caractéristiques de l'ICE mais 1 (8 souches), 2 (6 souches), ou 3 gènes (1 souche). Toutes portent, au minimum, le gène codant l'intégrase et toutes sauf une possèdent le couple de gènes *SAL_2079-SAL_2080*. Parmi ces 15 souches, 9 portent les sites de recombinaison *attL* et *attR* présents chez les ICE caractérisés du locus considéré dont 3 avec 1 à 7 sites de recombinaison supplémentaire. En revanche 6 souches ne portent qu'un site identique au site *attR* des ICE, ces éléments sont donc potentiellement non mobiles.

Dix-neuf souches ne présentent que les gènes *SAL_2079* ou *SAL_2080* (10 souches d'origine humaine, 5 bovines et 4 de poissons). Les analyses révèlent que toutes portent les sites *attL* et *attR* présents chez les ICE caractérisés du locus considéré et au moins 2, voir 3 sites *attR* homologues à un de ceux retrouvés chez *IME_A909_tRNA^{Lys}* ou *CIME_Nem_tRNA^{Lys}* confirmant ainsi que ces éléments pourraient être des CIME intégrés à proximité du gène codant un ARNt^{Lys} codon CTT (Tableau 6).

De plus, 39 autres souches ne portant aucun des 10 gènes testés contiennent au moins un site *attL* et un site *attR*. Des analyses complémentaires ont révélé que 37 d'entre elles portent au moins un homologue du gène *gbs1965* (gène situé à l'extrémité droite de *CIME_Nem_tRNA^{Lys}*, Figure 24), 1 un homologue du gène *gbs1968* (Figure 24) et 1 autre un homologue de *gbs1977* à proximité du gène codant un ARNt^{Lys}. Ces 39 souches pourraient donc également porter des CIME.

Pour les 33 souches restantes, les régions situées en aval du gène de l'ARNt^{Lys} (codon CTT) ont été analysées. Quinze d'entre elles, d'origine humaine, portent un homologue du gène *gbs1965*. Une souche bovine code une protéine de type *SAL_2053* (protéine de couplage d'*ICE_515_tRNA^{Lys}*) tronquée et une autre un gène codant une protéine FtsK partiel. Cinq autres souches d'origine humaine portent à proximité un homologue du gène *gbs1968* de *CIME_Nem_tRNA^{Lys}*. Une souche humaine porte le gène *SAK_1952* tronqué. Deux autres souches humaines possèdent les gènes *SAK_1950b* et *SAK_1952*, tronqués pour l'un d'entre eux, d'*IME_A909_tRNA^{Lys}*. Toutes ces souches portent au moins un site *attR* mais pas de site *attL*. Elles semblent contenir un résidu d'élément, probablement non mobile, intégré dans le locus considéré (Tableau 6).

Quatre souches, une d'origine humaine et 3 isolées de phoque gris ne portent aucun gène d'élément génétique mobile intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys}. Toutefois, elles portent deux répétitions directes imparfaites (1 C manque) bordant une partie du site de recombinaison *attR* d'*ICE_515_tRNA^{Lys}* (100% d'identité). Ces souches ne contiennent donc pas de site *attB* vide mais portent les vestiges minimaux d'un élément, un mini-CIME intégré au locus considéré.

En revanche, 3 souches d'origine humaine et 1 souche d'origine bovine portent un site *attB* apparemment vide à l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt^{Lys} CTT (Tableau 6).

Tableau 6 : Analyse par comparaison de séquences de 234 souches de *S. agalactiae*

A. Composition en gènes des différentes souches

B. Associations de gènes observées chez les différentes souches

A.

Origine	ICE				IME_2603V/R_ARNtLys		IME_18RS21_oriT		SAL_2080	SAL_2079
	SAL_2053 (FtsK)	SAL_2052 (relaxase)	SAL_2040 (OrfD)	SAL_2029 (intégrase)	SAG1988 (2 ^{ème} relaxase 2603V/R)	SAG1986 (2 ^{ème} intégrase 2603V/R)	SAJ_1916 (2 ^{ème} relaxase 18RS21)	SAJ_1914 (2 ^{ème} intégrase 18RS21)		
Humain (165)	59	61	59*	65	36**	36**	3***	3***	101	101
Bovin (45)	23**	23	25*	31	11	11**	0	0	36	36*
Poisson (14)	0	0	0	0	9	9**	0	0	13	13*
Autres (10)	4	4	4	4	3	3	0	0	6	6*
TOTAL (234)	86	88	88	100	59	59	3	3	156	156
%	36,8	37,6	37,6	42,7	25,2	25,2	1,3	1,3	66,7	66,7

B.

	ICE				IME_2603V/R_ARNtLys		IME_18RS21_oriT		SAL_2079-SAL_2080	autre gène	attL	attR	Humain (165)	Bovin (45)	Poisson (14)	Autres (10)	Total (234)	%
	SAL_2053 (FtsK)	SAL_2052 (relaxase)	SAL_2040 (OrfD)	SAL_2029 (intégrase)	SAG1988 (2 ^{ème} relaxase 2603V/R)	SAG1986 (2 ^{ème} intégrase 2603V/R)	SAJ_1916 (2 ^{ème} relaxase 18RS21)	SAJ_1914 (2 ^{ème} intégrase 18RS21)										
ICE	+	+	+	+					+(63)	ND	+	+	49	13	/	4	66	28,2%
ICE + IME_2603V/R_ARNtLys	+	+	+	+	+	+			+	ND	+	+	6	9	/	/	15	6,4%
ICE + IME_18RS21_oriT	+	+	+	+			+	+	+	ND	+	+	3	/	/	/	3	1,3%
IME_2603V/R_ARNtLys					+	+			+(36)	ND	+	+	30	2	9	3	44	18,8%
Dérivés d'ICE	+	+		+					+	+	+	+	1	/	/	/	1	0,4%
		+		+					+	+	+	+	3	/	/	/	3	1,3%
			+	+					+(2)	+(2)	+(2)	+	1	2	/	/	3	1,3%
				+					+	+	+(3)	+	2	6	/	/	8	3,4%
CIME									+(19)	+(39)	+	+	43	10	5	/	58	24,8%
Résidus d'élément										+(25)		++++	24	2	/	3	29	12,4%
sans élément													3	1	/	/	4	1,7%

*, dans certaines souches le gène est présent sur deux contigs ; **, dans certains cas le gène tronqué (couverture de 99%) ; ***, pourcentage d'identité nucléotidique de seulement 89% pour une des souches, pour 3 de ces éléments, 2 sont intégrés dans l'origine de transfert d'un élément intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ANRtLys et le dernier dans l'origine de transfert de Tn916 ; ****, 4 de ces éléments portent un site attR partiel.

Case +, gène présentant plus de 90% d'identité nucléotidique ou plus de 80% d'identité protéique ; ND, non déterminé

Le chiffre entre parenthèse représente le nombre de souche possédant l'élément lorsqu'elle ne le porte pas toutes.

Un site attL ou attR est considéré comme présent quel que soit le type de site porté.

2. Transfert conjugatif des ICE putatifs intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys}

La plupart des résultats présentés dans ce chapitre (mobilité des ICE d'origine humaine) et ceux présentés dans la partie suivante sur la mobilisation par ces éléments ont fait l'objet d'une publication dans « Journal of Bacteriology » (Annexe).

2.1 Excision des ICE putatifs

Les analyses précédentes montrent que 5 souches de *S. agalactiae* portent un ICE putatif intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys}. Ces 5 ICE portent un module de recombinaison complet composé de sites *att* bordant les éléments ainsi que des gènes codant une intégrase et une excisionase.

L'excision des ICE, (ICE_515_tRNA^{Lys}, ICE_COH1_tRNA^{Lys}, ICE_18RS21_tRNA^{Lys} et ICE_FSLS3-026_tRNA^{Lys}) devrait aboutir à la formation d'un site *attI* porté par l'élément et d'un site *attB* chromosomique (Figure 28A). En revanche, ICE_2603_tRNA^{Lys} est un élément composite composé d'un IME et d'un ICE et porteur d'un site *attI* interne. De ce fait, la recombinaison pourrait aboutir à trois formes excisées différentes, l'ICE ou l'IME pouvant s'exciser seul ou en tandem (Figure 28C). Les trois formes pourraient co-exister dans la même population cellulaire si ces recombinaisons ont lieu.

Des PCR nichées, permettant d'augmenter la spécificité et la quantité de produit de PCR, nous ont permis de détecter une forme circulaire pour les ICE des souches 515, 18RS21 et FSL S3-026 mais non pour celui de la souche COH1 (Figure 28B). Toutefois, un site *attB* vide a été détecté pour toutes ces souches. De même, les sites *attI* et *attB* issus de l'excision d'ICE_2603_tRNA^{Lys} ont été recherchés. Toutefois, seules les recombinaisons entre les sites *attL* et *attR* et entre les sites *attR* et *attI* ont abouti à une forme circulaire de l'élément. Ainsi, l'IME intégré au côté de l'ICE s'excise seul ou en tandem avec ce dernier (Figure 28D).

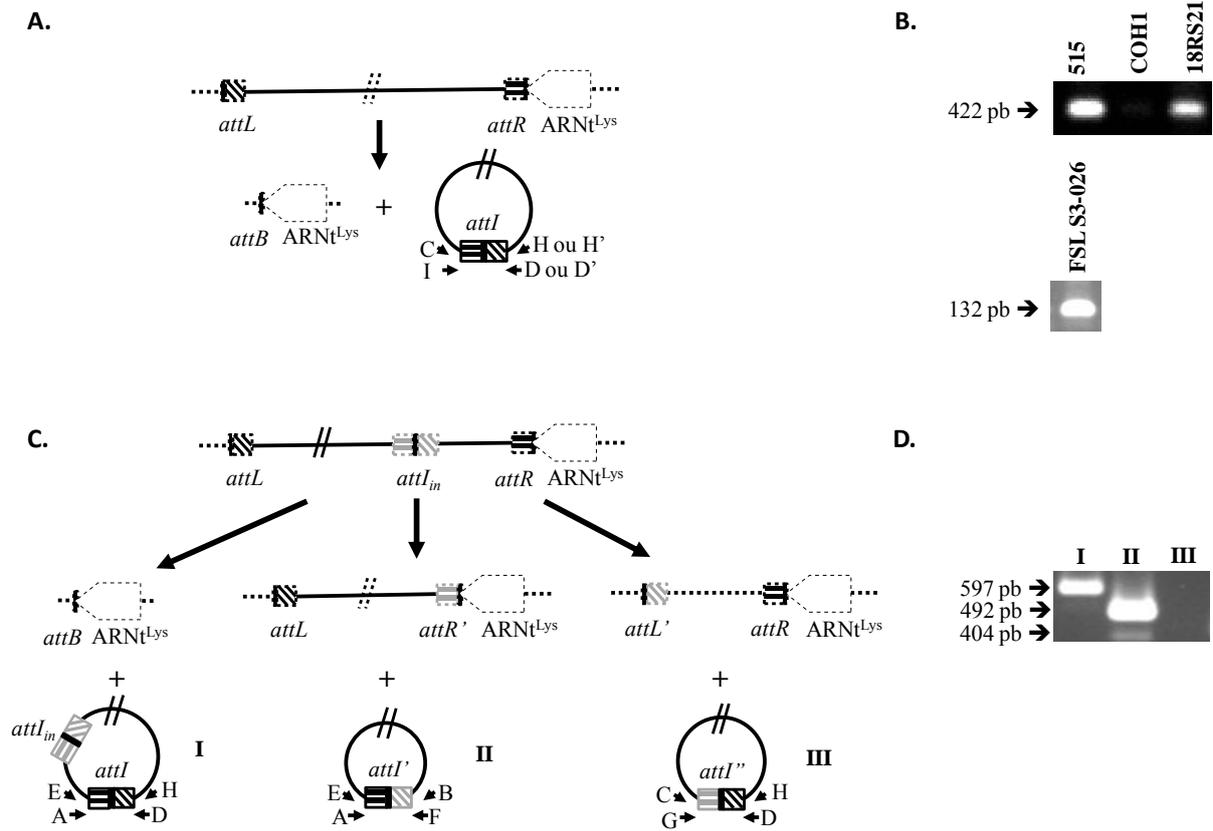


Figure 28 : Excision site-spécifique des ICE intégrés à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys} chez *S. agalactiae*

(A) Modèle d'excision des ICE portés par les souches 515, COH1, 18RS21 et FSL S3-026

(B) Electrophorèse des produits de PCR nichée portant *attI* obtenus pour les souches 515, COH1, 18RS21 et FSL S3-026

(C) Modèle d'excision d'ICE_2603_ *tRNA^{Lys}*. Cet élément possède un site *attI* interne. Trois événements de recombinaison sont possibles aboutissant à la formation de trois formes circulaires qui pourraient cohabiter au sein de la même population.

(D) Electrophorèse des produits de PCR nichée obtenus avec la souche 2603V/R

Les oligonucléotides utilisés afin de détecter les sites de recombinaison *attI*, *attI'* et *attI''* résultant de l'excision sont indiqués par des lettres.

2.2 Test de transfert conjugatif intra-espèce

2.2.1 Sélection de cellules réceptrices

Les expériences de conjugaison nécessitent en principe des cellules donatrices porteuses d'élément et de souches réceptrices dépourvues d'élément. Lors de la réalisation de ce travail, les génomes analysés dans la première partie de ces résultats n'étaient pas disponibles. Aucune souche sans élément intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{t^{Lys}} n'était donc disponible.

Dans le cadre d'un projet réalisé avec l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), une recherche systématique des ICE intégrés dans le locus considéré avait été effectuée chez une collection de souches de *S. agalactiae* isolées de bovins. Quarante-deux souches avaient été décrites comme ne portant pas le gène de l'intégrase recherché (SAL_2029). Des analyses complémentaires ont été réalisées sur ces souches grâce à des PCR permettant d'amplifier le gène SAL_2029, le gène codant l'intégrase SAG1986 d'IME_2603_ARN^{t^{Lys}}, et le gène SAL_2079. Ces expériences ont révélé que toutes les souches analysées portent au moins un des trois gènes et donc possèdent vraisemblablement un élément intégré dans le locus considéré.

Une stratégie de curage de souche a donc été mise en place dans un premier temps. Les gènes codant l'intégrase et l'excisionase d'ICE_515_tRNA^{Lys} ont donc été clonés dans les plasmides pIB184 et pIB185 contenant respectivement les promoteurs P23 et Pveg permettant la surexpression de gènes chez les streptocoques. Les souches 515 et Nem316 ont été électroporés en présence de ces plasmides afin d'augmenter la fréquence d'excision des éléments portés par ces souches et d'entraîner ainsi leur perte. Après 100 générations, aucune souche sans élément n'a pu être isolée.

Une seconde stratégie a alors été mise en place, basée sur l'exposition des cellules à la mitomycine C. Pour des ICE apparentés tels que ICES_{t1}-ICES_{t3} de *S. thermophilus* et ICE_6180_RD.2 de *S. pyogenes* l'ajout de mitomycine C augmente la fréquence d'excision de l'ICE ce qui favorise la perte de l'élément (Bellanger et al. 2011; Sitkiewicz et al. 2011). Après exposition de la souche 515 à la mitomycine C, en phase exponentielle, aucune souche dépourvue d'ICE_515_tRNA^{Lys} n'a pu être isolée malgré le test de plus de 1000 clones.

ICE_515_tRNA^{Lys} porte un système toxine-antitoxine putatif (SAL_2044-SAL_2045) qui pourrait défavoriser la perte de l'ICE. Le gène codant la toxine putative avait été délété (Chuzeville, com. pers.). La souche mutante a été exposée comme précédemment à la mitomycine C. Cependant, malgré le test de plus de 5000 clones, aucune souche curée n'a pu être isolée.

Trois souches réceptrices ont alors été construites. Nem316, COH1 et A909 portent toutes un élément intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{tLys} : Nem316 possède un CIME (CIME_Nem_tRNA^{Lys}), la souche COH1 un ICE, (ICE_COH1_tRNA^{Lys}) et la souche A909 un ICE (ICE_A909_tRNA^{Lys}). Des mutants spontanés résistants à la rifampicine et à la streptomycine ont été sélectionnés pour ces trois souches afin qu'elles puissent servir de cellules réceptrices.

2.2.2 Test de transfert d'ICE_515_tRNA^{Lys}

Afin de tester la capacité de transfert d'ICE_515_tRNA^{Lys}, cet élément a été marqué par le remplacement du gène SAL_2079 par un gène de résistance à l'érythromycine. Ce gène, situé à l'extrémité gauche de l'élément, code la sous-unité ATPase d'un transporteur ABC putatif.

Cette souche marquée a ensuite été utilisée comme cellule donatrice dans des expériences de conjugaison. Les souches dérivant de Nem316, COH1 et A909 décrites précédemment ont servi de souches réceptrices.

Les expériences ont montré qu'ICE_515_tRNA^{Lys} se transfère vers les souches Nem316 et COH1, respectivement avec des fréquences de conjugaison de $4,0 \times 10^{-7} \pm 0,8 \times 10^{-7}$ et $0,7 \times 10^{-7} \pm 0,1 \times 10^{-7}$ transconjugants par cellule donatrice. Aucun transconjugant n'a pu être isolé lorsque la souche A909 a été utilisée comme cellule réceptrice.

Les transconjugants putatifs ont été analysés par PCR. La souche Nem316 porte le gène SAL_2079 au niveau de CIME_Nem_tRNA^{Lys}. ICE_515_tRNA^{Lys} porte également le gène SAL_2079 mais celui-ci est interrompu par un gène de résistance à l'érythromycine et est donc plus grand que celui présent chez la souche réceptrice. Deux fragments ont été obtenus lors de l'amplification du gène SAL_2079 chez les transconjugants putatifs, démontrant ainsi que ceux-ci dérivent bien de la cellule

réceptrice et portent l'ICE (Figure 29). Les transconjugants issus du transfert d'ICE_515_tRNA^{Lys} vers la souche COH1 ont été confirmés selon le même principe.

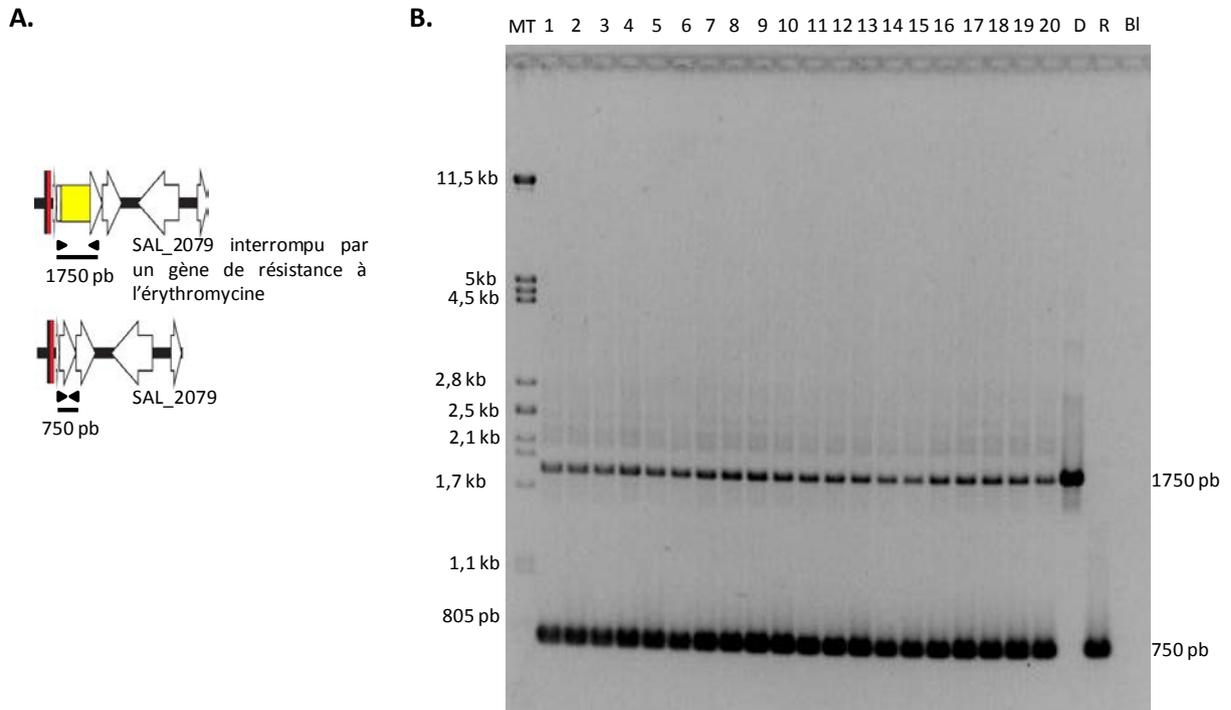


Figure 29 : Analyse des transconjugants d'ICE_515_tRNA^{Lys} vers la souche Nem316

A. Principe de la PCR de vérification des transconjugants

ICE_515_tRNA^{Lys} porte le gène *SAL_2079* (homologue du gène *SAG2026* chez la souche 2603V/R), interrompu par un gène de résistance à l'érythromycine. La souche Nem316 porte également ce gène sur *CIME_Nem_tRNA^{Lys}*. Une PCR réalisée avec des oligonucléotides bordant ce gène aboutit à un fragment de 750 pb chez la souche réceptrice, de 1750 pb environ chez la souche donatrice. Les transconjugants, qui sont des cellules dérivées des souches réceptrices mais portant en plus l'ICE, sont caractérisés par l'amplification des deux fragments.

B. Analyse par électrophorèse des transconjugants putatifs

Les transconjugants putatifs issus de la conjugaison entre les souches 515 et Nem316 présentent tous le profil attendu.

MT, marqueur de taille ; chiffres de 1 à 20, transconjugant ; D, donatrice ; R, réceptrice ; Bl, blanc

2.2.3 Transfert conjugatif d'un ICE ou autre mécanisme possible ?

2.2.3.1 Test à la désoxyribonucléase I

Bien que *Streptococcus agalactiae* n'ait jamais été démontré décrite comme étant une bactérie compétente, elle possède des gènes orthologues à tous les gènes de *S. pneumoniae* nécessaires à la mise en place de la compétence, excepté les régulateurs de l'induction (Glaser et al. 2002). Il ne pouvait donc pas être totalement exclu que le transfert de gène observé au cours de ce travail soit dû à une transformation. Lors d'un événement de transformation, contrairement à la conjugaison, l'ADN transféré passe dans le milieu extracellulaire et devient donc sensible à la désoxyribonucléase I (DNase I) ajoutée dans le milieu. Des expériences de conjugaison ont été réalisées avec et sans DNase I (50 µg/mL) afin de comparer les fréquences de transfert. La souche 515 portant ICE_515_tRNA^{Lys} a été utilisée comme souche donatrice et la souche Nem316 comme souche réceptrice. La fréquence de transfert avec ajout de DNase I a été comparée à une fréquence sans enzyme mais avec les tampons CaCl₂ (0,5 mM) et MgCl₂ (2,5 mM) afin d'éviter toute interférence de ces derniers. Aucune différence de transfert n'a été observée après ajout de la DNase I dans le milieu (Figure 30). Ainsi, l'hypothèse de transformation naturelle est réfutée.

Le transfert observé au cours de ce travail ne semble pas dû à un mécanisme de transformation.

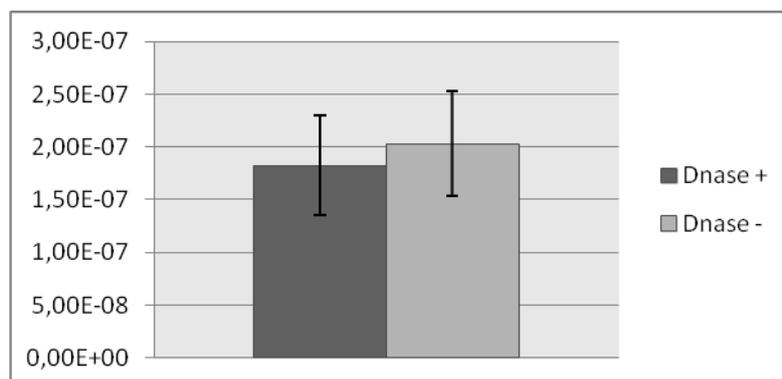


Figure 30 : Fréquence de transfert d'ICE_515_tRNA^{Lys} vers la souche Nem316 avec et sans DNaseI

La fréquence de transfert est identique avec et sans enzyme réfutant l'hypothèse de transformation naturelle.

2.2.3.2 Blocage entre cellules donatrice et réceptrice

Contrairement aux deux autres mécanismes de transfert, la conjugaison nécessite un contact physique entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice. Des expériences de conjugaison entre les souches 515 (donatrice) et Nem316 (réceptrice) ont été réalisées en bloquant le contact entre les deux types cellulaires par l'intermédiaire d'un filtre lors des expériences de conjugaison. Les pores (0,45 μ M) du filtre utilisé ne permettent pas le passage des cellules mais autorisent celui des nutriments, de certaines molécules et des phages. Aucun transconjugant n'a été observé lors de ces expériences de conjugaison.

Le contact entre cellule donatrice et cellule réceptrice est donc nécessaire au transfert, ce qui conforte l'hypothèse d'un transfert par conjugaison.

2.2.3.3 Test de re-transfert

ICE_515_ *tRNA*^{Lys} se transfère vers des souches de *S. agalactiae*. Toutefois, la souche 515 porte Tn916 qui pourrait mobiliser ICE_515_ *tRNA*^{Lys}. La souche Nem316 ne porte pas Tn916 et un transfert d'ICE_515_ *tRNA*^{Lys} à partir de cette souche permettrait de démontrer que cet élément se transfère de manière autonome.

CIME_ *Nem*_ *tRNA*^{Lys} a été marqué par intégration d'un gène de résistance au chloramphénicol au niveau du gène *gbs1985*, homologue de *SAL_2079*, codant la sous-unité ATPase d'un transporteur ABC.

Des tests de transfert conjugatif ont ensuite été réalisés en utilisant la souche 515 (porteuse d'ICE_515_ *tRNA*^{Lys}) comme cellule donatrice et la souche dérivée de Nem316 portant le CIME marqué par le gène de résistance au chloramphénicol en tant que cellule réceptrice. Comme précédemment, des transconjugants Nem316 (ICE_515_ *tRNA*^{Lys}) ont été obtenus.

Ces transconjugants résistants à l'érythromycine et au chloramphénicol ont ensuite été utilisés en tant que cellules donatrices afin de tester le re-transfert de l'ICE vers une souche Nem316 résistante à la rifampicine et à la streptomycine. Des transconjugants putatifs ont été obtenus. Des transconjugants résistants à la rifampicine, à la streptomycine (dérivant de la souche réceptrice) et à l'érythromycine (donc porteurs d'ICE_515_ *tRNA*^{Lys}) ont été obtenus. De plus, des PCR amplifiant le gène *SAL_2079* présentent le profil attendu (Figure 31). Deux fragments sont observés chez les transconjugants : celui de faible poids moléculaire

confirme qu'ils dérivent de la réceptrice, celui de haut poids moléculaire qu'ils portent l'ICE et/ou le CIME issu de la souche donatrice. L'amplification par PCR chez les transconjugants du gène *SAL_2029* confirme que ces derniers portent l'ICE car ce gène n'est pas présent sur le CIME de la souche Nem316.

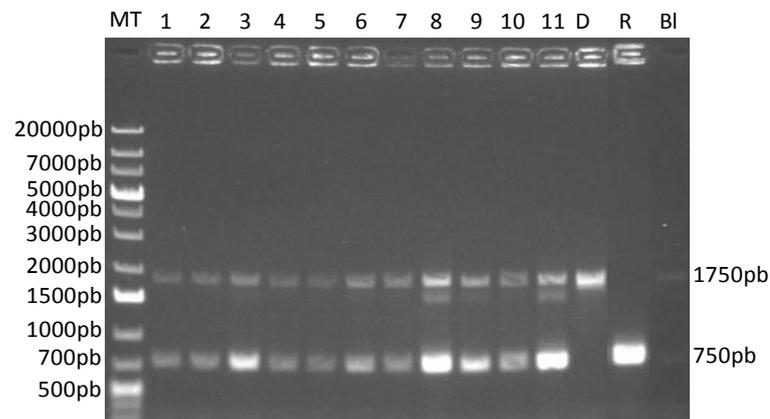


Figure 31 : Analyse par électrophorèse des transconjugants issus des expériences de re-transfert

Electrophorèse suite à une PCR amplifiant le gène *SAL_2079*. Le principe de la PCR est expliqué dans la figure 29. Les transconjugants portent les deux fragments attendus.

MT, marqueur de taille ; Chiffres de 1 à 11, transconjugant ; D, donatrice ; R, réceptrice ; Bl, blanc.

Ainsi, *ICE_515_tRNA^{Lys}* s'est re-transféré à partir d'une souche Nem316. La fréquence de conjugaison est alors de $2,2 \times 10^{-5} \pm 0,9 \times 10^{-5}$ transconjugants par cellule donatrice. La fréquence de transfert est beaucoup plus importante que celle obtenue lors des conjugaisons utilisant la souche 515 comme cellule donatrice.

Toutes ces expérimentations démontrent qu'*ICE_515_tRNA^{Lys}* est un ICE fonctionnel, c'est-à-dire capable de se transférer par conjugaison de manière autonome.

2.2.3.4 Test de caractérisation de certaines fonctions codées par l'ICE

Au cours de ces travaux, plusieurs tentatives de construction de mutants interrompus dans les gènes de l'intégrase, l'excisionase et de la relaxase d'*ICE_515_tRNA^{Lys}* ont échoué. La délétion de ces gènes aurait permis d'étudier leur

rôle dans la recombinaison ou la conjugaison de l'ICE. Le principe de la délétion était le même que celui du marquage des ICE. Les constructions permettant le remplacement des gènes par un gène de résistance à un antibiotique ont été construites et électroporées chez *S. agalactiae* 515. Toutefois, le second événement de recombinaison, permettant le remplacement du gène et la perte du plasmide, n'a jamais pu être isolé malgré l'analyse d'au moins 2500 clones pour chaque type de délétion.

L'interruption d'un gène est souvent plus simple à réaliser que le remplacement. Cette stratégie a également été tentée pour interrompre le gène de l'intégrase mais n'a également pas abouti à l'isolement d'une souche mutante. Lors de la construction de cet interruptant, une population mixte (contenant à la fois des cellules avec le gène interrompu et d'autres avec le gène sauvage) a été obtenue.

La mutation d'autres gènes d'ICE_515_tRNA^{Lys} (SAL_2078 et SAL_2059, pouvant être impliqués dans la réponse au stress oxydant et non le transfert conjugatif) n'a également pas abouti (Chuzeville, com. pers.).

2.2.4 Tests de transfert des autres ICE putatifs intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t^{Lys}

Quatre autres souches de *S. agalactiae* portent un ICE putatif. L'un d'entre elles est d'origine bovine et les 3 autres d'origine humaine. Comme ICE_515_tRNA^{Lys}, ces quatre ICE ont été marqués par un gène de résistance à l'érythromycine intégré dans un gène codant la sous-unité ATPase d'un transporteur ABC putatif (SAL_2079/SAG2026).

Les tests de transfert ont été réalisés en utilisant les souches possédant un ICE marqué comme cellule donatrice et la souche dérivant de Nem316 résistante à la rifampicine et à la streptomycine comme cellule réceptrice.

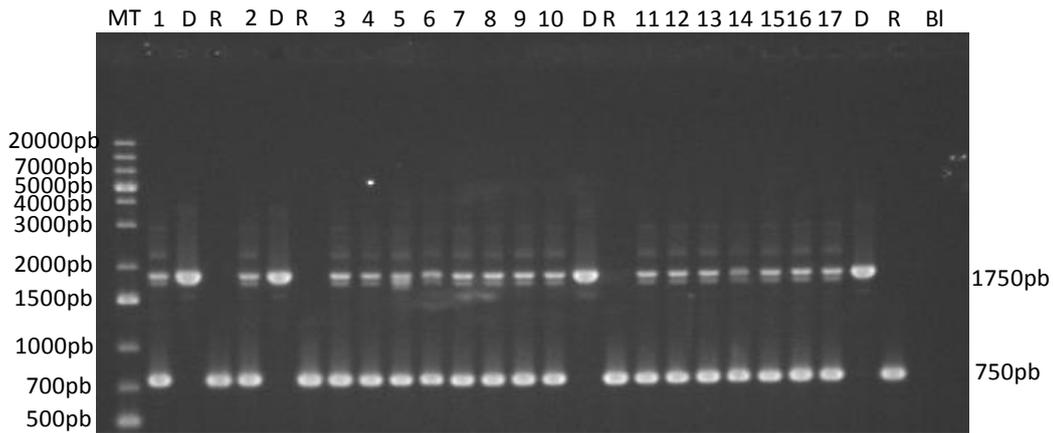
Aucun transconjugant n'a été obtenu lorsque les trois souches humaines COH1, 18RS21 et 2603V/R ont été utilisées comme cellule donatrice. Il est possible que ces trois ICE ne se transfèrent pas entre ces souches ou que la fréquence de transfert soit trop faible pour être détectée dans les conditions testées.

En revanche, des transconjugants putatifs ont été obtenus lors des tests de transfert d'ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} vers la souche Nem316. L'analyse des transconjugants a été réalisée suivant le même principe que précédemment (Figure 29). La PCR permettant d'amplifier le gène SAL_2079 aboutit bien à l'apparition de deux fragments pour les transconjugants (un gène provenant de l'élément résident de la réceptrice et l'autre provenant de l'ICE) (Figure 32A). Afin de s'assurer que les transconjugants dérivent de la cellule réceptrice, une PCR multiplex a été réalisée. Cette PCR met en jeu 5 couples d'oligonucléotides, amplifiant différents locus et permet de discriminer différentes souches de *S. agalactiae*. Les profils des transconjugants sont identiques à celui de la réceptrice Nem316 (Figure 32B).

Ainsi, ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} s'est transféré par conjugaison vers la souche Nem316. La fréquence de transfert de cet élément vers cette souche est de $4,3 \times 10^{-8}$ ($\pm 2,3 \times 10^{-8}$) transconjugant par cellule donatrice.

Des tests de transfert d'ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} ont ensuite été réalisés vers deux autres cellules réceptrices, A909 (portant IME_A909_tRNA^{Lys}) et COH1 (portant ICE_COH1_tRNA^{Lys}). Aucun transconjugant n'a pu être isolé lors de ces expérimentations.

A.



B.

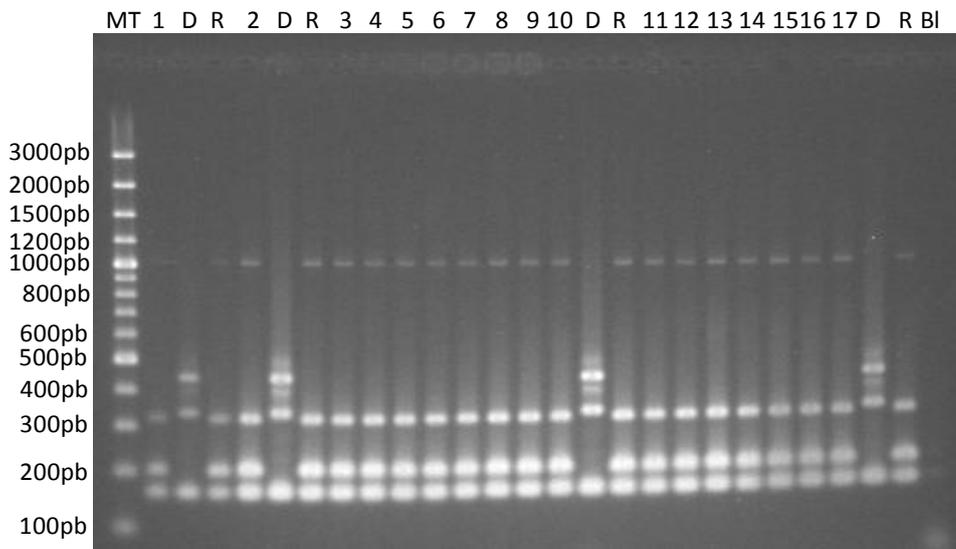


Figure 32 : Analyse par électrophorèse des transconjugants putatifs d'ICE_FSL S3-026_ *tRNA*^{Lys}

A. PCR permettant de vérifier que les transconjugants portent bien l'ICE marqué et le CIME résident de la cellule réceptrice. Le principe est indiqué figure 29.

B. PCR multiplexe permettant de vérifier que les transconjugants dérivent bien de la cellule réceptrice. MT, marqueur de taille ; chiffres de 1 à 17, transconjugants putatifs ; D, donatrice ; R, réceptrice, Bl, blanc.

2.3 Test de transfert conjugatif inter-espèces

Les ICE des souches 515 et FSL S3-026, respectivement d'origine humaine et bovine, se transfèrent par conjugaison vers d'autres souches de *S. agalactiae*. De plus, des ICE très proches ou de la même famille sont retrouvés chez de nombreuses espèces de streptocoques (*S. uberis*, *S. dysgalactiae* (Haenni et al. 2010; Chuzeville et al. 2012), *S. bovis*, *S. equisimilis* (Chuzeville et al. 2012), *S. thermophilus*, *S. mutans* (Burrus et al. 2002a; Brochet et al. 2008a), *S. pyogenes* (Brochet et al. 2008a; Sitkiewicz et al. 2011), *S. parasanguinis*, *S. pneumoniae*, *S. infantis*, *S. australis*, *S. gallolyticus*, *S. downei*

(Carraro et al. 2011)). Il était donc possible que ces deux éléments se transfèrent vers d'autres espèces bactériennes. Des tests de transfert conjugatif ont été réalisés en utilisant 6 autres espèces de streptocoques en tant que souches réceptrices : *S. salivarius* (CIP102503 et JIM8777), *S. thermophilus* (LMG18311), *S. pyogenes* (ATCC 12202), *S. uberis* (20388 et 21458), *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (14998 et 16192) et *S. mutans* (UA159). Une autre espèce de Firmicutes, *E. faecalis* (JH2-2), a également été testée en tant que cellule réceptrice.

Les sites de recombinaison chromosomiques *attB* potentiels de ces différentes espèces ont été analysés. Pour les espèces *S. thermophilus*, *S. uberis*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* et *S. salivarius* le site *attB* potentiel est identique à celui observé chez *S. agalactiae*. En revanche, les sites *attB* potentiels de *S. pyogenes*, *S. mutans* et d'*E. faecalis* divergent de 1 à 3 nucléotides par rapport à celui observé chez *S. agalactiae* (Tableau 7). De plus, au moins deux de ces souches présentent un élément intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys}^{CTT} (un IME chez *S. salivarius* JIM8777 et un élément composite CIME-IME chez *S. thermophilus* LMG18311) (Guédon, com. pers.)

Tableau 7: Comparaison des sites *attB* potentiels de différentes espèces de Firmicutes à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys}

Espèce	Divergence par rapport à <i>S. agalactiae</i>	Extrémité 3' du gène codant un ARN ^t _{Lys} (anticodon CTT)
<i>Streptococcus uberis</i> (1 souche)	0 divergence	ACATCCCCCTG
<i>Streptococcus salivarius</i> (7 souches)		
<i>Streptococcus thermophilus</i> (9 souches)		
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>dysgalactiae</i> (1 souche)		
<i>Streptococcus pyogenes</i> (24 souches)	1 divergence	ACATCCCC <u>CA</u> T
<i>Streptococcus mutans</i> (1 souche)	3 divergences	<u>AGTACGGGTCA</u>
<i>Enterococcus faecalis</i> (1 souche - * 2 copies)	3 divergences	<u>TGTACGGCTCA</u>

Le nombre de génomes disponibles et analysés des différentes espèces est indiqué entre parenthèses.

Des mutants spontanés résistants à la rifampicine et à la streptomycine ont tout d'abord été sélectionnés afin de pouvoir utiliser ces souches en tant que cellules réceptrices. Puis, pour chaque cas, au moins 3 expériences de conjugaison ont été réalisées. Des expériences témoins de transfert intra-spécifique ont toujours été réalisées en parallèle afin de vérifier que les conditions permettaient le transfert conjugatif.

Aucun transfert d'ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys}, vers ces espèces n'a été observé. L'ICE de la souche 515 se transfère, mais uniquement vers *S. pyogenes*. Toutefois, après 9 expériences de conjugaison réalisées, seulement 3 d'entre elles ont permis l'isolement de 20 transconjugants. Ainsi, le nombre de transconjugants est trop faible pour déterminer de manière fiable une fréquence de transfert.

Les transconjugants putatifs ont été analysés. Tout d'abord, une PCR, utilisant un oligonucléotide s'hybridant sur le gène de l'intégrase d'ICE_515_tRNA^{Lys} et un second s'hybridant dans le gène codant l'ARN^{tLys} CTT, a montré que les transconjugants putatifs portent bien l'ICE, intégré dans le locus considéré (Figure 33A). De plus, une expérience de PFGE a permis de démontrer que les transconjugants putatifs présentent le même profil que la souche réceptrice (Figure 33B). Les transconjugants sont donc bien des souches de *S. pyogenes* ATCC 12202 portant ICE_515_tRNA^{Lys} intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{tLys} CTT.

ICE_515_tRNA^{Lys} se transfère vers la souche ATCC 12202 de *S. pyogenes*. Dans les conditions testées, cet ICE ne se transfère pas vers d'autres espèces. ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} ne se transfère pas vers d'autres espèces dans les conditions testées.

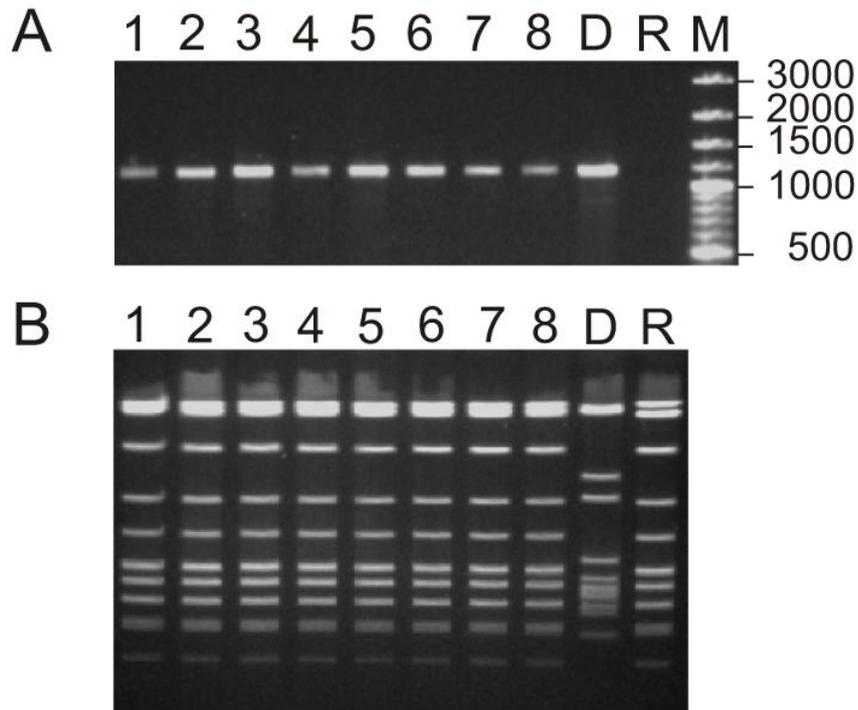


Figure 33 : Analyse de 8 transconjugants obtenus après des expériences de conjugaison entre les souches *S. agalactiae* 515 (portant ICE₅₁₅*tRNA*^{Lys}) et *S. pyogenes* ATCC 12202

A. Electrophorèse des produits de PCR permettant de vérifier que les transconjugants putatifs portent l'ICE, intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys}. Les oligonucléotides s'hybrident au niveau du gène codant l'intégrase d'ICE₅₁₅*tRNA*^{Lys} et du gène de l'ARNt^{Lys}. Une PCR sur l'ADN de *S. pyogenes* ATCC 12202 (souche réceptrice) a été utilisée comme témoin négatif (colonne R). Le contrôle positif a été réalisé sur l'ADN de la souche donatrice *S. agalactiae* 515 (colonne D).

B. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE) permettant l'analyse des transconjugants en parallèle des souches donatrice et de la souche réceptrice.

Chiffres de 1 à 8, transconjugants ; D, donatrice ; R, réceptrice ; M, marqueur de taille

3. Accrétion et mobilisation

3.1 Accrétion site-spécifique entre ICE 515 *tRNA*^{Lys} et des éléments apparentés

La souche Nem316 utilisée lors des expériences de conjugaison intra-espèce, possède un CIME intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys}. Cet élément porte, en plus des deux sites *att* qui le bordent, un site *attI* interne. De ce fait, l'intégration d'ICE₅₁₅*tRNA*^{Lys} dans le génome de cette souche pouvait avoir lieu

dans ces trois sites *att* aboutissant à la formation d'éléments composites présentant différentes structures (Figure 34). Chacune de ces intégrations correspondrait à un événement d'accrétion.

Des PCR ont été réalisées sur 100 transconjugants afin de déterminer le site d'intégration préférentiel d'*ICE_515_tRNA^{Lys}* dans le génome de la souche Nem316. Dans 96% des cas, *ICE_515_tRNA^{Lys}* s'est intégré au niveau du site *attR* de l'élément résident et dans 4% des cas au niveau du site *attL*, mais jamais dans le site interne (Figure 34).

S. agalactiae possède deux autres gènes codant un ARNt^{Lys}. Des PCR ont été réalisées afin de définir si *ICE_515_tRNA^{Lys}* s'intégrait aussi dans ces sites. Un premier couple d'oligonucléotides borde le site potentiel d'intégration. Dans le second couple, un oligonucléotide s'hybride au niveau de l'ICE et le second au niveau de l'ARNt^{Lys}. Les résultats obtenus montrent que l'ICE ne s'intègre pas dans les autres gènes codant un ARNt^{Lys}. L'intégration est spécifique au gène codant un ARNt^{Lys} anticodon CTT.

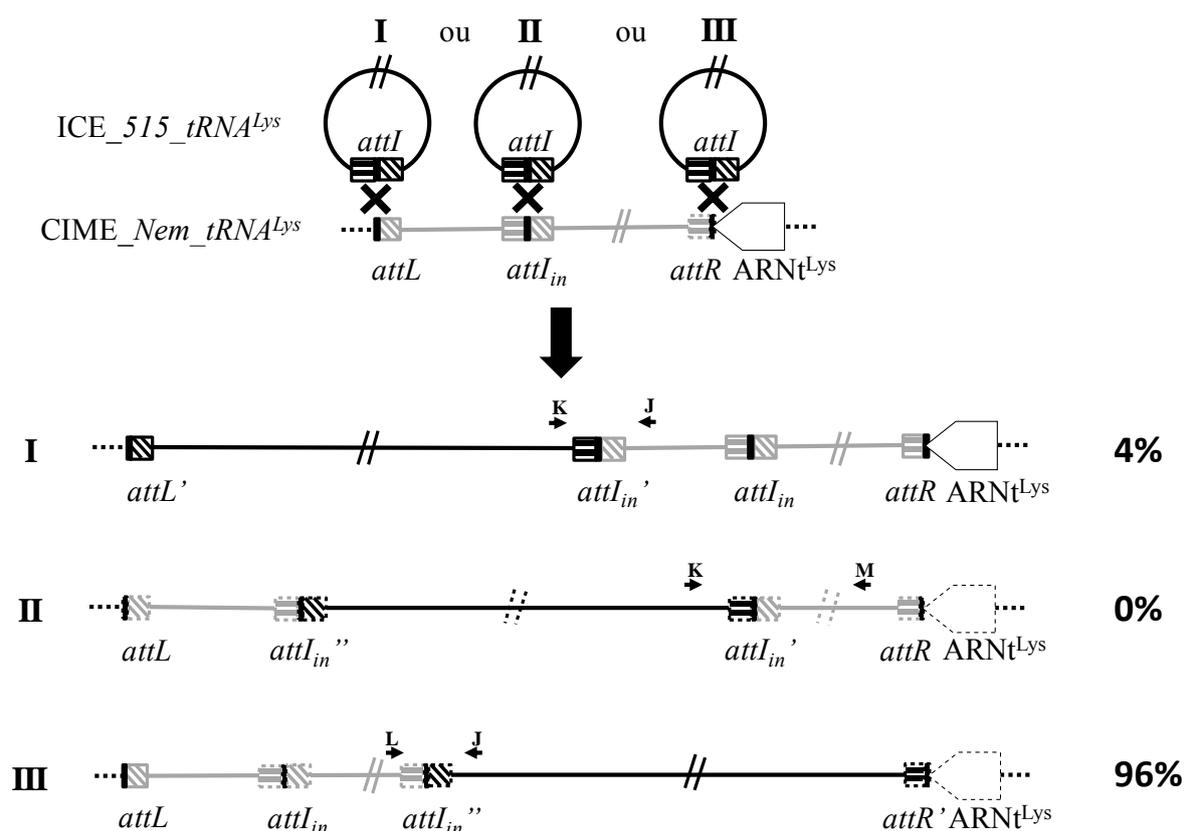


Figure 34 : Représentation schématique de l'intégration site-spécifique d'ICE_515_tRNA^{Lys} dans le génome de la souche Nem316.

CIME_Nem_tRNA^{Lys} possède trois sites *att* : les sites *attR* et *attL* le bordant ainsi qu'un site *attI* interne. L'intégration d'ICE_515_tRNA^{Lys} par recombinaison site-spécifique pouvait a priori avoir lieu dans ces trois sites *att* et aboutir aux trois configurations présentées dans la figure. Les oligonucléotides utilisés afin de déterminer le site d'intégration sont indiqués par des flèches. ICE_515_tRNA^{Lys} est représenté en noir et CIME_Nem_tRNA^{Lys} en gris.

Le transfert d'ICE_515_tRNA^{Lys} a également été obtenu vers la souche COH1. Cette dernière porte un ICE, dont les modules de recombinaison et de transfert sont très proches de ceux d'ICE_515_tRNA^{Lys}. L'intégration d'ICE_515_tRNA^{Lys} dans le génome de cette souche pouvait à priori avoir lieu dans les sites *attR* ou *attL* d'ICE_COH1_tRNA^{Lys}. L'analyse, par PCR, de 12 transconjugants révèle une intégration dans 100% des cas au niveau du site *attR* de l'élément résident (Figure 35). Cette intégration aboutit à la formation d'un tandem ICE-ICE.

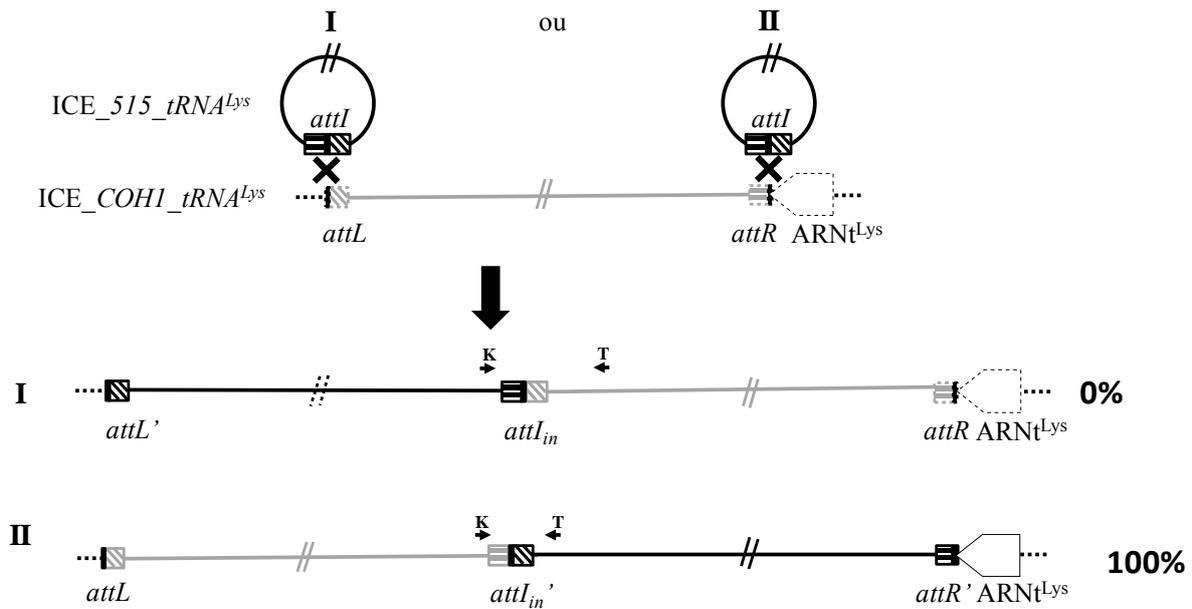


Figure 35 : Représentation schématique de l'intégration site-spécifique d'ICE_515_tRNA^{Lys} dans le génome de la souche COH1.

L'intégration d'ICE_515_tRNA^{Lys} par recombinaison site-spécifique peut avoir lieu dans les deux sites *att* bordant ICE_COH1_tRNA^{Lys} et aboutir aux deux configurations présentées dans la figure. Les oligonucléotides utilisés afin de déterminer le site d'intégration sont indiqués par des flèches. ICE_515_tRNA^{Lys} est représenté en noir et ICE_COH1_tRNA^{Lys} en gris.

ICE_515_tRNA^{Lys} s'intègre en tandem avec un ICE ou un CIME conduisant à leur accrétion. De plus, lorsque la cellule réceptrice porte déjà un élément, il semblerait qu'ICE_515_tRNA^{Lys} s'intègre préférentiellement au niveau de son site *attR*.

3.2 Mobilisation en *cis* de CIME *Nem* tRNA^{Lys} par ICE 515 tRNA^{Lys}

Des expériences de conjugaison avec une souche portant ICE_515_tRNA^{Lys} marqué par un gène de résistance à l'érythromycine ont été réalisées en utilisant la souche Nem316, portant le CIME marqué par le gène de résistance au chloramphénicol, comme cellule réceptrice. Des transconjugants portant le tandem CIME_{cat}-ICE_{ery} et donc la double résistance ont été obtenus (voir partie 2.2.3.3). Dans cette configuration, il était possible qu'ICE_515_tRNA^{Lys} provoque le transfert de CIME_{Nem}_tRNA^{Lys} par mobilisation en *cis*.

Des PCR ont permis de mettre en évidence les sites *attB* et *attI* issus de l'excision du tandem lors de l'analyse de 10 souches portant le tandem (Figure 36).

Ainsi, *ICE_515_tRNA^{Lys}* permet la mobilisation intracellulaire en *cis* de *CIME_Nem_tRNA^{Lys}*.

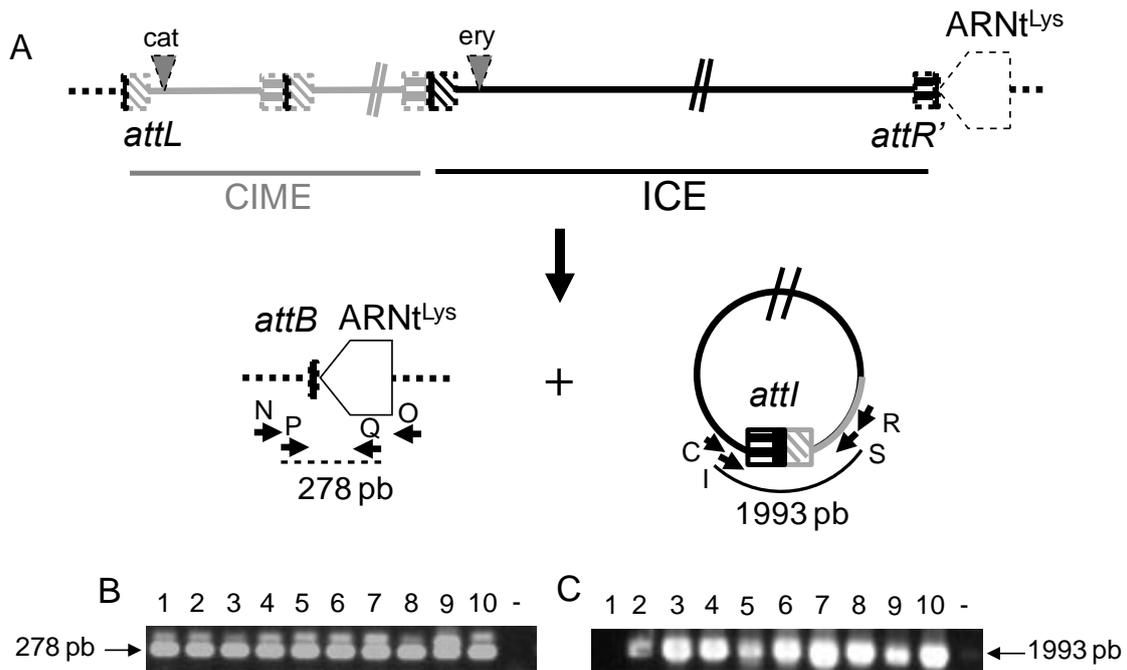


Figure 36 : Analyse de la mobilité intra-cellulaire du tandem CIME_{cat}-ICE_{ery} issu du transfert d'*ICE_515_tRNA^{Lys}* vers la souche Nem316

A. Représentation schématique de l'excision site-spécifique du tandem. Les oligonucléotides permettant la détection des sites de recombinaison sont indiqués par des lettres.

B. Electrophorèse des produits d'amplification du site *attB* sur 10 transconjugants de *S. agalactiae* Nem316.

C. Electrophorèse des produits d'amplification du site *attI* sur les mêmes clones.

Chiffre de 1 à 10, 10 transconjugants testés ; -, témoins négatifs

ICE_515_tRNA^{Lys} est représenté en noir et *CIME_Nem_tRNA^{Lys}* en gris.

Le transfert de l'élément composite par conjugaison a ensuite été analysé. La souche dérivant de Nem316 et porteuse du tandem CIME_{cat}-ICE_{ery} a été utilisée en tant que cellule donatrice. Une souche dérivant de Nem316 résistante à la rifampicine et à la streptomycine a été utilisée en tant que cellule réceptrice. Les transconjugants putatifs ont été sélectionnés sur des milieux supplémentés avec 3 antibiotiques (rifampicine, streptomycine et érythromycine ou chloramphénicol) afin de sélectionner des souches ayant acquis au moins l'ICE ou le CIME seul. Des milieux contenant 4 antibiotiques n'ont pas permis pas l'isolement de clones (voir partie 2.2.3.3).

Neuf cents transconjugants putatifs résistants à l'érythromycine ont été répliqués sur un milieu sélectif contenant du chloramphénicol. Un seul d'entre eux a pu croître sur ce milieu. Un seul clone semble donc porter le tandem CIME-ICE (M1). Pour tous les autres, seul l'ICE s'est transféré par conjugaison. Un seul transconjugant putatif (M2) a été isolé sur un milieu contenant de la rifampicine, de la streptomycine et du chloramphénicol. L'analyse de ce transconjugant putatif démontre que le CIME et l'ICE sont présents en tandem dans la cellule réceptrice. Ces deux clones M1 et M2 sont résistants à la rifampicine et à la streptomycine et dérivent donc bien de la cellule réceptrice.

Ces deux transconjugants M1 et M2 putatifs ont été analysés par PFGE (Figure 37) pour vérifier le co-transfert des deux éléments. Les cellules réceptrices dérivant de Nem 316 utilisées lors de cette expérience de conjugaison présentent un fragment de 105 kb caractéristique de la présence du CIME (Figure 37, pistes R). Les cellules donatrices, dérivant de la souche Nem316 mais porteuses du tandem CIME_{cat}-ICE_{ery}, présentent un fragment différent, de plus haut poids moléculaire (148 kb = 105+43) caractéristique de la présence de ce tandem (Figure 37, pistes D). Chez le transconjugant putatif M2, ces deux fragments disparaissent, tandis qu'un fragment de 165 kb apparaît. Celui-ci correspond à la présence dans ce clone d'un tandem CIME-CIME_{cat}-ICE_{ery} (165 kb = 105+43+17, Figure 37, piste M2). Dans ce cas, ICE₅₁₅_tRNA^{Lys} a permis la mobilisation de CIME_Nem_tRNA^{Lys}.

Chez le transconjugant M1, on observe bien la disparition des fragments caractéristiques de la cellule donatrice et réceptrice. Un nouveau fragment de 225 kb apparaît (la bande de 223 kb est doublée). Il correspond à la présence du CIME résident et de deux tandems CIME_{cat}-ICE_{ery} (225 kb = 105+2x(43+17), Figure 37, piste M1). ICE₅₁₅_tRNA^{Lys} a mobilisé CIME_Nem_tRNA^{Lys}.

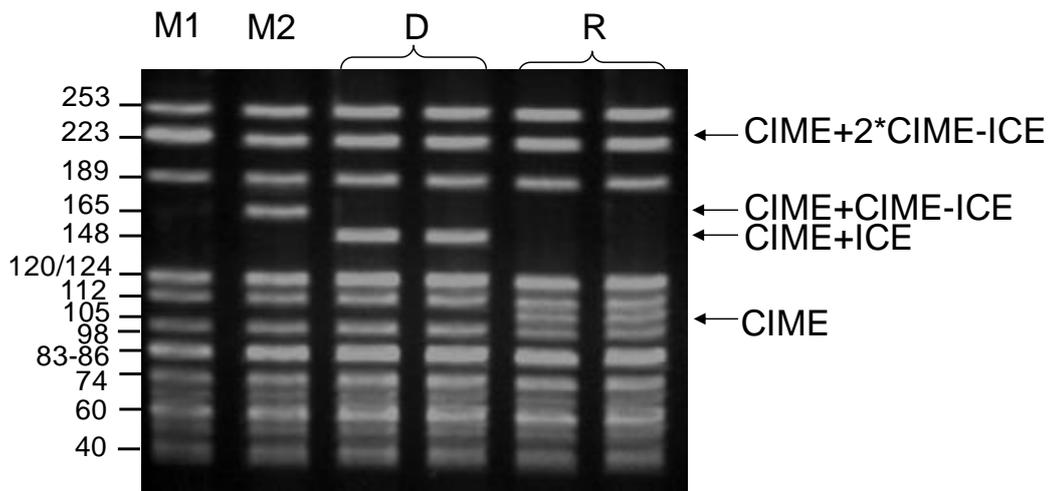
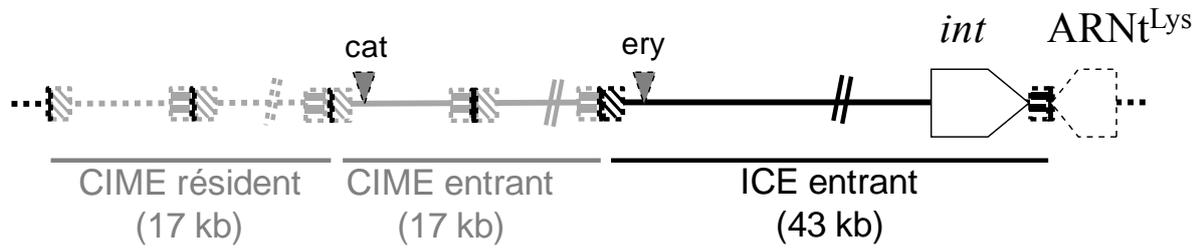


Figure 37 : Analyse par électrophorèse en champ pulsé de 2 transconjugants obtenus après la mobilisation en *cis* de CIME_{cat} par ICE_{ery}

M1 et M2, transconjugants obtenus après la mobilisation en *cis* de CIME_{cat} par ICE_{ery}

D, souche dérivant de Nem316 portant le tandem CIME_{cat}-ICE_{ery} et utilisée comme souche donatrice lors des expériences de mobilisation

R, souche dérivant de Nem316 et utilisée comme souche réceptrice lors des expériences de mobilisation

CIME_{Nem}_tRNA^{Lys} a été transféré grâce à une mobilisation conjugative en *cis* par ICE₅₁₅_tRNA^{Lys}.

DISCUSSION

1. Ubiquité et diversité des éléments intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant l'ARNt^{Lys} CTT chez *S. agalactiae*

1.1 Prévalence des éléments

S. agalactiae est une bactérie commensale ou pathogène opportuniste colonisant de nombreux hôtes animaux tels que l'homme, les bovins, les poissons, le chien, la grenouille, le phoque ou le dauphin.

Les analyses précédentes avaient montré que les génomes séquencés de huit souches d'origine humaine de *S. agalactiae* portent tous un îlot génomique intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys}, différent pour chaque souche et correspondant, soit à un élément unique, soit à une accréction de plusieurs éléments (Brochet et al. 2008a). De même, des analyses chez des souches d'origine bovine de *S. agalactiae* avaient révélé chez la moitié des 76 souches testées un élément intégré dans ce locus (Haenni et al. 2010). Ainsi, ces premières analyses levaient le voile sur la plasticité et la diversité des îlots génomiques chez cette bactérie et suggéraient que l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys} CTT est un point chaud d'intégration. Les analyses *in silico* effectuées au cours de ces travaux confirment l'omniprésence et la grande diversité des éléments intégrés dans ce site chez *S. agalactiae*. En effet, 98% des 254 souches analysées portent un élément intégré dans le locus considéré quelle que soit l'origine de la souche.

1.2 Nature des éléments

Trois familles d'éléments sont intégrées dans l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys} CTT chez *S. agalactiae* : les éléments apparentés à ICE_515_tRNA^{Lys}, ceux apparentés à l'IME de la souche 2603V/R (IME_2603_tRNA^{Lys}) et ceux apparentés à l'IME de la souche 18RS21 (IME_18RS21_oriT). Ces deux IME font chacun partie d'un élément composite constitué d'un ICE apparenté à ICE_515_tRNA^{Lys} et d'un IME. Les analyses *in silico* de 246 nouveaux génomes de *S. agalactiae* ont permis de mettre en évidence des ICE putatifs, des IME putatifs, des éléments dérivés d'ICE dont des CIME putatifs ainsi que des éléments composites apparentés à ces trois familles.

De plus, certains de ces éléments portent des séquences d'insertion. Ces IS, de nature variée, pourraient elles aussi avoir un rôle sur la diversité et la plasticité des éléments observés au locus considéré.

1.2.1 Une famille d'ICE très répandue

Au moins un ICE supplémentaire, apparenté à ICE_515_tRNA^{Lys}, a été caractérisé chez une souche d'origine bovine (FSL S3-026). De plus, 84 souches supplémentaires portent les 4 gènes de mobilité testés codant l'intégrase, la relaxase, la protéine de couplage (VirD4) et la protéine de conjugaison OrfD (VirB4) d'ICE_515_tRNA^{Lys}. Toutes ces souches portent au moins un site *attR* et un site *attL* apparentés à ceux trouvés sur les éléments déjà caractérisés. Ces données suggèrent que ces souches portent des ICE apparentés et intégrés dans le même site. Ces 84 souches ont été isolées majoritairement d'humains (69%), plus rarement de bovins (26%) et dans seulement 4 cas de phoque gris (2) ou de chien (2).

De plus, des éléments étroitement apparentés à ICE_515_tRNA^{Lys} sont présents chez d'autres streptocoques tels que *S. uberis*, *S. dysgalactiae*, *S. bovis* et *S. equisimilis* (Haenni et al. 2010; Chuzeville et al. 2012). Ces éléments codent une intégrase de type SAL_2029, comme les 5 ICE intégrés dans le locus considéré précédemment décrits, et portent un site *attR* présentant entre 78 et 86% d'identité avec celui d'ICE_515_tRNA^{Lys}. De même, *S. urinalis* 2285-97 porte un ICE quasiment identique à ICE_515_tRNA^{Lys} (Payot, com. pers.). De plus, le module de conjugaison d'ICE_515_tRNA^{Lys} est apparenté à celui d'ICE_6180_RD.2 de *S. pyogenes* et dans une moindre mesure à celui d'ICESt1 et d'ICESt3 de *S. thermophilus* (respectivement 47 à 96% et 28 à 59% d'identité protéique) (Burrus et al. 2002a; Pavlovic et al. 2004; Brochet et al. 2008a). Cette famille d'ICE serait donc répandue et jouerait un rôle important dans le transfert de gènes non seulement chez *S. agalactiae* mais également chez d'autres streptocoques.

1.2.2 Une famille d'IME très répandue

Les IME sont des éléments intégratifs mobilisables en *trans*. Très peu d'IME ont été caractérisés, principalement chez *Bacteroides* et *Salmonella enterica* (Salyers et al. 1995a; Mulvey et al. 2006). Une analyse systématique des génomes procaryotiques a cependant révélé que de très nombreuses relaxases sont codées par des gènes

chromosomiques non associés à des modules de conjugaison, suggérant que les IME sont très répandus (Guglielmini et al. 2011). De plus, l'unique recherche d'IME dans des génomes a révélé 6 IME différents chez 8 génomes séquencés de *S. agalactiae*, dont 1 intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t^{Lys} (Brochet et al. 2008a).

Un IME est intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t^{Lys} de la souche A909 (Brochet et al. 2008a). De plus, l'îlot génomique intégré dans ce site chez la souche 2603V/R est un élément composite constitué d'un ICE et d'un IME portant tous deux un gène codant une relaxase et une intégrase. Les relaxases et intégrases de l'IME et de l'ICE de 2603V/R ne sont apparentées que de façon lointaine (22% d'identité protéique entre les deux relaxases et 41% entre les intégrases). Les deux relaxases portent un domaine de la même famille (PF02486) et les deux recombinaisons sont des intégrases à tyrosine. L'intégrase et la relaxase de cet IME sont quasiment identiques (99% d'identité protéique) à celles codées par *IME_A909_tRNA^{Lys}*.

Trois IME quasiment identiques à *IME_A909_tRNA^{Lys}* ont été caractérisés parmi les 12 souches analysées en détail. De plus, l'analyse systématique des 234 autres génomes de *S. agalactiae* a mis en évidence 59 souches portant un IME apparenté à *IME_2603_tRNA^{Lys}* dont 15 sont associés à un ICE putatif. Contrairement aux ICE qui sont majoritairement présents chez des souches humaines, les IME ont été retrouvés quelle que soit l'origine de la souche y compris dans 52% des souches isolées de poisson. L'analyse de 246 nouveaux génomes de *S. agalactiae* corrobore donc la fréquence de cette famille d'IME.

1.2.3 Une famille d'IME présentant une spécificité d'intégration originale : l'origine de transfert de différents ICE ?

ICE_18RS21_tRNA^{Lys} est un élément composite constitué d'un ICE et d'un IME. La comparaison de cet ICE avec les ICE apparentés indiquait que cet élément est intégré dans l'origine de transfert de l'ICE, d'où le nom donné à cet IME : *IME_18RS21_oriT*.

Trois autres IME apparentés à *IME_18RS21_oriT* ont été caractérisés au sein des 246 génomes de *S. agalactiae* étudiés. De plus, une analyse par BlastP en utilisant la séquence de l'intégrase et de la relaxase de cet élément a révélé des IME étroitement apparentés chez une autre souche de *S. agalactiae* (souche UCN70, 98% d'identité protéique) et chez 3 souches de *S. mutans* (souches C150, 3SN1 et 11VS1, 98% d'identité protéique également). De plus, les sites de recombinaison

d'IME_18RS21_oriT et des IME apparentés des autres souches sont très conservés (Figure 38). Tous ces éléments appartiennent donc à une nouvelle famille d'IME.

Pour la souche UCN70, les gènes codant l'intégrase et la relaxase appartiennent à un élément d'environ 5,2 kb porteur du gène *lsa(C)*, responsable de la résistance de la souche aux lincosamides et aux streptogramines A (Malbruny et al. 2011), élément qui constitue un IME putatif. Par manque d'information, il est impossible de définir les sites d'intégration des IME putatifs des souches UCN70, C150 et 3SN1. L'élément porté par la souche 11VS1 n'est quant à lui pas intégré dans une origine de transfert. Cet élément est bordé par un gène codant une protéine de fonction inconnue portant un domaine histone acétyltransférase et par un gène codant une bêta-lactamase. En revanche, dans les 3 autres cas, comme IME_18RS21_oriT, ces IME sont intégrés dans l'origine de transfert d'un ICE putatif, entre les gènes codant la protéine de couplage et la relaxase. Dans deux des cas, cet ICE est étroitement apparenté à ICE_515_tRNA^{Lys} et dans l'autre à Tn916. L'intégration de l'élément dans l'origine de transfert modifie la séquence de l'oriT (Figure 26, oriT de la souche 18RS21). La conservation des séquences et de la structure de l'origine de transfert sont importantes pour sa fonctionnalité. La seule intégration possible publiée d'un élément conjugatif dans une origine de transfert est un événement d'intégration de l'ICE BTF-37 de *Bacteroides fragilis* LV23 dans un fragment de 3,5 kb contenant l'origine de transfert d'un plasmide mobilisable. Toutefois, le site précis d'intégration d'ICE BTF-37 n'a pas été déterminé dans ce cas (Vedantam and Hecht 2002).

La présence de ce type d'IME dans l'oriT d'ICE dans 4 cas sur 5 analysables suggère qu'ils pourraient cibler ce type de séquence. Cependant, la répétition directe de ces sites est petite (7 à 8 pb selon les souches) et présentent un motif commun à tous les éléments encore plus court (T)TCTAA Ce motif est présent dans l'oriT des ICE de famille ICESt3 (par exemple les ICE de *S. agalactiae*, ICESt3 et ICE_6180_RD.2, Figure 26) et ne présente qu'une seule différence avec la séquence correspondante de l'oriT des ICE de type Tn916. Cependant, ce motif est également assez fréquent chez les bactéries possédant un faible pourcentage en G+C, dont les streptocoques. Ces données suggèrent donc que l'intégration de ces éléments pourrait être de spécificité limitée, ce qui expliquerait une intégration dans l'oriT d'ICE de 2 familles différentes d'ICE et dans un site sans rapport apparent avec les ICE.

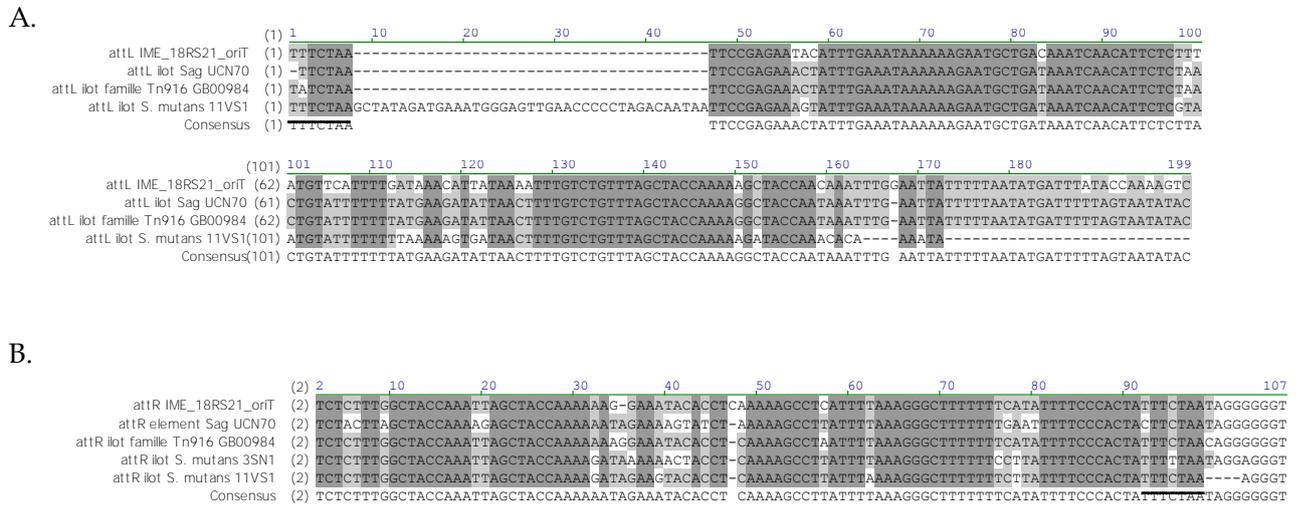


Figure 38 : Aligment des sites de recombinaison des IME de type *IME_18RS21_oriT* : (A) *attL* et (B) *attR*.

Dans les deux cas, les sites de recombinaison sont conservés entre les différents éléments.

Les alignements ont été réalisés avec le logiciel Vector NTI.

La répétition directe est soulignée. Elle se situe au voisinage du site *nic* probable de coupure de l'origine de transfert (Figure 26).

1.2.4 Vestiges d'éléments : témoins de la richesse des remaniements génétiques liés aux éléments génétiques mobiles

Au cours de cette étude, 9 éléments, porteurs du gène de l'intégrase et de sites de recombinaison *attL* et *attR* et qui pourraient dériver d'un ICE, ont été identifiés. Selon la définition originelle (Pavlovic et al. 2004), les IME sont définis comme des éléments s'intégrant et s'excisant de façon autonome et sont par conséquent porteurs d'un module de recombinaison complet (incluant donc deux sites *att* et un gène d'intégrase), mais ne codant qu'une partie seulement des protéines impliquées dans la conjugaison dont une relaxase. Toutefois, certains IME identifiés plus récemment ne codent pas de relaxase. Ainsi, MTn*Sag1* ne code qu'une transposase à DDE et une résistance aux lincosamides. Il contient une origine de transfert non apparentée à celle de Tn916 qui pourtant le mobilise en *trans* (Achard and Leclercq 2007). De même, les ICE de la famille SXT mobilisent en *trans* des îlots qui possèdent leur propre *oriT* mais requièrent la relaxase de l'ICE (Daccord et al. 2010). Les 9 éléments isolés lors de cette étude pourraient être mobilisables *en trans* et seraient donc des IME s'ils contiennent une origine de transfert fonctionnelle. De nombreux éléments portant un module de recombinaison complet mais ne codant aucune protéine de conjugaison ont été caractérisés au sein des génomes bactériens et généralement

annotés en tant qu'îlots génomiques (Hacker and Kaper 2000; Bourhy et al. 2007; Murphy and Boyd 2008). Ces éléments pourraient correspondre à des IME.

Les CIME dérivent d'ICE ou d'IME par perte des modules de recombinaison, régulation et conjugaison mais restent flanqués de sites *att*. Un ICE ou un IME apparenté pourra s'intégrer en tandem avec le CIME et le mobiliser en *cis*. Ces éléments, de par leur nature, sont difficiles à détecter au sein des génomes bactériens et sont généralement annotés en tant qu'îlots génomiques et non pas comme des CIME. Les seuls éléments putatifs décrits comme CIME sont intégrés dans l'extrémité 3' du gène *fda* de *S. thermophilus* (Bellanger et al. 2011) et dans l'extrémité 3' du gène *rpmG* ou du gène codant un ARN^t^{Thr} ou un ARN^t^{Lys} de *S. agalactiae* (Brochet et al. 2008a). Au cours de ces travaux, au moins 11 CIME intégrés aux locus considérés avaient été caractérisés. De plus, 58 souches portant un ou des gènes non impliqués dans la mobilité ainsi que des sites *attL* et *attR* posséderaient des CIME intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t^{Lys} ^{CTT}. Les premières analyses réalisées sur le génome de la souche STIR-CD-17 concluaient sur une absence d'élément génétique mobile (Delannoy et al. 2012). Au contraire, les analyses réalisées au cours de ce travail révèlent que cette souche porte un CIME putatif intégré dans le locus considéré. De plus, 8 souches ne portent aucun des gènes testés, parmi elles 4 souches possèdent un CIME minuscule constitué uniquement, de droite à gauche, de la fin du gène d'ARN^t^{Lys}, de pb du site de recombinaison *attR* d'ICE_515_ *tRNA*^{Lys} (100% d'identité) et d'une répétition de la fin du gène d'ARN^t^{Lys}. Ces données démontrent, une nouvelle fois, que les CIME sont difficilement détectables. Il est donc fort probable que ces éléments soient beaucoup plus répandus que décrits.

Sur les 5 CIME caractérisés plus en détail lors de ce travail, celui porté par la souche SS1014 correspond, comme CIME_H36B_ *tRNA*^{Lys}, à la partie gauche de l'élément composite d'IME_A909_ *tRNA*^{Lys} (situé entre les sites *attL* et *attI'*, cf Figure 24). Les 4 autres correspondent en partie à la partie gauche de l'élément composite CIME_Nem_ *tRNA*^{Lys} (entre les sites *attL* et *attI*, Figure 24). De même, 27 souches portent un CIME tronqué car ne présentant pas de site *attL*. L'élément dérivé d'un ICE porté par la souche ATCC 13813 a quant à lui perdu au moins deux gènes du module de conjugaison ainsi que le site *attL*. D'autres souches semblent également dériver d'un ICE par délétion de certains gènes (Tableau 6). Ces données suggèrent,

comme attendu, que les éléments intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} évoluent par acquisition et délétion de séquence.

2. Mobilité des éléments

2.1 Excision des éléments

Les analyses réalisées au cours de ces travaux ont permis de mettre en évidence la présence de forme circulaire pour quatre des cinq ICE caractérisés au locus considéré. Les ICE portés par les souches d'origine humaine 515, 18RS21 et 2603V/R ainsi que celui porté par la souche bovine FSL S3-026 s'excisent du chromosome.

ICE_{2603_tRNA^{Lys}} est un élément composite constitué d'un ICE et d'un IME séparés par un site *attI* interne, chaque élément codant une intégrase putative. Théoriquement, les trois formes d'excision pourraient exister. Toutefois seulement deux formes circulaires ont été détectées au cours de ces travaux, l'une correspondant à l'IME seul et l'autre à l'ensemble ICE+IME. L'ICE seul (extrémité gauche de l'élément) ne s'excise pas.

Différentes hypothèses pourraient permettre d'expliquer ce phénomène. Les intégrases à tyrosine reconnaissent et se fixent sur des séquences spécifiques (sites *att*). Chaque site *att* est complexe et porte en plus des séquences de recombinaisons des séquences permettant la fixation de l'intégrase et d'autres protéines qui vont faciliter l'excision, tels que l'excisionase ou des facteurs d'hôte (Groth and Calos 2004). De ce fait, les sites *attL*, *attR* et *attI* d'un même élément ont généralement des propriétés différentes. Ainsi, chez Tn916, l'excisionase se fixe préférentiellement à l'extrémité gauche de l'élément afin de faciliter son excision (Mullany et al. 2002).

Par ailleurs, les différents sites *att* portés par l'ICE et l'IME, qui codent des intégrases éloignées ou non apparentées, sont très différents (pourcentage d'identité nucléotidique de 51% entre les sites *attL* et de 52% entre les sites *attR*) et il est donc probable que les sites *attR* et *attI* de l'élément composite se lient de façon différente aux deux intégrases, aux deux excisionases et/ou aux cofacteurs de l'hôte. Enfin, l'intégrase pourrait avoir besoin des séquences se trouvant au niveau de l'extrémité du gène de l'ARN^t_{Lys} pour catalyser l'excision. Ces séquences ne seraient pas

présentes au niveau du site *attI* interne, ce qui empêcherait l'utilisation de ce site en tant qu'*attR*.

Si l'excision de l'élément composite est réalisée par l'intégrase et l'excisionase de l'IME, ces dernières doivent reconnaître non seulement le site *attR*, ce qui est attendu mais aussi le site *attL* de l'ICE. De même, si l'événement d'excision est réalisé par l'intégrase de l'ICE, elle devra se fixer sur le site *attR* de l'IME, différent de son site cible *attR* habituel.

Toutes ces données suggèrent qu'IME_2603_*tRNA^{Lys}* est fonctionnel et qu'il pourrait être mobilisé en *cis* ou en *trans* par un ICE, nécessitant la présence d'un élément synthétisant les composants du pore de conjugaison et permettant son transfert. Il s'agit donc d'un nouvel exemple d'IME.

L'existence de formes circulaires multiples a déjà été observée pour d'autres éléments composites issus d'accrétion. ICE*St1* est un élément constitué d'un ICE (ICE*St2*) et d'un CIME (CIME368). Une excision de ICE*St2* seul ou de l'ICE composite ICE*St1* ont été observées, aboutissant à deux formes circulaires différentes (Pavlovic et al. 2004). De même, ICE*St3* s'intègre en tandem avec différents CIME (CIME_{L3catR3} ou CIME19258*cat* ou CIME9, Bellanger com. pers.). Dans ces trois cas, l'ICE seul, le CIME seul ou l'élément composite peuvent s'exciser. ICE GI3 de *Bordella petrii* est intégré en tandem avec deux autres îlots génomiques et cinq formes circulaires différentes ont été observées (Lechner et al. 2009). Ainsi, après un événement d'accrétion, l'apparition de formes circulaires multiples, dues à l'excision de la totalité de l'élément composite ou d'un seul de ses membres, semble courante.

Aucune forme circulaire n'a pu être détectée pour ICE_COH1_*tRNA^{Lys}* dans les conditions testées. Toutefois, un site chromosomique vide a pu être amplifié. Il est donc possible que cet élément s'excise mais que la forme circulaire n'ait pas été isolée. Cette dernière pourrait avoir été perdue lors de l'extraction. Elle pourrait en effet être présente en plus faible quantité ou être dégradée lors des manipulations. ICE_COH1_*tRNA^{Lys}* portant deux gènes supplémentaires à l'extrémité gauche de l'élément, le fragment à amplifier pour la détection de la forme circulaire est donc plus grand que pour les autres éléments. La taille du fragment pourrait donc avoir diminué l'efficacité de l'amplification. Par ailleurs, une analyse de la séquence située à gauche d' « *attL* » d'ICE_COH1_*tRNA^{Lys}* montre que celle-ci est quasiment identique à celle du bras du site *attR* de CIME_*Nem_tRNA^{Lys}* (qui présente 50 %

d'identité avec le site *attR* d'ICE_515_ *tRNA^{Lys}*) et est en fait un site *attI*. Comme précédemment avec le site *attI* d'ICE_2603_ *tRNA^{Lys}*, la présence d'un site *attI* pourrait limiter la fixation de l'intégrase, de l'excisionase ou des facteurs d'hôte et ainsi réduire les événements d'excision.

Enfin, les différents éléments portent plusieurs gènes codant des régulateurs putatifs, présentant un domaine hélice tour hélice caractéristique des répresseurs des prophages et de divers ICE. L'ICE porté par la souche 515 code cinq régulateurs putatifs, ceux des souches COH1 et FSL S3-026 quatre, 2603V/R trois et 18RS21 deux. L'un d'entre eux présente un décalage du cadre de lecture chez ICE_FSL_ *tRNA^{Lys}*. La présence de ces différentes combinaisons, jamais décrite chez d'autres éléments, pourrait aussi expliquer les différences d'excision observées avec les différentes souches.

2.2 Transfert conjugatif intra-spécifique des ICE putatifs

2.2.1. ICE_515_ *tRNA^{Lys}* et ICE_FSL S3-026_ *tRNA^{Lys}* : deux ICE fonctionnels chez *S. agalactiae*

Lors de ces travaux, la fonctionnalité d'ICE_515_ *tRNA^{Lys}* a été démontrée. En effet, cet élément issu d'une souche de *S. agalactiae* d'origine humaine se transfère de manière autonome et par conjugaison vers d'autres souches de la même espèce. De même, l'ICE porté par la souche FSL S3-026, isolé d'une souche bovine, semble se transférer par conjugaison au moins vers une autre souche de *S. agalactiae*.

Aucun transconjugant n'a été observé lors des conjugaisons impliquant ICE_18RS12_ *tRNA^{Lys}*, ICE_COH1_ *tRNA^{Lys}* et ICE_2603_ *tRNA^{Lys}*. Chez ces trois éléments, le gène *orfD* est tronqué (18RS21 et COH1) ou interrompu par une IS (2603V/R). Le gène *orfD* code une ATPase putative appartenant à la super-famille FtsK et portant des domaines caractéristiques Walker A et Walker B (respectivement impliqués dans la fixation des acides nucléiques et contenant un résidu aspartate responsable de l'hydrolyse de l'ATP). La protéine codée par le gène *orfD* est homologue des protéines VirB4 codées par l'élément pTi d'*Agrobacterium tumefaciens*, ConE (Ydde) d'ICEBs1 ou Orf16 de Tn916 qui sont toutes des ATPases. Chez les bactéries à coloration de Gram négative, les composants ATPasiques fournissent

l'énergie nécessaire permettant la translocation de l'ADN vers le pore de conjugaison (Cascales and Christie 2003; Chen et al. 2005; Christie et al. 2005; Lopez-Sanchez et al. 2012). Bien que moins connue chez les bactéries à coloration de Gram positive, cette ATPase semble indispensable au transfert conjugatif des ICE considérés. Pour l'élément ICE_18RS12_ *tRNA*^{Lys}, les gènes de conjugaison *orfL* et *orfC* sont également tronqués.

D'autres ICE fonctionnels ont été décrits au sein de cette espèce, TnGBS2 et TnGBS1. Toutefois, TnGBS1 et TnGBS2 possèdent des modules de conjugaison non apparentés aux ICE étudiés lors de ce travail. De plus, ils codent une transposase à DDE responsable de leur intégration, contrairement aux ICE intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys} qui codent une recombinase à tyrosine putative (Brochet et al. 2008a; Brochet et al. 2009). Le transfert de deux autres ICE de streptocoques apparentés à ICE_515_ *tRNA*^{Lys} a été démontré, (ICE_6180_RD.2 de *S. pyogenes* et ICESt3 de *S. thermophilus* (avec respectivement 47 à 96% et 28 à 59% d'identité protéique au niveau du module de conjugaison). Toutefois, leurs modules de recombinaison sont très éloignés, ces éléments s'intégrant respectivement dans l'extrémité 3' d'un gène codant un ARNt^{Thr} (Sitkiewicz et al. 2011) et du gène *fda* (Bellanger et al. 2009). Le transfert d'autres ICE de streptocoques, appartenant à d'autres familles, présentant des spécificités d'insertion variées et portant une grande variété de gènes d'adaptation, a été observé, notamment ICESp2905 de *S. pyogenes* (famille de Tn1549) (Brenciani et al. 2011), ICESe2 de *S. equi* (Heather et al. 2008), divers ICE de famille Tn916 (Tn1545 et Tn5251 de *S. pneumoniae*) (Poyart-Salmeron et al. 1989; Clewell et al. 1995a) et divers ICE de famille Tn5252 (Tn5252, et Tn5253 de *S. pneumoniae*, Tn1207.3, de *S. pyogenes*, ICESsu32457 de *S. suis* et ICESde3396 de *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*) (Poyart-Salmeron et al. 1989; Ayoubi et al. 1991; Vijayakumar and Ayalew 1993; Clewell et al. 1995a; Santagati et al. 2003; Heather et al. 2008; Davies et al. 2009; Brencciani et al. 2011; Palmieri et al. 2012). Combinées à l'existence de nombreux ICE putatifs identifiés par séquençage (Brochet et al. 2008a; Carraro et al. 2011), ces données suggèrent que les ICE jouent un rôle essentiel dans le transfert horizontal chez les streptocoques.

2.2.2. Impact de la souche réceptrice utilisée : barrières s'opposant au transfert

La nature de la souche réceptrice pourrait avoir un impact sur le transfert de l'élément. En effet, la fréquence de conjugaison d'*ICE_515_tRNA^{Lys}* est 100 fois plus importante lorsque l'élément est retransféré d'une souche Nem316 vers une souche Nem316 que lorsqu'il se transfère de la souche 515 vers la souche Nem316.

2.2.2.1 Systèmes de restriction-modification

L'hypothèse la plus probable à la différence de fréquence de transfert observé lors des expériences de re-transfert et la présence de système(s) de restriction modification chez la bactérie réceptrice. Les systèmes RM sont très courants et très nombreux au sein des génomes bactériens. Ils constituent une barrière importante au transfert horizontal puisqu'ils vont cliver l'ADN entrant non modifié et ainsi inhiber le transfert d'un élément. Ces systèmes pourraient être présents chez les cellules réceptrices et être ainsi responsables de la faible fréquence de conjugaison observée lors de ces travaux. Toutefois, il est intéressant de noter que de nombreux ICE, dont ceux de *S. agalactiae* intégrés au locus considéré, possèdent des stratégies leur permettant d'échapper aux systèmes RM. Ces éléments portent en effet un gène codant une protéine d'anti-restriction ArdA putative (« alleviation of restriction of DNA »). Les protéines ArdA inhibent les systèmes RM en mimant une molécule d'ADN. Elles préviennent l'activité de restriction en déstabilisant le complexe protéique du système RM via une fixation sur la méthyltransférase (Wilkins 2002; McMahon et al. 2009).

2.2.2.2 Système CRISPR

La présence de loci CRISPR chez les souches réceptrices pourrait également inhiber le transfert conjugatif d'*ICE_515_tRNA^{Lys}* et d'*ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys}*. Les systèmes CRISPR/Cas sont en effet considérés comme une barrière importante à la dissémination des éléments génétiques mobiles. L'analyse de génomes de souches d'origine humaine ou animale de *S. agalactiae* révèlent qu'il contient 2 loci CRISPR, CRISPR1 ubiquitaire et très dynamique et CRISPR2 moins conservé et présent seulement chez quelques souches. Sur les 351 loci analysés, le locus CRISPR1 contient 949 espaceurs différents (Lopez-Sanchez et al. 2012). La majorité cible des phages ou

des ICE rencontrés chez *S. agalactiae*, notamment TnGBS1 et TnGBS2, mais aussi les ICE considérés lors de cette étude. La diversité des espaceurs paraît coïncider avec celle observée au sein des éléments génétiques mobiles de *S. agalactiae* (Lopez-Sanchez et al. 2012). Cependant, d'autres espaceurs vont cibler des séquences d'éléments mobiles identifiés chez d'autres espèces de streptocoques, notamment *S. pyogenes*. Aucun transfert conjugatif d'ICE_515_tRNA^{Lys} ou d'ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} n'a pu être observé vers la souche A909. L'analyse des espaceurs de cette souche révèle que trois d'entre eux ciblent ICE_515_tRNA^{Lys}. L'un d'entre eux cible le gène de la protéine de couplage (SAL_2053), un autre la région intergénique entre les gènes codant la protéine de couplage et la relaxase (dans l'origine de transfert mais pas dans la région conservée) et enfin le dernier un gène codant une ADN adénine méthylase putative (SAL_2035). Ces données pourraient expliquer l'absence de transconjugant avec cette souche réceptrice. La souche A909 porterait un locus CRISPR/Cas fonctionnel, ciblant l'ADN étranger dont les ICE de la famille d'ICE_515_tRNA^{Lys}, protégeant ces cellules de la dissémination de ces éléments.

2.2.2.3 Mise en place du pore de conjugaison

Une différence de spectre d'hôte pourrait également expliquer la différence de transfert entre ICE_515_tRNA^{Lys} et ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys}. En effet, ces deux éléments ont été caractérisés respectivement chez une souche d'origine humaine et bovine. Or tous les tests de transfert ont été réalisés vers des cellules réceptrices d'origine humaine. Des différences sont observées entre les souches adaptées à différents hôtes et notamment au niveau de la paroi. Il est donc possible que le contact entre des cellules adaptées aux humains et d'autres aux bovins ne soit pas optimal, expliquant ainsi la différence de fréquence de transfert. Des tests de transfert conjugatifs utilisant des cellules réceptrices isolées de bovins ou d'autres animaux permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Les expériences de conjugaison ont été réalisées vers des souches possédant déjà un élément intégré dans le locus considéré. Aucun de ces îlots ne porte de gènes codant un système d'exclusion connu, tels qu'une exclusion de surface ou d'entrée.

2.3 Transfert conjugatif inter-spécifique des ICE

S. agalactiae est une bactérie pathogène de l'homme et des animaux. Son mode de vie fait qu'elle entre en interaction avec de nombreuses bactéries et notamment d'autres streptocoques. Elle est notamment associée à *S. dysgalactiae* et *S. uberis* dans les mammites bovines. Des échanges ont été observés au sein de ces espèces. Ainsi, ICESde3396 de *S. dysgalactiae subsp. equisimilis* apparenté aux ICE intégrés dans le gène *rplL* de *S. agalactiae* se transfère vers d'autres espèces de streptocoques dont *S. agalactiae*, *S. pyogenes* et d'autres streptocoques β -hémolytiques (Davies et al. 2009).

Lors de ce travail, des tests de transfert conjugatif ont été réalisés vers 6 espèces différentes de streptocoques et 1 espèce d'entérocoque. Le transfert inter-spécifique d'ICE₅₁₅*tRNA^{Lys}* (souche d'origine humaine) n'a été observé que vers *S. pyogenes*. Aucun transfert d'ICE_{FSL S3-026}*tRNA^{Lys}* (souche d'origine bovine) n'a pu être observé. Ces éléments semblent donc posséder un spectre de transfert étroit. Cependant, en raison du faible nombre de souches testées (au maximum 2 par espèce), l'absence de transfert pourrait être liée aux souches utilisées et non à l'espèce considérée.

Le transfert conjugatif d'un ICE repose sur plusieurs étapes : l'excision de l'élément, son transfert par conjugaison, son intégration puis son maintien dans la cellule réceptrice. Dans le cas du transfert inter-spécifique, il semble peu probable que l'excision soit l'étape limitante du transfert. En revanche, le transfert peut en être une. Peu de données existent sur la nature du contact entre les cellules donatrices et réceptrices lors de la conjugaison, il est possible que ce contact puisse être plus difficile et moins stable entre deux cellules d'espèce différente et ne permettent pas la mise en place du transfert. De même, la mise en place du pore de conjugaison nécessite le transport de certaines protéines dans la paroi de la cellule réceptrice. Certaines de ces protéines, telles que les hydrolases, pourraient ne pas être actives sur la paroi de la cellule réceptrice ce qui empêcherait la formation du pore. Des données récentes indiquent qu'après le transfert d'un ICE, celui-ci se transfère à haute fréquence à partir de la cellule réceptrice, assurant ainsi l'envahissement de la population. Chez ICEBs1, ce processus repose sur les protéines du module de conjugaison (Babic et al. 2011).

Enfin, la cellule réceptrice elle même pourrait coder des fonctions inhibant le transfert de l'élément tels que des systèmes RM, des systèmes CRISPR ou des systèmes d'exclusion (voir partie 2.2.2).

3. Maintien des éléments

3.1 Maintien dans la cellule réceptrice

Le maintien d'un ICE repose dans la majorité des cas sur son intégration dans un réplicon de la cellule réceptrice par recombinaison site-spécifique après réplication ou non de l'élément.

3.1.1 Intégration par recombinaison site-spécifique

L'intégration de l'élément est une des étapes limitantes du transfert. Lors d'un événement d'intégration, l'intégrase catalyse une recombinaison site-spécifique entre le site *attB* porté par le chromosome de la cellule réceptrice et le site *attI* de l'ICE. Une variation au niveau de la séquence de recombinaison pourrait entraîner une baisse d'efficacité de l'intégration de l'ICE et sa perte. Le site *attB* putatif correspondant à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{t^{Lys} CTT} d'*E. faecalis* diverge de 36% comparé à celui trouvé chez *S. agalactiae*, ce qui pourrait expliquer l'absence de transfert vers cette espèce. Tous les autres sites *attB* des souches réceptrices utilisées lors de ces expériences ne diffère pas de plus d'un nucléotide (sur les 11 identiques entre les sites). Cette divergence explique difficilement l'absence de conjugaison. En effet, ICE_515_ *tRNA^{Lys}* se transfère vers *S. pyogenes* dont le site *attB* potentiel diffère d'un nucléotide comparé à celui présent chez *S. agalactiae*. Ainsi, les divergences observées au niveau du site *attB* peuvent expliquer une diminution de la fréquence de transfert mais ne semblent pas être la cause unique de son absence.

De plus, bien que les promoteurs et RBS des firmicutes soient très similaires, les protéines de la cellule réceptrice pourraient ne pas se fixer de manière optimale sur ces derniers et entraîner une plus faible expression des gènes impliqués ou l'intégration de l'élément.

Au moins 2 mécanismes peuvent constituer des barrières à l'intégration des éléments : l'immunité de cible et l'immunité de sur-conjugaison.

Immunité de cible

Lors de la réalisation de ces expériences de conjugaison, aucune souche de *S. agalactiae* sans élément n'a pu être isolée. Les transferts conjugatifs ont donc été réalisés vers des souches de *S. agalactiae* déjà porteuses d'un élément intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{tLys} CTT. Ainsi, la souche Nem316 porte un CIME, la souche COH1 un ICE et la souche A909 un IME. ICE_515_tRNA^{Lys} se transfère vers deux de ces souches : Nem316 et COH1, mais non vers la souche A909. La fréquence de transfert est environ 4 fois plus élevée vers la souche Nem316 que vers la souche COH1. ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} ne se transfère que vers la souche Nem316 avec une fréquence de conjugaison 5 fois plus faible que celle d'ICE_515_tRNA^{Lys}. De même, deux souches utilisées lors des expériences de transfert inter-spécifique réalisées lors de ces travaux portent un élément intégré dans l'extrémité 3' du locus considéré. En effet, *S. salivarius* JIM8777 porte un IME et *S. thermophilus* LMG18311 un élément composite CIME-IME (Guédon com. pers.).

La fréquence de transfert d'ICE_515_tRNA^{Lys} est 10 fois plus faible que celle d'ICES_{t3} et d'ICE_6180_RD.2. Celle d'ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} est environ 50 fois plus faible. Toutefois, les fréquences de conjugaison d'ICES_{t3} et de d'ICE_6180_RD.2 ont été calculées lors de transfert vers une souche réceptrice sans élément. Or la fréquence de transfert d'ICES_{t3} vers une souche portant un élément résident (CIME_{L3catR3}) est 8 fois plus faible que celle où le site *attB* est vide (Bellanger et al. 2011). De même, ICE_{elc} s'intègre avec une plus grande efficacité dans un site *attR* tronqué d'une majeure partie de son bras que dans un site *attR* complet (Sentchilo et al. 2009). Ce mécanisme d'immunité de cible reposerait sur le fait que les sites *attR* et *attL* bordant l'élément résident porteraient des sites de liaison de l'intégrase, de l'excisionase et/ou de co-facteurs de l'hôte, absents du site *attB*, qui interféreraient avec l'intégration de l'élément entrant. De même, la fréquence de transfert est différente suivant la cellule réceptrice utilisée. Les sites *att* portés par CIME_Nem_tRNA^{Lys} et IME_A909_tRNA^{Lys} sont différents de ceux portés par ICE_515_tRNA^{Lys}, ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} et ICE_COH1_tRNA^{Lys}. Cette divergence pourrait entraîner une immunité de cible plus ou moins importante suivant les sites

d'intégration aboutissant à des fréquences d'intégration et donc de transfert différentes.

L'immunité de cible pourrait donc expliquer les faibles fréquences de transfert d'ICE_515_tRNA^{Lys} et d'ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} ainsi que les différences observées entre les différentes cellules réceptrices utilisées, lors des transferts intra- ou inter-spécifique.

Immunité de surconjugaison

Un autre mécanisme d'immunité de surconjugaison par répression de l'élément entrant a été caractérisé chez les prophages, plus particulièrement chez les phages λ et TP901-1 (Madsen et al. 1999; Oppenheim et al. 2005). Ces phages, via leur régulateur central de type cI ou cI-like, répriment les phages étroitement apparentés et leur intégration dans le chromosome. Ce phénomène est également décrit pour ICEBs1 de *B. subtilis*. Dans ce cas, le régulateur central de l'ICE, ImmR, prévient l'acquisition d'un nouvel ICE lorsqu'une copie est déjà présente dans la cellule réceptrice. Ce régulateur réprime l'expression de l'intégrase du nouvel élément entrant, et donc le maintien de l'ICE par intégration (Auchtung et al. 2007). Les éléments intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t^{Lys} utilisés lors de cette étude portent tous des gènes codant des régulateurs cI-like putatifs, homologues au gène *immR* de *B. subtilis*. Ces régulateurs pourraient donc jouer un rôle dans l'immunité de surconjugaison.

3.1.2 Réplication

Des études récentes montrent que la réplication peut être impliquée dans la stabilité et le maintien des ICE (Lee et al. 2010; Guerillot et al. 2013). Ainsi, sous certaines conditions, telle qu'une exposition à un agent endommageant l'ADN, les ICE sous forme circulaire se répliqueraient ce qui limiterait leur perte lors des divisions cellulaires. La réplication permettrait également d'augmenter le succès du transfert d'un ICE, celui-ci se répliquant dans la cellule réceptrice, permettant l'apparition de nouvelles copies de l'élément et une dissémination plus efficace dans la population (Lee et al. 2010). Les deux ICE, ICE_515_tRNA^{Lys} et ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys}, se transfèrent par conjugaison. Ils se maintiendraient ensuite dans la cellule réceptrice par intégration site spécifique. Toutefois, les

nombreuses tentatives de curages de souches, par surexpression de l'intégrase ou exposition des souches à un agent endommageant l'ADN, ont échoué. De même, les nombreux essais de remplacement de gènes n'ont jamais abouti. Il est donc possible que, comme d'autres ICE, les ICE de type ICE_515_tRNA^{Lys} se répliquent de manière intracellulaire dans certaines conditions, ce qui pourrait provoquer l'existence de plusieurs copies dans la cellule et faciliter un retour au phénotype sauvage lors de la construction de mutants.

Pour TnGBS1 et TnGBS2, l'ICE se répliquerait chez la cellule réceptrice, permettant la présence d'un nombre élevé de copies de l'élément et sa dissémination (Guerillot et al. 2013). Ces éléments, comme ICE_515_tRNA^{Lys}, possèdent cependant un spectre de transfert très restreint en conditions de laboratoire bien que des éléments apparentés à TnGBS1 et TnGBS2 aient été identifiés dans de nombreux génomes de streptocoques (Guerillot et al. 2013). Ce spectre étroit reposerait non sur le transfert lui-même mais sur la spécificité d'hôte de la protéine responsable de la réplication de l'élément et donc le maintien après transfert. Toutefois, cette donnée semble difficilement transposable aux éléments de type ICE_515_tRNA^{Lys}. En effet, TnGBS1 et TnGBS2 contrairement à tous les autres ICE simple brin connus, possèdent un module de réplication thêta distinct du module de conjugaison (Guerillot et al. 2013).

3.2 Maintien dans la population

3.2.1 Système toxine-antitoxine

Les ICE de type ICE_515_tRNA^{Lys} porteraient également d'autres systèmes leur permettant de se maintenir dans la population. ICE_515_tRNA^{Lys} code ainsi un système toxine-antitoxine putatif (SAL_2044-SAL_2045). D'autres ICE, tels que SXT de *V. cholerae*, codent un système toxine-antitoxine impliqué dans le maintien de ces éléments (Kobayashi 2001; Burrus et al. 2002a; Wozniak and Waldor 2009b). Ces systèmes d'addiction contribuent au maintien de l'élément, leur perte entraînant la mort cellulaire. Toutefois, le système toxine-antitoxine putatif codé par ICE_515_tRNA^{Lys} ne semble pas être le seul système de maintien porté par l'élément. En effet, lors des tentatives de curage de souche, le gène codant la toxine de ce système d'addiction a été délété, mais cela n'a pas permis d'obtenir une souche sans ICE.

3.2.2 Fonctions avantageuses

Enfin, les ICE de type ICE_515_tRNA^{Lys} portent des fonctions pouvant contribuer à l'adaptation de l'hôte les portant et donc à long terme au maintien de l'ICE dans la population. ICE_515_tRNA^{Lys} code ainsi un facteur CAMP fonctionnel. Le facteur CAMP est un facteur de virulence qui provoque la lyse cellulaire des érythrocytes (Chuzeville 2012). ICE_515_tRNA^{Lys} possède également deux gènes codant une glutarédoxine et une protéine NRAMP putatives (SAL_2054 et SAL_2078) pouvant être impliquées dans la réponse au stress oxydant. Enfin, ICE_515_tRNA^{Lys} porte des protéines de surface possédant des motifs LPxTG (SAL_2036, SAL_2056 et SAL_2057). SAL_2056 contribue à la formation de biofilm et confère à la cellule des propriétés de liaison au fibrinogène et à la fibronectine (Chuzeville, com. pers.). Ces derniers sont des composants de la matrice extracellulaire des cellules humaines. La présence de la protéine SAL_2056 pourrait ainsi favoriser l'invasion cellulaire lors d'une infection par *S. agalactiae*. De plus, le maintien des éléments dans des souches isolées d'hôtes variés suggère que ces éléments codent des fonctions conférant des avantages sélectifs à tous les types de population.

4. Accrétion et mobilisation

L'accrétion correspond à l'intégration d'un élément dans un des sites *att* d'un autre élément (accrétion en tandem) ou à l'intérieur de celui-ci (accrétion interne), aboutissant à la formation d'un élément composite. Ces accrétions engendrent des structures présentant une grande plasticité. Elle peut conduire à la mobilisation en *cis* d'un élément par un autre.

4.1 Accrétion en tandem

L'accrétion en tandem a été proposée initialement pour expliquer la structure des éléments intégrés dans l'extrémité 3' du locus *fda* de *S. thermophilus*, en particulier ICESt1 de *S. thermophilus*, qui est constitué d'un ICE et d'un CIME intégrés en tandem (Pavlovic et al. 2004). L'accrétion semble répandue au sein des éléments génétiques mobiles chez les procaryotes (Boccard et al. 1989; Immonen et al. 1998; Pavlovic et al. 2004; Coleman et al. 2006; te Poele et al. 2008; Brochet et al. 2008a; Lechner et al. 2009; Bellanger et al. 2011), même si ce phénomène est peu caractérisé.

Ainsi, l'ICE pSAM2 de *Streptomyces ambofaciens* ATCC 23873 est flanqué d'un autre îlot. Ces 2 éléments sont séparés par un site de recombinaison et l'ensemble est bordé de deux sites *att* (Boccard et al. 1989). L'ICE Tn5481 de *Lactococcus lactis* est quant à lui un élément composite (Immonen et al. 1998) qui serait constitué d'un ICE et d'un CIME. Dans la souche DSM12804 de *Bordetella petrii*, l'ICE GI3 est intégré en tandem avec deux autres îlots génomiques (Lechner et al. 2009). La cyanobactérie marine *Prochlorococcus* porte un îlot composé de 12 éléments intégrés en tandem séparés par 13 répétitions qui pourraient correspondre à des sites *att* ou à des vestiges de sites *att* (Coleman et al. 2006). Certains événements d'accrétion impliquent deux éléments possédant des intégrases différentes. Ainsi, chez *Streptomyces avermitilis*, les deux ICE putatifs Sav3708 et Sav3728 sont intégrés en tandem alors que leur deux intégrases ne présentent que 24% d'identité protéique (te Poele et al. 2008).

Les analyses *in silico* effectuées sur les 8 premiers génomes séquencés de souches humaines de *S. agalactiae* ainsi que celles réalisées au cours de ces travaux montrent l'importance de ce phénomène chez cette espèce (Brochet et al. 2008a). Chez les 8 premières souches humaines analysées, tous sites d'intégration confondus, douze éléments, soit un tiers des éléments décrits, portent des sites de recombinaison internes ou sont des éléments composites, dont 5 intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys}. De plus, la souche COH1 ne porte pas de site de recombinaison *attL* mais un site *attI* qui serait la marque d'un précédent événement d'accrétion. La caractérisation des éléments intégrés à ce locus dans 12 autres souches a permis de mettre en évidence 4 nouveaux éléments composites. L'analyse systématique de plus de 200 souches révèle la présence d'au moins 18 coïntégrats. Enfin, la recherche des sites de recombinaison a permis de mettre en évidence de nombreux éléments portant plus de deux sites *att* et qui pourraient ainsi être des éléments composites. Ainsi, 37 ICE potentiels (dont les 18 coïntégrats), 44 IME putatifs de type IME_2603_*tRNA*^{Lys}, c'est-à-dire la totalité de ceux observés, 3 dérivés d'ICE et 50 CIME putatifs portent au moins 3 sites de recombinaison. Cela représente 134 éléments soit 57% de la population.

Au cours de ces travaux, des expériences de conjugaison ont été effectuées. Aucune souche sans élément intégré dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t_{Lys} n'avait alors pu être caractérisée. Les tests de transfert d'ICE_515_*tRNA*^{Lys} ont alors

été réalisés vers des souches possédant un élément intégré à ce locus, ICE ou CIME. Ces transferts ont abouti à la formation d'éléments composites avec un ICE intégré en tandem à proximité d'un CIME ou d'un ICE. Il s'agit donc d'événements d'accrétion.

ICE PAPI1 de *Pseudomonas aeruginosa* peut s'intégrer soit dans le second gène codant un ARN^t_{Lys}, soit à l'extrémité d'un autre élément PAPI2 (Qiu et al. 2006). Contrairement à cet élément, ICE_515_tRNA^{Lys} s'intègre préférentiellement au niveau du site *attR* de l'élément résident et jamais dans un des deux autres gènes codant un ARN^t_{Lys}. Cette intégration préférentielle au niveau du site *attR* a déjà été observée lors des événements d'accrétion entre ICESt3 et des CIME de *S. thermophilus*. Comme précédemment lors du mécanisme d'immunité de cible, une différence d'affinité de fixation par l'intégrase entre les sites *attL* et *attR* est possible. Si le site *attR* de l'élément résident confère une immunité de cible inférieure à celle du site *attL*, alors l'ICE s'intégrera majoritairement au niveau du site *attR*. De plus, les facteurs d'hôte peuvent également se fixer avec une plus grande affinité sur l'un ou l'autre des deux sites de recombinaison et intervenir dans le choix du site d'intégration. Enfin, les séquences présentes dans le gène codant l'ARN^t_{Lys} peuvent être nécessaires pour la fixation de l'intégrase ou de co-facteur. Ces séquences ne sont présentes qu'au niveau du site *attR* et jamais au niveau du site *attL* ou de site interne. Cela favoriserait l'intégration au niveau du site *attR* de l'élément résident.

4.2 Accrétion interne

Les ICE portent fréquemment d'autres éléments mobiles, généralement des séquences d'insertion, mais parfois des éléments plus complexes. Ainsi, ICEEc2 d'*E. coli* contient un élément de la famille Tn7 (Roche et al. 2010) tandis que l'ICE SPI-7 de *Salmonella enterica* serovar *Typhi* CT18 contient un prophage *sopE* bordé de répétitions directes et intégré dans le gène *samA* appartenant à l'opéron *samAB* codant des enzymes de réparation de l'ADN (Pickard et al. 2003). De même, de nombreux éléments composites étroitement apparentés à Tn5252 et portant divers éléments de la famille Tn916 en diverses positions ont été identifiés chez les streptocoques (Mingoia et al. 2011).

ICE_18RS21_tRNA^{Lys} est un élément composite constitué d'un ICE et d'un IME de type IME_18RS21_tRNA^{Lys}, intégré dans l'origine de transfert de l'ICE. Les analyses *in silico* effectuées au cours de ce travail ont permis de mettre en évidence 3 autres

intégrations d'IME dans une *oriT*, ce qui n'avait jamais été décrit. Cette structure pourrait résulter d'une insertion spécifique dans *oriT*.

Quelques ICE composites contenant un IME intégré dans un ICE avaient déjà été décrits. Ainsi, l'ICE CTnDOT de *Bacteroides* porte un IME de 13 kb conférant une résistance à la résistance à l'érythromycine. Cet IME ne s'excise plus, mais son module de mobilisation est toujours fonctionnel (Whittle et al. 2001). L'ICE Tn6103 de *Clostridium difficile* porte trois IME. L'un d'entre eux, ainsi que l'élément composite en entier, sont capables de s'exciser (Brouwer et al. 2011). De même, ICESp2905 de *S. pyogenes* porte deux éléments apportant l'un une résistance à l'érythromycine (élément Erm(TR)) et l'autre une résistance à la tétracycline (Brenciani et al. 2011). L'élément Erm(TR) avait été interprété comme un ICE (ICESp2907) car il peut se transférer seul à partir de la structure composite. La réanalyse du contenu en gènes suggère cependant que les deux éléments intégrés dans ICESp2905 sont des IME car chacun de ces deux éléments code une intégrase à sérine et une relaxase mais ne code pas de protéines de couplage ou de protéines du pore de conjugaison. L'élément Erm(TR) est intégré dans l'extrémité 3' d'*orf8* du module de conjugaison de l'ICE et est flanqué de répétitions directes de 21 pb. De plus, son transfert sans transfert de l'ICE n'est observé que si la réceptrice possède un ICE apparenté à ICESp2905 (ICESp1108) et les transconjugants présentent l'élément Erm(TR) intégré dans l'extrémité 3' de l'homologue d'*orf8* porté par ICESp1108. Ceci implique donc que l'élément Erm(TR) cible le module de conjugaison des éléments de type ICESp2905/ICESp1108 comme IME_18RS21_tRNA^{Lys} cible les éléments de type ICE_515_tRNA^{Lys}.

De même, les transposons de famille Tn7 résidant dans la cellule réceptrice ciblent la structure ADN simple brin en cours de réplication par cercle roulant des éléments conjugatifs lors de leur arrivée dans la cellule. Cet événement de transposition conduit donc à l'intégration du transposon dans l'élément conjugatif (Wolkow et al. 1996). Certaines IS, se transposant grâce à une réplicase à cercle roulant, c'est-à-dire une transposase apparentée à une relaxase, ciblent également l'ADN simple brin. Elles vont donc principalement transposer dans les éléments génétiques mobiles en cours de transfert ou entrant dans la cellule réceptrice (Guynet et al. 2008). Ce type d'IS est notamment intégré dans l'IME SGI1 (Kiss et al. 2012).

4.3 Mobilisation en cis des CIME

Le transfert conjugatif d'ICE_515_tRNA^{Lys} vers la souche Nem316 porteuse de CIME_Nem_tRNA^{Lys} aboutit à la formation d'un élément composite qui s'excise et se transfère, même si la fréquence de co-transfert ne dépasse pas 0,1% des événements totaux de transfert. L'excision d'un élément composite après conjugaison et accréation site-spécifique en tandem d'un ICE et d'un IME ainsi que son transfert conjugatif n'avait juste là été démontrée que pour ICESt3 (Bellanger et al. 2011). Toutefois, il s'agit de la première mobilisation en cis d'un CIME naturel. En effet, l'élément utilisé lors de la démonstration du modèle chez *S. thermophilus* était totalement artificiel, constitué des sites *att* d'ICESt3 et d'un gène de résistance au chloramphénicol. L'élément mobilisé au cours de cette étude est un élément composite complexe qui est flanqué d'un site *attR* non apparenté à celui de l'ICE qui le mobilise. Les gènes portés par CIME_Nem_tRNA^{Lys} ne sont pas impliqués dans le transfert mais potentiellement dans la régulation. Ces travaux confirment que ce modèle s'applique à d'autres streptocoques que *S. thermophilus* et qu'il pourrait jouer un rôle majeur dans l'évolution des génomes bactériens, d'autant plus que l'intégrase d'ICE_515_tRNA^{Lys} et celle d'ICESt3 sont différentes. ICE_FSLS3-026_tRNA^{Lys} s'intègre également en tandem avec CIME_Nem_tRNA^{Lys} et pourrait donc également mobiliser ce CIME en cis.

Lors de ces travaux, 64 CIME putatifs intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{tLys} ont été caractérisés, portant des sites *att* homologues à ceux trouvés chez les autres éléments. Si un ICE s'intègre en tandem avec ces éléments comme le font ICE_515_tRNA^{Lys} et ICE_FSLS3-026_tRNA^{Lys} avec CIME_Nem_tRNA^{Lys} alors tous ces éléments sont susceptibles d'être mobilisés en cis.

Les 3 autres ICE caractérisés à l'extrémité 3' du gène codant un ARN^{tLys} chez *S. agalactiae* ne se transfèrent pas dans les conditions testées. Il serait toutefois possible qu'ils se transfèrent par mobilisation en cis après accréation avec un autre ICE. De même, au moins deux de ces ICE s'excisent et il serait donc possible qu'ils soient mobilisés en trans en utilisant leur *oriT* et tout ou partie des protéines codées par le module de conjugaison d'un élément apparenté.

Enfin, certains îlots génomiques de *S. agalactiae* provoquent le transfert de larges fragments d'ADN chromosomique par un mécanisme de mobilisation en cis de type Hfr (Brochet et al. 2008b; Sorensen et al. 2010).

La mobilisation en *cis* serait donc un mécanisme majeur générant de la diversité dans les génomes de *S. agalactiae* et pourrait ainsi contribuer à l'évolution des génomes bactériens d'autres espèces.

4.4. Plasticité des tandems ICE-IME

L'îlot génomique intégré dans le gène d'ARNt^{Lys} de la souche 26023V/R (ICE_2603_tRNA^{Lys}) est un élément composite présentant une structure de type ICE-IME-gène d'ARNt^{Lys}. Pour les 15 autres éléments ayant une structure en tandem décrits dans cette étude, 5 possèdent une organisation similaire et au moins 5 autres une organisation de type IME-ICE-gène d'ARNt^{Lys}. Ces différentes structures peuvent s'expliquer par une intégration différentielle de l'élément entrant dans le site *attL* ou *attR* de l'élément résident. Les tests réalisés au cours de ces travaux démontrent une intégration préférentielle de l'ICE dans le site *attR*, ce qui entraîne une structure de type IME-ICE-tRNA^{Lys} si lors d'un transfert de l'ICE, la réceptrice possède un IME résident. La structure ICE-IME-tRNA^{Lys} pourrait s'expliquer par l'intégration d'un IME dans le site *attR* d'un ICE résident. Les préférences de cette intégrase, qui n'est apparentée que de façon lointaine à celle des ICE, sont cependant inconnues. L'analyse des transconjugants obtenus lors du transfert d'ICESt3 de *S. thermophilus* vers une souche résidente possédant un CIME a montré que l'ICE s'intégrait préférentiellement dans le site *attR* ce qui conduit à une structure CIME-ICE-*fda*. Cependant, des hybridations spécifiques ont montré que tous les clones obtenus possédaient en plus de la structure attendue, la structure alternative ICE-CIME-*fda*, généralement en quantité très nettement plus faible (Bellanger et al. 2011). Par ailleurs, l'analyse des transconjugants suggère, à partir de ces structures, une excision des deux éléments seuls et de l'élément composite. La présence des deux formes, une minoritaire et l'autre majoritaire dans le même clone, s'expliquerait par la dynamique des différentes excisions et insertions possibles, qui conduirait à la présence de formes différentes dans différentes cellules du même clone. Il serait donc également possible que les structures observées chez *S. agalactiae* soient dues à des remaniements intracellulaires et à la dynamique des tandems.

4.5. Accrétion IME-ICE : mobilisation en *cis* ou en *trans* des IME ?

D'après la définition originale, les IME s'excisent de manière autonome puis utilisent la machinerie de conjugaison d'un autre élément pour se transférer (Pavlovic et al. 2004). Cependant, après accrétion en tandem entre un ICE et un IME, les deux éléments pourraient a priori se transférer ensemble (co-transfert) ou séparément. Un IME catalysant sa propre excision pourrait être mobilisé *en trans* par l'ICE du tandem ou bien par un autre élément conjugatif de la cellule. De plus, l'ICE pourrait mobiliser en *cis* l'IME.

Les éléments de type IME_18RS21_oriT semblent cibler l'origine de transfert d'un ICE. L'intégration de l'élément dans l'origine de transfert modifie la séquence de l'oriT (Figure 26, oriT de la souche 18RS21). L'intégration des IME de type IME_18RS21_oriT dans l'origine de transfert pourrait donc avoir pour conséquence d'inhiber la reconnaissance d'oriT et/ou la coupure du site *nic* par la relaxase. Le transfert de l'ICE composite pourrait donc être compromis. Cependant, la modification ne touche que 4 nucléotides d'oriT et l'origine de transfert pourrait rester au moins en partie fonctionnelle. Dans ce cas, les deux éléments pourraient a priori se transférer ensemble (co-transfert et mobilisation en *cis*) ou l'IME pourrait se transférer seul par mobilisation en *trans*. Ceci serait similaire à ce qui est observé pour ICESp2905 où l'ICE reste mobile malgré l'intégration d'Erm(TR) dans son module de conjugaison et les deux types de transfert sont observés (co-transfert et transfert de l'IME seul) (Brenciani et al. 2011).

Enfin, l'IME pourrait également mobiliser l'ICE en *cis*. En effet, l'intégrase codée par l'IME pourrait catalyser l'excision de l'ICE composite (IME + ICE), et la relaxase de l'IME pourrait recruter la machinerie conjugative d'un troisième élément ou de l'ICE afin de mobiliser l'ICE composite.

5. Conclusion et perspectives

En conclusion, ces travaux ont permis de mettre en évidence la présence chez *S. agalactiae* de 3 familles d'éléments intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t^{Lys} (ICE_515_ARN^t^{Lys} et éléments apparentés, IME_2603_ARN^t^{Lys} et éléments apparentés et IME_oriT_ARN^t^{Lys} et éléments apparentés). Ces éléments sont omniprésents dans la population de cette bactérie puisque seulement 4 souches ne portent pas d'élément intégré dans le locus considéré (pour 254 souches analysées soit 2% des souches). L'extrémité 3' du gène codant un ARN^t^{Lys} serait un point chaud

d'intégration. Les îlots intégrés dans ce locus participent à la diversité et à la plasticité du génome de *S. agalactiae*. 52% souches isolées de poisson possèdent un IME de type IME_2603_tRNA^{Lys} et aucune ne possède d'ICE. En revanche, 35% des souches d'origine humaine portent un ICE putatif intégré au locus considéré et seulement 20% possèdent un IME de type IME_2603_tRNA^{Lys}. Ainsi, même si les éléments intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARN^t^{Lys} sont présents dans les génomes de souches quelle que soit leur origine, la répartition semble tout de même dépendante du type d'élément considéré.

Les analyses comparatives des génomes des souches d'origine humaine et bovine avaient révélé que les deux populations sont distinctes et que leur diversité résulte essentiellement de la présence d'îlots génomiques (Bisharat et al. 2004; Dogan et al. 2005; Sukhnanand et al. 2005). Pourtant, des souches de différentes origines (humaine, bovine, souches isolées de poisson, de grenouille, de chien ou de phoque gris) portent des éléments étroitement apparentés intégrés dans le locus considéré. Ceci suggère donc que, ces souches de toutes origines de *S. agalactiae* échangent du matériel génétique par transfert horizontal, malgré leurs divergences et leurs niches écologiques différentes.

Ces éléments semblent donc se transférer et se maintenir dans la population. Ils permettent également de répandre des gènes impliqués dans la virulence à la fois dans *S. agalactiae* mais également vers d'autres espèces de streptocoques et constituent un exemple supplémentaire de contribution des ICE au pouvoir pathogène des souches. La fonction de certains gènes ayant un rôle dans l'adaptation a été étudiée mais il serait pertinent d'observer si les fonctions codées par ces éléments sont en relation avec l'origine des souches, leur caractère pathogène ou commensale ou leur sérotype. Une comparaison des éléments, intégrés dans le locus considéré, des 8 souches humaines ainsi que des 12 souches étudiées au cours de ces travaux suggère cependant que ces fonctions d'adaptation ne seraient pas dépendantes de l'origine de la souche.

Au cours de ces travaux le transfert par conjugaison d'ICE_515_ARN^t^{Lys} et d'ICE_FSL3-026_ARN^t^{Lys} a été démontré. Ces deux éléments sont issus respectivement d'une souche d'origine humaine et d'une souche d'origine bovine. Toutefois, les tests de transferts n'ont été réalisés que vers des souches réceptrices

portant un élément intégré dans le locus considéré et d'origine humaine. Des tests de transfert vers des souches ne portant pas d'élément ou d'autres origines pourraient être intéressants à réaliser.

Les analyses *in silico* démontrent que les éléments mobilisables sont répandus au sein des génomes de *S. agalactiae*. Ces éléments seraient impliqués dans la diversité et la plasticité du génome de cette bactérie.

Ce travail a démontré l'accrétion d'un ICE et d'un CIME. L'étude de la stabilité des tandems obtenus pourrait être envisagée et permettrait d'apporter des informations sur les facteurs pouvant influencer l'évolution des tandems et la formation d'éléments chimériques. De plus la mobilisation en *cis* d'un CIME par ICE_515_ARN^{t^{Lys}} a été démontrée au cours de ce travail. Il serait intéressant de déterminer si cet élément mobilise d'autres îlots en *cis* ou en *trans*, notamment ICE_COH1_tRNA^{Lys} à côté duquel il s'intègre en tandem. Cela permettrait d'appréhender l'apport de cette famille d'éléments et de la mobilisation en *cis* dans la diversité et la plasticité des génomes de *S. agalactiae*.

Lors d'un événement d'accrétion entre un IME et un ICE ou impliquant deux ICE, l'élément composite code deux intégrases. Cette situation est notamment observée avec ICE_2603_tRNA^{Lys}. Dans ce cas, l'élément composite ICE+IME et l'IME seul s'excise. Les deux intégrases pourraient provoquer l'excision de ces éléments, la délétion de l'une d'entre elles permettrait d'étudier son implication dans le processus d'excision. Il serait également intéressant de tester le transfert de ces IME par mobilisation en *trans*, par des ICE de type ICE_515_ARN^{t^{Lys}} ou par des éléments différents, intégrés à d'autres loci, comme Tn916. Pour ce faire, l'élément mobilisateur devra fournir une machinerie de conjugaison à l'élément mobilisé. Cela permettrait d'appréhender l'apport de cette famille d'éléments et de la mobilisation dans la diversité et plasticité des génomes de *S. agalactiae*.

Au cours de ce travail, une famille d'IME ciblant l'origine de transfert d'autres éléments conjugatifs a été caractérisée. Toutefois, ces éléments ne semblent pas s'intégrer exclusivement dans les *oriT* et il serait intéressant d'étudier leur spécificité d'intégration et d'observer si ces éléments s'intègrent dans d'autres origines de transfert ou seulement celle de la famille d'ICE_515_tRNA^{Lys} et de Tn916. La mobilisation de ces éléments par des ICE pourra également être testée. L'intégration de ces éléments dans une origine de transfert modifie la séquence de cette dernière.

ICE_18RS21_tRNALys, contenant un IME de la famille IME_18RS21_oriT, ne se transfère pas mais trois gènes du module de conjugaison de cet ICE semblent tronqués. Afin d'observer l'impact de l'intégration d'un élément de type IME_18RS21_oriT, cet élément pourrait être mobilisé vers ICE_515_ARNt^{Lys}. Des tests de conjugaison de cet ICE élément composite pourraient alors être entrepris.

Enfin, les relaxases codées par les 5 ICE intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Lys} possèdent un domaine HTH homologue à celui porté par les régulateurs des éléments. Il serait donc possible que la relaxase joue un rôle dans la régulation et l'expression des gènes de l'ICE. Ce domaine HTH est également présent chez la relaxase de tous les ICE de la famille d'ICESt3 mais son rôle n'a jamais été étudié. La délétion du gène codant la relaxase a été entreprise au cours de ces travaux mais n'a pas abouti. Afin d'étudier le rôle de la relaxase dans la régulation des éléments, cette protéine pourrait être surexprimée chez *S. agalactiae* et l'impact de la surexpression sur l'excision et le transfert de l'élément pourrait être analysé. De même, des fusions transcriptionnelles des promoteurs responsables de la transcription des gènes impliqués dans le transfert de l'élément pourraient être réalisées avec le gène codant une protéine fluorescente (Gfp) afin d'étudier l'expression de ces promoteurs lors de la surexpression de la relaxase. En parallèle, la protéine pourrait être surproduite et purifiée afin d'étudier sa fixation sur les promoteurs de l'ICE.

BIBLIOGRAPHIE

- Achard, A. and R. Leclercq (2007). "Characterization of a small mobilizable transposon, MTnSag1, in *Streptococcus agalactiae*." J Bacteriol **189**(11): 4328-4331.
- Achtman, M., N. Kennedy, et al. (1977). "Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of traT protein in surface exclusion." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(11): 5104-5108.
- Achtman, M., K. Zurth, et al. (1999). "*Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 14043-14048.
- Ajdic, D., W. M. McShan, et al. (2002). "Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(22): 14434-14439.
- Albano, M., W. K. Smits, et al. (2005). "The Rok protein of *Bacillus subtilis* represses genes for cell surface and extracellular functions." J Bacteriol **187**(6): 2010-2019.
- Ali, S. S., B. Xia, et al. (2012). "Silencing of foreign DNA in bacteria." Curr Opin Microbiol **15**(2): 175-181.
- Althorpe, N. J., P. M. Chilley, et al. (1999). "Transient transcriptional activation of the Inc11 plasmid anti-restriction gene (*ardA*) and SOS inhibition gene (*psiB*) early in conjugating recipient bacteria." Mol Microbiol **31**(1): 133-142.
- Anthony, B. F. and D. M. Okada (1977). "The emergence of group B streptococci in infections of the newborn infant." Annu Rev Med **28**: 355-369.
- Anthony, K. G., W. A. Klimke, et al. (1999). "Comparison of proteins involved in pilus synthesis and mating pair stabilization from the related plasmids F and R100-1: insights into the mechanism of conjugation." J Bacteriol **181**(17): 5149-5159.
- Auchtung, J. M., C. A. Lee, et al. (2007). "Identification and characterization of the immunity repressor (ImmR) that controls the mobile genetic element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **64**(6): 1515-1528.
- Auchtung, J. M., C. A. Lee, et al. (2005). "Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(35): 12554-12559.
- Audette, G. F., J. Manchak, et al. (2007). "Entry exclusion in F-like plasmids requires intact TraG in the donor that recognizes its cognate TraS in the recipient." Microbiology **153**(Pt 2): 442-451.
- Ayoubi, P., A. O. Kilic, et al. (1991). "Tn5253, the pneumococcal omega (*cat tet*) BM6001 element, is a composite structure of two conjugative transposons, Tn5251 and Tn5252." J Bacteriol **173**(5): 1617-1622.
- Babic, A., M. B. Berkmen, et al. (2011). "Efficient gene transfer in bacterial cell chains." MBio **2**(2).
- Babic, A., A. B. Lindner, et al. (2008). "Direct visualization of horizontal gene transfer." Science **319**(5869): 1533-1536.

- Bacic, M., A. C. Parker, et al. (2005). "Genetic and structural analysis of the Bacteroides conjugative transposon CTn341." J Bacteriol **187**(8): 2858-2869.
- Bahl, M. I., L. H. Hansen, et al. (2007). "Conjugative transfer facilitates stable maintenance of IncP-1 plasmid pKJK5 in *Escherichia coli* cells colonizing the gastrointestinal tract of the germfree rat." Appl Environ Microbiol **73**(1): 341-343.
- Bahl, M. I., L. H. Hansen, et al. (2007). "Impact of conjugal transfer on the stability of IncP-1 plasmid pKJK5 in bacterial populations." FEMS Microbiol Lett **266**(2): 250-256.
- Barkay, T., S. M. Miller, et al. (2003). "Bacterial mercury resistance from atoms to ecosystems." FEMS Microbiol Rev **27**(2-3): 355-384.
- Bates, S., R. A. Roscoe, et al. (1999). "Expression of leading region genes on Inc11 plasmid ColIb-P9: genetic evidence for single-stranded DNA transcription." Microbiology **145** (Pt 10): 2655-2662.
- Bauer, T., T. Rosch, et al. (2011). "Localization pattern of conjugation machinery in a Gram-positive bacterium." J Bacteriol **193**(22): 6244-6256.
- Beaber, J. W., V. Burrus, et al. (2002). "Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants." Cell Mol Life Sci **59**(12): 2065-2070.
- Beaber, J. W., B. Hochhut, et al. (2002). "Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*." J Bacteriol **184**(15): 4259-4269.
- Beaber, J. W., B. Hochhut, et al. (2004a). "SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes." Nature **427**(6969): 72-74.
- Beaber, J. W. and M. K. Waldor (2004b). "Identification of operators and promoters that control SXT conjugative transfer." J Bacteriol **186**(17): 5945-5949.
- Bellanger, X., C. Morel, et al. (2007). "Derepression of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus* by DNA damage response: implication of a cI-related repressor." J Bacteriol **189**(4): 1478-1481.
- Bellanger, X., C. Morel, et al. (2011). "Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to *cis* mobilization and gene capture." Mol Microbiol **81**(4): 912-925.
- Bellanger, X., A. P. Roberts, et al. (2009). "Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICES_{t1} and ICES_{t3} from *Streptococcus thermophilus*." J Bacteriol **191**(8): 2764-2775.
- Belogurov, A. A., E. P. Delver, et al. (2000). "Antirestriction protein Ard (Type C) encoded by IncW plasmid pSa has a high similarity to the "protein transport" domain of TraC1 primase of promiscuous plasmid RP4." J Mol Biol **296**(4): 969-977.
- Berg, T., N. Firth, et al. (1998). "Complete nucleotide sequence of pSK41: evolution of staphylococcal conjugative multiresistance plasmids." J Bacteriol **180**(17): 4350-4359.

- Berkmen, M. B., C. A. Lee, et al. (2010). "Polar positioning of a conjugation protein from the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **192**(1): 38-45.
- Bhaya, D., M. Davison, et al. (2011). "CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation." Annu Rev Genet **45**: 273-297.
- Bibb, M. J., J. M. Ward, et al. (1981). "Excision of chromosomal DNA sequences from *Streptomyces coelicolor* forms a novel family of plasmids detectable in *Streptomyces lividans*." Mol Gen Genet **184**(2): 230-240.
- Bisharat, N., D. W. Crook, et al. (2004). "Hyperinvasive neonatal group B streptococcus has arisen from a bovine ancestor." J Clin Microbiol **42**(5): 2161-2167.
- Bishop, E. J., C. Shilton, et al. (2007). "Necrotizing fasciitis in captive juvenile *Crocodylus porosus* caused by *Streptococcus agalactiae*: an outbreak and review of the animal and human literature." Epidemiol Infect **135**(8): 1248-1255.
- Biswas, I., J. K. Jha, et al. (2008). "Shuttle expression plasmids for genetic studies in *Streptococcus mutans*." Microbiology **154**(Pt 8): 2275-2282.
- Blanc, G., H. Ogata, et al. (2007). "Lateral gene transfer between obligate intracellular bacteria: evidence from the *Rickettsia massiliae* genome." Genome Res **17**(11): 1657-1664.
- Blatny, J. M., L. Godager, et al. (2004). "Complete genome sequence of the *Lactococcus lactis* temperate phage phiLC3: comparative analysis of phiLC3 and its relatives in lactococci and streptococci." Virology **318**(1): 231-244.
- Boccard, F., T. Smokvina, et al. (1989). "The integrated conjugative plasmid pSAM2 of *Streptomyces ambofaciens* is related to temperate bacteriophages." EMBO J **8**(3): 973-980.
- Bolotin, A., B. Quinquis, et al. (2004). "Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*." Nat Biotechnol **22**(12): 1554-1558.
- Boltner, D., C. MacMahon, et al. (2002). "R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements." J Bacteriol **184**(18): 5158-5169.
- Bordeleau, E., E. Brouillette, et al. (2010). "Beyond antibiotic resistance: integrating conjugative elements of the SXT/R391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-di-GMP signalling in *Vibrio cholerae*." Environ Microbiol **12**(2): 510-523.
- Bordeleau, E., M. G. Ghinet, et al. (2012). "Diversity of integrating conjugative elements in actinobacteria: Coexistence of two mechanistically different DNA-translocation systems." Mob Genet Elements **2**(2): 119-124.
- Bose, B., J. M. Auchtung, et al. (2008). "A conserved anti-repressor controls horizontal gene transfer by proteolysis." Mol Microbiol **70**(3): 570-582.

- Bose, B. and A. D. Grossman (2011). "Regulation of horizontal gene transfer in *Bacillus subtilis* by activation of a conserved site-specific protease." J Bacteriol **193**(1): 22-29.
- Bourhy, P., L. Salaun, et al. (2007). "A genomic island of the pathogen *Leptospira interrogans* serovar Lai can excise from its chromosome." Infect Immun **75**(2): 677-683.
- Brenciani, A., A. Bacciaglia, et al. (2010). "Phim46.1, the main *Streptococcus pyogenes* element carrying *mef(A)* and *tet(O)* genes." Antimicrob Agents Chemother **54**(1): 221-229.
- Brenciani, A., E. Tiberi, et al. (2011). "Two distinct genetic elements are responsible for *erm*(TR)-mediated erythromycin resistance in tetracycline-susceptible and tetracycline-resistant strains of *Streptococcus pyogenes*." Antimicrob Agents Chemother **55**(5): 2106-2112.
- Briani, F., G. Deho, et al. (2001). "The plasmid status of satellite bacteriophage P4." Plasmid **45**(1): 1-17.
- Brigulla, M. and W. Wackernagel (2010). "Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues." Appl Microbiol Biotechnol **86**(4): 1027-1041.
- Brochet, M., E. Couve, et al. (2008a). "Integrative conjugative elements and related elements are major contributors to the genome diversity of *Streptococcus agalactiae*." J Bacteriol **190**(20): 6913-6917.
- Brochet, M., E. Couve, et al. (2006). "Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*." Microbes Infect **8**(5): 1227-1243.
- Brochet, M., V. Da Cunha, et al. (2009). "Atypical association of DDE transposition with conjugation specifies a new family of mobile elements." Mol Microbiol **71**(4): 948-959.
- Brochet, M., C. Rusniok, et al. (2008b). "Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of *Streptococcus agalactiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(41): 15961-15966.
- Brom, S., L. Girard, et al. (2004). "Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with *p42a*, which may be mediated by site-specific recombination." J Bacteriol **186**(22): 7538-7548.
- Brosius, J. (1989). "Superpolylinkers in cloning and expression vectors." DNA **8**(10): 759-777.
- Brouwer, M. S., P. J. Warburton, et al. (2011). "Genetic organisation, mobility and predicted functions of genes on integrated, mobile genetic elements in sequenced strains of *Clostridium difficile*." PLoS One **6**(8): e23014.
- Bukowski, M., A. Rojowska, et al. (2011). "Prokaryotic toxin-antitoxin systems--the role in bacterial physiology and application in molecular biology." Acta Biochim Pol **58**(1): 1-9.

- Burrus, V., C. Bontemps, et al. (2001). "Characterization of a novel type II restriction-modification system, *Sth368I*, encoded by the integrative element *ICESt1* of *Streptococcus thermophilus* CNRZ368." *Appl Environ Microbiol* **67**(4): 1522-1528.
- Burrus, V., G. Pavlovic, et al. (2002a). "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.
- Burrus, V., G. Pavlovic, et al. (2002b). "Conjugative transposons: the tip of the iceberg." *Mol Microbiol* **46**(3): 601-610.
- Burrus, V., R. Quezada-Calvillo, et al. (2006). "SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae*." *Appl Environ Microbiol* **72**(4): 3054-3057.
- Burrus, V. and M. K. Waldor (2003). "Control of SXT integration and excision." *J Bacteriol* **185**(17): 5045-5054.
- Butcher, B. G., Y. P. Lin, et al. (2007). "The *yydFGHIJ* operon of *Bacillus subtilis* encodes a peptide that induces the *LiaRS* two-component system." *J Bacteriol* **189**(23): 8616-8625.
- Byrd, D. R. and S. W. Matson (1997). "Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase." *Mol Microbiol* **25**(6): 1011-1022.
- Calcutt, M. J., M. S. Lewis, et al. (2002). "Molecular genetic analysis of *ICEF*, an integrative conjugal element that is present as a repetitive sequence in the chromosome of *Mycoplasma fermentans* PG18." *J Bacteriol* **184**(24): 6929-6941.
- Cambray, G., N. Sanchez-Alberola, et al. (2011). "Prevalence of SOS-mediated control of integron integrase expression as an adaptive trait of chromosomal and mobile integrons." *Mob DNA* **2**(1): 6.
- Camilli, R., M. Del Grosso, et al. (2008). "New genetic element carrying the erythromycin resistance determinant *erm*(TR) in *Streptococcus pneumoniae*." *Antimicrob Agents Chemother* **52**(2): 619-625.
- Canchaya, C., G. Fournous, et al. (2004). "The impact of prophages on bacterial chromosomes." *Mol Microbiol* **53**(1): 9-18.
- Carraro, N., V. Libante, et al. (2011). "Differential regulation of two closely related integrative and conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*." *BMC Microbiol* **11**: 238.
- Carter, M. Q., J. Chen, et al. (2010). "The *Pseudomonas aeruginosa* pathogenicity island PAPI-1 is transferred via a novel type IV pilus." *J Bacteriol* **192**(13): 3249-3258.
- Cascales, E. and P. J. Christie (2003). "The versatile bacterial type IV secretion systems." *Nat Rev Microbiol* **1**(2): 137-149.
- Ceccarelli, D., A. Daccord, et al. (2008). "Identification of the origin of transfer (*oriT*) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements." *J Bacteriol* **190**(15): 5328-5338.
- Celli, J. and P. Trieu-Cuot (1998). "Circularization of *Tn916* is required for expression of the transposon-encoded transfer functions: characterization of long tetracycline-

inducible transcripts reading through the attachment site." Mol Microbiol **28**(1): 103-117.

Cellier, M. F., P. Courville, et al. (2007). "Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense." Microbes Infect **9**(14-15): 1662-1670.

Chattoraj, P., A. Banerjee, et al. (2010). "ClpP of *Streptococcus mutans* differentially regulates expression of genomic islands, mutacin production, and antibiotic tolerance." J Bacteriol **192**(5): 1312-1323.

Chen, I., P. J. Christie, et al. (2005). "The ins and outs of DNA transfer in bacteria." Science **310**(5753): 1456-1460.

Chen, L., K. Brugger, et al. (2005). "The genome of *Sulfolobus acidocaldarius*, a model organism of the Crenarchaeota." J Bacteriol **187**(14): 4992-4999.

Chen, W. Y., J. W. Ho, et al. (2011). "Functional characterization of an alkaline exonuclease and single strand annealing protein from the SXT genetic element of *Vibrio cholerae*." BMC Mol Biol **12**: 16.

Cheng, Q., B. J. Paszkiet, et al. (2000). "Integration and excision of a *Bacteroides* conjugative transposon, CTnDOT." J Bacteriol **182**(14): 4035-4043.

Cheng, Q., Y. Sutanto, et al. (2001). "Identification of genes required for excision of CTnDOT, a *Bacteroides* conjugative transposon." Mol Microbiol **41**(3): 625-632.

Cheng, Q., N. Wesslund, et al. (2002). "Development of an in vitro integration assay for the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT." J Bacteriol **184**(17): 4829-4837.

Chilley, P. M. and B. M. Wilkins (1995). "Distribution of the *ardA* family of antirestriction genes on conjugative plasmids." Microbiology **141** (Pt 9): 2157-2164.

Christie, P. J., K. Atmakuri, et al. (2005). "Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems." Annu Rev Microbiol **59**: 451-485.

Christie, P. J., R. Z. Korman, et al. (1987). "Two conjugation systems associated with *Streptococcus faecalis* plasmid pCF10: identification of a conjugative transposon that transfers between *S. faecalis* and *Bacillus subtilis*." J Bacteriol **169**(6): 2529-2536.

Chuzeville, S., A. Puymege, et al. (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.

Clewell, D. B. (1993). "Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer." Cell **73**(1): 9-12.

Clewell, D. B., S. E. Flannagan, et al. (1988). "Sequence analysis of termini of conjugative transposon Tn916." J Bacteriol **170**(7): 3046-3052.

Clewell, D. B., S. E. Flannagan, et al. (1995a). "Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons." Trends Microbiol **3**(6): 229-236.

Clewell, D. B., D. D. Jaworski, et al. (1995b). "The conjugative transposon Tn916 of *Enterococcus faecalis*: structural analysis and some key factors involved in movement." Dev Biol Stand **85**: 11-17.

- Coleman, M. L., M. B. Sullivan, et al. (2006). "Genomic islands and the ecology and evolution of *Prochlorococcus*." Science **311**(5768): 1768-1770.
- Colmin, C., M. Pebay, et al. (1991). "A species-specific DNA probe obtained from *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* detects strain restriction polymorphism." FEMS Microbiol Lett **65**(2): 123-128.
- Connolly, K. M., M. Iwahara, et al. (2002). "Xis protein binding to the left arm stimulates excision of conjugative transposon Tn916." J Bacteriol **184**(8): 2088-2099.
- Cookson, A. L., S. Noel, et al. (2011). "Transposition of Tn916 in the four replicons of the *Butyrivibrio proteoclasticus* B316(T) genome." FEMS Microbiol Lett **316**(2): 144-151.
- Cornacchione, P., L. Scaringi, et al. (1998). "Group B streptococci persist inside macrophages." Immunology **93**(1): 86-95.
- Croucher, N. J., D. Walker, et al. (2009). "Role of conjugative elements in the evolution of the multidrug-resistant pandemic clone *Streptococcus pneumoniae*Spain23F ST81." J Bacteriol **191**(5): 1480-1489.
- Cvitkovitch, D. G. (2001). "Genetic competence and transformation in oral streptococci." Crit Rev Oral Biol Med **12**(3): 217-243.
- Daccord, A., D. Ceccarelli, et al. (2010). "Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands." Mol Microbiol **78**(3): 576-588.
- Daccord, A., M. Mursell, et al. (2012). "Dynamics of the SetCD-regulated integration and excision of genomic islands mobilized by integrating conjugative elements of the SXT/R391 family." J Bacteriol **194**(21): 5794-5802.
- Davies, M. R., J. Shera, et al. (2009). "A novel integrative conjugative element mediates genetic transfer from group G *Streptococcus* to other {beta}-hemolytic *Streptococci*." J Bacteriol **191**(7): 2257-2265.
- Davison, J. (1999). "Genetic exchange between bacteria in the environment." Plasmid **42**(2): 73-91.
- de la Cruz, F., L. S. Frost, et al. (2010). "Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria." FEMS Microbiol Rev **34**(1): 18-40.
- de Vries, J. and W. Wackernagel (2002). "Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(4): 2094-2099.
- Deep, A., U. Chaudhary, et al. (2011). "Quorum sensing and Bacterial Pathogenicity: From Molecules to Disease." J Lab Physicians **3**(1): 4-11.
- del Solar, G., R. Giraldo, et al. (1998). "Replication and control of circular bacterial plasmids." Microbiol Mol Biol Rev **62**(2): 434-464.
- Delannoy, C. M., R. N. Zadoks, et al. (2012). "Draft genome sequence of a nonhemolytic fish-pathogenic *Streptococcus agalactiae* strain." J Bacteriol **194**(22): 6341-6342.

- Deltcheva, E., K. Chylinski, et al. (2011). "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Nature **471**(7340): 602-607.
- Deveau, H., J. E. Garneau, et al. (2010). "CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions." Annu Rev Microbiol **64**: 475-493.
- Dimopoulou, I. D., J. Z. Jordens, et al. (1997). "A molecular analysis of Greek and UK *Haemophilus influenzae* conjugative resistance plasmids." J Antimicrob Chemother **39**(3): 303-307.
- Dimopoulou, I. D., J. E. Russell, et al. (2002). "Site-specific recombination with the chromosomal tRNA(Leu) gene by the large conjugative *Haemophilus* resistance plasmid." Antimicrob Agents Chemother **46**(5): 1602-1603.
- Dobrindt, U., B. Hochhut, et al. (2004). "Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms." Nat Rev Microbiol **2**(5): 414-424.
- Dodd, I. B., K. E. Shearwin, et al. (2005). "Revisited gene regulation in bacteriophage lambda." Curr Opin Genet Dev **15**(2): 145-152.
- Dogan, B., Y. H. Schukken, et al. (2005). "Distribution of serotypes and antimicrobial resistance genes among *Streptococcus agalactiae* isolates from bovine and human hosts." J Clin Microbiol **43**(12): 5899-5906.
- Doleans-Jordheim, A., M. Akermi, et al. (2006). "Growth-phase-dependent mobility of the *lvh*-encoding region in *Legionella pneumophila* strain Paris." Microbiology **152**(Pt 12): 3561-3568.
- Doran, K. S. and V. Nizet (2004). "Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy." Mol Microbiol **54**(1): 23-31.
- Douard, G., K. Praud, et al. (2010). "The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized in trans by the IncA/C multidrug resistance plasmid family." PLoS One **5**(12): e15302.
- Dougherty, B. A., C. Hill, et al. (1998). "Sequence and analysis of the 60 kb conjugative, bacteriocin-producing plasmid pMRC01 from *Lactococcus lactis* DPC3147." Mol Microbiol **29**(4): 1029-1038.
- Dower, W. J., J. F. Miller, et al. (1988). "High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation." Nucleic Acids Res **16**(13): 6127-6145.
- Dubey, G. P. and S. Ben-Yehuda (2011). "Intercellular nanotubes mediate bacterial communication." Cell **144**(4): 590-600.
- Dubnau, D. and R. Losick (2006). "Bistability in bacteria." Mol Microbiol **61**(3): 564-572.
- Dunny, G. M. (2007). "The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **362**(1483): 1185-1193.
- Dyall-Smith, M. (2011). "Dangerous weapons: a cautionary tale of CRISPR defence." Mol Microbiol **79**(1): 3-6.

- Dziewit, L., M. Jazurek, et al. (2007). "The SXT conjugative element and linear prophage N15 encode toxin-antitoxin-stabilizing systems homologous to the tad-ata module of the *Paracoccus aminophilus* plasmid pAMI2." J Bacteriol **189**(5): 1983-1997.
- Elliott, J. A., R. R. Facklam, et al. (1990). "Whole-cell protein patterns of nonhemolytic group B, type Ib, streptococci isolated from humans, mice, cattle, frogs, and fish." J Clin Microbiol **28**(3): 628-630.
- Esposito, D. and G. F. Gerard (2003). "The *Escherichia coli* Fis protein stimulates bacteriophage lambda integrative recombination in vitro." J Bacteriol **185**(10): 3076-3080.
- Evans, J. J., D. J. Pasnik, et al. (2006). "First report of *Streptococcus agalactiae* and *Lactococcus garvieae* from a wild bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*)." J Wildl Dis **42**(3): 561-569.
- Framson, P. E., A. Nittayajarn, et al. (1997). "New genetic techniques for group B streptococci: high-efficiency transformation, maintenance of temperature-sensitive pWV01 plasmids, and mutagenesis with Tn917." Appl Environ Microbiol **63**(9): 3539-3547.
- Frees, D., K. Savijoki, et al. (2007). "Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria." Mol Microbiol **63**(5): 1285-1295.
- Freundlich, M., N. Ramani, et al. (1992). "The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **6**(18): 2557-2563.
- Furuya, E. Y. and F. D. Lowy (2006). "Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting." Nat Rev Microbiol **4**(1): 36-45.
- Gaillard, M., N. Pernet, et al. (2008). "Host and invader impact of transfer of the clc genomic island into *Pseudomonas aeruginosa* PAO1." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(19): 7058-7063.
- Gaillard, M., N. Pradervand, et al. (2010). "Transcriptome analysis of the mobile genome ICE_{clc} in *Pseudomonas knackmussii* B13." BMC Microbiol **10**: 153.
- Garnier, F., S. Taourit, et al. (2000). "Characterization of transposon Tn1549, conferring VanB-type resistance in *Enterococcus* spp." Microbiology **146** (Pt 6): 1481-1489.
- Garriss, G., M. K. Waldor, et al. (2009). "Mobile antibiotic resistance encoding elements promote their own diversity." PLoS Genet **5**(12): e1000775.
- Gasson, M. J., J. J. Godon, et al. (1995). "Characterization and exploitation of conjugation in *Lactococcus lactis*." Int Dairy Journal **5**: 757-762.
- Ghinet, M. G., E. Bordeleau, et al. (2011). "Uncovering the prevalence and diversity of integrating conjugative elements in actinobacteria." PLoS One **6**(11): e27846.
- Ghosh, S. K., S. Hajra, et al. (2006). "Mechanisms for chromosome and plasmid segregation." Annu Rev Biochem **75**: 211-241.

- Giovanetti, E., A. Brenciani, et al. (2012). "ICESp2905, the erm(TR)-tet(O) element of *Streptococcus pyogenes*, is formed by two independent integrative and conjugative elements." Antimicrob Agents Chemother **56**(1): 591-594.
- Glaser, P., C. Rusniok, et al. (2002). "Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease." Mol Microbiol **45**(6): 1499-1513.
- Godon, J. J., K. Jury, et al. (1994). "The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation gene *cluA*." Mol Microbiol **12**(4): 655-663.
- Goerke, C., J. Koller, et al. (2006). "Ciprofloxacin and trimethoprim cause phage induction and virulence modulation in *Staphylococcus aureus*." Antimicrob Agents Chemother **50**(1): 171-177.
- Gogarten, J. P. and J. P. Townsend (2005). "Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution." Nat Rev Microbiol **3**(9): 679-687.
- Gottfried, P., E. Yagil, et al. (2000). "Core-binding specificity of bacteriophage integrases." Mol Gen Genet **263**(4): 619-624.
- Grandoso, G., P. Avila, et al. (2000). "Two active-site tyrosyl residues of protein TrwC act sequentially at the origin of transfer during plasmid R388 conjugation." J Mol Biol **295**(5): 1163-1172.
- Greub, G., F. Collyn, et al. (2004). "A genomic island present along the bacterial chromosome of the *Parachlamydiaceae* UWE25, an obligate amoebal endosymbiont, encodes a potentially functional F-like conjugative DNA transfer system." BMC Microbiol **4**: 48.
- Grindley, N. D., K. L. Whiteson, et al. (2006). "Mechanisms of site-specific recombination." Annu Rev Biochem **75**: 567-605.
- Grohmann, E., G. Muth, et al. (2003). "Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria." Microbiol Mol Biol Rev **67**(2): 277-301, table of contents.
- Groth, A. C. and M. P. Calos (2004). "Phage integrases: biology and applications." J Mol Biol **335**(3): 667-678.
- Guedon, E., C. Delorme, et al. (2011). "Complete genome sequence of the commensal *Streptococcus salivarius* strain JIM8777." J Bacteriol **193**(18): 5024-5025.
- Guerillot, R., V. Da Cunha, et al. (2013). "Modular Evolution of TnGBSs, a New Family of Integrative and Conjugative Elements Associating Insertion Sequence Transposition, Plasmid Replication, and Conjugation for Their Spreading." J Bacteriol **195**(9): 1979-1990.
- Guglielmini, J., L. Quintais, et al. (2011). "The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation." PLoS Genet **7**(8): e1002222.
- Guynet, C., A. B. Hickman, et al. (2008). "In vitro reconstitution of a single-stranded transposition mechanism of IS608." Mol Cell **29**(3): 302-312.

- Haas, D., J. Watson, et al. (1981). "Isolation of an Hfr donor of *Pseudomonas aeruginosa* PAO by insertion of the plasmid RP1 into the tryptophan synthase gene." Mol Gen Genet **182**(2): 240-244.
- Hacker, J. and E. Carniel (2001). "Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. A Darwinian view of the evolution of microbes." EMBO Rep **2**(5): 376-381.
- Hacker, J., B. Hochhut, et al. (2004). "Pathogenomics of mobile genetic elements of toxigenic bacteria." Int J Med Microbiol **293**(7-8): 453-461.
- Hacker, J. and J. B. Kaper (2000). "Pathogenicity islands and the evolution of microbes." Annu Rev Microbiol **54**: 641-679.
- Haenni, M., E. Saras, et al. (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**(24): 7957-7965.
- Hagege, J., J. L. Pernodet, et al. (1993). "Mode and origin of replication of pSAM2, a conjugative integrating element of *Streptomyces ambofaciens*." Mol Microbiol **10**(4): 799-812.
- Hagege, J., J. L. Pernodet, et al. (1993). "Transfer functions of the conjugative integrating element pSAM2 from *Streptomyces ambofaciens*: characterization of a kilkor system associated with transfer." J Bacteriol **175**(17): 5529-5538.
- Hamilton, H. L. and J. P. Dillard (2006). "Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination." Mol Microbiol **59**(2): 376-385.
- Hanssen, A. M. and J. U. Ericson Sollid (2006). "SCCmec in staphylococci: genes on the move." FEMS Immunol Med Microbiol **46**(1): 8-20.
- Harms, K. and W. Wackernagel (2008). "The RecBCD and SbcCD DNases suppress homology-facilitated illegitimate recombination during natural transformation of *Acinetobacter baylyi*." Microbiology **154**(Pt 8): 2437-2445.
- Harshey, R. M. (2012). "The Mu story: how a maverick phage moved the field forward." Mob DNA **3**(1): 21.
- Heather, Z., M. T. Holden, et al. (2008). "A novel streptococcal integrative conjugative element involved in iron acquisition." Mol Microbiol **70**(5): 1274-1292.
- Hoa, T. T., P. Tortosa, et al. (2002). "Rok (YkuW) regulates genetic competence in *Bacillus subtilis* by directly repressing *comK*." Mol Microbiol **43**(1): 15-26.
- Hochhut, B., J. W. Beaber, et al. (2001). "Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative chromosomally integrating elements that share an attachment site." J Bacteriol **183**(4): 1124-1132.
- Hochhut, B., K. Jahreis, et al. (1997). "CTnscr94, a conjugative transposon found in enterobacteria." J Bacteriol **179**(7): 2097-2102.

- Hochhut, B., J. Marrero, et al. (2000). "Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in *Vibrio cholerae* O139." J Bacteriol **182**(7): 2043-2047.
- Hochhut, B. and M. K. Waldor (1999). "Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*." Mol Microbiol **32**(1): 99-110.
- Holden, M. T., Z. Heather, et al. (2009). "Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens." PLoS Pathog **5**(3): e1000346.
- Horvath, P. and R. Barrangou (2010). "CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea." Science **327**(5962): 167-170.
- Hosking, S. L., M. E. Deadman, et al. (1998). "An in silico evaluation of Tn916 as a tool for generalized mutagenesis in *Haemophilus influenzae* Rd." Microbiology **144** (Pt 9): 2525-2530.
- Howard, M. T., W. C. Nelson, et al. (1995). "Stepwise assembly of a relaxosome at the F plasmid origin of transfer." J Biol Chem **270**(47): 28381-28386.
- Hulter, N. and W. Wackernagel (2008). "Double illegitimate recombination events integrate DNA segments through two different mechanisms during natural transformation of *Acinetobacter baylyi*." Mol Microbiol **67**(5): 984-995.
- Ike, Y., S. E. Flannagan, et al. (1992). "Hyperhemolytic phenomena associated with insertions of Tn916 into the hemolysin determinant of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1." J Bacteriol **174**(6): 1801-1809.
- Immonen, T., G. Wahlstrom, et al. (1998). "Evidence for a mosaic structure of the Tn5481 in *Lactococcus lactis* N8." DNA Seq **9**(5-6): 245-261.
- Ishikawa, K., M. Watanabe, et al. (2005). "Discovery of a novel restriction endonuclease by genome comparison and application of a wheat-germ-based cell-free translation assay: PabI (5'-GTA/C) from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*." Nucleic Acids Res **33**(13): e112.
- Jacob, A. E. and S. J. Hobbs (1974). "Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*." J Bacteriol **117**(2): 360-372.
- Jaworski, D. D. and D. B. Clewell (1995). "A functional origin of transfer (*oriT*) on the conjugative transposon Tn916." J Bacteriol **177**(22): 6644-6651.
- Jenal, U. and J. Malone (2006). "Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria." Annu Rev Genet **40**: 385-407.
- Jeters, R. T., G. R. Wang, et al. (2009). "Tetracycline-associated transcriptional regulation of transfer genes of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT." J Bacteriol **191**(20): 6374-6382.
- Johnsborg, O., V. Eldholm, et al. (2007). "Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function." Res Microbiol **158**(10): 767-778.

- Judd, P. K., R. B. Kumar, et al. (2005). "Spatial location and requirements for the assembly of the *Agrobacterium tumefaciens* type IV secretion apparatus." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(32): 11498-11503.
- Juhas, M., D. W. Crook, et al. (2008). "Type IV secretion systems: tools of bacterial horizontal gene transfer and virulence." Cell Microbiol **10**(12): 2377-2386.
- Juhas, M., P. M. Power, et al. (2007). "Sequence and functional analyses of *Haemophilus* spp. genomic islands." Genome Biol **8**(11): R237.
- Juhas, M., J. R. van der Meer, et al. (2009). "Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution." FEMS Microbiol Rev **33**(2): 376-393.
- Kaimer, C. and P. L. Graumann (2011). "Players between the worlds: multifunctional DNA translocases." Curr Opin Microbiol **14**(6): 719-725.
- Kaneko, T., Y. Nakamura, et al. (2000). "Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*." DNA Res **7**(6): 331-338.
- Karginov, F. V. and G. J. Hannon (2010). "The CRISPR system: small RNA-guided defense in bacteria and archaea." Mol Cell **37**(1): 7-19.
- Karl, W., M. Bamberger, et al. (2001). "Transfer protein TraY of plasmid R1 stimulates TraI-catalyzed *oriT* cleavage in vivo." J Bacteriol **183**(3): 909-914.
- Keefe, G. P. (1997). "*Streptococcus agalactiae* mastitis: a review." Can Vet J **38**(7): 429-437.
- Keeling, P. J. and J. D. Palmer (2008). "Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution." Nat Rev Genet **9**(8): 605-618.
- Keeton, C. M., J. Park, et al. (2012). "The excision proteins of CTnDOT positively regulate the transfer operon." Plasmid.
- Kelley, W. L. (2006). "Lex marks the spot: the virulent side of SOS and a closer look at the LexA regulon." Mol Microbiol **62**(5): 1228-1238.
- Kers, J. A., K. D. Cameron, et al. (2005). "A large, mobile pathogenicity island confers plant pathogenicity on *Streptomyces* species." Mol Microbiol **55**(4): 1025-1033.
- Kiewitz, C., K. Larbig, et al. (2000). "Monitoring genome evolution ex vivo: reversible chromosomal integration of a 106 kb plasmid at two tRNA(Lys) gene loci in sequential *Pseudomonas aeruginosa* airway isolates." Microbiology **146** (Pt 10): 2365-2373.
- Kiss, J., B. Nagy, et al. (2012). "Stability, entrapment and variant formation of *Salmonella* genomic island 1." PLoS One **7**(2): e32497.
- Klockgether, J., D. Wurdemann, et al. (2007). "Diversity of the abundant pKLC102/PAGI-2 family of genomic islands in *Pseudomonas aeruginosa*." J Bacteriol **189**(6): 2443-2459.
- Kobayashi, I. (2001). "Behavior of restriction-modification systems as selfish mobile elements and their impact on genome evolution." Nucleic Acids Res **29**(18): 3742-3756.

- Konto-Ghiorgi, Y., E. Mairey, et al. (2009). "Dual role for pilus in adherence to epithelial cells and biofilm formation in *Streptococcus agalactiae*." PLoS Pathog **5**(5): e1000422.
- Korona, R., B. Korona, et al. (1993). "Sensitivity of naturally occurring coliphages to type I and type II restriction and modification." J Gen Microbiol **139 Pt 6**: 1283-1290.
- Kulaeva, O. I., J. C. Wootton, et al. (1995). "Characterization of the umu-complementing operon from R391." J Bacteriol **177**(10): 2737-2743.
- Kuroda, M., T. Ohta, et al. (2001). "Whole genome sequencing of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*." Lancet **357**(9264): 1225-1240.
- Laachouch, J. E., L. Desmet, et al. (1996). "Bacteriophage Mu repressor as a target for the *Escherichia coli* ATP-dependent Clp Protease." EMBO J **15**(2): 437-444.
- Lancefield, R. C. (1933). "A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci." J Exp Med **57**(4): 571-595.
- Lang, A. S. and J. T. Beatty (2001). "The gene transfer agent of *Rhodobacter capsulatus* and "constitutive transduction" in prokaryotes." Arch Microbiol **175**(4): 241-249.
- Lang, A. S. and J. T. Beatty (2007). "Importance of widespread gene transfer agent genes in alpha-proteobacteria." Trends Microbiol **15**(2): 54-62.
- Law, J., G. Buist, et al. (1995). "A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes." J Bacteriol **177**(24): 7011-7018.
- Lawrence, J. G. (1999). "Gene transfer, speciation, and the evolution of bacterial genomes." Curr Opin Microbiol **2**(5): 519-523.
- Lawrence, J. G. and J. R. Roth (1996). "Selfish operons: horizontal transfer may drive the evolution of gene clusters." Genetics **143**(4): 1843-1860.
- Leaves, N. I., I. Dimopoulou, et al. (2000). "Epidemiological studies of large resistance plasmids in *Haemophilus*." J Antimicrob Chemother **45**(5): 599-604.
- Lechner, M., K. Schmitt, et al. (2009). "Genomic island excisions in *Bordetella petrii*." BMC Microbiol **9**: 141.
- Lederberg, J. (1998). "Plasmid (1952-1997)." Plasmid **39**(1): 1-9.
- Lee, C. A., J. M. Auchtung, et al. (2007). "Identification and characterization of *int* (integrase), *xis* (excisionase) and chromosomal attachment sites of the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*." Mol Microbiol **66**(6): 1356-1369.
- Lee, C. A., A. Babic, et al. (2010). "Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon." Mol Microbiol **75**(2): 268-279.
- Lee, C. A., J. Thomas, et al. (2012). "The *Bacillus subtilis* conjugative transposon ICEBs1 mobilizes plasmids lacking dedicated mobilization functions." J Bacteriol **194**(12): 3165-3172.
- Leenhouts, K. J., B. Tolner, et al. (1991). "Nucleotide sequence and characterization of the broad-host-range lactococcal plasmid pWVO1." Plasmid **26**(1): 55-66.

- Lewis, J. A. and G. F. Hatfull (2001). "Control of directionality in integrase-mediated recombination: examination of recombination directionality factors (RDFs) including Xis and Cox proteins." Nucleic Acids Res **29**(11): 2205-2216.
- Li, J., S. G. Wolf, et al. (2005). "Exploring cargo transport mechanics in the type IV secretion systems." Trends Microbiol **13**(7): 295-298.
- Li, L. Y., N. B. Shoemaker, et al. (1995a). "Location and characteristics of the transfer region of a *Bacteroides* conjugative transposon and regulation of transfer genes." J Bacteriol **177**(17): 4992-4999.
- Li, L. Y., N. B. Shoemaker, et al. (1995b). "The mobilization regions of two integrated *Bacteroides* elements, NBU1 and NBU2, have only a single mobilization protein and may be on a cassette." J Bacteriol **177**(14): 3940-3945.
- Lin, T. L., C. Z. Lee, et al. (2008). "Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess." J Bacteriol **190**(2): 515-526.
- Llosa, M., F. X. Gomis-Ruth, et al. (2002). "Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport." Mol Microbiol **45**(1): 1-8.
- Lopez-Sanchez, M. J., E. Sauvage, et al. (2012). "The highly dynamic CRISPR1 system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome." Mol Microbiol **85**(6): 1057-1071.
- Lorenz, M. G. and W. Wackernagel (1994). "Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment." Microbiol Rev **58**(3): 563-602.
- Losick, R. and C. Desplan (2008). "Stochasticity and cell fate." Science **320**(5872): 65-68.
- Lu, F. and G. Churchward (1995). "Tn916 target DNA sequences bind the C-terminal domain of integrase protein with different affinities that correlate with transposon insertion frequency." J Bacteriol **177**(8): 1938-1946.
- Lucas, M., B. Gonzalez-Perez, et al. (2010). "Relaxase DNA binding and cleavage are two distinguishable steps in conjugative DNA processing that involve different sequence elements of the *nic* site." J Biol Chem **285**(12): 8918-8926.
- Lucchini, S., F. Desiere, et al. (1999). "Comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* phage species supports a modular evolution theory." J Virol **73**(10): 8647-8656.
- Lyras, D., V. Adams, et al. (2009). "tISCpe8, an IS1595-family lincomycin resistance element located on a conjugative plasmid in *Clostridium perfringens*." J Bacteriol **191**(20): 6345-6351.
- Madsen, P. L., A. H. Johansen, et al. (1999). "The genetic switch regulating activity of early promoters of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1." J Bacteriol **181**(24): 7430-7438.
- Maguin, E., P. Duwat, et al. (1992). "New thermosensitive plasmid for gram-positive bacteria." J Bacteriol **174**(17): 5633-5638.

- Mahillon, J. and M. Chandler (1998). "Insertion sequences." Microbiol Mol Biol Rev **62**(3): 725-774.
- Mahillon, J., C. Leonard, et al. (1999). "IS elements as constituents of bacterial genomes." Res Microbiol **150**(9-10): 675-687.
- Maiques, E., C. Ubeda, et al. (2006). "beta-lactam antibiotics induce the SOS response and horizontal transfer of virulence factors in *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **188**(7): 2726-2729.
- Makarova, K. S., Y. I. Wolf, et al. (2009). "Comprehensive comparative-genomic analysis of type 2 toxin-antitoxin systems and related mobile stress response systems in prokaryotes." Biol Direct **4**: 19.
- Malbruny, B., A. M. Werno, et al. (2011). "Cross-resistance to lincosamides, streptogramins A, and pleuromutilins due to the *lsa(C)* gene in *Streptococcus agalactiae* UCN70." Antimicrob Agents Chemother **55**(4): 1470-1474.
- Manson, J. M. and M. S. Gilmore (2006). "Pathogenicity island integrase cross-talk: a potential new tool for virulence modulation." Mol Microbiol **61**(3): 555-559.
- Marenda, M., V. Barbe, et al. (2006). "A new integrative conjugative element occurs in *Mycoplasma agalactiae* as chromosomal and free circular forms." J Bacteriol **188**(11): 4137-4141.
- Marra, D., J. G. Smith, et al. (1999). "Excision of the conjugative transposon Tn916 in *Lactococcus lactis*." Appl Environ Microbiol **65**(5): 2230-2231.
- Marraffini, L. A. and E. J. Sontheimer (2010). "CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea." Nat Rev Genet **11**(3): 181-190.
- Marrero, J. and M. K. Waldor (2005). "Interactions between inner membrane proteins in donor and recipient cells limit conjugal DNA transfer." Dev Cell **8**(6): 963-970.
- Marrero, J. and M. K. Waldor (2007). "The SXT/R391 family of integrative conjugative elements is composed of two exclusion groups." J Bacteriol **189**(8): 3302-3305.
- Matson, S. W., J. K. Sampson, et al. (2001). "F plasmid conjugative DNA transfer: the TraI helicase activity is essential for DNA strand transfer." J Biol Chem **276**(4): 2372-2379.
- McGrath, B. M., J. A. O'Halloran, et al. (2005). "Pre-exposure to UV irradiation increases the transfer frequency of the IncJ conjugative transposon-like elements R391, R392, R705, R706, R997 and pMERPH and is recA⁺ dependent." FEMS Microbiol Lett **243**(2): 461-465.
- McLeod, S. M., V. Burrus, et al. (2006). "Requirement for *Vibrio cholerae* integration host factor in conjugative DNA transfer." J Bacteriol **188**(16): 5704-5711.
- McMahon, S. A., G. A. Roberts, et al. (2009). "Extensive DNA mimicry by the ArdA anti-restriction protein and its role in the spread of antibiotic resistance." Nucleic Acids Res **37**(15): 4887-4897.

- Mereghetti, L., I. Sitkiewicz, et al. (2008). "Extensive adaptive changes occur in the transcriptome of *Streptococcus agalactiae* (group B streptococcus) in response to incubation with human blood." PLoS One **3**(9): e3143.
- Mereghetti, L., I. Sitkiewicz, et al. (2008). "Remodeling of the *Streptococcus agalactiae* transcriptome in response to growth temperature." PLoS One **3**(7): e2785.
- Mian, G. F., D. T. Godoy, et al. (2009). "Aspects of the natural history and virulence of *S. agalactiae* infection in *Nile tilapia*." Vet Microbiol **136**(1-2): 180-183.
- Mills, D. A., T. G. Phister, et al. (1998). "An origin of transfer (*oriT*) on the conjugative element pRS01 from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ML3." Appl Environ Microbiol **64**(4): 1541-1544.
- Mingoia, M., E. Tili, et al. (2011). "Heterogeneity of Tn5253-like composite elements in clinical *Streptococcus pneumoniae* isolates." Antimicrob Agents Chemother **55**(4): 1453-1459.
- Minoia, M., M. Gaillard, et al. (2008). "Stochasticity and bistability in horizontal transfer control of a genomic island in *Pseudomonas*." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(52): 20792-20797.
- Miyazaki, R., M. Minoia, et al. (2012). "Cellular variability of RpoS expression underlies subpopulation activation of an integrative and conjugative element." PLoS Genet **8**(7): e1002818.
- Miyazaki, R. and J. R. van der Meer (2011). "A dual functional origin of transfer in the ICE_{clc} genomic island of *Pseudomonas knackmussii* B13." Mol Microbiol **79**(3): 743-758.
- Mochizuki, S., K. Hiratsu, et al. (2003). "The large linear plasmid pSLA2-L of *Streptomyces rochei* has an unusually condensed gene organization for secondary metabolism." Mol Microbiol **48**(6): 1501-1510.
- Mohd-Zain, Z., S. L. Turner, et al. (2004). "Transferable antibiotic resistance elements in *Haemophilus influenzae* share a common evolutionary origin with a diverse family of syntenic genomic islands." J Bacteriol **186**(23): 8114-8122.
- Mojica, F. J., C. Diez-Villasenor, et al. (2005). "Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements." J Mol Evol **60**(2): 174-182.
- Moon, K., N. B. Shoemaker, et al. (2005). "Regulation of excision genes of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT." J Bacteriol **187**(16): 5732-5741.
- Moon, K., J. Sonnenburg, et al. (2007). "Unexpected effect of a *Bacteroides* conjugative transposon, CTnDOT, on chromosomal gene expression in its bacterial host." Mol Microbiol **64**(6): 1562-1571.
- Mullany, P., A. P. Roberts, et al. (2002). "Mechanism of integration and excision in conjugative transposons." Cell Mol Life Sci **59**(12): 2017-2022.
- Muller, T. A., C. Werlen, et al. (2003). "Evolution of a chlorobenzene degradative pathway among bacteria in a contaminated groundwater mediated by a genomic island in *Ralstonia*." Environ Microbiol **5**(3): 163-173.

- Mulvey, M. R., D. A. Boyd, et al. (2006). "The genetics of Salmonella genomic island 1." Microbes Infect **8**(7): 1915-1922.
- Munoz-Najar, U. and M. N. Vijayakumar (1999). "An operon that confers UV resistance by evoking the SOS mutagenic response in streptococcal conjugative transposon Tn5252." J Bacteriol **181**(9): 2782-2788.
- Murphy, R. A. and E. F. Boyd (2008). "Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates." J Bacteriol **190**(2): 636-647.
- Murray, N. E. (2000). "Type I restriction systems: sophisticated molecular machines (a legacy of Bertani and Weigle)." Microbiol Mol Biol Rev **64**(2): 412-434.
- Nakayama, K., A. Yamashita, et al. (2008). "The Whole-genome sequencing of the obligate intracellular bacterium *Orientia tsutsugamushi* revealed massive gene amplification during reductive genome evolution." DNA Res **15**(4): 185-199.
- Nekrasov, S. V., O. V. Agafonova, et al. (2007). "Plasmid-encoded antirestriction protein ArdA can discriminate between type I methyltransferase and complete restriction-modification system." J Mol Biol **365**(2): 284-297.
- Nelson, W. C., M. T. Howard, et al. (1995). "The traY gene product and integration host factor stimulate *Escherichia coli* DNA helicase I-catalyzed nicking at the F plasmid *oriT*." J Biol Chem **270**(47): 28374-28380.
- Nobbs, A. H., R. J. Lamont, et al. (2009). "Streptococcus adherence and colonization." Microbiol Mol Biol Rev **73**(3): 407-450, Table of Contents.
- Novick, R. P., G. E. Christie, et al. (2010). "The phage-related chromosomal islands of Gram-positive bacteria." Nat Rev Microbiol **8**(8): 541-551.
- Ochman, H., J. G. Lawrence, et al. (2000). "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation." Nature **405**(6784): 299-304.
- Oppenheim, A. B., O. Kobiler, et al. (2005). "Switches in bacteriophage lambda development." Annu Rev Genet **39**: 409-429.
- Ortega, M. E. and C. E. Catalano (2006). "Bacteriophage lambda gpNu1 and *Escherichia coli* IHF proteins cooperatively bind and bend viral DNA: implications for the assembly of a genome-packaging motor." Biochemistry **45**(16): 5180-5189.
- Osorio, C. R., J. Marrero, et al. (2008). "Genomic and functional analysis of ICEPdaSpa1, a fish-pathogen-derived SXT-related integrating conjugative element that can mobilize a virulence plasmid." J Bacteriol **190**(9): 3353-3361.
- Palmieri, C., G. Magi, et al. (2012). "Characterization of a *Streptococcus suis* tet(O/W/32/O)-carrying element transferable to major streptococcal pathogens." Antimicrob Agents Chemother **56**(9): 4697-4702.
- Papagiannis, C. V., M. D. Sam, et al. (2007). "Fis targets assembly of the Xis nucleoprotein filament to promote excisive recombination by phage lambda." J Mol Biol **367**(2): 328-343.

- Park, J. and A. A. Salyers (2011). "Characterization of the *Bacteroides* CTnDOT regulatory protein RteC." J Bacteriol **193**(1): 91-97.
- Parker, C. and R. Meyer (2005). "Mechanisms of strand replacement synthesis for plasmid DNA transferred by conjugation." J Bacteriol **187**(10): 3400-3406.
- Pavlovic, G., V. Burrus, et al. (2004). "Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICESt1-related elements from *Streptococcus thermophilus*." Microbiology **150**(Pt 4): 759-774.
- Pernodet, J. L., J. M. Simonet, et al. (1984). "Plasmids in different strains of *Streptomyces ambofaciens*: free and integrated form of plasmid pSAM2." Mol Gen Genet **198**(1): 35-41.
- Perry, R. D. and J. D. Fetherston (1997). "*Yersinia pestis*--etiologic agent of plague." Clin Microbiol Rev **10**(1): 35-66.
- Phillips, Z. E. and M. A. Strauch (2002). "*Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression." Cell Mol Life Sci **59**(3): 392-402.
- Pickard, D., J. Wain, et al. (2003). "Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7." J Bacteriol **185**(17): 5055-5065.
- Pinto, U. M., K. M. Pappas, et al. (2012). "The ABCs of plasmid replication and segregation." Nat Rev Microbiol **10**(11): 755-765.
- Polard, P. and M. Chandler (1995). "Bacterial transposases and retroviral integrases." Mol Microbiol **15**(1): 13-23.
- Possoz, C., J. Gagnat, et al. (2003). "Conjugal immunity of *Streptomyces* strains carrying the integrative element pSAM2 is due to the pif gene (pSAM2 immunity factor)." Mol Microbiol **47**(5): 1385-1393.
- Possoz, C., C. Ribard, et al. (2001). "The integrative element pSAM2 from *Streptomyces*: kinetics and mode of conjugal transfer." Mol Microbiol **42**(1): 159-166.
- Poyart-Salmeron, C., P. Trieu-Cuot, et al. (1989). "Molecular characterization of two proteins involved in the excision of the conjugative transposon Tn1545: homologies with other site-specific recombinases." EMBO J **8**(8): 2425-2433.
- Qiu, X., A. U. Gurkar, et al. (2006). "Interstrain transfer of the large pathogenicity island (PAPI-1) of *Pseudomonas aeruginosa*." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(52): 19830-19835.
- Que, Y. A., J. A. Haefliger, et al. (2000). "Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using a new shuttle vector." Infect Immun **68**(6): 3516-3522.
- Ragonese, H., D. Haisch, et al. (2007). "The F plasmid-encoded TraM protein stimulates relaxosome-mediated cleavage at *oriT* through an interaction with TraI." Mol Microbiol **63**(4): 1173-1184.
- Rajagopal, L. (2009). "Understanding the regulation of Group B Streptococcal virulence factors." Future Microbiol **4**(2): 201-221.

- Ramsay, J. P., A. S. Major, et al. (2012). "A widely conserved molecular switch controls quorum sensing and symbiosis island transfer in *Mesorhizobium loti* through expression of a novel antiactivator." Mol Microbiol.
- Ramsay, J. P., J. T. Sullivan, et al. (2009). "A LuxRI-family regulatory system controls excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* strain R7A symbiosis island by activating expression of two conserved hypothetical genes." Mol Microbiol **73**(6): 1141-1155.
- Ramsay, J. P., J. T. Sullivan, et al. (2006). "Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS." Mol Microbiol **62**(3): 723-734.
- Rauch, P. J. and W. M. De Vos (1992). "Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*." J Bacteriol **174**(4): 1280-1287.
- Ravatn, R., S. Studer, et al. (1998). "Int-B13, an unusual site-specific recombinase of the bacteriophage P4 integrase family, is responsible for chromosomal insertion of the 105-kilobase *clc* element of *Pseudomonas* sp. Strain B13." J Bacteriol **180**(21): 5505-5514.
- Ravin, N. V. (2011). "N15: the linear phage-plasmid." Plasmid **65**(2): 102-109.
- Rawlings, D. E. and E. Tietze (2001). "Comparative biology of IncQ and IncQ-like plasmids." Microbiol Mol Biol Rev **65**(4): 481-496, table of contents.
- Raynal, A., K. Tophile, et al. (1998). "Structure of the chromosomal insertion site for pSAM2: functional analysis in *Escherichia coli*." Mol Microbiol **28**(2): 333-342.
- Reuther, J., C. Gekeler, et al. (2006). "Unique conjugation mechanism in mycelial streptomycetes: a DNA-binding ATPase translocates unprocessed plasmid DNA at the hyphal tip." Mol Microbiol **61**(2): 436-446.
- Rice, L. B. and L. L. Carias (1998). "Transfer of Tn5385, a composite, multiresistance chromosomal element from *Enterococcus faecalis*." J Bacteriol **180**(3): 714-721.
- Rice, L. B., L. L. Carias, et al. (2007). "Characterization of Tn5386, a Tn916-related mobile element." Plasmid **58**(1): 61-67.
- Richards, V. P., P. Lang, et al. (2011). "Comparative genomics and the role of lateral gene transfer in the evolution of bovine adapted *Streptococcus agalactiae*." Infect Genet Evol **11**(6): 1263-1275.
- Richardson, P. T. and S. F. Park (1997). "Integration of heterologous plasmid DNA into multiple sites on the genome of *Campylobacter coli* following natural transformation." J Bacteriol **179**(5): 1809-1812.
- Roberts, A. P., M. Chandler, et al. (2008). "Revised nomenclature for transposable genetic elements." Plasmid **60**(3): 167-173.
- Roberts, A. P. and P. Mullany (2009). "A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements." Trends Microbiol **17**(6): 251-258.

- Rocco, J. M. and G. Churchward (2006). "The integrase of the conjugative transposon Tn916 directs strand- and sequence-specific cleavage of the origin of conjugal transfer, *oriT*, by the endonuclease Orf20." J Bacteriol **188**(6): 2207-2213.
- Roche, D., M. Flechard, et al. (2010). "ICEEc2, a new integrative and conjugative element belonging to the pKLC102/PAGI-2 family, identified in *Escherichia coli* strain BEN374." J Bacteriol **192**(19): 5026-5036.
- Rogers, M. B., N. J. Patron, et al. (2007). "Horizontal transfer of a eukaryotic plastid-targeted protein gene to cyanobacteria." BMC Biol **5**: 26.
- Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, et al. (1995a). "In the driver's seat: the *Bacteroides* conjugative transposons and the elements they mobilize." J Bacteriol **177**(20): 5727-5731.
- Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, et al. (1995b). "Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements." Microbiol Rev **59**(4): 579-590.
- Sambrook, J. and I. Russell (2001). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, New-York, Cold spring Harbor Laboratory
- Sampath, J. and M. N. Vijayakumar (1998). "Identification of a DNA cytosine methyltransferase gene in conjugative transposon Tn5252." Plasmid **39**(1): 63-76.
- Santagati, M., F. Iannelli, et al. (2003). "The novel conjugative transposon tn1207.3 carries the macrolide efflux gene *mef(A)* in *Streptococcus pyogenes*." Microb Drug Resist **9**(3): 243-247.
- Schroder, G. and E. Lanka (2005). "The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA." Plasmid **54**(1): 1-25.
- Schubert, S., S. Dufke, et al. (2004a). "A novel integrative and conjugative element (ICE) of *Escherichia coli*: the putative progenitor of the *Yersinia* high-pathogenicity island." Mol Microbiol **51**(3): 837-848.
- Schubert, S., A. Rakin, et al. (2004b). "The *Yersinia* high-pathogenicity island (HPI): evolutionary and functional aspects." Int J Med Microbiol **294**(2-3): 83-94.
- Scott, J. R., F. Bringel, et al. (1994). "Conjugative transposition of Tn916: preferred targets and evidence for conjugative transfer of a single strand and for a double-stranded circular intermediate." Mol Microbiol **11**(6): 1099-1108.
- Scott, J. R., P. A. Kirchman, et al. (1988). "An intermediate in transposition of the conjugative transposon Tn916." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(13): 4809-4813.
- Sebahia, M., B. W. Wren, et al. (2006). "The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome." Nat Genet **38**(7): 779-786.
- Sentchilo, V., K. Czechowska, et al. (2009). "Intracellular excision and reintegration dynamics of the ICE*clc* genomic island of *Pseudomonas knackmussii* sp. strain B13." Mol Microbiol **72**(5): 1293-1306.
- Sentchilo, V., R. Ravatn, et al. (2003a). "Unusual integrase gene expression on the *clc* genomic island in *Pseudomonas* sp. strain B13." J Bacteriol **185**(15): 4530-4538.

Sentchilo, V., A. J. Zehnder, et al. (2003b). "Characterization of two alternative promoters for integrase expression in the *clc* genomic island of *Pseudomonas* sp. strain B13." Mol Microbiol **49**(1): 93-104.

Serfiotis-Mitsa, D., G. A. Roberts, et al. (2008). "The Orf18 gene product from conjugative transposon Tn916 is an ArdA antirestriction protein that inhibits type I DNA restriction-modification systems." J Mol Biol **383**(5): 970-981.

Shu, A. C., C. C. Wu, et al. (2008). "Evidence of DNA transfer through F-pilus channels during *Escherichia coli* conjugation." Langmuir **24**(13): 6796-6802.

Siguier, P., J. Filee, et al. (2006). "Insertion sequences in prokaryotic genomes." Curr Opin Microbiol **9**(5): 526-531.

Singer, M., T. A. Baker, et al. (1989). "A collection of strains containing genetically linked alternating antibiotic resistance elements for genetic mapping of *Escherichia coli*." Microbiol Rev **53**(1): 1-24.

Sitkiewicz, I., N. M. Green, et al. (2011). "Lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins." BMC Microbiol **11**: 65.

Skippington, E. and M. A. Ragan (2011). "Lateral genetic transfer and the construction of genetic exchange communities." FEMS Microbiol Rev **35**(5): 707-735.

Smidt, H., D. Song, et al. (1999). "Random transposition by Tn916 in *Desulfotobacterium dehalogenans* allows for isolation and characterization of halorespiration-deficient mutants." J Bacteriol **181**(22): 6882-6888.

Smillie, C., M. P. Garcillan-Barcia, et al. (2010). "Mobility of plasmids." Microbiol Mol Biol Rev **74**(3): 434-452.

Smith, M. C. and H. M. Thorpe (2002). "Diversity in the serine recombinases." Mol Microbiol **44**(2): 299-307.

Smits, W. K. and A. D. Grossman (2010). "The transcriptional regulator Rok binds A+T-rich DNA and is involved in repression of a mobile genetic element in *Bacillus subtilis*." PLoS Genet **6**(11): e1001207.

Smyth, D. S. and D. A. Robinson (2009). "Integrative and sequence characteristics of a novel genetic element, ICE6013, in *Staphylococcus aureus*." J Bacteriol **191**(19): 5964-5975.

Solomon, J. M., B. A. Lazazzera, et al. (1996). "Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*." Genes Dev **10**(16): 2014-2024.

Sorensen, U. B., K. Poulsen, et al. (2010). "Emergence and global dissemination of host-specific *Streptococcus agalactiae* clones." MBio **1**(3).

Springael, D., S. Kreps, et al. (1993). "Identification of a catabolic transposon, Tn4371, carrying biphenyl and 4-chlorobiphenyl degradation genes in *Alcaligenes eutrophus* A5." J Bacteriol **175**(6): 1674-1681.

- Springael, D., K. Peys, et al. (2002). "Community shifts in a seeded 3-chlorobenzoate degrading membrane biofilm reactor: indications for involvement of in situ horizontal transfer of the *clc*-element from inoculum to contaminant bacteria." Environ Microbiol **4**(2): 70-80.
- Srinivas, P., A. O. Kilic, et al. (1997). "Site-specific nicking in vitro at *ori T* by the DNA relaxase of Tn5252." Plasmid **37**(1): 42-50.
- Stanton, T. B. (2007). "Prophage-like gene transfer agents-novel mechanisms of gene exchange for Methanococcus, Desulfovibrio, Brachyspira, and Rhodobacter species." Anaerobe **13**(2): 43-49.
- Stroher, E. and A. H. Millar (2012). "The biological roles of glutaredoxins." Biochem J **446**(3): 333-348.
- Su, Y. A., P. He, et al. (1992). "Characterization of the *tet(M)* determinant of Tn916: evidence for regulation by transcription attenuation." Antimicrob Agents Chemother **36**(4): 769-778.
- Sukhnanand, S., B. Dogan, et al. (2005). "Molecular subtyping and characterization of bovine and human *Streptococcus agalactiae* isolates." J Clin Microbiol **43**(3): 1177-1186.
- Sullivan, J. T., S. D. Brown, et al. (2001). "The bio operon on the acquired symbiosis island of *Mesorhizobium* sp. strain R7A includes a novel gene involved in pimeloyl-CoA synthesis." Microbiology **147**(Pt 5): 1315-1322.
- Sullivan, J. T. and C. W. Ronson (1998). "Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(9): 5145-5149.
- Sullivan, J. T., J. R. Trzebiatowski, et al. (2002). "Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A." J Bacteriol **184**(11): 3086-3095.
- Summers, D. (1998). "Timing, self-control and a sense of direction are the secrets of multicopy plasmid stability." Mol Microbiol **29**(5): 1137-1145.
- Sutanto, Y., J. M. DiChiara, et al. (2004). "Factors required in vitro for excision of the Bacteroides conjugative transposon, CTnDOT." Plasmid **52**(2): 119-130.
- Swinger, K. K. and P. A. Rice (2004). "IHF and HU: flexible architects of bent DNA." Curr Opin Struct Biol **14**(1): 28-35.
- Takamatsu, D., M. Osaki, et al. (2001). "Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors." Plasmid **45**(2): 101-113.
- Tazi, A., P. C. Morand, et al. (2011). "Invasive group B streptococcal infections in adults, France (2007-2010)." Clin Microbiol Infect **17**(10): 1587-1589.
- te Poele, E. M., H. Bolhuis, et al. (2008). "Actinomycete integrative and conjugative elements." Antonie Van Leeuwenhoek **94**(1): 127-143.
- Tettelin, H., V. Massignani, et al. (2005a). "Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial "pan-genome"." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13950-13955.

- Tettelin, H., V. Maignani, et al. (2002b). "Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(19): 12391-12396.
- Thoma, L. and G. Muth (2012). "Conjugative DNA transfer in *Streptomyces* by TraB: is one protein enough?" FEMS Microbiol Lett **337**(2): 81-88.
- Thomas, C. M. and K. M. Nielsen (2005). "Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria." Nat Rev Microbiol **3**(9): 711-721.
- Thomas, J., C. A. Lee, et al. (2013). "A conserved helicase processivity factor is needed for conjugation and replication of an integrative and conjugative element." PLoS Genet **9**(1): e1003198.
- Ton-That, H., L. A. Marraffini, et al. (2004). "Protein sorting to the cell wall envelope of Gram-positive bacteria." Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 269-278.
- Top, E. M., D. Springael, et al. (2002). "Catabolic mobile genetic elements and their potential use in bioaugmentation of polluted soils and waters." FEMS Microbiol Ecol **42**(2): 199-208.
- Toussaint, A. and C. Merlin (2002). "Mobile elements as a combination of functional modules." Plasmid **47**(1): 26-35.
- Tun-Garrido, C., P. Bustos, et al. (2003). "Conjugative transfer of p42a from rhizobium etli CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by quorum sensing." J Bacteriol **185**(5): 1681-1692.
- van der Meer, J. R. and V. Sentchilo (2003). "Genomic islands and the evolution of catabolic pathways in bacteria." Curr Opin Biotechnol **14**(3): 248-254.
- Van Melderen, L. and M. Saavedra De Bast (2009). "Bacterial toxin-antitoxin systems: more than selfish entities?" PLoS Genet **5**(3): e1000437.
- Vedantam, G. and D. W. Hecht (2002). "Isolation and characterization of BTF-37: chromosomal DNA captured from *Bacteroides fragilis* that confers self-transferability and expresses a pilus-like structure in *Bacteroides* spp. and *Escherichia coli*." J Bacteriol **184**(3): 728-738.
- Vijayakumar, M. N. and S. Ayalew (1993). "Nucleotide sequence analysis of the termini and chromosomal locus involved in site-specific integration of the streptococcal conjugative transposon Tn5252." J Bacteriol **175**(9): 2713-2719.
- Vogelmann, J., M. Ammelburg, et al. (2011). "Conjugal plasmid transfer in *Streptomyces* resembles bacterial chromosome segregation by FtsK/SpoIIIE." EMBO J **30**(11): 2246-2254.
- Wang, G. R., N. B. Shoemaker, et al. (2011). "CTn12256, a chimeric *Bacteroides* conjugative transposon that consists of two independently active mobile elements." Plasmid **66**(2): 93-105.
- Wang, H. and P. Mullany (2000). "The large resolvase TndX is required and sufficient for integration and excision of derivatives of the novel conjugative transposon Tn5397." J Bacteriol **182**(23): 6577-6583.

- Wang, H., A. P. Roberts, et al. (2000). "Characterization of the ends and target sites of the novel conjugative transposon Tn5397 from *Clostridium difficile*: excision and circularization is mediated by the large resolvase, TndX." J Bacteriol **182**(13): 3775-3783.
- Wang, H., A. P. Roberts, et al. (2000). "DNA sequence of the insertional hot spot of Tn916 in the *Clostridium difficile* genome and discovery of a Tn916-like element in an environmental isolate integrated in the same hot spot." FEMS Microbiol Lett **192**(1): 15-20.
- Wang, J., G. R. Wang, et al. (2001). "Production of two proteins encoded by the *Bacteroides mobilizable* transposon NBU1 correlates with time-dependent accumulation of the excised NBU1 circular form." J Bacteriol **183**(21): 6335-6343.
- Wang, Y., E. R. Rotman, et al. (2005). "Translational control of tetracycline resistance and conjugation in the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT." J Bacteriol **187**(8): 2673-2680.
- Wang, Y., N. B. Shoemaker, et al. (2004). "Regulation of a *Bacteroides* operon that controls excision and transfer of the conjugative transposon CTnDOT." J Bacteriol **186**(9): 2548-2557.
- Wanger, A. R. and G. M. Dunny (1987). "Identification of a *Streptococcus agalactiae* protein antigen associated with bovine mastitis isolates." Infect Immun **55**(5): 1170-1175.
- Wesslund, N. A., G. R. Wang, et al. (2007). "Integration and excision of a newly discovered *Bacteroides* conjugative transposon, CTnBST." J Bacteriol **189**(3): 1072-1082.
- Whetzel, P. L., L. L. Hnatow, et al. (2003). "Transposon mutagenesis of *Mycoplasma gallisepticum*." Plasmid **49**(1): 34-43.
- Whittle, G., B. D. Hund, et al. (2001). "Characterization of the 13-kilobase *ermF* region of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT." Appl Environ Microbiol **67**(8): 3488-3495.
- Whittle, G., N. B. Shoemaker, et al. (2002). "Characterization of genes involved in modulation of conjugal transfer of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT." J Bacteriol **184**(14): 3839-3847.
- Wibawan, I. W. and C. Lammler (1990). "Properties of group B streptococci with protein surface antigens X and R." J Clin Microbiol **28**(12): 2834-2836.
- Wiedenheft, B., S. H. Sternberg, et al. (2012). "RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea." Nature **482**(7385): 331-338.
- Wilkins, B. M. (2002). "Plasmid promiscuity: meeting the challenge of DNA immigration control." Environ Microbiol **4**(9): 495-500.
- Wilkins, B. M. and A. T. Thomas (2000). "DNA-independent transport of plasmid primase protein between bacteria by the I1 conjugation system." Mol Microbiol **38**(3): 650-657.

- Will, W. R. and L. S. Frost (2006). "Characterization of the opposing roles of H-NS and TraJ in transcriptional regulation of the F-plasmid *tra* operon." J Bacteriol **188**(2): 507-514.
- Williams, K. P. (2002). "Integration sites for genetic elements in prokaryotic tRNA and tmRNA genes: sublocation preference of integrase subfamilies." Nucleic Acids Res **30**(4): 866-875.
- Williamson, E. D. and P. C. Oyston (2012). "The natural history and incidence of *Yersinia pestis* and prospects for vaccination." J Med Microbiol **61**(Pt 7): 911-918.
- Wilson, G. G. and N. E. Murray (1991). "Restriction and modification systems." Annu Rev Genet **25**: 585-627.
- Wolkow, C. A., R. T. DeBoy, et al. (1996). "Conjugating plasmids are preferred targets for Tn7." Genes Dev **10**(17): 2145-2157.
- Wong, J. J., J. Lu, et al. (2012). "Relaxosome function and conjugation regulation in F-like plasmids - a structural biology perspective." Mol Microbiol **85**(4): 602-617.
- Wozniak, R. A., D. E. Fouts, et al. (2009a). "Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs." PLoS Genet **5**(12): e1000786.
- Wozniak, R. A. and M. K. Waldor (2009b). "A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element." PLoS Genet **5**(3): e1000439.
- Wozniak, R. A. and M. K. Waldor (2010). "Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow." Nat Rev Microbiol **8**(8): 552-563.
- Zadoks, R. N., J. R. Middleton, et al. (2011). "Molecular epidemiology of mastitis pathogens of dairy cattle and comparative relevance to humans." J Mammary Gland Biol Neoplasia **16**(4): 357-372.

ANNEXES

Annexe 1 : Article Journal of Bacteriology

Conjugative Transfer and *cis*-Mobilization of a Genomic Island by an Integrative and Conjugative Element of *Streptococcus agalactiae*

Aurore Puymège,^{a,b} Stéphane Bertin,^{a,b} Sarah Chuzeville,^{a,b,c} Gérard Guédon,^{a,b} Sophie Payot^{a,b}

INRA, UMR1128 Génétique et Microbiologie, Faculté des Sciences et Technologies, Vandœuvre-lès-Nancy, France^a; Université de Lorraine, UMR1128 Génétique et Microbiologie, Faculté des Sciences et Technologies, Vandœuvre-lès-Nancy, France^b; Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, ANSES Lyon, Lyon, France^c

Putative integrative and conjugative elements (ICEs), i.e., genomic islands which could excise, self-transfer by conjugation, and integrate into the chromosome of the bacterial host strain, were previously identified by *in silico* analysis in the sequenced genomes of *Streptococcus agalactiae* (M. Brochet et al., J. Bacteriol. 190:6913–6917, 2008). We investigated here the mobility of the elements integrated into the 3' end of a tRNA^{Lys} gene. Three of the four putative ICEs tested were found to excise but only one (ICE_{515_tRNA^{Lys}}) was found to transfer by conjugation not only to *S. agalactiae* strains but also to a *Streptococcus pyogenes* strain. Transfer was observed even if recipient cell already carries a related resident ICE or a genomic island flanked by *attL* and *attR* recombination sites but devoid of conjugation or recombination genes (CIs-Mobilizable Element [CIME]). The incoming ICE preferentially integrates into the 3' end of the tRNA^{Lys} gene (i.e., the *attR* site of the resident element), leading to a CIME-ICE structure. Transfer of the whole composite element CIME-ICE was obtained, showing that the CIME is mobilizable in *cis* by the ICE. Therefore, genomic islands carrying putative virulence genes but lacking the mobility gene can be mobilized by a related ICE after site-specific accretion.

Mobile genetic elements (MGEs) and genomic islands play a key role in bacterial genome evolution by disseminating new genes and phenotypes to the recipient cells (1). The multiplication of bacterial genome sequencing projects in the last few years provides a remarkable opportunity to explore the pool of bacterial genetic mobile elements or “mobilome” (2, 3).

Bacterial genome analyses pointed out a novel class of widespread MGEs, called integrative and conjugative elements (ICEs), and related genomic islands (4–7). These chromosomal elements can excise by site-specific recombination, transfer by conjugation to another bacterial cell and integrate into the chromosome of the recipient cell (4, 7). ICEs are characterized by a combination of modules that can either be involved in their dissemination and maintenance (recombination, conjugation, and regulation modules) or confer adaptive functions to their host (catabolic properties, virulence, and antibiotic resistance) (8, 9). They evolve by acquisition, deletion, and exchange of these modules between different ICEs or with other MGEs (5, 8). The excision of most ICEs relies on an integrase of the tyrosine recombinase family, which catalyzes the site-specific recombination between identical sequences carried by *attL* (left attachment site) and *attR* (right attachment site) recombination sites flanking the element. This leads to the excision of a circular form of the ICE harboring an *attI* site (attachment site of ICE) and to a chromosomal *attB* (bacterial attachment site) empty site. After transfer, the circular ICE generally integrates into the chromosome of the recipient cell by site-specific recombination between identical sequences carried by the *attI* site and the *attB* site, including the 3' end of a tRNA gene, of a gene encoding ribosomal protein or another gene encoding a conserved protein (4).

In Gram-negative bacteria, the transfer of conjugative plasmids is initiated by a relaxase that nicks plasmid at the origin of transfer (*oriT*) and interacts with a coupling protein to convey DNA to a transport channel crossing the bacterial cell envelope (10). Little is known about the components of the conjugation machinery of conjugative plasmids and ICEs from *Firmicutes* (7).

The conjugation machinery of *Firmicutes* has been studied extensively for two conjugative plasmids: pIP501 of *Streptococcus agalactiae* and pCW3 of *Clostridium perfringens* (10). Major proteins of these conjugative systems include a relaxase ensuring DNA processing, an ATPase that likely energizes the DNA transport process, a coupling protein that links the relaxosome with the transport apparatus, and a peptidoglycan hydrolase to facilitate the assembly of the transport channel in the membrane (10). For ICEBs1 of *Bacillus subtilis*, the ATPase ConE colocalized with excised ICEBs1 DNA at or near the cell poles, suggesting that the conjugation machinery assembles at the donor cell poles (11).

Genomic islands, which carry a recombination module but encode only some the proteins required for conjugation (relaxase, other proteins of the relaxosome, and sometimes the coupling protein), could excise and use the transport apparatus of unrelated ICEs and conjugative plasmids to transfer into a recipient cell and were thus called integrative mobilizable elements (IMEs) (5). Other elements that lack recombination and conjugation modules but are flanked by recombination sites and derived from ICEs have been reported (8, 12). We recently demonstrated in *Streptococcus thermophilus* that a related ICE can integrate in these recombination sites and mobilize in *cis* the element (thus called CIs-Mobilizable Element [CIME]) (13).

We have previously detected 35 different ICEs, IMEs, and related genomic islands in eight sequenced genomes of *S. agalactiae* (group B streptococci) (14), an opportunistic pathogen responsi-

Received 5 December 2012 Accepted 20 December 2012

Published ahead of print 28 December 2012

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

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/JB.02199-12>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.02199-12

ble for invasive bacterial diseases in human neonates (15) and causing infections in various animals (16, 17). In the present study, we examined the functionality of putative ICEs of *S. agalactiae* that are integrated at the 3' end of a gene encoding a tRNA lysine (CTT anticodon) and carry a conjugation module distantly related to those of the ICEs RD2 from *S. pyogenes* and ICESt3 from *S. thermophilus*. We first test their excision as a circular form and then their conjugative transfer inside the *S. agalactiae* species and to other *Firmicutes* species. We also examine the ability of the ICEs to *cis*-mobilize a genomic island integrated into the same locus.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions. The original strains, spontaneous resistant strains, and plasmids used to obtain recipient or donor strains are listed in Table 1. Strains which were modified or mutated were named according to the modification. For example, the *S. agalactiae* Nem316 Rif^r Str^r strain refers to a spontaneous mutant selected from *S. agalactiae* Nem316 strain which is resistant to rifampin and spectinomycin.

S. agalactiae, *Streptococcus uberis*, and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* strains were grown in brain heart infusion (BHI; Difco) broth at 37°C with shaking at 150 rpm. *Streptococcus pyogenes* and *Enterococcus faecalis* strains were grown in the same conditions but without shaking. Solid cultures of these species were made on tryptic soy plates supplemented with defibrinated horse blood (5%). *S. thermophilus* strains were grown in reconstituted skim milk (10% [wt/vol]), M17 broth supplemented with 0.5% lactose (LM17; Oxoid) at 42°C in anaerobic conditions (GENbox Anaer atmosphere generators and incubation jars from bio-Mérieux). *Streptococcus salivarius* strains were grown in M17 broth supplemented with 0.5% glucose (GM17; Oxoid) at 37°C in anaerobic conditions. *Streptococcus mutans* strains were grown in Todd-Hewitt broth supplemented with 0.1% of yeast extract (Oxoid) at 37°C in anaerobic conditions. Cultures were supplemented with the following antibiotic when required: chloramphenicol, 16 µg ml⁻¹; erythromycin, 50 µg ml⁻¹; rifampin, 75 µg ml⁻¹; spectinomycin, 500 µg ml⁻¹; or streptomycin, 250 µg ml⁻¹.

Escherichia coli strains were grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C with shaking at 200 rpm. Recombinant plasmids derived from the pG+host9 vector were transformed into *E. coli* EC101 strain, a strain which contains a chromosomal copy of the pWV01 *repA* gene (18), and selected at 37°C on LB medium containing 150 µg of erythromycin ml⁻¹.

DNA manipulations, PCR, and pulsed-field gel electrophoresis. Preparation of chromosomal and plasmid DNAs was performed according to standard protocols (28).

PCRs and high-fidelity PCRs were carried out according to the manufacturer's instructions using the ThermoPol PCR kit (New England Biolabs) and the Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific), respectively. PCRs were performed with 4 µg of DNA template ml⁻¹ and included 30 cycles of amplification. The annealing step was executed at 5°C below the melting temperature (T_m) of the primers for standard PCR (ThermoPol PCR kit) and at a 3°C above the T_m of the primers for high-fidelity PCR (Phusion high-fidelity DNA polymerase). The primers used in the present study were purchased from Eurogentec and are listed in Table S1 in the supplemental material.

Transconjugants were confirmed by PCR using primers located in the SAG2026 (corresponding to the SAL_2079 gene in strain 515, 100% identical to the SAG2026 gene) gene. Transconjugants of *S. pyogenes* were also confirmed by PCR using a primer located in the ICE integrase gene (*intICESa03* Fwd) and a primer located in the tRNA^{Lys} gene (tRNA^{Lys}) (see Table S1 in the supplemental material).

The characterization of the CIME-ICE composite elements in the transconjugants of strain Nem316 was performed using three sets of primers: SAG2026-1 and *intICESa03* Fwd (for integration in the *attL* site), *intICESa03* Fwd and SAG1986 Rev (for integration in the *attI* site), and SAG1986 Fwd and SAG2026-1 (for integration in the *attR* site). Two pairs

of primers (SAG2026-1/tRNAMet Rev and SAG2026-1/tRNA16S Rev) were also used to examine integration in the two other tRNA^{Lys} genes.

Nested PCR were performed to determine the presence of an *attI* site and an *attB* site using two steps. The first step corresponds to a standard PCR except that 25 cycles of amplification were made instead of 30. In the second step, template corresponds to the PCR product obtained in the first step and primers used are internal to this fragment. Primers location and orientation are indicated in Fig. 2 and 5. Conditions used are those of the standard PCR described above. The *attI* and *attB* fragments obtained by PCR were sequenced to confirm their specificity.

Pulsed-field gel electrophoresis experiments were carried out as described previously using SmaI as the restriction enzyme (25).

ICE tagging. ICE was tagged at its left hand side by a resistance gene using the pG+host9 spc vector. Vector pG+host9spc is a derivative of the pG+host9 plasmid carrying a spectinomycin resistance gene (X. Bellanger, unpublished data). The resistance cassette was obtained from the pSET4S plasmid by digestion with the SpeI restriction enzyme and ligated to XbaI-digested pG+host9 plasmid (Bellanger, unpublished).

The locus tagged is the SAG2026 (SAL_2079) gene encoding the ATPase subunit of an ABC transporter. This gene belongs to an operon homologous to the *yydFGHIJ* operon of from *Bacillus subtilis* (32), which likely encodes a system of synthesis, maturation, and export of a signaling and/or antibacterial peptide. This operon is complete only in strain COH1; two genes are missing in the three other strains.

To construct the mutant, the 5' and 3' ends of SAG2026 gene were independently amplified by PCR (using the primers SAG2026-1-HindIII, SAG2026-2-AvrII, SAG2026-3-AvrII, and SAG2026-4-EcoRI) and subcloned in the pSL1180 vector. An erythromycin resistance gene amplified from pG+host9 was inserted in the internal AvrII site, and the whole insert (containing the two SAG2026 fragments separated by the *ery* cassette) was then cloned into pG+host9spc to give pG+host9spc-SAG2026ery, which was used to transform *S. agalactiae* by electroporation (33). Two crossovers, upstream and downstream from the tagged region, were selected as described previously to obtain replacement of the gene by the *ery* resistance gene (26).

Attempts to obtain strains of *S. agalactiae* devoid of elements integrated in tRNA^{Lys}. In order to find a strain devoid of element integrated into the 3' end the tRNA^{Lys} CTT gene to be used as recipient strain during mating experiments, a large collection of strains of *S. agalactiae* ($n = 70$) was screened by PCR. The primers used are specific for SAG1986 (SAG1986 Fwd and SAG1986 Rev) and SAG1993 (*intICESa03* Fwd and *intICESa03* Rev) integrase genes of ICE_2603_tRNA^{Lys} and specific for the SAG2026 gene (SAG2026-1 and SAG2026-4).

Two strategies were also tested for curing cells from their resident element. First, plasmids expressing the integrase and excisionase genes and carrying *attR* recombination site of ICE_515_tRNA^{Lys} were constructed and electroporated in the Nem316 and 515 strains. The purpose was to increase the excision of the elements and to select cells which would have lost them after 100 bacterial generations, as previously obtained for ICESt3 (26). The second strategy relied on exposition of the cells to mitomycin C in order to increase the excision of the ICE, as described for the distantly related ICEs ICESt3 and RD2. This strategy was tested on strain 515. Since the loss of the element could be hampered due to a putative toxin-antitoxin system encoded by ICE_515_tRNA^{Lys} (SAL_2044-SAL_2045 ORF), we also constructed a mutant deleted in the toxin gene to try to obtain cells cured of their ICEs.

Selection of spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutants to be used as recipient cells in filter-mating experiments. In a first step, rifampin-resistant mutants were selected by plating the parental strain on appropriate media containing rifampin (75 µg ml⁻¹). In a second step, rifampin- and streptomycin-resistant mutants were selected by plating the rifampin-resistant mutants obtained in the first step on appropriate media containing streptomycin (250 µg ml⁻¹). All of the selected mutants were confirmed by sequencing of the *sodA* gene (34) (see Table S1 in the supplemental material).

TABLE 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant phenotype or genotype ^a	Source or reference
Strains		
<i>S. agalactiae</i>		
515	Wild-type strain, carrying a putative ICE (ICE_515_tRNA ^{Lys})	19
2603V/R	Wild-type strain, carrying a composite ICE-IME element (ICE_2603_tRNA ^{Lys}), encoding a truncated conjugal transfer protein OrfD (ATPase VirB4 homolog)	20
COH1	Wild-type strain, carrying a putative ICE (ICE_COH1_tRNA ^{Lys}), encoding a truncated conjugal transfer protein OrfD (ATPase VirB4 homolog)	19
18RS21	Wild-type strain, carrying a putative ICE (ICE_18RS21_tRNA ^{Lys}), encoding three truncated conjugal proteins (OrfC, OrfD, and OrfL)	19
Nem316	Wild-type strain, carrying a putative CIME (CIME_Nem_tRNA ^{Lys})	21
A909	Wild-type strain, carrying a putative IME (IME_A909_tRNA ^{Lys})	19
515 (ICE_515_tRNA ^{Lys} ery)	Strain carrying ICE_515_tRNA ^{Lys} tagged by an Ery ^r cassette, Ery ^r	This study
515 (ICE_515_tRNA ^{Lys} cat)	Strain carrying ICE_515_tRNA ^{Lys} tagged by a Cm ^r cassette, Cm ^r	This study
2603V/R (ICE_2603V/R_tRNA ^{Lys} ery)	Strain carrying ICE_2603V/R_tRNA ^{Lys} tagged by an Ery ^r cassette, Ery ^r	This study
COH1 (ICE_COH1_tRNA ^{Lys} ery)	Strain carrying ICE_COH1_tRNA ^{Lys} tagged by an Ery ^r cassette, Ery ^r	This study
18RS21 (ICE_18RS21_tRNA ^{Lys} ery)	Strain carrying ICE_18RS21_tRNA ^{Lys} tagged by an Ery ^r cassette, Ery ^r	This study
Nem316 (CIME_Nem_tRNA ^{Lys} cat)	Strain carrying carrying CIME_Nem_tRNA ^{Lys} tagged by a Cm ^r cassette, Cm ^r	This study
COH1 Rif ^r Str ^r	Spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutant	This study
Nem316 Rif ^r Str ^r	Spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutant	This study
A909 Rif ^r Str ^r	Spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutant	This study
<i>S. mutans</i>		
UA159	Wild-type strain, no element integrated in the tRNA ^{Lys} CTT gene	22
UA159 Rif ^r Str ^r	Spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutant	This study
<i>S. salivarius</i>		
CIP102503	Wild-type strain	Institut Pasteur collection
JIM8777	Wild-type strain, with a putative IME integrated in the tRNA ^{Lys} CTT gene	23
CIP102503 Rif ^r Str ^r	Spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutant	This study
JIM8777 Rif ^r Str ^r	Spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutant	This study
<i>S. thermophilus</i>		
LMG18311	Wild-type strain, with a putative CIME-IME composite element integrated in the tRNA ^{Lys} CTT gene	24
LMG18311 Rif ^r Str ^r	Spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutant	This study
<i>S. uberis</i>		
20388	Wild-type strain	25
21458	Wild-type strain	25
20388 Rif ^r Str ^r	Spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutant	This study
21458 Rif ^r Str ^r	Spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutant	This study
<i>S. dysgalactiae</i>		
14998	Wild-type strain	25
16192	Wild-type strain	25
14998 Rif ^r Str ^r	Spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutant	This study
16192 Rif ^r Str ^r	Spontaneous rifampin- and streptomycin-resistant mutant	This study
<i>S. pyogenes</i>		
ATCC 12202	Wild-type strain	ATCC
ATCC 12202 Rif ^r	Spontaneous rifampin-resistant mutant	26
<i>E. faecalis</i>		
JH2-2	Rif ^r , Fus ^r	27
JH2-2 Rif ^r Str ^r	Spontaneous streptomycin-resistant mutant	This study
<i>E. coli</i>		
EC101	<i>supE hsd-5 thi (lac-proAB) F (traD6 proAB lacI^q lacZ M15) repA</i> , derivative of strain TG1	18
DH5α	<i>supE44 lacU169 (φ80 lacZ M15) hsdR17 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	28
Plasmids		
pG+host9	3.8 kb, pWV01-type thermosensitive replication origin (Ts) from pVE6002, Ery ^r	29
pSET4s	3.8 kb, pWV01-type Ts from pVE6002, <i>lacZ'</i> , Spc ^r	30
pSET5s	3.8 kb, pWV01-type Ts from pVE6002, <i>lacZ'</i> , Cm ^r	30
pSL1180	3.4 kb, pMB1 origin, superpolylinker for vector construction, Amp ^r	31

^a Abbreviations: Amp^r, ampicillin resistance; Cm^r, chloramphenicol resistance; Ery^r, erythromycin resistance; Fus^r, fusidic acid resistance; Rif^r, rifampin resistance; Spc^r, spectinomycin resistance; Str^r, streptomycin resistance.

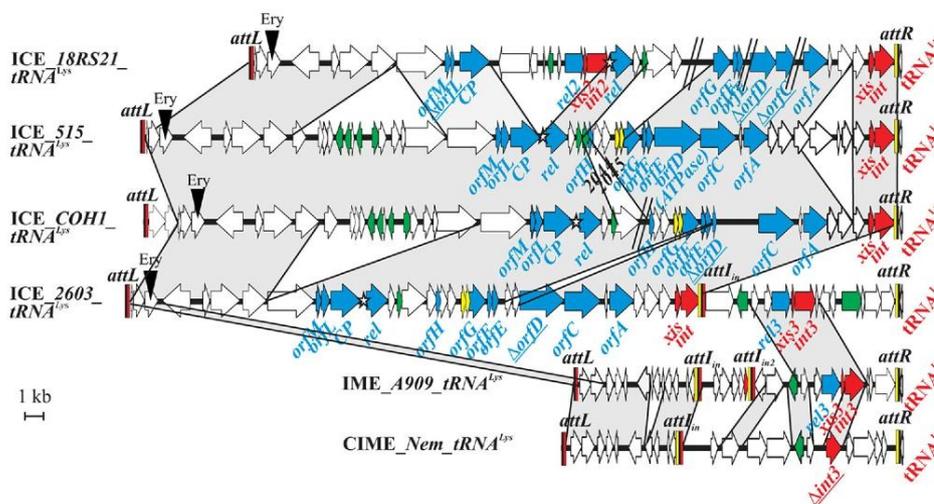


FIG 1 Open reading frame (ORF) organization and comparison of the elements integrated into the 3' end of the $tRNA^{Lys\ CTT}$ gene in *S. agalactiae* 18RS21, 515, COH1, 2603V/R, A909, and Nem316. ORFs appear as arrows (truncated genes are indicated by a delta letter and underlined). The name of the gene where the element is integrated appears in red. Genes of the conjugation module are indicated with blue arrows, genes of the regulation module are indicated with green arrows, and genes of the recombination module are indicated with red arrows. When a putative domain has been found for the gene product or a putative function can be assigned to its product, the gene is named accordingly (*rel* for relaxase, CP for coupling protein, ATPase, *xis* for excisionase, and *int* for integrase). Other genes were named according to their similarity to ICES11/St3 of *S. thermophilus*. The different genes encoding integrase, excisionase, and relaxase have been given different numbers. The putative toxin-antitoxin system (SAL2044-2045 and homologs in the other ICEs) appear as a yellow ORFs. The putative *oriT* is indicated by a star. Recombination sites are drawn as vertical rectangles. Black rectangles indicate identical sequences found in *attL*, *attR*, and *attI* sites. Yellow rectangles indicate the arm of *attR* sites and the related arm of *attI* sites, and red rectangles indicate the arm of *attL* sites and the related arms of *attI* sites. Protein identity higher than 80% is indicated in gray. Gaps in the genome due to missing contigs are indicated by a double slash.

Filter-mating experiments. The filter-mating protocol used was described previously (26). Briefly, both donor and recipient strains were grown overnight. A 15-ml culture in the relevant broth was inoculated with 150 μ l of overnight culture of the recipient or the donor strain. The cultures were grown at the relevant temperature until mid-exponential phase (optical density at 600 nm of 0.4). Cultures of the donor and recipient were mixed and centrifuged for 15 min in a prewarmed centrifuge at $4,500 \times g$ to form a cell pellet. The pellet was resuspended in 1 ml of BHI broth with or without 50 μ g of DNase I ml^{-1} (35), and 150- μ l aliquots were spread on 0.45- μ m-pore-size nitrocellulose filters (Sartorius) on tryptic soy agar plates, which were then incubated for 15 h at 37°C. The filters were removed from the agar plates and placed in 50-ml tubes containing 10 ml of sterile BHI broth, and bacteria were recovered by vortexing for 30 s. Various dilutions were spread on agar plates supplemented with the appropriate antibiotics, and the plates were incubated for 24 h in order to count the CFUs of the donor, the recipient, and the transconjugants.

DNA sequencing and sequence analysis. DNA sequencing was performed on recombinant plasmids and PCR products by Beckman Coulter genomics. BLASTN, BLASTX, BLASTP, and PSI-BLAST (36) were used to search similarities to sequences in the GenBank database. Sequences were aligned using Vector NTI advance 11 (Invitrogen).

Statistical analysis. Statistical analysis was performed as described by Georgin and Mouet (37) and Cumming et al. (38). The means and standard errors from at least three independent experiments were determined.

RESULTS

Excision of the putative ICEs integrated in the 3' end of a tRNA lysine gene in *S. agalactiae*. We previously reported that eight sequenced genomes of *S. agalactiae* display a genomic island integrated into the 3' end of the $tRNA^{Lys\ CTT}$ gene (14). Among these elements, four could be ICEs (in strains 18RS21, 515, COH1, and 2603V/R). The name that was given to the elements is composed of the nature of the element followed by the name of the

strain and the integration locus. One of these putative ICEs, ICE_2603_ $tRNA^{Lys}$, is a composite element that carries an additional recombination module, an additional putative relaxase gene and an internal *attI* site that probably results from the accretion of a putative ICE (left side from *attL* to *attI*) and a putative IME (right side from *attI* to *attR*) (Fig. 1).

We looked for excised circular forms of these four putative ICEs: one for ICE_515_ $tRNA^{Lys}$, ICE_COH1_ $tRNA^{Lys}$, and ICE_18RS21_ $tRNA^{Lys}$ (Fig. 2A) and three different possible circular forms for ICE_2603V/R_ $tRNA^{Lys}$ since this element carries an internal *attI* site (Fig. 2C). By nested PCR, we detected an excised circular form for ICE_515_ $tRNA^{Lys}$ and ICE_18RS21_ $tRNA^{Lys}$ but not for ICE_COH1_ $tRNA^{Lys}$ (Fig. 2B). An empty *attB* site was, however, detected for this latter strain (data not shown). Furthermore, two different excised forms were observed for ICE_2603_ $tRNA^{Lys}$ (Fig. 2D), indicating that the IME integrated beside the ICE in this strain is able to excise alone or together with the ICE. All of the fragments obtained by nested PCR were confirmed by sequencing.

Test of intraspecies conjugative transfer of the putative ICEs integrated in the 3' end of a tRNA lysine gene in *S. agalactiae*. To test whether the four putative ICEs described above are able to transfer by conjugation, they were tagged at their left extremity by an erythromycin resistance cassette after allelic replacement of a gene encoding a membrane subunit of a putative ABC transporter (SAL_2079/SAG2026 gene) (Fig. 1).

The strains harboring these tagged elements were then used as donor cells in filter mating experiments with three different recipient strains that all harbor elements flanked by *attL* and *attR* sites: (i) strain COH1, which harbors a putative ICE as mentioned previously; (ii) strain A909, which harbors a putative IME (i.e., an

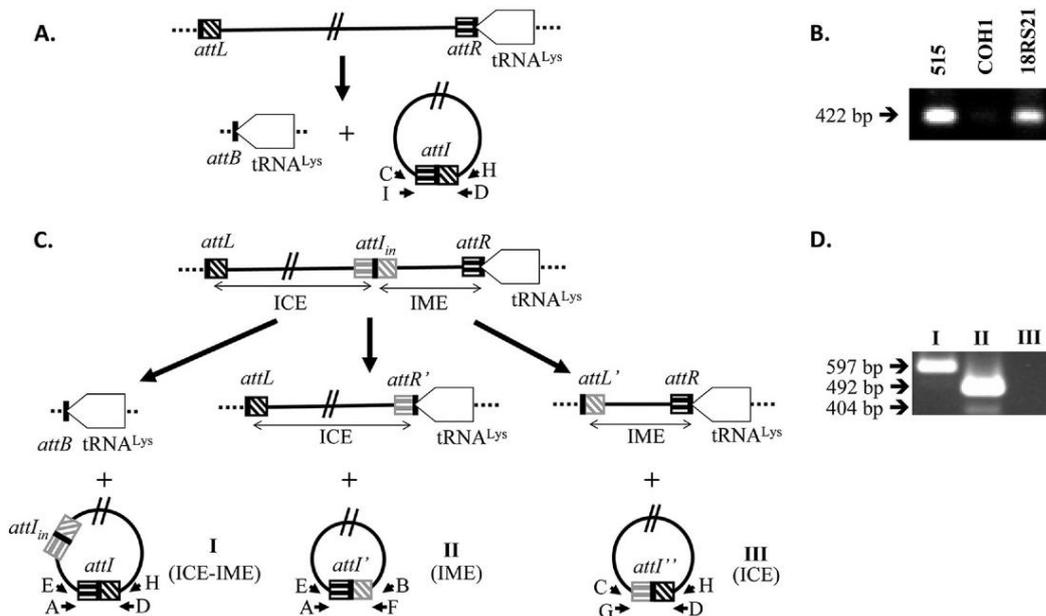


FIG 2 Schematic representation of the site-specific excision of the ICEs integrated in the 3' end of the *S. agalactiae* tRNA^{Lys} gene. Primers used to detect DNA molecules resulting from site-specific recombination events are indicated by letters. (A) Model of ICE_515_tRNA^{Lys}, ICE_COH1_tRNA^{Lys}, and ICE_18RS21_tRNA^{Lys} excision. (B) Electrophoresis of nested PCR product obtained for the 515, COH1, and 18RS21 strains of *S. agalactiae*. (C) Model of ICE_2603V/R_tRNA^{Lys} excision where three different circular forms could be obtained. (D) Electrophoresis of nested PCR products obtained for the 2603V/R strain.

element with a recombination module, a gene encoding the relaxase, but lacks genes required for mating pore assembly); and (iii) strain Nem316, which carries an element devoid of recombination and conjugation genes (CIME). We were not able to test a recipient strain devoid of element integrated in the tRNA^{Lys}^{CTT} gene since all our efforts to obtain such a strain (by screening of a large collection of strains or by artificial curing of a strain carrying an element) were unsuccessful (see Materials and Methods for more details).

ICE_515_tRNA^{Lys} was found to transfer by conjugation to the Nem316 strain and to the COH1 strain at frequencies of $4.0 \times 10^{-7} \pm 0.8 \times 10^{-7}$ and $0.7 \times 10^{-7} \pm 0.1 \times 10^{-7}$ CFU of transconjugants per CFU of donor cells, respectively. As expected, PCR on the SAL_2079/SAG2026 gene gave two fragments for the transconjugants (one for the gene present on the resident element and another of higher size corresponding to the gene that is carried by the incoming ICE and is interrupted by the erythromycin cassette) (data not shown). No transconjugant was obtained when cell-cell contacts were prevented by placing a filter between donor and recipient cells. Furthermore, the addition of DNase I in the growth medium had no impact on the number of transconjugants, indicating that DNA transfer occurred by conjugation. No transconjugant was obtained when the A909 strain was used as recipient cells.

ICE was found to retransfer if transconjugants (carrying a CIME *cat*-ICE *ery* element) were used as donor cells and rifampin-streptomycin mutants of the Nem316 strain were used as recipient cells. The frequency of retransfer was higher ($2.2 \times 10^{-5} \pm 0.9 \times 10^{-5}$ CFU of transconjugants per CFU of donor cells) than the one obtained for transfer from strain 515 to strain Nem316. This indicates that ICE_515_tRNA^{Lys} is able to self-transfer by conjugation and therefore is an ICE. In contrast, no conjugative transfer

was observed for the three other putative ICEs tested (ICE_2603_tRNA^{Lys}, ICE_18RS21_tRNA^{Lys}, and ICE_COH1_tRNA^{Lys}).

Test of interspecies conjugative transfer of ICE_515_tRNA^{Lys}. Since ICE_515_tRNA^{Lys} was shown to transfer by conjugation to a *S. agalactiae* recipient strain, we also tested whether it can transfer to other bacterial species. Seven different species belonging to the *Firmicutes* were tested as recipient cells: *S. salivarius* (CIP102503 and JIM8777), *S. thermophilus* (LMG18311), *S. pyogenes* (ATCC 12202), *S. uberis* (20388 and 21458), *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (14998 and 16192), *S. mutans* (UA159), and *E. faecalis* (JH2-2). Spontaneous rifampin and streptomycin mutants were first selected for these strains in order to use them as recipient cells in the mating experiments. Transconjugants were obtained only when using *S. pyogenes* as recipient cells. However, even for this species, transconjugants were obtained only in three experiments out of nine experiments performed, and only 20 different clones of transconjugants were isolated. The acquired ICE is integrated into the 3' end of the tRNA^{Lys}^{CTT} gene of the transconjugants, as shown by PCR using primers located in this tRNA^{Lys} gene and in the integrase gene of ICE_515_tRNA^{Lys} (Fig. 3A). In addition, they have the same genetic background than the recipient *S. pyogenes* strain, as shown by pulsed-field gel electrophoresis (Fig. 3B).

Site-specific accretion between ICE_515_tRNA^{Lys} and related elements. Since the Nem316 strain used as recipient cells for the mating experiments carries an internal recombination site in its element integrated in the tRNA^{Lys}^{CTT} gene, the incoming ICE could integrate into three different positions: the left (*attL*), the internal (*attI*), or the right (*attR*) recombination sites of the resident CIME (Fig. 4). Testing of 100 transconjugants by PCR indicated that integration occurs preferentially in the *attR* recombination site (96% versus 4% in the *attL* site and 0% in the *attI* site),

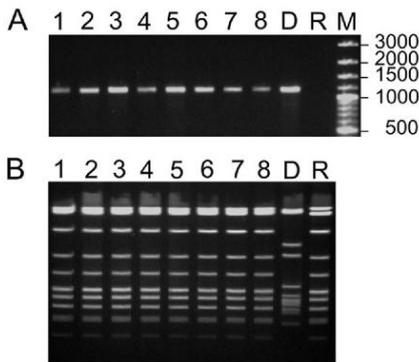


FIG 3 Analysis of eight clones of transconjugants obtained after filter-mating experiments between donor strain 515 (carrying ICE_515_tRNA^{Lys}) and recipient strain *S. pyogenes* ATCC 12202. (A) Amplification of the right junction of the ICEs in these clones as for donor cells, using primers specific of the integrase genes and of the tRNA^{Lys} gene (lane D). The negative control is *S. pyogenes* ATCC 12202, used as recipient cells (lane R). Lane M shows DNA molecular weight marker. (B) Analysis of the transconjugants by pulsed-field gel electrophoresis in parallel to the donor strain (lane D) and the recipient strain (lane R).

giving rise to a CIME-ICE *ery* tandem (Fig. 4). Mating experiments were also performed with a Nem316 recipient strain carrying a CIME tagged with a chloramphenicol resistance gene, giving rise to CIME *cat*-ICE *ery* tandem. PCRs were performed to amplify the two other tRNA^{Lys} genes to determine whether they can be used as secondary integration sites. None of the 100 transconjugants tested carried an ICE in the two other tRNA^{Lys} genes, indicating that integration is specific to the tRNA^{Lys} CTT gene.

Strain COH1 also gave transconjugants, although it already carries a putative resident ICE that is integrated into the same site and harbors very closely related conjugation and recombination modules. The incoming ICE can thus theoretically integrate at two different positions: in the left (*attL*) or in the right (*attR*) recombination site of the resident ICE. Analysis of 12 transconjugants indicated that they all integrated in the *attR* recombination site giving rise to the formation of a tandem of ICEs.

Conjugative mobilization of CIME_316_tRNA^{Lys} in cis by ICE_515_tRNA^{Lys}. The empty *attB* site (Fig. 5B) and the *attI* site (Fig. 5C) resulting from the excision of the whole CIME *cat*-ICE *ery* tandem were detected by nested PCR in transconjugants, showing the intracellular mobilization in *cis* of the CIME by the ICE. The conjugative transfer of this composite element was then investigated by filter matings using, as donor cells, the transconjugant deriving from Nem316 strain carrying this tandem and, as recipient cells, rifampin-streptomycin spontaneous mutant of the Nem316 strain. Putative transconjugants deriving from Nem316 Rif^r Sm^r were recovered on agar plates containing rifampin, streptomycin, and either erythromycin or chloramphenicol. Among 900 erythromycin-resistant transconjugants analyzed, only one carried both ICE and CIME; the others carried only the ICE alone. The only transconjugant recovered by plating on chloramphenicol-containing agar was shown to carry both ICE and CIME. These two transconjugants were analyzed by pulsed-field gel electrophoresis. Their electrophoresis pattern reflects the acquisition of a CIME-ICE tandem (one or two copies depending on the transconjugant) (Fig. 6). Therefore, the accretion has led not only to the intracellular mobilization in *cis* of the CIME by the ICE but also to its conjugative mobilization in *cis*.

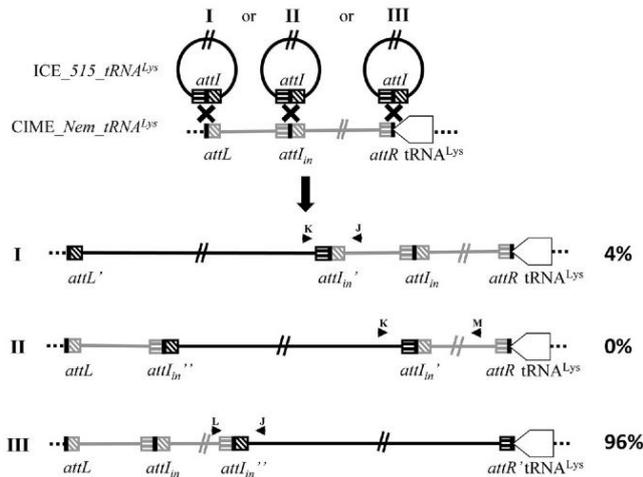


FIG 4 Schematic representation of the site-specific integration of ICE_515_tRNA^{Lys} in the genome of strain Nem316 and schematic localization of primers used to detect DNA molecules resulting from the site-specific recombination events. ICE_515_tRNA^{Lys} appears in black, and CIME_Nem_tRNA^{Lys} appears in gray.

DISCUSSION

A circular form was detected for three out of the four ICEs integrated in a tRNA^{Lys} gene of *S. agalactiae* tested. In strain 2603V/R, the whole composite ICE and the IME corresponding to its right end are able to excise. The lack of excision of the putative ICE corresponding to the left part of the composite ICE suggests that the integrase requires sequences present in the tRNA^{Lys} gene which are absent in the internal *attI* site. Alternatively, it is possible that integrase binding to the *attL* site and to *attR* moiety of *attI_{in}* is not optimal for recombination, explaining why the distal *attR* site is used for recombination instead of internal *attR* moiety of *attI_{in}*. Since the *attR* and *attL* sites of the ICE and of the IME are very different, the excision of the whole composite element ICE-IME requires that the integrase (of the ICE or of the IME) recognizes the other type of sequence (*attL* of the ICE if excision is mediated by the integrase of the IME or *attR* of the IME if the excision is ensured by the integrase of the ICE). This suggests that this IME is functional and could thus be *trans*- or *cis*-mobilized by an ICE. In both cases, it would need a functional helper conjugation pore to be transferred to a recipient cell. Although putative IMEs are frequent in genomes in particular in *S. agalactiae* (14) and the presence of a high number of isolated relaxase genes in bacterial chromosomes suggests that these elements are very frequent in bacteria (6), very few IMEs have actually been characterized until now in bacteria (5, 39). No circular form was detected for the fourth ICE (ICE_COH1_tRNA^{Lys}), but an empty integration site was detectable. This could indicate a loss of circular form in this strain in the extraction conditions tested due to less quantity or higher degradation of circular form than in the other strains. Alternatively, the absence of amplification can also be due to the longer expected size of the amplified fragment in this strain that carries two additional genes at the left-hand side of its ICE.

Screening of a large collection of strains of *S. agalactiae* did not enable us to find a strain that does not carry a genetic element integrated in the tRNA^{Lys} CTT gene in order to be used as recipient in the mating experiments. Even a strain isolated from fish carries

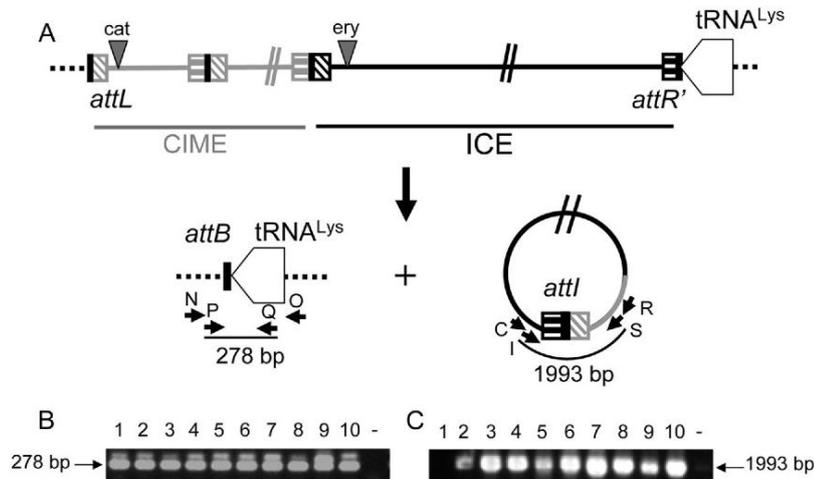


FIG 5 Analysis of the site-specific excision of the CIME *cat*-ICE *ery* composite element integrated in the 3' end of the *tRNA^{Lys}* gene of transconjugants of *S. agalactiae* Nem316. (A) Schematic representation of the circular form (with its *attI* site) and the empty *attB* integration site resulting from excision of the composite element. Primers used to detect DNA molecules resulting from site-specific recombination events are indicated by letters. (B) Amplification of an *attB* site in 10 transconjugants of *S. agalactiae* Nem316. (C) Amplification of an *attI* site in the same 10 clones. ICE₅₁₅*tRNA^{Lys}* appears in black, and CIME_{Nem}*tRNA^{Lys}* appears in gray.

an element at this locus (40), which thus appears as a hot spot of integration in this species. All curing attempts failed, although we tested different strategies that proved to be efficient for distantly related ICEs (26, 41). This could be due to the presence of a toxin-antitoxin system that kills the cells that have lost the ICE. However, interruption of the toxin gene of the putative toxin-antitoxin system identified on ICE₅₁₅*tRNA^{Lys}* did not allow curing the strain even after a mitomycin C treatment. Our hypothesis is that the ICE replicates in the cell as reported for two ICEs belonging to the ICESt3 family (26, 41), leading to a high frequency of reintegration in the chromosome even if excision is artificially increased. This hypothesis would also explain why the numerous attempts to interrupt the excisionase, integrase, relaxase, and other genes of

the ICE failed (data not shown). Since we did not find a *S. agalactiae* strain with an empty *tRNA^{Lys}* gene site, we used in the mating experiments a recipient strain that already carries a genetic element (CIME, IME, or ICE) integrated at this locus.

In this study, we demonstrated the functionality of an ICE carried by a human isolate of *S. agalactiae*. This is only the second description of conjugative transfer of an ICE in this species (the first one is TnGBS2 which uses a DDE transposase for its integration instead of a tyrosine recombinase [42] and carries an unrelated conjugation module). This ICE is related to two other ICEs whose conjugative transfer has been demonstrated in other streptococcal species: (i) RD2 of *S. pyogenes* (67 to 96% of identity for the proteins involved in conjugation transfer but different recombination module enabling integration into the 3' end of *tRNA^{Thr}* gene) (41) and (ii) ICESt3 of *S. thermophilus* (35 to 67% of protein identity for the conjugation proteins, unrelated recombination module providing specific integration into the 3' end of *fda* gene) (26). ICE₅₁₅*tRNA^{Lys}* was successfully transferred by conjugation to two other *S. agalactiae* strains: Nem316 strain (carrying a CIME) and COH1 strain (carrying a defective ICE). This led in both cases to an accretion of two elements (CIME-ICE or ICE-ICE) with a preferential integration of the incoming ICE at the *attI* recombination site (that includes the end of the *tRNA^{Lys}* gene). This *attI* preference was also observed for ICESt3 of *S. thermophilus*, although it encodes an unrelated integrase that catalyzes the integration in the *fda* gene instead of the *tRNA^{Lys}* gene (13). This suggests that the integrase or a cofactor needs to bind sequences present in the *tRNA^{Lys}* gene but absent in *attL* and *attR* sites for efficient integration of the ICE.

The frequency of conjugative transfer was low compared to the frequency of intraspecies transfer reported for ICEs of other *Firmicutes* (10-fold less than ICESt3 of *S. thermophilus* [26] and RD2 of *S. pyogenes* [41]). One hypothesis is that the occupation of the recipient *attB* site by an element flanked by *attR* and *attL* recombination sites reduces the frequency of ICE₅₁₅*tRNA^{Lys}* transfer, as was previously found for ICESt3 (13). The efficiency of ICE

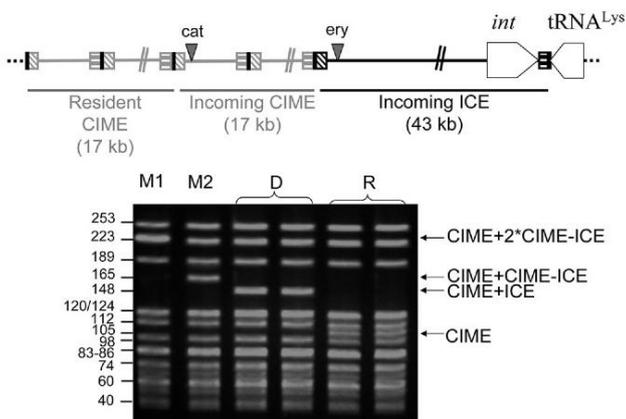


FIG 6 Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the two transconjugants (M1 and M2) obtained after conjugative mobilization *in cis* of the CIME *cat* by ICE *ery*. A strain deriving from Nem316 and harboring a tandem CIME *cat*-ICE *ery* (indicated by “D” on the schema) and a mutant strain resistant to rifampin and streptomycin deriving from Nem316 already harboring a resident CIME (indicated as recipient “R”) were used as donor and recipient strains, respectively.

integration in recombination sites flanking the resident element is likely reduced compared to an empty integration site. In addition, the frequency of transfer is even lower when the resident element of the recipient strain is an ICE (i.e., in strain COH1). This could be due to an exclusion mechanism as described for other ICEs (7). Furthermore, the *attR* recombination site of IME_A909_ *tRNA*^{Lys} and CIME_Nem316_ *tRNA*^{Lys} resident elements greatly differs from the *attR* site of ICE_COH1_ *tRNA*^{Lys}.

The genetic background of the recipient cells also likely plays a role since the frequency of transfer was 100-fold higher when transferring the ICE between strains with the same genetic background (experiments of retransfer using Nem316 strain as donor and recipient strain). This could be due to restriction-modification systems that degrade foreign DNA, including incoming ICE. Furthermore, no conjugative transfer of ICE_515_ *tRNA*^{Lys} was obtained when the A909 strain (carrying an IME) was used. A CRISPR system has been described recently in this strain (43). Analysis of the spacers present in this CRISPR system indicate that three of them match a sequence found in ICE_515_ *tRNA*^{Lys} (the coupling protein gene, the intergenic region between coupling protein and relaxase genes, and the gene of ICE_515_ *tRNA*^{Lys} encoding a putative DNA adenine methylase). Strain A909 thus likely carry a functional CRISPR system which targets foreign DNA including ICEs belonging to the same family than ICE_515_ *tRNA*^{Lys} and protect cell from invasion by these MGEs.

No conjugative transfer was observed for the three other putative ICEs tested (ICE_COH1_ *tRNA*^{Lys}, ICE_2603_ *tRNA*^{Lys}, and ICE_18RS21_ *tRNA*^{Lys}). These three elements all carry an *orfD* pseudogene. This conjugation gene encodes a putative ATPase belonging to the FtsK superfamily with characteristic Walker A and Walker B domains. It is thus a pTi VirB4 homolog like ConE (Ydde) of ICEBs1, TcpF of pCW3, or Orf16 of Tn916. This protein could play a role in energizing the conjugation machinery and as such is likely crucial for conjugative transfer of the element. This would explain why we did not observe conjugative transfer of ICE_COH1_ *tRNA*^{Lys}, ICE_2603_ *tRNA*^{Lys}, and ICE_18RS21_ *tRNA*^{Lys}.

Interspecies transfer was obtained only with *S. pyogenes* as recipient cells. In this species, the *tRNA*^{Lys CTT} gene displays one difference in the 11 terminal base pairs compared to *S. agalactiae*. Other species tested in the present study (*Streptococcus salivarius*, *Streptococcus uberis*, and *S. thermophilus*) carry a *tRNA*^{Lys CTT} gene with a 3' end identical to the gene of *S. agalactiae*. Other factors thus impact the compatibility of donor-recipient cells. At least two of the strains tested as recipient already carry a putative IME integrated in the *tRNA*^{Lys CTT} gene. This could limit the integration of the incoming ICE. Little is known about the cell-cell contacts that need to be established between donor and recipient cells during conjugative transfer. These contacts could be more difficult between bacteria of different species. Furthermore, restriction-modification systems probably interfere with the maintenance of ICE foreign DNA in the recipient cell. Even if we did not find *in vitro* conditions propitious to interspecies conjugative transfer of ICE_515_ *tRNA*^{Lys}, there are evidences of a spread of this type of ICE in other streptococcal species. For example, *S. urinalis* 2285-97 carries an almost identical ICE, and we recently identified an ICE integrated in a *tRNA*^{Lys} gene and carrying a related conjugation module in a strain of *S. uberis* (unpublished results). We are currently characterizing the functions encoded by the accessory genes carried by ICE_515_ *tRNA*^{Lys} since they could confer an adaptive advantage to the recipient strains. We showed in partic-

ular that this ICE encodes a functional CAMP factor toxin (a gene also found on *S. urinalis* putative ICE) (44). Transfer of ICEs carrying such accessory gene to other bacterial species would thus disseminate this toxin.

Conjugative transfer of ICE_515_ *tRNA*^{Lys} to the Nem316 that carries a CIME led to a CIME-ICE tandem in the recipient strains, thus offering us the opportunity to examine if ICE_515_ *tRNA*^{Lys} is able to *cis*-mobilize genes of CIME_Nem_ *tRNA*^{Lys}. The *attB* and *attI* sites resulting from the coexcision of both elements were detected by PCR, showing the intracellular mobilization in *cis* of the CIME by the ICE. Although quite infrequently (0.1% of the events of retransfer), the ICE-CIME tandem was also shown to transfer by conjugation. Such phenomenon has been described recently for ICEst3 of *S. thermophilus* (13) and could be a shared characteristic of ICEs using site-specific recombinases to excise and integrate. ICE_COH1_ *tRNA*^{Lys}, ICE_2603_ *tRNA*^{Lys}, and ICE_18RS21_ *tRNA*^{Lys}, although not self-transferable, could also be transferred by conjugation after accretion of an ICE and *cis*-mobilization. Since ICE_2603_ *tRNA*^{Lys} is able to excise, it could also be transferred by conjugation by using the mating apparatus encoded by a related ICE (mobilization in *trans*).

ICEs likely play an even higher role in horizontal gene transfer since it was reported recently that ICEBs1 of *B. subtilis* is able to mobilize in *trans* plasmids lacking dedicated mobilization proteins (45). Furthermore, Tn916 was found to mobilize in *trans* MTnSag1, an element from *S. agalactiae* which encodes a DDE transposase and carries its own *oriT* unrelated to the one of Tn916 but lacks conjugation or mobilization genes (46). Mobile genomic islands (MGI) carrying their own tyrosine integrase and an their own *oriT* but no conjugation or mobilization gene were also reported to be mobilized in *trans* by an ICE harboring a related *oriT* in *Vibrio* (47). Mobilization in *cis* can also lead to conjugative transfer of chromosomal sequences (up to 1 Mb) located at the 5' side of the MGI (47). Conjugative transfer of chromosomal DNA (up to 334 kb) by an Hfr-type mobilization initiated from the *oriT* of a genomic island was also reported in *S. agalactiae* (48). *cis*- and *trans*-mobilization of DNA by ICEs are thus probably very common and likely contribute to the evolution of genomic islands and bacterial genomes.

ACKNOWLEDGMENTS

A.P. was supported by a grant from the Institut National de la Recherche Agronomique and a grant from Région Lorraine.

We thank C. Delorme, A. Roberts, J. Y. Madec, and Marisa Haenni for providing the strains used in this study. We also thank Mylène Maury for technical help and X. Bellanger for constructing the pG+host9spc vector.

We are grateful to P. Glaser for helpful discussions.

REFERENCES

1. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. 2005. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 3:722–732.
2. Koonin EV, Wolf YI. 2008. Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res.* 36:6688–6719.
3. Toussaint A, Chandler M. 2012. Prokaryote genome fluidity: toward a system approach of the mobilome, p 57–80. *In* van Helden J, Toussaint A, Thieffry D (ed), *Bacterial molecular networks: methods and protocols*, vol 804. Humana Press, New York, NY.
4. Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guedon G. 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol. Microbiol.* 46:601–610.
5. Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G. 2002. The ICEst1 element of *Streptococcus thermophilus* belongs to a large family of integrative and

- conjugative elements that exchange modules and change their specificity of integration. *Plasmid* 48:77–97.
6. Guglielmini J, Quintais L, Garcillan-Barcia MP, de la Cruz F, Rocha EP. 2011. The repertoire of ICE in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. *PLoS Genet.* 7:e1002222. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002222>.
 7. Wozniak RA, Waldor MK. 2010. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:552–563.
 8. Burrus V, Waldor MK. 2004. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. *Res. Microbiol.* 155:376–386.
 9. Seth-Smith H, Croucher NJ. 2009. Genome watch: breaking the ICE. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:328–329.
 10. Alvarez-Martinez CE, Christie PJ. 2009. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 73:775–808.
 11. Berkmen MB, Lee CA, Loveday EK, Grossman AD. 2010. Polar positioning of a conjugation protein from the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 192:38–45.
 12. Pavlovic G, Burrus V, Gintz B, Decaris B, Guédon G. 2004. Evolution of genomic islands by deletion and tandem accretion by site-specific recombination: ICESt1-related elements from *Streptococcus thermophilus*. *Microbiology* 150:759–774.
 13. Bellanger X, Morel C, Gonot F, Puymège A, Decaris B, Guedon G. 2011. Site-specific accretion of an integrative conjugative element together with a related genomic island leads to *cis* mobilization and gene capture. *Mol. Microbiol.* 81:912–925.
 14. Brochet M, Couve E, Glaser P, Guedon G, Payot S. 2008. Integrative conjugative elements and related elements are major contributors to the genome diversity of *Streptococcus agalactiae*. *J. Bacteriol.* 190:6913–6917.
 15. Doran KS, Nizet V. 2004. Molecular pathogenesis of neonatal group B streptococcal infection: no longer in its infancy. *Mol. Microbiol.* 54:23–31.
 16. Keefe GP. 1997. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Can. Vet. J.* 38:429–437.
 17. Mian GF, Godoy DT, Leal CA, Yuhara TY, Costa GM, Figueiredo HC. 2009. Aspects of the natural history and virulence of *Streptococcus agalactiae* infection in Nile tilapia. *Vet. Microbiol.* 136:180–183.
 18. Law J, Buist G, Haandrikman A, Kok J, Venema G, Leenhouts K. 1995. A system to generate chromosomal mutations in *Lactococcus lactis* which allows fast analysis of targeted genes. *J. Bacteriol.* 177:7011–7018.
 19. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Donati C, Medini D, Ward NL, Angiuoli SV, Crabtree J, Jones AL, Durkin AS, Deboy RT, Daviden TM, Mora M, Scarselli M, Margarit y Ros I, Peterson JD, Hauser CR, Sundaram JP, Nelson WC, Madupu R, Brinkac LM, Dodson RJ, Rosovitz MJ, Sullivan SA, Daugherty SC, Haft DH, Selengut J, Gwinn ML, Zhou L, Zafar N, Khouri H, Radune D, Dimitrov G, Watkins K, O'Connor KJ, Smith S, Utterback TR, White O, Rubens CE, Grandi G, Madoff LC, Kasper DL, Telford JL, Wessels MR, Rappuoli R, Fraser CM. 2005. Genome analysis of multiple pathogenic isolates of *Streptococcus agalactiae*: implications for the microbial “pan-genome.” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102:13950–13955.
 20. Tettelin H, Masignani V, Cieslewicz MJ, Eisen JA, Peterson S, Wessels MR, Paulsen IT, Nelson KE, Margarit I, Read TD, Madoff LC, Wolf AM, Beanan MJ, Brinkac LM, Daugherty SC, DeBoy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Lewis MR, Radune D, Fedorova NB, Scanlan D, Khouri H, Mulligan S, Carty HA, Cline RT, Van Aken SE, Gill J, Scarselli M, Mora M, Iacobini ET, Brettoni C, Galli G, Mariani M, Vegni F, Maione D, Rinaudo D, Rappuoli R, Telford JL, Kasper DL, Grandi G, Fraser CM. 2002. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:12391–12396.
 21. Glaser P, Rusniok C, Buchrieser C, Chevalier F, Frangeul L, Msadek T, Zouine M, Couve E, Lalioui L, Poyart C, Trieu-Cuot P, Kunst F. 2002. Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease. *Mol. Microbiol.* 45:1499–1513.
 22. Ajdic D, McShan WM, McLaughlin RE, Savic G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najjar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ. 2002. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99:14434–14439.
 23. Guedon E, Delorme C, Pons N, Craud C, Loux V, Couloux A, Gautier C, Sanchez N, Layec S, Galleron N, Almeida M, van de Guchte M, Kennedy SP, Ehrlich SD, Gibrat JF, Wincker P, Renault P. 2011. Complete genome sequence of the commensal *Streptococcus salivarius* strain JIM8777. *J. Bacteriol.* 193:5024–5025.
 24. Bolotin A, Quinquis B, Renault P, Sorokin A, Ehrlich SD, Kulakauskas S, Lapidus A, Goltsman E, Mazur M, Pusch GD, Fonstein M, Overbeek R, Kyprides N, Purnelle B, Prozzi D, Ngui K, Masuy D, Hancy F, Burteau S, Boutry M, Delcour J, Goffeau A, Hols P. 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat. Biotechnol.* 22:1554–1558.
 25. Haenni M, Saras E, Bertin S, Leblond P, Madec J-Y, Payot S. 2010. Diversity and mobility of integrative and conjugative elements in *S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, and *S. uberis* bovine isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:7957–7965.
 26. Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guedon G. 2009. Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* 191:2764–2775.
 27. Jacob AE, Hobbs SJ. 1974. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J. Bacteriol.* 117:360–372.
 28. Sambrook J, Russell D. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
 29. Maguin E, Duwat P, Hege T, Ehrlich D, Gruss A. 1992. New thermo-sensitive plasmid for gram-positive bacteria. *J. Bacteriol.* 174:5633–5638.
 30. Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. 2001. Construction and characterization of *Streptococcus suis*-*Escherichia coli* shuttle cloning vectors. *Plasmid* 45:101–113.
 31. Brosius J. 1989. Superpolylinkers in cloning and expression vectors. *DNA* 8:759–777.
 32. Butcher BG, Lin YP, Helmann JD. 2007. The *yidFGHIJ* operon of *Bacillus subtilis* encodes a peptide that induces the LiaRS two-component system. *J. Bacteriol.* 189:8616–8625.
 33. Framson PE, Nittayajarn A, Merry J, Youngman P, Rubens CE. 1997. New genetic techniques for group B streptococci: high-efficiency transformation, maintenance of temperature-sensitive pWV01 plasmids, and mutagenesis with Tn917. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:3539–3547.
 34. Poyart C, Quesne G, Coulon S, Berche P, Trieu-Cuot P. 1998. Identification of streptococci to species level by sequencing the gene encoding the manganese-dependent superoxide dismutase. *J. Clin. Microbiol.* 36:41–47.
 35. Christie PJ, Korman RZ, Zahler SA, Adsit JC, Dunne GM. 1987. Two conjugation systems associated with *Streptococcus faecalis* plasmid pCF10: identification of a conjugative transposon that transfers between *S. faecalis* and *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169:2529–2536.
 36. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:3389–3402.
 37. Georgin P, Mouet M. 2000. *Statistiques avec Excel*. Presses Universitaires de Rennes, Rennes, France.
 38. Cumming G, Fidler F, Vaux DL. 2007. Error bars in experimental biology. *J. Cell Biol.* 177:7–11.
 39. Doublet B, Boyd D, Mulvey MR, Cloeckaert A. 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Mol. Microbiol.* 55:1911–1924.
 40. Wang B, Jian J, Lu Y, Cai S, Huang Y, Tang J, Wu Z. 2012. Complete genome sequence of *Streptococcus agalactiae* ZQ0910, a pathogen causing meningoenephalitis in the GIFT strain of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Bacteriol.* 194:5132–5133.
 41. Sitkiewicz I, Green NM, Guo N, Mereghetti L, Musser JM. 2011. Lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins. *BMC Microbiol.* 11:65. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-11-65>.
 42. Brochet M, Da Cunha V, Couve E, Rusniok C, Trieu-Cuot P, Glaser P. 2009. Atypical association of DDE transposition with conjugation specificity of a new family of mobile elements. *Mol. Microbiol.* 71:948–959.
 43. Lopez-Sanchez MJ, Sauvage E, Da Cunha V, Clermont D, Ratsima Hariniaina E, Gonzalez-Zorn B, Poyart C, Rosinski-Chupin I, Glaser P. 2012. The highly dynamic CRISPR1 system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome. *Mol. Microbiol.* 85:1057–1071.
 44. Chuzeville S, Puymège A, Madec JY, 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:e48918. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0048918>.

45. Lee CA, Thomas J, Grossman AD. 2012. The *Bacillus subtilis* conjugative transposon ICEBs1 mobilizes plasmids lacking dedicated mobilization functions. *J. Bacteriol.* **194**:3165–3172.
46. Achard A, Leclercq R. 2007. Characterization of a small mobilizable transposon, MTnSag1, in *Streptococcus agalactiae*. *J. Bacteriol.* **189**:4328–4331.
47. Daccord A, Ceccarelli D, Burrus V. 2010. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands. *Mol. Microbiol.* **78**:576–588.
48. Brochet M, Rusniok C, Couve E, Dramsi S, Poyart C, Trieu-Cuot P, Kunst F, Glaser P. 2008. Shaping a bacterial genome by large chromosomal replacements, the evolutionary history of *Streptococcus agalactiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**:15961–15966.

Annexe 2 : Listes et caractéristiques des souches dont les génomes ont été étudiés lors de cette étude

Nom de la souche	Numéro d'accession	MLST	Îlot putatif porté
515	AAJP00000000	23	ICE
BSU167	ALRL00000000	ND	ICE
BSU260	ANEC00000000	88	ICE
BSU447	ANEA00000000	19	ICE
BSU96	ALRH00000000	17	ICE
CCUG 19094	ALQK00000000	19	ICE
CCUG 24810	ALQL00000000	19	ICE
CCUG 37430	ALQN00000000	19	ICE
CCUG 37736	ANDE00000000	17	ICE
CCUG 37737	ALQO00000000	19	ICE
CCUG 37739	ANDF00000000	23	ICE
CCUG 38383	ALQS00000000	23	ICE
CCUG 44074	ANDI00000000	23	ICE
CCUG 44104	ANDJ00000000	19	ICE
CCUG 44186	ANDM00000000	17	ICE
CCUG 45061	ANDN00000000	19	ICE
CCUG 91	ANCY00000000	28	ICE
COH1	AAJR00000000	17	ICE
FSL C1-487	ANCK00000000	415	ICE
FSL S3-003	ALQJ00000000	19	ICE
FSL S3-026	AEXT00000000	67	ICE
FSL S3-077	ANPY00000000	ND	ICE
FSL S3-090	ANCQ00000000	23	ICE
FSL S3-105	ANCN00000000	91	ICE
FSL S3-170	ALQG00000000	ND	ICE
FSL S3-229	ANPV00000000	415	ICE
FSL S3-277	ALQC00000000	ND	ICE
FSL S3-337	ALQH00000000	19	ICE
FSL S3-586	ANCM00000000	67	ICE
FSL S3-603	ALQF00000000	61	ICE

GB00002	ALSL00000000	23	ICE
GB00018	ALSP00000000	444	ICE
GB00083	ALSS00000000	1	ICE
GB00092	ALSU00000000	19	ICE
GB00190	ALSZ00000000	23	ICE
GB00247	ALTG00000000	24	ICE
GB00543	ALTL00000000	36	ICE
GB00561	ALTP00000000	19	ICE
GB00588	ALTQ00000000	447	ICE
GB00601	ALTR00000000	24	ICE
GB00867	ALUB00000000	23	ICE
GB00884	ALUD00000000	19	ICE
GB00887	ALUE00000000	23	ICE
GB00900	ANQX00000000	19	ICE
GB00901	ALUK00000000	459	ICE
GB00904	ALUL00000000	19	ICE
GB00911	ALUN00000000	452	ICE
GB00923	ALUQ00000000	19	ICE
GB00929	ALUS00000000	19	ICE
GB00932	ALUT00000000	23	ICE
GB00933	ALUU00000000	452	ICE
GB00963	ANQR00000000	17	ICE
GB00986	ALVA00000000	23	ICE
GB00992	ALVB00000000	ND	ICE
GB01003	ANQO00000000	ND	ICE
Gottschalk 1002A	ANEY00000000	23	ICE
Gottschalk 1003A	ALSI00000000	19	ICE
Gottschalk 19247	ANFE00000000	23	ICE
Gottschalk 31825	ANFB00000000	23	ICE
LDS 623	ANEX00000000	61	ICE
LDS 628	ALSH00000000	61	ICE
LMG 15081	ANDS00000000	25	ICE

MRI Z1-022	ANEM00000000	121	ICE
MRI Z1-039	ALSA00000000	ND	ICE
MRI Z1-049	ANER00000000	ND	ICE
MRI Z1-200	ANQM00000000	23	ICE
MRI Z1-201	ANQL00000000	23	ICE
MRI Z1-204	ANQI00000000	23	ICE
MRI Z1-205	ANQH00000000	1	ICE
2603V/R	NC_004116	110	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
BSU188	ALRF00000000	23	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
CCUG 37741	ALQQ00000000	19	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
CCUG 37742	ALQR00000000	19	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-027	ANPU00000000	ND	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-034	ANPZ00000000	61	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-062	ANQF00000000	ND	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-128	ANPS00000000	ND	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-222	ANPW00000000	ND	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-251	ANCO00000000	ND	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-501	ALQE00000000	ND	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-608	ANQA00000000	490	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-654	ANPX00000000	61	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00865	ALUA00000000	19	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
LMG 15089	ANDV00000000	19	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
LMG 15093	ALQZ00000000	110	ICE + IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00957	ANQS00000000	23	ICE + IME_18RS21_ori ^T
GB00984	ALUZ00000000	19	ICE + IME_18RS21_ori ^T
LMG 15084	ANDU00000000	19	ICE + IME_18RS21_ori ^T
18RS21	AAJO01000000	19	ICE + IME_18RS21_ori ^T
A909	CP000114	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
BSU174	ANEF00000000	41	IME_2603_tRNA ^{Lys}
BSU178	ALRG00000000	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
BSU248	ANDZ00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
BSU450	ALRC00000000	10	IME_2603_tRNA ^{Lys}

BSU454	ANDY00000000	8	IME_2603_tRNA ^{Lys}
CCUG 29376	ANDB00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
CCUG 39096 A	ALQT00000000	9	IME_2603_tRNA ^{Lys}
CCUG 47293	ANDO00000000	ND	IME_2603_tRNA ^{Lys}
CF01173	CAQB00000000	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-014	ANCR00000000	8	IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-137	ANCU00000000	8	IME_2603_tRNA ^{Lys}
FSL S3-442	ANCT00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00003	ALSM00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00202	ALTA00000000	10	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00219	ALTC00000000	8	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00264	ALTH00000000	10	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00535	ALTK00000000	8	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00555	ALTN00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00651	ALTU00000000	8	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00653	ALTV00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00864	ALTZ00000000	10	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00893	ALUH00000000	8	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00897	ALUI00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00909	ALUM00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00914	ALUO00000000	8	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00919	ANQW00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GB00947	ALUV00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
GD20 1008-001	NC_018646	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
Gottschalk 998A	ANFC00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
Gottschalk 999B	ANFD00000000	8	IME_2603_tRNA ^{Lys}
LMG 15083	ANDT00000000	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
LMG 15090	ANDW00000000	8	IME_2603_tRNA ^{Lys}
MRI Z1-198	ANEG00000000	12	IME_2603_tRNA ^{Lys}
MRI Z1-206	ANQG00000000	8	IME_2603_tRNA ^{Lys}
MRI Z1-218	ANPP00000000	590	IME_2603_tRNA ^{Lys}
MRI Z1-219	ANEV00000000	590	IME_2603_tRNA ^{Lys}

STIR-CD-01	ANQE00000000	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
STIR-CD-14	ANEJ00000000	ND	IME_2603_tRNA ^{Lys}
STIR-CD-21	ALRO00000000	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
STIR-CD-22	ALRP00000000	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
STIR-CD-23	ALRQ00000000	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
STIR-CD-24	ALRR00000000	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
STIR-CD-25	ANEK00000000	283	IME_2603_tRNA ^{Lys}
STIR-CD-26	ANEL00000000	500	IME_2603_tRNA ^{Lys}
STIR-CD-27	ALRS00000000	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
STIR-CD-28	ALRT00000000	500	IME_2603_tRNA ^{Lys}
ZQ910	AKAP00000000	7	IME_2603_tRNA ^{Lys}
ATCC13813	AEQQ00000000	ND	Dérivé d'ICE ou d'IME
BSU165	ALRI00000000	28	Dérivé d'ICE ou d'IME
CCUG 37738	ALQP00000000	19	Dérivé d'ICE ou d'IME
FSL S3-043	ANPT00000000	61	Dérivé d'ICE ou d'IME
GB00206	ALTB00000000	19	Dérivé d'ICE ou d'IME
GB00226	ALTD00000000	28	Dérivé d'ICE ou d'IME
GB00663	ALTX00000000	19	Dérivé d'ICE ou d'IME
GB00899	ALUJ00000000	28	Dérivé d'ICE ou d'IME
GB00951	ANQU00000000	28	Dérivé d'ICE ou d'IME
LDS 617	ALSG00000000	ND	Dérivé d'ICE ou d'IME
LMG 14609	ALRV00000000	ND	Dérivé d'ICE ou d'IME
LMG 14838	ALRW00000000	ND	Dérivé d'ICE ou d'IME
MRI Z1-213	ALSD00000000	591	Dérivé d'ICE ou d'IME
MRI Z1-214	ALSE00000000	591	Dérivé d'ICE ou d'IME
MRI Z1-216	ALSF00000000	591	Dérivé d'ICE ou d'IME
MRI Z1-217	ANEU00000000	ND	Dérivé d'ICE ou d'IME
BSU442	ALRD00000000	22	Vestiges d'élément

CCUG 17336	AN CZ00000000	17	Vestiges d'élément
CCUG 28551	AN DA00000000	ND	Vestiges d'élément
CCUG 49086	AN DQ00000000	17	Vestiges d'élément
CCUG 49087	AL QV00000000	17	Vestiges d'élément
FSL C1-494	AL QD00000000	298	Vestiges d'élément
FSL F2-338	AN PQ00000000	ND	Vestiges d'élément
FSL S3-005	AN CW00000000	22	Vestiges d'élément
FSL S3-102	AN CS00000000	31	Vestiges d'élément
FSL S3-268	AN CV00000000	22	Vestiges d'élément
FSL S3-568	AN PR00000000	415	Vestiges d'élément
GB00097	AL SV00000000	17	Vestiges d'élément
GB00111	AL SW00000000	32	Vestiges d'élément
GB00112	AK XO00000000	17	Vestiges d'élément
GB00115	AL SX00000000	17	Vestiges d'élément
GB00174	AL SY00000000	22	Vestiges d'élément
GB00557	AL TO00000000	17	Vestiges d'élément
GB00654	AL TW00000000	17	Vestiges d'élément
GB00891	AL UG00000000	17	Vestiges d'élément
GB00940	AN QV00000000	17	Vestiges d'élément
GB00954	AN QT00000000	22	Vestiges d'élément
GB00975	AL UY00000000	22	Vestiges d'élément
GB01004	AN QN00000000	22	Vestiges d'élément
LMG 15085	AL QW00000000	17	Vestiges d'élément
LMG 15091	AL QX00000000	ND	Vestiges d'élément
LMG 15094	AL RA00000000	17	Vestiges d'élément
LMG 15095	AL RB00000000	17	Vestiges d'élément

2.22	FO393392	261	CIME
BSU133	ANEE00000000	6	CIME
BSU247	ALRE00000000	26	CIME
BSU252	ANDX00000000	1	CIME
BSU92	ALRJ00000000	196	CIME
CCUG 25532	ALQM00000000	26	CIME
CCUG 29782	ANDC00000000	23	CIME
CCUG 30636	ANDD00000000	1	CIME
CCUG 34230	ANQB00000000	23	CIME
CCUG 37740	ANDG00000000	1	CIME
CCUG 44050	ANDH00000000	ND	CIME
CCUG 44077	ALQU00000000	1	CIME
CCUG 44110	ANDK00000000	88	CIME
CCUG 44140	ANDL00000000	1	CIME
CCUG 49072	ANDP00000000	524	CIME
CCUG 49100	ANDR00000000	1	CIME
CJB111	AAJQ00000000	1	CIME
FSL F2-343	ALQI00000000	88	CIME
FSL S3-001	ANCX00000000	1	CIME
FSL S3-023	ANCP00000000	1	CIME
GB00012	ALSN00000000	1	CIME
GB00013	ALSO00000000	1	CIME
GB00020	ALSQ00000000	1	CIME
GB00082	ALSR00000000	2	CIME
GB00084	ALST00000000	1	CIME
GB00241	ALTE00000000	1	CIME

GB00279	ALTI00000000	2	CIME
GB00300	ALTJ00000000	130	CIME
GB00548	ALTM00000000	88	CIME
GB00614	ALTS00000000	448	CIME
GB00640	ALTT00000000	26	CIME
GB00679	ALTY00000000	2	CIME
GB00874	ALUC00000000	1	CIME
GB00888	ALUF00000000	41	CIME
GB00922	ALUP00000000	88	CIME
GB00924	ALUR00000000	1	CIME
GB00955	ALUW00000000	ND	CIME
GB00959	ALUX00000000	1	CIME
GB00965	ANQQ00000000	88	CIME
GB00999	ANQP00000000	1	CIME
Gottschalk 1005B	ALSJ00000000	288	CIME
Gottschalk 13227	ANEZ00000000	ND	CIME
Gottschalk 2864	ANFA00000000	1	CIME
Gottschalk 992B	ALSK00000000	ND	CIME
H36B	AAJS00000000	6	CIME
LADL_05-108a	CATH00000000	260	CIME
LADL-90-503	CAPZ00000000	260	CIME
LMG 14608	ALRU00000000	7	CIME
LMG 15092	ALQY00000000	2	CIME
MRI Z1-012	ALRX00000000	2	CIME
MRI Z1-025	ANEO00000000	1	CIME
MRI Z1-035	ANEP00000000	88	CIME

MRI Z1-048	ANEQ00000000	ND	CIME
MRI Z1-209	ANES00000000	ND	CIME
MRI Z1-211	ALSB00000000	1	CIME
MRI Z1-212	ALSC00000000	1	CIME
MRI Z1-215	ANET00000000	589	CIME
Nem316	NC_004368	23	CIME
PR06 PR06	AOSD00000000	ND	CIME
SA20-06	NC_019048	ND	CIME
SS1014	CAQC00000000	6	CIME
SS1218	CAUB00000000	ND	CIME
SS1219	CAQA00000000	260	CIME
STIR-CD-07	ANEI00000000	ND	CIME
STIR-CD-09	ALRM00000000	260	CIME
STIR-CD-13	ALRN00000000	ND	CIME
STIR-CD-17	ALXB00000000	ND	CIME
STIR-CD-29	ANQD00000000	ND	CIME
BSU253	ANEB00000000	23	MINI-CIME
MRI Z1-199	ANEH00000000	23	MINI-CIME
MRI Z1-202	ANQK00000000	23	MINI-CIME
MRI Z1-203	ANQJ00000000	23	MINI-CIME
BSU108	ALRK00000000	314	Sans élément
BSU451	ANED00000000	103	Sans élément
GB00245	ALTF00000000	23	Sans élément
MRI Z1-023	ANEN00000000	103	Sans élément

ND, non déterminé

RESUMES

Diversité, dynamique et mobilité des éléments intégratifs conjugatifs (ICE) de *Streptococcus agalactiae* intégrés dans l'extrémité 3' du gène codant un ARNt Lysine

Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) et les éléments en dérivant jouent un rôle important dans le transfert horizontal de gènes chez les bactéries. Les ICE s'excisent par recombinaison site-spécifique sous forme circulaire, se transfèrent par conjugaison et s'intègrent dans un réplicon de la cellule réceptrice. *Streptococcus agalactiae* est une bactérie pathogène opportuniste responsable d'infections néonatales sévères chez l'Homme et d'infections chez les animaux (bovins, poissons,...).

Une analyse *in silico* antérieure de 8 génomes séquencés de *Streptococcus agalactiae* avait permis d'identifier plusieurs éléments intégrés dans l'extrémité 3' d'un gène codant un ARNt^{Lys} CTT dont 4 ICE putatifs. Cette étude élargie à 246 génomes a confirmé la prévalence et la diversité des éléments intégrés dans ce locus (présence d'ICE, éléments mobilisables en *trans* ou en *cis*, éléments composites,... chez 98 % des souches). Une nouvelle famille d'éléments mobilisables putatifs s'intégrant dans l'*oriT* d'ICE a été caractérisée.

L'étude fonctionnelle de 5 ICE a montré que 4 s'excisent du chromosome mais que seuls ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} et ICE_515_tRNA^{Lys} se transfèrent par conjugaison au sein de l'espèce et vers *S. pyogenes* pour l'un des 2.

Des éléments composites ont été obtenus par transfert d'ICE_515_tRNA^{Lys} vers une souche possédant déjà un élément intégré dans ce locus. Un de ces éléments composites est capable de s'exciser et de se transférer par conjugaison conduisant à une mobilisation en *cis* de l'élément résident.

En conclusion, les ICE et les éléments mobilisables (en *cis* ou en *trans*) sont très répandus chez *S. agalactiae* et contribuent à la plasticité génomique chez cette espèce.

Mots clés : *Streptococcus agalactiae*, diversité, prévalence, ICE, transfert conjugatif et mobilité.

Diversity, dynamic and mobility of “Integrative Conjugative Elements” (ICEs) of *Streptococcus agalactiae* integrated into the 3' end of tRNA lysine gene

Integrative and Conjugative Elements (ICEs) and related elements are widespread in bacteria and play a key role in horizontal gene transfer. ICEs excise by site-specific recombination as a circular intermediate, promote their own transfer by conjugation and then integrate into a replicon of the recipient cell. *Streptococcus agalactiae* is an opportunistic pathogen that causes severe human invasive neonatal infections as well as infections in animals (bovine, fish...).

Previous *in silico* analysis of eight sequenced genomes of *S. agalactiae* identified in each genome a different element integrated in the tRNA^{Lys} CTT gene with four putative ICEs. This study, carried on 246 other genomes of *S. agalactiae*, confirmed the prevalence and diversity of elements integrated in this locus with 98% of the strains carrying an element (ICE, *trans* or *cis* mobilizable elements composite elements...). A novel family of putative mobilisable elements which can integrate in the *oriT* of ICE has been characterized.

Functional analysis of 5 ICEs demonstrated that four can excise of the chromosome but that only ICE_{FSL3-026}_tRNA^{Lys} and ICE₅₁₅_tRNA^{Lys} can transfer by conjugation inside the species or to *S. pyogenes* for one of them.

Composite elements have been obtained after transfer of ICE₅₁₅_tRNA^{Lys} to a recipient strain already carrying an element integrated in the same locus. One of this composite element is able to excise and transfer by conjugation to a new strain leading to *cis*-mobilization of the resident element.

In conclusion, ICEs and *cis* and *trans* mobilizable elements are widespread in *S. agalactiae* and contribute to the genomic plasticity in this bacterial species.

Key words: *Streptococcus agalactiae*, diversity, prevalence, ICE, conjugative transfer and mobility.

Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) et les éléments en dérivant jouent un rôle important dans le transfert horizontal de gènes chez les bactéries. Les ICE s'excisent par recombinaison site-spécifique sous forme circulaire, se transfèrent par conjugaison et s'intègrent dans un réplicon de la cellule réceptrice. *Streptococcus agalactiae* est une bactérie pathogène opportuniste responsable d'infections néonatales sévères chez l'Homme et d'infections chez les animaux (bovins, poissons,...). Une analyse *in silico* antérieure de 8 génomes séquencés de *Streptococcus agalactiae* avait permis d'identifier plusieurs éléments intégrés dans l'extrémité 3' d'un gène codant un ARN^{t^{Lys} CTT} dont 4 ICE putatifs. Cette étude élargie à 246 génomes a confirmé la prévalence et la diversité des éléments intégrés dans ce locus (présence d'ICE, éléments mobilisables en *trans* ou en *cis*, éléments composites,... chez 98 % des souches). Une nouvelle famille d'éléments mobilisables putatifs s'intégrant dans l'*oriT* d'ICE a été caractérisée. L'étude fonctionnelle de 5 ICE a montré que 4 s'excisent du chromosome mais que seuls ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} et ICE_515_tRNA^{Lys} se transfèrent par conjugaison au sein de l'espèce et vers *S. pyogenes* pour l'un des 2. Des éléments composites ont été obtenus par transfert d'ICE_515_tRNA^{Lys} vers une souche possédant déjà un élément intégré dans ce locus. Un de ces éléments composites est capable de s'exciser et de se transférer par conjugaison conduisant à une mobilisation en *cis* de l'élément résident. En conclusion, les ICE et les éléments mobilisables (en *cis* ou en *trans*) sont très répandus chez *S. agalactiae* et contribuent à la plasticité génomique chez cette espèce.

Mots clés : *Streptococcus agalactiae*, diversité, prévalence, ICE, transfert conjugatif et mobilité.

Integrative and Conjugative Elements (ICEs) and related elements are widespread in bacteria and play a key role in horizontal gene transfer. ICEs excise by site-specific recombination as a circular intermediate, promote their own transfer by conjugation and then integrate into a replicon of the recipient cell. *Streptococcus agalactiae* is an opportunistic pathogen that causes severe human invasive neonatal infections as well as infections in animals (bovine, fish...). Previous *in silico* analysis of eight sequenced genomes of *S. agalactiae* identified in each genome a different element integrated in the tRNA^{Lys} CTT gene with four putative ICEs. This study, carried on 246 other genomes of *S. agalactiae*, confirmed the prevalence and diversity of elements integrated in this locus with 98% of the strains carrying an element (ICE, *trans* or *cis* mobilizable elements composite elements...). A novel family of putative mobilisable elements which can integrate in the *oriT* of ICE has been characterized. Functional analysis of 5 ICEs demonstrated that four can excise of the chromosome but that only ICE_FSL S3-026_tRNA^{Lys} and ICE_515_tRNA^{Lys} can transfer by conjugation inside the species or to *S. pyogenes* for one of them. Composite elements have been obtained after transfer of ICE_515_tRNA^{Lys} to a recipient strain already carrying an element integrated in the same locus. One of this composite element is able to excise and transfer by conjugation to a new strain leading to *cis*-mobilization of the resident element. In conclusion, ICEs and *cis* and *trans* mobilizable elements are widespread in *S. agalactiae* and contribute to the genomic plasticity in this bacterial species.

Key words: *Streptococcus agalactiae*, diversity, prevalence, ICE, conjugative transfer and mobility.