



Caractérisation des éléments intégratifs conjugatifs de la famille ICESt3 et des facteurs influençant leur mobilité

Narimane Dahmane

► To cite this version:

Narimane Dahmane. Caractérisation des éléments intégratifs conjugatifs de la famille ICESt3 et des facteurs influençant leur mobilité. Bactériologie. Université de Lorraine, 2017. Français. NNT : 2017LORR0269 . tel-01699829

HAL Id: tel-01699829

<https://theses.hal.science/tel-01699829>

Submitted on 2 Feb 2018

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

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



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

UNIVERSITE DE LORRAINE

Ecole doctorale Sciences et Ingénierie des Ressources, Procédés, Produits, Environnement (RP2E)

Collegium Sciences et Technologies**THESE**

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention « Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystème »

par

Narimane DAHMANE

**Caractérisation des éléments intégratifs conjugatifs de la famille ICESt3
et des facteurs influençant leur mobilité**

Soutenue publiquement le 30 Novembre 2017

Membres du jury :

Rapporteurs :

M. Jan Roelof VAN DER MEER

Professeur, Université de Lausanne

M. Philippe GLASER

Chef de laboratoire, Institut Pasteur

Examineurs :

Mme Marie-Pierre CHAPOT-CHARTIER

Directeur de recherche, INRA

Mme Nathalie LEBLOND-BOURGET

Professeur, Université de Lorraine

Mme Sophie PAYOT-LACROIX

Directeur de recherche, INRA

M. Eric GUEDON

Directeur de recherche, INRA

Remerciements

J'adresse mes sincères remerciements au Pr Pierre Leblond pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude envers ma directrice de thèse, le Dr Sophie Payot-Lacroix. Je la remercie pour son infaillible encadrement, sa disponibilité, son soutien, et la confiance inébranlable qu'elle m'a accordée lors de ces trois années de thèse.

J'adresse ma sincère reconnaissance à mon co-directeur de thèse, le Dr Eric Guédon. Je le remercie pour son intérêt, son enthousiasme constant, ses nombreux conseils avisés et le temps qu'il m'a accordé tout au long de cette thèse.

Mes profonds remerciements vont à l'ensemble des membres du Jury qui me font l'honneur de juger ce travail de thèse. Je remercie le Pr Jan Roelof van der Meer et le Dr Philippe Glaser d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon manuscrit de thèse. Je remercie également le Dr Marie-Pierre Chapot-Chartier et le Pr Nathalie Leblond-Bourget d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie les membres de mon comité de thèse : le Dr Pascale Serror, le Dr Romain Briandet et le Pr Guennadi Sezonov. Je les remercie pour le temps qu'ils ont accordé au suivi de ce travail, et les nombreuses idées qu'ils y ont apportées.

Je remercie également le Dr Romain Briandet de m'avoir accueillie au sein de son équipe le temps de me former aux expériences de biofilms. Merci à Julien Deschamps d'avoir mené à bien cette formation.

Mes chaleureux remerciements vont à l'ensemble des membres du laboratoire DynAMic, en particulier l'équipe Ice-Tea : je remercie Virginie, Florence et Nicolas pour leur accueil, leur sympathie et leurs nombreux conseils, Nathalie de m'avoir donné l'opportunité d'enseigner la génétique des populations, et Gérard pour toutes les discussions captivantes où se mêlaient Archaea et Evolution.

Mes vifs remerciements vont à Emilie Robert pour son aide technique durant ces six mois, courts mais intenses, et à Stéphane Bertin pour ses sauvetages quand je croulais sous les boîtes de Petri.

Merci à *PioPio, Za, Robie, Bidi, Frère, Loukoum, Lolo, Laylouch, Clauclau, Max, Razouille et Nico* pour leur amitié et tous ces moments intra- et extra-DynAMic.

Mon éternelle gratitude et reconnaissance est adressée à mes Parents. Je les remercie pour leur soutien indéfectible, leur confiance, et surtout de m'avoir permis très tôt de voguer vers mes ambitions.

Je finirai en remerciant mon fidèle journal de bord qui a su absorber toute l'encre de mes écrits depuis tant d'années : Yasmine et Benoît, je vous remercie de me permettre au quotidien de maintenir le cap.

EAGLE !

LISTE DES ABREVIATIONS

μl : microlitre

aa : acide aminé

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNsb : ADN simple brin

ARN : acide ribonucléique

ARNt : ARN de transfert

ATP : adénosine triphosphate

attB : site d'attachement bactérien

attI : site d'attachement de l'élément génétique mobile

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

attR : site de recombinaison *att* droite (« Right »)

CIME : élément mobilisable en *cis* (« CIs Mobilizable Element »)

CRISPR : « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats »

dNTP : désoxyribonucléotide tri-phosphate

DO : densité optique

DR : répétition directe

EPS : exopolysaccharides

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

h : heure

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

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

IS : séquence d'insertion (« Insertion Sequence »)

kb : kilo-bases

LM17 : milieu M17 additionné de lactose 0,5 %

L-PG : lysyl-phosphatidylglycérol

Lpp : lipoprotéine

LTA : acides lipotéichoïques (« LipoTeichoic Acids »)

M : mole par litre

Mb : méga-bases

MEB : microscope électronique à balayage

MET : microscope électronique à transmission

MGE : éléments génétiques mobiles (« Mobile Genetic Elements »)

min : minute

ml : millilitre

MLST : typage par séquençage multiple de gènes (« MultiLocus Sequence Typing »)

MMC : mitomycine C

ORF : cadre de lecture ouvert (« Open Reading Frame »)

oriT : origine de transfert

pb : paire de bases

PCR : réaction de polymérase en chaîne

pH : potentiel hydrogène

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

RM : Restriction Modification

ROS : Dérivé réactif de l'oxygène (« Reactive Oxygen Species »)

Rpm : tour par minute

T4SS : système de sécrétion de type IV (« Type IV Secretion System »)

TA : toxine-antitoxine

UFC : Unité Formant Colonie

WTA : acides téichoïques de paroi (« Wall Teichoic Acids »)

Table des matières

I. INTRODUCTION	1
1. Le transfert horizontal.....	2
1.1. La transduction.....	3
1.2. La transformation.....	4
1.3. La conjugaison.....	5
1.4. Autres mécanismes de transfert horizontal.....	6
1.4.1. La transconjugaison	6
1.4.2. Les vésicules membranaires	7
1.4.3. Les nanotubes	7
1.4.4. Le Système Ced	7
2. Les éléments génétiques mobiles	8
2.1. Les phages	8
2.2. Les éléments transposables.....	10
2.3. Les plasmides conjugatifs.....	11
2.4. Les îlots génomiques.....	13
3. Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE).....	15
3.1. Intégration et excision des ICE du chromosome hôte.....	17
3.2. Transfert conjugal des ICE.....	19
3.2.1. Transfert simple brin de l'ADN.....	20
3.2.2. Transfert double brin de l'ADN	22
3.3. Régulation du transfert des ICE.....	22
3.3.1. Bistabilité et stochasticité.....	23
3.3.2. Impact des agents endommageant l'ADN.....	24
3.3.3. Le quorum sensing.....	25
3.4. Maintien des ICE	26
3.4.1. Maintien de l'élément entrant.....	26
3.4.1.1. Intégration.....	26
3.4.1.2. Réplication et maintien sous forme circulaire répliquative	27
3.4.2. Maintien au cours des générations.....	29
3.4.2.1. Traits adaptatifs augmentant le fitness de l'hôte	29
3.4.2.2. Systèmes toxines-antitoxines.....	30

3.4.2.3.	Système de partitionnement actif.....	31
3.5.	Barrière à l'acquisition des ICE	31
3.5.1.	Systèmes d'exclusions	31
3.5.2.	Immunité de cible	33
3.5.3.	Répression du transfert.....	33
3.5.4.	Dégradation de l'ADN entrant	33
3.5.4.1.	Système de restriction modification.....	33
3.5.4.2.	Système CRISPR-Cas	34
3.6.	Mobilisation d'autres éléments génétiques par conjugaison	35
3.6.1.	Les éléments intégratifs mobilisables en <i>trans</i> (IME)	35
3.6.2.	Les éléments mobilisables en <i>cis</i> (CIME).....	36
3.7.	Quelques modèles d'ICE	36
3.7.1.	ICE <i>Bs1</i>	36
3.7.2.	ICE <i>SXT</i> -R391	39
3.7.3.	ICE <i>clc</i>	40
3.7.4.	Tn <i>916</i>	42
3.7.5.	ICE <i>St1/3</i>	44
4.	Les modèles d'études.....	46
4.1.	<i>Streptococcus salivarius</i>	46
4.1.1.	Généralités.....	46
4.1.2.	Diversité génétique et transfert horizontal	47
4.2.	<i>Streptococcus thermophilus</i>	48
4.2.1.	Généralités.....	48
4.2.2.	Diversité génétique et transfert horizontal	48
5.	La paroi cellulaire	49
5.1.	La paroi des bactéries à Gram négatif.....	49
5.2.	La paroi des bactéries à Gram positif.....	50
5.2.1.	Les protéines de surface	52
5.2.1.1.	Les protéines à motif LPxTG	52
5.2.1.2.	Les lipoprotéines.....	54
5.2.2.	Les acides téichoïques et lipotéichoïques.....	55
5.2.2.1.	Les acides téichoïques de paroi	56
5.2.2.2.	Les acides lipotéichoïques.....	58

5.2.3. Les exopolysaccharides.....	59
5.3. Impact des composants de la paroi sur le transfert horizontal de gènes	61
5.3.1. Impact sur le transfert horizontal de phages et la transmission d'îlots génomiques.....	61
5.3.2. Impact sur le transfert de plasmide conjugatif	62
5.3.3. Impact sur le transfert d'ICE	62
6. Les biofilms.....	63
6.1. Les biofilms microbiens	63
6.2. Biofilm et transfert horizontal.....	65
II. Résultats.....	66
1. Analyse et comparaison <i>in silico</i> des ICE de <i>Streptococcus salivarius</i> , et évaluation expérimentale de leur fonctionnalité	66
2. Impact des facteurs d'hôte sur le transfert d'ICE _{St3} de <i>Streptococcus thermophilus</i>	90
III. Discussion des résultats et perspectives	133
1. Caractérisation des ICE de <i>Streptococcus salivarius</i> et étude de leur fonctionnalité.....	133
1.1. Caractérisation <i>in silico</i> des ICE de <i>S. salivarius</i>	133
1.1.1. Modules de conjugaison.....	133
1.1.2. Diversité de recombinaison des ICE de <i>S. salivarius</i>	134
1.1.2.1. Sites d'intégrations.....	134
1.1.2.2. Intégration, spectre d'hôte, impact sur le fitness et maintien	134
1.1.3. Diversité des modules de régulation des ICE de <i>S. salivarius</i>	135
1.1.4. Diversité de traits adaptatifs portés par les ICE de <i>S. salivarius</i>	136
1.1.5. Evolution des ICE de la famille ICE _{St3}	138
1.2. <i>S. salivarius</i> un modèle pour l'étude et la caractérisation des ICE de souches commensales ?	140
1.2.1. Organisation des ICE ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i> et ICE_ <i>SsaF4-2_fda</i> de <i>S. salivarius</i>	140
1.2.2. Fonctionnalité des ICE putatifs ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i> et ICE_ <i>SsaF4-2_fda</i> de <i>S. salivarius</i>	140

1.2.2.1. Excision des ICE putatifs ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i> et ICE_ <i>SsaF4-2_fda</i> de <i>S. salivarius</i>	140
1.2.2.2. Transfert intraspécifique des ICE putatifs ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i> et ICE_ <i>SsaF4-2_fda</i> de <i>S. salivarius</i>	140
1.2.2.1. Transfert interspécifique des ICE putatifs ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i> et ICE_ <i>SsaF4-2_fda</i> de <i>S. salivarius</i>	142
1.2.2.2. Autonomie d'ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i> de <i>S. salivarius</i>	143
1.3. Conclusion et perspectives de l'étude	144
2. Impact des facteurs d'hôte sur l'acquisition des éléments de la famille ICE <i>St3</i>	145
2.1. Impact des molécules de surface sur l'acquisition d'ICE <i>St3</i> par les cellules réceptrices.....	145
2.1.1. Impact des protéines exposées à la surface de <i>S. thermophilus</i>	145
2.1.1.1. Impact des lipoprotéines.....	145
2.1.1.2. Impact des protéines à motif LPxTG	147
2.1.2. Impact des acides téichoïques exposés à la surface de <i>S. thermophilus</i> .	147
2.1.2.1. Impact des acides téichoïques de paroi (WTA).....	148
2.1.2.2. Impact des acides lipotéichoïques de paroi (LTA)	150
2.1.2.3. Impact de la charge de la surface de LMG 18311	152
2.1.2.3.1. Impact du lysyl-phosphatidylglycérol (L-PG).....	152
2.1.2.3.2. Impact de la D-alanylation des WTA et LTA	153
2.1.3. Impact des polysaccharides	154
2.1.3.1. Impact des exopolysaccharides.....	154
2.1.3.2. Impact de <i>stu1482-rgpX2</i>	156
2.2. Impact des molécules de surface sur le transfert d'ICE <i>St3</i> par les cellules donatrices.....	157
2.3. Impact des molécules de surface sur le transfert d'ICE <i>St3</i> par les cellules donatrices et de son acquisition par les cellules réceptrices	157
2.4. Conclusion et perspectives de l'étude	158
IV. BIBLIOGRAPHIE	161
V. Annexes	181

I. INTRODUCTION

L'évolution est le processus définissant la modification des traits héréditaires que subit une population biologique au cours de générations successives, processus dont découlent les notions actuelles de spéciation, c'est à dire de divergence et de différenciation des individus en espèces distinctes. L'évolution, telle que décrite par Charles Darwin en 1859, est régie par la sélection naturelle. Celle-ci correspond à l'influence qu'exercent certains facteurs environnementaux sur la survie ou la capacité à se reproduire d'une espèce donnée en fonction de son degré d'adaptation, plus ou moins élevé à ces facteurs. C'est ainsi qu'au fil des générations que parcourt le temps, les organismes sélectionnés ne sont autres que ceux s'étant le mieux adaptés à ce qui les entoure.

La dérive génétique représente l'un des moteurs à l'origine de l'évolution microbienne. Elle implique une modification de la fréquence d'un allèle causée par un phénomène aléatoire, ou autrement dit, au hasard. Un autre facteur majeur aboutissant à l'évolution d'une population ou d'une espèce est la survenue de mutations ponctuelles au niveau du génome. Les mutations peuvent être engendrées par des erreurs stochastiques de réplication de l'ADN, ou lors des mécanismes de réparation de l'information génétique. Soumises à la loi de la sélection, les mutations délétères entraînent souvent la contre-sélection de l'organisme porteur, assurant ainsi la pérennité de l'espèce. *A contrario*, les mutations peuvent être avantageuses pour la bactérie en permettant son adaptation à un environnement engendrant un stress. Ainsi, la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928 suivie de l'émergence de souches résistantes à l'antibiotique quelques années après l'instauration de son utilisation en santé publique n'est autre que la preuve observable à court terme de l'efficacité du génome bactérien à assurer son propre succès évolutif.

L'adaptation microbienne aux environnements hostiles se fait par le biais de ces mutations, qui une fois sélectionnées positivement par la sélection naturelle, sont transmises verticalement à la descendance. Une autre stratégie adaptative présente chez les bactéries consiste à acquérir les gènes nécessaires à leur survie à partir d'autres procaryotes, indépendamment de leur descendance. On parle alors de transfert horizontal de l'information génétique, qui se positionne donc à l'opposé du transfert vertical.

1. Le transfert horizontal

L'accès aux données de séquençage du chromosome bactérien a grandement contribué à la détection de l'empreinte marquée par les flux de gènes, mettant ainsi en évidence l'impressionnante transmission de régions, plus ou moins grandes, d'ADN via ce mécanisme. Il a ainsi été observé suite au séquençage des génomes de 17 isolats d'*Escherichia coli*, qu'environ 2200 gènes constituaient le core génome, autrement dit, la partie conservée du génome de l'espèce. Le pangénome, soit l'ensemble des gènes retrouvés chez les différents isolats, comptait quant à lui environ 13000 gènes. Plus de 10000 gènes variables, c'est-à-dire propres à chaque ou à une minorité d'isolats, ont donc été recensés dans le pangénome de *E. coli* (Rasko *et al.*, 2008). Ainsi, cette forte proportion du pangénome bactérien représente un réservoir remarquable d'informations génétiques potentiellement acquises et transférées horizontalement d'une souche à une autre, voire d'une espèce à une autre. Des données ont très tôt suggéré que la proportion de gènes acquis par transfert horizontal chez *E. coli* était de 18% sur une échelle de 14 millions d'années (Lawrence & Ochman, 1998), tandis que celle des protéines acquises par transfert horizontal chez les Protéobactéries est estimée à 75% (Kloesges *et al.*, 2011). La quantité de gènes transmis horizontalement n'en demeure pas moins sous-évaluée. En effet, afin de se maintenir dans la cellule hôte, l'information génétique nouvellement acquise doit pouvoir augmenter l'avantage sélectif de la cellule réceptrice, ou au moins porter un caractère permettant son propre succès évolutif, parfois même au détriment de l'hôte, c'est le cas des éléments génétiques égoïstes. Dans le cas contraire, les gènes acquis ne sont pas maintenus dans la cellule et ne sont par conséquent pas transmis à la descendance. La perte de gène par délétion est un phénomène non négligeable de l'évolution bactérienne contribuant également à la sous-estimation de ces flux de gènes.

Le transfert horizontal se déroule en 3 étapes. La première nécessite la mise en contact de la cellule avec l'ADN étranger, puis son entrée dans la cellule, et enfin son maintien et transmission à la descendance. Trois mécanismes majeurs sont à l'origine du transfert horizontal : la transduction, la transformation, et la conjugaison (Figure 1).

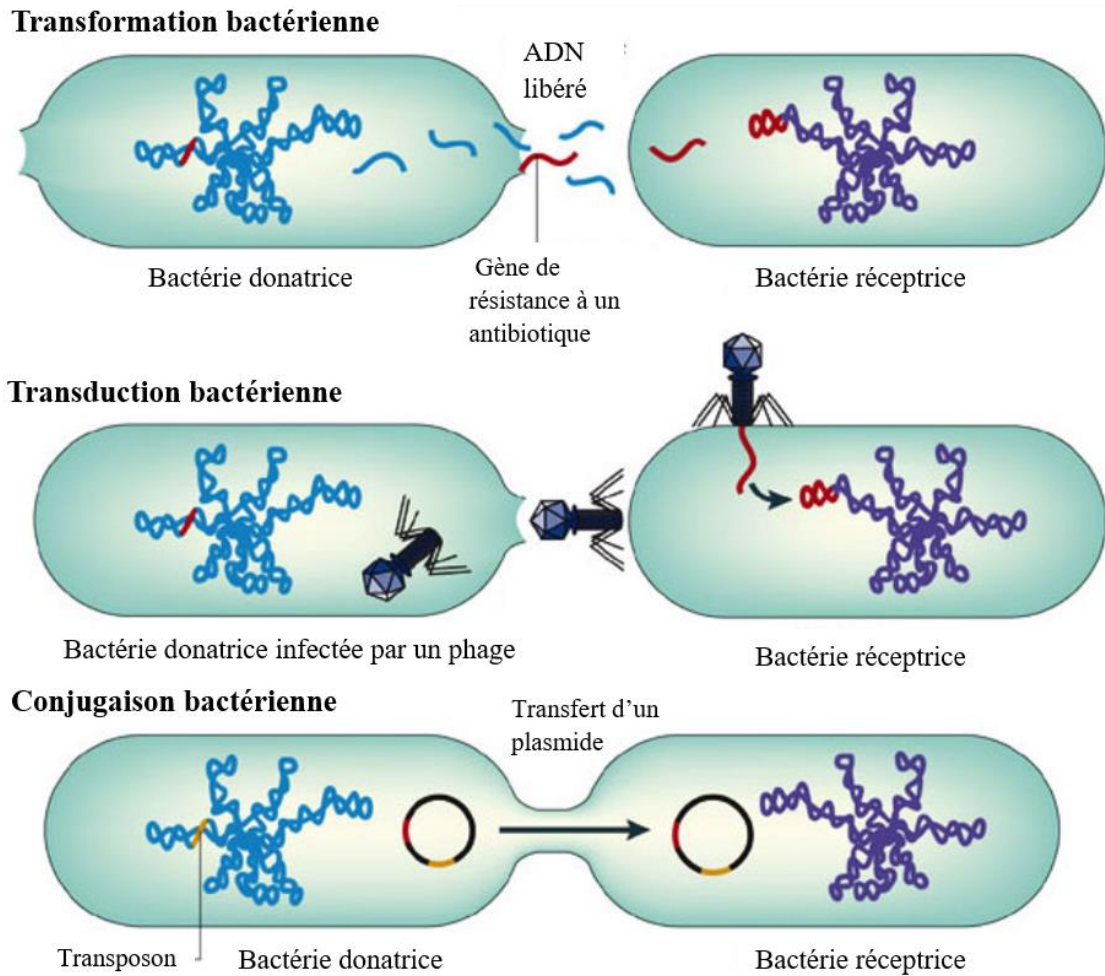


Figure 1 : Représentation schématique des trois mécanismes majeurs de transfert horizontal (adaptée d'après Furuya & Lowy, 2006).

1.1. La transduction

La transduction est le mécanisme au cours duquel des gènes bactériens sont transférés d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire de phages (*i.e.* virus infectant les bactéries). Ce mécanisme, répandu au sein de tous les genres bactériens (Miller, 1998; Ruhfel *et al.*, 1984; Yu & Baldwin, 1971), est rendu possible suite à l'encapsidation d'une portion d'ADN chromosomique ou d'ADN plasmidique de la bactérie. Il s'ensuit alors une nouvelle étape d'infection de cellules bactériennes par le phage où le contenu de sa capside est libéré dans le cytoplasme bactérien (Miller, 2001). En cas de compatibilité des séquences d'ADN entrantes

avec le chromosome de l'hôte, des recombinaisons homologues peuvent s'effectuer, assurant de ce fait le maintien de l'information acquise dans le chromosome résident. Les plasmides entrants peuvent quant à eux être maintenus à l'état réplcatif dans le cytoplasme de l'hôte (Miller, 2001).

Il existe deux types de transduction. La transduction est dite généralisée lorsque l'information microbienne est incorporée dans le phage aléatoirement durant la lyse cellulaire (cycle lytique), tandis que la transduction est dite spécialisée lorsqu'un phage intégré dans le génome d'une bactérie (*i.e.* prophage) s'excise du chromosome hôte et incorpore l'ADN microbien flanquant son site d'intégration.

Lors du mécanisme de transduction, les phages peuvent entraîner le transfert de gènes avantageux pour la cellule réceptrice permettant ainsi leur propre survie et dissémination (Modi *et al.*, 2013). Des cas de transfert de résistance à l'érythromycine (Hyder & Streitfeld, 1978), tétracycline ou de multiples résistances acquises par transduction ont en particulier été décrits chez *Streptococcus pyogenes* (McShan & Nguyen, 2016; Ubukata *et al.*, 1975).

1.2. La transformation

La transformation naturelle, observée pour la première fois par Griffith en 1928 chez *Streptococcus pneumoniae*, consiste en l'absorption, l'intégration et l'expression fonctionnelle d'ADN étranger extracellulaire (Griffith, 1928). La transformation naturelle est fortement représentée au sein du phylum des Firmicutes (*Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus salivarius*, et d'autres...) (Blomqvist *et al.*, 2006; David *et al.*, 2017; Fontaine *et al.*, 2010; Mulder & Venema, 1982; Perry & Kuramitsu, 1981). Des cas de transformations naturelles ont également été décrits pour les subdivisions alpha, beta, gamma et epsilon des protéobactéries (Catlin, 1960; Demaneche *et al.*, 2001; Frischer *et al.*, 1990).

La transformation nécessite le rassemblement d'un certain nombre de conditions : de l'ADN étranger doit se trouver dans le milieu environnant, la bactérie réceptrice doit se trouver dans un état dit de compétence, et l'ADN acquis doit être stabilisé soit par intégration au sein du génome de la bactérie réceptrice, soit par re-circularisation dans le cas de l'ADN plasmidique (Thomas & Nielsen, 2005).

Alors que les bactéries du genre *Neisseria* sont considérées comme constitutivement compétentes, la compétence d'autres espèces est induite uniquement dans certaines conditions, largement dépendantes de la phase de croissance de la bactérie, de la présence de peptides, des nutriments à disposition ou sous d'autres conditions induisant un stress donné (Johnston *et al.*, 2014). Ainsi, le phénotype de compétence chez *S. pneumoniae* de même que chez *B. subtilis* et *Haemophilus influenzae*, est exprimé spontanément et indépendamment de la présence d'ADN libre dans le milieu environnant. Alors que certaines bactéries compétentes absorbent l'ADN libéré passivement suite à la mort cellulaire des bactéries avoisinantes, les bactéries *S. pneumoniae* compétentes expriment un ensemble d'hydrolases du peptidoglycane lui permettant d'attaquer la paroi cellulaire des cellules voisines non compétentes, provoquant leur lyse cellulaire et la libération de leur ADN. Celui-ci devient alors une source potentielle d'informations génétiques disponibles à l'absorption par *S. pneumoniae* (Johnsborg *et al.*, 2007). Chez les Streptocoques notamment *S. salivarius* et *S. thermophilus*, la compétence est sous le contrôle transcriptionnel du gène *comX*, lui-même dépendant d'un système de quorum sensing ComRS. En effet, la compétence de ces bactéries dépend de la production, de la maturation et de la sécrétion d'un peptide signal nommé ComS (compétence signal), principalement détecté par la protéine AmiA3 lorsque sa concentration extracellulaire devient conséquente. AmiA3 transporte par la suite ComS et permet son interaction avec le régulateur ComR (competence regulator) qui est un activateur transcriptionnel pléiotropique de type Rgg. Cette interaction aboutit alors à l'activation de ComR qui se lie à ComE et favorise la transcription de *comX*. ComX code le facteur sigma régulant positivement les gènes nécessaires à la transformation (Fontaine *et al.*, 2010; Haustenne *et al.*, 2015).

Des travaux démontrant le transfert de résistances à la pénicilline et à la streptomycine par transformation naturelle chez *S. pneumoniae* (Hotchkiss, 1951) et entre *H. influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae* et *Haemophilus suis* (Alexander *et al.*, 1956) ont très tôt mis l'accent sur le rôle de la transformation naturelle dans le succès évolutif de ces espèces, en leur permettant l'intégration d'ADN nécessaire à leur survie.

1.3. La conjugaison

La conjugaison est un mécanisme par le biais duquel de l'information génétique est transférée après établissement d'un contact physique entre la bactérie donatrice et la bactérie réceptrice, et ce grâce à la mise en place d'une machinerie protéique (pili, adhésines, système

de sécrétion de type IV) (Guglielmini *et al.*, 2013; Wozniak & Waldor, 2010). De façon analogue à la transformation et la transduction, l'intégration de l'ADN acquis par conjugaison au sein du chromosome de la bactérie réceptrice, ou sa re-circularisation sont requises pour son maintien et transmission à la descendance.

Le mécanisme d'acquisition de l'information génétique par conjugaison est considéré comme majeur dans la dynamique du génome bactérien obtenue par transfert horizontal, et ce en assurant une meilleure efficacité d'acquisition de l'ADN que la transformation et un spectre d'hôte plus important que la transduction. En effet, la probabilité de dégradation de l'ADN nu exogène par des DNases ou des métaux lourds dans l'environnement naturel n'étant pas négligeable, l'efficacité de son acquisition lors de la transformation naturelle peut en être lourdement impactée. *A contrario*, lors de la transduction, l'ADN est encapsidé, ce qui le protège des facteurs de risques rencontrés dans l'environnement, augmentant alors l'efficacité de l'ADN exogène à entrer dans une nouvelle cellule hôte. Cependant, la plupart des phages décrits présentent un spectre de spécificité d'hôtes limité. La conjugaison, quant à elle protège l'ADN étranger du milieu environnant, en plus de présenter un spectre d'hôtes recouvrant une large distance taxonomique (Musovic *et al.*, 2006). Celle-ci peut atteindre des organismes d'autres domaines du vivant proches géographiquement, tel que décrit pour le transfert de plasmides conjuguatifs de procaryote à eucaryote (Kyndt *et al.*, 2015; Norman *et al.*, 2009). De ce fait, la conjugaison contribue grandement au réservoir de gènes disponibles au sein d'une communauté microbienne en plus de permettre l'acquisition de fragments de tailles plus importantes. Pour exemples le transfert par conjugaison d'une région de 334 kb et d'un plasmide conjuguatif de 600 kb a été décrit chez *Streptococcus agalactiae* (Brochet *et al.*, 2008) et chez des bactéries du genre *Alteromonas* (Lopez-Perez *et al.*, 2017) respectivement.

1.4. Autres mécanismes de transfert horizontal

1.4.1. La transconjugaison

La transconjugaison est un mécanisme nouvellement décrit de transfert horizontal d'informations génétiques. Ce mécanisme représente un système hybride de transformation de l'ADN étranger via un processus conjuguatif. Ainsi, la transconjugaison se déroule en deux étapes au cours desquelles la bactérie donatrice libère activement l'ADN suite à l'établissement d'un contact cellulaire avec la bactérie réceptrice, après quoi cette dernière utilise sa compétence naturelle afin de récupérer l'ADN relargué. Ce mécanisme n'est décrit

que pour le transfert d'un élément génétique mobile de la souche HB27 de *Thermus thermophilus*, où le relargage actif de l'ADN est réalisé par la protéine TdtA qui s'oligomérisse en hexamère autour de la molécule d'ADN double brin et utilise son activité ATPase afin de procéder activement au relargage de l'élément dans le milieu environnant (Blesa *et al.*, 2017).

1.4.2. Les vésicules membranaires

Les vésicules membranaires correspondent à des structures libérées de la surface cellulaire de nombreuses bactéries à Gram négatif, et de plus en plus mises en évidence chez les bactéries à Gram positif. Celles-ci peuvent contenir des protéines, des polysaccharides, des ions, des métabolites, des molécules de signalisation et de l'information génétique importante pour l'adaptation microbienne (Garcia-Aljaro *et al.*, 2017). Le relargage de vésicules membranaires comportant notamment des gènes de virulence et de résistances aux antibiotiques par *E. coli*, acquises ensuite par transformation par des Salmonelles a par ailleurs été observé (Mashburn-Warren *et al.*, 2008). De même, le relargage d'ADN extracellulaire par le biais de ce mécanisme par *Streptococcus mutans* dans des biofilms en formation procure une source de matériel génétique à disposition de la communauté microbienne (Liao *et al.*, 2014). De ce fait, les vésicules membranaires sont des éléments qui peuvent contribuer au transfert horizontal de gènes sans nécessiter l'intervention d'éléments génétiques mobiles (Garcia-Aljaro *et al.*, 2017).

1.4.3. Les nanotubes

Les nanotubes sont des structures tubulaires à travers desquelles du contenu cellulaire est échangé entre bactéries de la même espèce, ou d'espèces différentes. Le rôle des nanotubes est donc similaire à celui des pili mais ces derniers diffèrent de par la machinerie mise en place afin de mener à bien leurs fonctions (Garcia-Aljaro *et al.*, 2017).

1.4.4. Le Système Ced

Le système Ced met en œuvre un mécanisme retrouvé uniquement chez les Archées, et qui permet le transfert d'information génétique suite à l'exposition des cellules à un stress endommageant l'ADN. Celui-ci active le système Ups permettant la synthèse de pili et l'agrégation des cellules, l'ADN est ensuite transféré par un mécanisme encore inconnu, puis importé dans la cellule par le biais du système Ced. L'ADN importé peut alors permettre la

mise en place d'évènements de recombinaisons homologues susceptibles de réparer l'ADN endommagé (Wagner *et al.*, 2017).

2. Les éléments génétiques mobiles

Les éléments génétiques mobiles sont les acteurs du transfert horizontal chez les bactéries. Ce sont des éléments capables de se transférer et de se maintenir dans le génome de la cellule hôte. Ils jouent par conséquent un rôle majeur dans l'évolution du génome bactérien.

Parmi les éléments mobiles soumis au flux, nombreux sont ceux conférant un avantage sélectif à l'organisme porteur. Ainsi, le transfert d'éléments génétiques mobiles conférant des résistances aux antibiotiques a été observé dans différents écosystèmes : transfert entre bactéries au sein d'hôtes eucaryotes, dans le sol, dans des environnements aquatiques, et vers des bactéries liées à l'industrie alimentaire, ou des bactéries pathogènes (Davison, 1999). Le transfert conjugatif de ces éléments contribue donc significativement à la dissémination des résistances antibiotiques et constitue de ce fait un enjeu majeur de santé publique. Ceci est également appuyé par le transfert de gènes de pathogénicité (Wagner *et al.*, 2002).

Quatre types d'éléments génétiques mobiles ont été décrits : les phages, les éléments transposables, les plasmides et les îlots génomiques.

2.1. Les phages

Le phage infectant une cellule bactérienne peut suivre un cycle lytique. Lors de ce cycle, la cellule infectée est lysée suite à la réplication immédiate du phage, après que celui-ci ait détourné la machinerie de réplication bactérienne. En revanche, certains phages dits tempérés suivent un cycle lysogénique au sein de la bactérie hôte sous la forme de prophages. Dans ce cas de figure, le phage s'intègre au chromosome bactérien et est répliqué avec le reste de l'ADN résident, assurant alors son maintien au cours des générations. Lorsque l'hôte rencontre une détérioration des conditions de vie suite à un stress comme lors de privations en nutriments, le prophage sort de son état de dormance et déclenche son cycle lytique. Cela se traduit par la lyse cellulaire et la dissémination du phage dans le milieu environnant (Canchaya *et al.*, 2003) (Figure 2).

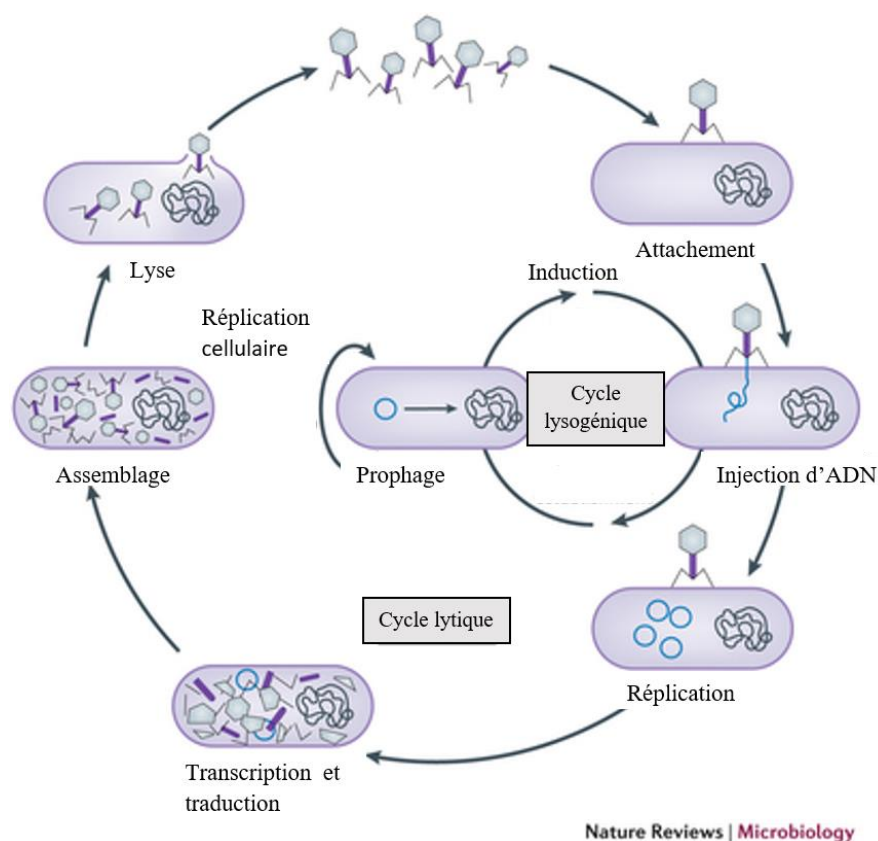


Figure 2 : cycle de vie d'un phage alternant cycle lysogénique et cycle lytique (adaptée de Salmond & Fineran, 2015).

L'intégration des prophages dans le chromosome hôte se fait généralement par recombinaison site-spécifique. Deux familles de recombinases catalysent la réaction d'intégration et d'excision des prophages, il s'agit des recombinases à tyrosine et recombinases à sérine selon l'acide aminé catalytique mis en jeu, souvent aidées par un facteur de recombinaison directionnelle RDF (Xis). La recombinaison site-spécifique du phage lambda est la mieux décrite. Celle-ci s'effectue entre deux courtes séquences identiques dont la taille varie de 8 à 60 nucléotides, et se déroule en deux étapes : (i) un des deux brins d'ADN est clivé par l'intégrase induisant un changement conformationnel, suivi (ii) du clivage du deuxième brin et la résolution des jonctions d'Holliday (Radman-Livaja *et al.*, 2003; Radman-Livaja *et al.*, 2005).

L'analyse des génomes séquencés a démontré la prévalence de prophages dans les chromosomes de bactéries pathogènes (Canchaya *et al.*, 2004). Ces observations, loin d'être anodines, sont liées au fait que les prophages sont souvent porteurs de facteurs de virulence,

tel que démontré pour la première fois en 1951 pour le phage- β de *Corynebacterium diphtheriae* codant pour la toxine diphtérique (Freeman, 1951). Des cas similaires ont par la suite été décrits, notamment pour la transmission de l'agent du choléra via le phage CTX Φ de *Vibrio cholerae* (Waldor & Mekalanos, 1996), ou des entérotoxines P et A codées respectivement par les phages Φ N315 et Φ 13 de *Staphylococcus aureus* (Coleman *et al.*, 1989; Kuroda *et al.*, 2001). Il a également été suggéré que l'émergence de souches hautement virulentes chez *Streptococcus pyogenes* était due à l'acquisition de trois prophages arborant une composition spécifique de superantigènes, de toxines et d'enzymes sécrétées (Canchaya *et al.*, 2003; Desiere *et al.*, 2001).

2.2. Les éléments transposables

Les éléments transposables, aussi appelés transposons, ont été décrits à la fin des années 1940 par Barbara McClintock (Ravindran, 2012). Ce sont des séquences d'ADN ayant la capacité de se mouvoir dans le génome d'un point à un autre assurant ainsi leur propagation. Il existe deux types de transposition. La première, dite répllicative, permet à l'élément de se déplacer d'un site donneur à un site récepteur suite à sa réplication préalable. Une copie de l'élément transposable est alors maintenue dans le site donneur, ce qui augmente le nombre de copies de l'élément au sein du génome hôte (transposons de type I). La deuxième, dite conservatrice, consiste en un transfert de l'élément transposable d'un site donneur à un site récepteur sans qu'une copie de celui-ci ne soit sauvegardée dans le site donneur (transposons de type II). Les transposons codent généralement pour une enzyme de type transposase ou recombinase à sérine ou tyrosine et présentent de courtes séquences terminales répétées, toutes deux nécessaires à leur mobilité (Haniford & Ellis, 2015; Lodge *et al.*, 1988; Morisato & Kleckner, 1987; Roberts *et al.*, 2008).

Certains transposons peuvent se déplacer d'un hôte à un autre en s'insérant au sein d'éléments génétiques capables de se transférer d'une cellule à une autre, tels que les phages, les plasmides, les éléments intégratifs conjugatifs ou les éléments mobilisables, ce qui leur permet d'assurer leur propagation et maintien (Roberts *et al.*, 2008).

Les transposons peuvent également faire bénéficier leur hôte de fonctions adaptatives. C'est le cas de certains transposons porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques (*e.g.* Tn9 portant la résistance au chloramphénicol, figure 3), aux métaux lourds, producteur de toxines,

ou codant des protéines de surface cellulaire (Furushita *et al.*, 2011; Jean & Hsueh, 2011; Pinyon & Hall, 2011; Roberts *et al.*, 2008).

Les séquences d'insertion (IS) représentent la forme la plus simple et la plus représentée d'élément transposables. Celles-ci sont capables de s'insérer à différents sites dans le génome sans nécessiter une large région d'homologie avec la séquence nucléotidique cible, et codent généralement une transposase et des molécules intervenant dans la régulation de leur transposition. Les IS sont regroupées dans différentes familles en fonction de la taille et de la séquence de leurs séquences terminales imparfaites de répétitions inversées (IR), de la taille et de la séquence des courtes répétitions directes flanquant l'élément (DR), de l'organisation de leur phase ouverte de lecture, des sites d'insertions ciblés et de la classification de la transposase qu'ils codent (Siguier *et al.*, 2014).

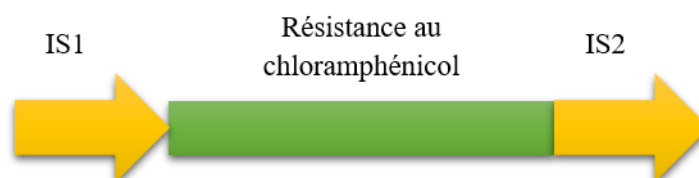


Figure 3 : Représentation schématique de l'organisation du transposon Tn9 du bactériophage P1Cm0.

Tn9 est un transposant portant le gène *cat* procurant la résistance au chloramphénicol, borné par deux séquences d'insertion IS1 et IS2.

2.3. Les plasmides conjugatifs

Les plasmides correspondent à des séquences d'ADN maintenues sous forme circularisée répliquative dans le cytoplasme de l'hôte. Ce sont des éléments ubiquitaires retrouvés dans toutes les branches du domaine des bactéries, surplombant toutes les communautés microbiennes et les écosystèmes terrestres, marins ou spécifiques au milieu clinique. Certains plasmides peuvent se transférer d'une cellule à une autre via un mécanisme de conjugaison, et bénéficient d'un spectre d'hôte allant parfois au-delà des limites intra-domaine (Turner *et al.*, 2002; van Elsas & Bailey, 2002).

Les plasmides conjugatifs codent les fonctions permettant leur propre transfert. La relaxase est une protéine commune nécessaire à tous les plasmides pour leur transfert, qui reconnaît une origine de transfert (*oriT*) et procède à la coupure simple brin du plasmide. L'association avec d'autres protéines forme un complexe dénommé relaxosome. Cette structure est par la suite reconnue par la protéine de couplage (T4CP) permettant de la diriger vers la paroi cellulaire. Le plasmide est parallèlement dupliqué par un mécanisme de réplication en cercle roulant très représenté chez les plasmides des bactéries à Gram positif, mais également décrit pour des plasmides de bactéries à Gram négatif (Ruiz-Maso *et al.*, 2015) (Figure 4).

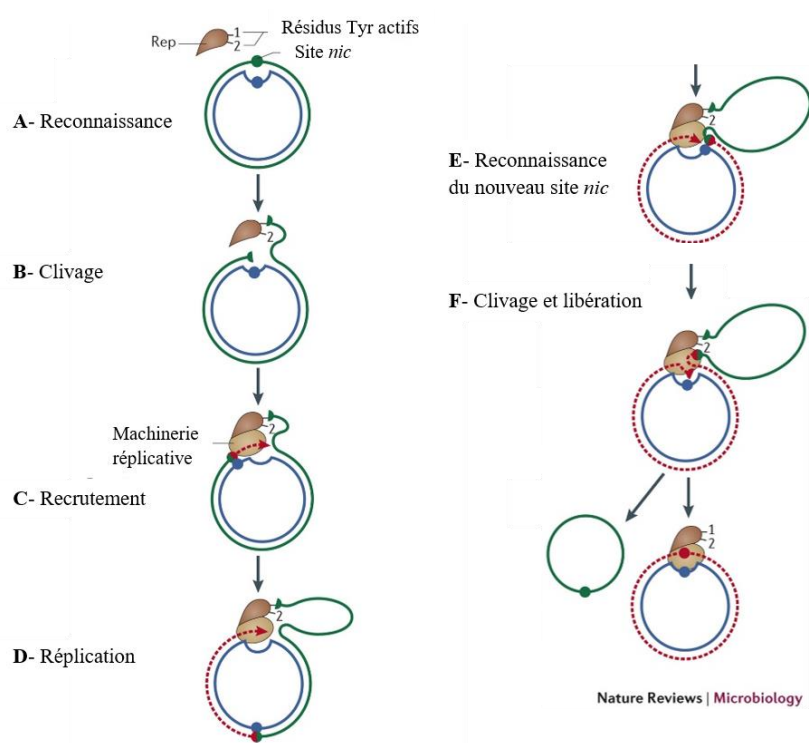


Figure 4 : Représentation de la réplication par cercle roulant plasmidique (adaptée d'après Chandler *et al.*, 2013).

A-La protéine de réplication Rep contient deux résidus catalytiques Tyr 1 et 2 qui reconnaissent la molécule d'ADN double brin (brin sens en vert, brin anti-sens en bleu) au niveau de l'extrémité 3' de la séquence de reconnaissance. **B-**Rep clive l'ADN au site *nic* et forme un lien phospho-tyrosine avec le résidu Tyr 1. **C-**L'appareil de réplication est recruté. **D-**Initiation de la réplication au site *nic* reconstitué. **E-**Après la réplication de toute la molécule d'ADN, Rep et le reste de la machinerie arrivent au site *nic* reconstitué. **F-**Libération de la molécule néoformée.

Chez les bactéries à Gram négatif, les plasmides sont transférés à travers un pilus assemblé par un système de sécrétion de type IV (T4SS), tandis qu'aucun pilus n'a jusqu'alors été observé pour la conjugaison d'éléments génétiques mobiles se trouvant chez

les bactéries à Gram positif, où le transfert se fait à travers un pore protéique de conjugaison. Une fois dans la cellule réceptrice, la relaxase catalyse une dernière étape de ligature permettant la re-circularisation du plasmide et son maintien dans le cytoplasme (Byrd & Matson, 1997; de la Cruz *et al.*, 2010; Furste *et al.*, 1989; Gomis-Ruth *et al.*, 2004).

D'autres plasmides ne possèdent qu'une partie des gènes nécessaires à leur transfert et sont donc dépendants de l'établissement de la machinerie conjugative d'autres éléments conjugatifs. Ces plasmides, dits mobilisables, portent uniquement une origine de transfert, et peuvent présenter ou non un gène codant pour la relaxase, et un ou deux gènes auxiliaires nécessaires à leur clivage (Ramsay & Firth, 2017). Leur mobilisation est rendue possible grâce à l'intervention de protéines pouvant agir en *trans* (O'Brien *et al.*, 2015; Ramsay *et al.*, 2016), ou en *cis* lors du co-transfert avec l'élément mobilisateur (Brom *et al.*, 2004; Haskett *et al.*, 2016).

L'information génétique portée par les plasmides conjugatifs est d'une grande diversité se traduisant par une diversité de traits phénotypiques. Parmi les fonctions connues codées par les plasmides, nombreuses sont celles conférant un avantage sélectif à l'organisme hôte. Des travaux alarmants, mettant en évidence leur impact dans la dissémination de résistance aux antibiotiques en plus de leur implication dans la pathogénicité de certaines espèces (Aviv *et al.*, 2016; Lang & Faure, 2014), se font de plus en plus fréquents (Harmer & Hall, 2015; Wyrsh *et al.*, 2016). Les plasmides conjugatifs sont parfois également porteurs de gènes de résistance aux métaux lourds vraisemblablement acquis à l'origine dans des écosystèmes pollués (Aminov, 2011) ou peuvent conférer des propriétés permettant à l'hôte de mettre en place des relations symbiotiques (Brom *et al.*, 2004). Comme pour beaucoup d'autres éléments, un nombre non négligeable de fonctions portées par les plasmides sont encore inconnues (Koonin, 2016).

2.4. Les îlots génomiques

Les îlots génomiques correspondent à une large famille d'éléments génétiques mobiles jouant un rôle important dans la différenciation et l'adaptation du génome bactérien à de nouvelles niches écologiques. Il s'agit de régions chromosomiques de tailles variées pouvant être transférées horizontalement. Leur contenu impacte considérablement le fitness de la cellule hôte, à travers l'apport de nouvelles fonctions telles que la résistance aux antibiotiques,

aux phages et métaux lourds, des facteurs de virulence, la capacité à effectuer des symbioses ou l'utilisation de nouvelles voies métaboliques (Dobrindt *et al.*, 2004).

La détection des îlots génomiques tient compte de la présence d'un certain nombre de conditions. Ces régions chromosomiques ne sont généralement retrouvées que dans certaines souches d'une espèce donnée et sont absentes du génome des autres souches, ce qui témoigne d'une acquisition récente de ces îlots par transfert horizontal ou une perte récente par délétion de gènes. Elles ne peuvent par conséquent pas être considérées comme faisant partie du core génome. Les îlots génomiques présentent par ailleurs un pourcentage de bases G+C ou une utilisation de codons différents de ceux du reste du génome dans lequel ils sont intégrés, lorsque ceux-ci sont issus d'hôtes relativement distants, appuyant ainsi la possibilité qu'ils aient été acquis suite à un transfert horizontal (Bellanger *et al.*, 2014).

Certains îlots génomiques ont la capacité de s'exciser à faible fréquence, et de se transférer vers une cellule réceptrice par co-transduction (Ubeda *et al.*, 2007) ou par conjugaison (Juhas *et al.*, 2007). Ils peuvent ensuite s'intégrer au chromosome souvent via une recombinaison site-spécifique dirigée par une intégrase au niveau d'un ou plusieurs sites chromosomiques (Bellanger *et al.*, 2014; Harmer & Hall, 2015; Ramsay *et al.*, 2006; Ravatn *et al.*, 1998; Wyrsh *et al.*, 2016). Les éléments intégratifs conjugatifs (« Integrative and Conjugative Elements, ICEs ») sont des îlots génomiques remplissant l'ensemble de ces conditions. D'autres îlots ne possèdent pas toute la machinerie nécessaire à leur transfert et sont dépendants de la machinerie d'autres éléments de type ICE ou plasmides conjugatifs. Parmi ces îlots, certains sont mobilisables en *trans* tels que les éléments intégratifs mobilisables (« Integrative Mobilizable Elements, IMEs ») ou l'îlot 1 de pathogénicité des *Salmonelles* (SGI1), tandis que d'autres sont mobilisables en *cis* tels que les éléments mobilisables en *cis* (« CIs Mobilizable Elements, CIMEs »). Par ailleurs, certains îlots semblent avoir été soumis à différents événements de délétions de gènes ou de recombinaisons anarchiques aboutissant à la perte entière de leur mobilité (Bellanger *et al.*, 2014; Carraro *et al.*, 2017).

Deux classes d'îlots génomiques sont considérées comme dérivés de prophages ancestraux et gardent des caractéristiques phares relatives au fonctionnement du prophage. C'est le cas des îlots de pathogénicité des *Staphylocoques* (SaPIs), qui sont des îlots génomiques de 15 kb comprenant une multitude de gènes de pathogénicité (Figure 5). Ces

îlots représentent une des classes majeures d'îlots génomiques décrits jusqu'à présent. Largement distribués au sein de *Staphylococcus aureus*, ils sont maintenus sous forme intégrée par un répresseur non inductible par la réponse SOS de dommage à l'ADN, pouvant être neutralisé par des phages helper portant la protéine anti-répresseur. Une fois excisée, SaPI se réplique de façon autonome puisqu'il comporte une origine de réplication et une protéine initiatrice de réplication (Rep). L'îlot est ensuite encapsidé et transféré par transfert horizontal (Novick & Ram, 2016; Ruzin *et al.*, 2001).

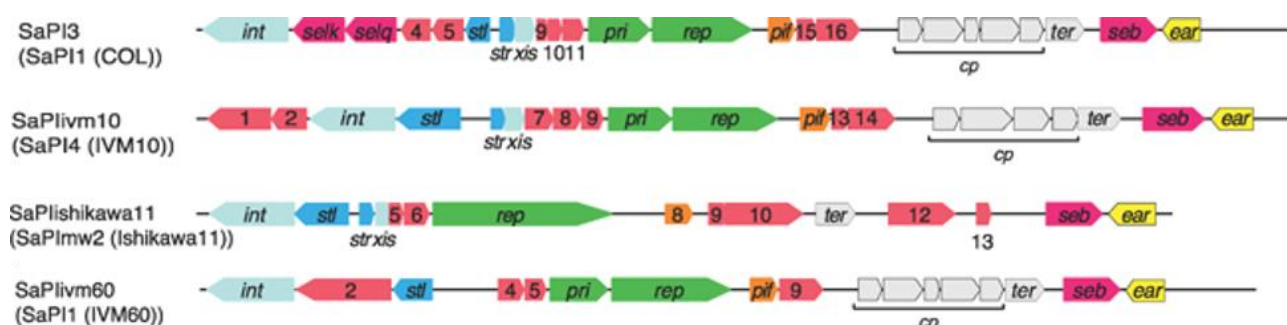


Figure 5 : Exemples d'organisation de différents îlots appartenant à la famille SaPI (adaptée d'après Sato'o *et al.*, 2013).

Cp, gène d'empaquetage ; *ear*, protéine se liant à la pénicilline ; *int*, intégrase ; *pif*, gène d'interférence avec des phages ; *pri*, primase ; *rep*, initiateur de la réplication ; *seb*, entérotoxine B staphylococcale ; *selk*, toxine de type entérotoxine K staphylococcale ; *selq*, toxine de type entérotoxine Q staphylococcale ; *stl*, répresseur ; *str*, régulateur ; *xis*, excisionase.

L'autre type d'îlot ancestralement lié aux prophages correspond aux agents de transfert de gènes (GTAs). Ces îlots, d'environ 5 kb considérés comme des phages défailants, forment des particules virales où sont encapsidés des fragments aléatoires d'ADN chromosomique hôte, au détriment complet de l'ADN phagique, ce qui les distingue d'un prophage classique. Les GTAs, libérés dans l'environnement suite à la lyse cellulaire, infectent d'autres procaryotes, suite à quoi l'ADN est intégré au chromosome de la cellule réceptrice (Koonin, 2016; Lang *et al.*, 2012). Contrairement aux autres îlots génomiques, le rôle des GTAs et l'avantage qu'ils confèrent à leurs hôtes restent encore flous, bien que des études tendent à leur accorder un rôle bénéfique dans la survie cellulaire (Stanton, 2007).

3. Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE)

Les ICE sont des éléments chromosomiques mobiles dont la taille varie de 18 à 600 kb ayant la capacité de s'exciser du chromosome de l'organisme donneur, de se circulariser, de

se répliquer, et de se transférer vers une cellule réceptrice par conjugaison puis de s'intégrer au chromosome de la cellule réceptrice afin d'assurer son maintien à la descendance (Burrus *et al.*, 2002; Burrus, 2017) (Figure 6).

L'intégration des ICE au chromosome est le produit d'un événement de recombinaison entre deux répétitions directes *att* de l'ADN, incluses au niveau du chromosome (site *attB*) et au niveau de la forme extra-chromosomique circulaire de l'ICE (site *attI* ou *attP*). L'intégration aboutit à la formation de deux répétitions directes de l'ADN, bordant chacune des extrémités de l'élément : site *attL* à l'extrémité gauche, et site *attR* à l'extrémité droite. La réaction inverse, se traduisant par l'excision de l'élément, comprend un second événement de recombinaison entre ces sites *attR* et *attL* (Bellanger *et al.*, 2014; Delavat *et al.*, 2017; Wozniak & Waldor, 2010) (Figure 6).

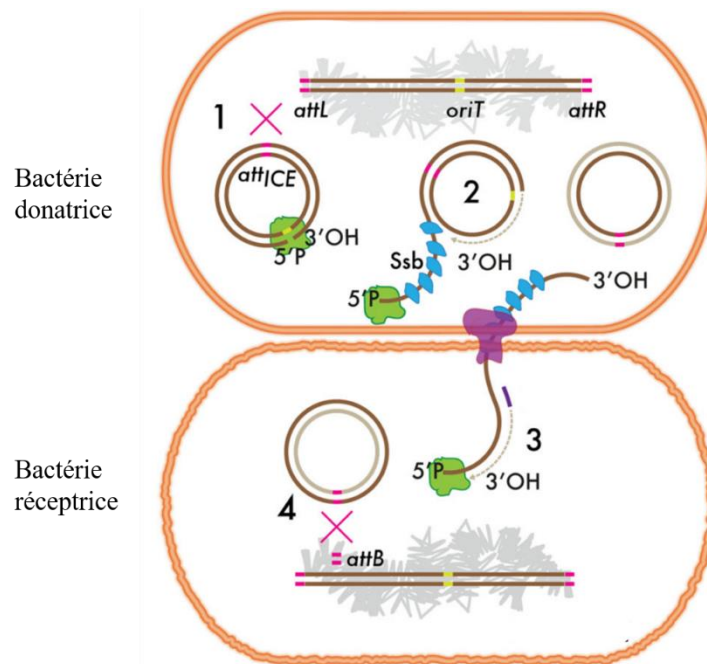


Figure 6 : Modèle généralisé de transfert des ICE (adaptée d'après Delavat *et al.*, 2017).

L'ICE est intégré dans le chromosome hôte, s'excise par recombinaison site-spécifique (croix roses) entre les sites d'attachements *attL* et *attR*. L'ICE excisé (1) est clivé sous forme simple brin au niveau de l'origine de transfert *oriT*, puis est reconstitué par réplication par cercle roulant suite à l'action de la relaxase (2) (vert). Une copie unique du simple brin est conduite à travers le pore de conjugaison de type IV par la protéine Ssb (Single-strand DNA binding protein) vers la bactérie réceptrice. La molécule double brin d'ADN est reconstituée (3) et se recombine de façon site-spécifique avec le site *attB* du chromosome bactérien pour être réintégrée (4).

Par analogie aux différents éléments génétiques mobiles décrits ci-dessus, les ICE présentent une organisation modulaire (Figure 7). Celle-ci décrit le regroupement dans la même région des différentes séquences ADN intervenant dans une même fonction biologique.

Ainsi, les ICE présentent : (i) un module de recombinaison qui assure la mobilité intracellulaire en codant une intégrase, protéine essentielle à l'excision de l'élément de la cellule donatrice, et à son intégration dans le génome de la bactérie réceptrice. Selon le type d'intégrase codée par l'ICE, l'intégration dans le chromosome hôte peut s'effectuer suite à une recombinaison site-spécifique. Ce module peut également coder une excisionase jouant le rôle de cofacteur favorisant l'excision de l'élément ; (ii) un module de conjugaison qui inclut une origine de transfert et code toutes les protéines nécessaires au transfert de l'élément et à la synthèse du pore protéique de conjugaison ; (iii) un module de régulation qui contrôle le processus de conjugaison en réponse à des stimuli extérieurs. Enfin, les ICE portent (iv) un module d'adaptation pouvant conférer un avantage sélectif à l'organisme hôte tel que la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds et aux phages, des gènes de pathogénicité, la capacité à effectuer des symbioses, ainsi que de nouvelles voies métaboliques. Les ICE évoluent par l'échange ou l'acquisition de ces modules à partir d'autres éléments génétiques mobiles tels que des ICE, des plasmides ou des prophages, mais aussi par la perte de ces modules (Bellanger *et al.*, 2014; Burrus *et al.*, 2002; Delavat *et al.*, 2017; Wozniak & Waldor, 2010).

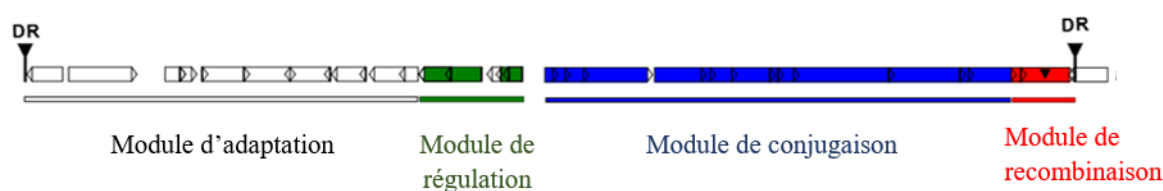


Figure 7 : Organisation modulaire type d'un ICE.

DR, répétitions directes bordant l'ICE.

Le spectre d'hôte des ICE est variable d'un élément à un autre. L'expérimentation *in vitro* du transfert conjugatif des ICE a néanmoins appuyé la capacité d'une majorité de ces éléments à se transférer en intra- et inter-espèces, comme démontré dans un premier temps pour Tn916 d'*Enterococcus faecalis* (Franke & Clewell, 1981; Roberts & Mullany, 2009), capable de se transférer vers un large spectre de Firmicutes et de Protéobactéries, ou alors CTnDOT de *Bacteroides thetaiotaomicron* (Shoemaker *et al.*, 1989).

3.1. Intégration et excision des ICE du chromosome hôte

L'intégration des ICE dans le chromosome hôte est la principale caractéristique les distinguant des plasmides conjugatifs. Les intégrases pouvant être codées par les ICE sont regroupées au sein de trois familles dont la phylogénie et le mode d'action diffèrent. Il s'agit

des recombinases à tyrosine, recombinases à sérine et des transposases à motif DDE. De façon générale, un ICE code pour une seule intégrase de n'importe quel type, chacune de ces familles d'enzymes étant capable de reconnaître les différentes séquences répétées directes ou inverses d'ADN bordant un élément donné. Des ICE comportant trois gènes adjacents codant des intégrases à sérines ont néanmoins été décrits au sein de Streptocoques (Beres & Musser, 2007; Burrus, 2017; Camilli *et al.*, 2011; Holden *et al.*, 2009). L'intégrase détermine le ou les sites d'insertion de l'ICE en plus de la fréquence d'excision de ce dernier. Par conséquent, l'expression de cette enzyme représente un des moyens de contrôle de la transmission de ces éléments.

Les recombinases à tyrosine correspondent à la famille d'intégrase la plus représentée au niveau des ICE décrits à l'heure actuelle. Ces enzymes catalysent l'intégration de l'élément sans nécessiter l'intervention de facteur de recombinaison directionnelle RDF, contrairement à la réaction d'excision de l'ICE qui parfois requiert l'action d'un facteur RDF, appelé excisionase. Néanmoins, certaines recombinases à tyrosines sont de parfaites enzymes bidirectionnelles assurant la réaction d'intégration et d'excision sans l'intervention de cofacteurs. Les ICE codant pour les recombinases à tyrosine montrent une forte spécificité d'intégration site-spécifique. La recombinase à tyrosine de l'élément Tn916 d'*E. faecalis* représente néanmoins une exception, puisque celle-ci assure une très faible spécificité d'intégration avec une préférence pour les régions riches en A+T (Caparon & Scott, 1989). Par ailleurs, celle de CTnDOT de *B. thetaiotaomicron* présente une sélectivité pour six sites *attB* différents au sein des Bacteroides (Bellanger *et al.*, 2014; Wood & Gardner, 2015).

Les recombinases à sérine constituent quant à elles une famille de recombinases moins commune. Par analogie aux recombinases à tyrosine, les recombinases à sérine catalysent une réaction de recombinaison site-spécifique entre les sites *attB* et *attI*. En revanche, c'est l'acide aminé sérine qui catalyse la réaction, à travers un mécanisme de recombinaison différent de celui de la recombinase à tyrosine. En effet, la recombinase à tyrosine coupe un seul brin de chaque partenaire et procède à la formation et la résolution des jonctions d'Holliday intermédiaires, où le brin d'ADN est transitoirement associé aux sous-unités de la recombinase à travers des liens phospho-tyrosine. La recombinase à sérine agit quant à elle en clivant les deux brins des deux partenaires, alors associés à la recombinase par le biais de liens phospho-sérine, puis en joignant les brins des deux partenaires suite à un mouvement de rotation (Smith & Thorpe, 2002). L'ICE Tn5397 de *Clostridium difficile* code une

recombinase à sérine dont l'activité enzymatique est bidirectionnelle, assurant alors l'intégration et l'excision de l'élément sans l'intervention de cofacteur (Wang *et al.*, 2006).

Les transposases à DDE, connues pour catalyser la transposition de la plupart des transposons, montrent une faible spécificité d'intégration et n'assurent la mobilité que de quelques ICE, vraisemblablement restreints au phylum des Firmicutes, tels que ICE6013 de *S. aureus*, ICEA de *Mycoplasma agalactiae*, et TnGBS1 et TnGBS2 de *S. agalactiae* (Bellanger *et al.*, 2014). La transposase de ce dernier, dont les trois acides aminés catalytiques sont l'aspartate (x2) et le glutamate, est la seule nécessaire et suffisante à son intégration et excision du chromosome hôte (Brochet *et al.*, 2009).

L'excision de l'élément est l'étape préalable nécessaire à son transfert, elle n'assure en revanche pas le succès de ce dernier, dont l'organisation et la régulation sont complexes.

3.2. Transfert conjugatif des ICE

Le transfert des ICE se fait à travers deux mécanismes possibles de translocation de l'ADN. Le premier concerne la majorité des ICE indépendamment de la physiologie et de l'organisation de la paroi de leur hôte. Ce mécanisme implique la mise en place d'un pore de conjugaison assemblé par le système de sécrétion de type IV (T4SS), et l'action d'une relaxase et d'une protéine de couplage afin de permettre le passage de l'ADN simple brin vers la cellule réceptrice (Goessweiner-Mohr *et al.*, 2014). Le second mécanisme, retrouvé uniquement chez les Actinobactéries, met en jeu la formation d'un pore doté d'une pompe à ATP (TraB) suffisante au transfert d'ADN double brin vers la cellule réceptrice (Bordeleau *et al.*, 2012).

Le transfert conjugatif des ICE est semblable à celui des plasmides conjugatifs. Une fois l'élément sous sa forme circulaire excisée, la relaxase (MOB) sous sa forme dimérique va catalyser la réaction de trans-estérification de la molécule d'ADN en clivant l'élément au niveau de son origine de transfert (*oriT*), ce qui aboutit à la mise en place d'un complexe nucléoprotéique dénommé relaxosome. Celui-ci est constitué d'un monomère de relaxase lié de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ADN. Ce complexe est par la suite reconnu par la protéine de couplage qui transporte l'ensemble vers la cellule réceptrice en empruntant le pore protéique de conjugaison. Par ailleurs, la réplication de l'élément par cercle roulant est

concomitante à son transfert, et ce au niveau de la cellule donatrice mais également au niveau de la cellule réceptrice (Bellanger *et al.*, 2014; Delavat *et al.*, 2017).

3.2.1. Transfert simple brin de l'ADN

Le transfert de l'ADN simple brin se fait à travers le système de sécrétion de type IV (T4SS). Le T4SS est une structure trans-enveloppe remplissant des fonctions de translocations diverses et variées. Ce système a d'abord été connu pour la translocation d'ADN et de macromolécules à travers la paroi de bactéries Gram négatif, notamment chez *Helicobacter pylori* en lui permettant l'injection d'oncoprotéines responsables de maladies gastro-intestinales (Terradot & Waksman, 2011), et *Agrobacterium tumefaciens* pour le transfert d'ADN oncogène à l'origine de la galle du collet chez les plantes (McCullen & Binns, 2006). Le T4SS a par la suite été défini comme le mécanisme essentiel au transfert conjugatif d'une majorité d'ADN mobile de type plasmide ou ICE dépendant du contact de la bactérie donatrice de l'élément avec la bactérie réceptrice.

Le T4SS d'*A. tumefaciens* est le mieux décrit. Celui-ci est composé de 11 protéines VirB (VirB1-VirB11) synthétisées par l'opéron *virB* codant pour l'ensemble des composés formant le pore de conjugaison. De façon générale, la protéine VirB4 appartenant à la superfamille AAA est un marqueur conservé de la présence du T4SS. Elle possède une activité ATPase et représente, par conséquent, une source d'énergie nécessaire à l'activité de translocation du T4SS. Une autre protéine relativement conservée du T4SS est la protéine VirB6, qui forme le pore de conjugaison au niveau de la membrane interne. La protéine VirB1 constitue quant à elle l'hydrolase du peptidoglycane nécessaire à la mise en place du pore protéique de conjugaison. Un second opéron, l'opéron *virD*, complète le dispositif. Il comprend quatre gènes (VirD1-VirD4) dont ceux codant la relaxase (VirD2) et la protéine de couplage (VirD4). La protéine VirD4 (aussi connue sous le nom de protéine de couplage ou T4CP) joue le rôle d'une ATPase responsable du recrutement des substrats du T4SS. La relaxase VirD2 clive l'ADN simple brin et forme un complexe nucléoprotéique reconnu par T4CP, qui dirige l'ensemble vers le T4SS. Des homologues du système VirB/VirD sont retrouvés dans d'autres systèmes conjugatifs de bactéries, des différences peuvent néanmoins concerner la composition et le nombre des différentes sous-unités du système VirB/VirD selon la nature du substrat transféré (Auchtung *et al.*, 2016; Burrus *et al.*, 2002; Chandran Darbari & Waksman, 2015; Christie, 2016; Fronzes *et al.*, 2009). La conjugaison à travers le T4SS nécessite parfois la mise en place d'un pilus assemblé par le T4SS lui-même. Le pilus

se forme suite à la polymérisation de sous-unités de pilines qui lui permettent d'entrer en contact avec la paroi de la cellule réceptrice afin de l'attirer vers la cellule donatrice. Il existe deux classes de pili : (i) les pili de type F qui sont des pili flexibles pouvant dynamiquement s'étendre et se rétracter, et permettent une efficacité de transfert aussi bien sur des surfaces solides que liquides (Arutyunov & Frost, 2013), et (ii) les pili de type P, courts et rigides, qui ne semblent pas être dotés de cette dynamique d'extension/rétraction (Christie *et al.*, 2005).

Le T4SS des bactéries à Gram positif est moins décrit, néanmoins celui-ci présente de nombreuses similarités avec le T4SS des bactéries à Gram négatif, notamment au niveau des premières étapes mettant en jeu la coupure de l'extrémité 5' de l'ADN ciblé par la relaxase et son transfert au pore protéique de conjugaison (Figure 8).

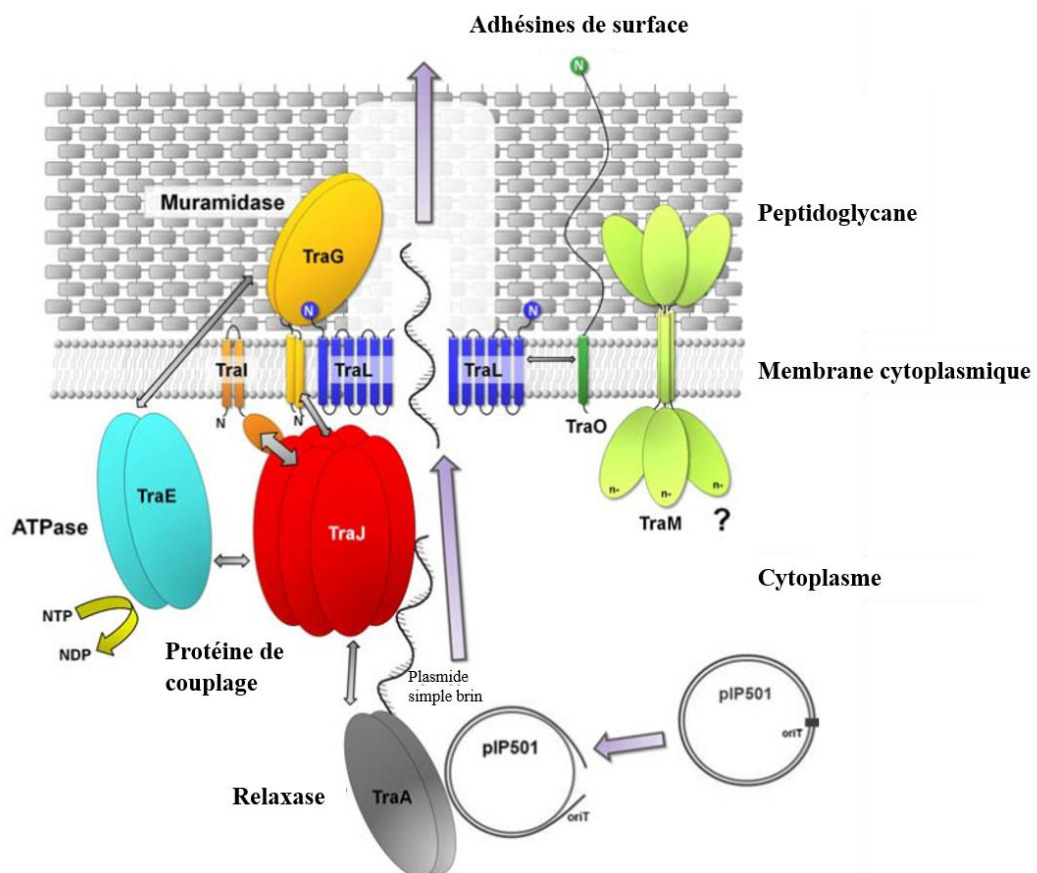


Figure 8 : Modèle représentant le T4SS du plasmide pIP501 de *S. agalactiae* (adaptée d'après Goessweiner-Mohr *et al.*, 2014).

La relaxase TraA se lie à la séquence *oriT*_{pIP501} et clive la molécule d'ADN. Le plasmide simple brin est ensuite transféré au pore de conjugaison par le biais des protéines de couplages putatives TraJ. (N) correspond à l'extrémité N-terminale des protéines du T4SS. Les flèches indiquent une interaction entre deux acteurs protéiques, et la largeur de la flèche est proportionnelle à la force de l'interaction. TraA, homologue de VirD2 ; TraE, homologue de VirB4 ; TraJ, homologue de VirD4 ; TraL, homologue de VirB6 ; TraG, homologue de VirB1 ; TraM, homologue de VirB8.

En revanche, l'étape de translocation de l'ADN à travers le T4SS montre des différences considérables entre les deux types de bactéries, probablement dues aux différences d'organisation de leurs parois respectives. De ce fait, aucun homologue des protéines VirB7-9-10 rentrant dans la composition du pore de conjugaison n'a encore été identifié dans les T4SS des bactéries à Gram positif. En revanche, des homologues de VirB1, VirB4, VirB6, VirB8, et VirD4 sont retrouvés dans les T4SS des bactéries à Gram positif (Goessweiner-Mohr *et al.*, 2014).

Alors que le T4SS des bactéries à Gram négatif met en place la synthèse de pili, aucune structure similaire n'a été décrite pour le transfert conjugatif des plasmides et ICE des bactéries à Gram positif, le transfert serait par conséquent dépendant de la capacité des cellules à entrer directement en contact. Ainsi, le T4SS de ces bactéries codent parfois des adhésines de surface facilitant l'interaction avec la paroi du deuxième partenaire (Goessweiner-Mohr *et al.*, 2014).

3.2.2. Transfert double brin de l'ADN

L'ordre des Actinomycètes constitue un groupe de bactéries Gram positif dont le génome est riche en G+C. Le transfert conjugatif des plasmides et ICE de ce groupe est le seul connu jusqu'à présent arborant un mécanisme de transfert différent de celui employant le système de sécrétion de type IV, mais semblable à la machinerie permettant la ségrégation des chromosomes durant la division cellulaire et la sporulation. Les AICE (*i.e.* éléments intégratifs conjugatifs des Actinomycètes) codent une ADN translocase (Tra) appartenant à la famille FtsK-SpoIIIE, une réplicase (Rep) permettant la réplication en cercle roulant de l'élément pendant son transfert, et quelques protéines impliquées dans le transfert de l'élément entre cellules se trouvant dans le même mycélium. Le transfert se fait à travers la protéine Tra qui s'assemble en canal hexamérique reliant les deux cellules donatrice et réceptrice. Tra reconnaît et se lie spécifiquement à la molécule d'ADN double brin au niveau de la région *clt* (*cis*-acting locus of *t*ransfer) équivalente à la région *oriT* des autres ICE, permettant ainsi le transfert de l'élément vers la cellule réceptrice (Bordeleau *et al.*, 2012).

3.3. Régulation du transfert des ICE

Le transfert des ICE est gouverné par un réseau de régulation complexe pouvant être activé et réprimé en réponse à des stimuli environnementaux. Ces signaux vont influencer l'expression et l'activité des ICE modulant ainsi l'expression des gènes nécessaires à

l'excision et au transfert de l'élément. Des études ont démontré que l'expression constitutive des gènes de conjugaison des ICE pouvait être nocive pour la cellule hôte et pour le maintien de l'élément (Manganelli *et al.*, 1995; Minoia *et al.*, 2008), mettant ainsi en exergue la nécessité d'une régulation fine de l'expression des gènes de transfert de l'élément.

L'ICE peut être induit sous certaines conditions, ce qui aboutit à la dérépression de l'expression des gènes de l'élément, et à l'excision de ce dernier, assurant ainsi sa disponibilité pour un éventuel transfert. Cependant, même sous ces conditions d'induction, l'ICE ne sera excisé que chez une faible proportion de la population, ce qui témoigne d'une régulation stricte de ces éléments (Beaber *et al.*, 2002; Beaber *et al.*, 2004).

Le mécanisme de régulation des ICE n'est pas universel, néanmoins ces éléments regroupent certains points communs.

3.3.1. Bistabilité et stochasticité

Deux états d'expression d'un gène peuvent coexister au sein d'une population sans qu'il y ait un changement génotypique provoquant l'un ou l'autre de ces états d'expression génétique, on parle alors de bistabilité essentiellement provoquée par des événements stochastiques, autrement dit réalisés au hasard (Roberfroid *et al.*, 2016). L'un des facteurs contribuant à la variabilité stochastique de l'expression d'un gène est le facteur d'interférence. Ce dernier correspond à une fluctuation aléatoire de l'expression d'un gène indépendante de l'intervention de signaux environnementaux, et ce au sein d'une même population clonale. Ainsi, l'apparition d'un « switch » stochastique au niveau d'une cellule lui détermine un sort différent du reste de la population pourtant génétiquement identique (Norman *et al.*, 2015).

La bistabilité déterminant l'état d'entrée en phase lysogénique ou lytique du phage lambda d'*E. coli* est la mieux décrite. Celle-ci est régulée par une région promotrice bidirectionnelle contrôlant l'expression des répresseurs de transcription CI (responsable du cycle lysogénique) et Cro (responsable du cycle lytique du phage), chacun réprimant le gène de l'autre. Ainsi lorsque CI est prédominant, le gène Cro est fortement réprimé, ce qui aboutit à encore plus de production de CI et encore plus de répression de Cro. Cette coopérativité est le résultat de l'oligomérisation de CI et est essentielle à la mise en place du « switch » de bistabilité du phage lambda, puisqu'une forte concentration de CI aboutit à l'inhibition de sa

production par un mécanisme de rétrocontrôle, provoquant ainsi l'expression de Cro et la répression de CI (Lewis *et al.*, 2016).

La bistabilité des ICE est à mettre en perspective avec leur double mode de vie : une alternance entre un état intégré au sein du chromosome hôte permettant leur maintien et transmission à la descendance par transfert vertical, et un état excisé assurant la transmission de l'élément aux autres cellules environnantes par le transfert horizontal. La régulation de l'ICE va contrôler la proportion de cellules dont le destin sera consacré à la transmission horizontale (Delavat *et al.*, 2017). Ceci est appuyé par le fait que les ICE, dans des conditions optimales de transfert et dans le cadre de régulation de type sauvage, ne présentent jamais 100% de taux de transfert, mais de faibles fréquences de transfert (allant de 10^{-2} à 10^{-7} transconjugants par cellules donatrices). Dans le cas d'ICEBs1 de *B. subtilis*, ce phénomène serait vraisemblablement contrôlé par le module de régulation puisque des ICE présentant presque 100% de taux de transfert ont été obtenus suite à des mutations du module de régulation de l'élément (Auchtung *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'ICE dont le phénomène de stochasticité et de bistabilité à l'échelle individuelle a été démontré est ICEclc de *Pseudomonas knackmussii*, dont l'expression bistable de l'intégrase IntB13 permet le contrôle du taux de transfert de l'élément (Minoia *et al.*, 2008). Ainsi, la régulation d'ICEclc est telle que seule une faible proportion de cellules donatrices (3 à 5%) de la population clonale va exprimer les gènes nécessaires à l'excision et au transfert de l'élément (Delavat *et al.*, 2016).

3.3.2. Impact des agents endommageant l'ADN

L'exposition des cellules bactériennes aux rayons ultraviolets ou aux agents endommageant l'ADN, tels que la mitomycine C et les quinolones, provoque la réponse SOS bactérienne de réparation de l'ADN endommagé. Ce système conservé fait intervenir deux acteurs moléculaires principaux chez *E. coli* : LexA jouant le rôle du répresseur et RecA celui de l'activateur. Lorsque l'ADN est endommagé et sous forme simple brin (ADNsb), RecA se fixe au fragment d'ADN aboutissant à la formation d'un complexe nucléoprotéique RecA-ADNsb. Ce dernier active la fonction d'autoprotéolyse du répresseur LexA, ce qui aboutit à la l'expression des gènes du régulon SOS (Janion, 2008). Chez le phage lambda, la mise en place de la réponse SOS de l'hôte se traduit par la protéolyse de LexA, mais aussi par celle du répresseur CI, permettant l'expression de Cro et l'entrée du phage dans un cycle lytique aboutissant à son excision du chromosome hôte et son transfert horizontal (d'Ari, 1985; Janion, 2008; Ogawa & Ogawa, 1990).

Les éléments *ICES_{St3}*, *ICES_{SXT}* et *ICE_{Bs1}* présentent des gènes homologues aux répresseurs CI et Cro du phage lambda et sont induits par la réponse SOS, aboutissant à l'augmentation de leurs fréquences de transfert d'un facteur 25, 300 et 1000 fois respectivement (Auchtung *et al.*, 2005; Bellanger *et al.*, 2007; d'Ari, 1985; Garriss *et al.*, 2013; Janion, 2008; Ogawa & Ogawa, 1990). L'induction de ces éléments par la réponse SOS semblerait être liée à la fragilité et au risque de létalité que rencontre l'hôte, menant l'ICE à davantage favoriser sa transmission horizontale plutôt que verticale, et ainsi assurer sa propagation et son maintien dans l'environnement (Reinhard & van der Meer, 2014).

3.3.3. Le quorum sensing

Le quorum sensing est un mécanisme par le biais duquel la bactérie coordonne, à l'échelle de la population, l'expression de ses gènes. Le quorum sensing se base sur l'utilisation d'oligopeptides jouant le rôle de molécules signales sécrétées dans l'environnement. Celles-ci sont alors détectées au niveau de la surface bactérienne par des systèmes à deux composants, ou sont internalisées dans les cellules voisines via un transporteur. Ces oligopeptides interagissent par la suite avec des régulateurs transcriptionnels ou des phosphatases qui vont impacter l'expression de leurs gènes cibles. C'est ainsi que des fonctions telles que la virulence, la production d'antibiotiques, la motilité, la sporulation, la formation de biofilm, la compétence ou la conjugaison sont en partie contrôlées (Miller & Bassler, 2001).

Le transfert du plasmide conjugatif pCF10 d'*E. faecalis* porteur d'un gène de résistance à la tétracycline est régulé par un mécanisme de type quorum sensing à travers la sécrétion de phéromones. Ainsi une molécule signal se présentant sous la forme d'un heptapeptide (LVTLVFV) et produite par des cellules réceptrices, est transportée dans le cytosol des cellules donatrices. Celle-ci informe l'élément conjugatif de la présence de cellules réceptrices dans le milieu environnant et induit l'expression de la totalité d'une région de gènes impliqués dans la réplication et la maintenance, l'expression des facteurs d'agrégation et la conjugaison de pCF10. Il apparaît ainsi que l'élément a évolué de sorte qu'une proportion minimale de machinerie de conjugaison soit produite afin de permettre l'efficacité de transfert de l'élément en réponse à un signal de type phéromone (Dunny, 2007).

ICEMISym^{R7A} de *Mesorhizobium loti* est également contrôlé par quorum sensing. Cet élément de 502 kb est retrouvé sous forme excisée uniquement au sein de 0,06 à 6 % de cellules et seulement 3 sur 10⁶ cellules vont réellement agir en tant que cellules donatrices de l'élément. La régulation de l'excision de cet élément, sa réplication, et l'activation de 100% des cellules donatrices sont néanmoins possibles suite à l'induction d'ICEMISym^{R7A} par un système de quorum sensing codé par l'élément lui-même. Ce système augmente le transfert de l'élément en induisant l'expression de l'excisionase RdfS et semble répondre à l'entrée de l'hôte en phase stationnaire de croissance, ou autrement dit, à l'apparition de conditions de haute densité cellulaire (Ramsay & Ronson, 2015).

3.4. Maintien des ICE

Les ICE codent les fonctions nécessaires à leur maintien afin d'assurer leur transmission à la descendance et leur propagation au sein des communautés microbiennes. En plus de la mise en place d'une stricte régulation de l'élément, les ICE codent leur maintien à court terme mais également à long terme. Ainsi, l'élément assure son maintien à court terme immédiatement après son entrée dans la cellule hôte en permettant sa réplication et intégration dans la cellule. De plus, afin d'empêcher sa perte au cours des cycles successifs de divisions bactériennes, l'élément assure son maintien à long terme en codant pour des fonctions adaptatives ou égoïstes vis-à-vis de l'hôte. Par ailleurs, la cellule hôte peut également coder des fonctions permettant le maintien de l'élément.

3.4.1. Maintien de l'élément entrant

3.4.1.1. Intégration

Suite à son entrée dans le cytosol de la bactérie réceptrice, l'ICE s'intègre dans le chromosome hôte généralement par une recombinaison site-spécifique catalysée par une recombinase à tyrosine (précédemment décrit dans le paragraphe 3.1), ce qui lui permet d'assurer sa transmission à la descendance (Delavat *et al.*, 2017).

La recombinase à tyrosine intègre préférentiellement les ICE dans différents sites à l'extrémité 3' aussi bien qu'à l'extrémité 5' de gènes de ménage tels qu'en 3' des ARNt codant la leucine (AICEM_{flv3036} de *Mycobacterium gilvum*), la proline (pSAM2 de *Streptomyces ambofaciens*), ou la glutamine (pSOG1 de *Sulfolobus islandicus*), en 5' du gène *rbgA* essentiel à l'assemblage de la sous-unité ribosomale 50S (Tn5252 de

S. pneumoniae), ou en 5' du gène *prfC* qui code une protéine impliquée dans la terminaison de la traduction (ICE R391 de *Providencia rettgeri*) (Bellanger *et al.*, 2014). De façon générale, l'intégration des ICE par le biais des intégrases à tyrosine n'impacte pas la séquence codante des gènes dans lesquels ils sont intégrés, ainsi ils ne perturbent pas la machinerie interne de l'hôte et ne provoquent pas sa mortalité. De ce fait, les ICE s'assurent d'être maintenus dans la descendance de l'hôte mais aussi de pouvoir se transférer vers d'autres bactéries phylogénétiquement proches présentant les sites d'insertions chromosomiques reconnus par les intégrases qu'ils codent, ces sites d'insertions étant généralement fortement conservés au sein de l'espèce voire même du genre.

Outre que par recombinaison site-spécifique, l'intégration des ICE dans le chromosome hôte peut parfois se faire par recombinaison homologue. En effet, en l'absence de l'intégrase d'*ICEBsI*, celui-ci est capable de procéder à une recombinaison homologue RecA dépendante dans le chromosome de *B. subtilis* (Lee *et al.*, 2007). En revanche, les ICE de la famille *ICESXT/R391* codent pour un système de recombinaison indépendant de RecA similaire à celui du bactériophage lambda. Ce système catalyse la recombinaison homologue de deux ICE apparentés se trouvant dans la même cellule hôte, et aboutit à la formation d'ICE hybrides intégrés en tandem dans le chromosome hôte (Garriss *et al.*, 2013).

Il est encore complexe de statuer quant au coût que représente la forme intégrée d'un ICE dans la cellule hôte. Il est envisageable qu'un ICE impacte le fitness de l'hôte en représentant un coût supplémentaire dont il faut assurer la réplication, ce qui théoriquement représente une augmentation de 1,6% du coût de réplication d'un ICE de 100 kb pour un génome de 6 Mb (Delavat *et al.*, 2017). Néanmoins, des données expérimentales mesurant la compétitivité d'une variété d'hôtes de *Pseudomonas aeruginosa* indiquent qu'en l'absence de conditions sélectives, la présence d'*ICEclc* de 103 kb ne provoque pas de perte de fitness (coût inférieur à 1%) comparé à son absence. Ainsi, il apparaît que l'intégration d'un ICE au chromosome hôte ne provoque pas de perte détectable du fitness de ce dernier, pouvant ainsi expliquer la large distribution de ces éléments dans les génomes bactériens (Delavat *et al.*, 2017; Gaillard *et al.*, 2008).

3.4.1.2. Réplication et maintien sous forme circulaire répllicative

Les ICE ont longtemps été considérés comme des éléments ne pouvant se répliquer uniquement qu'avec le chromosome de l'hôte et pendant le transfert simple brin de l'élément

(Burrus *et al.*, 2002). Cependant, de plus en plus d'études mettent en évidence une réplication extra-chromosomique en cercle roulant des ICE comparable à la réplication plasmidique, une caractéristique qui pourrait être commune au cycle de vie de tous les ICE (Burrus, 2017).

Ceci a d'abord été mis en évidence expérimentalement pour ICE*BsI* de *B. subtilis* où la réplication en cercle roulant est initiée par la relaxase NicK codée par l'élément, au niveau de l'origine de transfert (*oriT*) qui sert alors d'origine de transfert double brin (*dso*). En plus des molécules codées par ICE*BsI* telles que NicK et un facteur de processivité d'hélicase HelP, la réplication nécessite également l'intervention de molécules codées par l'hôte notamment l'ADN polymérase et l'hélicase PcrA, celle-ci nécessitant HelP pour le déroulement de la séquence double brin d'ICE*BsI*. La séquence *oriT* et ces trois molécules sont nécessaires à la réplication et au transfert simple brin de l'élément. La synthèse d'ADN double brin de la forme excisée de l'élément dans la cellule donatrice n'est en revanche pas nécessaire au transfert. Cette synthèse se fait au niveau de l'origine de réplication simple brin (*sso*) située en aval de la séquence *oriT*, accompagnée également d'une autre région redondante (*ssoI*). Il a été mis en évidence que la perte de ces deux régions perturbait l'acquisition d'ICE*BsI* par la cellule réceptrice et que l'absence de réplication en cercle roulant affectait considérablement la stabilité d'ICE*BsI* après son excision dans des cellules hôtes en division (Thomas *et al.*, 2013; Wright *et al.*, 2015).

La réplication par cercle roulant a par la suite été décrite pour Tn916 d'*E. faecalis* (Wright & Grossman, 2016) et pour une version minimale d'ICE*St3* de *S. thermophilus* dépourvue du module d'adaptation où de multiples copies (environ 10) de l'élément ont été retrouvées dans le génome de l'hôte (Carraro *et al.*, 2016). Il en est de même pour R391, où la perte de la séquence *oriT* provoque en plus de la perte de transfert, une perte considérable de l'élément corrélée avec une diminution du nombre de copies de la forme circulaire double brin de type plasmidique de l'élément (Carraro *et al.*, 2015).

La réplication des ICE dans les cellules donatrices semble par conséquent se produire afin d'assurer le maintien et la stabilité de ces éléments. La réplication en cercle roulant empêche la perte des ICE en augmentant le nombre de copies de leur forme circulaire double brin de type plasmidique dans les cellules hôtes, permettant ainsi une distribution aléatoire des ICE dans les cellules filles pendant la division cellulaire (Burrus, 2017).

3.4.2. Maintien au cours des générations

3.4.2.1. Traits adaptatifs augmentant le fitness de l'hôte

Les ICE ont évolué de sorte qu'ils puissent apporter un éventail de fonctions et d'avantages sélectifs pour leurs hôtes. Ceux-ci sont conférés par les modules d'adaptation des ICE qui peuvent comprendre un nombre considérable de gènes connus pour augmenter la compétitivité de l'hôte par rapport à d'autres bactéries se trouvant dans le même écosystème, ce qui favorise la transmission de ces éléments à la descendance. Cette stratégie adaptée par les ICE contribue à leur maintien au sein de la population et à leur succès évolutif (Johnson & Grossman, 2015).

Les gènes portés par les modules d'adaptation des ICE sont divers et variés. Il y figure de nombreux types de résistances apportés à l'hôte, notamment des résistances aux antimicrobiens (*e.g.* les ICE Tn1545, Tn6002 et Tn6079 confèrent la résistance aux macrolides, Tn1545 et Tn6003 confèrent la résistance à la kanamycine (Ciric *et al.*, 2012)), aux métaux lourds (*e.g.* ICE_Sa2603_rplL et ICE_Sa2603_tRNA^{Lys} de *S. agalactiae* codent un système d'export du mercure permettant la résistance à ce métal (Haenni *et al.*, 2010)) et à l'infection par des bactériophages (*e.g.* les ICE de la famille ICESXT/R391, ICEVspPor3 et ICEValSpa1 de *Vibrio splendidus* et *Vibrio alginolyticus* codent des systèmes de restriction modification protégeant contre l'infection par le bactériophage T1 et les bactériophages de l'environnement marin (Balado *et al.*, 2013)). Certains gènes proposent un apport de fonctions pour l'hôte tel que l'utilisation de nouvelles sources de carbone (*e.g.* ICE Tn5276 de *Lactococcus lactis* permet la fermentation du sucrose (Rauch & De Vos, 1992)), la virulence (*e.g.* les ICE de Salmonelles SPI-7_{CT18}, SPI-7_{Ty2}, SPI-7_{RKS4594}, et SPI-7₁₆₆₂ portent tous le facteur de virulence Vi correspondant à un antigène capsulaire (Seth-Smith *et al.*, 2012)) ou des facteurs permettant la colonisation de nouvelles niches écologiques (*e.g.* ICE_515_tRNA^{Lys} de *S. agalactiae* code des adhésines permettant la formation de biofilm (Chuzeville *et al.*, 2015)). D'autres gènes impactent significativement l'hôte en modifiant ses propriétés notamment lors de l'apport de fonctions symbiotiques telles que la capacité à fixer l'azote (*e.g.* l'îlot de *Mesorhizobium loti* souche R7A porte une région codant tous les gènes nécessaires à la fixation de l'azote (Sullivan *et al.*, 2002)), ou des gènes capables de faire passer l'hôte d'une vie sessile en biofilm à une vie motile (*e.g.* présence du second messager c-di-GMP contrôlant ce changement d'état dans les ICE de la famille ICESXT/R391 de *V. cholerae* (Bordeleau *et al.*, 2010)).

Les modules adaptatifs des ICE sont des régions dont la taille varie considérablement d'une famille d'ICE à une autre, voire même d'un élément à un autre au sein de la même famille, mettant en évidence l'efficacité de ces éléments à acquérir de nouvelles fonctions. Toutefois, un nombre considérable de gènes adaptatifs portés par les ICE codent des fonctions inconnues pouvant également apporter un avantage à l'hôte. Il a par ailleurs été démontré que la délétion d'une région inconnue d'un îlot génomique de 102 kb de *S. thermophilus* impactait significativement la croissance de la souche, démontrant que l'apport de fonctions avantageuses par ces éléments reste encore sous-évalué (Selle *et al.*, 2015).

3.4.2.2. Systèmes toxines-antitoxines

Les ICE assurent leur maintien en régulant finement l'expression des gènes impliqués dans leur excision et transfert. Une fonction égoïste mise en place par les ICE leur permet d'assurer activement leur acquisition et maintien dans la cellule en éliminant les cellules dépourvues de ces éléments.

Le système toxine-antitoxine (TA) comporte des régions génétiques composées d'une toxine et d'une antitoxine apparentée. Les toxines correspondent à de petits polypeptides régulant négativement la croissance cellulaire en inhibant les processus essentiels de la cellule tels que la division cellulaire, la réplication de l'ADN, la translocation des protéines ou l'intégrité de la membrane (Unterholzner *et al.*, 2013). L'antitoxine correspond quant à elle à un peptide ou un ARN non codant (small RNAs) dont la principale fonction est de bloquer l'activité de la toxine. De ce fait, la transcription d'un gène de toxine est toujours couplée à celle de l'antitoxine correspondante, ces derniers faisant généralement partie du même opéron. Les systèmes TA sont classifiés en six groupes définis selon le type d'antitoxine (protéine ou ARN) et le mécanisme utilisé par celle-ci afin de neutraliser la toxine (digestion de séquences spécifiques, digestion non spécifique) (Masuda & Inouye, 2017).

Le premier système TA mis en évidence est le système *ccdA/ccdB* renforçant la stabilité du plasmide F. Ce système agit en provoquant la mort des cellules filles ne possédant pas de copie du plasmide suite à la division et ségrégation des cellules (Ogura & Hiraga, 1983). Ce système dit d'addiction, est également retrouvé chez de nombreux ICE tels que les ICE de la famille ICESXT/R391. Ces derniers codent pour les systèmes MosT/MosA et S044/S045 (ICESXT) ou encore le système HipA/B (R391). Ainsi, des résultats expérimentaux démontrent une augmentation de l'expression de l'opéron *mosAT* suite à

l'excision d'ICESXT, témoignant d'une stratégie mise en place par l'élément afin d'éviter sa perte durant la phase d'excision. MosT bloque la croissance cellulaire en absence d'ICESXT et son activité est neutralisée par MosA. MosT étant plus stable que MosA, une perte d'ICESXT pourrait aboutir à une diminution rapide de la concentration de MosA, laissant libre place à l'activité endommageante de MosT. Suite à la réintégration d'ICESXT, l'expression de *mosAT* retourne à un état silencieux par l'auto-répression de MosA (Wozniak & Waldor, 2009). Ce système permet ainsi de minimiser la probabilité de formation de cellules dépourvues d'ICESXT et contribue de ce fait au maintien de l'élément dans la descendance.

3.4.2.3. Système de partitionnement actif

Le système de partitionnement a été décrit à l'origine comme un mécanisme actif essentiel au maintien de plasmides à bas nombre de copies, et ce en permettant une répartition équilibrée des différentes copies du plasmide dans les cellules filles lors de la ségrégation des cellules. Aucun système de partition n'a en revanche été observé dans des plasmides à haut nombre de copies (Wang, 2017).

Les ICE de la famille ICESXT/R391 codent pour un système de partitionnement SrpMRC homologue au ParMRC de type II, qui distribue les différentes copies de l'élément répliqué de façon égale dans les cellules en cours de division. *SrpMRC* fait partie du régulon *setCD* incluant également les gènes codant l'intégrase Int, le RDF Xis et les protéines du pore de conjugaison. Ceci met ainsi en évidence une coordination des fonctions permettant l'expression de l'excision, la réplication, la partition et le transfert de l'élément (Carraro *et al.*, 2015). Aucun maintien par partitionnement actif n'a encore été décrit pour d'autres ICE.

3.5. Barrière à l'acquisition des ICE

Selon les espèces et l'identité génétique des souches ciblées par le transfert horizontal des ICE, un certain nombre de processus peuvent intervenir afin de réduire, voire d'inhiber le transfert et/ou le maintien de l'élément acquis au sein de la cellule réceptrice.

3.5.1. Systèmes d'exclusions

Le système d'exclusion est un mécanisme codé par l'élément résident dans la cellule bactérienne pour que celui-ci inhibe l'entrée dans la cellule d'un nouvel élément apparenté. Ce mécanisme a été décrit à l'origine pour le plasmide F d'*E. coli*, pour lequel ce système constitue une barrière efficace compromettant l'acquisition d'éléments avec un système de

transfert apparenté (Thomas & Nielsen, 2005). Deux types de fonctions d'exclusion sont décrits, l'exclusion de surface et l'exclusion d'entrée. L'exclusion de surface n'a été décrite que pour les plasmides du groupe d'incompatibilité F (IncF), et se déroule suite à l'intervention d'une protéine de la membrane externe (TraT), qui inhiberait la mise en place du pore protéique de conjugaison reliant les deux cellules. En revanche, la majorité des plasmides codent une exclusion d'entrée qui semble inhiber le transfert de l'ADN ultérieurement à la mise en place du contact donatrice/réceptrice. Des études expérimentales démontrent que l'exclusion d'entrée est essentielle à la stabilité des plasmides conjuguatifs la possédant, mais celle-ci pourrait également intervenir afin de limiter les dommages pouvant être causés à la bactérie hôte suite à des cycles excessifs de conjugaison, ce qui correspond en d'autres termes à une immunité de surconjugaison (Garcillan-Barcia & de la Cruz, 2008).

Très peu d'exemples de systèmes d'exclusion ont été décrits pour les ICE de façon générale. Ces systèmes sont néanmoins très représentés au niveau des ICE de la famille ICESXT/R391. ICESXT et R391 portent des gènes codant une exclusion d'entrée impliquant deux protéines dirigées vers la membrane interne de la cellule : TraG au niveau de la bactérie donatrice, et Eex au niveau de la bactérie réceptrice. Bien que ICESXT et R391 soient des éléments fortement apparentés, ces deux ICE ne s'excluent pas l'un et l'autre. En revanche, la présence de R391 dans une cellule hôte exclut l'entrée d'autres ICE R391 et il en est de même pour ICESXT. Ainsi pour chacun de ces ICE présentant une variante spécifique de Eex et de TraG, une exclusion d'entrée est observée lorsque Eex est produite au niveau de la cellule réceptrice et que TraG est produite au niveau de la cellule donatrice. TraG est essentielle au transfert de ces ICE et semble entrer dans la composition du pore protéique de conjugaison. Le mécanisme aboutissant à l'exclusion de ces ICE par Eex est en revanche encore peu connu, bien que l'interaction spécifique de ces deux molécules soit susceptible d'en être la cause (Marrero & Waldor, 2005; Marrero & Waldor, 2007).

Une immunité de surconjugaison non apparentée à celle décrite précédemment concerne l'ICE pSAM2 de *Streptomyces ambofaciens* où la présence dans la cellule réceptrice du gène *pif* (pSAM2 immunity factor) est suffisante pour abolir l'initiation du transfert chez la donatrice par un mécanisme encore inconnu (Possoz *et al.*, 2003).

3.5.2. Immunité de cible

Beaucoup d'exemples d'immunité de cible ont été recensés au niveau des transposons. Ce mécanisme correspond à l'inhibition de l'insertion d'un élément à un site d'insertion cible contenant au préalable une partie, généralement l'extrémité, de l'élément ou l'intégration complète d'un autre élément (Choi *et al.*, 2014).

Une étude réalisée sur ICE_{clc} de *P. knackmussii* a démontré une meilleure efficacité de l'intégration d'une copie supplémentaire de l'élément dans un site *attR* tronqué, que dans un site *attR* sauvage. Ces données suggèrent que les acteurs moléculaires intervenant dans l'intégration de l'élément agissent plus facilement sur les sites *attB* que sur les sites *attR* et *attL* produits suite à l'intégration d'un îlot (Sentchilo *et al.*, 2009). Chez *S. thermophilus*, la présence d'un îlot dans le site *attB* d'insertion d'ICE_{St3} provoque une diminution de l'efficacité d'intégration de l'élément par rapport à un site *attB* vide (Bellanger *et al.*, 2011).

3.5.3. Répression du transfert

Ce mécanisme met en jeu un répresseur codé par la cellule réceptrice réduisant l'efficacité d'intégration d'un ICE entrant. Ainsi, la fréquence d'intégration d'ICE_{BsI} est réduite d'un facteur 1000 lorsque son répresseur ImmR est exprimé au niveau de la cellule réceptrice, celui-ci inhibe l'expression de l'intégrase de l'élément et empêche par conséquent son intégration (Auchtung *et al.*, 2007).

3.5.4. Dégradation de l'ADN entrant

Le transfert conjugatif des ICE peut également être compromis suite à l'intervention de différents mécanismes qu'encode la cellule réceptrice, et qui consistent en la reconnaissance et le clivage de l'ADN étranger se trouvant dans la cellule.

3.5.4.1. Système de restriction modification

Le système de restriction modification (RM) joue le rôle d'un système immunitaire pour les bactéries, en se chargeant de la neutralisation de molécules d'ADN étrangères entrant dans la cellule. Le système RM comprend deux enzymes remplissant des fonctions opposées : l'enzyme de restriction (REase) qui reconnaît spécifiquement l'ADN étranger non méthylé dont il faut procéder au clivage, notamment l'ADN plasmidique, phagique ou de type ICE, et une méthyltransférase (MTase) dont le rôle est de méthyliser les bases adénines ou cytosines de

l'ADN chromosomique bactérien suite à sa réplication, et ce afin de le protéger de l'action de clivage de REase. Les systèmes RM sont classés en quatre groupes majeurs selon la composition de leurs sous-unités, leurs sites de reconnaissance, les cofacteurs qu'ils mettent en jeu et la position de leurs sites de coupure (Oliveira *et al.*, 2016; Tock & Dryden, 2005).

Certains éléments génétiques mobiles ont réussi à mettre en place un mécanisme d'échappement au système RM permettant leur méthylation au préalable à l'action de l'enzyme de restriction. De nombreux ICE de *S. agalactiae* et Tn916 présentent le gène *ardA* codant pour une protéine d'anti-restriction. Celle-ci interagit avec le système RM et affecte son activité de restriction en empêchant son interaction avec l'ADN ciblé, protégeant ainsi l'élément entrant de la dégradation. ArdC, une autre protéine d'anti-restriction est retrouvée au niveau des ICE ICEA de *Mycoplasma agalactiae*, ICE*KpI*, ICE*MSym*^{R7A} et ICE*Eci* de protéobactéries (Bellanger *et al.*, 2014).

Outre son rôle de barrière, de nombreuses intrigues quant au rôle du système RM dans le transfert des ICE restent à être élucidées. Aucune étude démontrant le rôle du système RM dans la stabilisation et le maintien des ICE n'a encore été publiée. Cependant, celui-ci pourrait favoriser le transfert de ces éléments en leur permettant d'adopter un comportement d'élément égoïste, induisant pour l'hôte une addiction génétique à l'élément tel que démontré pour d'autres éléments génétiques mobiles (Burrus, 2017; Oliveira *et al.*, 2016).

3.5.4.2. Système CRISPR-Cas

Beaucoup de bactéries présentent un système CRISPR-Cas conférant une immunité acquise à la bactérie. Le système CRISPR-Cas reconnaît et dégrade des séquences spécifiques d'ADN étrangers ou d'ARN d'origine virale ou plasmidique. Ce système garde en mémoire les éléments génétiques mobiles précédemment rencontrés dans la vie de la bactérie en maintenant une sorte d'archives d'ADN étrangers dans le système. Les fragments reconnus sont intégrés en tant qu'« espaceurs » entre des régions identiques répétées (25 à 50 pb chacune), souvent palindromiques. Les séquences CRISPR comportant les espaceurs et une partie des régions répétées adjacentes sont transcrites en courtes séquences d'ARN. Celles-ci forment alors un complexe avec un ensemble de protéines Cas, qui reconnaissent et coupent les molécules d'ADN portant une séquence identique ou fortement apparentée à celle de l'espaceur (Jackson *et al.*, 2017).

S. agalactiae présente deux systèmes CRISPR-Cas. CRISPR1 est un système dynamique et ubiquitaire, qui comporte des séquences d'espaces reflétant les différents événements auxquels *S. agalactiae* a été confrontée. Ces espaces ciblent principalement des phages tempérés et trois familles d'ICE largement distribués chez les Streptocoques TnGBS1, TnGBS2, et ICE_515_ *tRNA*^{Lys}. La présence de ces espaces réduit considérablement la fréquence d'acquisition de ces éléments, démontrant ainsi le rôle des systèmes CRISPR-Cas dans la réduction et la modération du transfert conjugatif des ICE (Lopez-Sanchez *et al.*, 2012).

3.6. Mobilisation d'autres éléments génétiques par conjugaison

Parallèlement aux éléments codant de façon autonome l'ensemble des fonctions permettant leur transfert et maintien dans les cellules hôtes tels que les plasmides conjugatifs et les ICE, d'autres nommés îlots mobilisables, sont dépendants de la machinerie conjugative mise en place par ces éléments. La mobilisation est dite en *cis* quand l'élément mobilisé est co-intégré avec l'élément mobilisateur, tandis que la mobilisation est dite en *trans* lorsque ces deux éléments ne sont pas co-intégrés.

3.6.1. Les éléments intégratifs mobilisables en *trans* (IME)

Les éléments intégratifs mobilisables en *trans* (IME) présentent une large diversité de combinaisons de modules d'intégration, de mobilisation et d'adaptation. Les IME, comme les ICE, codent des recombinases à tyrosine, des recombinases à sérine ou des transposases à motif DDE, et présentent un large panel de sites spécifiques d'intégrations chromosomiques. La majorité des IME décrits codent une recombinase à tyrosine et s'intègrent à l'extrémité 3' de gènes codant différents ARNt ou des protéines conservées. Des exceptions mettant en évidence une faible spécificité d'intégration suite à l'action de recombinases à tyrosine ou sérine ont néanmoins été décrites pour certains IME (Tn4399, Tn4555 et Tn5520 de *Bacteroides* et Tn4451 de *Clostridium perfringens*). A l'exception de certains IME dont Tn4555 et Tn4399 de *Bacteroides* se trouvant en copies multiples dans le génome hôte, la majorité est retrouvée en copie unique. Les IME sont transférés sous forme simple brin, à l'exception d'ATE-1 d'Actinomycètes transféré sous forme double brin. Ils présentent ainsi une origine de transfert qui leur est propre et qui est reconnue, pour la plupart des IME, par leur propre relaxase (MOB). Une récente analyse des génomes de Streptocoques a par ailleurs démontré que la moitié des IME portés par ces organismes codent également leur propre protéine de couplage (Coluzzi *et al.*, 2017). Les IME utilisent en revanche pour se transférer

le T4SS d'ICE ou de plasmides conjugatifs avec lesquels ils ne partagent pas de parenté. Les IME peuvent conférer à leur hôte un avantage sélectif, ils sont ainsi porteurs de résistances aux antibiotiques et à l'arséniate, et permettant la synthèse de bactériocines ou de c-di-GMP (Bellanger *et al.*, 2014).

3.6.2. Les éléments mobilisables en *cis* (CIME)

Les éléments mobilisables en *cis* (CIME) sont des éléments hautement dégénérés dérivant d'ICE ou d'IME par délétion de modules de conjugaison/mobilisation et de recombinaison mais qui sont néanmoins flanqués par les sites *att* de recombinaison. Ils sont ainsi intégrés dans le chromosome hôte seuls, ou aux côtés d'ICE dont ils empruntent la machinerie protéique de conjugaison pour se transférer (*e.g.* CIME302 avec ICE*St1* de *S. thermophilus*), mais peuvent également se trouver en accréction avec un IME (*e.g.* MGLAmaMed1 d'*Alteromonas macleodii*) (Bellanger *et al.*, 2014). Les CIME sont difficilement détectables et restent encore très peu étudiés. Le transfert par mobilisation de CIME apparenté à un ICE a été expérimentalement décrit pour CIME*L3-catR3-ICESt3* de *S. thermophilus* (Bellanger *et al.*, 2011), ICE_515_ *tRNA*^{Lys}-CIME_Nem316_ *tRNA*^{Lys} de *S. agalactiae* (Puymège *et al.*, 2013) et LpcGI-2 de *Legionella pneumophila* (Lautner *et al.*, 2013).

3.7. Quelques modèles d'ICE

3.7.1. ICE*Bs1*

ICE*Bs1* est un ICE de 21 kb intégré à l'extrémité 3' du locus *trnS-leu2* de l'ARNt^{Leu} comprenant 24 gènes organisés en trois modules (Figure 9). Un certain nombre de ces gènes présentent des homologies avec des gènes d'autres ICE tels que Tn916 d'*E. faecalis*, Tn5397 de *Clostridium difficile*, ICE*St1* de *S. thermophilus*, ICE*Lm1* de *Listeria monocytogenes*, et ICE*Sa1*, ICE*Sa2*, et ICE6013 des souches *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline. ICE*Bs1* comporte également des gènes homologues à ceux de plasmides conjugatifs de bactéries à Gram positif tel que pCF10 d'*E. faecalis*, pCW3 de *Clostridium perfringens*, et pIP501 de *S. agalactiae*. Par ailleurs, aucun des 24 gènes portés par ICE*Bs1* ne semble procurer d'avantage sélectif à *B. subtilis* (Auchtung *et al.*, 2016).

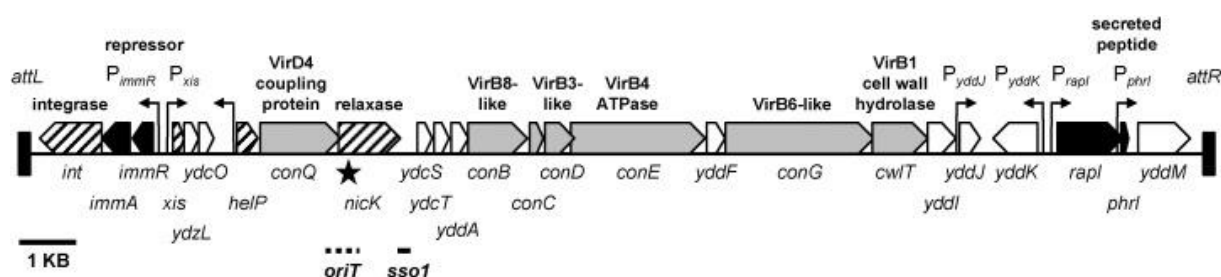


Figure 9 : Organisation génétique d'ICEBs1 (adaptée d'après Auchtung *et al.*, 2016)

Les sites d'attachements droit et gauche (*attR* et *attL*) sont représentés par des rectangles noirs. Les cadres de lectures ouverts (ORF) sont représentés par les boîtes fléchées orientées dans le sens de leur transcription. Les gènes sont colorés selon leurs fonctions : gènes de régulation (noir), gènes de traitement de l'ADN (rayures), les composés du T4SS (gris). Les ORF blanches codent des fonctions inconnues. L'origine de transfert *oriT* est indiquée par des pointillés, et l'origine simple brin *sso* par un trait unique. Le site de coupure est indiqué par une étoile noire. *int*, intégrase ; *xis*, excisionase ; *nicK*, relaxase ; *help*, facteur de processivité d'hélicase.

L'excision d'ICEBs1 se produit chez 0,005% de la population cellulaire dans des conditions de croissances classiques, non inductrices. L'excision se fait par une recombinaison site-spécifique entre des séquences directes répétées de 60 pb se trouvant dans les sites *attL* et *attR*, et requiert l'intervention du gène *int* codant une recombinase à tyrosine similaire à celle du phage lambda, et *xis* codant une excisionase. En revanche, l'intégration de l'élément ne nécessite que l'action de l'intégrase (Auchtung *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007).

Retrouvé à l'origine chez *B. subtilis*, ICEBs1 se transfère en conditions de laboratoire vers *Bacillus anthracis*, *Bacillus licheniformis* et *Listeria monocytogenes* avec une fréquence d'environ 10^{-2} transconjugants (*i.e.* cellule réceptrice ayant reçue l'ICE à partir d'une cellule donatrice) par cellules réceptrices (Auchtung *et al.*, 2005). Son transfert fait intervenir une relaxase Nick catalysant le clivage simple brin de la molécule d'ADN au niveau de la séquence *oriT*, aidée par l'hélicase PcrA et le facteur de processivité Help. La protéine Ssb (single-strand DNA-binding protein) forme un complexe nucléoprotéique avec Nick et l'élément simple brin, et procède à la réplication en cercle roulant d'ICEBs1, ce qui restaure la molécule d'ADN double brin et provoque l'augmentation de son nombre de copies. Parallèlement à cet événement, l'élément sous forme simple brin est conduit au pore protéique de conjugaison. De ce fait, la séquence *oriT* sert aussi bien d'origine de réplication de l'élément, que d'origine de transfert (Thomas *et al.*, 2013). Le transfert à travers le pore protéique de conjugaison fait intervenir un certain nombre de molécules, parmi lesquelles : ConE homologue de VirB4 fournit une source d'énergie à travers son activité ATPase, ConQ de la famille FtsK/SpoIIIE semble jouer le rôle de protéine de couplage (T4CP), ConG

homologue de VirB6 est associée à la membrane et est essentielle à la formation du pore, et CwlT joue le rôle d'hydrolase de peptidoglycane (Auchtung *et al.*, 2016).

ICEBs1 est régulé par le système ImmR/ImmA, lui-même régulé par la réponse SOS de l'hôte et le quorum sensing. ImmR réprime l'activité du promoteur P_{xis} contrôlant la transcription de *xis* et d'autres gènes impliqués dans réplication et la conjugaison d'ICEBs1 (Figure 10). ImmR régule également la transcription du promoteur situé en amont de l'opéron *immR-immA-int* permettant ainsi son autorégulation, mais aussi la régulation de l'expression des gènes *immA* et *int*, et aboutit à une expression constitutive du répresseur. La levée de répression du gène *immA* par ImmR aboutit à l'activation d'ImmA qui procède à la protéolyse d'ImmR, permettant ainsi l'excision et le transfert d'ICEBs1. Cette levée de répression est influencée par la réponse SOS, la disponibilité en nutriments, la densité cellulaire et la concentration de cellules réceptrices ne possédant pas ICEBs1, cette information étant relayée par le système de quorum sensing PhrI/RapI (Auchtung *et al.*, 2016). PhrI est un peptide signal sécrété sous forme active à l'extérieur de la cellule agissant comme un signal dépendant de la densité cellulaire. Ainsi lorsque le nombre de cellules portant ICEBs1 est élevé, la sécrétion de PhrI augmente, et de fortes concentrations de PhrI inhibent l'activité de RapI, ce dernier étant un activateur de l'activité protéolytique d'ImmA. De ce fait, les fréquences de transfert d'ICEBs1 sont faibles en phase stationnaire de croissance, contrairement à la phase exponentielle où PhrI, faiblement exprimé, n'aboutit pas à l'inhibition de RapI (Carraro & Burrus, 2014).

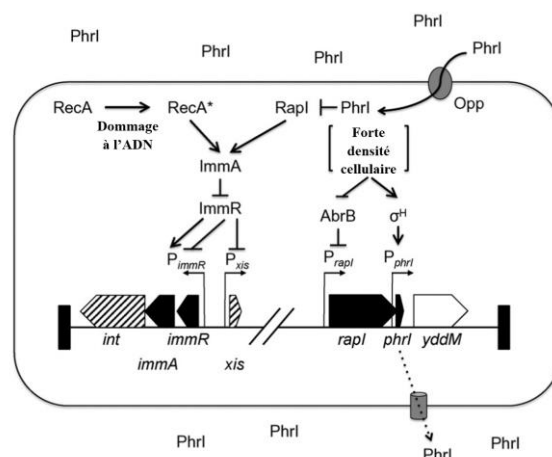


Figure 10 : Système de régulation d'ICEBs1 (adaptée d'après Auchtung *et al.*, 2016).

L'excision et le transfert d'ICEBs1 sont contrôlés par le promoteur P_{xis} . P_{xis} est réprimé par ImmR. La réponse RecA-dépendante de dommage à l'ADN et RapI activent l'anti-répresseur ImmA, qui clive ImmR. AbrB est un régulateur qui inhibe *rapI* en cas de faible densité cellulaire, celui-ci est alors activé en cas de forte densité cellulaire. PhrI est transporté dans la cellule par la perméase Opp et inhibe spécifiquement *rapI*.

3.7.2. ICESXT-R391

ICESXT est un élément de 96,5 kb mis en évidence à l'origine chez la souche 0139 de *V. cholerae*, qui confère à son hôte une résistance au chloramphénicol, à la streptomycine ainsi qu'aux sulfaméthoxazoles et au triméthoprim. R391 est un ICE de 89 kb fortement apparenté à ICESXT décrit à l'origine chez *P. rettgeri*, qui confère une résistance au mercure et à la kanamycine (Burrus *et al.*, 2006). ICESXT et R391 présentent un squelette commun de 47 kb comprenant 52 gènes avec plus de 95% d'identité nucléotidique, tandis que le reste des gènes, ou gènes variables, retrouvés dans la famille ICESXT/R391 codent des fonctions auxiliaires (résistance aux antibiotiques, seconds messagers, toxines/antitoxines, systèmes RM) ou des fonctions inconnues (Wozniak *et al.*, 2009) (Figure 11).

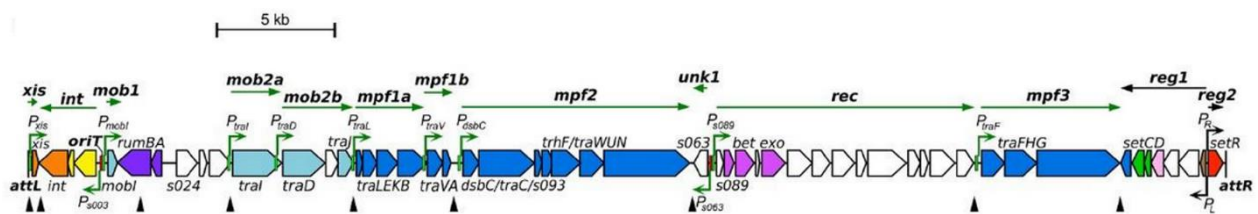


Figure 11 : Organisation génétique des ICE ICESXT/R391 (adaptée d'après Poulin-Laprade *et al.*, 2015).

Les ORF sont représentées par des flèches et sont colorées selon leur fonction : intégration/excision (orange), partitionnement de l'ADN (jaune), réparation de l'ADN (violet), traitement de l'ADN (bleu clair), assemblage du pore protéique de conjugaison (bleu foncé), recombinaison homologue (rose), activateurs (vert), répresseurs (rouge), régulateurs putatifs (marron), fonctions inconnues (blanches). *mob1-2*, traitement de l'ADN ; *rep*, réplication ; *unk1*, inconnu ; *mpf1-3*, formation du pore protéique de conjugaison ; *rec*, recombinaison ; *reg1-2*, régulation. L'origine de transfert *oriT* est indiquée.

Tous les membres de la famille ICESXT/R391 sont intégrés à l'extrémité 5' du gène *prfC* (peptide chain release factor), néanmoins ICESXT peut s'intégrer à moindre mesure dans des sites secondaires lorsque *prfC* est occupé. L'intégration dirigée par une recombinase à tyrosine (Int_{SXT}), se fait par recombinaison site-spécifique entre deux séquences quasi identiques de 17 pb, *attI* sur la forme circulaire excisée de l'élément, et *attB* sur le chromosome. L'excision de l'élément réalisée par l'intégrase Int_{SXT} à laquelle vient s'ajouter l'action de la RDF Xis, se produit chez 1% de la population cellulaire dans des conditions standard de croissance (Delavat *et al.*, 2017).

La fréquence de transfert d'ICESXT/R391 est d'environ 10⁻⁴ transconjugants par cellules donatrices à partir d'une donatrice *E. coli*, et de 10⁻⁷ transconjugants par cellules donatrices à partir d'une donatrice *V. cholerae*. Le transfert est initié au niveau de la séquence

oriT par la relaxase TraI et le facteur de mobilisation auxiliaire MobI dont le rôle exact est encore inconnu mais dont la nécessité au transfert a été démontrée expérimentalement (Ceccarelli *et al.*, 2008). La séquence *oriT* sert, par ailleurs, aussi bien d'origine de transfert que d'origine de réplication par cercle roulant. La réplication d'ICESXT/R391 provoque l'augmentation du nombre de copies de l'élément suite à son excision, permettant ainsi son maintien et sa stabilité au sein de l'hôte (Carraro *et al.*, 2015). Le maintien est aussi rendu possible par une répartition équilibrée des différentes copies de l'élément entre les cellules en division via le système de partitionnement actif (décrit dans le paragraphe 3.4.2.3). Le transfert d'ICESXT/R391 se fait à travers un pore assemblé par le T4SS et codé par quatre opérons *traLEKB*, *traVA*, *s054/traC/trhF/traWUN* et *traFHG* (Poulin-Laprade *et al.*, 2015) auxquels vient s'ajouter le gène *traD* codant la protéine de couplage (Delavat *et al.*, 2017). Le transfert des ICE de la famille ICESXT/R391 vers des cellules possédant des ICE de la même famille fait l'objet d'une exclusion d'entrée tel que précédemment développé dans le paragraphe 3.5.1.

ICESXT/R391 est régulé par quatre gènes conservés *setR*, *setC*, *setD* et *croS* portés par l'élément. *SetR* code un répresseur transcriptionnel de type CI qui enraye l'expression du promoteur P_L, ce dernier contrôlant l'expression de l'opéron composé de *croS* codant pour un régulateur de type Cro, de *setC* et de *setD*, aussi bien que sa propre expression. Ainsi, lors de l'exposition d'ICESXT/R391 aux agents induisant la réponse SOS de réparation de l'ADN, RecA provoque l'autoclivage et l'inactivation de SetR, permettant alors la levée de la répression de *setC* et *setD*. Les produits de ces deux gènes s'assemblent en complexe et permettent l'expression de divers gènes incluant *traLEKBVA*, *traFHG*, *int*, *xis*, le système de toxine-antitoxine *mosAT* et le système de recombinaison homologue indépendant de RecA *bet/exo*, ce qui aboutit à l'excision, au maintien et au transfert de l'élément (Carraro & Burrus, 2014; Poulin-Laprade & Burrus, 2015; Poulin-Laprade *et al.*, 2015).

3.7.3. ICE*clc*

ICE*clc* est un élément de 103 kb intégré à l'extrémité 3' du gène codant un ARNt^{Gly} dans la souche B13 de *P. knackmussii* (Figure 12). Cet ICE fait partie d'une famille d'ICE largement distribuée chez les bêta- et gammaprotéobactéries. ICE*clc* partage avec les éléments ICEHin1056 de *Haemophilus influenzae*, SPI-7 de *Salmonella enterica*, PAPI-1, pKLC102 et PAGI-3 de *P. aeruginosa* une région core qui comporte des fonctions orthologues présentant 25 à 30% d'identité de séquence d'acides aminés entre les différentes

protéines, regroupant ainsi ces éléments au sein de la même famille (Mohd-Zain *et al.*, 2004). Par ailleurs, ICE*clc* porte dans son module d'adaptation des gènes permettant à l'hôte l'utilisation du 3-chlorobenzoate (3-CBA) et du 2-aminophénol comme sources de carbone (Wozniak & Waldor, 2010).



Figure 12 : Organisation génétique d'ICE*clc* (adaptée d'après Delavat *et al.*, 2017).

Les gènes sont représentés par des flèches dont la coloration témoigne de la fonction : intégration (violet), régulation (rose), mobilité de l'ADN (jaune), formation du pore protéique de conjugaison (vert), origine de transfert *oriT* (bleu), fonctions inconnues (noir).

L'excision d'ICE*clc* est réalisée par la recombinase à tyrosine IntB13 qui recombine de façon site-spécifique deux séquences répétées de 18 pb se trouvant sur les deux extrémités *attR* et *attL* de l'élément intégré, aboutissant ainsi à la formation d'un site *attB* sur le chromosome, et d'un site *attI* sur la forme circulaire excisée de l'élément. Par ailleurs, aucune identification de RDF intervenant dans la réaction d'excision n'a encore été réalisée, IntB13 semble par conséquent suffisante pour la mise en place des deux réactions d'intégration et d'excision (Delavat *et al.*, 2016). Lorsque l'élément est sous forme intégrée, *intB13* se trouve sous le contrôle du promoteur faible P_{int} . En revanche, lorsque l'élément est excisé, *intB13* se retrouve sous le contrôle du promoteur fort constitutif P_{circ} qui, dans la forme intégrée, est dirigé vers l'extérieur de la séquence codante. P_{circ} se retrouve alors en amont du promoteur P_{int} , aboutissant à une forte expression du gène *intB13* potentiellement dans le but de faciliter la réintégration de l'élément (Delavat *et al.*, 2016; Sentchilo *et al.*, 2009). Par ailleurs, une étude suggère une réplication d'ICE*clc* aboutissant à l'augmentation de son nombre de copies, le mécanisme mis en place n'a en revanche pas encore été déterminé (Delavat *et al.*, 2016). Contrairement à ICES*XT* et ICEBs1, l'exposition d'ICE*clc* aux agents endommageant l'ADN ne provoque pas d'augmentation des fréquences d'excision de l'élément (Sentchilo *et al.*, 2009).

Le mécanisme de transfert d'ICE*clc* est peu décrit à l'heure actuelle. Celui-ci se transfère à une fréquence de 10^{-2} transconjugants par cellules donatrices, et est initié par une

relaxase clivant l'élément et le transférant sous forme simple brin, à travers un T4SS évolutivement distinct de celui codé par d'autres ICE et plasmides (Delavat *et al.*, 2017).

L'activation d'ICE*clc* se fait sous le contrôle de trois gènes régulateurs *mfsR*, *marR* et *tcIR*. MfsR est un répresseur transcriptionnel qui s'autorégule, et inhibe l'expression des gènes *marR* et *tcIR*. La levée de la répression engendrée par MfsR provoque la surexpression du gène *tcIR* et aboutit à l'augmentation de l'excision et du transfert d'ICE*clc*. Par ailleurs, le rôle du gène *marR* dans la régulation de l'élément reste encore inconnu. MfsR réprime également un ensemble de gènes codants pour une pompe à efflux, aussi localisé sur ICE*clc* mais séparé du gène *mfsR* par un cluster codant pour la dégradation du 2-aminophénol. Cette organisation génétique semble représenter une innovation récente d'ICE*clc* acquise par insertion de gène, puisque celle-ci aurait déplacé le gène *mfsR* de sa localisation originelle immédiatement adjacente aux gènes codant la pompe à efflux, aboutissant à une divergence de l'unité de régulation en deux unités distinctes. Cette caractéristique différencie ICE*clc* des autres ICE apparentés se transférant à une fréquence de 10^{-7} transconjugants par cellules donatrices, et pourrait être à l'origine de l'augmentation de la fréquence de transfert d'ICE*clc* par rapport aux autres ICE de la même famille (Pradervand *et al.*, 2014).

ICE*clc* est le seul ICE pour lequel des études à l'échelle cellulaire individuelle ont été réalisées. En plus de la mise en évidence d'une régulation stochastique de l'élément comme développé dans le paragraphe 3.3.1, des analyses expérimentales ont en partie percé à jour le devenir des cellules donatrices et l'impact du transfert de l'élément sur leur fitness. Il a ainsi été démontré que les cellules donatrices transférant ICE*clc* présentent une morphologie anormale et une capacité à se diviser et à croître altérées comparés aux mêmes cellules non porteuses de l'élément (Reinhard *et al.*, 2013). Il a également été observé que le transfert d'ICE*clc* à partir de ces cellules, et la présence de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) menant à la lyse cellulaire de l'hôte sont deux événements potentiellement liés. Néanmoins, il reste à définir si le transfert de l'élément est initié suite aux mauvaises conditions encourues par l'hôte, ou si c'est le transfert de l'élément qui provoque la lyse des cellules donatrices (Reinhard & van der Meer, 2014).

3.7.4. Tn916

Tn916 est un élément de 18 kb décrit à l'origine dans la souche DS16 d'*E. faecalis*, qui s'intègre préférentiellement dans des régions chromosomiques riches en AT. Tn916 confère à l'hôte la résistance à la tétracycline codée par le gène *tetM*, et présente un très large spectre d'hôte recouvrant aussi bien les bactéries à Gram positif, que les bactéries à Gram négatif (Roberts & Mullany, 2009) (Figure 13).

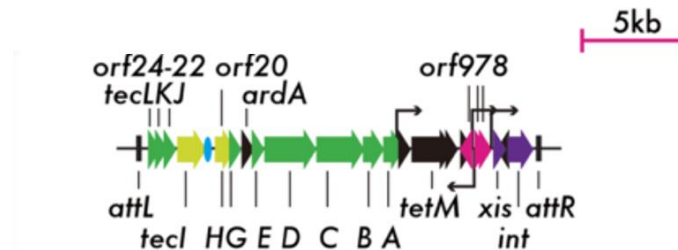


Figure 13 : Organisation génétique de Tn916 (adaptée d'après Delavat *et al.*, 2017).

Les gènes sont représentés par des flèches dont la couleur témoigne de la fonction : intégration (violet), régulation (rose), mobilité de l'ADN (jaune), formation du pore protéique de conjugaison (vert), origine de transfert *oriT* (bleu), fonctions inconnues (noir).

L'excision de Tn916 est réalisée par une recombinase à tyrosine Int^{Tn916} qui nécessite l'action de l'excisionase Xis. Ces deux molécules se lient à la molécule ADN au niveau, ou à côté des extrémités *attL* et *attR*. Alors que l'interaction de Xis avec l'extrémité *attL* favorise l'excision de l'élément, son interaction avec l'extrémité *attR* l'inhibe, ce qui pourrait représenter un moyen de réguler l'excision de l'élément. La recombinaison de Tn916 ne requiert pas l'homologie des séquences *attR/attL*, et se fait alors de manière non site-spécifique. De même, l'intégration catalysée par Int^{Tn916} ne nécessite pas d'homologie entre les sites *attB* et *attI* (Hinerfeld & Churchward, 2001a; Hinerfeld & Churchward, 2001b).

Le transfert de Tn916 nécessite l'intervention de la relaxase TecH (Orf20) qui catalyse la coupure simple brin de l'élément au niveau de l'origine de transfert *oriT* localisée dans une région intergénique en amont de *tecH*. Le système de conjugaison de Tn916 est apparenté à celui d'ICEBs1. De la même façon qu'ICEBs1, la synthèse du deuxième brin de Tn916 se fait par réplication en cercle roulant, utilise la séquence *oriT* comme origine de réplication, et nécessite l'intervention de TecH, des facteurs de processivité TecK et TecJ, et une origine de réplication simple brin (*sso*) (Wright & Grossman, 2016).

L'excision et le transfert de Tn916 impliquent une cascade de régulation très complexe induite par la présence de tétracycline. Ainsi, en l'absence de cet antibiotique, la transcription du gène *tetM* est interrompue prématurément tandis qu'en présence de tétracycline, l'ARN

polymérase continue la transcription du gène *tetM* et permet également la transcription d'un ARN antisens du gène *orf9*. Celui-ci inhibe la traduction de l'ARNm *orf9* ce qui aboutit à la levée de répression qu'exerçait Orf9 sur le promoteur P_{orf7}. Ce promoteur permet l'expression des gènes dont il a le contrôle, notamment *orf7* et *orf8*. Les protéines produites activent leur propre transcription, ce qui permet également la transcription de la région située en aval comportant les gènes *xis* et *int*. Enfin, la production de Xis et Int permet l'excision de Tn916, ce qui aboutit à l'association physique des gènes de conjugaison (*tecLKJIHGFEDCBA*) situés en aval de l'opéron *xis-int*, permettant ainsi le transfert de l'élément (Delavat *et al.*, 2017).

3.7.5. ICES_{St1/3}

ICES_{St1} et ICES_{St3} sont des éléments de 34,7 et 28,0 kb intégrés à l'extrémité 3' du gène *fda* codant une 1,6-biphosphate aldolase dans le génome des souches CNRZ368 et CNRZ385 de *S. thermophilus* respectivement (Burrus *et al.*, 2002). ICES_{St1} présente dans son module d'adaptation un système RM de type II dénommé Sth3681 conférant à l'hôte une résistance aux bactériophages (Burrus *et al.*, 2002). ICES_{St3} porte quant à lui dans son module d'adaptation deux ORF *orf385F* et *orf385G* codant deux méthyltransférases putatives pouvant appartenir à un système RM de type II (Burrus *et al.*, 2002; Carraro *et al.*, 2016) (Figure 14).

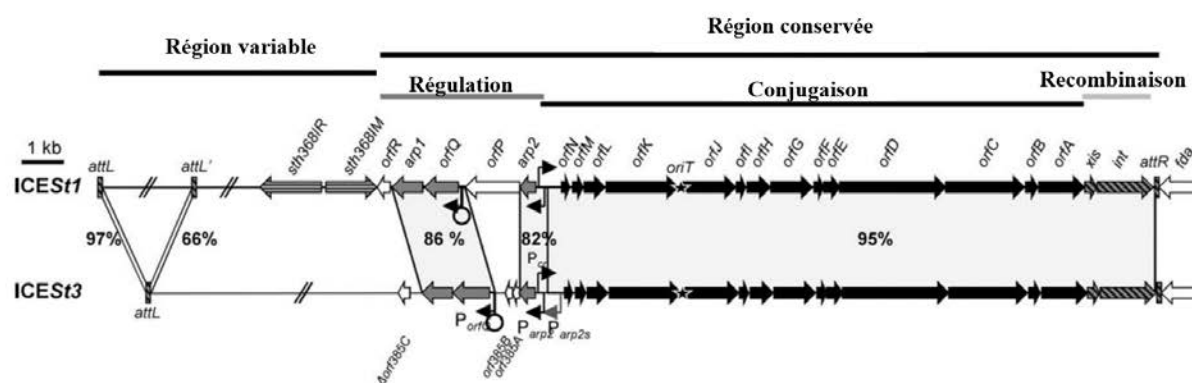


Figure 14 : Organisations génétiques d'ICES_{St1} et ICES_{St3} (adaptée d'après Carraro & Burrus, 2014).

La délimitation des différentes régions de ces ICE est indiquée par des lignes. Les ORF sont représentées par des flèches surplombées de leur nom et colorées selon leurs fonctions : traitement de l'ADN et formation du pore protéique de conjugaison (noir), régulation (gris), recombinaison (rayures transversales), restriction-modification (rayures horizontales), fonctions inconnues (blanc). Les promoteurs et terminateurs rho-indépendants sont indiqués par des flèches inclinées et des boucles. L'origine de transfert *oriT* et les sites d'attachements (*attL* et *attR*) sont indiqués par une étoile et des rectangles noirs respectivement. Les zones grisées mettent en évidence la parenté des séquences qui sont indiquées avec les pourcentages d'identités nucléotidiques.

L'excision et l'intégration d'ICE*St1/3* se font par recombinaison site-spécifique entre deux régions de répétitions directes de 27 pb situées de part et d'autre de l'élément *attL* et *attR* pour la forme intégrée, ou entre les sites *attB* (chromosome) et *attI* (ICE circularisé) lorsqu'il est sous forme excisée. L'excision d'ICE*St1/3* requiert l'action de la recombinase à tyrosine Int et de l'excisionase Xis, tandis qu'Int est suffisante à l'intégration de l'élément. L'excision de l'élément à partir de la cellule donatrice ne représente pas une étape limitante pour le transfert, sa fréquence d'excision étant 1000 fois supérieure à celle du transfert. ICE*St1* comporte un site *attL* secondaire nommé *attL'*, qui peut être utilisé pour la recombinaison site-spécifique de l'élément, et ainsi aboutir à la formation d'un ICE tronqué alternatif dit ICE*St2*. De façon semblable à ICE*clc*, l'excision d'ICE*St1* et d'ICE*St3* augmente lors de la phase stationnaire de croissance bactérienne. L'étude d'une version d'ICE*St3* dépourvue du module d'adaptation (mini-ICE*St3*) a mis en évidence une répllication en cercle roulant de l'élément permettant vraisemblablement le maintien et la stabilité de l'élément dans l'hôte (Burrus *et al.*, 2002; Carraro *et al.*, 2016; Delavat *et al.*, 2017).

ICE*St3* se transfère à une fréquence d'environ 10^{-6} transconjugants par cellules donatrices, tandis que le transfert d'ICE*St1* se situe en dessous du seuil de détection, dans les mêmes conditions de laboratoire (Bellanger *et al.*, 2009). ICE*St3* se transfère vers d'autres espèces que *S. thermophilus*, notamment vers *Streptococcus pyogenes* et *E. faecalis*. Les acteurs moléculaires intervenant dans le transfert d'ICE*St3* sont très peu caractérisés, néanmoins le module de conjugaison de ces éléments est plus ou moins proche de certains déjà décrits. Il comporte entre autres le gène *orfJ* codant une relaxase putative apparentée à Nick d'ICE*Bs1* et à Tech de Tn*916* qui catalyse la coupure simple brin de l'élément, *orfK* codant une protéine de couplage putative de type TCPA (non apparentée à VirD4), une région *oriT* présentant un site de coupure *nic* à priori conservé entre ICE*St1/3*, ICE*Bs1* et Tn*916*, les gènes *orfM* et *orfL* codant potentiellement un homologue fonctionnel du facteur de processivité Help d'ICE*Bs1* (Thomas *et al.*, 2013), et *orfA* codant potentiellement une hydrolase de peptidoglycane (Bellanger *et al.*, 2009).

Le module de régulation d'ICE*St1/3* est composé de trois gènes conservés *arp1*, *arp2*, et *orfQ*, et de gènes variables *orfP* et *orfR* pour ICE*St1*, et *orf385A*, *orf385B*, et Δ *orf385C* pour ICE*St3*. La régulation d'ICE*St1/3* est contrôlée par deux opérons (opéron *arp1/orfQ* + opéron *arp2*) transcrits à partir des promoteurs P_{arp2} et P_{orfQ} séparés par un terminateur transcriptionnel rho-indépendant. Alors que les deux opérons sont co-transcrits chez ICE*St3*,

leur transcription ne semble pas couplée chez ICE*St1* (Carraro *et al.*, 2011). Par ailleurs, un deuxième promoteur P_{arp2s} est exprimé chez ICE*St3* durant la phase stationnaire de croissance alors qu'il est inactif chez ICE*St1* (Carraro *et al.*, 2011). L'excision et le transfert d'ICE*St1/3* sont régulés par Arp1 présentant une région homologue au répresseur CI du phage lambda et à SetR d'ICE*SXT*. L'analyse de la séquence des gènes *arp2* et *orfQ* démontre une homologie de domaine avec les régulateurs ImmR et ImmA d'ICE*Bs1* respectivement, les produits de transcription de ces gènes n'ont en revanche pas encore fait l'objet d'une caractérisation. L'exposition d'ICE*St1/3* aux agents endommageant l'ADN provoque l'augmentation de l'excision de l'élément, qui serait une conséquence d'un autoclivage d'Arp1 dépendant de RecA. La cascade de régulation d'ICE*St1/3* n'est pas entièrement caractérisée à l'heure actuelle, néanmoins il se peut que la dégradation d'Arp1 et d'Arp2 par OrfQ soit nécessaire à la levée de la répression des fonctions permettant l'excision et l'initiation du transfert de l'élément (Bellanger *et al.*, 2009; Bellanger *et al.*, 2014; Carraro *et al.*, 2011).

L'étude du transfert d'ICE*St3* intégré dans les souches CNRZ368 et CNZ385 de *S. thermophilus* a par ailleurs mis en évidence l'influence des facteurs d'hôte sur le transfert de l'élément, celui-ci se déroulant à moins fort impact au niveau de la souche CNRZ368 qu'au niveau de la souche CNRZ385 (Carraro *et al.*, 2011).

4. Les modèles d'études

4.1. *Streptococcus salivarius*

4.1.1. Généralités

S. salivarius est une bactérie à Gram positif, aéro-anaérobe facultative, appartenant aux Firmicutes et plus précisément au groupe Salivarius comportant également les espèces apparentées *S. thermophilus* et *Streptococcus vestibularis*. *S. salivarius* est une primo-colonisatrice de la cavité buccale des nouveau-nés, qui persiste dans la cavité orale tout au long de la vie de son hôte. *S. salivarius* est également une bactérie commensale que l'on retrouve au niveau de l'estomac et du jéjunum, suggérant un rôle écologique de cette bactérie dans ces écosystèmes (Kaci *et al.*, 2014). En effet, *S. salivarius* est considérée comme une bactérie pouvant limiter l'émergence de pathogènes au niveau de la cavité buccale et du tractus digestif. Elle entre en particulier en compétition avec *Streptococcus mutans* et *Streptococcus sobrinus* lors de la colonisation de la cavité buccale, ou inhibe la colonisation du tissu épithélial par la bactérie pathogène *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

(Delorme *et al.*, 2015). *S. salivarius* est également productrice de bactériocines telles que les lantibiotiques, pouvant inhiber la croissance de bactéries comme *S. pyogenes* et *S. pneumoniae*. La souche K12 de *S. salivarius*, isolée de la salive d'un enfant sain, est par ailleurs commercialisée en tant que probiotique pour la prévention des pharyngites liées à des infections par des Streptocoques (Burton *et al.*, 2006), et s'avère être également protectrice contre l'infection par *Candida albicans* en empêchant l'adhésion de ce dernier (Burton *et al.*, 2006; Delorme *et al.*, 2015). *A contrario*, *S. salivarius* est également un pathogène opportuniste pouvant provoquer des bactériémies lors d'épisodes d'immunodéficience du porteur, ou des endocardites et des méningites suite à un traumatisme subi par l'hôte (Laurila *et al.*, 1998; Shewmaker *et al.*, 2010).

4.1.2. Diversité génétique et transfert horizontal

La taille du génome de *S. salivarius* varie de 2,05 Mb à 2,42 Mb et représente l'un des génomes les plus conséquents des Streptocoques. Les souches K12 et M18, dont les tailles des génomes figurent parmi les plus importantes, présentent toutes deux un mégaplasme d'environ 0,18 Mb porteur de gènes adaptatifs codant (i) la production de bactériocines permettant à l'hôte de contrer la prolifération de pathogènes et ainsi de stabiliser la flore microbale orale, et (ii) la synthèse de pili impliqués dans la co-aggrégation avec d'autres bactéries et l'adhésion aux cellules épithéliales humaines (Burton *et al.*, 2013). Des transconjugants ayant reçu le mégaplasme de la donatrice K12 et M18 ont par ailleurs été obtenus *in vitro*, le mécanisme emprunté par le mégaplasme pour son transfert horizontal n'a en revanche pas été défini (Burton *et al.*, 2013).

Le core génome de *S. salivarius* est estimé comporter 1350 gènes orthologues, et la comparaison de paires de souches *S. salivarius* a permis de dénoter l'existence de plus de 500 gènes variables procurant potentiellement différents traits adaptatifs. Des événements d'inversions génomiques potentiellement dues à l'insertion d'éléments de type IS, ainsi que des événements de recombinaison témoignant de l'échange d'informations génétiques entre des régions chromosomiques et des plasmides ont par ailleurs été décrits (Delorme *et al.*, 2015). De plus, des échanges interspécifiques entre *S. salivarius* et les bactéries partageant les mêmes écosystèmes tels que *S. pneumoniae* et *S. parasanguinis* ont également été mis en évidence (Delorme *et al.*, 2007), notamment pour la souche K12 pour laquelle une région chromosomique de 17 kb présentant une mosaïque de gènes potentiellement transférés

horizontalement avec *S. mutans*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *L. lactis* et *Lactobacillus sakei* a été identifiée (Delorme *et al.*, 2015).

Une étude menée sur une collection comprenant 46 souches commensales et 92 souches cliniques de *S. salivarius* a mis en évidence la présence l'éléments intégratifs conjugatifs apparentés à ICESt3 de *S. thermophilus* suite à l'amplification par réaction de polymérisation en chaîne des gènes codant l'intégrase, la protéine de couplage et la relaxase d'ICESt3. La présence de Tn916 d'*E. faecalis* a également été détectée par amplification du gène de la relaxase codée par l'élément. D'autres éléments porteurs des gènes *erm*(B) ou *mef*(A/E) conférant une résistance à l'érythromycine (Tn3872, Tn6002, Tn2009, l'élément MEGA) ont par ailleurs été retrouvés dans des isolats de *S. salivarius* (Chaffanel *et al.*, 2015).

4.2. *Streptococcus thermophilus*

4.2.1. Généralités

S. thermophilus est une bactérie à Gram positif anaérobie aérotolérante appartenant aux Firmicutes, et constituant avec *S. salivarius*, l'une des trois espèces formant le groupe Salivarius. *S. thermophilus* est une bactérie lactique de grande importance économique dans l'industrie alimentaire liée à la production de fromage, de yaourt et de lait fermenté en co-culture avec des bactéries comme *Lactobacillus delbrueckii* et *L. lactis*. *S. thermophilus* semble avoir récemment dérivé d'une souche du groupe Salivarius s'étant adaptée au lait, la seule niche écologique de *S. thermophilus* connue jusqu'à présent (Delorme *et al.*, 2007; Delorme *et al.*, 2010). Contrairement aux autres Streptocoques, *S. thermophilus* est la seule espèce ne présentant pas de souches pathogènes, et semblerait avoir évolué principalement par perte des fonctions inutiles à son cycle de vie dans l'écosystème laitier, notamment des gènes de virulence (Bolotin *et al.*, 2004; Couvigny *et al.*, 2015; Hols *et al.*, 2005). *S. thermophilus* présente également des caractéristiques probiotiques à travers des activités anti-oxydantes, la modulation du microbiote intestinal et l'inhibition de certains pathogènes (Cui *et al.*, 2016).

4.2.2. Diversité génétique et transfert horizontal

Le transfert horizontal a grandement contribué à l'évolution du génome de *S. thermophilus*. Celle-ci met en jeu une diversité d'éléments génétiques mobiles de type IS, phages et ICE dont la fonctionnalité a pu être prouvée expérimentalement, notamment dans le cas d'ICESt3 de la souche CNRZ385 (Bellanger *et al.*, 2009). Ceci est également appuyé par

la mise en évidence d'une région de 17 kb comportant des insertions de séquences et une mosaïque de gènes présentant plus de 90% d'identité nucléotidique avec d'autres bactéries lactiques (Delorme *et al.*, 2010). Par ailleurs, l'analyse *in silico* de 47 souches décrit un contenu en gène variable d'environ 20% chez *S. thermophilus*, dont 8% n'aurait été acquis que très récemment par transfert horizontal du fait de leur présence uniquement dans six des souches analysées (Eng *et al.*, 2011).

5. La paroi cellulaire

Lors de la conjugaison, les ICE sont transférés du cytoplasme de la bactérie donatrice vers celui de la bactérie réceptrice en traversant l'enveloppe cellulaire de chacune de ces deux cellules. La composition de l'enveloppe cellulaire de la donatrice et de la réceptrice va donc probablement influencer le succès de la conjugaison.

La paroi cellulaire est une structure multicouche complexe destinée à protéger la bactérie de l'effet imprédictible et parfois hostile de l'environnement. La paroi des bactéries à Gram négatif comporte un peptidoglycane, lui-même entouré d'une membrane externe composée de lipopolysaccharides. En revanche la paroi des bactéries à Gram positif comporte un peptidoglycane plus épais, mais ne présente pas de membrane externe (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014; Schwechheimer & Kuehn, 2015).

5.1. La paroi des bactéries à Gram négatif

L'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif comporte deux membranes, la membrane cytoplasmique ou interne composée d'une bicouche phospholipidique, et la membrane externe composée de phospholipides orientés vers l'intérieur et de lipopolysaccharides orientés vers l'extérieur de la cellule. Un espace périplasmique contenant un peptidoglycane et des protéines périplasmiques sépare les deux membranes interne et externe. Le peptidoglycane comporte de longs polymères de chaînes répétées de disaccharide N-acétylglucosamine-N-acétylmuramique liés via des liaisons peptidiques (Schwechheimer & Kuehn, 2015) (Figure 15).

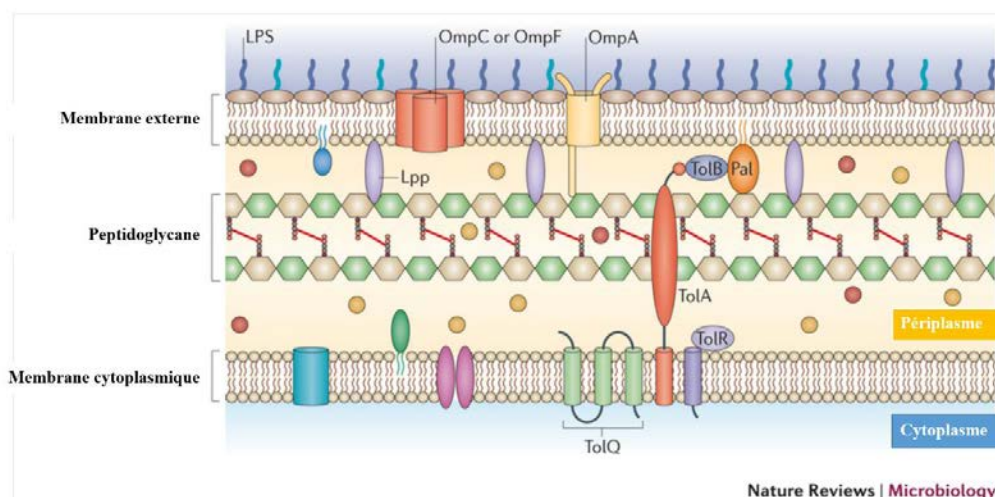


Figure 15 : Composition de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram négatif (adapté d'après Schwechheimer & Kuehn, 2015).

LPS, lipopolysaccharides ; Lpp, lipoprotéines ; OmpA-C-F, protéines de la membrane externe attachées de façon non covalente ; Tol-Pal, complexe de lipoprotéines associées au peptidoglycane comprenant TolA, TolB, TolQ, TolR et Pal. Les protéines périplasmiques sont représentées par des sphères oranges et rouges, les protéines transmembranaires par des formes ovales roses et des cylindres cyan.

5.2. La paroi des bactéries à Gram positif

Deux principaux éléments différencient la paroi des bactéries à Gram positif de la paroi des bactéries à Gram négatif. Le premier élément concerne l'absence de la membrane externe qui joue un rôle essentiel dans la protection des bactéries à Gram négatif des molécules toxiques se trouvant dans l'environnement, en plus de représenter une couche stabilisatrice supplémentaire. Le deuxième élément concerne l'épaisseur du peptidoglycane. Celui-ci est de l'ordre de quelques nanomètres d'épaisseur et se trouve être beaucoup plus fin chez les bactéries à Gram négatif étant donné l'effet de stabilité de la paroi octroyé par la présence de la membrane externe. Les bactéries à Gram positif peuvent occuper des écosystèmes aussi hostiles que ceux occupés par les bactéries à Gram négatif notamment au niveau du tube digestif, mais ne bénéficient pas de la protection apportée par une membrane externe. Afin de pallier à ce manque, les bactéries à Gram positif exposent à leur surface un peptidoglycane beaucoup plus épais que celui des bactéries à Gram négatif, celui-ci mesurant entre 30 à 100 nanomètres (Silhavy *et al.*, 2010; Vollmer & Seligman, 2010) (Figure 16).

Ainsi, le peptidoglycane est le constituant majeur de la paroi des bactéries à Gram positif, et est composé de chaînes alternées de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et N-acétylmuramique acide (MurNAc) liés via des ponts β -1,4. Des chaînes peptidiques, dont la

composition diffère d'une espèce à une autre, sont liées de façon covalente via leur extrémité N-terminale au groupe lactyl de MurNAc, et sont parfois interconnectées de façon directe ou indirecte à travers un ou plusieurs acides aminés générant ainsi une structure tridimensionnelle autour de la cellule. De ce fait, le réseau de peptides et de carbohydrates, dont est composé le peptidoglycane des bactéries à Gram positif, joue un rôle clé dans l'intégrité structurale de la cellule grâce sa structure à la fois élastique et robuste, procurant une forte résistance aux pressions osmotiques et hydrostatiques que rencontre la bactérie (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014).

Les bactéries à Gram positif exposent à leur surface un nombre variable, selon les espèces et les souches, de protéines de surface parfois analogues aux protéines retrouvées dans le périplasma des bactéries à Gram négatif. La membrane externe étant absente de ces organismes, les protéines ne peuvent être retenues et contenues dans la cellule sans l'intervention d'éléments les retenant proches, ou au niveau, de la membrane. Le peptidoglycane des bactéries à Gram positif est également composé de longs polymères anioniques nommés acides téichoïques qui représentent 60% de la masse de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif et contribuent ainsi de façon majeure à sa structure et fonctionnalité. L'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif est composée également de polysaccharides présentant une diversité significative de composition et de poids moléculaire (Silhavy *et al.*, 2010).

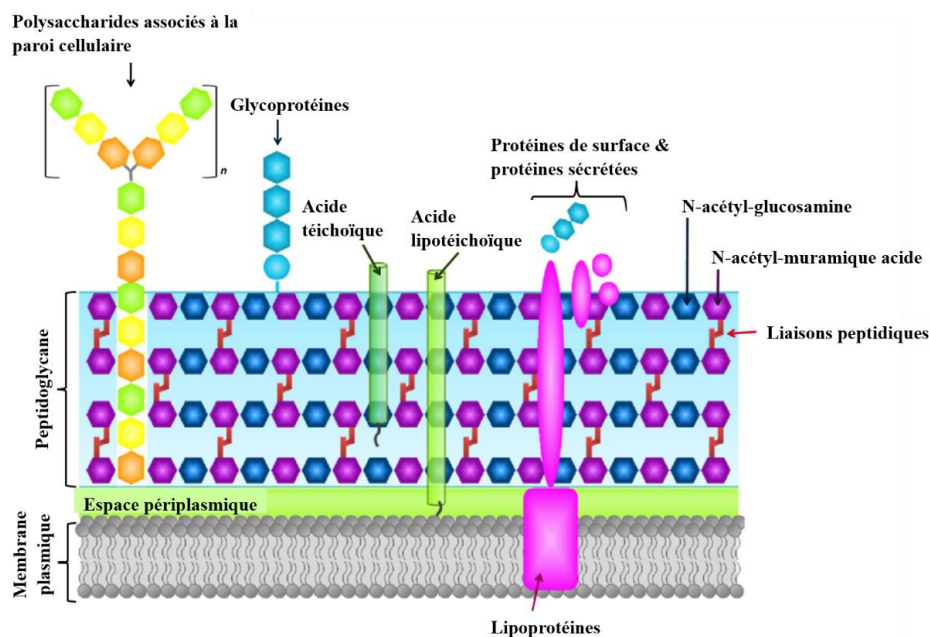


Figure 16 : Composition de l'enveloppe cellulaire des bactéries Gram positif (adapté d'après Burgain *et al.*, 2014).

5.2.1. Les protéines de surface

Les protéines transportées à la surface bactérienne comportent un peptide signal assurant leur migration vers la surface à travers un système d'exportation, suite à quoi le peptide signal peut-être reconnu et clivé par une peptidase spécifique. Ainsi, les protéines possédant un motif d'ancrage s'attachent de façon covalente ou non à la paroi, tandis qu'en l'absence de ce motif, les protéines sont excrétées au niveau du milieu environnant la bactérie. Néanmoins, des protéines de surface ne présentant aucun peptide signal ou de motif d'ancrage pouvant expliquer leur localisation à la paroi ont été identifiées comme impliquées dans les voies métaboliques liées à la synthèse de carbohydrates et de protéines (Sanchez *et al.*, 2008).

Parmi les protéines exposées à la surface cellulaire des bactéries à Gram positif, figurent les protéines à motif LPxTG ainsi que les lipoprotéines, pour lesquelles l'association à la surface se fait à travers une liaison covalente (Burgain *et al.*, 2014).

5.2.1.1. Les protéines à motif LPxTG

Les protéines à motif LPxTG sont les protéines de surface les mieux identifiées, et représentent moins de 10% des protéines exportées vers la surface des bactéries à Gram positif (Siegel *et al.*, 2016). Ces protéines remplissent diverses fonctions principalement liées à l'adhésion et la colonisation de nouveaux hôtes par des bactéries généralement pathogènes (Davies *et al.*, 2009; Nobbs *et al.*, 2007; Schneewind & Missiakas, 2014).

Celles-ci présentent en N-terminal un signal peptide permettant leur orientation vers la surface à travers le système de sécrétion Sec. Lors de la translocation de ces protéines, le peptide signal est clivé par une peptidase, et le produit de cette réaction comprenant uniquement l'extrémité C-terminale est retenue dans la voie de sécrétion. Celle-ci présente le signal de sortie (CWSS) comportant un motif conservé d'acides aminés LPxTG, suivi d'un domaine hydrophobique et d'une courte queue composée de résidus chargés positivement. Ces deux dernières régions servent à retenir temporairement la protéine au niveau de la membrane en jouant respectivement le rôle d'un domaine transmembranaire et en interagissant avec la membrane chargée négativement, permettant de ce fait un bon positionnement de la protéine préalable à son ancrage au peptidoglycane (Siegel *et al.*, 2017). La sortase (SrtA), une transpeptidase conservée attachée à la membrane et présentant un site actif cystéine et histidine, reconnaît et clive le motif LPxTG entre l'acide aminé thréonine (T)

et glycine (G), puis établit une liaison covalente entre l'acide aminé cystéine de la sortase et le résidu thréonine (T) libéré en C-terminal. Par la suite, SrtA catalyse la mise en place de la liaison peptidique entre l'acide aminé thréonine (T) du substrat clivé et le groupe amino- du pentaglycyle du lipide II, un précurseur de biosynthèse du peptidoglycane, générant ainsi l'incorporation de la protéine à la paroi cellulaire au niveau du peptidoglycane (Schneewind & Missiakas, 2014) (Figure 17).

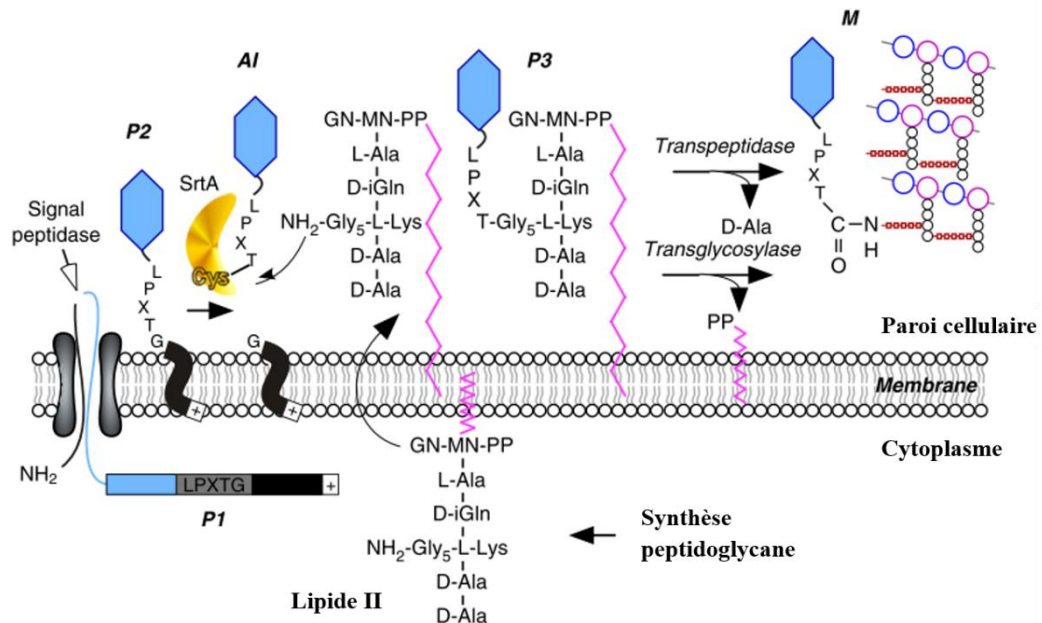


Figure 17 : Modèle décrivant l'ancrage des protéines à motif LPxTG à la paroi chez *S. aureus* (adaptée d'après Schneewind & Missiakas, 2014).

P1, précurseur présentant la protéine complète ; P2, produit de réaction de clivage de P1 par la sortase A présentant uniquement la partie C-terminale contenant le signal de sortie ; boîte noire, domaine hydrophobe retenant P2 et queue chargée positivement (+) ; SrtA, sortase A ; AI, intermédiaire acyle suite à la liaison de la cystéine de SrtA avec la glycine du motif LPxTG de la protéine de surface ; P3, précurseur présentant une liaison entre la thréonine C-terminale de la protéine de surface au lipide II ; M, protéine de surface mature associée au peptidoglycane.

Chez *S. thermophilus*, la souche LMD-9 code une sortase fonctionnelle SrtA (STER1255) qui est retrouvée sous forme de pseudogène dans la souche LMG 18311 dont le génome a été complètement séquencé (Bolotin *et al.*, 2004). Trois autres pseudogènes correspondent à des protéines à motif LPxTG dans la souche LMG 18311, alors que la souche LMD-9 code pour trois protéines à motif LPxTG dépendante de SrtA en plus de deux pseudogènes présentant un motif LPxTG. La rareté de l'exposition de ces protéines à la surface de *S. thermophilus* semble être une conséquence de l'adaptation de cette dernière à son environnement laitier, et la perte des gènes impliqués dans la virulence, puisque les

protéines à motif LPxTG sont généralement associées au caractère de virulence des *Streptococcus* pathogènes (Goh *et al.*, 2011; Hols *et al.*, 2005).

5.2.1.2. Les lipoprotéines

Les lipoprotéines (Lpp) constituent le deuxième type de protéines ancrées de façon covalente à la paroi cellulaire. Celles-ci remplissent d'importantes fonctions chez les bactéries à Gram positif, notamment en jouant le rôle de protéines de liaison à des substrats (SBP Substrat Binding Proteins) dans les systèmes de transporteurs de type ABC, lors de la résistance aux antibiotiques, dans la signalisation cellulaire, lors de l'exportation et le repliement des protéines, la sporulation, la germination, la conjugaison ainsi que d'autres fonctions diverses et variées (Sutcliffe & Harrington, 2002).

Les lipoprotéines sont d'abord synthétisées dans le cytoplasme sous forme de précurseurs (prolipoprotéines), puis sont sécrétées à travers le système de sécrétion Sec ou Tat, suite à quoi les précurseurs sont traités et maturés au niveau de la membrane plasmique par l'action séquentielle de trois enzymes différentes (Nguyen & Gotz, 2016). Les lipoprotéines présentent une séquence conservée nommée « lipobox » permettant une reconnaissance spécifique des lipoprotéines par la machinerie de modification. D'abord les enzymes prolipoprotéines diacylglycérol transférases (Lgt) catalysent l'addition d'un lipide diacylglycérol de peptidoglycane au groupe thiol du résidu cystéine conservé de la lipobox, elle-même localisée au niveau de la région de clivage du peptide signal. Celui-ci est alors clivé par une lipoprotéine signal peptidase II (Lsp) au niveau de la lipobox, libérant alors le groupe alpha-amino de la diacylglycéryl-cystéine se trouvant en N-terminale de la lipoprotéine mature. Enfin, l'apolipoprotéine N-acyltransférase (Lnt) catalyse la N-acylation de la diacylglycéryl-cystéine, aboutissant à la forme mature de la protéine liée à la membrane plasmique via son N-acyl-S-diacylglycéryl-cystéine (Buddelmeijer, 2015) (Figure 18).

Contrairement aux protéines à motif LPxTG, les lipoprotéines ont moins été sujettes à l'inactivation et la perte lors de l'adaptation de *S. thermophilus* à sa niche écologique. Ainsi, la souche LMG 18311 de *S. thermophilus* code 24 lipoprotéines prédites, dont 15 sont impliquées dans la liaison à des substrats pour des transporteurs de type ABC (Hols *et al.*, 2005), alors que très peu correspondent à des pseudogènes apparentés à des fonctions de virulence (2 au total) (Bolotin *et al.*, 2004).

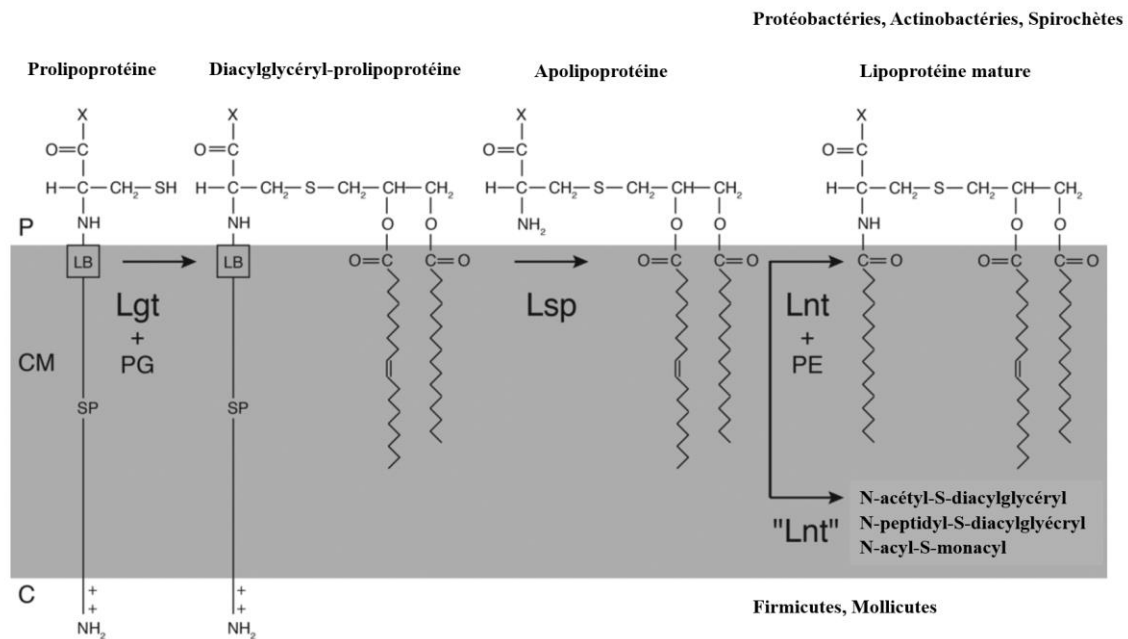


Figure 18: Voie de modification des lipoprotéines chez les bactéries (adaptée d'après Buddelmeijer, 2015).

CM, membrane cytoplasmique ; C, cytoplasme ; P, périplasme ; SP, peptide signal reconnu par les systèmes de sécrétion Sec ou Tat ; LB, lipobox ; Lgt, Lsp, Lnt, les trois enzymes intervenant dans la maturation des lipoprotéines ; PG, phosphatidylglycérol ; PE, phosphatidyléthanolamine. Des modifications N-acyl alternatives ont été observées chez les Firmicutes et les Mollicutes.

5.2.2. Les acides téichoïques et lipotéichoïques

Les acides téichoïques représentent le second composé majeur de l'enveloppe cellulaire des bactéries à Gram positif. Les acides téichoïques correspondent à des polymères répétés classifiés en deux groupes : les acides téichoïques de paroi WTA (wall teichoic acids) liés de façon covalente au peptidoglycane, et les acides lipotéichoïques LTA (lipoteichoic acids) attachés à la membrane plasmique par le biais d'un glycolipide (Burgain *et al.*, 2014) (Figure 19).

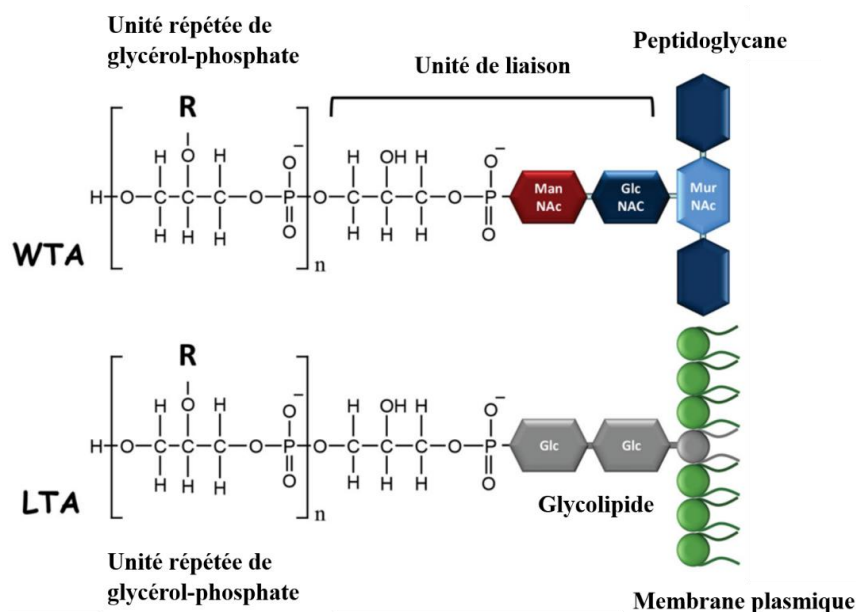


Figure 19 : Représentation schématique des acides téichoïques de paroi (WTA) et lipotéichoïques (LTA) (adaptée d'après Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014).

5.2.2.1. Les acides téichoïques de paroi

Les acides téichoïques de paroi (WTA) peuvent à eux seuls représenter plus de la moitié du poids de l'enveloppe cellulaire de certaines espèces. Les WTA présentent une très forte diversité de structures et leur abondance dépend d'un certain nombre de facteurs, à savoir de l'espèce ou de la souche, de la phase de croissance, des conditions de pH, de la source de carbone et de la disponibilité en phosphate (Burgain *et al.*, 2014). Les WTA semblent intervenir dans de nombreuses fonctions notamment au niveau de l'interaction hôte/pathogène en permettant la colonisation et l'infection de nouvelles niches écologiques pour *S. aureus*, *S. pneumoniae* ou *Bacillus anthracis*, mais aussi au niveau du transfert horizontal de gènes (Schade & Weidenmaier, 2016).

Les WTA sont généralement constitués de chaînes répétées de poly-glycérophosphate [poly(Gro-P)] ou poly-ribitolphosphate [poly (Rbo-P)], attachées de façon covalente au carbone C6 du groupe hydroxyle du composé MurNac du peptidoglycane, via une liaison phosphodiester (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014). Ce sont les enzymes Tag ou Tar dont le fonctionnement est similaire, qui interviennent respectivement dans la voie de biosynthèse des WTA chez *B. subtilis*, et *S. aureus*. La première étape se déroule dans le cytoplasme de la cellule, où l'enzyme TagO (ou TarO) intervient dans le transfert de GlcNac-

1-P de UDP-GlcNAc au peptide undecaprenol phosphate UndP se trouvant au niveau de la membrane cytoplasmique. Ensuite, l'acétylmanosamine (ManNAc) est transféré par TagA (ou TarA) à partir d'UDP-ManNAc au GlcNAc lié à UndP lors de l'étape précédente. La primase TagB (ou TarB) procède ensuite à l'attachement d'une unité glycérophosphate Gro-P, elle-même formée par TagD (ou TarD) à partir d'un glycérol et d'un CTP. La polymérisation des WTA est par la suite catalysée par TagF (ou TarF) qui ajoute les unités Gro-P à la chaîne déjà existante. Plus de 40 unités ribitolphosphate Rbo-P peuvent ensuite être ajoutées par TagL (ou TarL). Enfin, une fois les étapes intracellulaires complétées, la chaîne de WTA est transloquée du côté extracellulaire de la cellule à travers un transporteur de type ABC (TarGH) et la chaîne est alors liée de façon covalente au peptidoglycane via le groupement C6-OH du composé MurNAc, catalysée par LytR-CpsA-Psr. Les liaisons phosphodiester intervenant dans le maintien de la chaîne WTA apportent des charges négatives qui rendent le polymère en entier chargé négativement. Cependant, dans certaines espèces, une D-alanylation du polymère réalisée par les enzymes DltABCD, peut rendre le polymère partiellement zwitterionique suite à la neutralisation des charges négatives (Chapot-Chartier & Kulakauskas, 2014; Schade & Weidenmaier, 2016) (Figure 20).

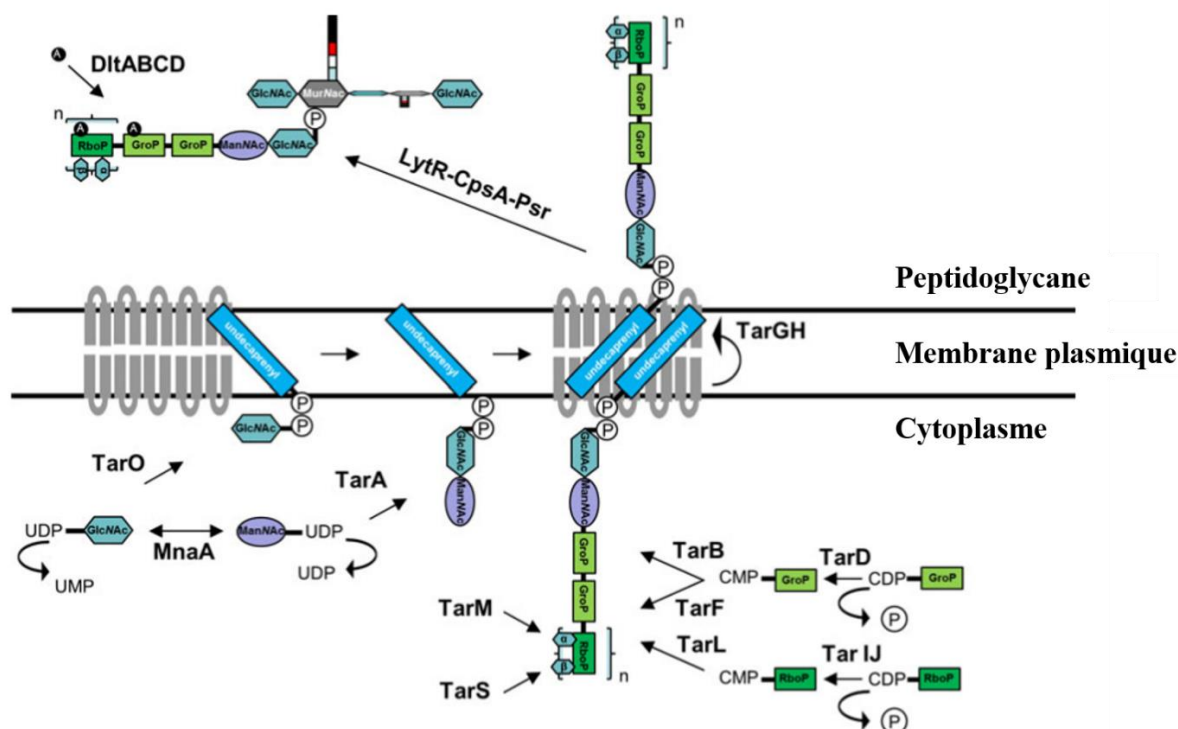


Figure 20 : voie de biosynthèse des WTA chez *S. aureus* (adaptée d'après Schade & Weidenmaier, 2016).

Des résultats expérimentaux démontrent que la délétion des gènes *tarO* et *tagO* chez *S. aureus* et *B. subtilis* ne perturbent pas la viabilité de ces bactéries. Néanmoins, ces mutants ne présentent plus d'acides téichoïques à la surface, témoignant de l'absence de voie de biosynthèse alternative, ce qui met en exergue le rôle essentiel de TarO et de TagO dans la l'initiation de la production de ces composés de paroi (D'Elia *et al.*, 2006a; D'Elia *et al.*, 2006b). Le contenu en acides téichoïques de l'enveloppe cellulaire de *S. thermophilus* est très peu caractérisé, et seul l'opéron *dlt* responsable de la D-alanylation des acides téichoïques des bactéries à Gram positif a fait l'objet d'une brève description (Hols *et al.*, 2005).

5.2.2.2. Les acides lipotéichoïques

Les acides lipotéichoïques (LTA) sont largement distribués chez les bactéries lactiques, en particulier chez les Entérocoques et les Streptocoques. La structure des LTA des bactéries à Gram positif est fortement conservée entre les espèces contrairement à celle des WTA, et leur production est indépendante de la phase et des conditions de croissance de la bactérie. Le rôle des LTA, bien qu'encore peu décrit, semble plus concerner la physiologie de la bactérie et son interaction avec l'hôte comme témoigné par le positionnement aberrant du septum de division, la diminution de la capacité à adhérer et à envahir les cellules hôtes et l'atténuation de la virulence de mutants LTA (Schade & Weidenmaier, 2016).

Contrairement au WTA, le polymère des LTA est beaucoup moins complexe et est ancré à la paroi via un glycolipide di-glucosyl-diacylglycérol inséré dans le feuillet externe de la membrane plasmique. Largement étudiée chez *S. aureus*, la synthèse des LTA débute dans le cytoplasme avec l'action de la glycosyltransférase YpfP qui transfère deux glucoses de l'UDP-glucose au lipide membranaire diacylglycérol (DAG) générant ainsi le produit Glc₂-DAG. La protéine membranaire LtaA interviendrait par la suite pour la translocation du glycolipide du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique. Enfin, la protéine LtaS polymérise le squelette carboné des LTA en ajoutant les motifs répétés de glycérol-phosphate GroP. La décoration du squelette GroP avec des esters D-alanine neutralise la charge négative globale du polymère en le rendant alors zwitterionique (Reichmann *et al.*, 2014).

Chez *B. subtilis* ce sont LtaS_{BS}, YfnI and YqgS des orthologues de LtaS, qui jouent le rôle de LTA synthétases et YvgJ celui de primase (Figure 21). L'étude de simple, triple ou quadruple mutant de ces protéines démontre que la production des LTA n'est abolie que pour

le quadruple mutant ou le simple mutant YvgJ. Des résultats expérimentaux démontrent par ailleurs l'interdépendance des activités enzymatiques de LtaS_{BS} et YfnI. Chez *Listeria monocytogenes*, une seule LTA synthase semble intervenir dans la production des LTA (Wormann *et al.*, 2011). De même que pour les acides téichoïques, les acides lipotéichoïques de *S. thermophilus* n'ont pas fait l'objet de caractérisations (Hols *et al.*, 2005).

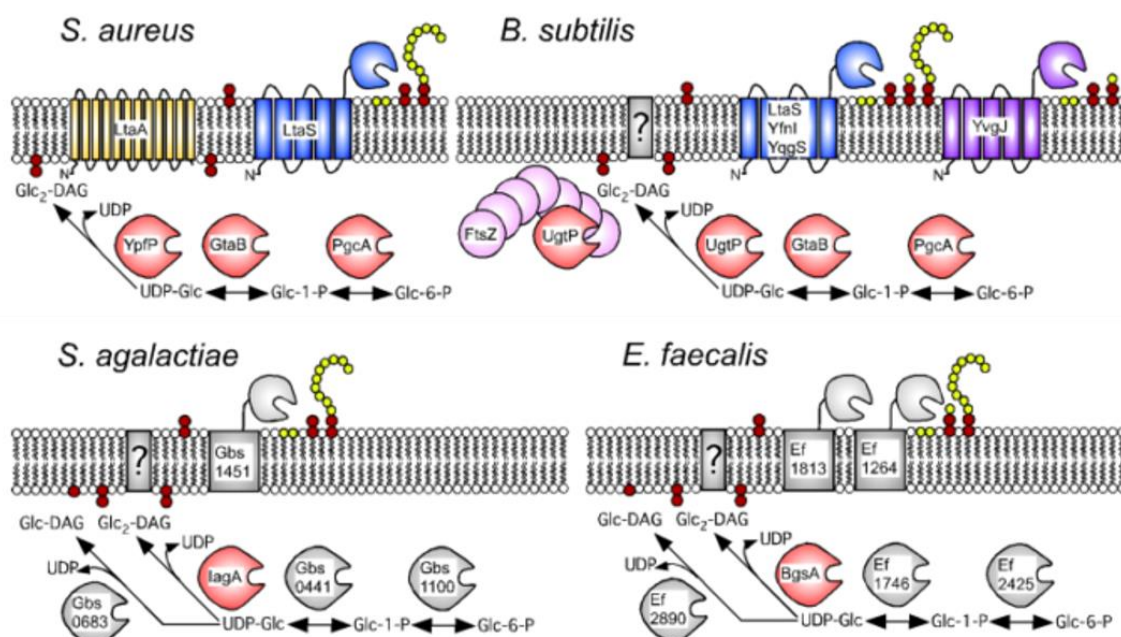


Figure 21 : Représentation des acteurs moléculaires intervenant dans la synthèse des acides lipotéichoïques chez *S. aureus*, *B. subtilis*, *S. agalactiae* et *E. faecalis* (adaptée d'après Reichmann & Grundling, 2011).

Les enzymes dont la fonction a été prouvée expérimentalement sont représentées en couleur. Les enzymes identifiées par un BLAST basé sur l'homologie de séquence sont représentées en gris. Les points d'interrogation correspondent à des protéines prédites mais non identifiées. Le glucose est représenté par des cercles rouges. Le polymère final phosphatidylglycérol-phosphate-LTA est représenté par des cercles jaunes. Les appellations des protéines sont issues de la littérature ou basées sur les numéros de gènes des souches *S. agalactiae* NEM316, et *E. faecalis* V583.

Glc-6-P, glucose-6-phosphate ; Glc-1-P, glucose-1-phosphate; Glc₂-DAG, diglucosyldiacylglycérol.

5.2.3. Les exopolysaccharides

Les exopolysaccharides (EPS) correspondent à de longues chaînes de polysaccharides auxquels se branchent des unités répétées de sucre, généralement de glucose, de galactose, de du rhamnose ou de dérivés. Les EPS ne sont pas attachés de façon permanente à la surface microbienne et sont sécrétés dans l'environnement lors de la croissance de la bactérie, ce qui les distingue des polysaccharides capsulaires qui restent associés à la membrane de façon permanente (Rehm, 2010). Les EPS semblent remplir diverses fonctions principalement en

lien avec le manteau qu'ils forment autour de la cellule, qui serait à l'origine d'un microenvironnement favorable à la formation de biofilm. Des rôles dans la protection des bactéries vis-à-vis des facteurs hostiles liés à l'environnement ou à l'hôte sont également accordés aux EPS, de même qu'un rôle dans la pathogénicité de bactérie telle que *S. pneumoniae* en rendant possible l'interaction hôte-pathogène (Minic *et al.*, 2007).

Les EPS produits par *S. thermophilus* sont des hétéropolysaccharides (HePS) composés d'unités répétées de différents monosaccharides, principalement de glucose, galactose et rhamnose, mais aussi de fucose, ribose, d'acide glucuronique, N-acetylgalactosamine, et de composés non carbohydratés tels que le phosphate et l'acétate. La présence de ces deux derniers peut conférer une charge négative au polymère d'EPS, ce qui peut expliquer la nature des interactions électrostatiques observées avec des composés chargés positivement (Pachekrepapol *et al.*, 2017). Les gènes impliqués dans la biosynthèse des EPS chez *S. thermophilus* sont généralement regroupés en cluster sur le chromosome et codent pour les protéines impliquées dans la formation des unités répétées de sucre, l'export et la polymérisation de la chaîne d'EPS (Figure 22).

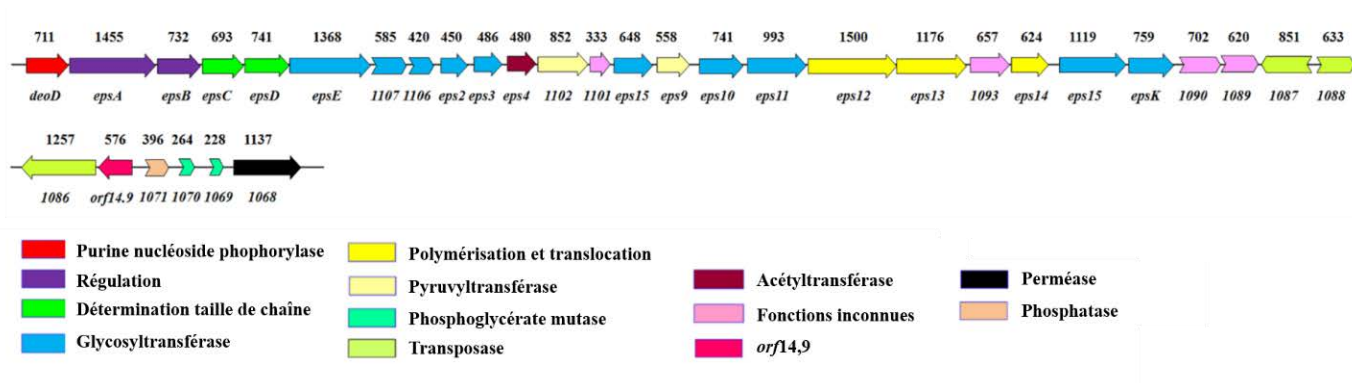


Figure 22 : Organisation du cluster de gènes *eps* de la souche LMG 18311 de *S. thermophilus* (adaptée d'après Cui *et al.*, 2017).

Les produits putatifs codés par les gènes conservés du cluster EPS sont une phosphatase (EpsB), une kinase (EpsD), une phosphogalactosyltransférase (EpsE), une molécule nécessaire à la phosphorylation d'EpsD (EpsC), et un modulateur de l'activité d'EpsE (EpsD). Des simples mutants ne présentant pas de fonctionnalité d'EpsC, d'EpsD, ou d'EpsE ne synthétisent plus d'EPS (Minic *et al.*, 2007). Les sous-unités répétées de l'EPS sont synthétisées dans le cytoplasme sur un transporteur lipidique membranaire, l'undécaprenol phosphate (C55-P), puis transférées à l'extérieur de la membrane plasmique

par une flippase et enfin assemblées en chaîne d'EPS par une polymérase. Dans le cas des EPS, d'autres enzymes pourraient intervenir dans le clivage de la liaison rattachant l'EPS à la membrane plasmique (Welman & Maddox, 2003).

5.3. Impact des composants de la paroi sur le transfert horizontal de gènes

Des études investiguant le lien entre des molécules de surface et le transfert horizontal d'éléments génétiques mobiles (MGE) de type phage, plasmide ou ICE n'ont commencé que très récemment à voir le jour, démontrant l'impact de molécules telles que les protéines de surface, les acides téichoïques, ou des phospholipides sur l'acquisition par les bactéries de nouvelles informations génétiques.

5.3.1. Impact sur le transfert horizontal de phages et la transmission d'îlots génomiques

Une étude parue en 2011 traitant de l'infection de *S. aureus* par des phages a mis en évidence le rôle des acides téichoïques de paroi dans la réussite de cette infection. En effet, des mutants délétés du premier gène de la voie de biosynthèse des WTA, *tagO*, ne produisant par conséquent plus de WTA, présentent une absence de plages de lyse suite à des tentatives d'infection de la bactérie sauvage par des phages du séro groupe A, F et D. Il a alors été démontré que ces WTA jouent le rôle de récepteur reconnu par les phages du fait de l'exposition d'un glyco-épitope GlcNAc particulier (Xia *et al.*, 2011).

Une étude concernant la souche ST395 de *S. aureus* a par ailleurs mis l'accent sur le rôle des WTA dans le contrôle du spectre d'hôte susceptible de recevoir les îlots génomiques SaPI de la souche ST395 via l'intervention de phages helper. Il a ainsi été démontré que cette souche, qui d'ordinaire ne transfère pas ses îlots génomiques vers les souches réceptrices de *S. aureus*, mais les transfère vers *Staphylococcus epidermis* et *L. monocytogenes*, produit un WTA particulier qu'elle partage avec celles-ci. Ceci a par ailleurs été confirmé par le succès du transfert de SaPI de ST395 vers les souches *S. aureus* et des souches non apparentées autrefois non réceptrices, lorsque le WTA de ST395 est exprimé de façon ectopique dans ces souches (Winstel *et al.*, 2013).

5.3.2. Impact sur le transfert de plasmide conjugatif

Le plasmide conjugatif pCF10 d'*E. faecalis*, dont la fréquence de transfert élevée avoisine 10^{-1} - 10^{-2} transconjugants par cellules donatrices, code une protéine de surface PrgB permettant l'agrégation de la cellule donatrice avec la cellule réceptrice afin de procéder au transfert du plasmide. PrgB présente dans sa partie C-terminale un motif LPxTG, et deux domaines d'agrégation permettant son attachement aux acides lipotéichoïques, ce qui lui permet à travers son exposition à la surface de jouer un rôle de facteur d'agrégation cellulaire, également responsable de la formation de biofilm, c'est-à-dire, à la mise en place d'un environnement propice à l'échange des signaux de phéromones et à l'installation de la machinerie conjugative. Ainsi, les acides lipotéichoïques impactent le transfert conjugatif de pCF10 en permettant l'établissement du contact cellulaire contigu nécessaire au succès de la conjugaison (Bhatty *et al.*, 2015; Waters *et al.*, 2004).

5.3.3. Impact sur le transfert d'ICE

La mutation du génome de *B. subtilis* (porteur d'ICEBsI) par des insertions aléatoires de transposons a permis de mettre en évidence l'importance de certains gènes dans le transfert d'ICEBsI. Alors que certaines mutations provoquent l'augmentation des fréquences de transfert, d'autres les diminuent significativement, et ce lorsque seule la réceptrice fait l'objet de mutations, ou lorsque la donatrice et la réceptrice sont toutes deux mutées. De façon générale, les mutations impactant le transfert d'ICEBsI concernent principalement des gènes dont le rôle prédit ou décrit affecte l'enveloppe cellulaire de *B. subtilis* (Johnson & Grossman, 2014).

Il a ainsi été démontré que la réduction ou l'élimination du produit du gène *mprF*, à savoir le phospholipide membranaire lysyl-phosphatidylglycérol (L-PG), provoque la diminution des fréquences de transfert d'ICEBsI, alors que l'augmentation du niveau de L-PG suite à la mutation du gène *ugtP* ou la surexpression de *mprF* provoque l'augmentation des fréquences de transfert. La perte de fonctionnalité d'YfnI, intervenant entre autres, dans la biosynthèse d'acides lipotéichoïques, provoque quant à elle l'augmentation des fréquences de transfert d'ICEBsI (Johnson & Grossman, 2016) (Figure 23).

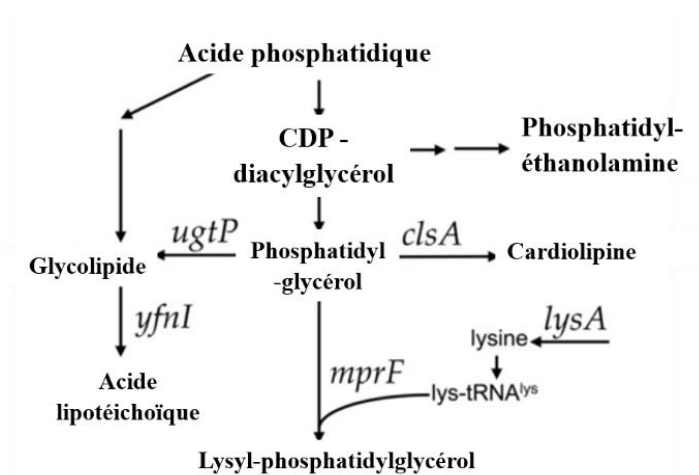


Figure 23 : Voie de biosynthèse des phospholipides affectant le transfert conjuguatif d'ICEBs1 (adapté d'après Johnson & Grossman, 2016).

6. Les biofilms

6.1. Les biofilms microbiens

Un biofilm microbien correspond à la structure tridimensionnelle que forme une communauté microbienne sessile et mixte comportant des organismes procaryotes et/ou eucaryotes. La formation d'un biofilm débute par l'adhésion des cellules à une surface potentiellement permise par des facteurs d'agrégation ou la synthèse de pili. La croissance cellulaire de la communauté microbienne au sein du biofilm aboutit alors à la production et l'accumulation d'une matrice extracellulaire composée d'une ou plusieurs substances polymérique de type protéines, polysaccharides, ADN extrachromosomique, substances humiques ou diverses molécules impliquées dans la communication cellulaire, permettant alors le maintien de la structuration du biofilm à travers l'attachement des cellules à la surface et entre elles. Suite à la formation du biofilm, des cellules individuelles voire même de petites parties de biofilms peuvent se séparer du reste du biofilm retournant alors à un mode de vie planctonique, ou à nouveau sessile au sein d'un autre biofilm (Azeredo *et al.*, 2017) (Figure 24).

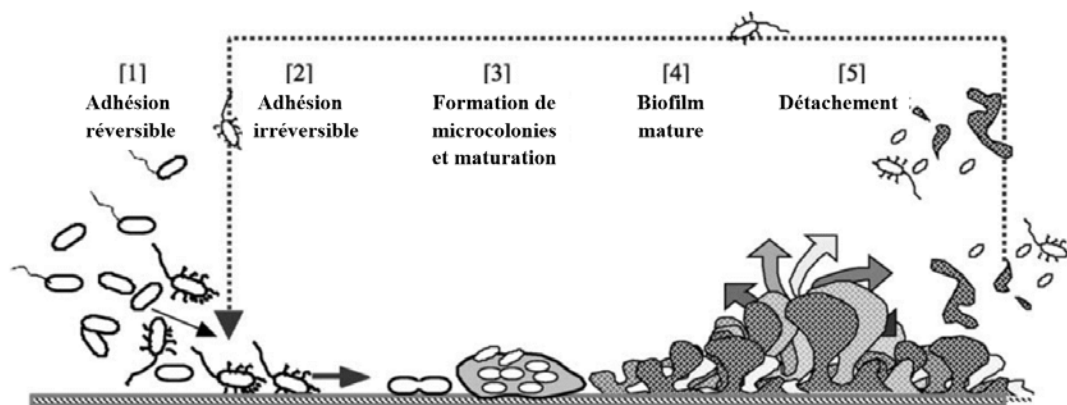


Figure 24 : Représentation des différentes étapes de développement d'un biofilm bactérien (adapté d'après Ghigo, 2003).

Des bactéries telles que les bactéries à Gram négatif *E. coli* et *P. aeruginosa* ou la bactérie à Gram positif *B. subtilis* sont utilisées comme modèles pour l'étude et la caractérisation expérimentale du développement d'un biofilm microbien. Pour ces bactéries, la formation des biofilms est vraisemblablement liée à une perte de motilité due à un switch génotypique les faisant passer d'un mode de vie planctonique à un mode de vie sessile, alors que la phase de dispersion se produisant suite au développement d'un biofilm semble être dépendante de la réactivation de la machinerie de motilité de ces bactéries. Néanmoins, des bactéries non motiles comme les Staphylocoques, les Entérocoques et les Streptocoques présentent également les mêmes caractéristiques de formation et de développement de biofilm, à savoir une architecture structurale similaire ainsi que la présence d'une matrice extracellulaire (Cook & Dunny, 2014).

L'analyse de la capacité d'une collection de souches de *S. thermophilus* à produire des biofilms a démontré que cette espèce est très peu productrice de biofilm contrairement aux bactéries apparentées du groupe *Salivarius*, ce qui est expliqué par le manque d'efficacité d'adhésion aux surfaces dont fait preuve *S. thermophilus*. De plus, l'analyse du génome d'une souche *S. thermophilus* anormalement productrice de biofilm a mis en évidence l'existence de trois gènes impliqués dans la formation de biofilm et dont la distribution est hétérogène parmi les différentes souches de *S. thermophilus*. Alors qu'un de ces gènes semble avoir été acquis suite à un événement de transfert horizontal, les deux autres sont localisés dans un cluster absent des autres souches de *S. thermophilus*, présentant notamment des événements de pertes de gènes par délétion, et dont les orthologues codent des facteurs impliqués dans l'adhésion

cellulaire. En somme, cela constitue des arguments en faveur d'un phénotype ancestral vestige d'une vie en tant que commensal, qui a été perdu au cours de l'évolution par *S. thermophilus* lors de son adaptation à l'environnement laitier (Couvigny *et al.*, 2015).

6.2. Biofilm et transfert horizontal

La structuration en biofilm procure aux bactéries un environnement propice au transfert horizontal de gènes, notamment dans le cadre de l'acquisition de l'ADN étranger par transformation bactérienne. Cela a été décrit pour les biofilms de *S. mutans* démontrant une plus forte induction de la compétence (Aspiras *et al.*, 2004). De même, il a été démontré que le développement d'un biofilm et de la compétence sont des mécanismes faisant l'objet d'une régulation impliquant un certain nombre de gènes communs (Aspiras *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2002). Par ailleurs, il a également été mis en évidence que des événements de transfert d'éléments génétiques mobiles par conjugaison ont lieu parmi les communautés microbiennes vivant en biofilm (Hausner & Wuertz, 1999), ce qui a donné naissance à un certain nombre d'études visant à analyser le lien entre le développement des biofilms et le transfert conjugal des éléments. Ainsi, il a été montré que l'addition du plasmide conjugal F à des cellules d'*E. coli* augmentait considérablement leur capacité à former des biofilms notamment à travers la synthèse de pili codés par le plasmide (Ghigo, 2001). La capacité à former des biofilms est également portée par les modules adaptatifs de certains ICE telle que l'îlot de pathogénicité PAPI-1 de *P. aeruginosa* (Hong *et al.*, 2017), ou les ICE de *Streptococcus agalactiae* qui codent des adhésines, contribuant à la formation de biofilms (Chuzeville *et al.*, 2015). Ainsi, il apparaît que les éléments génétiques mobiles favorisent la formation et la stabilisation de la structuration en biofilm de leur hôte, ce qui leur permet de bénéficier d'un environnement propice à leur transfert horizontal (Molin & Tolker-Nielsen, 2003).

II. Résultats

1. Analyse et comparaison *in silico* des ICE de *Streptococcus salivarius*, et évaluation expérimentale de leur fonctionnalité

Contexte : le microbiote intestinal dont fait partie *S. salivarius* joue un rôle majeur dans la santé humaine en offrant une protection à l'encontre des pathogènes et en contribuant à la nutrition humaine. Suite à la consommation du bol alimentaire, une importante quantité de bactéries est alors ingérée et se retrouve capable d'interagir avec les bactéries résidentes symbiotiques et commensales et ce notamment à travers l'échange d'informations génétiques. Cet échange de gènes peut résulter en l'acquisition de nouvelles propriétés pour les bactéries permettant la résistance aux antibiotiques, la virulence, la synthèse de bactériocines ou de facteurs de réponse aux stress, et l'apport de nouvelles propriétés cataboliques. Celles-ci peuvent significativement impacter l'équilibre du microbiote digestif voire même être à l'origine de l'émergence de souches multi-résistantes et/ou pathogènes. Une précédente étude menée au laboratoire sur des isolats de *S. salivarius* a mis en évidence la présence d'ICE putatifs suite à l'amplification par PCR du gène codant pour la relaxase d'ICE*St3* de *S. thermophilus*, suggérant la présence d'ICE de la même famille (Chaffanel *et al.*, 2015), mais également la possibilité que *S. salivarius* soit un acteur important du transfert horizontal de gènes par conjugaison dans son écosystème naturel.

Objectif : l'objectif de cette étude était de caractériser *in silico* les ICE mis en évidence dans les génomes de *S. salivarius*, et de tester expérimentalement leur fonctionnalité et leur capacité de transfert intra- et interspécifique.

Stratégie employée : treize souches de *S. salivarius* (F1-4, F1-8, F4-2, F6-1, B35, B57, L22, L50, L60, L64, N5, N20, et T93) ayant démontré une amplification du gène de la relaxase d'ICE*St3* et présentant des profils MLST différents ont été sélectionnées pour le séquençage de leur génome afin d'accéder à la séquence nucléotidique de leur ICE. Ces derniers, ainsi que d'autres ICE de Streptocoques retrouvés dans la base de données NCBI, ont fait l'objet d'une caractérisation *in silico*. Celle-ci comprend l'étude et la comparaison de leurs modules d'intégration, de conjugaison, de régulation et d'adaptation. La fonctionnalité de deux ICE issus de deux isolats de *S. salivarius* a par la suite été évaluée expérimentalement notamment à travers l'étude de leur excision en absence et en présence d'agents endommageant l'ADN. De plus, ces deux ICE ont été marqués par un gène de résistance au chloramphénicol afin de suivre et de tester leur capacité à se transférer en intra- et inter-espèces lors d'expériences de conjugaison sur filtre.

Résultats : les ICE mis en évidence dans le cadre de cette étude partagent un module de conjugaison conservé et proche de celui d'ICE*St3*. En revanche, ces éléments se caractérisent par une diversité de séquence et/ou d'organisation des modules d'intégration et de régulation, mais également par la diversité de leurs gènes adaptatifs.

Les 13 souches de *S. salivarius* analysées présentent des ICE portant des modules de conjugaison fortement apparentés à celui d'ICE*St3* avec plus de 90% d'identité nucléotidique. La recherche à travers les bases de données NCBI a notamment permis d'identifier une parenté avec le module de conjugaison d'ICE*St3* pour de nombreux ICE portés par des souches de *S. salivarius* dont font parties les souches JF et 1270, mais également pour des ICE portés par d'autres Streptocoques. Les analyses phylogénétiques et les alignements de séquences ont par ailleurs permis de mettre en évidence la parenté de protéines codées par des éléments portés par des hôtes de différentes espèces.

Bien que fortement apparentés à celui d'ICE*St3*, les modules de conjugaison des ICE de *S. salivarius* sont associés à trois types de modules de recombinaison différents permettant une intégration de ces éléments à l'extrémité 3' de trois gènes : *fda* codant une fructose 1-6 biphosphate aldolase, *rpsI* codant la sous-unité S9 de la grande sous-unité ribosomale 50S, et *rpmG* codant la sous-unité L33 de la petite sous-unité ribosomale 30S. L'analyse phylogénétique des modules de recombinaison a par ailleurs démontré la présence d'intégrases fortement apparentées au sein d'ICE de souches de *S. salivarius* phylogénétiquement distantes, mais également au sein d'autres espèces telles que *S. pneumoniae*, *S. parasanguinis* et *S. macedonicus*. Les analyses phylogénétiques mettent également en évidence une évolution des ICE de *S. salivarius* par échange de modules entraînant l'apparition de différentes combinaisons de modules de conjugaison et de recombinaison.

Les ICE de *S. salivarius* présentent une diversité de contenu et d'organisation de leur module de régulation. Néanmoins, la majorité de ces éléments présentent des homologues des gènes *arp1*, *orfQ* et *arp2* caractérisés chez ICE*St3*, ou plus rarement une version tronquée ou absente de l'un de ces gènes de régulation. La comparaison de la séquence en acide aminés des protéines Arp1, OrfQ et Arp2 des ICE de *S. salivarius* met en évidence une divergence pouvant atteindre 45%, 59% et 53% respectivement. Des modules de conjugaison fortement apparentés peuvent également être associés à des modules de régulation distants

phylogénétiquement. En plus de la diversité de séquence, une diversité d'organisation de ces modules de régulation a été mise en évidence avec l'incorporation de gènes additionnels entre les gènes *arp2* et *orfQ* des ICE analysés. Des événements d'accrétion ou de recombinaisons homologues ont également été mis en évidence chez de nombreux ICE de *S. salivarius*.

Les ICE de *S. salivarius* mais également ceux d'autres espèces incluses dans ce travail ont démontré une diversité du contenu de leur module adaptatif. Ainsi, parmi les fonctions retrouvées : (i) 13 des 19 éléments étudiés portent un système de restriction et modification (RM) ou une méthyltransférase orpheline, (ii) deux ICE de *S. salivarius* portent un groupe de gènes codant un système de résistance au cadmium retrouvé également au niveau d'un CIME en accrétion avec un ICE, (iii) un des ICE code un groupe de gènes pouvant être impliqué dans la biosynthèse de lipides membranaires, (iv) deux autres ICE possèdent des gènes codant potentiellement des bactériocines (salivaricine D), (v) un des ICE porte des gènes pouvant coder des protéines de paroi, et (vi) deux ICE présents chez *S. salivarius* et *S. parasanguinis* présentent un même cargo de gènes codant un système à deux composants et un cluster de gènes codant un complexe putatif LolCDE impliqué dans la libération des lipoprotéines de la membrane plasmique. Des ICE retrouvés chez des espèces et souches distantes phylogénétiquement mais portant les mêmes attributs adaptatifs ont pu être mis en évidence.

Les ICE_*SsaF1-4_fda* et ICE_*SsaF4-2_fda*, portés par les souches *S. salivarius* F1-4 et F4-2 respectivement, ont été sélectionnés pour l'évaluation de la fonctionnalité des ICE de cette espèce. ICE_*SsaF1-4_fda* partage la plus forte identité nucléotidique avec le module de conjugaison d'ICE*St3* de *S. thermophilus*, en plus de présenter des régulateurs putatifs Arp1, OrfQ et Arp2 également fortement apparentés à ceux d'ICE*St3*. ICE_*SsaF4-2_fda* présente également un module de conjugaison apparenté à ICE*St3*, en revanche celui-ci présente un module de régulation distant. L'excision de ces deux ICE, comme première preuve de leur fonctionnalité, a été mise en évidence par PCR suite à l'amplification des sites *attB* et *attI* correspondant respectivement au site chromosomique dépourvu d'élément, et au site représentatif de la forme circulaire excisée de l'élément.

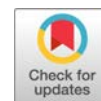
Les souches F1-4 et F4-2 portant les éléments ICE_*SsaF1-4_fda* et ICE_*SsaF4-2_fda* ont par la suite été utilisées en expérience de conjugaison sur filtre avec différentes souches réceptrices dont les souches de *S. salivarius* JIM8777 et F1-8 présentant toutes deux un site d'insertion *fda* dépourvu d'élément. F1-8 présente quant à elle un ICE de la sous-famille

ICE*St3* inséré à l'extrémité 3' du site d'insertion *rpmG* en accréition avec un IME. Le transfert d'ICE_*SsaF1-4_fda* et d'ICE_*SsaF4-2_fda* a été démontré vers ces deux souches, bien que leur fréquence de transfert soit proche de la valeur minimale du seuil de détection des transconjugants dans les conditions de laboratoire testées (fréquence inférieure à 10^{-8} transconjugants par cellules donatrices). Plusieurs paramètres en relation avec les conditions de culture ou le protocole de conjugaison ont été modifiés dans le but d'optimiser la détection des transconjugants qui est cependant restée inchangée.

Afin d'évaluer la capacité des ICE de *S. salivarius* à se transférer vers d'autres espèces, des expériences de conjugaisons sur filtre ont été réalisées avec des cellules réceptrices appartenant à l'espèce *S. thermophilus* et *E. faecalis*, également réceptrices d'ICE*St3* de *S. thermophilus*. Des transconjugants ont été obtenus pour chacune de ces réceptrices et la fréquence de transfert de ces ICE s'est avérée être inférieure à 10^{-8} transconjugants par cellules donatrices. Par ailleurs, le séquençage des sites *attR* du transconjugant *E. faecalis* a permis la localisation précise du site de coupure préférentiel de l'intégrase de l'élément.

L'impact de la mitomycine C (MMC), un agent endommageant l'ADN, sur l'excision et le transfert d'ICE_*SsaF1-4_fda* a également été évalué. Ainsi, le traitement des cellules porteuses de l'élément avec de la MMC a mis en évidence une augmentation de l'excision d'ICE_*SsaF1-4_fda* comme en témoignent les résultats de PCR semi-quantitatives. En revanche, l'utilisation de la MMC en expérience de conjugaison sur filtre ne provoque pas l'induction de transfert de l'élément contrairement à ce qui a été observé pour ICE*St3*.

La capacité des transconjugants obtenus chez *S. salivarius*, *S. thermophilus* et *E. faecalis* à retransférer ICE_*SsaF1-4_fda* a été testée lors des expériences de conjugaison sur filtre. Ainsi, le re-transfert d'ICE_*SsaF1-4_fda* à partir des transconjugants a été mis en évidence pour chacune de ces espèces avec une fréquence de transfert différente selon l'identité de la donatrice. Les transconjugants *S. salivarius* re-transfèrent ICE_*SsaF1-4_fda* à une fréquence proche de celle observée lors des expériences de conjugaison intra et inter-espèces, alors que celle-ci a été améliorée lors de l'utilisation en tant que donatrices des transconjugants *S. thermophilus* et *E. faecalis* (10^{-8} transconjugants par cellules donatrices).



Diversity of Integrative and Conjugative Elements of *Streptococcus salivarius* and Their Intra- and Interspecies Transfer

Narimane Dahmane,^a Virginie Libante,^a Florence Charron-Bourgoin,^a
Eric Guédon,^b Gérard Guédon,^a Nathalie Leblond-Bourget,^a  Sophie Payot^a

DynAMic, Université de Lorraine, INRA, Vandœuvre-lès-Nancy, France^a; STLO, Agrocampus Ouest, INRA, Rennes, France^b

ABSTRACT Integrative and conjugative elements (ICEs) are widespread chromosomal mobile genetic elements which can transfer autonomously by conjugation in bacteria. Thirteen ICEs with a conjugation module closely related to that of ICEst3 of *Streptococcus thermophilus* were characterized in *Streptococcus salivarius* by whole-genome sequencing. Sequence comparison highlighted ICE evolution by shuffling of 3 different integration/excision modules (for integration in the 3' end of the *fda*, *rpsl*, or *rpmG* gene) with the conjugation module of the ICEst3 subfamily. Sequence analyses also pointed out a recombination occurring at *oriT* (likely mediated by the relaxase) as a mechanism of ICE evolution. Despite a similar organization in two operons including three conserved genes, the regulation modules show a high diversity (about 50% amino acid sequence divergence for the encoded regulators and presence of unrelated additional genes) with a probable impact on the regulation of ICE activity. Concerning the accessory genes, ICEs of the ICEst3 subfamily appear particularly rich in restriction-modification systems and orphan methyltransferase genes. Other cargo genes that could confer a selective advantage to the cell hosting the ICE were identified, in particular, genes for bacteriocin synthesis and cadmium resistance. The functionality of 2 ICEs of *S. salivarius* was investigated. Autonomous conjugative transfer to other *S. salivarius* strains, to *S. thermophilus*, and to *Enterococcus faecalis* was observed. The analysis of the ICE-*fda* border sequence in these transconjugants allowed the localization of the DNA cutting site of the ICE integrase.

IMPORTANCE The ICEst3 subfamily of ICEs appears to be widespread in streptococci and targets diverse chromosomal integration sites. These ICEs carry diverse cargo genes that can confer a selective advantage to the host strain. The maintenance of these mobile genetic elements likely relies in part on self-encoded restriction-modification systems. In this study, intra- and interspecies transfer was demonstrated for 2 ICEs of *S. salivarius*. Closely related ICEs were also detected *in silico* in other *Streptococcus* species (*S. pneumoniae* and *S. parasanguinis*), thus indicating that diffusion of ICEst3-related elements probably plays a significant role in horizontal gene transfer (HGT) occurring in the oral cavity but also in the digestive tract, where *S. salivarius* is present.

KEYWORDS integrative and conjugative elements, *Streptococcus salivarius*, accretion, bacteriocin, cadmium resistance, conjugation, gene transfer, restriction-modification systems

Acquisition of genes by horizontal gene transfer (HGT) is a major driving force for evolution of bacterial genomes (1, 2). The main mechanism is conjugation, a process that enables transfer of large DNA fragments without requiring any similarity between sequences, thus being naturally broad host range (3). Besides conjugative transfer of extrachromosomal elements (plasmids), recent analyses have revealed that

Received 7 February 2017 Accepted 12 April 2017

Accepted manuscript posted online 21 April 2017

Citation Dahmane N, Libante V, Charron-Bourgoin F, Guédon E, Guédon G, Leblond-Bourget N, Payot S. 2017. Diversity of integrative and conjugative elements of *Streptococcus salivarius* and their intra- and interspecies transfer. Appl Environ Microbiol 83:e00337-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.00337-17>.

Editor M. Julia Pettinari, University of Buenos Aires

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

Address correspondence to Sophie Payot, sophie.payot-lacroix@inra.fr.

many integrated mobile elements, called integrative and conjugative elements (ICEs), also encode their own transfer by conjugation (4, 5). Like all other mobile genetic elements (MGEs) (6), ICEs have a modular structure. Three modules, a recombination module, a conjugation module, and a regulation module, together control and ensure the excision and transfer of the element (7). ICEs are able to excise from the bacterial chromosome generally by site-specific recombination, to transfer using their own conjugative machinery, and to integrate in the chromosome of a recipient cell (4, 5). Moreover, various ICEs can promote the transfer of large fragments of the bacterial chromosome by an Hfr-like mechanism (8). They can also mobilize nonautonomous integrated transferable elements such as (i) integrative and mobilizable elements (IMEs), genetic elements unrelated to ICEs that can excise and integrate from the chromosome but need to hijack the transfer machinery of a conjugative element, and (ii) *cis* mobilizable elements (CIMEs), elements that derive from ICEs and IMEs by deletion of the conjugation/mobilization and recombination modules but retain recombination sites *att* (4). In the latter case, an ICE that integrates in a recombination site of a CIME can mobilize the nonautonomous element by mediating the excision of the whole composite element (process of accretion-mobilization) (9, 10). The increase of bacterial genome sequencing projects in the last few years provides a remarkable opportunity to explore the pool of bacterial genetic mobile elements ("mobilome"). These *in silico* analyses revealed the high abundance of ICEs in bacteria (11–13). In addition to the genes involved in or controlling their mobility, ICEs also carry cargo genes, which can provide new properties (virulence and antibiotic resistance, for example) to the recipient cell (7).

Streptococcus salivarius is a member of the *Firmicutes* that is a major constituent of the human oral cavity microbiota (14) and is commonly detected in the human gastrointestinal tract in healthy individuals (15, 16). A few strains have also been associated with opportunistic infections, in particular, in cases of meningitis (17), endocarditis (18) and bacteremia in immunocompromised patients (19, 20). Analyses of *S. salivarius* genomes pointed out the considerable variability of gene content and the differences in adaptive traits (21). Evidence of widespread HGT was obtained in association with the presence of diverse MGEs (21) and the competence for natural transformation of the species (22).

We recently screened a collection of 138 strains of *S. salivarius* for the presence of MGEs (23). This led to the identification of 60 strains (belonging to 39 multilocus sequence type [MLST] groups) with a positive PCR signal for the relaxase gene of ICES_{t3}, an ICE previously characterized in the closely related species *Streptococcus thermophilus* (24–26). This indicated the presence in these strains of putative ICEs belonging to the ICES_{t3} subfamily. However, not all these strains showed a positive PCR signal for the ICES_{t3} integrase gene, which catalyzes the integration into the *fda* site. This suggested the presence of other recombination modules associated with the ICES_{t3} conjugation module in *S. salivarius* ICEs.

In this work, we selected 13 strains with different MLST patterns (including 6 strains with a negative PCR signal for the ICES_{t3} integrase gene) and sequenced their genomes in order to gain access to their ICE sequences. ICEs with a conjugation module closely related to the one in ICES_{t3} were searched in other NCBI database-available genomes of *S. salivarius* and in other genomes of *Firmicutes*. ICE sequences were compared and the putative functions encoded by their genes were analyzed *in silico*. Two putative ICEs from *S. salivarius* were analyzed experimentally to test their excision and their autonomous intraspecies and interspecies conjugative transfer.

RESULTS AND DISCUSSION

Diversity of integrative and conjugative elements of the ICES_{t3} subfamily identified in *S. salivarius* and in other streptococci. (i) Conjugation modules. To explore the diversity of the ICEs of the ICES_{t3} subfamily found in *S. salivarius*, 13 strains (F1-4, F1-8, F4-2, F6-1, B35, B57, L22, L50, L60, L64, N5, N20, and T93) with different MLST patterns were selected from a previous work (23) (Table 1). These strains likely

TABLE 1 Bacterial strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant phenotype or genotype	Source or reference
Strains		
<i>S. salivarius</i>		
B35	WT ^a strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily	23
B57	WT strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily	23
F1-4	WT strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily (ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i>)	23
F1-4(ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i>) Cm ^r	F1-4 carrying ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i> tagged with a Cm ^r cassette	This work
F1-8	WT strain carrying a putative ICE in accretion with an IME integrated in the 3' end of <i>rpmG</i> ; no element in <i>fda</i>	23
F1-8(pMG36e)	F1-8 carrying pMG36e, a plasmid conferring erythromycin resistance	This work
F4-2	WT strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily	23
F6-1	WT strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily	23
JIM8777	WT strain carrying a putative IME in the 3' end of <i>rpmG</i> and a putative CIME in the 3' end of <i>rpsL</i> ; no element integrated in the <i>fda</i> gene	57
JIM8777(pMG36e)	JIM8777 carrying pMG36e, a plasmid conferring erythromycin resistance	This work
L22	WT strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily	23
L50	WT strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily	23
L60	WT strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily	23
L64	WT strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily	23
N5	WT strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily	23
N20	WT strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily	23
T93	WT strain carrying a putative ICE of the ICESt3 subfamily	23
<i>S. thermophilus</i>		
CNRZ385(ICESt3cat)	CNRZ385 carrying ICESt3 with <i>cat</i> inserted in <i>orf385J</i> pseudogene; Cm ^r	24
LMG18311	WT strain with no element in <i>fda</i>	BCCM/LMG
LMG18311(pMG36e)	LMG18311 carrying pMG36e, a plasmid conferring erythromycin resistance	24
<i>E. faecalis</i>		
JH2-2	WT strain with no element in <i>fda</i>	58
JH2-2(pMG36e)	JH2-2 carrying the plasmid pMG36e, conferring erythromycin resistance	24
Plasmids		
pSET5s	pWV01-type thermosensitive replication origin from pVE6002; LacZ Cm ^r	59
pMG36e	3.6 kb, replication origin from pWV01; Ery ^r	49

^aWT, wild type.

carry an ICE of the ICESt3 subfamily, as suggested by a positive PCR signal for the ICESt3 relaxase gene (23). Their genomes were sequenced and assembled in order to gain access to their ICE sequences. Except for 2 ICEs (ICE_*SsaF6-1_rpsL* and ICE_*SsaB57_fda*) split into 2 contigs, the sequences of the ICEs appear on a single contig (Fig. 1). As shown in Fig. 1, ICEs found in these 13 *S. salivarius* strains all display a conjugation module that is closely related to that of ICESt3 from *S. thermophilus* (>90% nucleic sequence identity). ICEs with a closely related full-conjugation module were also detected in 2 genomes of *S. salivarius* available in the NCBI database (those of strains JF and 1270) (Fig. 1). The element of *S. salivarius* NCTC 8618 (GenBank accession number CP009913.1) also has a closely related full-conjugation module but is not shown in the figure since it harbors a truncated integrase gene and is therefore defective. Elements with a closely related conjugation module (partial in most of the genomes due to gaps in the assembly) were also detected in the genomes of strains GED7778A (GenBank accession number LRQ500000000), 140 (GenBank accession number JVSQ01000000), 20-02 S1 (GenBank accession number LXMBO0000000), 20-12 S2 (GenBank accession number LXMC00000000), and UC3162 (GenBank accession number JYOY01000000). These elements are not shown in Fig. 1 because their sequences are incomplete. ICEs with a closely related conjugation module (92 to 94% nucleic sequence identity with that of ICESt3) were also identified in the genome of *Streptococcus pneumoniae* 2842STDY5753514 (mitis group) and *Streptococcus parasanguinis* DD19 (sanguinis group) (Fig. 1). Phylogenetic analysis of the relaxase OrfJ (Fig. 2) and the coupling protein OrfK (Fig. 3) of these ICEs indicates that they group with OrfJ and OrfK from *S. salivarius* ICEs. Similar results were obtained for the other proteins of the conjugation module (data not shown). Taken as a whole, these phylogenetic analyses and sequence

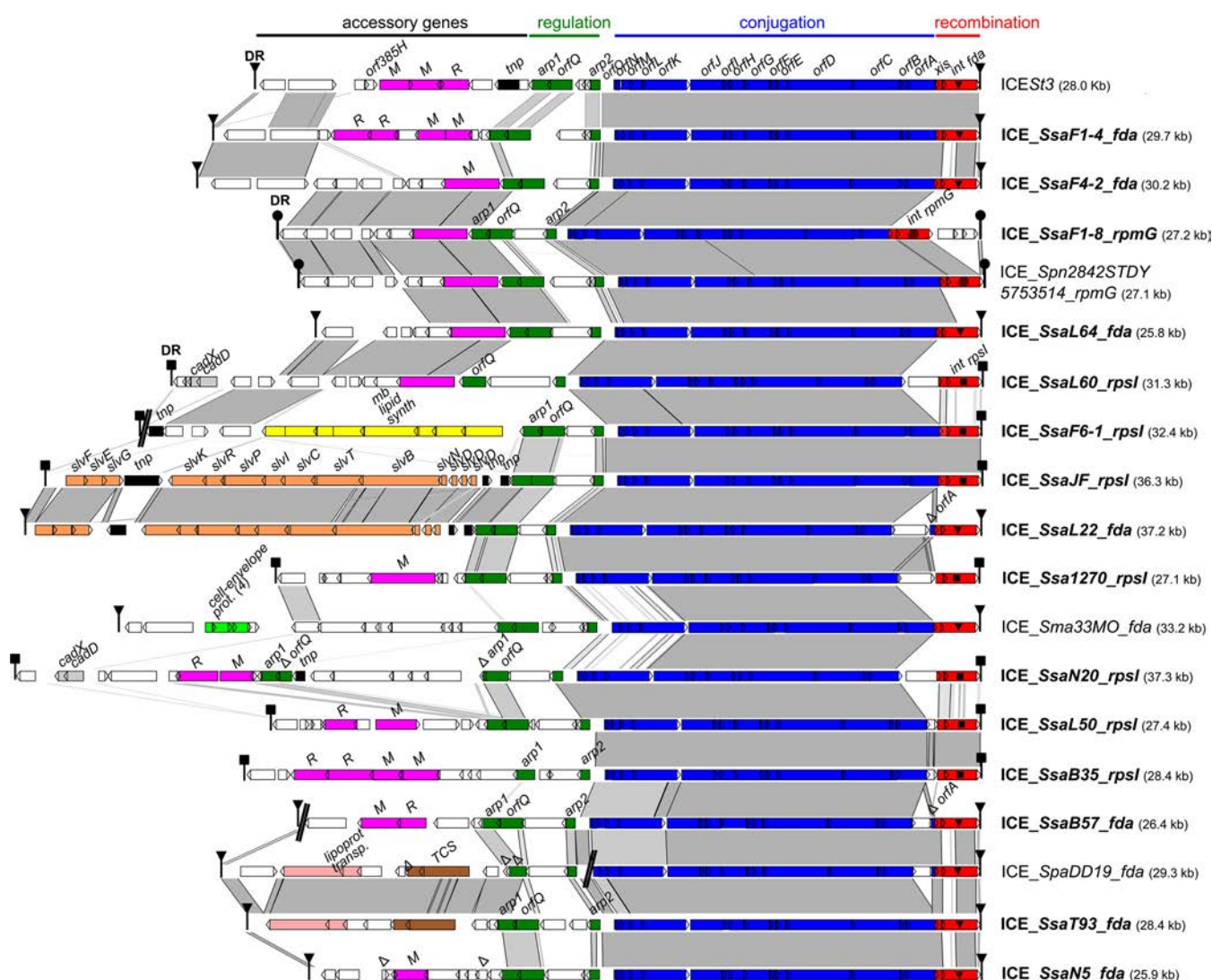


FIG 1 Comparison of the integrative and conjugative elements (ICEs) found in *S. salivarius* and in other streptococci. ICEs are named according to their host strains and integration sites. ICEs of *S. salivarius* are indicated in bold. For more clarity, elements in accretion with ICEs are not shown. Nucleic acid sequence identity higher than 80% between sequences is indicated in light gray and that higher than 90% in dark gray. Direct repeats (DR) delimiting ICEs are shown as triangles, circles, or squares depending on their sequences. Open reading frames (ORFs) appear as arrows (truncated genes are indicated by capital deltas). Modules of recombination (integrase [*int*] and excisionase [*xis*] genes), conjugation (*orfO* to *orfA* genes), and regulation (including the *arp1*, *arp2*, and *orfQ* genes) appear in red, blue, and green, respectively. The three different integration genes (*fda*, *rpsI*, or *rpmG*) targeted by the integrase are indicated by distinct symbols in the integrase gene and are part of the ICE name. Genes from the adaptation module encoding proteins with putative function inferred from *in silico* analysis are indicated in pink for RM systems and orphan methyltransferase genes, in dark gray for cadmium resistance genes (*cadD* and *cadX*), in yellow for the membrane lipid synthesis cluster, in orange for the bacteriocin synthesis cluster, in light green for genes encoding cell envelope proteins, in light pink for the cluster of genes for putative lipoprotein transport, in brown for the two-component system (TCS), and in black for the *tnp* transposase gene(s). Sequences used for this analysis were ICEst3 of *S. thermophilus* (AJ586568) and sequenced genomes of *S. pneumoniae* 2842STDY5753514 (FDNK01000013), *S. macedonicus* 33MO (JNCV01000015), and *S. parasanguinis* DD19 (LQNY01000339, LQNY01000340). Gaps in the assembly found in ICE_SsaF6-1_rpsI, ICE_SsaB57_fda, and ICE_SpaDD19_fda are indicated by a double slash.

comparisons clearly showed that transfers of ICEs closely related to ICEst3 have occurred between distinct species from different streptococcal groups.

The comparison of the clustering groups obtained for the relaxase (OrfJ) and the coupling protein (OrfK) indicated that OrfJ of ICE_Sma33MO_fda is closely related to the relaxases of ICEst3 and *S. salivarius* ICEs, whereas OrfK is clearly different from the coupling proteins of these ICEs but is closer to that of ICE_SparauNCFD2020_rpsI (see phylogenetic trees in Fig. 2 and 3). Nucleic sequence alignments indicated that the left extremity of the conjugation module (including the *orfN* to *orfK* genes) of ICE_Sma33MO_fda is closely related to the corresponding sequence of ICE_SparauNCFD2020_rpsI (86% nucleic sequence identity compared to 64% nucleic sequence identity with the correspond-

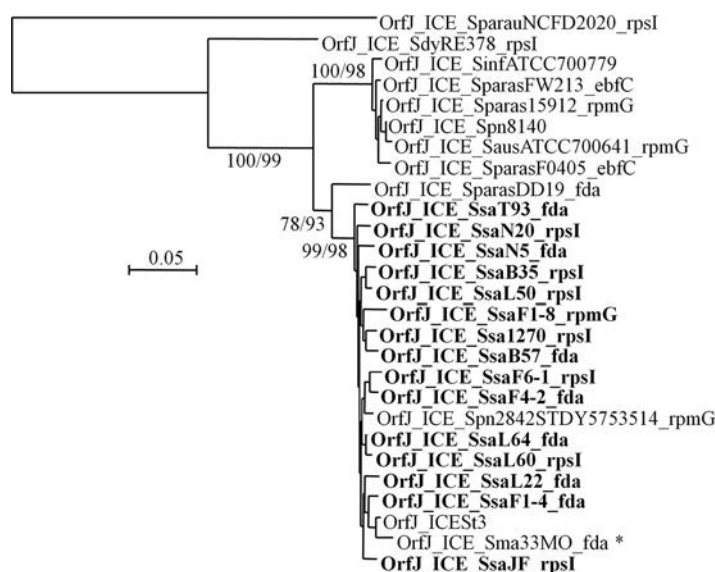


FIG 2 Phylogenetic BioNJ tree obtained for relaxases (OrfJ) of ICEs belonging to the ICESt3 subfamily. The relaxase protein sequence of 27 ICEs (the 19 ICEs of the ICESt3 subfamily with closely related conjugation modules and 8 additional ones previously reported to belong to the same ICE subfamily but showing more distantly related conjugation modules) were included in the analysis. ICEs of *S. salivarius* are indicated in bold, and *ICE_Sma33MO_fda* is indicated by an asterisk. Bootstrap values supporting main branches are given for BioNJ and ML, respectively.

ing genes of ICESt3), whereas the right extremity of the conjugation module of *ICE_Sma33MO_fda* (corresponding to the *orfJ* to *orfA* genes) is closely related to those of ICESt3 (96% nucleic sequence identity compared to 64% nucleic sequence identity with the corresponding genes of *ICE_SparauNCFD2020_rpsI*) and *S. salivarius* ICEs. The putative *nic* site of the transfer origin of ICEs of the ICESt3 subfamily, predicted by comparison with the *oriT* characterized for ICEB51 of *Bacillus subtilis* (27), is located between the *orfK* and *orfJ* genes (Fig. S1 in the supplemental material). Sequence alignment of this region indicated that the drop in nucleic sequence identity between

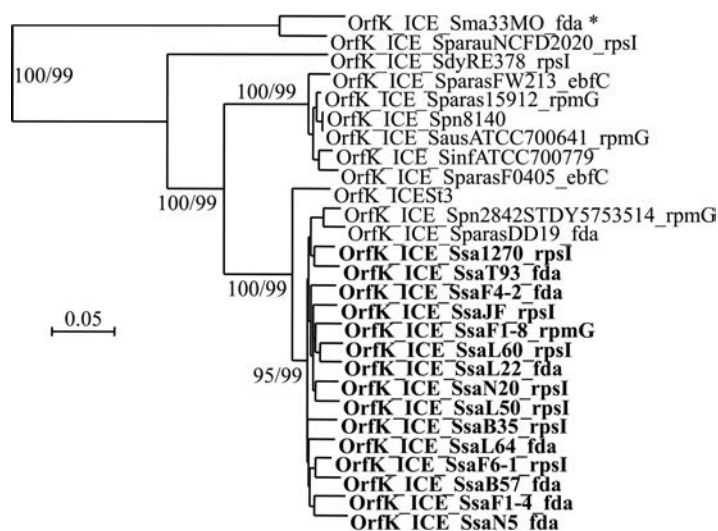


FIG 3 Phylogenetic BioNJ tree obtained for coupling proteins (OrfK) of ICEs of the ICESt3 subfamily. The sequence of the coupling protein of 27 ICEs (the 19 ICEs of the ICESt3 subfamily with closely related conjugation modules and 8 additional ones previously reported to belong to the same ICE subfamily but showing more distantly related conjugation modules) were included in the analysis. ICEs of *S. salivarius* are indicated in bold, and *ICE_Sma33MO_fda* is indicated by an asterisk. Bootstrap values supporting main branches are given for BioNJ and ML, respectively.

ICE_*Sma33MO_fda* and ICE_*SparauNCFD2020_rpsl* occurs at the *nic* site (Fig. S1 in the supplemental material). This suggests that a recombination event occurred at *oriT* in ICE_*Sma33MO_fda*. This *oriT* recombination was likely mediated by the relaxase of the ICE, which is able to recognize and nick this sequence. Such *oriT* site-specific recombination has already been demonstrated for several canonical relaxases of plasmids (belonging to the MobF, MobP, MobC, and MobM families) (4, 28, 29) and has been suggested to occur in ICEs of the SXT/R391 family and for ICE_{cl} (both encoding canonical relaxases of the MobH family) (30, 31). This mechanism that enables creation of hybrid ICEs could thus also be mediated by relaxases of the noncanonical MobT family, which are related to rolling circle replication initiators and are found in ICEs of the Tn916/ICESt3/ICEBs1 family, a family of ICEs widespread in streptococci (11) and other *Firmicutes* (5).

(ii) Integration modules. ICESt3 conjugation modules found in *S. salivarius* ICEs are associated with 3 different recombination modules (see Fig. S2 in the supplemental material) enabling integration of the corresponding ICEs in the 3' ends of three different genes: *fda* (encoding the fructose-1-6-diphosphate aldolase, as for ICESt3), *rpsl* (encoding the S9 ribosomal protein), and *rpmG* (encoding the L33 ribosomal protein). This confirms our previous results showing a positive PCR signal for the ICESt3 relaxase gene but not for the ICESt3 integrase gene for 22 strains (23). Closely related integrases were found in ICEs of *S. salivarius* strains that are distant in the phylogenetic tree built on the basis of MLST data (for example, in strains F1-4, L22, and N5 or in strains B35 and L50) (23) but also in ICEs found in other species (for example, in *S. pneumoniae* 2842STDY5753514 or in *S. parasanguinis* DD19 and *S. macedonicus* 33MO) (Fig. S2 in the supplemental material). This is in agreement with the previously reported exchanges of recombination modules in the ICESt3 subfamily (11, 26).

(iii) Regulation modules. Comparison of the regulation modules of all ICEs of the ICESt3 subfamily showed their high diversity (Fig. 1). The only common characteristic is the presence, in most of the ICEs, of homologs of the *arp1*, *orfQ*, and *arp2* genes. This strongly suggests that these genes participate in the same regulation cascade and likely interact or interfere with each other. Exceptions are ICE_*SsaL60_rpsl*, devoid of the *arp1* gene; ICE_*SsaB35_rpsl*, lacking the *orfQ* gene; and ICE_*SpaDD19_fda*, carrying truncated *arp1* and *orfQ* genes. ICE_*SsaN20_rpsl* also displays a peculiar regulation organization, with full copies of the *arp1* and *orfQ* genes separated by truncated copies of the *orfQ* and *arp1* genes. This is due to an insertion of genes (including one encoding a transposase) in this region of the ICE (Fig. 1). The *arp1*, *orfQ*, and *arp2* genes encode, respectively, a *ci*-related repressor, an ImmA-related putative protease (32), and a putative transcriptional regulator (33) that are related to those of ICESt3 from *S. thermophilus* (26, 34). Arp1 and Arp2 homologs all share an N-terminal helix-turn helix PF01381 domain that is found in several regulatory proteins, including Cro and *ci* regulators of the λ phage. Arp1 proteins also display a C-terminal PF00717 peptidase S24-like domain involved in the autocleavage of the *ci* repressor induced by DNA damage. OrfQ homologs are characterized by a COG2856 Zn-dependent peptidase ImmA domain, also found in the ImmA protease of ICEBs1 of *B. subtilis* that cleaves the ImmR repressor in response to DNA damage (32). A high diversity is observed in the nucleotide (Fig. 1) and amino acid primary sequences of the encoded regulators. Divergences of up to 45%, 58%, and 53% were observed between the sequences of the Arp1, OrfQ, and Arp2 proteins encoded by ICEs of *S. salivarius*. If considering only the ICEs that harbor the *arp1*, *orfQ*, and *arp2* genes, the sequence divergence goes from 5 to 37% for Arp1, 7 to 58% for OrfQ, and 7 to 37% for Arp2.

In support of a modular evolution of ICEs that was already noticeable from the exchanges in the recombination modules mentioned previously, some ICEs harbor regulators which are distantly related to those found in the other ICEs of *S. salivarius* despite having a closely related conjugation module (deduced from the phylogenetic trees of relaxases and coupling proteins). This is the case for ICE_*SsaF4-2_fda*, which has a conjugation module closely related to the one of ICESt3 (94% nucleic sequence

identity over the whole conjugation module) but encodes more distant regulators (with 63, 46, and 73% amino acid identity with those encoded by ICEst3 for Arp1, OrfQ, and Arp2, respectively).

Furthermore, all the regulation modules include additional genes (1 to 3 depending on the ICE) between the *arp2* and *orfQ* genes. These genes that encode proteins of unknown function contribute to the diversity of the regulation modules.

(iv) Accretions. Accretion of ICEs with other genetic elements was observed: ICEs of strains F1-8 and L60 were in accretion with a putative IME, whereas those of strains F6-1 and L50 were adjacent to 1 or 2 CIMEs (data not shown).

Evidence of accretion or recombination events was also found in the sequences of several ICEs of *S. salivarius*. A truncated supplementary copy of the *orfA* gene was found between *orfA* and the excisionase genes in the ICEs of *S. salivarius* L22 and B57 and in the closely related ICE found in *S. parasanguinis* DD19. The presence of supplementary truncated *arp1* and *orfQ* genes and of a transposase gene was also detected in the regulation module of *S. salivarius* N20 ICE. These structures could result (i) from the integration of an ICE within an *att* site flanking a resident element (accretion) or (ii) from recombination between ICEs, followed by internal deletion(s) in both cases. These mechanisms contribute to the plasticity and evolution of ICEs and potentiate gene transfer mediated by these MGEs.

Cargo genes found on ICEs of the ICEst3 subfamily in *S. salivarius* and other streptococci. A diversity of cargo genes was found in the left part of the ICEs of the ICEst3 subfamily, explaining the variation of their size ranges: from 25.8 kb for the smallest one (ICE_*SsaL64_fda*) to 37.3 kb for the largest one (ICE_*SsaN20_rpsI*) (Fig. 1). The 2 closely related strains included in the analysis (L22 and L64) harbor ICEs with unrelated cargo genes (Fig. 1). In addition, ICEs found in unrelated strains of *S. salivarius* (for example, in strains JF and L22 or F4-2 and F1-8) or in different species (in *S. salivarius* T93 and *S. parasanguinis* DD19) harbor the same cargo genes (Fig. 1). This distribution is due to the horizontal transfer of these genes (exchange of module between ICEs or transfer of the whole ICE).

Two-thirds (13/19 if including ICEst3 [35]) of the ICEs analyzed in this work carry a restriction-modification (RM) system ($n = 6$) or an orphan methyltransferase ($n = 7$) (Fig. 1). This is in accordance with a previous study indicating that the abundance of RM systems correlates with the presence of MGEs in small genomes (36). RM systems were first described as bacterial innate immune systems allowing protection against foreign unmethylated DNA (37). Unmethylated incoming DNA is degraded by restriction enzymes produced by the cell, while the genome of the host remains protected due to methylation by the cognate methyltransferase. RM systems carried by ICEs of *S. salivarius* could protect their host from invasion by other genetic elements such as phages, thus playing a role in “cellular defense” as described for other bacteria (38–40). RM systems also turn out to be selfish mobile elements themselves (41). RM systems that carry the restriction enzyme activity and modification enzyme activity on separate proteins (as observed for the ICEs of the ICEst3 subfamily) can have an impact on the maintenance of the MGEs carrying them (mechanism of genetic addiction). The MGE encodes the poison endonuclease activity and its “antidote,” the methyltransferase (37). Postsegregational killing would occur if the whole RM system was lost. Dilution of the modification enzyme by cell division will lead to the exposure of unmethylated recognition sites on newly replicated chromosomes that will be targeted by the restriction enzyme. Only a few remaining molecules of restriction enzymes are sufficient to kill the cell. Concerning orphan methyltransferases (encoded by 7 of the ICEs of the ICEst3 subfamily analyzed in this work), if these enzymes target the same DNA sequence as a resident RM system, they could protect the host from postsegregational killing, thus participating in the displacement of the resident MGE (42).

Two ICEs found in *S. salivarius* L60 and N20 carry a cadmium resistance cluster (*cadD-cadX*) (Fig. 1). Cadmium is a widespread heavy metal air pollutant which is commonly released into the environment from industrial processes (in particular, glass

manufacturing) and urban activities, as well as from the widespread application of fertilizers, manures, and sewage sludge (43). The *cadD-cadX* genes also appear in a CIME in accretion with the ICE from strains F6-1 and L50 (data not shown). In the latter ones, full recombination sites are still present and thus the CIME and the ICE are considered separately. In these strains, the whole CIME-ICE composite element could excise and transfer by a process of accretion-mobilization already demonstrated with other ICEs of this family (9, 10). Sequence comparison revealed 98% nucleic acid identity over 2,683 bp between the CIME located upstream of the ICE in strain L50 and the region that includes *cadD-cadX* genes in ICE_*SsaL60_rpsI*. This suggests that in strain L60 the cadmium resistance cluster was acquired by the ICE after deletion of the recombination site delimiting the ICE and the adjacent CIME. This mechanism contributes to the plasticity and evolution of ICEs as previously suggested (4).

ICE_*SsaF6-1_rpsI* carries a cluster of genes (10.8 kb) that could be involved in membrane lipid synthesis. It includes, in particular, a *fabF*-like gene encoding a beta-ketoacyl (acyl carrier protein) synthase II (KASI/Ilcd00834 domain, with an E value of $1.4e-144$) and a KBL-like gene encoding a serine palmitoyltransferase involved in sphingolipid synthesis (cd06454 domain, with an E value of $3.7e-151$).

Two ICEs (found in the unrelated strains *S. salivarius* JF and L22) harbor a closely related cluster of genes (*slv* cluster; 15.7 to 15.9 kb) involved in the biosynthesis of a bacteriocin (salivaricin D). These clusters differ from the one previously described for the commensal strain 5M6c of *S. salivarius*, isolated from a healthy infant (44), by the number of copies of the *slvD* structural gene (2 and 3 identical copies, respectively, compared to 1 in strain 5M6c). Salivaricin D is a nisin-like lantibiotic with a broad spectrum that includes a large array of Gram-positive bacteria, in particular, the important pathogens *S. pneumoniae* and *S. pyogenes* (44). Thus, it could be used as a potential weapon, for commensal species of the oral cavity such as *S. salivarius*, to compete with oronasopharynx-colonizing streptococci, including pathogens (44–46). Bacteriocins could act as an addiction system by killing neighboring cells that do not encode resistance to the bacteriocin and thus contribute to the maintenance of the MGE in the population (47).

The ICE found in *S. macedonicus* 33MO carries genes that encode cell envelope proteins: one with a PF03780 domain with cell envelope-related function ($E = 7.93e-23$) and three membrane proteins. Lastly, ICEs of *S. salivarius* T93 and *S. parasanguinis* DD19 harbor the same cargo genes, in particular, (i) a two-component system with a signal transduction histidine kinase (nitrate/nitrite-specific COG3850 NarQ domain, $E = 5.3e-13$) and a NarL DNA-binding response regulator (COG2197 domain, $E = 6.1e-48$) and (ii) a cluster of genes encoding a putative LolCDE complex which catalyzes the release of lipoproteins from the cytoplasmic membrane (LolC PF13521 AAA_28 domain, $E = 1.2e-09$; LolD cd03255 ABC_MJ0796_LolCDE_FtsE domain, $E = 1.2e-108$; and LolE COG4591 domain, $E = 4.4e-14$) (Fig. 1).

Excision testing of 2 putative ICEs: ICE_*SsaF1-4_fda* and ICE_*SsaF4-2_fda*. Experiments were carried out to test the functionality of 2 putative ICEs of *S. salivarius*. The first one, ICE_*SsaF1-4_fda*, has a conjugation module showing the highest percentage of identity with that of ICEst3 of *S. thermophilus*, an ICE whose transfer was previously demonstrated (24) (Fig. 1). Arp1, OrfQ, and Arp2 regulators encoded by this ICE are also closely related to those of ICEst3 (85, 71, and 84% amino acid identities, respectively). As mentioned before, the second one, ICE_*SsaF4-2_fda*, has a conjugation module closely related to ICE_*SsaF1-4_fda* and ICEst3 but harbors a distantly related regulation module.

Excision of these 2 ICEs was tested by PCR. Amplifications were obtained for *attI* and *attB*, corresponding to the circular excised form and the empty chromosomal site, respectively, indicating the functionality of their recombination module. Recombination sites (*attL* and *attR*) flanking the ICEs were also amplified (data are shown only for ICE_*SsaF1-4_fda* [Fig. 4; Table 2]).

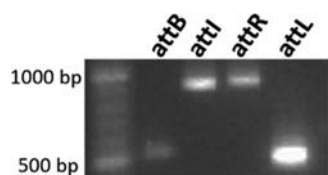


FIG 4 PCR detection of integrated and excised forms of ICE_*SsaF1-4_fda*. The sizes of the PCR fragments obtained for the amplification of the *attB*, *attI*, *attR*, and *attL* sites (586 bp, 887 bp, 900 bp, and 523 bp, respectively) were confirmed by parallel migration of a DNA ladder. The primer pairs used for these amplifications are listed in Table 2.

Test of intraspecies conjugative transfer of 2 putative ICEs of *S. salivarius*. Both ICE_*SsaF1-4_fda* and ICE_*SsaF4-2_fda* were first tagged by a chloramphenicol resistance cassette (Table 1). Donor strains were then used in filter mating experiments with two *S. salivarius* recipient strains: JIM8777 and F1-8, displaying different genotypes (Table 1 and 3). Both strains carry an empty *fda* integration site, and strain F1-8 carries an ICE belonging to the ICESt3 subfamily (Fig. 1) in accretion with an IME integrated in the 3' end of *rpmG*. Some putative transconjugants were recovered when *S. salivarius* JIM8777 or F1-8 was used as the recipient (Table 3). After subculturing, transconjugants were confirmed by detection of the integrase gene (data are shown only for ICE_*SsaF1-4_fda* [Fig. 5a and b]). For JIM8777 derivative clones, this screen was combined with detection of the pMG36e plasmid and random amplification of polymorphic DNA (RAPD) (Fig. 5a). F1-8 transconjugants were confirmed by sequencing of an MLST locus (*ddlA* gene). The site-specific insertion in the *fda* gene and the excision of the newly acquired ICEs were also confirmed by the PCR detection of *attL*, *attR*, *attI*, and *attB* sites for both F1-8 (data are shown only for ICE_*SsaF1-4_fda* [Fig. 5c]) and JIM8777 (data not shown). This suggests that the elements are still active in these transconjugants (at least for excision).

Mating experiments were repeated with at least 3 different cultures of donor and recipient cells (biological repetitions) but very few transconjugants (2 clones for the whole experiment) were obtained, thus preventing any calculation of transfer frequency. Attempts to increase ICE_*SsaF1-4_fda* transfer frequency were made: (i) testing of different media (milk, brain heart infusion [BHI], mitis, and M17 broth with 1% final glucose instead of 0.5% final lactose); (ii) testing of different donor/recipient ratios ranging from 1:1, 2:1, 10:1, and 50:100 to 100:1; and (iii) mixing of donor and recipient at the end of exponential growth phase or stationary phase instead of mid-exponential phase. None of the tested conditions enabled an increase in transfer frequency, which remained inferior to 10^{-8} transconjugants per donor cells.

Testing of interspecies conjugative transfer of ICEs of *S. salivarius*. To evaluate ICE interspecies transfer, mating assays were carried out with two other *Firmicutes* as recipients: the closely related species *S. thermophilus* and *Enterococcus faecalis*. Recipient strains were *S. thermophilus* LMG18311 and *E. faecalis* JH2-2, both carrying pMG36e and described as recipients strains of ICESt3 from *S. thermophilus* (transfer frequency of $3.4 \times 10^{-6} \pm 0.5 \times 10^{-6}$ and $3.9 \times 10^{-7} \pm 0.9 \times 10^{-7}$, respectively [24]). Some putative transconjugants (2 clones for the whole experiment) were recovered when using strains F1-4 or F4-2 as donors in mating experiments (Table 3) and confirmed by PCR detection of the ICE integrase gene (data are shown only for ICE_*SsaF1-4_fda* [Fig. 6]). The genetic background of LMG18311 was confirmed by PCR amplification of the internal transcribed spacer (ITS) followed by HaeIII DNA digestion, which allows discrimination of *S. salivarius* strains and *S. thermophilus* LMG18311 (data are shown only for ICE_*SsaF1-4_fda* [Fig. 6a]). The genetic background of JH2-2 was confirmed by the PCR amplification of the ITS and by the amplification of *fda* gene with primers specific to *E. faecalis* (data are shown only for ICE_*SsaF1-4_fda* [Fig. 6b]).

ICE_*SsaF1-4_fda* carries 27 bp showing identity with the 3' end of the *fda* gene of *S. salivarius* (Fig. 7). This sequence (present in *attI*) enables specific recombination with the chromosomal integration site of the recipient cell (*attB* site) and generates a 27-bp

TABLE 2 Primers used in this work

Primer use	Primer name	Sequence (5'–3')	Reference
ICE labeling	F1-4 CDS7 F	GAGATTGAGCATATCCTTCC	This study
	F1-4 CDS8 R_Bis	GGTGACTAGTTATCTACACGCGAGATTCGTGGACTAACTT	
	F1-4 CDS9 F_Bis	CCATATCCTTCTTTTCTGCTCACTATCTTGTCGTTTGT	
	F1-4 CDS9 R	GGAGAGTTTAGCTGGGAGG	
	ICE F4-2 fragment I_F	GGAAATATCCTGTTGTCATC	
	ICE F4-2 fragtl_R-catbis	GGTGACTAGTTATCTACACGCCTATAAAGTTGTTAAGTTCACCT	
	ICE F4-2 fragtlI_F-catbis	CCATATCCTTCTTTTCTGGCGTGAATTGAAGAGTGA	
	ICE F4-2 fragment II_R	GTCTAAACTGAGCCAAGAAG	
	Cat_F	GCCTCCTAAATTCACCTTAG	
	Cat_R	GTAAAAAGTACAGTCGGCAT	
Detection of ICE integrated and excised forms <i>attB</i> amplification			23
	attBfdaSsal	GCCCAACCAAATAACACTAAA	
	attB ST3 Rev	CTCTTCGACCCACGTAAATTC	23
	<i>attI</i> amplification		
	intST3 For	AGGGCTTTCTGACGAATTAG	This study
	attI ST3 Rev	CGGTGTAATGGGAAGTATGG	
	<i>attL</i> amplification		23
	attL Rv CDS gwIG	CGGTGTAATGGGAAGTATGG	
	attBfdaSsal	GCCCAACCAAATAACACTAAA	23
	<i>attR</i> amplification		
Integrase gene	intST3 for	AGGGCTTTCTGACGAATTAG	35
	intICEst3-fdaRev	ACCAGGTTTCGATGCTATTACAG	
	intST3 for	AGGGCTTTCTGACGAATTAG	23
	intST3 Rev	GAGTTCTAATAACTGAGGCTA	
Semiquantitative PCR <i>attI</i> amplification			This study
	intICEF1-4 For	AGGTCTTTCTGACGAATTAG	
	attICEF1-4 Rev	CGGCGTAATGGGAAGTATGG	23
	<i>attB</i> amplification		
	attBfdaSsal	GCCCAACCAAATAACACTAAA	This study
	attB ST3 Rev	CTCTTCGACCCACGTAAATTC	
<i>fda</i> amplification	Fda1	TTCAAGAATTTACGTGGG	56
	Fda2	AGATGCTAAAGCTATGGTTG	
Donor/recipient discrimination ITS16S/23S	16SITS	TTGTACACACCGCCCGTCA	24
	23SITS	GGTACCTTAGATGTTTCAGTTC	
	<i>ddlA</i> gene		60
	ddlA up	TCAAGTGTGGCTATGGA	
<i>E. faecalis fda</i> -specific amplification	ddlA dn	GTAGATGGCTCCATCCTC	24
RAPD	Efa fba1b	ATGTGTTCTTCTGCATCTTT	56
	Efa fba2	CCCATTGATTACGATTTT	
pMG36e	XD9	GAAGTCGTCC	24
	pMG36e Fwd	GCCTCCTCATCCTCTTCAT	
	pMG36e_R	ACAGAACCGTTTCTACTCAATGAAC	This study

imperfect direct repeat (DR) in intraspecies transconjugants (Fig. 7). Sequencing of the *attR* site obtained after integration of ICE_*SsaF1-4_fda* in *E. faecalis* JH2-2 recipient cells provided relevant information on the DNA localization of one cutting site of *fda* integrase. This *attR* site is a hybrid between the sequence found in the *attI* of ICE_*SsaF1-4_fda* and the *attB* of *E. faecalis* JH2-2 recipient cells. Since the *attB* sequence

TABLE 3 Mating pairs tested in filter experiments

Type of transfer	Donor cells with AB ^{ra}	Recipient cells with AB ^{ra}
Intraspecies transfer	F1-4(ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i>) Cm ^r	JIM8777(pMG36e) Ery ^r
		F1-8(pMG36e) Ery ^r
	F4-2(ICE_ <i>SsaF4-2_fda</i>) Cm ^r	JIM8777(pMG36e) Ery ^r
		F1-8(pMG36e) Ery ^r
Interspecies transfer	F1-4(ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i>) Cm ^r	LMG18311(pMG36e) Ery ^r
		JH2-2(pMG36e) Ery ^r
	F4-2(ICE_ <i>SsaF4-2_fda</i>) Cm ^r	LMG18311(pMG36e) Ery ^r
		JH2-2(pMG36e) Ery ^r
ICE retransfer from transconjugants	F1-8(ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i>) Cm ^r	F1-8(pMG36e) Ery ^r
		LMG18311(pMG36e) Ery ^r
	LMG18311(ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i>) Cm ^r	LMG18311(pMG36e) Ery ^r
	JH2-2(ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i>) Cm ^r	JH2-2(pMG36e) Ery ^r

^aAB^r, antimicrobial resistance of the strain.

in the recipient strains is different from the *attI* of ICE_ *SsaF1-4_fda* (Fig. 7), the presence of a T nucleotide at position 20 of the DR in the *attR* of the transconjugants, as in ICE_ *SsaF1-4_fda*, indicates that integrase cuts downstream of this nucleotide to allow strand exchange during recombination. Previous work aimed at studying CIME-ICE accretion also identified the same cutting position as well as the position of a second staggered cutting site located 6 bp downstream (Fig. 7) (48).

Intra- and interspecies conjugative transfer of two different ICEs found in *S. salivarius* was observed under laboratory conditions. These ICEs could thus play a significant role in HGT occurring both in the oral cavity (as exemplified by the presence of a closely related ICE in *S. parasanguinis*) and in the digestive tract.

Impact of MMC on excision and transfer of ICE_ *SsaF1-4_fda*. Previous work demonstrated that excision and transfer of ICEst3 of *S. thermophilus* can be increased by treating donor cells with mitomycin C (MMC) (34). Hence, we examined the impact of such treatment on excision and transfer of an ICE from *S. salivarius* (ICE_ *SsaF1-4_fda*). Induction of ICE excision by MMC was tested by PCR amplification of *attI* and *attB* fragments using different amounts of genomic DNA (0.1 µg to 1 pg) after MMC treatment or not of the cells (Fig. 8). The minimal quantity of DNA producing a positive result for *attI* and *attB* was 0.1 ng for nontreated cells, whereas 10 pg of DNA was sufficient to detect a signal after MMC treatment of the cells (Fig. 8). Furthermore, when

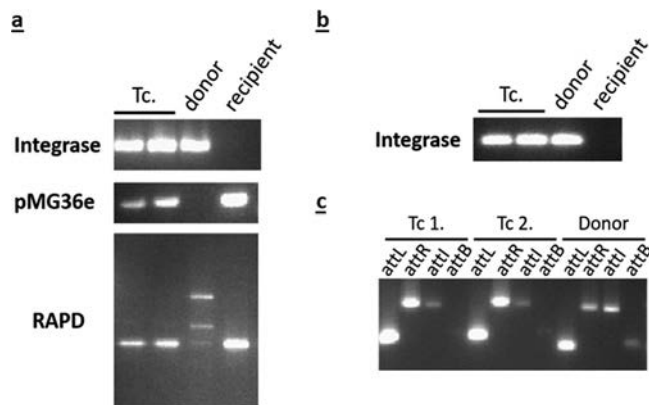


FIG 5 Characterization of transconjugants carrying ICE_ *SsaF1-4_fda* after intraspecies transfer. F1-4(ICE_ *SsaF1-4_fda*) was used as the donor in mating experiments with JIM8777(pMG36e) (a) and F1-8(pMG36e) (b and c) as recipients. Tc, transconjugants; integrase, amplification of the integrase gene of ICE_ *SsaF1-4_fda*; pMG36e, amplification of an internal fragment of the pMG36e plasmid; RAPD, random amplification of polymorphic DNA; *attL*, *attR*, *attI*, and *attB*, amplification of fragments carrying these attachments sites in F1-8 transconjugants. The primer pairs used for these amplifications are listed in Table 2.

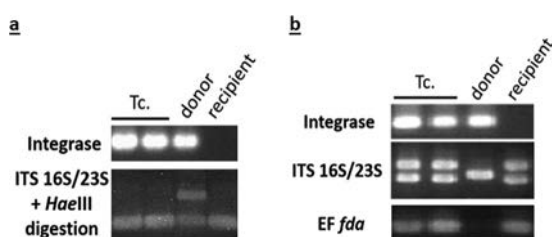


FIG 6 Characterization of transconjugants carrying ICE_ *SsaF1-4_fda* after interspecies transfer. F1-4(ICE_ *SsaF1-4_fda*) was used as the donor in mating experiments with LMG18311(pMG36e) (a) and JH2-2(pMG36e) (b) as recipients. Tc, transconjugants; integrase, amplification of the integrase gene of ICE_ *SsaF1-4_fda*; ITS16S/23S, amplification of the internal transcribed spacer; ITS16S/23S+HaeIII digestion, amplification of the internal transcribed spacer followed by HaeIII digestion of the obtained fragment; EF *fda*, amplification of *fda* fragment using *E. faecalis*-specific primers.

cells were treated with MMC, a higher intensity of the PCR signal was observed for *attI* and *attB* using 0.1, 1, and 10 ng of DNA than in cells without MMC treatment (Fig. 8). Such a difference was not observed for the *fda* control (Fig. 8). Thus, as for ICEst3 (34), MMC treatment leads to an increase of ICE_ *SsaF1-4_fda* excision.

To evaluate the effect of MMC on ICE transfer, strain F1-4 was treated with MMC (at the concentration inducing the maximum level of ICE excision) and used in filter mating experiments with *S. salivarius* strain F1-8 as the recipient. No difference of ICE transfer was detectable between cells treated or not with MMC. This is in contrast to what was observed for ICEst3 (34). Thus, it appears that for ICE_ *SsaF1-4_fda* excision is not a limiting step for transfer.

Retransfer of ICE_ *SsaF1-4_fda* from transconjugants. To test whether ICE_ *SsaF1-4_fda* transfers autonomously, retransfer was tested by using transconjugants (obtained as described above) as donor cells. Plasmid pMG36e was removed by curing transconjugants prior to the retransfer assays. F1-8(ICE_ *SsaF1-4_fda*) cells were used as donor cells in filter mating experiments with either F1-8(pMG36e) or LMG18311(pMG36e) cells as recipient

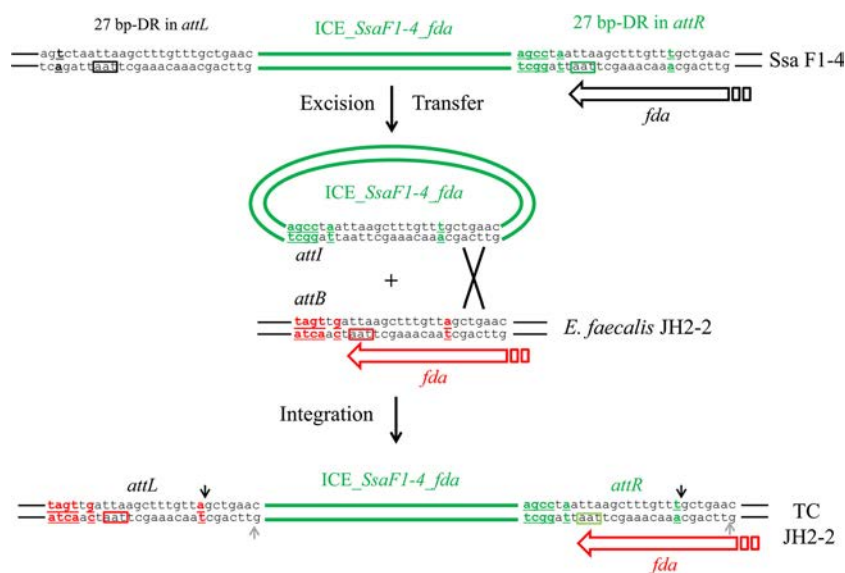


FIG 7 Localization of the DNA cutting site of integrase by sequencing of the *attR* site in *E. faecalis* JH2-2 transconjugants. ICE_ *SsaF1-4_fda* is shown in green in its integrated form in donor *S. salivarius* strain F1-4 (top), its excised form (middle), and its integrated form in *E. faecalis* JH2-2 recipient strain after transfer and integration (bottom). Nucleotide differences in *att* sequences are indicated in green for ICE_ *SsaF1-4_fda* and in red for *E. faecalis* JH2-2. The position of the DNA cutting site of integrase deduced from this analysis is indicated by a black arrow. Previous work aimed at studying CIME-ICE accretion also identified the same cutting position as well as the position of a second staggered cutting site located 6 bp from the first one (indicated in gray) (48).

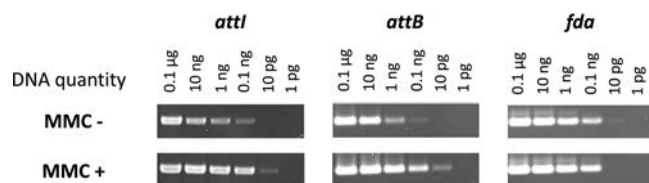


FIG 8 Impact of mitomycin C on ICE_*SsaF1-4_fda* excision. Fragments corresponding to the recombination sites *attB* and *attI* of nontreated (MMC–) or treated (MMC+) cells were amplified by PCR using template DNA quantities ranging from 0.1 µg to 1 pg. The amplification of the *fda* gene was used as a control.

cells. LMG18311(ICE_*SsaF1-4_fda*) and JH2-2(ICE_*SsaF1-4_fda*) cells were used as donor cells with LMG18311(pMG36e) and JH2-2(pMG36e), respectively (Table 3). For each mating assay, transconjugants were recovered and confirmed by PCR detection of both the ICE integrase gene and plasmid pMG36e present in the recipients (data not shown). A small number of transconjugant colonies (as for intraspecies transfer of ICE_*SsaF1-4_fda*, i.e., 2 clones for the whole experiment) was observed when using *S. salivarius* as the donor and strains with the same genetic background as the recipients (F1-8/F1-8 mating pairs) or *S. thermophilus* LMG18311 cells as recipient cells. In contrast, more transconjugant colonies (at least 20 clones for the whole experiment) were obtained using *S. thermophilus* LMG18311(ICE_*SsaF1-4_fda*) and *E. faecalis* JH2-2(ICE_*SsaF1-4_fda*) as donors and LMG18311(pMG36e) and JH2-2(pMG36e) cells as recipient cells. These results confirm that ICE_*SsaF1-4_fda* is able to transfer autonomously but also suggest that (i) host factors could impact ICE replication and/or assembly of the conjugation machinery in *S. salivarius*, as already suggested for some strains of *S. thermophilus* (26), or (ii) molecules displayed at the cell surface of *S. salivarius* could impact the donor/recipient cell contacts and thus the assembly of the conjugative machinery. These hypotheses are consistent with the fact that no transconjugant was recovered when *S. thermophilus* CNRZ368 donor cells carrying ICEst3 were mated with *S. salivarius* JIM8777 or F1-8 recipient cells (data not shown), whereas transconjugants were obtained using *S. thermophilus* LMG18311 as recipient cells as already reported (24).

It should be kept in mind that *S. salivarius* encounters different physiological conditions in the oral cavity and along the digestive tract. The impact on ICE regulation of these complex interactions between bacteria and of changing environment in these ecological niches should be explored in the near future.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and culture conditions. The strains and plasmids used in the experimental part of this study are listed in Table 1.

Thirteen *S. salivarius* strains, including 4 commensal (F1-4, F1-8, F4-2, and F6-1) and 9 clinical (B35, B57, L22, L50, L60, L64, N5, N20, and T93) strains, were selected on the basis of a previous study (23). These strains were chosen according to 3 criteria. First, the selected strains likely harbor an ICE with a conjugation module related to ICEst3 (as suggested by a positive PCR signal for the relaxase and coupling protein genes of ICEst3). Second, to increase the diversity of ICEs included in the analysis, half of the strains were selected according to the absence of a PCR signal for the integrase gene of ICEst3, thus suggesting the presence of a different recombination module. Lastly, the selected strains are distributed all over the phylogenetic tree built from MLST data (23). They belong to different MLST groups and differ by at least 3 MLST alleles (out of 6 alleles analyzed) and can thus be considered unrelated, except two of them (strains L22 and L64) which differ by only 1 allele (23). These 13 strains are available upon request.

Modified strains were named according to the modification. For example, *S. salivarius* F1-8(pMG36e) corresponds to a derivative of *S. salivarius* F1-8 carrying plasmid pMG36e. pMG36e is a small plasmid (3,611 bp) that carries only genes required for its replication and an erythromycin resistance gene. It is a nonconjugative plasmid derived from pWV01, which is a broad-spectrum plasmid replicating in *E. coli* and in *Firmicutes* (49) and has been successfully used for labeling recipient strains in conjugation experiments with *S. thermophilus* (24). *S. salivarius*, *E. faecalis*, and *S. thermophilus* were grown in M17 broth supplemented with 0.5% lactose (LM17) at 37°C (*S. salivarius* and *E. faecalis*) or 42°C (*S. thermophilus*) without shaking. Selective mitis salivarius agar (MSA; Difco) containing a 1% (wt/vol) tellurite solution, brain heart infusion (BHI; Difco), and reconstituted skim milk broths were also used for mating assays. Solid cultures were made in an oxygen-free environment induced by GasPak utilization (bioMérieux).

When required, cultures were supplemented with the following antibiotics: chloramphenicol ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$ for *S. thermophilus* or $8 \mu\text{g ml}^{-1}$ for *S. salivarius* and *E. faecalis*) and erythromycin ($5 \mu\text{g ml}^{-1}$ for *S. thermophilus* or $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ for *S. salivarius* and *E. faecalis*).

DNA sequencing and sequence analysis. The 13 selected *S. salivarius* strains were subjected to whole-genome sequencing. Sequencing was done with an Illumina HiSeq2000 sequencer by Beckman Coulter genomics (2×100 bp after paired-end library construction, with at least $60\times$ coverage expected). Observed sequencing depth was higher than $200\times$ for all the 13 genomes. *De novo* assembly was performed using CLC Genomics Workbench (CLC Bio) with default parameters. A scaffold of the genomes was built by using the Genome Finishing module of CLC Genomics Workbench with the *S. salivarius* JIM8777 genome as reference. Some assembly gaps were filled by PCR and sequencing. This enabled us to obtain genomes fragmented in less than 75 contigs (less than 30 contigs for two-thirds of the genomes; the median size of the contigs was higher than 40 kb for half of them). Contigs were first annotated using the RAST annotation server (<http://rast.nmpdr.org/>) (50, 51). Then, contigs containing genes closely related to conjugation genes of ICEst3 were identified by BLASTN analysis (using the *orfO* to *orfA* genes as a query by megaBlast analysis with default parameters and filter disabled), and annotation was completed manually.

In NCBI sequence data banks, ICEs closely related to ICEst3 were searched by using microbial nucleotide blast (using the *orfO* to *orfA* genes as a query by megaBlast analysis with default parameters and filter disabled) on complete ($n = 816$; last accessed 29 July 2016) and draft ($n = 9,573$; last accessed 29 July 2016) genomes of *Firmicutes*. Hits with more than 90% identity with the whole query sequence were further analyzed.

Pairwise comparisons of elements were performed with Artemis Comparison Tool provided by the Sanger Centre using comparison files generated by Double Act (available at http://www.hpa-bioinfotools.org.uk/pise/double_actv2.html) (52). Manual editing of comparison figures was performed using Inkscape.

Phylogenetic tree construction. Proteins of 27 ICEs were included in the analysis. These ICEs correspond to (i) the 19 ICEs of the ICEst3 subfamily with closely related conjugation modules and (ii) 8 additional ones previously reported to belong to the same ICE subfamily but showing more distantly related conjugation modules (11, 26). The sequences of signature proteins were aligned using Clustal omega with default parameters (53). The trees were built with MEGA (54) using (i) maximum likelihood (ML) based on the Jones-Taylor-Thornton (JTT) model including amino acid empirical frequencies (partial deletion of gaps and missing data at 80% cutoff, gamma distribution in 5 categories, and allowance for invariant sites), and (ii) BioNJ methods with the Poisson model (55). The branch support of the groupings was estimated using bootstrap (100 replicates).

ICE tagging. ICE_*SsaF1-4_fda* and ICE_*SsaF4-2_fda* were tagged by a chloramphenicol resistance cassette originating from the pSET5s plasmid. The resistance cassette was inserted in an intergenic region located between convergent coding sequences in the adaptive module to avoid impacting ICE functionality. Two DNA fragments of about 1,000 bp corresponding to the upstream and the downstream regions of the integration locus were amplified by PCR using specific primers that present an extended sequence matching with the 5' and the 3' ends of the chloramphenicol resistance cassette. A second PCR amplification was carried out using these two PCR fragments and the resistance gene as a template to synthesize a fragment carrying the antibiotic resistance cassette flanked by the upstream and downstream chromosomal regions of the gene. The natural competence of *S. salivarius* cells was induced by addition of the synthetic peptide ($\text{H}_2\text{N-LPYFTGCL-COOH}$) (22), and the overlap PCR product was then added for transformation. The crossover events, upstream and downstream from the tagged region, were positively selected by the newly acquired antibiotic resistance of the transformed clones. The integrity of the regions flanking the antibiotic cassette was confirmed by PCR.

PCRs were done using the Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific). PCRs were performed with 50 ng of genomic DNA, 200 μM each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 0.5 μM each primer (for primer sequences, see Table 2), and 0.02 U μl^{-1} of Phusion DNA polymerase in an appropriate buffer per 50- μl reaction volume. Cycling conditions for the overlap PCR were 3 min at 98°C , 30 s at annealing temperature (with 1°C of incrementation at each cycle), and 30 s/kb at 72°C , followed by 30 additional cycles with an annealing temperature of 55°C and a final extension of 10 min at 72°C .

Excision testing with or without mitomycin C (MMC). PCR amplifications of *attB*, *attI*, *attR*, and *attL* fragments were carried out in a 25- μl volume containing 1 μl of overnight culture, 200 μM each dNTP (Thermo Scientific, France), 0.5 μM each primer (for primer sequences, see Table 2), and 0.025 U μl^{-1} of DreamTaq DNA polymerase in an appropriate buffer (Thermo Scientific, France). PCR amplifications were performed using the following cycling parameters: 10 min at 95°C , followed by 30 cycles of 30 s at 95°C , 30 s at 50°C , and 1 min/kb at 72°C , with a final 5-min extension at 72°C . Amplified products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel.

To test the impact of MMC on ICE excision, PCR amplifications of the attachment sites were done after a 2.5-h treatment of the cells with MMC. To select the MMC concentration that gives the highest induction of excision, a range of MMC concentrations (0.025 to 0.4 mg ml^{-1}) was first tested using 1 ng of genomic DNA as the template. Semiquantitative PCR (performed with 30 cycles) was then done at the selected concentration of MMC (0.05 mg ml^{-1}) using different genomic DNA quantities (0.1 μg to 1 pg). Amplifications of the *fda* gene were done in parallel as controls.

Mating experiments. Donor and recipient strains were grown overnight with an appropriate antibiotic. Fifteen milliliters of broth medium was inoculated with 150 μl of donor or recipient stationary-phase cultures. Cultures were grown until mid-exponential phase (optical density at 600 nm of 0.4) and then were mixed and centrifuged for 15 min in a prewarmed centrifuge at $4,500 \times g$ to pellet cells. The pellet was resuspended in 1 ml of LM17 broth, and 150 μl was spread on 0.45- μm -pore-size cellulose

nitrate filters (Sartorius Stedim Biotech) deposited on LM17 soft agar (0.8%) plates. Plates were then incubated at 37°C (for *S. salivarius*-*S. salivarius* and *S. salivarius*-*E. faecalis* mating pairs) or at 39°C (for *S. salivarius*-*S. thermophilus* mating pairs). After an overnight incubation, the filters were removed from the agar plates and placed into 10 ml of LM17 liquid medium. Bacteria were recovered by vortexing for 30 s. The suspension was then directly spread on agar plates supplemented with the appropriate antibiotics or concentrated 10 times by centrifugation at $4,500 \times g$ for 15 min to enable counting of the CFU of the donor, the recipient, and the transconjugant cells after a 24-h incubation. Transconjugant clones obtained after *S. salivarius* intraspecies mating were typed by DNA sequencing of PCR products corresponding to the *ddlA* gene (for primer sequences, see Table 2).

Treatment of donor cells with mitomycin C was done as follows. Cells carrying ICE_5saF1-4_4_fda were grown in LM17 liquid medium at 37°C to an optical density at 600 nm of 0.4. The culture was then diluted 10-fold in 15 ml of prewarmed LM17 medium containing MMC at the concentration that showed the maximum ICE excision level (0.05 mg ml^{-1}). A 10-fold dilution without MMC was used as a control. After 1 h of culture, the cells were harvested by centrifugation in a prewarmed centrifuge and washed once with 15 ml of prewarmed LM17 medium. The donor cells treated with MMC were mixed with recipient cells grown at an optical density at 600 nm of 0.4 and centrifuged for 15 min in a prewarmed centrifuge at $4,500 \times g$ to pellet cells. The pellet was resuspended in 1 ml of LM17 broth, and 150 μl was spread on nitrocellulose filters on LM17 soft agar plates before incubation for 4 h or overnight at appropriate temperatures. The filters were then treated as previously described.

Mating frequencies were calculated by dividing the number of transconjugants by the number of donor cells, except in the case of donor cells treated with MMC, where mating frequencies were calculated relative to recipients. At least three independent biological replicates were done.

Plasmid curing. Transconjugants carrying plasmid pMG36e were cultured overnight without erythromycin and were then spread on LM17 plates at different dilutions. One hundred isolated clones were then streaked on LM17 plates with or without erythromycin. Erythromycin-sensitive clones were then confirmed by PCR for the absence of plasmid (see Table 2 for primer sequences).

RAPD. Random amplification of polymorphic DNA (RAPD) (56) was carried out with DreamTaq enzyme (for primer sequences, see Table 2). Cycling conditions were 40 cycles consisting of 94°C for 1 min, 31°C for 1 min, and 72°C for 2 min; the final extension was continued for 7 min at 72°C. One microliter of liquid culture was used as the DNA template. The PCR products were separated by electrophoresis on a 1.5% agarose gel.

Accession number(s). The sequences of ICEs have been deposited in the EMBL Nucleotide Sequence Database under accession numbers [LT622825](#) to [LT622837](#).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/AEM.00337-17>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Stéphane Bertin and Emilie Robert for their technical help.

N.D. is recipient of a scholarship funded by INRA and Région Grand Est (formerly Région Lorraine). This work received financial support from the Région Lorraine and Université de Lorraine (2011–2013) and from ANR (MATICE project ANR-15-CE21-0007).

REFERENCES

- Abby SS, Tannier E, Gouy M, Daubin V. 2012. Lateral gene transfer as a support for the tree of life. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:4962–4967. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116871109>.
- Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405:299–304. <https://doi.org/10.1038/35012500>.
- Llosa M, Gomis-Ruth FX, Coll M, de la Cruz F. 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* 45:1–8. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03014.x>.
- Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N, Guédon G. 2014. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol Rev* 38:720–760. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12058>.
- Roberts AP, Mullany P. 2013. Bacterial integrative mobile genetic elements. Landes Bioscience, Austin, TX.
- Toussaint A, Merlin C. 2002. Mobile elements as a combination of functional modules. *Plasmid* 47:26–35. <https://doi.org/10.1006/plas.2001.1552>.
- Burrus V, Pavlovic G, Decaris B, Guédon G. 2002. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Mol Microbiol* 46:601–610. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03191.x>.
- Brochet M, Rusniok C, Couvé 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803654105>.
- Bellanger X, Morel C, Gonot F, Puymège A, Decaris B, Guédon G. 2011. Site-specific accretion of an integrative conjugative element and a related genomic island leads to cis-mobilization and gene capture. *Mol Microbiol* 81:912–925. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07737.x>.
- Puymège A, Bertin S, Chuzeville S, Guédon G, Payot S. 2013. Conjugative transfer and cis-mobilization of a genomic island by an integrative and conjugative element of *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* 195:1142–1151. <https://doi.org/10.1128/JB.02199-12>.
- Ambroset C, Coluzzi C, Guédon G, Devignes MD, Loux V, Lacroix T, Payot S, Leblond-Bourget N. 2015. New insights into the classification and integration specificity of *Streptococcus* integrative conjugative elements through extensive genome exploration. *Front Microbiol* 6:1483. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01483>.
- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002222>.

13. Puymège A, Bertin S, Guédon G, Payot S. 2015. Analysis of *Streptococcus agalactiae* pan-genome for prevalence, diversity and functionality of integrative and conjugative or mobilizable elements integrated in the tRNA^{lys} CTT gene. *Mol Genet Genomics* 290:1727–1740. <https://doi.org/10.1007/s00438-015-1031-9>.
14. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. 2005. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol* 43:5721–5732. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>.
15. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Bork P, Ehrlich SD. 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464:59–65. <https://doi.org/10.1038/nature08821>.
16. Van den Bogert B, Boekhorst J, Herrmann R, Smid EJ, Zoetendal EG, Kleerebezem M. 2013. Comparative genomics analysis of *Streptococcus* isolates from the human small intestine reveals their adaptation to a highly dynamic ecosystem. *PLoS One* 8:e83418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083418>.
17. Wilson M, Martin R, Walk ST, Young C, Grossman S, McKean EL, Aronoff DM. 2012. Clinical and laboratory features of *Streptococcus salivarius* meningitis: a case report and literature review. *Clin Med Res* 10:15–25. <https://doi.org/10.3121/cmr.2011.1001>.
18. Kitten T, Munro CL, Zollar NQ, Lee SP, Patel RD. 2012. Oral streptococcal bacteremia in hospitalized patients: taxonomic identification and clinical characterization. *J Clin Microbiol* 50:1039–1042. <https://doi.org/10.1128/JCM.06438-11>.
19. Corredoira JC, Alonso MP, Garcia JF, Casariego E, Coira A, Rodriguez A, Pita J, Louzao C, Pombo B, Lopez MJ, Varela J. 2005. Clinical characteristics and significance of *Streptococcus salivarius* bacteremia and *Streptococcus bovis* bacteremia: a prospective 16-year study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24:250–255. <https://doi.org/10.1007/s10096-005-1314-x>.
20. Han XY, Kamana M, Rolston KV. 2006. Viridans streptococci isolated by culture from blood of cancer patients: clinical and microbiologic analysis of 50 cases. *J Clin Microbiol* 44:160–165. <https://doi.org/10.1128/JCM.44.1.160-165.2006>.
21. Delorme C, Abraham AL, Renault P, Guedon E. 2015. Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. *Infect Genet Evol* 33:381–392. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.001>.
22. Fontaine L, Boutry C, de Frahan MH, Delplace B, Fremaux C, Horvath P, Boyaval P, Hols P. 2010. A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol* 192:1444–1454. <https://doi.org/10.1128/JB.01251-09>.
23. Chaffanel F, Charron-Bourgoin F, Libante V, Leblond-Bourget N, Payot S. 2015. Resistance genes and genetic elements associated with antibiotic resistance in clinical and commensal isolates of *Streptococcus salivarius*. *Appl Environ Microbiol* 81:4155–4163. <https://doi.org/10.1128/AEM.00415-15>.
24. Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guédon G. 2009. Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 191:2764–2775. <https://doi.org/10.1128/JB.01412-08>.
25. 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. [https://doi.org/10.1016/S0147-619X\(02\)00102-6](https://doi.org/10.1016/S0147-619X(02)00102-6).
26. Carraro N, Libante V, Morel C, Decaris B, Charron-Bourgoin F, Leblond P, Guédon G. 2011. Differential regulation of two closely related integrative and conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*. *BMC Microbiol* 11:238. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-238>.
27. Lee CA, Grossman AD. 2007. Identification of the origin of transfer (*oriT*) and DNA relaxase required for conjugation of the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 189:7254–7261. <https://doi.org/10.1128/JB.00932-07>.
28. Kishida K, Inoue K, Ohtsubo Y, Nagata Y, Tsuda M. 2017. Host range of the conjugative transfer system of IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and characterization of its *oriT* region and relaxase. *Appl Environ Microbiol* 83:e02359-16. <https://doi.org/10.1128/AEM.02359-16>.
29. Wang P, Zhang C, Zhu Y, Deng Y, Guo S, Peng D, Ruan L, Sun M. 2013. The resolution and regeneration of a cointegrate plasmid reveals a model for plasmid evolution mediated by conjugation and *oriT* site-specific recombination. *Environ Microbiol* 15:3305–3318. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12177>.
30. Ceccarelli D, Daccord A, Rene M, Burrus V. 2008. Identification of the origin of transfer (*oriT*) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. *J Bacteriol* 190:5328–5338. <https://doi.org/10.1128/JB.00150-08>.
31. Miyazaki R, van der Meer JR. 2011. A dual functional origin of transfer in the ICElc genomic island of *Pseudomonas knackmussii* B13. *Mol Microbiol* 79:743–758. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07484.x>.
32. Bose B, Auchtung JM, Lee CA, Grossman AD. 2008. A conserved anti-repressor controls horizontal gene transfer by proteolysis. *Mol Microbiol* 70:570–582. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06414.x>.
33. Auchtung JM, Lee CA, Garrison KL, Grossman AD. 2007. Identification and characterization of the immunity repressor (ImmR) that controls the mobile genetic element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 64:1515–1528. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05748.x>.
34. Bellanger X, Morel C, Decaris B, Guédon G. 2007. Derepression of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus* by DNA damage response: implication of a cl-related repressor. *J Bacteriol* 189:1478–1481. <https://doi.org/10.1128/JB.01125-06>.
35. Carraro N, Libante V, Morel C, Charron-Bourgoin F, Leblond P, Guédon G. 2016. Plasmid-like replication of a minimal streptococcal integrative and conjugative element. *Microbiology* 162:622–632. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000219>.
36. Oliveira PH, Touchon M, Rocha EP. 2014. The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic Acids Res* 42:10618–10631. <https://doi.org/10.1093/nar/gku734>.
37. Mruk I, Kobayashi I. 2014. To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Res* 42:70–86. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt711>.
38. Balado M, Lemos ML, Osorio CR. 2013. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family from fish-isolated vibrios encode restriction-modification systems that confer resistance to bacteriophages. *FEMS Microbiol Ecol* 83:457–467. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12007>.
39. Price VJ, Huo W, Sharifi A, Palmer KL. 2016. CRISPR-Cas and restriction-modification act additively against conjugative antibiotic resistance plasmid transfer in *Enterococcus faecalis*. *mSphere* 1(3):e00064-16. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00064-16>.
40. Vasu K, Nagaraja V. 2013. Diverse functions of restriction-modification systems in addition to cellular defense. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:53–72. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00044-12>.
41. Rocha EP, Danchin A, Viari A. 2001. Evolutionary role of restriction/modification systems as revealed by comparative genome analysis. *Genome Res* 11:946–958. <https://doi.org/10.1101/gr.1531RR>.
42. Takahashi N, Naito Y, Handa N, Kobayashi I. 2002. A DNA methyltransferase can protect the genome from postdisturbance attack by a restriction-modification gene complex. *J Bacteriol* 184:6100–6108. <https://doi.org/10.1128/JB.184.22.6100-6108.2002>.
43. Järup L, Akesson A. 2009. Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol* 238:201–208. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2009.04.020>.
44. Birri DJ, Brede DA, Nes IF. 2012. Salivaricin D, a novel intrinsically trypsin-resistant lantibiotic from *Streptococcus salivarius* 5M6c isolated from a healthy infant. *Appl Environ Microbiol* 78:402–410. <https://doi.org/10.1128/AEM.06588-11>.
45. Dobson A, Cotter PD, Ross RP, Hill C. 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol* 78:1–6. <https://doi.org/10.1128/AEM.05576-11>.
46. Wescombe PA, Heng NC, Burton JP, Tagg JR. 2010. Something old and something new: an update on the amazing repertoire of bacteriocins produced by *Streptococcus salivarius*. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2:37–45. <https://doi.org/10.1007/s12602-009-9026-7>.
47. Rankin DJ, Rocha EP, Brown SP. 2011. What traits are carried on mobile genetic elements, and why? *Heredity* 106:1–10. <https://doi.org/10.1038/hdy.2010.24>.
48. Bellanger X. 2009. Transfert, accréation et mobilisation des éléments intégratifs conjugatifs et des îlots génomiques apparentés de *Streptococcus thermophilus*: un mécanisme clef de l'évolution bactérienne? PhD thesis. Nancy-Université, Nancy, France.
49. van de Guchte M, van der Vossen JM, Kok J, Venema G. 1989. Construc-

- tion of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* 55:224–228.
50. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. 2008. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics* 9:75. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-9-75>.
 51. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA, Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R. 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res* 42:D206–D214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>.
 52. Carver T, Berriman M, Tivey A, Patel C, Bohme U, Barrell BG, Parkhill J, Rajandream MA. 2008. Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics* 24: 2672–2676. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn529>.
 53. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Soding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>.
 54. Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipksi A, Kumar S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30:2725–2729. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
 55. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol* 27:221–224. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp259>.
 56. Blaiotta G, Sorrentino A, Ottombrino A, Aponte M. 2011. Short communication: technological and genotypic comparison between *Streptococcus macedonicus* and *Streptococcus thermophilus* strains coming from the same dairy environment. *J Dairy Sci* 94:5871–5877. <https://doi.org/10.3168/jds.2011-4630>.
 57. Guédon E, Delorme C, Pons N, Cruaud 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. <https://doi.org/10.1128/JB.05390-11>.
 58. Jacob AE, Hobbs SJ. 1974. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J Bacteriol* 117:360–372.
 59. Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. 2001. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* 46:140–148. <https://doi.org/10.1006/plas.2001.1532>.
 60. Delorme C, Poyart C, Ehrlich SD, Renault P. 2007. Extent of horizontal gene transfer in evolution of streptococci of the *salivarius* group. *J Bacteriol* 189:1330–1341. <https://doi.org/10.1128/JB.01058-06>.

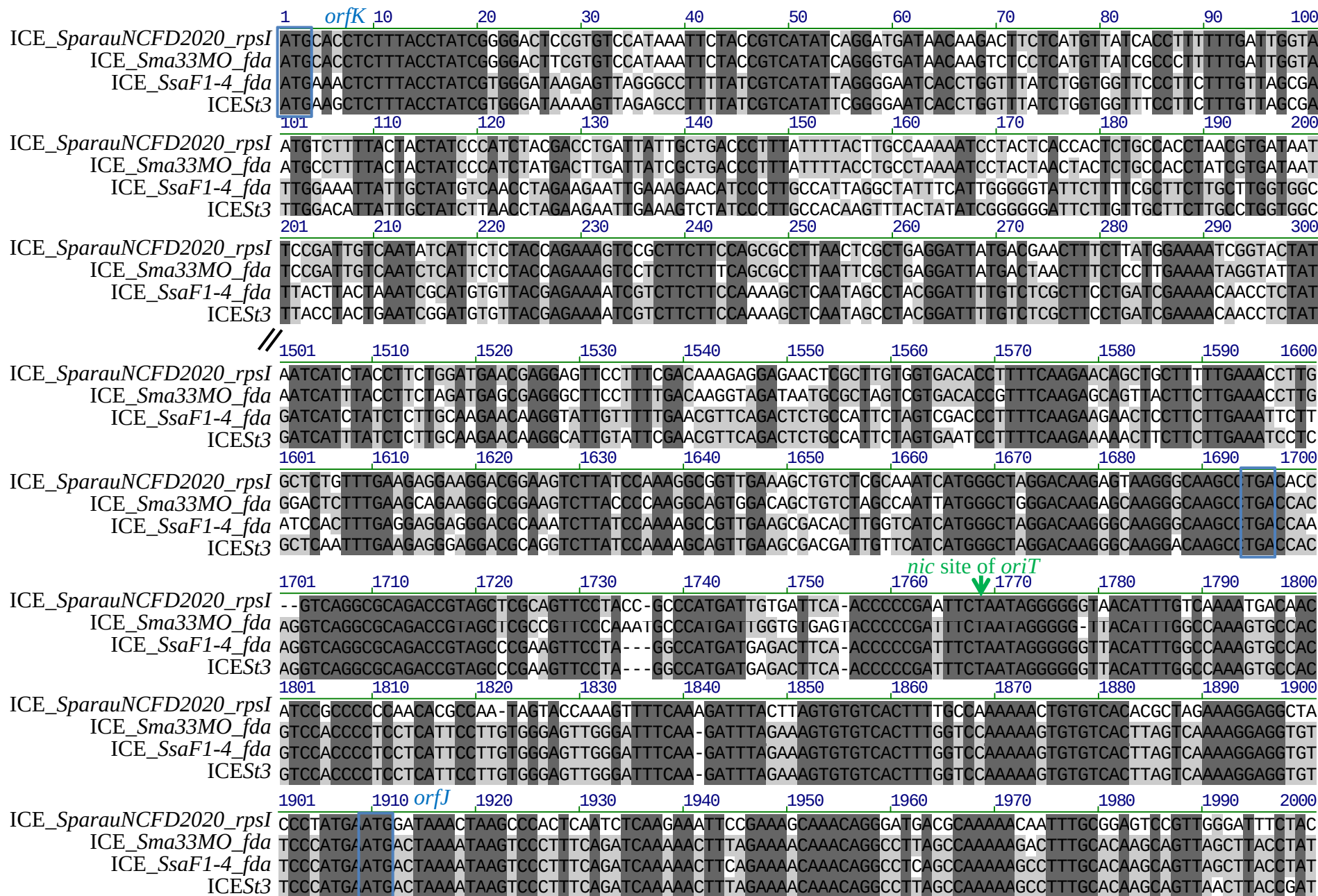


Fig. S1: sequence comparison of *orfK*, intergenic sequence *orfK-orfJ* and beginning of the *orfJ* gene in ICEs found in *S. parasanguinis* NCFD2020, *S. macedonicus* 33MO, *S. salivarius* F1-4 compared to ICESt3 of *S. thermophilus*. Start and stop codons are indicated as blue rectangles and the *nic* site of *oriT* is indicated as a green arrow.

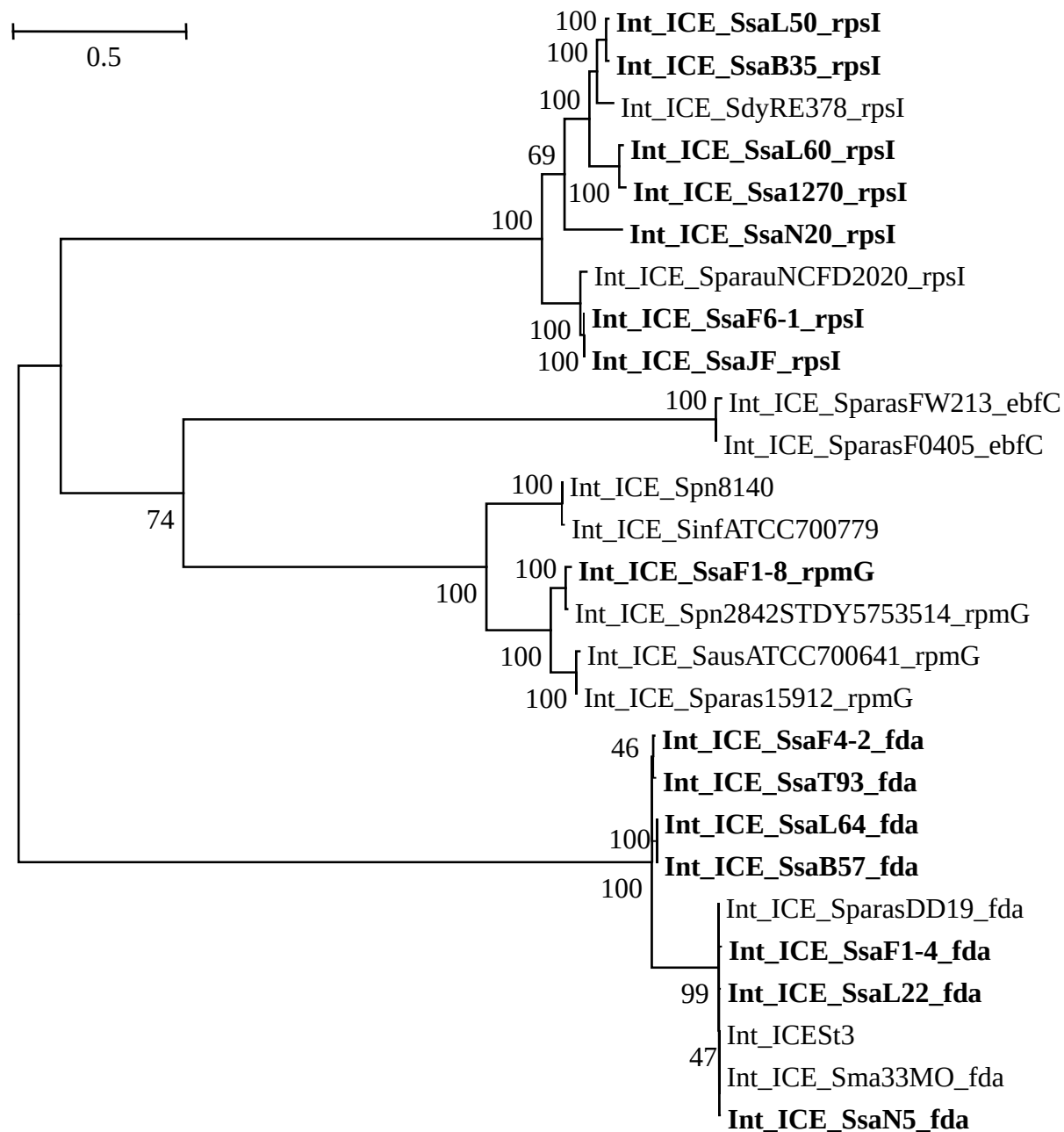


Fig. S2. Phylogenetic BioNJ tree obtained for integrases of ICEs belonging to the ICESt3 subfamily. The integrase protein sequence of twenty-seven ICEs (the 19 ICEs of the ICESt3 subfamily with closely related conjugation modules and 8 additional ones previously reported to belong to the same ICE subfamily but showing more distantly related conjugation modules) were included in the analysis. ICEs of *S. salivarius* are indicated in bold. Bootstrap values supporting main branches are given at nodes.

2. Impact des facteurs d'hôte sur le transfert d'ICESt3 de *Streptococcus thermophilus*

Contexte : suite à l'activation des fonctions permettant l'excision de l'élément, le succès de transfert des ICE est dépendant de la capacité des cellules donatrice et réceptrice à entrer en contact dans un premier temps et à établir la machinerie de conjugaison dans un second temps. Au vu de ce qu'elles impliquent, ces deux étapes devraient être étroitement dépendantes de l'enveloppe cellulaire qu'expose chacune de ces bactéries et pourraient alors constituer un frein au transfert de l'élément, ou à l'inverse le favoriser. Alors que beaucoup d'études concernant les ICE sont focalisées sur les fonctions codées par ces éléments, l'impact des facteurs d'hôte sur leur transfert ne reste quant à lui qu'encore très faiblement documenté. Ainsi, l'étude de l'impact de l'enveloppe cellulaire sur le transfert d'ICE a fait l'objet de la deuxième partie de ce travail de thèse. Les ICE de *S. salivarius* décrits dans le chapitre I ne se transférant pas à une fréquence suffisante pour l'évaluation statistique de cet impact, c'est l'ICE apparenté ICESt3 qui a été utilisé comme modèle d'élément. De ce fait, c'est l'espèce *S. thermophilus* qui a été étudiée comme modèle d'hôte.

Objectif : l'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de l'enveloppe cellulaire sur le transfert et l'acquisition d'ICESt3 et l'identification des composés de surface mis en jeu.

Stratégie employée : dans le cadre de cette étude, des mutants ciblant diverses molécules exposées à la surface de *S. thermophilus*, à savoir les protéines de surface à motif LPxTG ($\Delta srtA$) et les lipoprotéines ($\Delta lspA$), les acides téichoïques ($\Delta tagO$ -like, $\Delta yfnI$ -like), les polysaccharides ($\Delta epsE$, $\Delta eps9-11$, $\Delta stu1482$ -rgpX2), et des molécules pouvant impacter la charge à la surface de la cellule ($\Delta mprF$ -like, $\Delta dltA$) ont été construits principalement chez la souche LMG 18311 (Tableau 1). Des expériences de conjugaison sur filtres ont par la suite été réalisées afin de comparer les fréquences de transfert et d'acquisition d'ICESt3 des mutants à celles du couple sauvage (WT) (donatrice LMG 18311(ICESt3) Cm^r / réceptrice LMG 18311 Ery^r ou Spc^r). La souche LMG 18311 présentant un gène de sortase A tronqué, c'est la souche *S. thermophilus* LMD-9 qui a été utilisée dans le cadre particulier de l'étude de l'effet des protéines à motif LPxTG sur l'acquisition d'ICESt3.

L'impact de ces mutations a été étudié dans différents contextes : avec seule la réceptrice mutée, seule la donatrice mutée, mais également dans un contexte où la donatrice et la réceptrice ont été toutes deux mutées au niveau d'une même molécule de surface. Les résultats d'expériences de conjugaison sur filtre décrits ci-dessous ont fait l'objet d'au moins trois répétitions biologiques réalisées sur deux clones de transformants indépendants.

Mutant	Locus Tag	Gene / homologue	Fonction
Protéines de surface	STER_1255	<i>srtA</i>	Sortase A, LPxTG transpeptidase
	Stu0521	<i>lspA</i>	Prolipoprotéine signal peptidase (spase II)
Acides téichoïques	Stu0163	<i>tagO-like</i>	Biosynthèse acides téichoïques (WTA)
	Stu0636	<i>yfnI-like</i>	Biosynthèse acides lipotéichoïques (LTA)
D-alanylation	Stu0761	<i>dltA</i>	D-alanylation des WTA et des LTA
Lysyl-phosphatidylglycérol	Stu1256	<i>mprF-like</i>	Synthèse de lysyl-phosphatidylglycérol (L-PG)
Polysaccharides	Stu1108	<i>epsE</i>	Synthèse des exopolysaccharides
	Stu1097-1099	<i>eps9-11</i>	Synthèse des exopolysaccharides
	Stu1482-1473	<i>stu1482-rgpX2</i>	Synthèse de polysaccharides

Tableau 1 : tableau récapitulatif des mutants étudiés.

Résultats : la mutation des molécules de surface de LMG 18311 perturbe de façon globale plusieurs paramètres liés notamment à la croissance de la bactérie, à sa morphologie, son organisation en chaînette, sa charge globale ou sa capacité à former des biofilms, de même qu'elle impacte la capacité de LMG 18311 à transférer ou recevoir ICE*St3*.

La caractérisation et la comparaison des taux de croissance des souches LMG 18311 sauvage et mutées a mis en évidence quelques disparités, en particulier pour deux souches présentant une croissance ralentie ($\Delta yfnI$ -like, $\Delta stu1482$ -*rgpX2*). Les autres mutations ne semblent pas affecter drastiquement les propriétés de croissance de LMG 18311. L'observation de la souche LMG 18311 et de ses dérivés en microscopie à contraste de phase ainsi qu'en microscopie électronique a par ailleurs permis de montrer l'altération d'un certain nombre de propriétés morphologiques des mutants LMG 18311. Celles-ci comprennent notamment des différences de taille et de formes cellulaires (e.g. $\Delta tagO$ -like, $\Delta yfnI$ -like, $\Delta mprF$ -like, $\Delta dltA$, $\Delta epsE$, $\Delta eps9-11$, $\Delta stu1482$ -*rgpX2*), des profils de divisions cellulaires aberrants ($\Delta tagO$ -like, $\Delta yfnI$ -like), une augmentation de la taille des chaînettes et de la sédimentation ($\Delta epsE$, $\Delta eps9-11$), mais aussi une organisation sous forme agrégative ($\Delta tagO$ -like, $\Delta dltA$). Les mesures des potentiels Zéta indiquant la charge globale de la surface cellulaire ont fourni des résultats homogènes pour la majorité des mutants, à l'exception des deux mutants impliqués dans la biosynthèse des exopolysaccharides ($\Delta epsE$, $\Delta eps9-11$) qui se démarquent de LMG 18311 de par leur exposition d'une surface chargée plus positivement aux pH 2 et 3, et plus négativement aux pH 7 et 9. L'analyse de la capacité de LMG 18311 et de ses dérivés à former des biofilms a mis en évidence une augmentation significative de formation de biofilm pour certains mutants comme démontré par la comparaison quantitative des biovolumes de biofilms.

Dans le but d'évaluer l'impact des molécules ciblées sur l'acquisition d'ICES $t3$, ces mutants ont dans un premier temps été utilisés en tant que cellules réceptrices lors des expériences de conjugaisons sur filtre. La comparaison des fréquences de transfert des mutants par rapport à la réceptrice sauvage LMG 18311 Ery^r (ou LMD-9(pMG36e) dans le cadre du mutant $\Delta srtA$) démontrent une augmentation des fréquences d'acquisition d'ICES $t3$ par les mutants $\Delta lspA$, $\Delta tagO-like$, $\Delta yfnI-like$, $\DeltamprF-like$, $\Delta dltA$, $\Delta epsE$ et $\Delta eps9-11$ d'un facteur d'environ 100, 40, 100, 5, 40, 400 et 400 respectivement, alors qu'aucune différence significative n'a été mise en évidence pour les mutants $\Delta srtA$ et $\Delta stu1482-rgpX2$.

Afin d'évaluer si les phénotypes observés sont propres à la réceptrice ou s'appliquent également à la cellule donatrice, des expériences de conjugaisons sur filtres mettant en jeu des cellules donatrices mutées au niveau de molécules testées précédemment ont été réalisées. Contrairement aux résultats obtenus démontrant l'augmentation des fréquences d'acquisition d'ICES $t3$ lorsque la cellule réceptrice est mutée au niveau des molécules $\Delta lspA$, $\Delta tagO-like$, $\Delta yfnI-like$, $\DeltamprF-like$, $\Delta dltA$, $\Delta epsE$ et $\Delta eps9-11$, ces mêmes mutations au niveau de la souche donatrice LMG 18311(ICES $t3$) provoquent quant à elles une diminution des fréquences de transfert d'ICES $t3$. Celle-ci se traduit par une perte d'un facteur 10 à 25 de l'efficacité de transfert d'ICES $t3$ comparé au couple sauvage.

Au vu de l'impact de ces molécules sur le transfert et l'acquisition d'ICES $t3$ qui diffère significativement selon s'il s'agit de la donatrice ou de la réceptrice qui fait l'objet d'une mutation, quatre délétions ciblant les lipoprotéines ($\Delta lspA$), la présence des acides téichoïques de paroi ($\Delta tagO-like$), des acides lipotéichoïques ($\Delta yfnI-like$), ou les exopolysaccharides ($\Delta epsE$) ont été sélectionnées dans le but de réaliser des expériences de conjugaison sur filtre dans un contexte donatrice mutée / réceptrice mutée. Les résultats démontrent une baisse de l'efficacité de transfert d'ICES $t3$ similaire à celle observée dans le cadre des expérimentations donatrice mutée / réceptrice sauvage.

Impact of cell surface molecules on conjugative transfer of the integrative and conjugative
element ICE*St3* of *Streptococcus thermophilus*

Running title: Impact of cell surface molecules on ICE*St3* transfer

Narimane Dahmane¹, Emilie Robert¹, Julien Deschamps², Thierry Meylheuc^{2,3}, Christine
Delorme², Romain Briandet², Nathalie Leblond-Bourget¹, Eric Guédon⁴ and Sophie Payot¹ #

¹ DynAMic, Université de Lorraine, INRA, Vandœuvre-lès-Nancy, France;

² MICALIS Institute, INRA, AgroParisTech, Université Paris-Saclay, Jouy-en-Josas, France;

³ INRA, Plateforme MIMA2, Jouy-en-josas, France;

⁴ STLO, INRA, Agrocampus Ouest, Rennes, France

Corresponding author

Tel: +33 3 72 74 56 81

Fax: +33 3 72 74 53 56

E-mail address: sophie.payot-lacroix@inra.fr

ABSTRACT

Integrative Conjugative Elements (ICEs) are chromosomal elements that are widely distributed in bacterial genomes, hence contributing to genome plasticity, adaptation and evolution of bacterial organisms. Conjugation requires a contact between both the donor and the recipient cells and thus likely depends on the cell surface envelope composition. In this work, we investigated the impact of different cell surface molecules including cell surface proteins, wall teichoic acids, lipoteichoic acids and exopolysaccharides on the transfer and acquisition of ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*. The transfer of ICE*St3* from wild type donor towards mutated recipient cells increased 5- to 400-fold compared to WT when recipients cells were affected in lipoproteins, teichoic acids or exopolysaccharides. These mutants displayed an increased biofilm-forming ability compared to WT that could explain the increase of ICE*St3* acquisition frequency. Microscopic observations of *S. thermophilus* cell surface mutants showed different phenotypes (increase of chain length, aggregation in particular) that can also be behind the impacts observed on cell conjugation.

By contrast, the same mutations did not have the same impact when the donor cells, instead of recipient cells, were mutated. In that case, the transfer frequency of ICE*St3* decreased compared to WT. The same observation was made when both donor and recipient cells were mutated. This depicts a different effect of cell surface molecules on conjugation according to whether the cell is acting as a donor or as a recipient of the ICE.

IMPORTANCE

ICEs contribute to horizontal gene transfer of adaptive traits (for example virulence, antibiotic resistance or biofilm formation) and play a considerable role in bacterial genome evolution thus underlying the need of a better understanding of their conjugative mechanism of transfer. While most of studies are focusing on the different functions encoded by ICEs, little is known

50 about the effect of host factors on their conjugative transfer. Using ICE*St3* of *S. thermophilus*
51 as a model of study, we demonstrated the impact of lipoproteins, teichoic acids and
52 exopolysaccharides on ICE transfer and acquisition. This opens up new avenues to control
53 gene transfers mediated by ICEs.

INTRODUCTION

Horizontal gene transfer (HGT) significantly impacts bacterial evolution by driving genome plasticity. Comparison of the increasing amount of available prokaryotic genome sequences enables to estimate the intraspecies diversity and reveals a high dynamic of gene exchanges (1). Conjugation is a mechanism through which the DNA is transferred following the establishment of a cell contact between a donor and a recipient bacteria (2, 3). This mechanism is admitted to be the primary contributor to HGT by allowing an effective DNA transfer to a large spectrum of hosts. Mobile Genetic Elements (MGEs) are essential actors of HGT. Among them, Integrative Conjugative Elements (ICEs), whose size ranges from 18 to 600 kb, are widely distributed in bacterial genomes regardless of the species or any other classification (4–6). ICEs are chromosomal mobile elements that are able to excise from the donor chromosome, transfer by conjugation, and integrate into the recipient chromosome. As many other MGEs, ICEs owe their evolutionary success in part to the adaptive genes they carry, which can significantly contribute to the competitiveness of their hosts. Hence, ICEs are notably contributing to the spread of antimicrobial resistance (AMR) and the emergence of multidrug resistant strains, which constitute a serious threat to global public health as reminded recently by the World Health Organization (4, 7). This highlights the necessity of drawing a more comprehensive picture of the conjugative mechanism employed by ICEs. Since conjugation needs a physical contact between both the donor and recipient cells, it likely depends on the cell surface composition and on the donor/recipient interactions. Previous studies on ICEs mainly focused on the mechanisms of transfer and regulation encoded by these elements, whereas the impact of host factors on ICE transfer, including donor/recipient cell surface components, are still poorly described. To the best of our knowledge, this has only been studied for *ICEBs1*, an ICE from the Gram-positive (G+) bacterium *Bacillus subtilis*, for which the authors reported an impact of the phospholipid

79 biosynthesis pathway on ICEBs1 transfer (8, 9). The impact of this pathway has also been
80 tested for Tn916 by the same group in order to extrapolate ICEBs1 results, demonstrating that
81 some impacts were specific to ICEBs1, whereas others could be generalized to other ICEs (8,
82 9). In order to provide more information about this topic, we investigated the impact of
83 various cell surface molecules including surface exposed proteins, wall teichoic acids (WTA),
84 lipoteichoic acids (LTA) and exopolysaccharides (EPS) on the conjugative transfer of ICESt3
85 of *Streptococcus thermophilus*.

86 ICESt3 of *S. thermophilus* is a 28 kb element inserted in the 3' end of the *fda* gene encoding a
87 1,6-disphosphate aldolase. It transfers at a frequency of 10^{-6} transconjugant per donor cell to
88 other *S. thermophilus* strains but also to *Streptococcus pyogenes* and *Enterococcus faecalis*
89 (10). The frequency of transfer of ICESt3 can be increased 25-fold after exposure of donor
90 cells to a mitomycin C treatment (10). ICESt3 does not encode any known aggregation factor
91 or cell surface exposed molecule, thus its transfer depends on successful donor/recipient
92 contacts and likely relies on host factors as already suggested by a previous study (11).

93 The G⁺ bacterium *S. thermophilus* is a clonal species that has recently emerged from a
94 commensal ancestor of the salivarius group that also includes the closely related species
95 *Streptococcus vestibularis* and *Streptococcus salivarius* (12). *S. thermophilus* has mainly
96 evolves by loss of gene functions unnecessary for its adaptation to a narrow and well-defined
97 ecological niche, milk (13–15). This notably includes loss of functions linked with the cell
98 surface composition, making *S. thermophilus* a simple model of cell surface envelope suitable
99 for the purpose of this study.

100 LPxTG-containing proteins are cell surface proteins covalently linked through the action of
101 sortase enzymes that recognize the LPxTG motif and process the link between the LPxTG
102 protein and the peptidoglycan. These proteins are known to fulfill functions mainly linked to

103 the interactions of pathogenic strains with their host (16). Thus, it is not surprising that only
104 rare *S. thermophilus* strains harbor LPxTG proteins at their surface (13).

105 Lipoproteins (Lpps) are surface proteins covalently linked to the plasma membrane. Their
106 biosynthesis depends on the sequential action of three enzymes. One of them, the lipoprotein
107 signal peptidase II (LspA), is essential for the recognition and processing of the lipobox motif
108 carried by Lpp, thus enabling the action of the enzyme that binds the Lpp to the cell
109 membrane (17). The cell envelope of *S. thermophilus* harbors a variable number of Lpps: for
110 instance the strain LMG 18311 exhibits at its surface 24 predicted Lpps among which 15 are
111 involved in the binding of substrates of ABC transporters (13, 15).

112 Wall teichoic acids (WTA) are major components of the G⁺ bacterial envelope and can
113 represent more than one half of the weight of the cell wall. According to the species and
114 strains considered, WTA exhibit a very diverse carbon backbone structure and molecular
115 weight (18). The exposure of WTA at the cell surface is dependent on the action of TagO or
116 its homologue TarO respectively described in *B. subtilis* and *Staphylococcus aureus* as
117 essential for the initiation of WTA biosynthesis (19, 20). Unlike WTA, LTA exhibit a more
118 conserved structure between bacterial species, and are covalently attached to the plasma
119 membrane through their bond to a glycolipid inserted in the membrane (20). In *S. aureus*,
120 LtaS polymerizes the carbon backbone of LTA, whereas three homologues of LtaS: LtaS_{BS},
121 YfnI and YqgS are involved in the biosynthesis of LTA in *B. subtilis*, with YvgJ acting as a
122 primase (19, 21, 22). WTA and LTA backbones are maintained with phosphodiester bounds
123 that confer a negative global charge to the whole polymers. Thus, for both components, a D-
124 alanylation driven by DltABCD, can neutralize the negative charges of the WTA and LTA
125 polymers leading to zwitterionic forms (19, 23, 24). The presence of a *dlt* cluster in
126 *S. thermophilus* LMG 18311 has already been described, but little is known about these
127 different components in *S. thermophilus* (15). Exopolysaccharides (EPS) are long chains of

128 polysaccharides that are branched with repeated units of sugar (*e.g.* glucose, galactose,
129 rhamnose, and derivative) and are transiently linked to the plasma membrane before their
130 secretion in the neighborhood environment (25, 26). EPS of *S. thermophilus* are well-studied
131 components because of the texture they form that is useful for the dairy industry. In the
132 *S. thermophilus* strain LMG 18311 (27–29), a large cluster of genes encodes all the proteins
133 involved in the formation of the repeated sugar units and the export and polymerization of the
134 EPS chain. The EpsE phosphogalactosyltransferase is essential for EPS production in
135 *S. thermophilus*, since strains lacking this enzyme do not show a detectable amount of EPS
136 (30).

137 In this study, cell surface mutants of *S. thermophilus* strain LMG 18311 were constructed,
138 characterized (growth, SEM and TEM microscopies, and biofilm formation) and used to test
139 their ability to transfer ICES_{St3} compared to the wild type strain (WT). Mating experiments
140 were carried out either with mutated recipients or mutated donors, and with both mutated
141 donors and recipients. Whereas some mutations led to the increase, up to 400-fold, of the
142 ICES_{St3} transfer frequency, others led to a decrease of the transfer frequency compared to WT.
143 However, none of the tested molecules appeared to be essential for ICES_{St3} transfer.

RESULTS

Homologs of genes involved in cell surface composition of *S. thermophilus* LMG 18311

Eight LMG 18311 mutants were constructed to target cell surface proteins ($\Delta lspA$), teichoic acids ($\Delta tagO$ -like, $\Delta yfnI$ -like, $\Delta dltA$), lysyl-phosphatidylglycerol biosynthesis ($\Delta mprF$ -like), and polysaccharide production including exopolysaccharides ($\Delta epsE$, $\Delta eps9-11$) and rhamnose-glucose polysaccharides ($\Delta stu1482-rgpX2$). Genes encoding some of the targeted functions have already been described (15) or clearly annotated like the EPS and *dlt* operons, and *lspA* gene. Identification of genes linked to LTA and WTA functions in *S. thermophilus* required a preliminary *in silico* analysis to detect possible homologs of known coding genes from other bacterial species. Analysis of the available LMG 18311 genome (13) revealed homologs of *B. subtilis* proteins involved in LTA, WTA and lysyl-phosphatidylglycerol biosynthesis: Stu0163, Stu0636 and Stu1256 were found to be homologous to TagO (41% identity with 86% sequence coverage, $E = 2e^{-69}$), YfnI (42% identity with 96% sequence coverage, $E = 7e^{-158}$) and MprF (31% identity with 96% sequence coverage, $E = 2e^{-121}$), respectively. We searched for homologs among the LMG 18311 proteome of the two other proteins, LtaS_{BS} and YqgS, involved in LTA synthesis in *B. subtilis*. The Stu0636 protein was the sole detected, suggesting that as observed in *S. aureus* (22) and *Listeria monocytogenes* (31), only one LTA synthase is involved in LTA biosynthesis in *S. thermophilus* LMG 18311. Only one LTA synthase was also found in other *S. thermophilus* strains as revealed by *in silico* analyses (e.g. strains TH1435, CNRZ1066, TH1477 and JIM8282).

Characterization of cell surface mutants

Growth properties of mutants: None of the cell surface mutants displayed drastic growth defects compared to WT during growth in M17 broth complemented with 0.5% of lactose.

We noted however that the *ΔyfnI-like* and *Δstu1482-rgpX2* mutants showed a higher generation time (G = 46 and 62 min respectively) compared to WT (G = 30 min), while *ΔlspA*, *ΔtagO-like*, *ΔepsE* and *Δeps9-11* displayed generation times (G = 28, 32, 32, 32 min, respectively) close to those of WT.

Morphological characteristics of mutants: LMG 18311 WT and cell surface mutants were observed with scanning and transmission electron microscopy (SEM/TEM) in order to characterize the cell, surface and chain morphology. LMG 18311 WT cells displayed a homogenous size and were assembled in typical ovococci chains, with septa formed in successive parallel planes perpendicular to the chain axis (Fig. 1). In WT cells, exopolysaccharides appeared as disseminated white spots at the cell surface when using SEM (black arrows in Fig.1A, first line) and as amorphous structures surrounding cells when using TEM (black arrows in Fig.1A, second line). All the mutants shared these characteristics except the *ΔepsE* and *Δeps9-11* mutants (Fig. 1A), thus confirming that these mutants are lacking exopolysaccharides. It also appeared that wall teichoic and lipoteichoic acids mutants displayed an aberrant pattern of septation and cell separation during division (Fig. 1B). Furthermore, two mutants (*ΔtagO-like*, *ΔdltA*) formed aggregates when compared to WT (data not shown).

Finally, the two mutants linked to EPS biosynthesis (*ΔepsE* and *Δeps9-11*) exhibited a distinguishable phenotype of sedimentation in liquid culture compared to WT (Fig. 2). This phenotype was likely linked to the number of cells per chains of these mutants, which was greater than WT, as observed by phase-contrast microscopy (Fig 2).

Cell surface charge of mutants: in order to characterize the impact of mutations on the global charge of the cell surface envelope, the Zeta potential of mutants was compared to the one of WT at various pHs. At very acidic pH (around pH 2), the Zeta potential of *ΔepsE* and *Δeps9-11* mutants differed from those of WT and other mutants with a more positively

charged Zeta potential (close to 10 mV compared to less than 5 mV) (Fig. 3). The Zeta potential of WT and mutants was negative at the three tested pH 5, pH 7 and pH 9. At these latter pHs, the $\Delta epsE$ and $\Delta eps9-11$ mutants displayed a more negative zeta potential than the WT and other mutants (Fig. 3).

Biofilm-forming abilities of mutants: since bacteria mostly live in community in biofilms rather than in planktonic lifestyle, and based on the suspicion of a better transfer rate in such growth conditions, the biofilm formation of WT and mutants was assessed in polystyrene 96 well plates. Biofilm formation was evaluated after different time lapses (2 h, 6 h and 15 h) and characterized two times: before and after rising to test the robustness of the formed biofilms. The quantitative comparison of biofilm biovolumes showed diversity in biofilm formation compared to WT. Before rising, the $\Delta yfnI$ -like mutant showed a significant higher biofilm biovolume compared to WT after 6 h of growth (Fig. 4-A). After 15 h of growth, all mutants, except $\Delta mprF$ -like, showed at least a 2-fold higher biofilm biovolume compared to WT (Fig. 4-A). After rising of the well plates, the $\Delta lspA$ mutant stood out from the WT and other mutants as shown by the robustness of its biofilm structure with a 7-fold higher biofilm biovolume after 15 h of growth compared to WT (Fig. 4-B). Two other mutants (e.g. $\Delta dltA$, and $\Delta stu1482-rgpX2$) also displayed a robust biofilm structure compared to WT after 15 h growth (Fig. 4-B).

Conjugative transfer of ICESt3 using mutated recipients

To test whether the cell surface properties impact the transfer of ICESt3, mating experiments were first carried out using mutated recipient cells as detailed in Table 1.

(I) Mating experiments using recipient cells affected in protein exposure ($\Delta srtA$ and $\Delta lspA$ mutants): strain LMG 18311 harbors a truncated *srtA* gene and three pseudogenes of LPxTG proteins. An efficient transfer was observed using this strain both as donor or

219 recipient in conjugation experiments. This indicates that LPxTG proteins are not essential for
220 transfer and acquisition of ICES $t3$. Experiments were also carried out using the LMD-9 strain
221 of *S. thermophilus*, which harbors a functional sortase A protein and exposes at its surface
222 three LPxTG proteins. The LMD-9 $\Delta srtA$ mutant is a strain with a sortase A gene that was
223 interrupted to inhibit the synthesis of SrtA (32). No significant difference in ICES $t3$
224 acquisition was observed when using WT LMG 18311(ICES $t3$) Cm^r as donor and LMD-9
225 $\Delta srtA$ Ery^r or LMD-9(pMG36e) Ery^r as recipient (Fig. 5).

226 By contrast, mutation of LspA in LMG 18311 showed a 100-fold increase of ICES $t3$
227 acquisition compared to a WT recipient strain (*i.e.* LMG 18311 Ery^r) ($p < 0.01$, t-test) (Fig.
228 6A).

229 **(II) Mating experiments using recipient cells affected in wall teichoic acids ($\Delta tagO$ -like**
230 **mutant) and lipoteichoic acids ($\Delta yfnI$ -like mutant) exposure:** the $\Delta tagO$ -like and $\Delta yfnI$ -like
231 mutants showed a 40- and 100-fold increase of ICES $t3$ acquisition ($p < 0.01$, t-test)
232 respectively compared to a WT recipient strain (Fig. 6A).

233 **(III) Mating experiments using recipient cells that could be affected in cell surface**
234 **charge ($\Delta mprF$ -like and $\Delta dltA$ mutants):** an increase of ICES $t3$ acquisition, albeit lower than
235 those observed for the other mutants (approximately 5-fold, $p < 0.05$, t-test), was observed
236 using the $\Delta mprF$ -like mutant compared to WT (Fig. 6A). For the $\Delta dltA$ mutant, an increase
237 similar to the one observed for the WTA mutant (approximately 40-fold, $p < 0.01$, t-test) was
238 observed (Fig. 6A).

239 **(IV) Mating experiments using recipient cells affected in cell surface polysaccharide**
240 **production:** a 400-fold increase of ICES $t3$ acquisition was obtained for mutants lacking
241 genes or group of genes belonging to the same cluster and involved in glycosyltransferase
242 activity (*epsE*, *eps11* and *eps10*), or pyruvyltransferase activity (in case of *eps9*) ($p < 0.01$, t-
243 test) (Fig. 6A). In these conditions, the frequency of ICES $t3$ transfer was close to 10^{-1}

transconjugant per donor cells. By contrast, a mutant affected in rhamnase-glucose polysaccharide production (Δ stu1482-*rgpX2*), showed no significant difference in ICESt3 acquisition compared to WT recipient cells (Fig. 6A).

Conjugative transfer of ICESt3 using mutated donor cells

In order to investigate whether the phenotypes observed for the mutants are specific to the recipient cells and/or to ICESt3 activity, mating experiments were also carried out using mutated donor cells.

Mating experiments were carried out using selected LMG 18311 mutants (Δ *lspA*, Δ *tagO-like*, Δ *yfnI-like*, Δ *mprF-like*, Δ *dltA*, Δ *epsE*, Δ *esp9-11*) carrying ICESt3 as donor cells (obtained in experiments mentioned in preceding paragraph) and WT LMG 18311 Spc^r strain as recipient cells (see Table 1).

While the mutation of these cell surface molecules in the recipient led to a 5 to 400-fold increase of ICESt3 acquisition compared to WT, the same mutations in the donor cells led to a significant decrease of ICESt3 transfer (ranging from less of 10- to 25-fold) compared to WT ($p < 0.01$, t-test) (Fig. 6B).

Conjugative transfer of ICESt3 using a mutant/mutant mating pair

To test whether the observed effects of mutations in the donor or recipient cells were additive, mating experiments using mutated donor and recipient cells were also carried out.

The results showed a decrease of ICESt3 transfer when lipoproteins, teichoic acids, lipoteichoic acids or exopolysaccharides were affected in both the donor and recipient cells. These results were close to the ones obtained when only the donor strain is mutated. Hence, no additive effect between the donor mutation and the recipient mutation was observed (Fig. 6C).

DISCUSSION

Our results highlight a significant impact of cell surface molecules on the conjugation of ICES_{St3} of *S. thermophilus*. Deletion of *lspA*, *tagO-like*, *yfnI-like*, *epsE* and *eps9-11* genes or cluster of genes coding for various cell surface molecules in the recipient led to an increase of ICES_{St3} acquisition. Thus, it appears that the covalent linkage of mature lipoproteins and the presence of teichoic acids and exopolysaccharides inhibit ICES_{St3} acquisition by recipient cells. Taken as a whole, it appears that the fewer surface molecules, the better conjugation efficiency is, at least when considering the recipient cell. This would be intelligible regarding the important mass and networks that components such as teichoic acids and exopolysaccharides represent in the Gram-positive cell surface envelope (18). The lack or reduction of these components could significantly reduce the steric hindrance of the cell envelope, thus describing the picture of a poorly overloaded surface that may be suitable for the peptidoglycan hydrolysis activity of the ICES_{St3} hydrolase OrfA, but also for the assembly of the conjugation machinery. Furthermore, all of these cell surface components are known to contribute to bacterial interactions, and thus the higher frequency of ICES_{St3} transfer could be imputable to better cell-to-cell interactions between donor and recipient cells that can occur through the modification of physical-chemical properties of the cell envelope.

Characterization of the mutants revealed some phenotypes that could stand as plausible hypotheses explaining the observed impact of mutations on ICES_{St3} conjugation. Since biofilms likely represent a suitable environment for lateral gene exchanges (33), the biofilm-forming ability of mutants was assessed in this study. Thus, $\Delta lspA$ mutant but also $\Delta tagO-like$, $\Delta yfnI-like$, $\Delta dltA$, $\Delta epsE$ and $\Delta eps9-11$ showed higher biovolumes and ability of interactions during biofilm assays compared to WT. Furthermore, LMG 18311 $\Delta lspA$ mutant stood out from the WT and derivatives by the robustness of its biofilm-forming ability, thus suggesting a higher cell-to-cell interaction for this mutant. Although it is complicated to

define for each mutant whether these properties contribute to enhance ICES_{St3} acquisition, they stand as a plausible hypothesis that does not exclude the intervention of other factors.

(I) Lipoproteins: LMG 18311 $\Delta lspA$ is expected to be affected in its Lpps content, as observed in *Streptococcus sanguinis* $\Delta lspA$ mutant whose Lpps show a partial activity (34). In *Streptococcus uberis*, a type I peptidase signal Eep seems to substitute the cleavage activity of LspA (35) suggesting the possibility that an alternative pathway take place in a $\Delta lspA$ mutant. Genome analysis of LMG 18311 predicted the presence of two type I peptidase signal (15) but it is not known whether these proteins could be involved in Lpp maturation in a $\Delta lspA$ mutant context. LMG 18311 $\Delta lspA$ showed a high increase (up to 100-fold) of ICES_{St3} acquisition. LMG 18311 harbors 24 predicted lipoproteins which presence could interfere with the conjugation machinery assembly. Among these 24 predicted lipoproteins, 15 are involved in the binding of substrates of ABC transporters, whereas others are involved in unknown functions (15). We cannot exclude that a molecular interaction between one or several of these lipoproteins and components of the conjugation machinery could lie behind the inhibition of ICES_{St3} transfer efficiency.

(II) Wall teichoic acids: TagO and TarO homologs are described as essential for wall teichoic acid biosynthesis in *B. subtilis* and *S. aureus* (36, 37). LMG 18311 $\Delta tagO$ -like is thus expected to show a lack of WTA. The $\Delta tagO$ -like mutant showed an approximately 40-fold increase of ICES_{St3} acquisition by recipient cells. SEM and contrast microscopies analyses showed a formation of aggregates of LMG 18311 $\Delta tagO$ -like compared to WT, as described in other species such as *S. aureus* (37). This phenotype could contribute to the success of donor/recipient cell contacts, thus explaining a better ICES_{St3} acquisition efficiency for this mutant.

(III) Lipoteichoic acids: the *yfnI*-like gene product is the only LTA synthase identified in our *in silico* analysis. Therefore, the disruption of this gene is expected to abrogate, or at least to

319 reduce LTA presence in LMG 18311 cell envelope. As in *B. subtilis* for ICEBsI acquisition
320 (8), the $\Delta yfnI$ -like mutant of *S. thermophilus* LMG 18311 showed an increased propensity for
321 ICESt3 acquisition. The much higher impact of *yfnI*-like mutation on ICESt3 transfer
322 (approximately 100-fold) than for ICEBsI acquisition (less than 10-fold) could be explained
323 by the fact that two additional enzymes, LtaSBS and YqgS are involved with YfnI in LTA
324 biosynthesis in *B. subtilis*. Thus, *yfnI* deletion in both these species is not expected to trigger
325 the same phenotypes. This can also be linked to the difference of transfer frequency between
326 ICEBsI and ICESt3, thus making ICEBsI more prone to saturation.

327 We also investigated the impact of an *mprF* mutation on ICESt3 acquisition by the recipient
328 cells. Unlike ICEBsI and Tn916 (9), the $\Delta mprF$ -like mutant showed an increase of ICESt3
329 acquisition, although at lesser extent compared to the other mutants. As suggested by Johnson
330 and Grossman, MprF impacts the level of lysyl-phosphatidylglycerol, a positively charged
331 molecule that could be involved in cell buffering in the various environmental conditions
332 encountered by the bacteria (8). Specific environmental growth conditions and cell surface
333 charge of *S. thermophilus* could explain these observed differences, suggesting a species
334 dependent impact of lysyl-phosphatidylglycerol on conjugation.

335 **(IV) D-alanylation of teichoic acids content:** WTA and LTA are known to be negatively
336 charged polymers due to their exhibition of phosphodiester linkages, however little is known
337 about cell envelope composition of *S. thermophilus* regarding its teichoic acid content. One
338 hypothesis could be that the observed impacts on ICESt3 transfer and acquisition are partly
339 linked to the negative charges carried by the WTA and LTA polymers. The absence of these
340 molecules would make the cell envelope less negatively charged hence contributing to better
341 interactions with the donor that is negatively charged. To test whether WTA and LTA impacts
342 are linked to cell surface charge, ICESt3 transfers were assessed using a $\Delta dltA$ mutant as
343 recipient. The *dltA* gene belongs to the *dlt* operon which is responsible for the D-alanylation

of both WTA and LTA thus neutralizing their negative charge and making the whole polymers zwitterionic, or at least reducing them. It has been described that a *dltA* mutation is sufficient to impair D-alanylation of WTA and LTA in *B. subtilis* (23). Thus, LMG 18311 $\Delta dltA$ is expected to expose at its surface fully negatively charged WTA and LTA polymers. However, the $\Delta dltA$ mutant showed a similar increase of ICESt3 acquisition than a $\Delta tagO$ -like mutant (approximately 40-fold increase for both comparing to WT), but lower than the $\Delta yfnI$ -like mutant (approximately 100-fold increase comparing to WT) which is not consistent with this hypothesis. However, we cannot exclude that the $\Delta dltA$ effect could be tied to the lack of D-alanylation of another cell envelope component. Furthermore, no measurable difference of Zeta potential was detected between WT, $\Delta dltA$, $\Delta tagO$ -like and $\Delta yfnI$ -like in the tested conditions suggesting that the change of surface charge is minor in these mutants, which can be explained by the following hypotheses: (i) LTA and WTA in *S. thermophilus* LMG 18311 could harbor a carbon backbone poorly loaded in phosphoglycerol repeat units and (ii) LMG 18311 could display very few amount of LTA and WTA at its surface thus explaining the absence of significant change in cell surface net charge. However, this could also indicate that not all teichoic acids were removed by these mutations. These results also highlight that the increase of ICESt3 acquisition observed when recipient is affected in WTA or LTA biosynthesis is not linked to the negative charges that both these polymers could confer to the bacteria. Moreover, the same impact on ICESt3 acquisition observed for both $\Delta dltA$ and $\Delta tagO$ -like mutants could be linked to the formation of aggregates, thus enhancing the cell-to-cell interactions of both these mutants.

(V) Exopolysaccharides: Several genes belonging to a large gene cluster involved in EPS biosynthesis were mutated in LMG 18311. These mutants showed the highest increase of ICESt3 acquisition with a transfer frequency reaching 10^{-1} transconjugant per donor cell. Unlike *S. thermophilus* teichoic acids, EPS are well documented and it has been described

that the lack of the EpsE glycosyltransferase leads to a lack of EPS at *S. thermophilus* cell surface (30). We confirmed this observation by SEM and TEM since EPS is absent from the cell surface of $\Delta epsE$ and $\Delta eps9-11$ mutants. Liquid culture of these mutants showed sedimentation following growth, which could be a consequence of the chain length increase of these mutants compared to WT. Hence, this phenotype could explain the impact on ICES_{St3} conjugation since the increase in chain length reflects an increase of cell/cell contacts and interactions, thus enhancing ICE transfer and retransfer within the same chain. This also argues in favor of conjugation occurring at the poles of the bacterial cell as in *Bacillus subtilis* (38). EPS mutants show a significant change in cell surface charge compared to WT and the other mutants. This phenotype could originate from the presence of phosphate and acetate components that may be attached to the EPS backbone. Hence, this phenotype could increase electrostatic interactions thus enhancing the ability of ICES_{St3} acquisition. The $\Delta stu1482$ -*rgpX2* did not show any significant difference in ICES_{St3} acquisition compared to WT, suggesting that the products of these genes predicted to be involved in polysaccharide production do not contribute to synthesis of exopolysaccharides. This is consistent with the SEM characterization of this mutant that still indicates white spots corresponding to EPS at its cell surface.

(VI) LPxTG proteins: the mutation of *srtA* in LMD-9 did not have any significant impact regarding ICES_{St3} acquisition compared to WT, thus suggesting that the covalent linkage of LPxTG proteins to the cell membrane does not interfere with DNA transport inside the recipient cell.

Mutations affecting cell surface composition were also tested in a donor context instead of a recipient one. Our results indicate that the impact of mutations is different when the donor cell is targeted. Since the same strain was used, this difference in behavior is likely linked to the

donor or recipient “status” in link with ICE*St3* activity. Hence, Δ *lspA*, Δ *tagO-like*, Δ *yfnI-like*, Δ *epsE* and Δ *eps9-11* donor mutants were not able to efficiently transfer ICE*St3* towards WT recipient cells. These results suggest that lipoproteins, wall teichoic acids, lipoteichoic acids and exopolysaccharides are important to the donor cell for an efficient transfer of ICE*St3*, likely for the proper positioning and/or assembly of the conjugative pore.

The transfer frequencies of ICE*St3* using Δ *lspA*, Δ *tagO-like*, Δ *yfnI-like* and Δ *epsE* mutated donors also decreased even towards mutated recipient cells (carrying the same mutation). This supports the previous suggestion that these molecules are important for an efficient ICE*St3* transfer from the donor cells. No obvious additive effect between donor and recipient mutations was observed, thus suggesting that (i) the effect of a donor mutation is dominant and (ii) the inhibition occurs prior to ICE*St3* entry in the recipient cell. This would be in favor of a direct impact of these molecules on the assembly of the conjugation machinery in the donor cell envelope. Hence the phenotypes of transfer observed when donor is mutated in these cell surface molecules are likely linked to the activity of ICE*St3* and are therefore not dependent of host factors, since the same strain was used when only the recipient cell was mutated.

This study contributes to a better understanding of the impact of host factors on conjugation, but further studies are needed to decipher how these factors precisely interfere with the transfer of conjugative elements.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and culture conditions

The strains used in this study are listed in Table 1. *S. thermophilus* LMG 18311, LMD-9 and their derivatives were grown in M17 broth supplemented with 0.5% lactose (LM17) at 42°C without shaking. When required, cultures were supplemented with antibiotics at the following concentrations: chloramphenicol 6 µg ml⁻¹, erythromycin 5 µg ml⁻¹, spectinomycin 500 µg ml⁻¹.

Construction of mutants affected in cell surface composition

S. thermophilus LMG 18311 WT was used to construct cell surface mutants. For each targeted molecule, the gene sequence was deleted by insertion of an erythromycin resistance cassette by overlap PCR as described previously (39). PCRs were performed with 50 ng of genomic DNA, 200 µM of each deoxynucleotide triphosphate (dNTP), 0.5 µM of each primer (for primer sequences, see Table 2) and 0.02 U µl⁻¹ of Phusion high-fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific) in appropriate buffer per 50 µl reaction volume. Cycling conditions for the overlap PCR were: 3 min at 98°C, 30 s at annealing temperature (with 1°C of incrementation at each cycle), 30 s/kb at 72°C, followed by 30 additional cycles with an annealing temperature of 55°C and a final extension of 10 min at 72°C. PCR products were then used for natural transformation of LMG 18311. The same steps were followed for chromosomal tagging of LMG 18311 strain with two different resistance genes (erythromycin or spectinomycin resistance gene, see Table 1). These resistance cassettes were inserted in an intergenic region between two convergent ORFs of *S. thermophilus* genome (13): *stu0627* and *stu0629*. LMD-9 (pMG36e) was obtained by natural transformation of LMD-9 with purified extract of pMG36e using a previously described protocol (39).

The pSL1180 spec vector was obtained by cloning a SpeI-SpeI spectinomycin resistance cassette at the AvrII site of pSL1180. The SpeI-SpeI spectinomycin resistance cassette was

amplified from the pSET4S plasmid using the Spec-lox71-SpeI F and Spec-lox66-SpeI R primers (Table 2) that introduce SpeI sites upstream and downstream the resistance cassette.

Mating experiments

S. thermophilus LMG 18311, whose genome sequence is available, was chosen for mutant construction. This strain was previously successfully used as recipient cells of ICE*St3* using the original donor strain CNRZ385 (at a frequency of 10^{-6} transconjugant per donor cell), but can also act as a donor transferring ICE*St3* at the same frequency (10). In order to avoid interference with host factors, LMG 18311 was used both as donor and recipient in mating experiments. Depending on the mating pair used, derivatives of strain LMG 18311 tagged either with an erythromycin or spectinomycin resistance gene were used as recipients (see Table 1). The mating pair using LMG 18311 (ICE*St3*) donor strain with these recipient strains was considered as a WT mating pair (transfer frequency of ICE*St3* of 10^{-4} transconjugants per donor cell), and the term mutant was used for the cells affected in their cell surface composition.

Donor and recipient strains were grown overnight with an appropriate antibiotic. Fifteen ml of broth medium were inoculated with 150 μ l of donor or recipient stationary phase cultures. Cultures were grown until mid-exponential phase (optical density at 600 nm of 0.4), then were mixed and centrifuged for 15 min in a prewarmed centrifuge at $4,200 \times g$ to pellet cells. The pellet was resuspended in 1 ml of LM17 broth and 150 μ l were spread on 0.45 μ m pore-size cellulose nitrate filters (Millipore) deposited on LM17 soft agar (0.8 %) plates. Plates were then incubated at 42°C. After an overnight incubation, the filters were removed from the agar plates and placed into 10 ml of LM17 liquid media. Bacteria were recovered by vortexing for 30 s. The suspension was then directly spread on agar plates supplemented with the appropriate antibiotic to enable counting the CFUs of the donor, of the recipient, and of the transconjugants cells after a 24h-incubation.

Mating frequencies were calculated by dividing the number of transconjugants by the number of donor cells. At least three independent biological repetitions were done on two independent transformants. Statistical analysis was carried out by using a student's t-test.

Determination of bacterial cell wall zeta potential

Bacterial cells from overnight cultures were harvested by centrifugation (5 min at 7000 g), washed twice with demineralized water and suspended in demineralized water. To break bacterial chains, cells were vortexed for 3 min. Electrophoretic mobility measurements were done by suspending the bacterial strains in 3 ml of 10 mM potassium phosphate buffers with the pH ranging from 2 to 9 to obtain an OD₆₀₀ of 0.07. The electrophoretic mobility at 150 V of the suspended bacteria was then measured using the ZetaSizer Nano ZS apparatus (Malvern Instruments Ltd., Malvern, UK). Electrophoretic mobilities were converted to the zeta potentials using the Helmholtz-Smoluchowski equation. At least three independent biological replicates were done.

Transmission electron microscopy

For each strain, 50 ml of planktonic bacteria grown until the end of exponential growth were pelleted at 2 000 rpm for 10 min at 4°C. Samples were then fixed for 1 h at room temperature in a 0.1 M cacodylate buffer containing 2% (v/v) glutaraldehyde (pH 7.2). Samples were kept overnight at 4 °C in a 0.1 M cacodylate and 0.2 M sucrose buffer. Bacteria were then washed one time during 5 min with 0.1 M cacodylate buffer, contrasted during 1 h with 0.5% OTE in 0.1 M cacodylate buffer, and washed 2 times during 5 min with 0.1 M cacodylate buffer. Samples were post-fixed for 1 h at room temperature in 0.1 M cacodylate buffer containing 1 % (v/v) osmium tetroxide with 1.5% potassium cyanoferrate, and washed twice for 5 min with distilled water. Thereafter cells were dehydrated in a gradual ethanol series (30 %, 50 %, 70 %, 90 % v/v with distilled water, and 3 times with 100 % ethanol, 10 min for each step, except overnight for 70%). A 10 min intermediate bath in propylene oxide was performed.

Then, bacteria were impregnated at room temperature in successive mixes of propylene oxide and epon (2:1; 1:1 and 1:2, for 2 h each step), in pure epon overnight and in vacuum conditions. A final inclusion bath with pure epon and DMAE (accelerator) was performed and polymerization was allowed by incubating for 48 h at 60 °C. Ultrathin sections of 70 nm were cut with an ultramicrotome (UC6, Leica, Germany) and deposited on 200 mesh copper platinum grids. Sections were stained for 2 min in Reynolds lead citrate and rinsed in distilled water. Observations were performed using an HT7700 transmission electron microscope (Hitachi, Japan) equipped with an 8 million pixels format CCD camera driven by the image capture engine software AMT, version 6.02, at the INRA MIMA2 microscopy platform (Jouy-en-Josas, France). Images were made at 80 kV in high contrast mode with an objective aperture adjusted for each sample and magnification.

Scanning electron microscopy

Bacterial suspensions, collected at the end of exponential growth, were immersed in a fixative solution (2,5% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4), deposited on sterile cover-glasses discs (Marienfeld, VWR, France) and stored 1 hour at room temperature and overnight at 4°C. The fixative was removed, and samples were rinsed three times for 10 min in the sodium cacodylate solution (pH 7.4). The samples underwent progressive dehydration by soaking in a gradual ethanol series (50 to 100%) before critical-point drying under CO₂. Samples were mounted on aluminum stubs (10 mm diameter) with carbon adhesive discs (Agar Scientific, Oxford Instruments SAS, Gometz-La-Ville, France) and sputter coated with platinum (Polaron SC7640, Elexience, Verrières-le-buisson, France) for 200 s at 10 mA. Samples were visualized by field emission gun scanning electron microscopy. They were viewed as secondary electron images (2 kV) with a Hitachi S4500 instrument (Elexience, Verrières-le-buisson, France). Scanning Electron Microscopy analyses

were performed at the Microscopy and Imaging Platform MIMA2 (INRA, Jouy-en-Josas, France).

Biofilms evaluation by laser scanning confocal microscopy (LSCM)

Biofilms were formed in polystyrene 96-well microtiter plates with a µclear base (Greiner Bio-one, France), enabling high-resolution fluorescence imaging, as previously described (40). A volume of 200 µl of an overnight culture in LM17 (adjusted to an optical density at 600 nm of 0.01) was added to the wells of a microtiter plate. The microtiter plate was then kept at 42°C for 60 min to allow the bacteria to adhere to the bottom of the wells. After this adhesion step, the wells were rinsed with the growth medium to eliminate any non-adherent bacteria and then refilled with 200 µl of LM17. The microtiter plate was then incubated at 42°C for 2, 6 or 15 hours, and rinse or not with a microplate autowasher (Thermofisher Wellwash) before microscopic evaluation. Bacterial cells were fluorescently stained in green with the nucleic acid marker SYTO9 (1:500 dilution in LM17 from a SYTO9 stock solution at 5 mM in dimethyl sulfoxide [DMSO]; Invitrogen, France). After 20 min of incubation in the dark to enable fluorescent labeling of the bacteria, the plate was mounted on the motorized stage of the confocal microscope (Leica SP8 AOBS inverter confocal laser scanning microscope at the MIMA2 platform, www6.jouy.inra.fr/mima2_eng/). The microtiter plates were scanned using a 63×/1.2-numerical-aperture (NA) water immersion objective lens and scanned at excitation wavelengths of 488 nm (argon laser; 3% intensity), with emission wavelengths collected from 493 to 550 nm using hybrid detectors (HyD Leica Microsystems, Germany). Three-dimensional (3D) projections of the biofilm structures before and after the washing step were reconstructed using the Easy 3D function of the IMARIS software (Bitplane, Switzerland) and the biofilm biovolume (in µm³) extracted from image series using the imageJ COMSTAT2 plugin (www.comstat.dk, (41)).

Genome analysis

541 Search of homologs of *B. subtilis* proteins involved in LTA, WTA and lysyl-
542 phosphatidylglycerol biosynthesis was carried out on *S. thermophilus* genomes LMG 18311,
543 TH1435, CNRZ1066, TH1477, JIM8282 using BlastP analysis with default parameters and
544 filter disabled.

545

546 **ACKNOWLEDGMENTS**

547 We thank Sophie Bobet and Johan Staub for the construction of mutant strains, Alexis Canette
548 for TEM observations and UR AFPA laboratory for providing the *srtA* mutant.

549

550 **FUNDING INFORMATION**

551 N.D. is recipient of a scholarship funded by INRA and Région Grand Est.

552 This work received financial support from the Région Lorraine and Université de Lorraine
553 (2011–2013) and from ANR (MATICE project, ANR-15-CE21-0007).

REFERENCES

1. Koonin E V. 2016. Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions. *F1000Research* 5:1805.
2. García-Aljaro C, Ballesté E, Muniesa M. 2017. Beyond the canonical strategies of horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 38:95–105.
3. Llosa M, Gomis-Ruth FX, Coll M, Cruz F de la. 2002. Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol Microbiol* 45:1–8.
4. Bellanger X, Payot S, Leblond-Bourget N, Guédon G. 2014. Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol Rev* 38:720–760.
5. Johnson CM, Grossman AD. 2015. Integrative and Conjugative Elements (ICEs): what they do and how they work. *Annu Rev Genet* 49: 577-601.
6. Delavat F, Miyazaki R, Carraro N, Pradervand N, van der Meer JR. 2017. The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiol Rev*, 41:512-537.
7. Carraro N, Burrus V. 2014. Biology of three ICE families: SXT/R391, ICEBsI, and ICESt1/ICESt3. *Microbiol Spectr* 2:1–20.
8. Johnson CM, Grossman AD. 2016. The composition of the cell envelope affects conjugation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 198:1241–9.
9. Johnson CM, Grossman AD. 2014. Identification of host genes that affect acquisition of an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 93:1284-1301.
10. Bellanger X, Roberts AP, Morel C, Choulet F, Pavlovic G, Mullany P, Decaris B, Guédon G. 2009. Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICESt1 and ICESt3 from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* 191:2764–2775.
11. Carraro N, Libante V, Morel C, Decaris B, Charron-Bourgoin F, Leblond P, Guédon G. 2011. Differential regulation of two closely related integrative and conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*. *BMC Microbiol*, 11:238.
12. Delorme C, Abraham A-L, Renault P, Guédon E. 2015. Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. *Infect Genet Evol*, 33:381-392.
13. 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.
14. Couvigny B, Thériat C, Gautier C, Renault P, Briandet R, Guédon E. 2015. *Streptococcus thermophilus* biofilm formation: a remnant trait of ancestral commensal life? *PLoS One* 10:e0128099.
15. Hols P, Hancy F, Fontaine L, Grossiord B, Prozzi D, Leblond-Bourget N, Decaris B, Bolotin A, Delorme C, Duskoehrich S, Guédon E, Monnet V, Renault P, Kleerebezem M. 2005. New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* 29:435–463.

- 595 16. Siegel SD, Reardon ME, Ton-That H. 2017. Anchoring of LPXTG-like proteins to the
596 Gram-positive cell wall envelope. *Curr Top Microbiol Immunol* 404:159–175.
- 597 17. Buddelmeijer N. 2015. The molecular mechanism of bacterial lipoprotein modification-
598 -how, when and why? *FEMS Microbiol Rev* 39:246–261.
- 599 18. Burgain J, Scher J, Francius G, Borges F, Corgneau M, Revol-Junelles AM, Cailliez-
600 Grimal C, Gaiani C. 2014. Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization
601 and interactions with food matrix components. *Adv Colloid Interface Sci* 213:21–35.
- 602 19. Chapot-Chartier M-P, Kulakauskas S. 2014. Cell wall structure and function in lactic
603 acid bacteria. *Microb Cell Fact* 13 Suppl 1:S9.
- 604 20. Schade J, Weidenmaier C. 2016. Cell wall glycopolymers of Firmicutes and their role
605 as nonprotein adhesins. *FEBS Lett* 590:3758–3771.
- 606 21. Wörmann ME, Corrigan RM, Simpson PJ, Matthews SJ, Gründling A. 2011.
607 Enzymatic activities and functional interdependencies of *Bacillus subtilis* lipoteichoic
608 acid synthesis enzymes. *Mol Microbiol* 79:566–83.
- 609 22. Gründling A, Schneewind O. 2007. Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in
610 *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8478–83.
- 611 23. Perego M, Glaser P, Minutello A, Strauch MA, Leopold K, Fischer W. 1995.
612 Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus*
613 *subtilis*. Identification of genes and regulation. *J Biol Chem* 270:15598–606.
- 614 24. Miyauchi E, Morita M, Rossi M, Morita H, Suzuki T, Tanabe S. 2012. Effect of D -
615 alanine in teichoic acid from the *Streptococcus thermophilus* cell wall on the barrier-
616 protection of intestinal epithelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 76:283–288.
- 617 25. Rehm BHA. 2010. Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications.
618 *Nat Rev Microbiol* 8:578–592.
- 619 26. Schmid J, Sieber V, Rehm B. 2015. Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis
620 pathways and engineering strategies. *Front Microbiol* 6:1–24.
- 621 27. Ren W, Xia Y, Wang G, Zhang H, Zhu S, Ai L. 2016. Bioactive exopolysaccharides
622 from a *S. thermophilus* strain: screening, purification and characterization. *Int J Biol*
623 *Macromol* 86:402–407.
- 624 28. Pachekrepapol U, Lucey JA, Gong Y, Naran R, Azadi P. 2017. Characterization of the
625 chemical structures and physical properties of exopolysaccharides produced by various
626 *Streptococcus thermophilus* strains. *J Dairy Sci.* 100(5):3424–3435.
- 627 29. De Vuyst L, Weckx S, Ravyts F, Herman L, Leroy F. 2011. New insights into the
628 exopolysaccharide production of *Streptococcus thermophilus*. *Int Dairy J* 21:586–591.
- 629 30. Minic Z, Marie C, Delorme C, Faurie JM, Mercier G, Ehrlich D, Renault P. 2007.
630 Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis
631 in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase. *J Bacteriol* 189:1351–1357.
- 632 31. Webb AJ, Karatsa-Dodgson M, Gründling A. 2009. Two-enzyme systems for
633 glycolipid and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid synthesis in *Listeria*
634 *monocytogenes*. *Mol Microbiol* 74:299–314.
- 635 32. Kebouchi M, Galia W, Genay M, Soligot C, Lecomte X, Awussi AA, Perrin C, Roux

- E, Dary-Mourot A, Le Roux Y. 2016. Implication of sortase-dependent proteins of *Streptococcus thermophilus* in adhesion to human intestinal epithelial cell lines and bile salt tolerance. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:3667–3679.
33. Molin S, Tolker-Nielsen T. 2003. Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* 14:255–261.
34. Das S, Kanamoto T, Ge X, Xu P, Unoki T, Munro CL, Kitten T. 2009. Contribution of lipoproteins and lipoprotein processing to endocarditis virulence in *Streptococcus sanguinis*. *J Bacteriol* 191:4166–79.
35. Denham EL, Ward PN, Leigh JA. 2008. Lipoprotein signal peptides are processed by Lsp and Eep of *Streptococcus uberis*. *J Bacteriol* 190:4641–7.
36. D’Elia MA, Millar KE, Beveridge TJ, Brown ED. 2006. Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 188:8313–6.
37. Vergara-Irigaray M, Maira-Litrán T, Merino N, Pier GB, Penadés JR, Lasa I. 2008. Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Microbiology* 154:865–77.
38. Auchtung JM, Aleksanyan N, Bulku A, Berkmen MB. 2016. Biology of ICEBsI, an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 86:14–25.
39. Dahmane N, Libante V, Charron-Bourgoin F, Guédon E, Guédon G, Leblond-Bourget N, Payot S. 2017. Diversity of integrative and conjugative elements of *Streptococcus salivarius* and their intra- and interspecies transfer. *Appl Environ Microbiol* 83:AEM.00337-17.
40. Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Boubetra A, Thomas V, Briandet R. 2010. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J Microbiol Methods* 82:64–70.
41. Givskov M, Hentzer M, Ersbøll BK, Heydorn A, Sternberg C, Nielsen AT, Molin S. 2000. Quantification of biofilm structures by the novel computer program comstat. *Microbiology* 146:2395–2407.
42. van de Guchte M, van der Vossen JM, Kok J, Venema G. 1989. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* 55:224–8.
43. Maguin E, Prévost H, Ehrlich SD, Gruss A. 1996. Efficient insertional mutagenesis in lactococci and other gram-positive bacteria. *J Bacteriol* 178:931–5.
44. Takamatsu D, Osaki M, Sekizaki T. 2001. Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* 46:140–148.

LEGENDS OF FIGURES

Fig. 1 SEM and TEM observations of LMG 18311 WT and mutants

A, SEM observations with original magnification of x50.000 (upper) and TEM observation with original magnification of x10.000 (bottom) for each strain. Black arrows indicate EPS.

B, TEM observations with original magnification of x2500 (upper) and x10.000 (bottom) for each strain.

Fig. 2 Sedimentation and chain length of LMG 18311 WT and EPS mutants.

Picture of standing LM17 cultures and phase-contrast microscopy of LMG 18311, $\Delta epsE$ and $\Delta eps9-11$ strains. Photographs were taken after 8 h of growth at 42°C in LM17 medium. Original magnification x400.

Fig. 3 Zeta potential values of LMG 18311 and mutants at pH 2, 3, 5, 7 and 9.

Fig. 4 Biofilm biovolumes of LMG 18311 mutants relative to WT after 2, 6 and 15 h of growth, before (A) and after (B) rising of the polystyrene microplates.

Bars show standard errors of the means.

Fig. 5 Conjugative transfer of ICES $t3$ using recipient cells mutated in sortase A gene.

Conjugation frequency value of LMD-9 $\Delta srtA$ relative to WT (LMD-9(pMG36e)). Means and standard deviation result from at least 3 biological repetitions.

Fig. 6 Conjugative transfer of ICES $t3$ from and/or towards mutants.

Conjugation frequencies values of LMG 18311 mutants relative to WT. A, conjugative transfer of ICES $t3$ using a WT donor and a mutated recipient; B, conjugative transfer of ICES $t3$ using a mutated donor and a WT recipient; C, conjugative transfer of ICES $t3$ using a mutated donor and a mutated recipient. For each experiment, means and standard deviation result from at least 3 biological repetitions on 2 independent clones of mutants. *, the conjugation frequency is statistically different from that of WT with $p < 0.05$; **, the conjugation frequency is statistically different from that of WT with $p < 0.01$.

697 **TABLE 1.** Bacterial strains and plasmid used in this study

Strains and plasmid	Relevant phenotypes	Source or references
Strains		
LMG 18311	Wild-type strain	
LMG 18311 (ICE <i>St3</i>)	LMG 18311 carrying ICE <i>St3</i> tagged with a chloramphenicol resistance cassette, Cm ^r	(10)
LMG 18311 Ery ^r	LMG 18311 carrying an erythromycin resistance cassette in its chromosome between <i>stu0627</i> and <i>stu0629</i> genes, Ery ^r	This work
LMG 18311 Spc ^r	LMG 18311 carrying a spectinomycin resistance cassette in its chromosome between <i>stu0627</i> and <i>stu0629</i> genes, Spc ^r	This work
LMD-9 (pMG36e)	LMD-9 carrying pMG36e plasmid conferring an erythromycin resistance, Ery ^r	This work
Mutated recipient cells for mating with WT donor cells		
LMG 18311 Δ <i>lspA</i>	LMG 18311 with <i>lspA</i> (<i>stu0521</i>) gene deleted by insertion of an erythromycin cassette, Ery ^r	This work
LMG 18311 Δ <i>tagO-like</i>	LMG 18311 with <i>tagO-like</i> (<i>stu0163</i>) gene deleted by insertion of an erythromycin cassette, Ery ^r	This work
LMG 18311 Δ <i>dltA-like</i>	LMG 18311 with <i>dltA</i> (<i>stu0761</i>) gene deleted by insertion of an erythromycin cassette, Ery ^r	This work
LMG 18311 Δ <i>yfnI-like</i>	LMG 18311 with <i>yfnI-like</i> (<i>stu0636</i>) gene deleted by insertion of an erythromycin cassette, Ery ^r	This work
LMG 18311 Δ <i>mprF-like</i>	LMG 18311 with <i>mprF-like</i> (<i>stu1256</i>) gene deleted by insertion of an erythromycin cassette, Ery ^r	This work
LMG 18311 Δ <i>epsE</i>	LMG 18311 with <i>epsE</i> (<i>stu1108</i>) gene deleted by insertion of an erythromycin cassette, Ery ^r	This work
LMG 18311 Δ <i>eps9-11</i>	LMG 18311 with <i>eps9-11</i> (<i>stu1097-stu1099</i>) genes deleted by insertion of an erythromycin cassette, Ery ^r	This work
LMG 18311 Δ <i>stu1482-rgpX2</i>	LMG 18311 with <i>stu1482-rgpX2</i> (<i>stu1482-stu1473</i>) genes deleted by insertion of an erythromycin cassette, Ery ^r	This work
LMD-9 Δ <i>srtA</i>	LMD-9 with <i>srtA</i> gene deleted by insertion of an erythromycin cassette, Ery ^r	(32)
Mutated donor cells for mating with WT recipient cells		
LMG 18311(ICE <i>St3</i>) Δ <i>lspA</i>	LMG 18311 Δ <i>lspA</i> carrying ICE <i>St3</i> , Ery ^r Cm ^r	This work
LMG 18311(ICE <i>St3</i>) Δ <i>tagO-like</i>	LMG 18311 Δ <i>tagO-like</i> carrying ICE <i>St3</i> , Ery ^r Cm ^r	This work
LMG 18311(ICE <i>St3</i>) Δ <i>dltA-like</i>	LMG 18311 Δ <i>dltA-like</i> carrying ICE <i>St3</i> , Ery ^r Cm ^r	This work

LMG 18311(ICEST3) $\Delta yfnI$ -like	LMG 18311 $\Delta yfnI$ -like carrying ICESt3, Ery ^r Cm ^r	This work
LMG 18311(ICEST3) $\Delta mprF$ -like	LMG 18311 $\Delta mprF$ -like carrying ICESt3, Ery ^r Cm ^r	This work
LMG 18311(ICEST3) $\Delta epsE$	LMG 18311 $\Delta epsE$ carrying ICESt3, Ery ^r Cm ^r	This work
LMG 18311(ICEST3) $\Delta eps9-11$	LMG 18311 $\Delta eps9-11$ carrying ICESt3, Ery ^r Cm ^r	This work
Mutated recipient cells used in mutant/mutant experiments		
LMG 18311 $\Delta lspA$	LMG 18311 $\Delta lspA$ with spectinomycin resistance cassette, Ery ^r Spc ^r	This work
LMG 18311 $\Delta tagO$ -like	LMG 18311 $\Delta tagO$ -like with spectinomycin resistance cassette, Ery ^r Spc ^r	This work
LMG 18311 $\Delta yfnI$ -like	LMG 18311 $\Delta yfnI$ -like with spectinomycin resistance cassette, Ery ^r Spc ^r	This work
LMG 18311 $\Delta epsE$	LMG 18311 $\Delta epsE$ with spectinomycin resistance cassette, Ery ^r Spc ^r	This work
Plasmid		
pMG36e	3.4 kb, replication origin from pWV01, Ery ^r	(42)
pG ⁺ host9	4.6 kb, thermosensitive derivative of pWV01, Ery ^r	(43)
pSL1180 spec lox	4.5 kb, derivative of pBR322, Spc ^r	This work
pSET4s	4.5 kb, thermosensitive derivative of pWV01, Spc ^r	(44)

698

699

700 **TABLE 2.** Primers used in this work

Primer use	Primer name	Sequence (5'-3')	Reference
LMG 18311 Ery ^r construction	MchromLMG I_Fwd	GAGGAACTCGGATTGGTAG	This work
	MchromLMG I_rev_ery	AGCCATCCGGAAGATCTGGGACCATTTCGTTTGCAC	This work
	MchromLMG II_fwd_ery	AACACGAACCGTCTTATCTCCCAACTTAATTGAAGGCCAT	This work
	MchromLMG II_Rev	CAGGGCTAGCTATTGTTTC	This work
	Prom-Ery-For	GGAGATAAGACGGTTCGTGTT	This work
	pSL1180 ery rev	CAGATCTTCCGGATGGCT	This work
LMG 18311 Spc ^r construction	MchromLMG I_Fwd	GAGGAACTCGGATTGGTAG	This work
	MchromLMG I_rev_spc	GGGAAATATTCATTCTAATTGGGGACCATTTCGTTTGCAC	This work
	MchromLMG II_fwd_spc	ATTTATAGATTTTCATTGGCTTCCAACCTTAATTGAAGGCCAT	This work
	MchromLMG II_Rev	CAGGGCTAGCTATTGTTTC	This work
	SpecFwd	TAGAAGCCAATGAAATCTAT	This work
	Speclox66 Rev	CCAATTAGAATGAATATTTCCC	This work
LMG 18311 Δ <i>lspA</i> construction	EG1885	ACGAGTACTTCTTGACAGACAAATCAGA	This work
	EG1886	TCATGTAATCACTCCTTCTTAATTACACATAAGTCCTCCTATGGTTTA TAAGTATCA	This work
	EG1887	TATTTAACGGGAGGAAATAATTCTACATTAAAGAGGCGGGAAACCG TCTGGACAAGT	This work
	EG1888	AGAACATCCGTTGGATGACTATTAAGCT	This work
LMG 18311 Δ <i>tagO</i> - <i>like</i> construction	EG1873	ATAGGCAGTCATGGTTGTTACCTCC	This work
	EG1874	TCATGTAATCACTCCTTCTTAATTACACATGTCCTAGCTCCATTTCGT TGCTTGT	This work

LMG 18311 $\Delta yfnI$ - like construction	EG1875	TATTTAACGGGAGGAAATAATTCTAAAATAAACATTTGAAAAGCCA AGCAATGGCT	This work
	EG1876	AGATCTTGCAACCAGAGTGGCTCTGCT	This work
	EG1897	TCCATACTAAAGCCATTAGCTTCAAA	This work
	EG1898	TCATGTAATCACTCCTTCTTAATTACACAAAATAATACTTCCTTTGAT TTCATATTA	This work
	EG1899	TATTTAACGGGAGGAAATAATTCTAGAATAATCCTAAAAAGACTGTT CTAAT	This work
LMG 18311 $\Delta mprF$ - like construction	EG1900	ACTTGACTGTGCATCATCTGAATTCTA	This work
	EG1951	TCATTTATGGTATCTAAGCTTGTCCGT	This work
	EG1902	TCATGTAATCACTCCTTCTTAATTACACATGCCACCACCTCTTTTTGA CTAATTCTA	This work
	EG1903	TATTTAACGGGAGGAAATAATTCTAAAGTAAATACGACAAAAAAG TGACCCTCCAGGGT	This work
	EG1904	AGCATTCTCGATATGGATATTCCTGA	This work
LMG 18311 $\Delta dltA$ construction	EG1947	AGTGCTTTAGCCTGTGCTGATCGTCTA	This work
	EG1914	TCATGTAATCACTCCTTCTTAATTACACATTATTCTTCCTAAAATTCTG TTATAGATA	This work
	EG1915	TATTTAACGGGAGGAAATAATTCTACGATGATAGACTTCTTGAAACA GCTTCCCC	This work
	EG1916	TCGCATGAGTACTATGACTAAGCGCATA	This work
	EG1945	ACTAAGGTTGATAAGAACAATATCGAGA	This work
LMG 18311 $\Delta epsE$ construction	EG1946	TCATGTAATCACTCCTTCTTAATTACACACTTATTTTTCCTCCATCAG ATTTTTGAT	This work

LMG 18311 Δ <i>eps9-11</i> construction	EG1923	TATTTAACGGGAGGAAATAATTCTAAAATGATAACTTCAAAGATGAT TAGATGAG	This work
	EG1924	AGACCTGTAATTCCTGGCTTGAAGCT	This work
	EG1941	AGGAATGTCAAGATTTAGGAATTACA	This work
	EG1942	TCATGTAATCACTCCTTCTTAATTACACATCTTCTCATCACCTAAATA TTGATTTTT	This work
LMG 18311 Δ <i>stu1482-rgpX2-3</i> construction	EG1943	TATTTAACGGGAGGAAATAATTCTACAATAAATTCAATGATAATATA AGAGTTGC	This work
	EG1944	TTGCTAAATGCTGAGTAAATCCATTCCA	This work
	EG1937	TGGTATTGATAGTATCGAAAGTAGAGA	This work
	EG1938	TCATGTAATCACTCCTTCTTAATTACACATTTTTTATACGTAGTTTCTC CTGAAAAC	This work
Ery resistance cassette used for mutant construction	EG1939	TATTTAACGGGAGGAAATAATTCTAAAATAATATTTTATTAATAGCA GTCCCCTG	This work
	EG1940	ATCAGTTTGTGCCATAGCCTCCAGTA	This work
	EG940	TGTAATTAAGAAGGAGTGA	This work
	EG941	TAGAATTATTCCTCCCGT	This work
Vector pSL1180 spec lox construction	Spec-lox71-SpeI F	TTTTTACTAGTTCGTACCGTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT CGTAACGTGACTGGCAAGA	This work
	Spec-lox66-SpeI R	TTTTTACTAGTCGTACCGTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATC CAATTAGAATGAATATTCCC	This work

Figure 1

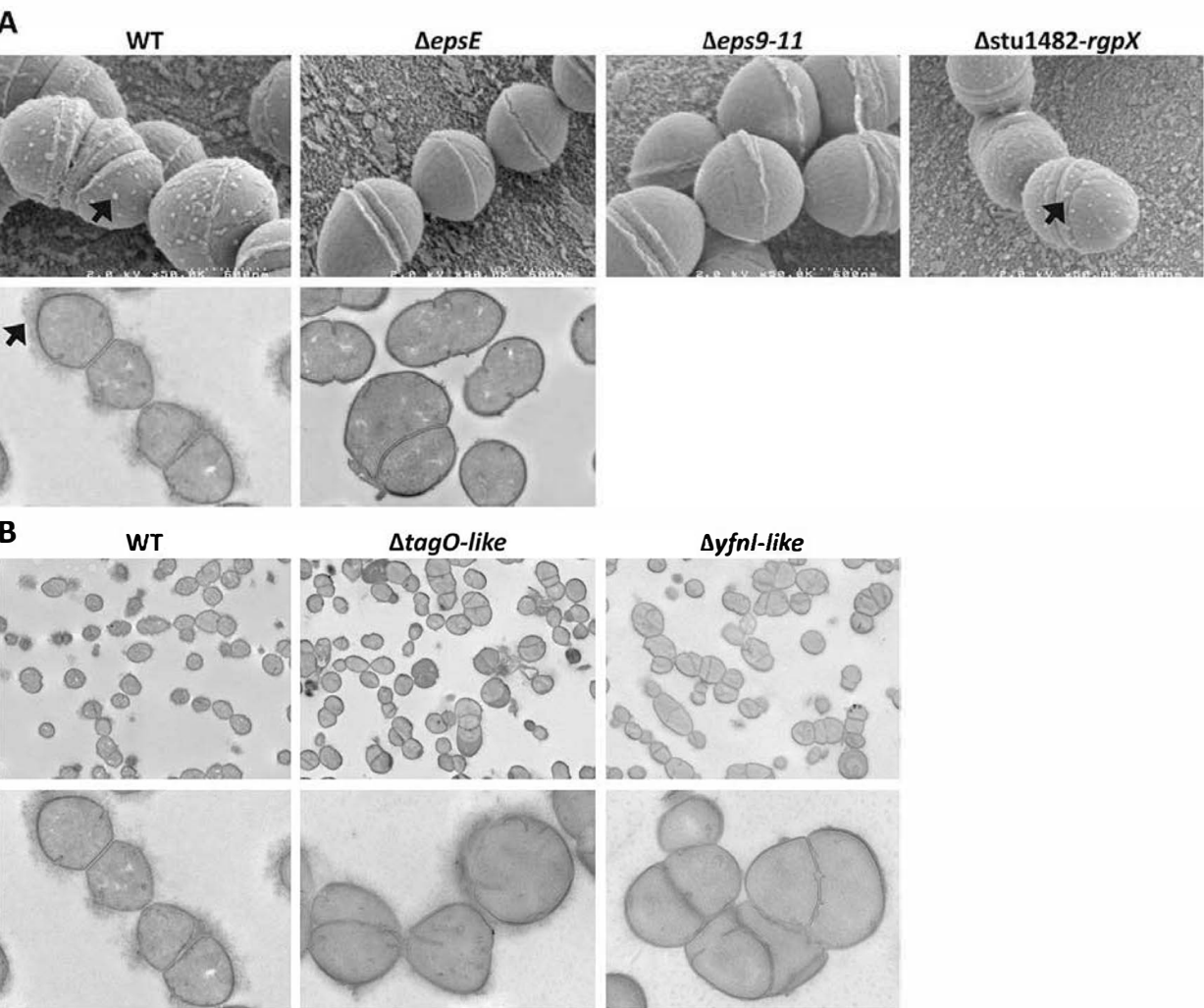


Figure 2

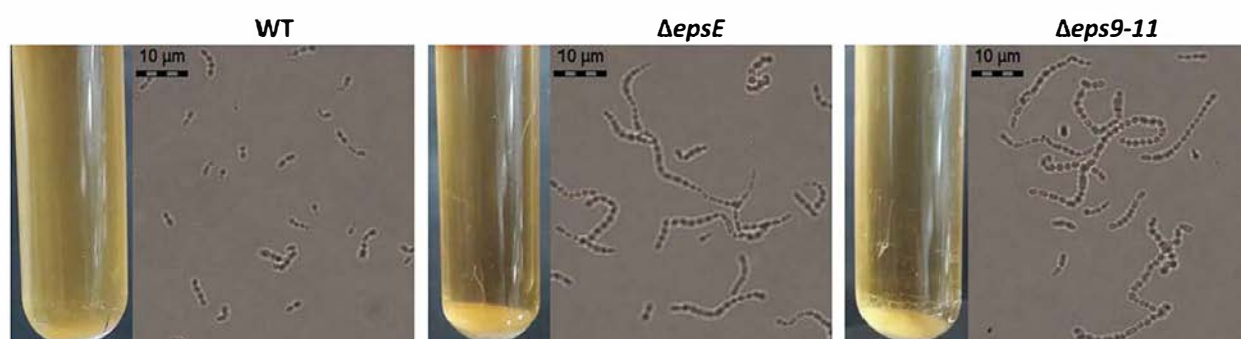


Figure 3

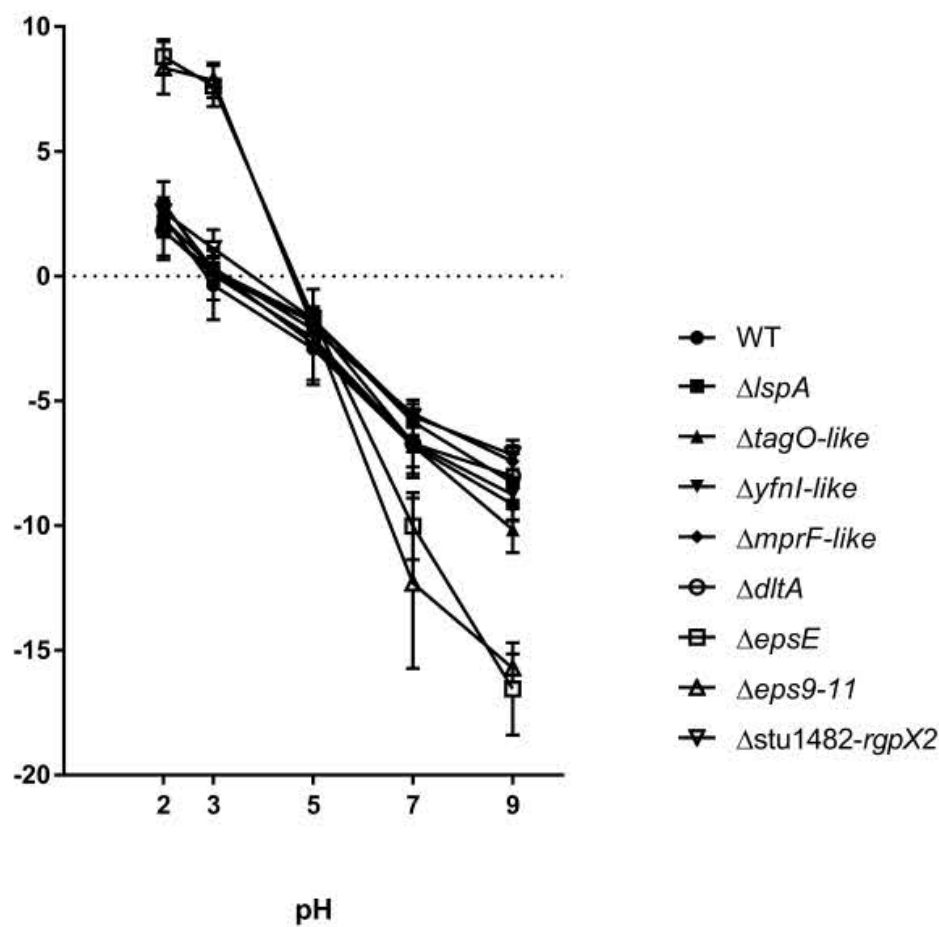
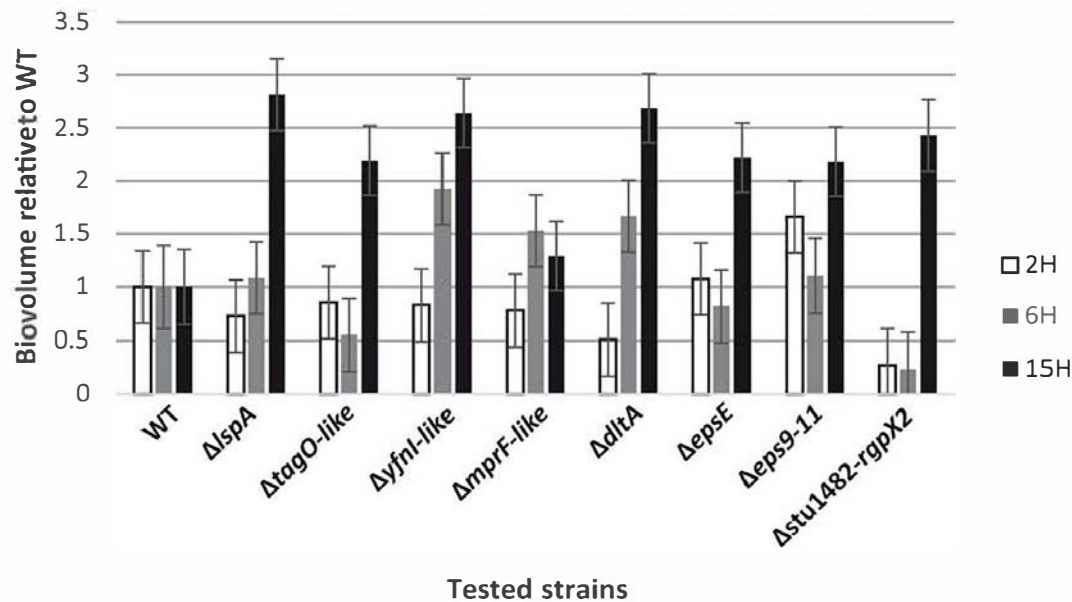


Figure 4

A



B

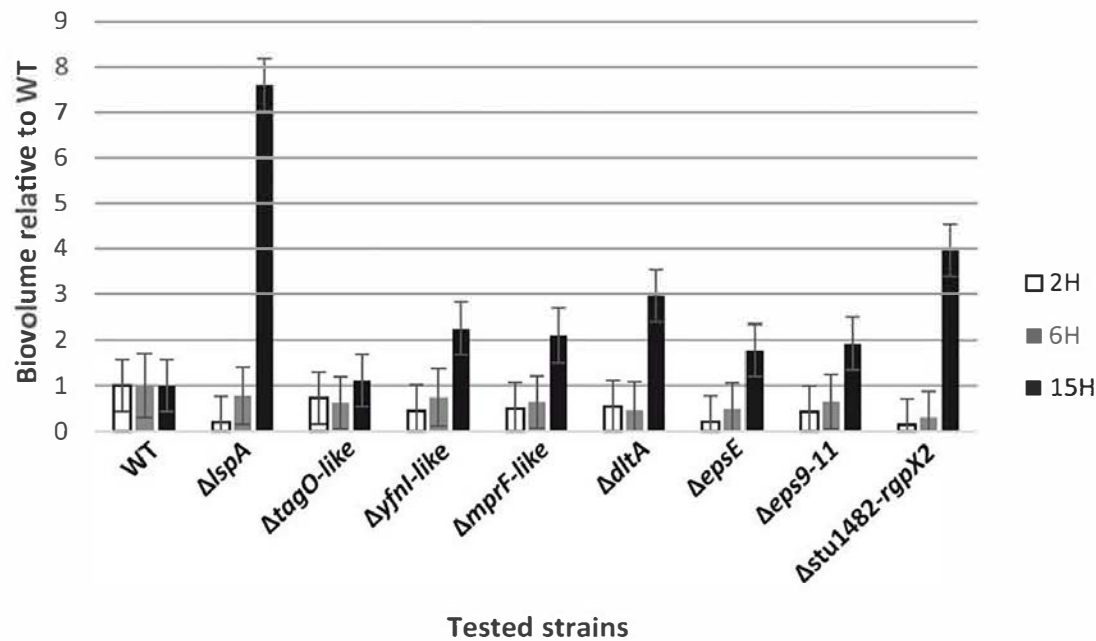


Figure 5

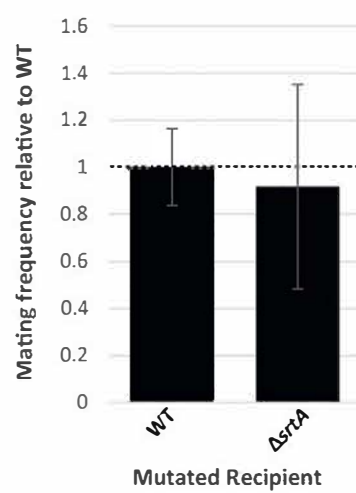
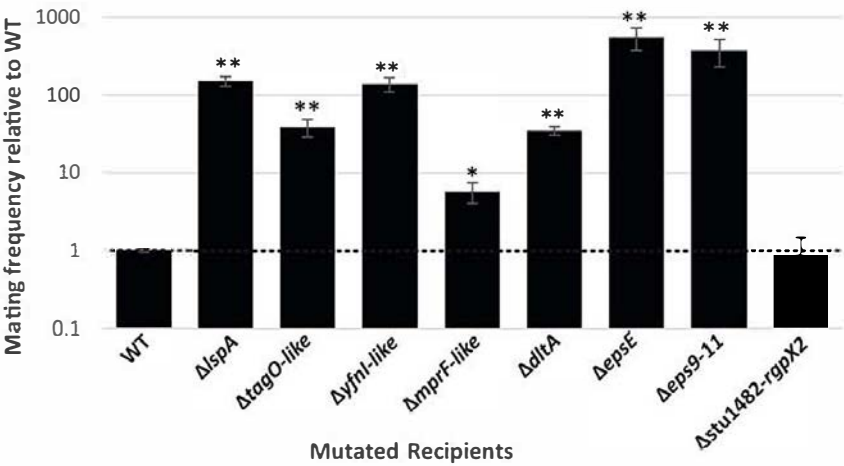
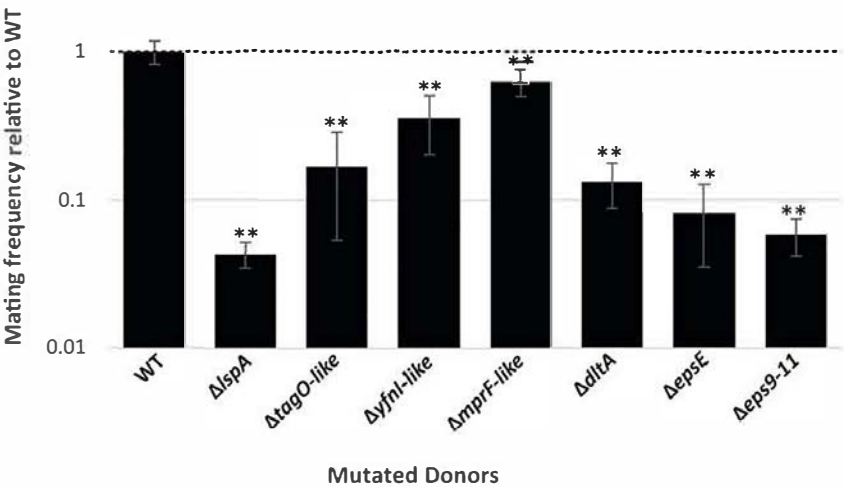


Figure 6

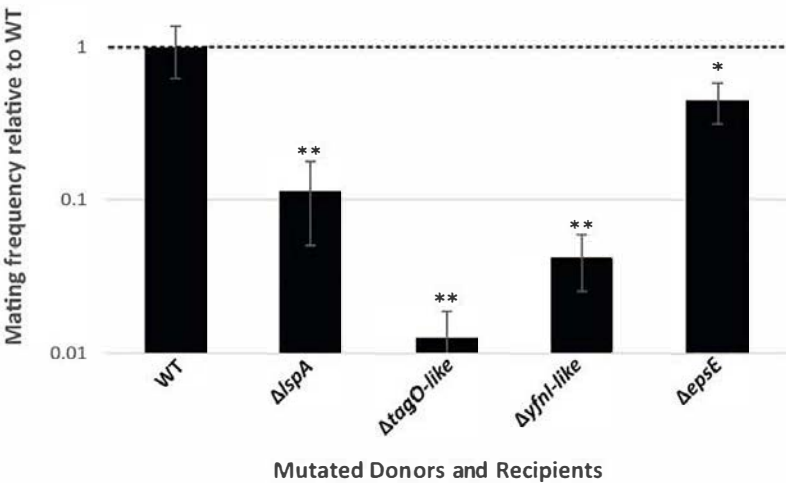
A



B



C



III. Discussion des résultats et perspectives

1. Caractérisation des ICE de *Streptococcus salivarius* et étude de leur fonctionnalité

Lors d'une étude préalable à ce travail de thèse, le laboratoire a mis en place une collection de souches commensales de *S. salivarius* ayant été isolées à partir de différents individus sains, auxquelles s'est ajouté un certain nombre d'isolats cliniques issus de différents établissements hospitaliers français. La caractérisation de cette collection a notamment mis en évidence la présence potentielle d'éléments proches d'ICE*St3* de *S. thermophilus* du fait de l'amplification du gène de la relaxase de ce dernier (Chaffanel *et al.*, 2015). Ceci a par la suite donné naissance à une première problématique dont l'objectif était de caractériser les éléments de type ICE retrouvés au sein des différents isolats sélectionnés dans le but de témoigner de leur organisation, et de ce fait de leur unicité ou au contraire, de leur diversité. La mise en évidence d'ICE dont les séquences ne témoignent pas d'une quelconque aberration a ainsi engendré la problématique de leur fonctionnalité et la possibilité de les utiliser en tant que modèle pour l'étude des éléments intégratifs conjuguatifs.

1.1. Caractérisation *in silico* des ICE de *S. salivarius*

1.1.1. Modules de conjugaison

Les modules de conjugaison sont classiquement considérés pour la classification des ICE en différentes familles d'ICE, en fonction de la parenté de ces modules. Le séquençage du génome de 13 souches issues de la collection de *S. salivarius* du laboratoire (F1-4, F1-8, F4-2, F6-1, B35, B57, L22, L50, L60, L64, N5, N20 et T93) a confirmé la présence d'ICE au sein de ces isolats. Ces derniers présentent sans exception plus de 90% d'identité nucléotidique dans leurs modules de conjugaison avec celui d'ICE*St3*. La forte parenté de ces éléments de *S. salivarius* avec l'élément de *S. thermophilus* les groupe ainsi dans la sous-famille ICE*St3*. Il est à noter que les souches de *S. salivarius* porteuses de ces éléments ont été sélectionnées en liaison avec des résultats préliminaires se basant sur la détection par PCR du gène de la relaxase d'ICE*St3*, il n'est donc pas surprenant que les souches séquencées portent des éléments très proches de celui-ci. Il n'est pas exclu que *S. salivarius* présente des ICE de la famille ICE*St3* arborant des relaxases plus éloignées non détectables par l'approche utilisée. Par ailleurs, des ICE appartenant à d'autres familles ont été retrouvés chez les souches de *S. salivarius* étudiées, à savoir (i) les éléments Tn916, Tn3872 et Tn6002

appartenant à la famille Tn916, celle-ci formant avec la famille ICESt3 la superfamille Tn916 (Chaffanel *et al.*, 2015), mais également (ii) les éléments Tn1549 et TnGBS2 formant avec Tn5252 la superfamille Tn5252 (Thèse Fanny Chaffanel, 2017). Il reste également envisageable que des ICE appartenant à la famille TnGBS1 soient retrouvés dans l'espèce *S. salivarius*, tel que mis en évidence chez d'autres Streptocoques (Ambroset *et al.*, 2016).

La recherche dans les bases de données NCBI d'ICE apparentés à ICESt3 a révélé l'existence d'éléments apparentés chez d'autres souches de *S. salivarius* mais également chez *S. parasanguinis*, soit une bactérie partageant la même niche écologique que *S. salivarius*, et *S. pneumoniae*, que l'on retrouve également chez l'Homme, en plus de la présence de cette famille chez *S. thermophilus*. Ces données sont en faveur du caractère ubiquitaire des éléments de la famille ICESt3 au sein des Streptocoques, de même qu'elles suggèrent la possibilité que l'acquisition de ces éléments aient été le fruit d'un transfert horizontal entre ces différentes espèces.

1.1.2. Diversité de recombinaison des ICE de *S. salivarius*

1.1.2.1. Sites d'intégrations

Les ICE de *S. salivarius* analysés dans le cadre de cette étude présentent une diversité de modules de recombinaison aboutissant à une diversité d'intégration de ces éléments au sein des génomes de *S. salivarius*. Ces derniers présentent tous des intégrases à tyrosine catalysant une intégration site-spécifique au niveau de trois sites chromosomiques distincts *fda*, *rpsI* et *rpmG*. Ces données suggèrent une intégration préférentielle des éléments de la sous-famille ICESt3 dans les sites *fda*, *rmpG* et *rpsI* au niveau de l'espèce *S. salivarius*. Le nombre de génomes étudiés dans cette étude étant faible (n=15 en incluant les autres génomes déjà séquencés), il est possible que cette diversité d'intégration soit sous-estimée. D'autres sites d'intégration d'ICE de la famille ICESt3 ont en effet été décrits chez d'autres Streptocoques, avec notamment des intégrations à l'extrémité 3' de gènes codant un ARN de transfert, en 5' du gène *ebfC* (codant une protéine associée au nucléoïde) ou en 5' du gène *ftsK* (codant une ADN translocase impliquée dans la division cellulaire) (Ambroset *et al.*, 2016).

1.1.2.2. Intégration, spectre d'hôte, impact sur le fitness et maintien

L'intégration des ICE de *S. salivarius* étudiés semblent répondre aux deux critères indispensables à leur propagation et maintien.

En effet, le gène *fda* code une fructose 1-6 biphosphate aldolase qui est une enzyme catalysant le clivage réversible scindant le fructose 1,6-biphosphate en glycéraldéhyde 3-phosphate et dihydroxyacétone phosphate (Lorentzen *et al.*, 2005), alors que les gènes *rpmG* et *rpsI* codent les sous-unités L33 et S9 appartenant aux sous-unités ribosomales 50S et 30S respectivement. En d'autres termes, ces ICE ciblent des sites d'intégrations se trouvant dans des gènes essentiels et conservés d'un point de vue séquence au sein des Streptocoques, mais également conservés de façon générale chez les autres genres bactériens. De ce fait, les ICE de *S. salivarius* peuvent théoriquement bénéficier d'un large spectre d'hôtes permettant leur propagation et leur succès évolutif.

Par ailleurs, ces éléments sont intégrés au niveau de l'extrémité 3' de *fda*, *rpmG* et *rpsI* et leur insertion ne devrait pas perturber l'expression de ces gènes, de même qu'elle ne devrait pas modifier les produits de ces gènes. Par conséquent, l'insertion des ICE de la sous-famille ICE*St3* analysés dans ces travaux ne devrait pas altérer la survie de l'hôte et son fitness, ce qui pourrait s'avérer également juste dans le cas de leur propagation vers des hôtes d'autres espèces. Il n'est pas exclu que l'insertion dans le chromosome hôte de ces éléments, dont la taille varie entre 25,8 et 37,3 kb, représente un coût énergétique non négligeable pour la bactérie lors de la réplication de son chromosome. Cependant, le coût énergétique que représente l'intégration d'un ICE a été évalué pour ICE*clc* dont la taille est de 103 kb or l'acquisition de ce dernier ne provoque pas de perte de fitness chez *P. aeruginosa* (Gaillard *et al.*, 2008).

1.1.3. Diversité des modules de régulation des ICE de *S. salivarius*

Les ICE de *S. salivarius* ont en commun avec ICE*St3* la présence de gènes codant les régulateurs putatifs Arp1, OrfQ et Arp2, suggérant l'intervention de ces derniers dans une même cascade de régulation et la possibilité qu'ils interagissent entre eux. L'analyse des domaines des produits de ces gènes permet, par homologie, de suspecter un rôle de répresseur pour Arp1 portant un domaine de type CI du phage lambda et SetR d'ICE*SXT*. Arp2, qui porte un domaine HTH homologue à celui du régulateur ImmR d'ICE*BsI*, pourrait également avoir un rôle de répresseur, alors qu'OrfQ, présentant une homologie avec le régulateur ImmA d'ICE*BsI*, pourrait jouer le rôle d'une protéase intervenant dans le clivage des répresseurs. De façon générale, la présence de deux répresseurs dans le module de régulation des ICE de la sous-famille ICE*St3* est intrigante. Des exceptions à cette organisation ont été mises en évidence durant cette étude : ICE_*SsaL60_rpsI* ne présente pas de gène *arp1*,

ICE_*SsaB35_rpsI* ne comporte pas de gène *orfQ* et ICE_*SpaDD19_fda* présente des versions tronquées des gènes *arp1* et *orfQ*. Bien que l'échantillonnage ne permette pas d'envisager d'hypothèses solides, il est intéressant de noter qu'aucun des ICE étudiés ne présente de délétion du gène *arp2* contrairement à *arp1* ou à *orfQ*. Cette observation pourrait éventuellement prendre tout son sens s'il s'avérait qu'Arp2 soit indispensable à la régulation de ces éléments. De ce fait, son absence pourrait entraîner une dérégulation complète de l'excision de l'élément et de son transfert aboutissant à des cycles répétitifs d'évènements de conjugaison à l'origine de la contre-sélection de cette mutation. En revanche, la troncation ou délétion du gène *arp1* observée chez certains de ces ICE suggère, si ceux-ci ne présentent pas d'autres mutations impactant la fonctionnalité de l'ICE (dans le module de conjugaison ou de recombinaison) que le gène *arp1* n'est pas indispensable à la répression du transfert de l'élément, et/ou n'engendre pas une perturbation suffisante pouvant provoquer la contre-sélection de l'hôte. Par ailleurs, il est également envisageable que les éléments dans lesquels *orfQ* est délété ne soient pas capables de se transférer, et que l'évolution vienne à éliminer ces ICE si aucun attribut adaptatif ne vient contrebalancer les évènements.

Par ailleurs, l'analyse réalisée a mis en évidence une diversité de séquence en acides aminés de ces trois acteurs putatifs de la régulation des ICE de *S. salivarius*, en plus de l'existence d'un nombre variable de gènes codant des protéines de fonctions inconnues dans les régions séparant *arp2* et *orfQ*. A moins d'être les conséquences hasardeuses d'évènements de recombinaisons homologues ou d'insertions d'éléments transposables, ces gènes peuvent également intervenir dans la régulation de ces éléments d'une façon encore inconnue, et ainsi aboutir à des mécanismes de contrôle encore plus complexes.

1.1.4. Diversité de traits adaptatifs portés par les ICE de *S. salivarius*

Les ICE de la sous-famille ICES₃ analysés dans ces travaux présentent une taille qui varie entre 25,8 à 37,3 kb, indicative de la diversité de leurs modules adaptatifs. Toutefois, avant de faire référence à cette diversité, il est intéressant de noter la prévalence des systèmes RM dans les modules adaptatifs de ces éléments. Plusieurs rôles sont accordés aux systèmes RM notamment dans la protection de la bactérie hôte face à l'infection par de l'ADN étranger. L'enzyme de restriction dégrade l'ADN étranger et la méthylase protège l'ADN bactérien suite à sa méthylation. Ainsi, la présence de systèmes RM complets au sein de ces éléments pourrait indiquer une action semblable de ces acteurs moléculaires qui permettrait d'engendrer une action protectrice à l'encontre de l'infection des cellules hôtes par des

phages. De même, il est envisageable que la présence de ces systèmes puisse permettre la mise en place d'un système d'addiction de la bactérie pour l'élément conjugatif, assurant de ce fait son maintien. Différents types de systèmes RM ont été décrits : (i) le type I correspond à un hétéro-oligomère comprenant les sous-unités S (spécificité), M (modification) et R (restriction) ; (ii) le système RM de type II présente une activité de restriction et une activité de modification, toutes deux catalysées par des protéines distinctes et (iii) le système de type III correspond à un hétéro-trimère ou un hétéro-tétramère de sous-unités de restriction (Res) et modification (Mod), cette dernière étant suffisante à l'activité de méthylation. Par opposition au système RM, le « système de restriction » de type IV (McrBC), est composé uniquement d'une ou deux enzymes de restriction qui clivent des sites de restriction préalablement méthylés (Mruk & Kobayashi, 2014). Contrairement à l'observation émise par Oliveira *et al.* (2014) décrivant la surreprésentation de système RM de type III dans les ICE, la plupart des systèmes RM trouvés dans les ICE de *S. salivarius* sont des systèmes de type II (Annexe 1). La présence de cette classe de système RM peut être expliquée par les hypothèses formulées précédemment. En revanche, la présence d'un système de restriction de type IV ainsi que deux méthyltransférases appartenant à un système de restriction de type II dans ICE_*SsaB35_rpsI* est plus inhabituelle. En ce qui concerne la présence de ces méthylases, il est envisageable que celles-ci présentent une spécificité ne représentant pas une cible pour la nucléase McrBC. Ainsi, ces méthylases pourraient protéger l'ICE de l'action d'une enzyme de restriction codée par l'hôte ou par un autre MGE. L'enzyme de restriction de type IV, quant à elle, pourrait agir suite à l'entrée dans la cellule hôte d'un phage ou d'un plasmide dont l'ADN peut être méthylé par les méthylases qu'il code, l'enzyme de restriction McrBC pourrait alors détecter la présence de cet élément et procéder au clivage de son ADN. Ce système pourrait alors jouer un rôle dans la compétition entre MGE en empêchant la colonisation de l'hôte par d'autres éléments. Alors que six des éléments analysés présentent des systèmes RM complets dans leur module d'adaptation, sept d'entre eux comportent des méthylases orphelines. La prévalence de ces dernières a été décrite de façon plus générale comme caractéristique de nombreux éléments génétiques mobiles. Ces méthylases orphelines pourraient alors jouer le rôle d'antidotes protégeant l'élément de l'action d'enzymes de restriction de systèmes RM codés par l'hôte ou par un élément génétique mobile résident. Cela permettrait au MGE d'infecter l'hôte en question ou d'entrer en compétition avec l'élément résident (Oliveira *et al.*, 2014). Il a également été suggéré par ces auteurs que, contrairement à l'opinion générale, ces méthylases orphelines ne résulteraient pas de la dégradation d'un système RM, mais plutôt du transfert horizontal de ces molécules

indépendant du reste du système. De plus, Oliveira *et al.* (2016) démontrent dans leur étude la prévalence élevée au sein des MGE de méthylases orphelines par rapport aux systèmes RM complets, suggérant que les systèmes RM sont plus souvent un moyen codé par l'hôte pour limiter l'entrée de MGE plutôt qu'un outil codé par les MGE pour assurer leur maintien dans la cellule (Oliveira *et al.*, 2014; Oliveira *et al.*, 2016). Etant donné le faible effectif des génomes étudiés au cours de nos travaux, il est difficile de conclure quant à la prévalence des méthylases orphelines au sein des éléments de la famille ICE*St3*.

L'analyse des séquences des modules adaptatifs des éléments de la famille ICE*St3* étudiés a permis l'identification d'un certain nombre de clusters de gènes impliqués dans différentes fonctions putatives. Certains de ces éléments portent un cluster de résistance au cadmium qui est un métal toxique relargué par certaines activités industrielles (Jarup & Akesson, 2009). La présence chez *S. salivarius*, qui est une bactérie commensale, d'une telle fonction suggère son acquisition par transfert horizontal ou par recombinaison homologue à partir de l'ADN d'une bactérie environnementale ayant pu entrer en contact avec *S. salivarius*. Ce type d'évènements ne va pas sans rappeler ceux s'étant produits dans la souche *S. salivarius* K12, portant un cluster de gènes presque identique à ceux retrouvés au sein de bactéries alimentaires en transit (*e.g.* *Lactococcus lactis* et *Lactobacillus sakei*) (Delorme *et al.*, 2015). Un cluster de gènes impliqués dans la biosynthèse de salivaricine D a également été mis en évidence dans les ICE étudiés au cours de ce travail, la présence de cette bactériocine au sein de ces ICE n'est en revanche pas surprenante. Celle-ci peut significativement contribuer à leur compétitivité et à l'augmentation de leur fitness dans leur écosystème naturel, les prémunissant ainsi de l'action d'autres bactéries à Gram positif telles que *S. pneumoniae* et *S. pyogenes*. Ces éléments comportent également des clusters potentiellement impliqués dans la synthèse de lipides, la biosynthèse de protéines de paroi, ou dans la libération de lipoprotéines de la membrane plasmique. Les produits de ces gènes, dont le rôle est moins évident, pourraient contribuer à l'augmentation de la compétitivité de l'hôte, ou intervenir dans l'amélioration du transfert de l'élément en modifiant l'organisation de la paroi de la bactérie hôte.

1.1.5. Evolution des ICE de la famille ICE*St3*

Plusieurs éléments, mis en évidence au cours de cette étude, suggèrent fortement une évolution modulaire et intra-modulaire des ICE de la famille ICE*St3*. Les différentes analyses phylogénétiques effectuées indiquent en effet que, des protéines codées par le module de

conjugaison des ICE : OrfJ (relaxase) et OrfK (protéine de couplage) présentent une forte parenté alors que les intégrases de ces éléments ne sont pas apparentées. Ceci suggère un échange de modules de conjugaison entre ICE. De façon générale, l'association des modules de conjugaison hautement conservés de ces ICE avec des modules de recombinaison et/ou de régulation et/ou d'adaptation distants témoigne de cette évolution modulaire.

En parallèle, l'alignement des séquences d'acides aminés de la relaxase OrfJ d'ICE_*Sma33MO_fda* démontre que celle-ci est apparentée à celle d'ICE*St3* et des ICE de *S. salivarius* alors que sa protéine de couplage OrfK est quant à elle différente de celles de ces éléments. De plus, la partie gauche du module de conjugaison d'ICE_*Sma33MO_fda* est apparentée à celle d'ICE_*SparauNCFD2020_rpsI* (86% d'identité nucléotidique) alors que sa partie droite est apparentée à celle d'ICE*St3* (96% d'identité nucléotidique), la différence de pourcentage d'identité se situant au niveau de l'origine de transfert d'ICE_*Sma33MO_fda*. L'ensemble de ces données est en faveur d'un échange intra-modulaire réalisé par la relaxase suite à une recombinaison site-spécifique au niveau de l'origine de transfert. Ce type de recombinaison a également été décrit pour des relaxases de plasmides et s'avère également se produire au niveau d'ICE*clc* et de la famille ICE*SXT/R391* (Ceccarelli *et al.*, 2008; Miyazaki & van der Meer, 2011), et contribue de ce fait à la diversité des éléments.

L'accrétion est également un événement générateur de diversité qui contribue à l'évolution des ICE. Ainsi, lorsqu'un élément de type ICE ou IME est transféré par conjugaison vers une réceptrice présentant déjà un élément apparenté dans le site d'insertion ciblé, l'ICE ou l'IME peut s'intégrer dans l'un des deux sites *att* généré auparavant suite à l'insertion du premier élément, aboutissant ainsi à la formation d'un élément composite (Bellanger *et al.*, 2014). Il peut s'en suivre également des épisodes de troncations des sites *att* séparant les deux éléments, ce qui donne naissance à un élément unique délimité de part et d'autres par des sites *att* (Bellanger *et al.*, 2014). L'accrétion contribue à l'évolution des éléments de la famille ICE*St3*, tel qu'observé pour les ICE des souches F1-8 et L60 en accrétion avec des IME putatifs, ou ceux des souches F6-1 et L50 que l'on retrouve adjacents à des CIME.

1.2.S. *salivarius* un modèle pour l'étude et la caractérisation des ICE de souches commensales ?

1.2.1. Organisation des ICE ICE_*SsaF1-4_fda* et ICE_*SsaF4-2_fda* de *S. salivarius*

Les éléments ICE_*SsaF1-4_fda* et ICE_*SsaF4-2_fda* font partie des ICE ayant été sélectionnés dans le but de tester la fonctionnalité des ICE de *S. salivarius*. ICE_*SsaF1-4_fda* possède un module de conjugaison fortement apparenté à celui d'ICE*St3*. Il en est de même pour les gènes *arp1*, *orfQ* et *arp2* codant les régulateurs putatifs d'ICE_*SsaF1-4_fda*. Ainsi seule la région séparant *orfQ* et *arp2* diffère significativement entre ces deux éléments. Ces données *in silico* sont donc en faveur d'un fonctionnement d'ICE_*SsaF1-4_fda* semblable à celui d'ICE*St3*, bien qu'il ne soit pas exclu que la région *orfQ-arp2* puisse impacter la régulation de ces éléments. ICE_*SsaF4-2_fda* possède également un module de conjugaison fortement apparenté à celui d'ICE*St3*, en revanche ses régulateurs putatifs sont plus distants. De ce fait, cet ICE pourrait se comporter différemment des deux ICE précédents.

1.2.2. Fonctionnalité des ICE putatifs ICE_*SsaF1-4_fda* et ICE_*SsaF4-2_fda* de *S. salivarius*

1.2.2.1. Excision des ICE putatifs ICE_*SsaF1-4_fda* et ICE_*SsaF4-2_fda* de *S. salivarius*

L'amplification des sites *attI* et *attB* d'ICE_*SsaF1-4_fda* et ICE_*SsaF4-2_fda* a permis de mettre en évidence la capacité d'excision de ces deux éléments, suggérant donc la fonctionnalité du module de recombinaison. Bien que des analyses quantitatives de cette excision n'aient pas été réalisées, il est intéressant de noter que la détection des formes circulaires de ces éléments ne nécessite pas l'usage de techniques à forte sensibilité (*e.g.* PCR nichée et autres...), contrairement à ce qui a été observé pour les éléments de *S. agalactiae* (Puymege *et al.*, 2013) suggérant un taux d'excision important de ces ICE de *S. salivarius*.

1.2.2.2. Transfert intraspécifique des ICE putatifs ICE_*SsaF1-4_fda* et ICE_*SsaF4-2_fda* de *S. salivarius*

Le transfert d'ICE_*SsaF1-4_fda* a été testé vers un large panel de souches réceptrices ($n > 10$), présentant un site d'insertion *fda* dépourvu d'élément dont font partie les souches *S. salivarius* JIM8777 et F1-8. Ces souches sont les seules pour lesquels des transconjugants

ont été obtenus. La présence d'un ICE dans le site *rpmG* de la souche F1-8 n'exclut pas la possibilité que le transfert d'ICE_*SsaF1-4_fda* ait été rendu possible suite à l'utilisation de la machinerie conjugative de l'ICE inséré au site *rpmG*. Cependant, l'absence d'élément conjugatif autonome chez la souche JIM8777 conforte quant à elle l'idée d'une activité autonome d'ICE_*SsaF1-4_fda*. Par la suite, ces réceptrices se sont également avérées recevoir ICE_*SsaF4-2_fda*. Par ailleurs, l'insertion de ces éléments dans les souches JIM8777 et F1-8 ne perturbe pas la croissance de ces souches, ce qui suggère que l'insertion de ces ICE dans le chromosome de leur hôte ne réduit pas le fitness de ce dernier.

En revanche, la fréquence de transfert de ces deux éléments n'a pas pu être mesurée du fait de la faible quantité de transconjugants issus des expériences de conjugaison sur filtre, cette fréquence étant inférieure à 10^{-8} transconjugants par cellules donatrices. Ainsi, les fréquences de transfert de ces éléments sont 10 à 1000 fois moins importantes que celles obtenues lors du transfert conjugatif d'autres éléments du groupe Streptocoques, notamment ICE*St3* (Bellanger *et al.*, 2009), ICE_*515_tRNA^{Lys}* de *S. agalactiae* (Puymège *et al.*, 2013), et RD2 de *S. pyogenes* (Sitkiewicz *et al.*, 2011). Plusieurs hypothèses peuvent être formulées pour expliquer ces résultats, notamment en liaison avec la régulation de ces éléments. Bien qu'Arp1, Arp2 et OrfQ d'ICE_*SsaF1-4_fda* soient apparentés à ceux d'ICE*St3*, il se peut que les gènes insérés entre *arp2* et *orfQ* influencent ces ICE en engendrant une régulation différente de ces éléments. Ceci peut également être valable pour ICE_*SsaF4-2_fda* dont les régulateurs putatifs sont distants d'ICE*St3*. Il est également possible que des facteurs d'hôte puissent impacter cette fréquence de transfert que ce soit au niveau de la cellule donatrice ou de la réceptrice, en liaison notamment avec la composition de la paroi de ces cellules. En effet, celle-ci peut agir sur le succès de la conjugaison comme démontré pour ICE*BsI* (Johnson & Grossman, 2014; Johnson & Grossman, 2016) potentiellement en perturbant l'interaction et le contact de la donatrice et de la réceptrice, ou en interférant avec la mise en place de la machinerie conjugative.

Les souches F1-8 et JIM8777 sont les deux seules souches vers lesquelles le transfert d'ICE_*SsaF1-4_fda* a été obtenu (Annexe 2). La 1^{ère} hypothèse pouvant être formulée quant à l'absence de transfert vers les autres souches, est en faveur de l'impact de la composition de l'enveloppe cellulaire des donatrices et réceptrices mises en jeu, celle-ci pourrait influencer l'interaction cellule-cellule, et inhiber la mise en place du pore protéique de conjugaison entre les deux cellules tel que suggéré par les résultats observés avec ICE*St3* (Carraro *et al.*, 2011)

et ICEBsI (Johnson & Grossman, 2014; Johnson & Grossman, 2016). La 2^{ème} hypothèse serait qu'en raison d'un faible taux de transfert de cet élément, les transconjugants seraient obtenus sous le seuil de détection permis par les conditions d'expérimentation utilisées, empêchant par conséquent la mise en évidence d'un transfert de cet ICE vers les autres souches testées (Annexe 2). La 3^{ème} hypothèse concerne l'impact des facteurs d'hôte sur le transfert de cet élément. Ces derniers peuvent être nombreux et puiser leurs origines à différents niveaux. Par exemple, des systèmes CRISPR-Cas dirigés contre ces éléments peuvent être contenus dans les génomes des souches testées, inhibant ainsi l'acquisition et le maintien de cet élément dans les souches réceptrices. Par ailleurs, l'ICE peut être la cible d'une enzyme de restriction codée par l'hôte inhibant l'entrée de l'ICE dans la cellule. Une exclusion d'entrée est également envisageable, bien que le transfert d'ICE_*SsaF1-4_fda* vers la souche F1-8 possédant un ICE de la famille ICESt3 dans le site *rpmG*, semble aller à l'encontre d'une possible exclusion d'entrée entre les éléments de la famille ICESt3. Par ailleurs, l'ICE utilise des molécules codées par l'hôte, telle que l'ADN polymérase ou l'hélicase, pour assurer sa propre réplication. De ce fait, si celles-ci venaient à être limitantes, la réplication de l'élément qui joue un rôle dans son maintien en serait impacté tel qu'observé pour ICEBsI (Auchtung *et al.*, 2016).

L'utilisation de la MMC provoque l'induction de l'excision d'ICE_*SsaF1-4_fda* telle qu'observée pour de nombreux éléments génétiques mobiles. En revanche, contrairement à ICESt3 pour lequel le traitement des cellules donatrices avec la MMC provoque l'augmentation des fréquences de transfert d'un facteur x25 (Bellanger *et al.*, 2009), le traitement de la souche F1-4 avec la MMC ne provoque pas d'augmentation détectable des fréquences de transfert d'ICE_*SsaF1-4_fda*. Ces résultats suggèrent que l'excision de l'élément n'est pas à l'origine de ces faibles fréquences de transfert et qu'une étape ultérieure à celle-ci est limitante pour le transfert de l'élément, soit potentiellement l'étape de conjugaison.

1.2.2.1. Transfert interspécifique des ICE putatifs ICE_*SsaF1-4_fda* et ICE_*SsaF4-2_fda* de *S. salivarius*

La capacité des ICE ICE_*SsaF1-4_fda* et ICE_*SsaF4-2_fda* à se transférer vers d'autres espèces a été évaluée dans le cadre de cette étude. Des transconjugants ont été obtenus en utilisant comme réceptrices les souches *S. thermophilus* LMG 18311 et *E. faecalis* JH2-2, témoignant de la capacité de ces éléments à se transférer vers d'autres espèces. Les

transconjugants obtenus avec *E. faecalis* JH2-2 ne peuvent résulter que d'un transfert par conjugaison de ces éléments, cette souche n'étant pas capable de transformation naturelle. La capacité d'ICE_*SsaF1-4_fda* et ICE_*SsaF4-2_fda* à se transférer en inter-espèce n'ayant été évaluée que vers les espèces *S. thermophilus* et *E. faecalis*, il est difficile de se prononcer quant à la largeur du spectre d'hôte que peuvent avoir ces éléments. Il est à noter que les fréquences de transfert obtenues en conjugaison inter-espèce sont faibles et similaires à celles obtenues en intra-espèce.

1.2.2.2. Autonomie d'ICE_*SsaF1-4_fda* de *S. salivarius*

Le re-transfert d'ICE_*SsaF1-4_fda* à partir des transconjugants de *S. salivarius*, *S. thermophilus* et *E. faecalis* témoigne de l'autonomie de cet élément et par conséquent confirme son appartenance aux éléments intégratifs conjugatifs. Par ailleurs, il est important de noter que la fréquence de transfert d'ICE_*SsaF1-4_fda* augmente d'un facteur 10 environ fois lorsque *S. thermophilus* LMG 18311 ou *E. faecalis* JH2-2, et non *S. salivarius*, est utilisée comme donatrice. Ces résultats sont donc fortement en faveur de l'impact de facteurs d'hôte sur le transfert de cet élément. Au vu de l'absence de cette augmentation lors du transfert inter-espèce de l'élément, il apparaît que l'augmentation observée dans le cadre du re-transfert à partir de *S. thermophilus* et *E. faecalis* est liée à la cellule donatrice, soit à LMG 18311 et JH2-2. Néanmoins, ce sont ces mêmes souches qui ont été utilisées comme cellules réceptrices dans le transfert interspécifique de cet ICE. De ce fait, l'augmentation observée semble liée à la présence d'ICE_*SsaF1-4_fda* dans ces souches, ou en d'autres termes à leur statut de donatrice de l'élément.

Un autre argument en faveur de l'impact de facteurs d'hôte sur le transfert de cet élément réside dans les résultats de transfert d'ICE*St3* porté par la souche *S. thermophilus* CNRZ385 vers des cellules de *S. salivarius*. En effet, plusieurs tentatives de transfert d'ICE*St3* vers différentes souches de *S. salivarius* (incluant les souches JIM8777 et F1-8) ont été réalisées (Annexe 2). Aucun transconjugant ayant reçu ICE*St3* n'a été obtenu. Ces résultats n'excluent en revanche pas la possibilité qu'ICE*St3* ait pu être acquis par quelques clones de *S. salivarius*, mais que ces derniers aient échappé à notre détection. Quoi qu'il en soit, il est évident que la fréquence de transfert d'ICE*St3* vers *S. salivarius* est inférieure à 10^{-8} transconjugants par cellules donatrices. Cette absence ou diminution drastique du transfert d'ICE*St3* ne pouvant être liée à sa régulation et excision, celle-ci pourrait être la conséquence d'une altération ou absence de contact de CNRZ385 avec ces cellules de *S. salivarius*, de

même qu'il ait envisageable que le transfert soit bloqué au niveau de l'établissement de la machinerie conjugative.

1.3. Conclusion et perspectives de l'étude

Au cours de ces travaux, les ICE de *S. salivarius* ont été caractérisés. Cette étude a mis en évidence leur diversité d'intégration, de régulation et de leur contenu adaptatif mais également leur parenté avec d'autres ICE de Streptocoques. L'étude expérimentale de deux ICE de *S. salivarius* a permis de mettre en évidence leur fonctionnalité. Cependant, alors que ces ICE semblent présenter une organisation globale similaire et une parenté avec ICE $St3$, les fréquences de transfert de ces éléments se sont avérées très faibles par rapport à ce dernier. Cependant, il est aussi important de noter que le transfert des ICE connus dans d'autres espèces est rarement d'une grande efficacité, potentiellement due à la fine régulation de ces éléments qui permet à la cellule hôte de ne pas entrer dans un état de surconjugaison potentiellement létal. De ce fait, il n'est pas exclu que ce soit ICE $St3$ qui fasse l'objet d'une dérégulation permettant un transfert plus important. Par ailleurs, les fréquences de transfert des ICE de *S. salivarius* mises en évidence dans des conditions de laboratoire ne sont potentiellement pas représentatives de la réalité. *S. salivarius*, dans son écosystème buccal et digestif, rencontre énormément de facteurs/molécules/interactions/stress pouvant fortement influencer le transfert de ses ICE, facteurs qu'il est difficile de mimer lors d'expérimentations. Mon travail de thèse s'inscrivait dans le projet ANR MATICE (« Mécanismes d'Activation du Transfert des éléments Intégratifs Conjugatifs au sein de l'Ecosystème digestif »). Il est prévu également dans le cadre de ce projet de tester le transfert des ICE dans des conditions plus proches des conditions réelles rencontrées par la bactérie : en digesteur et côlon artificiels et *in vivo* en injectant chez des souris axéniques différentes combinaisons de populations donatrices et réceptrices afin d'évaluer l'efficacité de ce transfert. Aussi, une étude complémentaire visant à identifier le rôle des régulateurs putatifs est prévue, ce qui pourrait grandement contribuer à la compréhension de la régulation de cette famille d'éléments, notamment par rapport au rôle d'Arp2.

Les résultats obtenus lors des expériences de transfert des ICE de *S. salivarius* sont en faveur d'un impact des facteurs d'hôte sur le transfert de ces éléments. Il paraît donc intéressant de creuser cet aspect.

2. Impact des facteurs d'hôte sur l'acquisition des éléments de la famille ICES_{St3}

L'étude de l'impact des facteurs d'hôte sur le transfert d'ICES_{St3} réalisée dans le cadre de la thèse a révélé l'importance de la composition de l'enveloppe cellulaire. Les composés (en particulier lipoprotéines, acides téichoïques et exopolysaccharides) qu'exposent à leur surface les bactéries à Gram positif se sont avérés impacter l'acquisition de l'élément par les cellules réceptrices, mais également son transfert à partir des cellules donatrices. Cet impact, bien que très prononcé, est fondamentalement différent selon la cellule considérée puisque celui-ci semble être dépendant de la présence et de l'activité d'ICES_{St3}.

2.1. Impact des molécules de surface sur l'acquisition d'ICES_{St3} par les cellules réceptrices

2.1.1. Impact des protéines exposées à la surface de *S. thermophilus*

2.1.1.1. Impact des lipoprotéines

Deux types de protéines de surface ont fait l'objet d'une étude afin de caractériser leur impact sur l'acquisition d'ICES_{St3}. Les lipoprotéines ont été ciblées chez la souche LMG 18311 à travers l'action de LspA, nécessaire à la maturation des lipoprotéines au préalable de leur ancrage covalent à la membrane plasmique. Alors que la délétion de ce gène est létale pour les bactéries à Gram négatif, un bon nombre de bactéries à Gram positif semblent en revanche le tolérer et ne présentent que très peu d'atteintes à leur croissance (Das *et al.*, 2009). Ceci est également valable pour la souche LMG 18311 de *S. thermophilus* pour laquelle la délétion du gène *lspA* ne provoque pas de létalité. De plus, LMG 18311 Δ *lspA* se distingue de la souche sauvage LMG 18311 par une forte capacité à développer des biofilms denses et robustes résistants au rinçage mécanique. En revanche, la délétion de *lspA* ne semble pas perturber la taille ou la morphologie de la cellule, de même que la charge globale de sa surface ne paraît pas être altérée comparée à la souche sauvage.

Un certain nombre d'études se focalisant sur le rôle des lipoprotéines dans l'interaction hôte-pathogène se sont intéressées aux effets de la mutation de *lspA* chez les bactéries à Gram positif. Celles-ci ont par ailleurs suggéré qu'un certain nombre de lipoprotéines pouvaient retenir au moins une activité partielle en l'absence du clivage réalisé par LspA chez *Streptococcus sanguinis*, bien qu'une altération générale du clivage des

lipoprotéines ait été observée chez le mutant *lspA* (Das *et al.*, 2009). Il a également été démontré chez *Streptococcus uberis* que le gène *eep* interviendrait dans le clivage des lipoprotéines en l'absence de Lsp (Denham *et al.*, 2008) suggérant la possibilité d'intervention d'une voie de biosynthèse secondaire permettant la maturation des lipoprotéines. Il est, par ailleurs, important de noter que l'analyse du génome de *S. thermophilus* LMG 18311 prédit la présence de deux signal peptidases de type I (SipA et SipB) (Hols *et al.*, 2005). Ces protéines pourraient par conséquent intervenir dans le clivage des lipoprotéines en l'absence de la signal peptidase de type II LspA. Cependant, l'absence de données relatives à l'activité de ces protéines prédites ne permet pas de statuer sur leur rôle chez *S. thermophilus*, notamment dans un contexte de mutant *lspA*. Une analyse protéomique de la surface de ces mutants serait donc nécessaire afin de conclure quant à l'impact de cette mutation sur la synthèse et liaison des lipoprotéines à la paroi de la souche LMG 18311.

L'utilisation de LMG 18311 Δ *lspA* en tant que cellule réceptrice provoque l'augmentation de l'efficacité d'acquisition d'ICE*St3* d'un facteur proche de 100 comparé à la réceptrice sauvage LMG 18311 Ery^r. Trois hypothèses peuvent être considérées pour expliquer ce phénotype : (i) il se peut que le mutant Δ *lspA* présente une défaillance de clivage des lipoprotéines non compensée par l'intervention d'une autre voie de biosynthèse, provoquant ainsi une délocalisation des prolipoprotéines vers le milieu de culture du fait de l'absence d'un ancrage covalent à la membrane. Ainsi, l'absence de lipoprotéines au niveau de la paroi pourrait alléger l'encombrement stérique et moléculaire de la surface cellulaire, favorisant par conséquent la mise en place du pore protéique de conjugaison avec la cellule donatrice de l'élément ; (ii) LMG 18311 code 24 lipoprotéines prédites. Alors que 15 de ces protéines semblent être impliquées dans la liaison au substrat de transporteurs de type ABC (Hols *et al.*, 2005), les autres protéines prédites codent pour des fonctions inconnues. De ce fait, il est possible qu'une ou plusieurs de ces protéines dont l'activité est totalement ou partiellement affectée dans le cadre du mutant *lspA* soit à l'origine de l'inhibition de l'acquisition d'ICE*St3* à travers une interaction moléculaire pouvant interférer notamment avec des composés impliqués dans l'assemblage de la machinerie conjugative ; (iii) LMG 18311 Δ *lspA* se distingue fortement de la souche sauvage et des autres mutants étudiés de par sa capacité à former des biofilms denses et solides. De ce fait, cette caractéristique pourrait favoriser le contact cellulaire de la réceptrice avec la donatrice en augmentant les probabilités de rencontres et d'interactions des deux cellules lors d'expériences de conjugaison sur filtre.

2.1.1.2. Impact des protéines à motif LPxTG

L'impact des protéines à motif LPxTG sur l'acquisition d'ICES_{St3} a également été évalué. Dans ce but, la souche *S. thermophilus* LMD-9 a été utilisée et son gène *srtA* codant pour la sortase A a été ciblé.

Des études démontrent le caractère indispensable du gène *srtA* dans l'ancrage covalent des protéines à motif LPxTG à la paroi cellulaire notamment chez *Streptococcus agalactiae* (Lalioui *et al.*, 2005). Le mutant LMD-9 $\Delta srtA$ ne devrait donc pas exposer de protéines à motif LPxTG à sa surface. Néanmoins, ces protéines étant tout de même secrétées à travers le système de sécrétion Sec indépendamment de la présence ou non de SrtA, il se peut que ce mutant présente des protéines à motif LPxTG dans le milieu environnant ou maintenues à la surface temporairement à travers des interactions électrostatiques.

LMG 18311 ne présente pas de sortase A fonctionnelle ni de protéine à motif LPxTG, de plus celle-ci peut agir en tant que donatrice d'ICES_{St3} en couple avec une réceptrice également de type LMG 18311. De ce fait, ces données indiquent clairement l'absence de nécessité absolue à l'égard de ces protéines pour le transfert et l'acquisition de l'élément. Les résultats de cette étude démontrent également l'absence d'impact significatif sur l'acquisition d'ICES_{St3} suite à la délétion du gène *srtA* chez LMD-9, suggérant ainsi que le déficit de liaison covalente des protéines à motif LPxTG au peptidoglycane n'interfère pas avec l'acquisition d'ICES_{St3} chez cette souche. De façon globale, l'ensemble de ces données va à l'encontre d'une quelconque interférence des protéines à motif à LPxTG avec l'acquisition d'ICES_{St3}, s'opposant par conséquent à une éventuelle interaction moléculaire de ces protéines avec les composés de la machinerie conjugative. Ce résultat est cohérent avec le rôle décrit jusque-là pour les protéines à motif LPxTG en lien avec l'adhésion et la colonisation de nouveaux hôtes (Couvigny *et al.*, 2017; Davies *et al.*, 2009).

2.1.2. Impact des acides téichoïques exposés à la surface de *S. thermophilus*

Lors de ces travaux, l'impact sur l'acquisition d'ICES_{St3} du contenu général en acides téichoïques, comprenant notamment les acides téichoïques de paroi WTA (mutant $\Delta tagO$ -like) et les acides lipotéichoïques (mutant $\Delta yfnI$ -like), a été évalué. L'impact de la charge globale de la surface de *S. thermophilus* a également été étudié à travers la D-alanylation des

acides téichoïques (mutant $\Delta dltA$) mais également à travers la perte du composé de paroi lysyl-phosphatidylglycerol chargé positivement (mutant $\Delta mprF$ -like).

Les acides téichoïques de façon générale n'ont pas fait l'objet de caractérisation chez *S. thermophilus*. De ce fait, aucune donnée bibliographique propre au contenu en acides téichoïques de *S. thermophilus* n'est disponible à l'heure actuelle pour la majorité de ces mutants pour lesquels ces travaux de thèse constituent une première étude et caractérisation.

2.1.2.1. Impact des acides téichoïques de paroi (WTA)

L'impact des WTA sur l'acquisition d'ICES₃ a été évalué chez LMG 18311 à travers le ciblage du gène *tagO*-like correspondant à un homologue des gènes *tagO* et *tarO* de *B. subtilis* et *S. aureus* respectivement dont le rôle est d'assurer la première étape de biosynthèse des WTA. Des résultats expérimentaux témoignent de l'absence de WTA dans l'enveloppe cellulaire de ces deux bactéries modèles dans le cadre du mutant *tagO* (D'Elia *et al.*, 2006a; D'Elia *et al.*, 2006b; Vergara-Irigaray *et al.*, 2008). Il est par conséquent attendu que LMG 18311 $\Delta tagO$ -like soit dans l'incapacité de produire des WTA.

De même que l'absence de WTA ne provoque pas la létalité de *B. subtilis* et *S. aureus*, la délétion de *tagO* chez LMG 18311 n'altère pas la viabilité de la bactérie. La comparaison de LMG 18311 $\Delta tagO$ -like à la souche sauvage ne montre pas de perturbation des propriétés de croissance. En revanche, LMG 18311 $\Delta tagO$ -like démontre une organisation morphologique différente de la souche sauvage avec notamment une hétérogénéité de taille et de forme cellulaire. De plus, LMG 18311 $\Delta tagO$ -like démontre également une capacité d'agrégation, phénotype absent de la souche sauvage mais également observé pour les mutants *tagO* de *S. aureus* et *B. subtilis* (D'Elia *et al.*, 2006a; D'Elia *et al.*, 2006b; Vergara-Irigaray *et al.*, 2008). La capacité d'agrégation des mutants $\Delta tagO$ pourrait être une propriété générale propre à l'absence des acides téichoïques de l'enveloppe des bactéries à Gram positif. Par ailleurs, comme suggéré par Vergara-Irigaray *et al.* (2008) ce phénotype pourrait s'expliquer par l'absence des WTA de la paroi cellulaire, rendant ainsi possible de nouvelles interactions entre des composés de la paroi cellulaire qui d'ordinaire ne peuvent interagir (Vergara-Irigaray *et al.*, 2008). De façon surprenante, la caractérisation de la charge globale de la souche LMG 18311 $\Delta tagO$ -like par la mesure du potentiel Zéta ne démontre pas de différence significative avec la souche sauvage, suggérant que les charges négatives apportées par les polymères de WTA n'impactent pas fondamentalement la charge globale de la surface

de *S. thermophilus* LMG 18311. Le mutant LMG 18311 $\Delta tagO$ -like présente une capacité à développer un biofilm plus important que la souche sauvage comme en témoigne la mesure des biovolumes après 15 h de croissance en plaque de polystyrène. Cette caractéristique n'est en revanche pas partagée par *S. aureus* et *Staphylococcus epidermidis* pour lesquelles une altération de formation de biofilm a été observée pour le mutant *tagO* suggérée par les auteurs comme étant une conséquence de l'augmentation de l'hydrophobicité chez $\Delta tagO$ par rapport à la souche sauvage (Holland *et al.*, 2011). Il se peut que LMG 18311 $\Delta tagO$ -like n'engendre pas une telle augmentation d'hydrophobicité ou un effet inverse.

L'étude de l'impact de la mutation de *tagO*-like chez la réceptrice LMG 18311 démontre une augmentation de l'efficacité d'acquisition d'ICES $t3$ d'un facteur d'environ 40 comparé à la réceptrice sauvage. Ces résultats suggèrent que la présence des WTA inhibe l'acquisition d'ICES $t3$ dans un contexte sauvage. Quatre hypothèses peuvent être proposées pour l'explication de cet impact : (i) les WTA peuvent représenter plus de la moitié de la biomasse de la paroi cellulaire des bactéries à Gram positif (Burgain *et al.*, 2014). De ce fait, l'absence de ces composés de paroi chez LMG 18311 aboutit à l'exposition d'une surface beaucoup moins dense et encombrée pouvant être propice à l'établissement du pore protéique de conjugaison de façon générale, et/ou à l'activité de l'hydrolase de peptidoglycane OrfA codée par ICES $t3$ en particulier ; (ii) il est également possible d'envisager une interaction moléculaire des WTA avec un composé important au niveau de la cellule donatrice, dont le fruit résulterait en l'inhibition du transfert de l'élément. Ce type d'interaction a déjà été caractérisée dans le cadre de transfert horizontal d'îlots génomiques par transduction de phages helper (Xia *et al.*, 2011) ; (iii) bien qu'après 6 h de croissance aucune différence significative dans la formation de biofilm ne distingue la souche LMG 18311 $\Delta tagO$ -like de la souche sauvage, des temps de croissance plus longs permettent l'augmentation du développement de biofilms de ce mutant, pouvant ainsi représenter un environnement propice à l'échange de gènes ; (iv) le mutant $\Delta tagO$ -like présente un phénotype d'agrégation témoignant d'une plus forte interaction entre cellules de la même chaînette mais également entre les différentes chaînettes de cellules par rapport à la souche sauvage. Ce phénotype peut de ce fait grandement contribuer à l'augmentation de l'acquisition d'ICES $t3$ en favorisant le contact entre cellules, dans un premier temps en permettant une agrégation avec la donatrice lors de la co-culture des deux cellules, puis dans un second temps en permettant un re-transfert efficace d'ICES $t3$ à partir des transconjugants. En revanche, la mesure du potentiel Zéta de $\Delta tagO$ -like ne permet pas d'émettre d'hypothèse quant à un éventuel impact de la

charge sur l'interaction cellule-cellule dans le contexte de ce mutant. Celle-ci ne semble à priori pas entrer en ligne de compte.

2.1.2.2. Impact des acides lipotéichoïques de paroi (LTA)

L'analyse du génome de la souche LMG 18311 et la comparaison avec les gènes homologues identifiés dans la biosynthèse des LTA a permis de mettre en évidence la présence d'un gène homologue de *yfnI* de *B. subtilis*. L'analyse n'a en revanche pas permis l'identification d'autres LTA synthases suggérant que, chez *S. thermophilus*, seule une LTA synthase intervient dans la voie de biosynthèse telle que mis en évidence chez *L. monocytogenes* (Webb *et al.*, 2009) ou *S. aureus* (Grundling & Schneewind, 2007). Chez cette dernière, la déplétion de cette unique LTA synthase provoque un blocage de la synthèse des LTA (Grundling & Schneewind, 2007). De ce fait, il est attendu que LMG 18311 $\Delta yfnI$ -like présente une absence de LTA ou au moins une réduction de ce contenu.

Comme pour *B. subtilis*, *Yfni*-like n'est pas indispensable à la viabilité de *S. thermophilus* LMG 18311. Alors que la délétion de la LTA synthase semble provoquer un lourd impact sur la croissance de *S. aureus* qui dépend finement des conditions de milieux de culture et de température (Grundling & Schneewind, 2007; Oku *et al.*, 2009), la mutation $\Delta yfnI$ -like ne provoque qu'un léger ralentissement de la vitesse de croissance de LMG 18311 en milieu LM17 à 42°C. En revanche, conformément à ce qui a été décrit pour l'absence de LTA chez les bactéries à Gram positif (Reichmann *et al.*, 2014), LMG 18311 $\Delta yfnI$ -like présente des défaillances morphologiques se traduisant par une hétérogénéité de taille et de forme ainsi que des positionnements particuliers des septa de division. La mesure de la charge globale de la surface de LMG 18311 $\Delta yfnI$ -like ne montre pas de différence significative avec celle de la souche sauvage, suggérant que de façon similaire au mutant $\Delta tagO$ -like, l'apport des charges négatives des polymères de LTA ne modifient pas drastiquement la charge globale de la paroi de *S. thermophilus* LMG 18311. L'étude de la capacité de LMG 18311 $\Delta yfnI$ -like à former des biofilms montre une augmentation significative des biovolumes de biofilm après 6 h de croissance en comparaison avec la souche sauvage. En revanche, une étude menée sur un mutant de *S. aureus* présentant une réduction du contenu de LTA met en évidence une augmentation de l'hydrophobicité et une diminution de la capacité à adhérer et former des biofilms (Fedtke *et al.*, 2007) tel qu'observé lors de la délétion des WTA à travers le mutant $\Delta tagO$ chez *S. epidermidis* (Holland *et al.*, 2011). De ce fait, tel que formulé précédemment pour $\Delta tagO$ -like, il est également envisageable que $\Delta yfnI$ -like puisse présenter

moins d'augmentation voire une diminution d'hydrophobicité provoquant l'augmentation de la formation de biofilm.

L'utilisation de LMG 18311 *ΔyfnI-like* comme réceptrice démontre une augmentation de l'efficacité d'acquisition d'ICE*St3* d'un facteur proche de 100 fois celle de la réceptrice sauvage. Ces résultats suggèrent que la présence de la totalité du contenu en LTA de l'enveloppe bactérienne de LMG 18311 inhibe l'acquisition d'ICE*St3*. Des résultats similaires ont été décrits pour ICE*BsI* de *B. subtilis* avec une augmentation de l'acquisition de l'élément d'un facteur 10 environ chez le mutant *ΔyfnI* comparé à la réceptrice sauvage (Johnson & Grossman, 2014; Johnson & Grossman, 2016). La différence de facteurs d'impact observée chez ces deux ICE pourrait s'expliquer par l'induction préalable d'ICE*BsI* lors de ces expériences, augmentant de ce fait sa fréquence de transfert initiale et aboutissant à une saturation, bien que d'autres facteurs ICE- ou souche-dépendants peuvent également en être la cause. Trois des hypothèses énoncées dans l'explication de l'impact de la mutation *ΔtagO-like* peuvent également être valables dans le cadre de ce mutant : (i) la délétion de *yfnI-like* devrait potentiellement inhiber la production de LTA ou au moins réduire leur présence, libérant de ce fait la paroi de l'encombrement produit par ce réseau important de molécules. Ceci pourrait être favorable à l'interaction donatrice/réceptrice et à la mise en place du pore protéique de conjugaison ; (ii) les LTA sont connues pour interagir avec de nombreuses molécules de surface notamment des protéines de surface dans le cadre d'interactions cellule-cellule. De ce fait, la présence de la totalité des LTA pourrait être à l'origine d'une diminution d'efficacité d'interaction ou de l'inhibition moléculaire d'un composé important dans le cadre du transfert d'ICE*St3* ; (iii) six heures de croissance suffisent à mettre en évidence une augmentation des biovolumes des biofilms de LMG 18311 *ΔyfnI-like* témoignant d'une meilleure capacité à former des biofilms par rapport à la souche sauvage. Ce phénotype traduit une plus forte capacité d'adhésion aux surfaces mais également une meilleure interaction cellule-cellule pouvant refléter un environnement dans lequel le transfert de gènes est favorisé. De même que pour le mutant *ΔtagO-like*, la charge globale à la surface de LMG 18311 *ΔyfnI-like* ne semble pas constituer un élément à considérer pour expliquer cet impact.

2.1.2.3. Impact de la charge de la surface de LMG 18311

2.1.2.3.1. Impact du lysyl-phosphatidylglycérol (L-PG)

Les phosphatidylglycérols (PG) sont des composés lipidiques retrouvés au niveau de la membrane plasmique des bactéries à Gram positif. Leur estérification peut s'effectuer par le biais d'une lysine (L-PG) qui est à l'origine de la modulation de la charge de la membrane plasmique de ces bactéries et de la modification de la charge nette du peptidoglycane généralement négative en faveur d'une charge nette zwitterionique voire positive (Kilelee *et al.*, 2010). L'impact de ce composé a été étudié dans le cadre de l'investigation de l'impact de la charge nette de la surface de *S. thermophilus* sur le transfert d'ICESt3. C'est le gène *mprF-like*, homologue du gène *mprF* décrit comme indispensable à la production du L-PG chez *B. subtilis* mais également chez *S. aureus* (RajBhandary & Soll, 2008), qui a été ciblé chez LMG 18311.

La mutation *ΔmprF-like* ne provoque pas d'altération de croissance chez LMG 18311. En revanche, celle-ci provoque des modifications morphologiques se traduisant par une hétérogénéité de forme et de taille cellulaire. La mesure du potentiel Zéta de ce mutant ne montre pas de différence significative par rapport à la souche sauvage, suggérant un rôle moins fondamental du L-PG dans la modification de la charge nette de la bactérie. De même, cette mutation ne modifie pas la capacité de LMG 18311 à former des biofilms.

L'utilisation de LMG 18311 *ΔmprF-like* en tant que cellule réceptrice lors des expériences de conjugaison sur filtre démontre une augmentation de l'efficacité d'acquisition d'ICESt3, bien que moindre (facteur x 5) comparée aux effets des mutations discutées précédemment. Ces résultats s'opposent à ceux obtenus pour ICEBs1 et Tn916 pour lequel l'utilisation du mutant *mprF* en tant que cellule réceptrice provoque une diminution de l'efficacité d'acquisition de l'élément (Johnson & Grossman, 2016). Tel que suggéré par les auteurs, le L-PG pourrait remplir la fonction de tampon dans les différents environnements et conditions de culture rencontrés par la bactérie, démontrant par conséquent un impact différent du L-PG sur la conjugaison dépendant de ces conditions (Johnson & Grossman, 2016). Les observations de Johnson et Grossman ne sont par conséquent pas contradictoires avec les résultats obtenus pour LMG 18311 *ΔmprF-like* compte-tenu des différentes conditions de culture de *S. thermophilus* et *B. subtilis*, et des propriétés de surface différentes de ces deux bactéries.

2.1.2.3.2. Impact de la D-alanylation des WTA et LTA

L'impact de la D-alanylation des acides téichoïques a été étudié suite au ciblage du gène *dltA* de LMG 18311, faisant partie de l'opéron *dlt* dont la fonction est de neutraliser les charges négatives des WTA et LTA des bactéries à Gram positif. La délétion du gène *dltA* provoque un manque de D-alanylation de ces composés chez *B. subtilis* et *E. faecalis* (Fabretti *et al.*, 2006; Perego *et al.*, 1995), de ce fait il est attendu que la mutation $\Delta dltA$ bloque l'ajout de D-alanine aux acides téichoïques de LMG 18311.

La mutation $\Delta dltA$ n'altère pas la croissance de LMG 18311. En revanche, LMG 18311 $\Delta dltA$ se distingue de la souche sauvage par sa structuration sous forme agrégative comme pour le mutant $\Delta tagO$ -like. De façon surprenante, la caractérisation de la charge de la surface cellulaire de LMG 18311 $\Delta dltA$ ne démontre pas de différence significative avec la souche sauvage, alors qu'une charge nette de $\Delta dltA$ plus négative que celle de la souche sauvage aurait été attendue. Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus suite à la mesure du potentiel Zeta des LTA et WTA discutés précédemment et est en faveur d'un contenu en acides téichoïques faiblement chargés négativement. Ceci suggère l'exposition d'un squelette carboné pauvre en répétitions d'unités glycérol-phosphate pour ces deux types de polymères chez *S. thermophilus* LMG 18311. Par ailleurs, ces résultats peuvent également indiquer la présence d'une faible quantité de LTA et WTA à la surface de LMG 18311. Aussi, il n'est pas exclu que l'absence d'impact des mutations $\Delta tagO$ -like et $\Delta yfnI$ -like sur la charge globale de la surface de LMG 18311 puisse être due à une élimination non totale du contenu en WTA et LTA chez ces mutants. Le dosage de ces composés chez les mutants permettrait de le vérifier. Par ailleurs, l'analyse de la capacité de LMG 18311 $\Delta dltA$ à former des biofilms démontre une augmentation des biovolumes suite à 15 h de croissance en microplaque comparé à la souche sauvage, suggérant une meilleure capacité d'adhésion et d'interaction des cellules $\Delta dltA$ par rapport à la souche sauvage. La délétion de *dltA* provoque en revanche une diminution de la capacité à former des biofilms chez *E. faecalis* (Fabretti *et al.*, 2006), telle qu'observé également pour $\Delta tagO$ -like et $\Delta yfnI$ -like discutés précédemment. Dans leur globalité, les résultats d'analyse du potentiel Zéta et de la capacité à former des biofilms des mutants $\Delta tagO$ -like, $\Delta yfnI$ -like et $\Delta dltA$ sont en faveur d'une organisation distincte de la surface de *S. thermophilus* potentiellement due à son adaptation au milieu laitier comparé aux bactéries à Gram positif modèles dont l'écosystème n'est autre que la flore humaine et gastro-intestinale.

L'efficacité d'acquisition d'ICES₃ est augmentée d'un facteur proche de 40 lors de l'utilisation de la réceptrice LMG 18311 $\Delta dltA$ comparé à la souche sauvage. En revanche, le mutant $\Delta dltA$ ne présente pas de différence significative avec le mutant $\Delta tagO-like$. La caractérisation de ce mutant permet d'émettre deux hypothèses quant à son impact sur l'acquisition d'ICES₃ : (i) les mutants $\Delta dltA$ et $\Delta tagO-like$ se distinguent des autres mutants de par leur capacité d'interaction cellule-cellule comme en témoigne leur structuration en agrégats. Celle-ci peut expliquer l'augmentation de l'efficacité de transfert observée et est une hypothèse plausible compte-tenu du même facteur d'impact observé pour ces deux mutants. L'aggrégation pourrait donc être à l'origine du phénotype de transfert observé chez ces deux mutants ; (ii) en lien avec la première hypothèse, $\Delta dltA$ présente une capacité à former des biofilms plus importante que la souche sauvage pouvant être à l'origine d'un environnement favorable au transfert et l'acquisition de l'élément. En revanche, pour $\Delta dltA$ aussi bien que pour les mutants $\Delta tagO-like$, $\Delta yfnI-like$ et $\Delta mprF-like$, il semble peu concevable que l'augmentation des interactions électrostatiques soit à l'origine de l'augmentation des efficacités de transfert.

2.1.3. Impact des polysaccharides

2.1.3.1. Impact des exopolysaccharides

L'impact des exopolysaccharides a été évalué à travers deux mutants dont les gènes ciblés font partie du large cluster *eps* de LMG 18311 : $\Delta epsE$ et $\Delta eps9-11$ pour lesquels des gènes impliqués dans l'activité glycosyltransférase et pyruvyltransférase ont été délétés. Les EPS de *S. thermophilus* ont fait l'objet de nombreuses caractérisations. Des données démontrent en particulier l'absence de détection d'EPS dans le cadre du mutant $\Delta epsE$ chez *S. thermophilus* (Minic *et al.*, 2007). Ainsi, il est attendu que LMG 18311 $\Delta epsE$ soit dépourvue d'EPS à sa surface. Les résultats obtenus pour les deux mutants testés étant identiques en tout point, ils seront discutés communément.

Les mutants LMG 18311 $\Delta epsE/\Delta eps9-11$ présentent une courbe de croissance semblable à celle de la souche sauvage. Cependant, il en est autrement de leur propriété de croissance en culture liquide qui reflète une forte sédimentation puisant vraisemblablement son origine dans l'augmentation de la longueur des chaînettes de cellules comparé à la souche sauvage. Ce phénotype pourrait être une conséquence d'une meilleure activité / interaction des molécules, notamment de type polysaccharides, influençant la longueur des chaînettes de

S. thermophilus. L'observation de ces mutants a par ailleurs pu confirmer le caractère indispensable du gène *epsE* dans la formation des EPS, mais également démontrer celui du gène *eps9-11*. La mesure du potentiel Zéta des mutants LMG 18311 $\Delta epsE/\Delta eps9-11$ démontre une charge nette à la surface les distinguant significativement de la souche sauvage et de l'ensemble des mutants étudiés lors de ces travaux. Les mutants $\Delta epsE/\Delta eps9-11$ exposent une surface plus chargée positivement dans les pH acides, alors que celle-ci est plus chargée négativement dans les pH neutre et basique. Ce phénotype peut être expliqué par l'influence des charges négatives pouvant être apportées par des composés tels que le phosphate et l'acétate retrouvés dans le squelette carboné de certains EPS. L'analyse de la capacité à former des biofilms de $\Delta epsE/\Delta eps9-11$ ne montre pas de différence significative avec la souche sauvage après 6 h de croissance, en revanche les données mesurées à 15 h de croissance démontrent une augmentation des biovolumes. La formation de biofilm de $\Delta epsE$ de *S. thermophilus* LMG 18311 est par ailleurs difficilement comparable à celles d'autres espèces telles que *B. subtilis* du fait de l'importance de EpsE dans le blocage de la motilité de ces bactéries, représentant de ce fait une molécule nécessaire à la formation de biofilms pour ces espèces motiles (Guttenplan *et al.*, 2010).

L'utilisation de LMG 18311 $\Delta epsE/\Delta eps9-11$ en tant que cellules réceptrices engendre la plus forte augmentation de l'efficacité d'acquisition d'ICESt3 avec un facteur proche de 400 comparé à la réceptrice sauvage. Ces résultats suggèrent l'inhibition de l'acquisition d'ICESt3 par la présence d'EPS. Plusieurs hypothèses interconnectées impliquant des interactions cellule-cellule peuvent être formulées afin d'expliquer ces résultats : (i) les EPS constituent un large réseau formant un manteau tout autour de l'enveloppe de *S. thermophilus*. L'absence de ce manteau peut ainsi favoriser l'interaction cellule-cellule en favorisant l'interaction de composés à l'origine « cachés » par ce manteau, permettant de ce fait une meilleure interaction avec la cellule donatrice ; (ii) il est démontré pour ICEBs1 que la conjugaison s'effectue aux pôles de la cellule. Si cela est également applicable à ICESt3, les longues chaînettes qu'exposent les mutants $\Delta epsE/\Delta eps9-11$ peuvent être à l'origine de cette augmentation d'efficacité d'acquisition d'ICESt3, tout en favorisant également un re-transfert efficace d'ICESt3 à partir des transconjugants vers les différentes cellules que comporte une même chaînette ; (iii) les expériences de conjugaison sur filtre sont réalisées dans du milieu LM17 préparé à pH 6,9 qui est fortement susceptible à l'acidification lors de la croissance de *S. thermophilus*. De plus, la mesure du potentiel Zeta démontre une surface fortement chargée positivement pour $\Delta epsE/\Delta eps9-11$ aux pH acides. Considérant ces deux données, il est

envisageable que des interactions électrostatiques soient à l'origine de l'augmentation de cette efficacité de transfert ; (iv) l'augmentation des interactions et de la capacité d'adhésion conférées par la formation de biofilm de $\Delta epsE/\Delta eps9-11$ peuvent également être à l'origine de ce phénotype.

2.1.3.2. Impact de *stu1482-rgpX2*

Le mutant $\Delta stu1482-rgpX2$ présente la délétion d'un cluster de gènes contenant les gènes *rgpX3* et *rgpX2* codant des protéines putatives impliquées dans la biosynthèse des polysaccharides, un gène *stu1481* codant une protéine putative de fonction inconnue, et *stu1482* potentiellement impliquée dans la biosynthèse de rhamnose. Par conséquent, $\Delta stu1482-rgpX2$ pourrait lourdement impacter le contenu en polysaccharides de LMG 18311.

LMG 18311 $\Delta stu1482-rgpX2$ présente une altération des propriétés de croissance par rapport à la souche sauvage et aux autres mutants étudiés. Le mutant $\Delta stu1482-rgpX2$ démontre également des altérations morphologiques se traduisant par des formes cellulaires parfois aberrantes et globalement de tailles hétérogènes suggérant une forte altération des propriétés de paroi de ce mutant. La charge à la surface de ce mutant ne semble en revanche pas modifiée. La présence d'EPS est par ailleurs visible par microscopie chez ce mutant $\Delta stu1482-rgpX2$. De ce fait, le mutant $\Delta stu1482-rgpX2$ ne semble pas impacter le contenu en exopolysaccharides de LMG 18311. Alors que l'analyse de la capacité à former des biofilms met en évidence une diminution de biovolumes à 6 h pour $\Delta stu1482-rgpX2$ par rapport au WT, les résultats obtenus après 15 h de croissance mettent en évidence une augmentation des biovolumes, qui s'avère être corrélée à une phase de latence plus importante accompagnée d'un taux de croissance plus faible.

L'utilisation de LMG 18311 $\Delta stu1482-rgpX2$ en tant que cellule réceptrice ne démontre pas de différence significative dans l'acquisition d'ICE*St3* par rapport à la réceptrice sauvage. Ainsi, les composés ciblés à travers ce mutant ne semblent pas interférer avec le contact cellule-cellule, ni avec l'établissement du pore protéique de conjugaison nécessaire au transfert de l'élément.

2.2. Impact des molécules de surface sur le transfert d'ICES_{St3} par les cellules donatrices

Suite aux résultats obtenus démontrant l'impact des molécules de surface sur l'acquisition d'ICES_{St3} par les cellules réceptrices, l'étude de leur impact sur le transfert de l'élément chez les cellules donatrices s'est avérée nécessaire. Ainsi, les mutations ayant présenté un impact significatif dans la première partie de cette étude ont également été testées chez les cellules donatrices (*e.g.* $\Delta lspA$, $\Delta tagO$ -like, $\Delta yfnI$ -like, $\Delta mprF$ -like, $\Delta dltA$, $\Delta epsE$ et $\Delta esp9-11$).

De façon surprenante, l'ensemble des mutants ayant présenté une augmentation significative des fréquences d'acquisition d'ICES_{St3} lorsque la mutation ciblait la cellule réceptrice ont démontré une diminution significative du transfert d'ICES_{St3} lorsque la mutation ciblait la cellule donatrice. Ces résultats suggèrent que le clivage des lipoprotéines par LspA, la présence des acides téichoïques et des exopolysaccharides sont importants pour le transfert de l'élément. Du fait de l'utilisation de la même souche pour chacune de ces problématiques, ces résultats sont en faveur d'un impact différent si la cellule agit en tant que réceptrice, ou si celle-ci joue le rôle de cellule donatrice d'ICES_{St3}, suggérant de ce fait un impact lié à la présence et/ou l'activité de l'élément.

2.3. Impact des molécules de surface sur le transfert d'ICES_{St3} par les cellules donatrices et de son acquisition par les cellules réceptrices

L'impact du transfert et de l'acquisition de l'élément par un couple donatrice / réceptrice toutes deux mutées au niveau de la même molécule de surface a également été évalué pour quatre mutants (*e.g.* $\Delta lspA$, $\Delta tagO$ -like, $\Delta yfnI$ -like, $\Delta epsE$).

Les résultats de transfert des couples mutés ont démontré une diminution du transfert d'ICES_{St3} comparé au couple sauvage. Ces résultats rejoignent donc les résultats observés lorsque seule la donatrice est mutée, confirmant alors l'importance de ces molécules pour un transfert efficace de l'élément. De plus, aucun effet additif entre l'impact de la donatrice et l'impact de la réceptrice n'a été recensé indiquant l'absence d'effet synergique ou compensatoire, il en ressort donc un effet dominant de l'impact de la mutation des cellules donatrices sur le transfert de l'élément par rapport à celui des cellules réceptrices. De ce fait,

l'inhibition du transfert d'ICES β 3 devrait se produire au préalable de son entrée dans la cellule réceptrice, reflétant ainsi une inhibition de transfert plutôt qu'une inhibition de l'acquisition de l'élément. L'ensemble de ces résultats sont donc en faveur d'un impact direct de ces molécules au niveau de l'assemblage de la machinerie conjugative. Ainsi, ces données suggèrent que dans le cadre d'une donatrice mutée l'impact observé est lié à la présence et/ou à l'activité de l'élément, indépendamment des facteurs d'hôte pouvant intervenir.

2.4. Conclusion et perspectives de l'étude

Cette étude démontre la forte influence des molécules de surface sur le transfert horizontal d'ICES β 3. L'utilisation de réceptrices mutées dans les expériences de conjugaison sur filtre a mis en évidence l'augmentation de l'efficacité d'acquisition d'ICES β 3 pour un certain nombre de mutants (Figure 25).

La caractérisation de ces mutants à travers leur observation (microscopie électronique, à contraste de phase, œil nu), la mesure de leur potentiel Zêta, ou l'analyse de leur capacité à former des biofilms, a permis d'émettre un certain nombre d'hypothèses reflétant globalement l'importance des interactions cellulaires dans l'établissement du contact donatrice/réceptrice et la mise en place d'un contexte favorable à l'acquisition de l'élément. Les gènes ciblés au cours de ce travail impactent fortement la composition et l'organisation de la surface de *S. thermophilus*. Cette bactérie semble par ailleurs présenter des propriétés la distinguant des autres bactéries modèles, pouvant être liées à son adaptation récente au milieu laitier. Il est important de noter que la mutation de ces gènes peut engendrer énormément de modifications aussi bien dans les voies de biosynthèse mais également au niveau de la régulation de l'expression de gènes dont on peut difficilement suspecter l'identité. C'est pourquoi les phénotypes observés lors de la caractérisation de ces mutants (surface + transfert) peuvent être liés à différents événements se produisant en amont nécessitant des études plus poussées afin de parvenir à une compréhension précise.

L'utilisation d'une donatrice mutée en couple avec une réceptrice sauvage ou mutée a mis en évidence une sorte de différenciation des cellules selon leur statut de donatrice ou de réceptrice d'ICES β 3. La notion de différenciation des cellules donatrices d'un ICE selon l'activité de celui-ci a déjà été décrite dans le cadre d'une étude traitant du comportement des cellules portant ICE ϵ lc (Reinhard *et al.*, 2013). Le terme semble également approprié dans le cadre des résultats obtenus lors de ce travail de thèse, puisqu'ils impliquent un impact

différent d'une même cellule selon si celle-ci s'adonne à recevoir ou à donner l'élément (Figure 25), reflétant par la même occasion la capacité de l'élément à impacter son hôte en liaison avec son activité. Il est également envisageable que seule la présence de l'élément suffit à expliquer ces différences. ICE*St3* est un élément de 28 kb portant un module d'adaptation large de 10 kb dont la majorité des régions codantes codent des fonctions inconnues pouvant perturber l'organisation générale de la paroi de *S. thermophilus*.

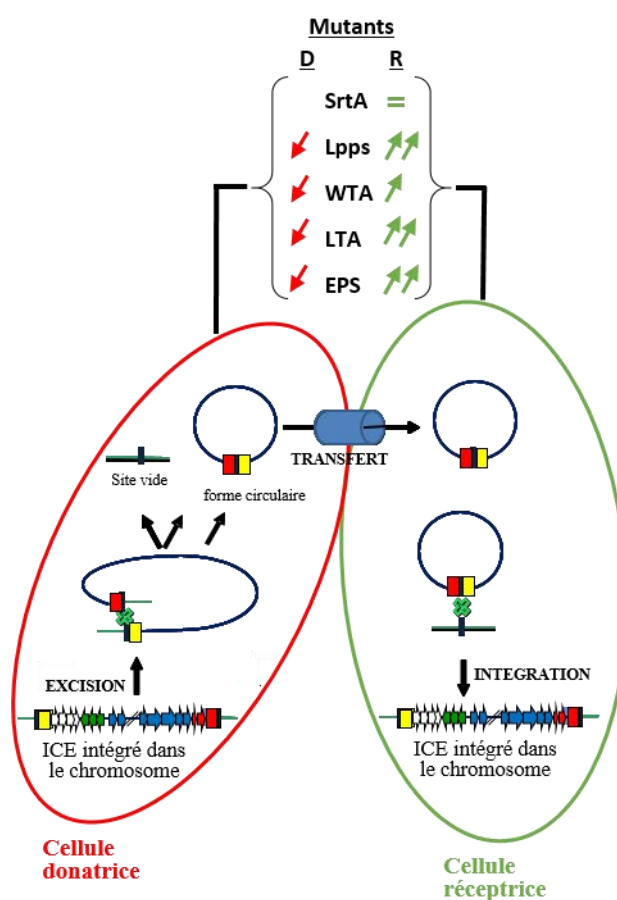


Figure 25 : Schéma récapitulatif de l'impact des molécules de surface sur le transfert et l'acquisition d'ICE*St3* par *S. thermophilus* LMG 18311.

Les flèches de couleur indiquent la diminution ou l'augmentation des fréquences de transfert d'ICE*St3* selon le sens de la flèche. La présence d'une flèche de couleur indique un facteur d'impact supérieur à 10. La présence de deux flèches de couleur indique un facteur d'impact supérieur à 100. Le signal égal indique l'absence d'impact sur le transfert d'ICE*St3*.

Plusieurs expériences complémentaires pourraient être réalisées afin d'évaluer si les résultats mis en évidence suite à cette étude pourraient être extrapolés à d'autres espèces ou d'autres éléments. Par exemple, il serait intéressant de tester le transfert des ICE de

S. salivarius vers des réceptrices *S. salivarius* ou *S. thermophilus* mutées au niveau des molécules de surface ayant démontré une augmentation d'acquisition d'ICE*St3*, afin d'évaluer si celles-ci pouvaient également provoquer l'augmentation de l'acquisition des ICE de *S. salivarius*. Par ailleurs, l'impact observé sur le transfert d'ICE*St3* lorsque la donatrice est mutée semble indépendant de l'impact de la réceptrice. Dans le but de conforter cette observation, il serait intéressant d'utiliser les donatrices mutées en expérience de conjugaison sur filtre en couple avec une réceptrice d'une autre espèce telle que *E. faecalis* souche JH2-2 qui reçoit d'ordinaire ICE*St3* à une fréquence de 10^{-7} transconjugants par cellules donatrices. Afin de confirmer l'influence des facteurs d'hôte, un transconjugant *E. faecalis* JH2-2 possédant ICE*St3* pourrait aussi être utilisé en expérience de conjugaison sur filtre vers des réceptrices JH2-2 sauvages et mutées. Parallèlement, il serait également intéressant d'utiliser Tn*916*, que l'on retrouve assez fréquemment dans les génomes de Streptocoques, afin d'étudier l'impact de ces molécules de surface sur le transfert de cet ICE. Si ces molécules s'avèrent être importantes pour le transfert des éléments intégratifs conjugatifs indépendamment de l'hôte, ces molécules pourraient être ciblées afin de ralentir l'expansion rapide d'échanges de gènes de résistance aux antibiotiques dont s'alarme l'Organisation Mondiale de la Santé (Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance, 2014).

IV. BIBLIOGRAPHIE

Alexander, H. E., Hahn, E. & Leidy, G. (1956). On the specificity of the desoxyribonucleic acid which induces streptomycin resistance in *Hemophilus*. *J Exp Med* **104**, 305-320.

Ambroset, C., Coluzzi, C., Guédon, G., Devignes, M. D., Loux, V., Lacroix, T., Payot, S. & Leblond-Bourget, N. (2016). New insights into the classification and integration specificity of *Streptococcus* Integrative Conjugative Elements through extensive genome exploration. *Front Microbiol* **6**, 1483.

Aminov, R. I. (2011). Horizontal gene exchange in environmental microbiota. *Front Microbiol* **2**, 158.

Arutyunov, D. & Frost, L. S. (2013). F conjugation: back to the beginning. *Plasmid* **70**, 18-32.

Aspiras, M. B., Ellen, R. P. & Cvitkovitch, D. G. (2004). ComX activity of *Streptococcus mutans* growing in biofilms. *FEMS Microbiol Lett* **238**, 167-174.

Auchtung, J. M., Lee, C. A., Monson, R. E., Lehman, A. P. & Grossman, A. D. (2005). Regulation of a *Bacillus subtilis* mobile genetic element by intercellular signaling and the global DNA damage response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12554-12559.

Auchtung, J. M., Lee, C. A., Garrison, K. L. & Grossman, A. D. (2007). Identification and characterization of the immunity repressor (ImmR) that controls the mobile genetic element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **64**, 1515-1528.

Auchtung, J. M., Aleksanyan, N., Bulku, A. & Berkmen, M. B. (2016). Biology of ICEBs1, an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* **86**, 14-25.

Aviv, G., Rahav, G. & Gal-Mor, O. (2016). Horizontal transfer of the *Salmonella enterica* serovar Infantis resistance and virulence plasmid pESI to the gut microbiota of warm-blooded hosts. *MBio* **7**.

Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R. & other authors (2017). Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol* **43**, 313-351.

Balado, M., Lemos, M. L. & Osorio, C. R. (2013). Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family from fish-isolated *Vibrios* encode restriction-modification systems that confer resistance to bacteriophages. *FEMS Microbiol Ecol* **83**, 457-467.

Beaber, J. W., Hochhut, B. & Waldor, M. K. (2002). Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* **184**, 4259-4269.

Beaber, J. W., Hochhut, B. & Waldor, M. K. (2004). SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**, 72-74.

Bellanger, X., Morel, C., Decaris, B. & Guedon, G. (2007). Derepression of excision of integrative and potentially conjugative elements from *Streptococcus thermophilus* by DNA damage response: implication of a *cI*-related repressor. *J Bacteriol* **189**, 1478-1481.

Bellanger, X., Roberts, A. P., Morel, C., Choulet, F., Pavlovic, G., Mullany, P., Decaris, B. & Guedon, G. (2009). Conjugative transfer of the integrative conjugative elements ICE*St1* and ICE*St3* from *Streptococcus thermophilus*. *J Bacteriol* **191**, 2764-2775.

Bellanger, X., Morel, C., Gonot, F., Puymège, A., Decaris, B. & Guédon, G. (2011). Site-specific accretion of an Integrative Conjugative Element and a related genomic island leads to cis-mobilization and gene capture. *Mol Microbiol* **81**, 912-925.

Bellanger, X., Payot, S., Leblond-Bourget, N. & Guedon, G. (2014). Conjugative and mobilizable genomic islands in bacteria: evolution and diversity. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 720-760.

Beres, S. B. & Musser, J. M. (2007). Contribution of exogenous genetic elements to the group A *Streptococcus* metagenome. *PLoS One* **2**, e800.

Bhatty, M., Cruz, M. R., Frank, K. L., Gomez, J. A., Andrade, F., Garsin, D. A., Dunne, G. M., Kaplan, H. B. & Christie, P. J. (2015). *Enterococcus faecalis* pCF10-encoded surface proteins PrgA, PrgB (aggregation substance) and PrgC contribute to plasmid transfer, biofilm formation and virulence. *Mol Microbiol* **95**, 660-677.

Blesa, A., Baquedano, I., Quintans, N. G., Mata, C. P., Caston, J. R. & Berenguer, J. (2017). The transjugation machinery of *Thermus thermophilus*: Identification of TdtA, an ATPase involved in DNA donation. *PLoS Genet* **13**, e1006669.

Blomqvist, T., Steinmoen, H. & Havarstein, L. S. (2006). Natural genetic transformation: a novel tool for efficient genetic engineering of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6751-6756.

Bolotin, A., Quinquis, B., Renault, P. & other authors (2004). Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Nat Biotechnol* **22**, 1554-1558.

Bordeleau, E., Brouillette, E., Robichaud, N. & Burrus, V. (2010). Beyond antibiotic resistance: integrating conjugative elements of the SXT/R391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-di-GMP signalling in *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol* **12**, 510-523.

Bordeleau, E., Ghinet, M. G. & Burrus, V. (2012). Diversity of integrating conjugative elements in actinobacteria: coexistence of two mechanistically different DNA-translocation systems. *Mob Genet Elements* **2**, 119-124.

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.

Brochet, M., Da Cunha, V., Couve, E., Rusniok, C., Trieu-Cuot, P. & Glaser, P. (2009). Atypical association of DDE transposition with conjugation specifies a new family of mobile elements. *Mol Microbiol* **71**, 948-959.

Brom, S., Girard, L., Tun-Garrido, C., Garcia-de los Santos, A., Bustos, P., Gonzalez, V. & Romero, D. (2004). Transfer of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* CFN42 requires cointegration with p42a, which may be mediated by site-specific recombination. *J Bacteriol* **186**, 7538-7548.

Buddelmeijer, N. (2015). The molecular mechanism of bacterial lipoprotein modification--how, when and why? *FEMS Microbiol Rev* **39**, 246-261.

Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A. M., Cailliez-Grimal, C. & Gaiani, C. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: surface characterization and interactions with food matrix components. *Adv Colloid Interface Sci* **213**, 21-35.

Burrus, V., Pavlovic, G., Decaris, B. & Guédon, G. (2002). The ICE*Stl* 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.

Burrus, V., Marrero, J. & Waldor, M. K. (2006). The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid* **55**, 173-183.

Burrus, V. (2017). Mechanisms of stabilization of integrative and conjugative elements. *Curr Opin Microbiol* **38**, 44-50.

Burton, J. P., Wescombe, P. A., Moore, C. J., Chilcott, C. N. & Tagg, J. R. (2006). Safety assessment of the oral cavity probiotic *Streptococcus salivarius* K12. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3050-3053.

Burton, J. P., Wescombe, P. A., Macklaim, J. M. & other authors (2013). Persistence of the oral probiotic *Streptococcus salivarius* M18 is dose dependent and megaplasmid transfer can augment their bacteriocin production and adhesion characteristics. *PLoS One* **8**, e65991.

Byrd, D. R. & Matson, S. W. (1997). Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. *Mol Microbiol* **25**, 1011-1022.

Camilli, R., Bonnal, R. J., Del Grosso, M. & other authors (2011). Complete genome sequence of a serotype 11A, ST62 *Streptococcus pneumoniae* invasive isolate. *BMC Microbiol* **11**, 25.

Canchaya, C., Fournous, G., Chibani-Chennoufi, S., Dillmann, M. L. & Brussow, H. (2003). Phage as agents of lateral gene transfer. *Curr Opin Microbiol* **6**, 417-424.

Canchaya, C., Fournous, G. & Brussow, H. (2004). The impact of prophages on bacterial chromosomes. *Mol Microbiol* **53**, 9-18.

Caparon, M. G. & Scott, J. R. (1989). Excision and insertion of the conjugative transposon Tn916 involves a novel recombination mechanism. *Cell* **59**, 1027-1034.

Carraro, N., Libante, V., Morel, C., Decaris, B., Charron-Bourgoin, F., Leblond, P. & Guedon, G. (2011). Differential regulation of two closely related integrative and conjugative elements from *Streptococcus thermophilus*. *BMC Microbiol* **11**, 238.

Carraro, N. & Burrus, V. (2014). Biology of three ICE families: SXT/R391, ICEBs1, and ICESt1/ICESt3. *Microbiol Spectr* **2**.

Carraro, N., Poulin, D. & Burrus, V. (2015). Replication and active partition of Integrative and Conjugative Elements (ICEs) of the SXT/R391 family: the line between ICEs and conjugative plasmids is getting thinner. *PLoS Genet* **11**, e1005298.

Carraro, N., Libante, V., Morel, C., Charron-Bourgoin, F., Leblond, P. & Guedon, G. (2016). Plasmid-like replication of a minimal Streptococcal Integrative and Conjugative Element. *Microbiology*.

Carraro, N., Rivard, N., Burrus, V. & Ceccarelli, D. (2017). Mobilizable genomic islands, different strategies for the dissemination of multidrug resistance and other adaptive traits. *Mob Genet Elements* **7**, 1-6.

Catlin, B. W. (1960). Transformation of *Neisseria meningitidis* by deoxyribonucleates from cells and from culture slime. *J Bacteriol* **79**, 579-590.

Ceccarelli, D., Daccord, A., Rene, M. & Burrus, V. (2008). Identification of the origin of transfer (*oriT*) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. *J Bacteriol* **190**, 5328-5338.

Chaffanel, F., Charron-Bourgoin, F., Libante, V., Leblond-Bourget, N. & Payot, S. (2015). Resistance genes and genetic elements associated with antibiotic resistance in clinical and commensal isolates of *Streptococcus salivarius*. *Appl Environ Microbiol* **81**, 4155-4163.

Chandler, M., de la Cruz, F., Dyda, F., Hickman, A. B., Moncalian, G. & Ton-Hoang, B. (2013). Breaking and joining single-stranded DNA: the HUH endonuclease superfamily. *Nat Rev Microbiol* **11**, 525-538.

Chandran Darbari, V. & Waksman, G. (2015). Structural biology of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Biochem* **84**, 603-629.

Chapot-Chartier, M. P. & Kulakauskas, S. (2014). Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb Cell Fact* **13 Suppl 1**, S9.

Choi, K. Y., Spencer, J. M. & Craig, N. L. (2014). The Tn7 transposition regulator TnsC interacts with the transposase subunit TnsB and target selector TnsD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, E2858-2865.

Christie, P. J., Atmakuri, K., Krishnamoorthy, V., Jakubowski, S. & Cascales, E. (2005). Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annu Rev Microbiol* **59**, 451-485.

Christie, P. J. (2016). The mosaic Type IV secretion systems. *EcoSal Plus* **7**.

Chuzeville, S., Dramsi, S., Madec, J. Y., Haenni, M. & Payot, S. (2015). Antigen I/II encoded by integrative and conjugative elements of *Streptococcus agalactiae* and role in biofilm formation. *Microb Pathog* **88**, 1-9.

Ciric, L., Ellatif, M., Sharma, P., Patel, R., Song, X., Mullany, P. & Roberts, A. P. (2012). Tn916-like elements from human, oral, commensal streptococci possess a variety of antibiotic and antiseptic resistance genes. *Int J Antimicrob Agents* **39**, 360-361.

Coleman, D. C., Sullivan, D. J., Russell, R. J., Arbuthnott, J. P., Carey, B. F. & Pomeroy, H. M. (1989). *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J Gen Microbiol* **135**, 1679-1697.

Coluzzi, C., Guedon, G., Devignes, M. D., Ambroset, C., Loux, V., Lacroix, T., Payot, S. & Leblond-Bourget, N. (2017). A glimpse into the world of Integrative and Mobilizable Elements in streptococci reveals an unexpected diversity and novel families of mobilization proteins. *Front Microbiol* **8**, 443.

Cook, L. C. & Dunny, G. M. (2014). The influence of biofilms in the biology of plasmids. *Microbiol Spectr* **2**.

Couvigny, B., Therial, C., Gautier, C., Renault, P., Briandet, R. & Guedon, E. (2015). *Streptococcus thermophilus* biofilm formation: a remnant trait of ancestral commensal life? *PLoS One* **10**, e0128099.

Couvigny, B., Lapaque, N., Rigottier-Gois, L. & other authors (2017). Three glycosylated serine-rich repeat proteins play a pivotal role in adhesion and colonization of the pioneer commensal bacterium, *Streptococcus salivarius*. *Environ Microbiol* **19**, 3579-3594.

Cui, Y., Xu, T., Qu, X., Hu, T., Jiang, X. & Zhao, C. (2016). New insights into various production characteristics of *Streptococcus thermophilus* strains. *Int J Mol Sci* **17**.

Cui, Y., Jiang, X., Hao, M., Qu, X. & Hu, T. (2017). New advances in exopolysaccharides production of *Streptococcus thermophilus*. *Arch Microbiol* **199**, 799-809.

d'Ari, R. (1985). The SOS system. *Biochimie* **67**, 343-347.

D'Elia, M. A., Millar, K. E., Beveridge, T. J. & Brown, E. D. (2006a). Wall teichoic acid polymers are dispensable for cell viability in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**, 8313-8316.

D'Elia, M. A., Pereira, M. P., Chung, Y. S., Zhao, W., Chau, A., Kenney, T. J., Sulavik, M. C., Black, T. A. & Brown, E. D. (2006b). Lesions in teichoic acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus* lead to a lethal gain of function in the otherwise dispensable pathway. *J Bacteriol* **188**, 4183-4189.

Das, S., Kanamoto, T., Ge, X., Xu, P., Unoki, T., Munro, C. L. & Kitten, T. (2009). Contribution of lipoproteins and lipoprotein processing to endocarditis virulence in *Streptococcus sanguinis*. *J Bacteriol* **191**, 4166-4179.

- David, B., Radziejwoski, A., Toussaint, F. & other authors (2017).** Natural DNA transformation is functional in *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* KW2. *Appl Environ Microbiol*.
- Davies, J. R., Svensater, G. & Herzberg, M. C. (2009).** Identification of novel LPXTG-linked surface proteins from *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* **155**, 1977-1988.
- Davison, J. (1999).** Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid* **42**, 73-91.
- de la Cruz, F., Frost, L. S., Meyer, R. J. & Zechner, E. L. (2010).** Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**, 18-40.
- Delavat, F., Mitri, S., Pelet, S. & van der Meer, J. R. (2016).** Highly variable individual donor cell fates characterize robust horizontal gene transfer of an integrative and conjugative element. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, E3375-3383.
- Delavat, F., Miyazaki, R., Carraro, N., Pradervand, N. & van der Meer, J. R. (2017).** The hidden life of integrative and conjugative elements. *FEMS Microbiol Rev* **41**, 512-537.
- Delorme, C., Poyart, C., Ehrlich, S. D. & Renault, P. (2007).** Extent of horizontal gene transfer in evolution of Streptococci of the *salivarius* group. *J Bacteriol* **189**, 1330-1341.
- Delorme, C., Bartholini, C., Bolotine, A., Ehrlich, S. D. & Renault, P. (2010).** Emergence of a cell wall protease in the *Streptococcus thermophilus* population. *Appl Environ Microbiol* **76**, 451-460.
- Delorme, C., Abraham, A. L., Renault, P. & Guedon, E. (2015).** Genomics of *Streptococcus salivarius*, a major human commensal. *Infect Genet Evol* **33**, 381-392.
- Demaneche, S., Kay, E., Gourbiere, F. & Simonet, P. (2001).** Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2617-2621.
- Denham, E. L., Ward, P. N. & Leigh, J. A. (2008).** Lipoprotein signal peptides are processed by Lsp and Eep of *Streptococcus uberis*. *J Bacteriol* **190**, 4641-4647.
- Desiere, F., McShan, W. M., van Sinderen, D., Ferretti, J. J. & Brussow, H. (2001).** Comparative genomics reveals close genetic relationships between phages from dairy bacteria and pathogenic Streptococci: evolutionary implications for prophage-host interactions. *Virology* **288**, 325-341.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J. (2004).** Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**, 414-424.
- Dunny, G. M. (2007).** The peptide pheromone-inducible conjugation system of *Enterococcus faecalis* plasmid pCF10: cell-cell signalling, gene transfer, complexity and evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **362**, 1185-1193.

Eng, C., Thibessard, A., Danielsen, M., Rasmussen, T. B., Mari, J. F. & Leblond, P. (2011). *In silico* prediction of horizontal gene transfer in *Streptococcus thermophilus*. *Arch Microbiol* **193**, 287-297.

Fabretti, F., Theilacker, C., Baldassarri, L., Kaczynski, Z., Kropec, A., Holst, O. & Huebner, J. (2006). Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun* **74**, 4164-4171.

Fedtke, I., Mader, D., Kohler, T. & other authors (2007). A *Staphylococcus aureus* *ypfP* mutant with strongly reduced lipoteichoic acid (LTA) content: LTA governs bacterial surface properties and autolysin activity. *Mol Microbiol* **65**, 1078-1091.

Fontaine, L., Boutry, C., de Frahan, M. H., Delplace, B., Fremaux, C., Horvath, P., Boyaval, P. & Hols, P. (2010). A novel pheromone quorum-sensing system controls the development of natural competence in *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*. *J Bacteriol* **192**, 1444-1454.

Franke, A. E. & Clewell, D. B. (1981). Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *J Bacteriol* **145**, 494-502.

Freeman, V. J. (1951). Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J Bacteriol* **61**, 675-688.

Frischer, M. E., Thurmond, J. M. & Paul, J. H. (1990). Natural plasmid transformation in a high-frequency-of-transformation marine *Vibrio* strain. *Appl Environ Microbiol* **56**, 3439-3444.

Fronzes, R., Schafer, E., Wang, L., Saibil, H. R., Orlova, E. V. & Waksman, G. (2009). Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* **323**, 266-268.

Furste, J. P., Pansegrau, W., Ziegelin, G., Kroger, M. & Lanka, E. (1989). Conjugative transfer of promiscuous IncP plasmids: interaction of plasmid-encoded products with the transfer origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 1771-1775.

Furushita, M., Akagi, H., Kaneoka, A., Awamura, K., Maeda, T., Ohta, M. & Shiba, T. (2011). Structural variation of Tn10 that carries *tetB* found in fish farm bacteria. *Microbes Environ* **26**, 84-87.

Furuya, E. Y. & Lowy, F. D. (2006). Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol* **4**, 36-45.

Gaillard, M., Pernet, N., Vogne, C., Hagenbuchle, O. & van der Meer, J. R. (2008). Host and invader impact of transfer of the *clc* genomic island into *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7058-7063.

Garcia-Aljaro, C., Balleste, E. & Muniesa, M. (2017). Beyond the canonical strategies of horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* **38**, 95-105.

Garcillan-Barcia, M. P. & de la Cruz, F. (2008). Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid* **60**, 1-18.

Garriss, G., Poulin-Laprade, D. & Burrus, V. (2013). DNA-damaging agents induce the RecA-independent homologous recombination functions of integrating conjugative elements of the SXT/R391 family. *J Bacteriol* **195**, 1991-2003.

Ghigo, J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature* **412**, 442-445.

Ghigo, J. M. (2003). Are there biofilm-specific physiological pathways beyond a reasonable doubt? *Res Microbiol* **154**, 1-8.

Goessweiner-Mohr, N., Arends, K., Keller, W. & Grohmann, E. (2014). Conjugation in Gram-Positive Bacteria. *Microbiol Spectr* **2**, PLAS-0004-2013.

Goh, Y. J., Goin, C., O'Flaherty, S., Altermann, E. & Hutkins, R. (2011). Specialized adaptation of a lactic acid bacterium to the milk environment: the comparative genomics of *Streptococcus thermophilus* LMD-9. *Microb Cell Fact* **10 Suppl 1**, S22.

Gomis-Ruth, F. X., Sola, M., de la Cruz, F. & Coll, M. (2004). Coupling factors in macromolecular type-IV secretion machineries. *Curr Pharm Des* **10**, 1551-1565.

Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* **27**, 113-159.

Grundling, A. & Schneewind, O. (2007). Synthesis of glycerol phosphate lipoteichoic acid in *Staphylococcus aureus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8478-8483.

Guglielmini, J., de la Cruz, F. & Rocha, E. P. (2013). Evolution of conjugation and type IV secretion systems. *Mol Biol Evol* **30**, 315-331.

Guttenplan, S. B., Blair, K. M. & Kearns, D. B. (2010). The EpsE flagellar clutch is bifunctional and synergizes with EPS biosynthesis to promote *Bacillus subtilis* biofilm formation. *PLoS Genet* **6**, e1001243.

Haenni, M., Saras, E., Bertin, S., Leblond, P., Madec, J. Y. & Payot, S. (2010). Diversity and mobility of integrative and conjugative elements in bovine isolates of *Streptococcus agalactiae*, *S. dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, and *S. uberis*. *Appl Environ Microbiol* **76**, 7957-7965.

Haniford, D. B. & Ellis, M. J. (2015). Transposons Tn10 and Tn5. *Microbiol Spectr* **3**, MDNA3-0002-2014.

Harmer, C. J. & Hall, R. M. (2015). The A to Z of A/C plasmids. *Plasmid* **80**, 63-82.

Haskett, T. L., Terpolilli, J. J., Bekuma, A., O'Hara, G. W., Sullivan, J. T., Wang, P., Ronson, C. W. & Ramsay, J. P. (2016). Assembly and transfer of tripartite integrative and conjugative genetic elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 12268-12273.

Hausner, M. & Wuertz, S. (1999). High rates of conjugation in bacterial biofilms as determined by quantitative *in situ* analysis. *Appl Environ Microbiol* **65**, 3710-3713.

Haustenne, L., Bastin, G., Hols, P. & Fontaine, L. (2015). Modeling of the ComRS Signaling Pathway Reveals the Limiting Factors Controlling Competence in *Streptococcus thermophilus*. *Front Microbiol* **6**, 1413.

Hinerfeld, D. & Churchward, G. (2001a). Specific binding of integrase to the origin of transfer (*oriT*) of the conjugative transposon Tn916. *J Bacteriol* **183**, 2947-2951.

Hinerfeld, D. & Churchward, G. (2001b). Xis protein of the conjugative transposon Tn916 plays dual opposing roles in transposon excision. *Mol Microbiol* **41**, 1459-1467.

Holden, M. T., Hauser, H., Sanders, M. & other authors (2009). Rapid evolution of virulence and drug resistance in the emerging zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *PLoS One* **4**, e6072.

Holland, L. M., Conlon, B. & O'Gara, J. P. (2011). Mutation of tagO reveals an essential role for wall teichoic acids in *Staphylococcus epidermidis* biofilm development. *Microbiology* **157**, 408-418.

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L. & other authors (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 435-463.

Hong, T. P., Carter, M. Q., Struffi, P., Casonato, S., Hao, Y., Lam, J. S., Lory, S. & Jousson, O. (2017). Conjugative type IVb pilus recognizes lipopolysaccharide of recipient cells to initiate PAPI-1 pathogenicity island transfer in *Pseudomonas aeruginosa*. *BMC Microbiol* **17**, 31.

Hotchkiss, R. D. (1951). Transfer of penicillin resistance in pneumococci by the desoxyribonucleate derived from resistant cultures. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **16**, 457-461.

Hyder, S. L. & Streitfeld, M. M. (1978). Transfer of erythromycin resistance from clinically isolated lysogenic strains of *Streptococcus pyogenes* via their endogenous phage. *J Infect Dis* **138**, 281-286.

Jackson, S. A., McKenzie, R. E., Fagerlund, R. D., Kieper, S. N., Fineran, P. C. & Brouns, S. J. (2017). CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science* **356**.

Janion, C. (2008). Inducible SOS response system of DNA repair and mutagenesis in *Escherichia coli*. *Int J Biol Sci* **4**, 338-344.

Jarup, L. & Akesson, A. (2009). Current status of cadmium as an environmental health problem. *Toxicol Appl Pharmacol* **238**, 201-208.

Jean, S. S. & Hsueh, P. R. (2011). Antimicrobial drug resistance in Taiwan. *J Formos Med Assoc* **110**, 4-13.

Johnsborg, O., Eldholm, V. & Havarstein, L. S. (2007). Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol* **158**, 767-778.

Johnson, C. M. & Grossman, A. D. (2014). Identification of host genes that affect acquisition of an integrative and conjugative element in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **93**, 1284-1301.

Johnson, C. M. & Grossman, A. D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annu Rev Genet* **49**, 577-601.

Johnson, C. M. & Grossman, A. D. (2016). The Composition of the Cell Envelope Affects Conjugation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **198**, 1241-1249.

Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P. & Claverys, J. P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* **12**, 181-196.

Juhas, M., Crook, D. W., Dimopoulou, I. D., Lunter, G., Harding, R. M., Ferguson, D. J. & Hood, D. W. (2007). Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands. *J Bacteriol* **189**, 761-771.

Kaci, G., Goudercourt, D., Dennin, V. & other authors (2014). Anti-inflammatory properties of *Streptococcus salivarius*, a commensal bacterium of the oral cavity and digestive tract. *Appl Environ Microbiol* **80**, 928-934.

Kilelee, E., Pokorny, A., Yeaman, M. R. & Bayer, A. S. (2010). Lysyl-phosphatidylglycerol attenuates membrane perturbation rather than surface association of the cationic antimicrobial peptide 6W-RP-1 in a model membrane system: implications for daptomycin resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **54**, 4476-4479.

Kloesges, T., Popa, O., Martin, W. & Dagan, T. (2011). Networks of gene sharing among 329 proteobacterial genomes reveal differences in lateral gene transfer frequency at different phylogenetic depths. *Mol Biol Evol* **28**, 1057-1074.

Koonin, E. V. (2016). Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions. *F1000Res* **5**.

Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I. & other authors (2001). Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**, 1225-1240.

Kyndt, T., Quispe, D., Zhai, H., Jarret, R., Ghislain, M., Liu, Q., Gheysen, G. & Kreuze, J. F. (2015). The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 5844-5849.

Lalioui, L., Pellegrini, E., Dramsi, S. & other authors (2005). The SrtA Sortase of *Streptococcus agalactiae* is required for cell wall anchoring of proteins containing the LPXTG motif, for adhesion to epithelial cells, and for colonization of the mouse intestine. *Infect Immun* **73**, 3342-3350.

- Lang, A. S., Zhaxybayeva, O. & Beatty, J. T. (2012).** Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. *Nat Rev Microbiol* **10**, 472-482.
- Lang, J. & Faure, D. (2014).** Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front Plant Sci* **5**, 14.
- Laurila, J. J., Kostamovaara, P. A. & Alahuhta, S. (1998).** *Streptococcus salivarius* meningitis after spinal anesthesia. *Anesthesiology* **89**, 1579-1580.
- Lautner, M., Schunder, E., Herrmann, V. & Heuner, K. (2013).** Regulation, integrase-dependent excision, and horizontal transfer of genomic islands in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* **195**, 1583-1597.
- Lawrence, J. G. & Ochman, H. (1998).** Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9413-9417.
- Lee, C. A., Auchtung, J. M., Monson, R. E. & Grossman, A. D. (2007).** Identification and characterization of *int* (integrase), *xis* (excisionase) and chromosomal attachment sites of the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **66**, 1356-1369.
- Lewis, D. E. A., Gussin, G. N. & Adhya, S. (2016).** New Insights into the Phage Genetic Switch: Effects of Bacteriophage Lambda Operator Mutations on DNA Looping and Regulation of PR, PL, and PRM. *J Mol Biol* **428**, 4438-4456.
- Li, Y. H., Tang, N., Aspiras, M. B., Lau, P. C., Lee, J. H., Ellen, R. P. & Cvitkovitch, D. G. (2002).** A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol* **184**, 2699-2708.
- Liao, S., Klein, M. I., Heim, K. P. & other authors (2014).** *Streptococcus mutans* extracellular DNA is upregulated during growth in biofilms, actively released via membrane vesicles, and influenced by components of the protein secretion machinery. *J Bacteriol* **196**, 2355-2366.
- Lodge, J. K., Weston-Hafer, K. & Berg, D. E. (1988).** Transposon Tn5 target specificity: preference for insertion at G/C pairs. *Genetics* **120**, 645-650.
- Lopez-Perez, M., Ramon-Marco, N. & Rodriguez-Valera, F. (2017).** Networking in microbes: conjugative elements and plasmids in the genus *Alteromonas*. *BMC Genomics* **18**, 36.
- Lopez-Sanchez, M. J., 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.
- Lorentzen, E., Siebers, B., Hensel, R. & Pohl, E. (2005).** Mechanism of the Schiff base forming fructose-1,6-bisphosphate aldolase: structural analysis of reaction intermediates. *Biochemistry* **44**, 4222-4229.

- Manganelli, R., Romano, L., Ricci, S., Zazzi, M. & Pozzi, G. (1995).** Dosage of Tn916 circular intermediates in *Enterococcus faecalis*. *Plasmid* **34**, 48-57.
- Marrero, J. & Waldor, M. K. (2005).** Interactions between inner membrane proteins in donor and recipient cells limit conjugal DNA transfer. *Dev Cell* **8**, 963-970.
- Marrero, J. & Waldor, M. K. (2007).** The SXT/R391 family of integrative conjugative elements is composed of two exclusion groups. *J Bacteriol* **189**, 3302-3305.
- Mashburn-Warren, L., McLean, R. J. & Whiteley, M. (2008).** Gram-negative outer membrane vesicles: beyond the cell surface. *Geobiology* **6**, 214-219.
- Masuda, H. & Inouye, M. (2017).** Toxins of Prokaryotic Toxin-Antitoxin Systems with Sequence-Specific Endoribonuclease Activity. *Toxins (Basel)* **9**.
- McCullen, C. A. & Binns, A. N. (2006).** *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**, 101-127.
- McShan, W. M. & Nguyen, S. V. (2016).** The Bacteriophages of *Streptococcus pyogenes*. In *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations*. Edited by J. J. Ferretti, D. L. Stevens & V. A. Fischetti. Oklahoma City (OK).
- Miller, M. B. & Bassler, B. L. (2001).** Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**, 165-199.
- Miller, R. V. (1998).** Bacterial gene swapping in nature. *Sci Am* **278**, 66-71.
- Miller, R. V. (2001).** Environmental bacteriophage-host interactions: factors contribution to natural transduction. *Antonie Van Leeuwenhoek* **79**, 141-147.
- Minic, Z., Marie, C., Delorme, C., Faurie, J. M., Mercier, G., Ehrlich, D. & Renault, P. (2007).** Control of EpsE, the phosphoglycosyltransferase initiating exopolysaccharide synthesis in *Streptococcus thermophilus*, by EpsD tyrosine kinase. *J Bacteriol* **189**, 1351-1357.
- Minoia, M., Gaillard, M., Reinhard, F., Stojanov, M., Sentchilo, V. & van der Meer, J. R. (2008).** Stochasticity and bistability in horizontal transfer control of a genomic island in *Pseudomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 20792-20797.
- Miyazaki, R. & van der Meer, J. R. (2011).** A dual functional origin of transfer in the ICE_{clc} genomic island of *Pseudomonas knackmussii* B13. *Mol Microbiol* **79**, 743-758.
- Modi, S. R., Lee, H. H., Spina, C. S. & Collins, J. J. (2013).** Antibiotic treatment expands the resistance reservoir and ecological network of the phage metagenome. *Nature* **499**, 219-222.
- Mohd-Zain, Z., Turner, S. L., Cerdeno-Tarraga, A. M. & other authors (2004).** Transferable antibiotic resistance elements in *Haemophilus influenzae* share a common

evolutionary origin with a diverse family of syntenic genomic islands. *J Bacteriol* **186**, 8114-8122.

Molin, S. & Tolker-Nielsen, T. (2003). Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol* **14**, 255-261.

Morisato, D. & Kleckner, N. (1987). Tn10 transposition and circle formation *in vitro*. *Cell* **51**, 101-111.

Mruk, I. & Kobayashi, I. (2014). To be or not to be: regulation of restriction-modification systems and other toxin-antitoxin systems. *Nucleic Acids Res* **42**, 70-86.

Mulder, J. A. & Venema, G. (1982). Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* mutants impaired in DNA entry. *J Bacteriol* **150**, 260-268.

Musovic, S., Oregaard, G., Kroer, N. & Sorensen, S. J. (2006). Cultivation-independent examination of horizontal transfer and host range of an IncP-1 plasmid among gram-positive and gram-negative bacteria indigenous to the barley rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **72**, 6687-6692.

Nguyen, M. T. & Gotz, F. (2016). Lipoproteins of Gram-Positive Bacteria: Key Players in the Immune Response and Virulence. *Microbiol Mol Biol Rev* **80**, 891-903.

Nobbs, A. H., Vajna, R. M., Johnson, J. R., Zhang, Y., Erlandsen, S. L., Oli, M. W., Kreth, J., Brady, L. J. & Herzberg, M. C. (2007). Consequences of a sortase A mutation in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* **153**, 4088-4097.

Norman, A., Hansen, L. H. & Sorensen, S. J. (2009). Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**, 2275-2289.

Norman, T. M., Lord, N. D., Paulsson, J. & Losick, R. (2015). Stochastic Switching of Cell Fate in Microbes. *Annu Rev Microbiol* **69**, 381-403.

Novick, R. P. & Ram, G. (2016). The Floating (Pathogenicity) Island: A Genomic Dessert. *Trends Genet* **32**, 114-126.

O'Brien, F. G., Yui Eto, K., Murphy, R. J., Fairhurst, H. M., Coombs, G. W., Grubb, W. B. & Ramsay, J. P. (2015). Origin-of-transfer sequences facilitate mobilisation of non-conjugative antimicrobial-resistance plasmids in *Staphylococcus aureus*. *Nucleic Acids Res* **43**, 7971-7983.

Ogawa, H. & Ogawa, T. (1990). Regulation in repressor inactivation by RecA protein. *Adv Biophys* **26**, 33-49.

Ogura, T. & Hiraga, S. (1983). Mini-F plasmid genes that couple host cell division to plasmid proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 4784-4788.

- Oku, Y., Kurokawa, K., Matsuo, M., Yamada, S., Lee, B. L. & Sekimizu, K. (2009).** Pleiotropic roles of polyglycerolphosphate synthase of lipoteichoic acid in growth of *Staphylococcus aureus* cells. *J Bacteriol* **191**, 141-151.
- Oliveira, P. H., Touchon, M. & Rocha, E. P. (2014).** The interplay of restriction-modification systems with mobile genetic elements and their prokaryotic hosts. *Nucleic Acids Res* **42**, 10618-10631.
- Oliveira, P. H., Touchon, M. & Rocha, E. P. (2016).** Regulation of genetic flux between bacteria by restriction-modification systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**, 5658-5663.
- Pachekrepapol, U., Lucey, J. A., Gong, Y., Naran, R. & Azadi, P. (2017).** Characterization of the chemical structures and physical properties of exopolysaccharides produced by various *Streptococcus thermophilus* strains. *J Dairy Sci* **100**, 3424-3435.
- Perego, M., Glaser, P., Minutello, A., Strauch, M. A., Leopold, K. & Fischer, W. (1995).** Incorporation of D-alanine into lipoteichoic acid and wall teichoic acid in *Bacillus subtilis*. Identification of genes and regulation. *J Biol Chem* **270**, 15598-15606.
- Perry, D. & Kuramitsu, H. K. (1981).** Genetic transformation of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* **32**, 1295-1297.
- Pinyon, J. L. & Hall, R. M. (2011).** Evolution of IncP-1alpha plasmids by acquisition of antibiotic and mercuric ion resistance transposons. *Microb Drug Resist* **17**, 339-343.
- Possoz, C., Gagnat, J., Sezonov, G., Guerineau, M. & Pernodet, J. L. (2003).** Conjugal immunity of Streptomyces strains carrying the integrative element pSAM2 is due to the pif gene (pSAM2 immunity factor). *Mol Microbiol* **47**, 1385-1393.
- Poulin-Laprade, D. & Burrus, V. (2015).** A lambda Cro-Like Repressor Is Essential for the Induction of Conjugative Transfer of SXT/R391 Elements in Response to DNA Damage. *J Bacteriol* **197**, 3822-3833.
- Poulin-Laprade, D., Carraro, N. & Burrus, V. (2015).** The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids. *Front Microbiol* **6**, 837.
- Pradervand, N., Delavat, F., Sulser, S., Miyazaki, R. & van der Meer, J. R. (2014).** The TetR-type MfsR protein of the integrative and conjugative element (ICE) ICE_{clc} controls both a putative efflux system and initiation of ICE transfer. *J Bacteriol* **196**, 3971-3979.
- Puymege, A., Bertin, S., Chuzeville, S., Guedon, G. & Payot, S. (2013).** Conjugative transfer and cis-mobilization of a genomic island by an Integrative and Conjugative Element of *Streptococcus agalactiae*. *J Bacteriol* **195**, 1142-1151.
- Radman-Livaja, M., Shaw, C., Azaro, M., Biswas, T., Ellenberger, T. & Landy, A. (2003).** Arm sequences contribute to the architecture and catalytic function of a lambda integrase-Holliday junction complex. *Mol Cell* **11**, 783-794.

- Radman-Livaja, M., Biswas, T., Mierke, D. & Landy, A. (2005).** Architecture of recombination intermediates visualized by in-gel FRET of lambda integrase-Holliday junction-arm DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 3913-3920.
- RajBhandary, U. L. & Soll, D. (2008).** Aminoacyl-tRNAs, the bacterial cell envelope, and antibiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5285-5286.
- Ramsay, J. P., Sullivan, J. T., Stuart, G. S., Lamont, I. L. & Ronson, C. W. (2006).** Excision and transfer of the *Mesorhizobium loti* R7A symbiosis island requires an integrase IntS, a novel recombination directionality factor RdfS, and a putative relaxase RlxS. *Mol Microbiol* **62**, 723-734.
- Ramsay, J. P. & Ronson, C. W. (2015).** Silencing quorum sensing and ICE mobility through antiactivation and ribosomal frameshifting. *Mob Genet Elements* **5**, 103-108.
- Ramsay, J. P., Kwong, S. M., Murphy, R. J. & other authors (2016).** An updated view of plasmid conjugation and mobilization in *Staphylococcus*. *Mob Genet Elements* **6**, e1208317.
- Ramsay, J. P. & Firth, N. (2017).** Diverse mobilization strategies facilitate transfer of non-conjugative mobile genetic elements. *Curr Opin Microbiol* **38**, 1-9.
- Rasko, D. A., Rosovitz, M. J., Myers, G. S. & other authors (2008).** The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. *J Bacteriol* **190**, 6881-6893.
- Rauch, P. J. & De Vos, W. M. (1992).** Characterization of the novel nisin-sucrose conjugative transposon Tn5276 and its insertion in *Lactococcus lactis*. *J Bacteriol* **174**, 1280-1287.
- Ravatn, R., Studer, S., Zehnder, A. J. & van der Meer, J. R. (1998).** Int-B13, an unusual site-specific recombinase of the bacteriophage P4 integrase family, is responsible for chromosomal insertion of the 105-kilobase *clc* element of *Pseudomonas* sp. Strain B13. *J Bacteriol* **180**, 5505-5514.
- Ravindran, S. (2012).** Barbara McClintock and the discovery of jumping genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 20198-20199.
- Rehm, B. H. (2010).** Bacterial polymers: biosynthesis, modifications and applications. *Nat Rev Microbiol* **8**, 578-592.
- Reichmann, N. T. & Grundling, A. (2011).** Location, synthesis and function of glycolipids and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid in Gram-positive bacteria of the phylum Firmicutes. *FEMS Microbiol Lett* **319**, 97-105.
- Reichmann, N. T., Picarra Cassona, C., Monteiro, J. M., Bottomley, A. L., Corrigan, R. M., Foster, S. J., Pinho, M. G. & Grundling, A. (2014).** Differential localization of LTA synthesis proteins and their interaction with the cell division machinery in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **92**, 273-286.

Reinhard, F., Miyazaki, R., Pradervand, N. & van der Meer, J. R. (2013). Cell differentiation to "mating bodies" induced by an integrating and conjugative element in free-living bacteria. *Curr Biol* **23**, 255-259.

Reinhard, F. & van der Meer, J. R. (2014). Life history analysis of integrative and conjugative element activation in growing microcolonies of *Pseudomonas*. *J Bacteriol* **196**, 1425-1434.

Roberfroid, S., Vanderleyden, J. & Steenackers, H. (2016). Gene expression variability in clonal populations: Causes and consequences. *Crit Rev Microbiol* **42**, 969-984.

Roberts, A. P., Chandler, M., Courvalin, P. & other authors (2008). Revised nomenclature for transposable genetic elements. *Plasmid* **60**, 167-173.

Roberts, A. P. & Mullany, P. (2009). A modular master on the move: the Tn916 family of mobile genetic elements. *Trends Microbiol* **17**, 251-258.

Ruhfel, R. E., Robillard, N. J. & Thorne, C. B. (1984). Interspecies transduction of plasmids among *Bacillus anthracis*, *B. cereus*, and *B. thuringiensis*. *J Bacteriol* **157**, 708-711.

Ruiz-Maso, J. A., Macho, N. C., Bordanaba-Ruiseco, L., Espinosa, M., Coll, M. & Del Solar, G. (2015). Plasmid Rolling-Circle Replication. *Microbiol Spectr* **3**, PLAS-0035-2014.

Ruzin, A., Lindsay, J. & Novick, R. P. (2001). Molecular genetics of SaPI1--a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* **41**, 365-377.

Salmond, G. P. & Fineran, P. C. (2015). A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol* **13**, 777-786.

Sanchez, B., Bressollier, P. & Urdaci, M. C. (2008). Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunol Med Microbiol* **54**, 1-17.

Sato'o, Y., Omoe, K., Ono, H. K., Nakane, A. & Hu, D. L. (2013). A novel comprehensive analysis method for *Staphylococcus aureus* pathogenicity islands. *Microbiol Immunol* **57**, 91-99.

Schade, J. & Weidenmaier, C. (2016). Cell wall glycopolymers of Firmicutes and their role as nonprotein adhesins. *FEBS Lett* **590**, 3758-3771.

Schneewind, O. & Missiakas, D. (2014). Sec-secretion and sortase-mediated anchoring of proteins in Gram-positive bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1843**, 1687-1697.

Schwechheimer, C. & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol* **13**, 605-619.

Selle, K., Klaenhammer, T. R. & Barrangou, R. (2015). CRISPR-based screening of genomic island excision events in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 8076-8081.

Sentchilo, V., Czechowska, K., Pradervand, N., Minoia, M., Miyazaki, R. & van der Meer, J. R. (2009). Intracellular excision and reintegration dynamics of the ICE_{clc} genomic island of *Pseudomonas knackmussii* sp. strain B13. *Mol Microbiol* **72**, 1293-1306.

Seth-Smith, H. M., Fookes, M. C., Okoro, C. K. & other authors (2012). Structure, diversity, and mobility of the Salmonella pathogenicity island 7 family of integrative and conjugative elements within Enterobacteriaceae. *J Bacteriol* **194**, 1494-1504.

Shewmaker, P. L., Gertz, R. E., Jr., Kim, C. Y., de Fijter, S., DiOrio, M., Moore, M. R. & Beall, B. W. (2010). *Streptococcus salivarius* meningitis case strain traced to oral flora of anesthesiologist. *J Clin Microbiol* **48**, 2589-2591.

Shoemaker, N. B., Barber, R. D. & Salyers, A. A. (1989). Cloning and characterization of a Bacteroides conjugal tetracycline-erythromycin resistance element by using a shuttle cosmid vector. *J Bacteriol* **171**, 1294-1302.

Siegel, S. D., Liu, J. & Ton-That, H. (2016). Biogenesis of the Gram-positive bacterial cell envelope. *Curr Opin Microbiol* **34**, 31-37.

Siegel, S. D., Reardon, M. E. & Ton-That, H. (2017). Anchoring of LPXTG-Like Proteins to the Gram-Positive Cell Wall Envelope. *Curr Top Microbiol Immunol* **404**, 159-175.

Siguier, P., Gourbeyre, E. & Chandler, M. (2014). Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev* **38**, 865-891.

Silhavy, T. J., Kahne, D. & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**, a000414.

Sitkiewicz, I., Green, N. M., Guo, N., Mereghetti, L. & Musser, J. M. (2011). Lateral gene transfer of streptococcal ICE element RD2 (region of difference 2) encoding secreted proteins. *BMC Microbiol* **11**, 65.

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

Stanton, T. B. (2007). Prophage-like gene transfer agents-novel mechanisms of gene exchange for Methanococcus, Desulfovibrio, Brachyspira, and Rhodobacter species. *Anaerobe* **13**, 43-49.

Sullivan, J. T., Trzebiatowski, J. R., Cruickshank, R. W. & other authors (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J Bacteriol* **184**, 3086-3095.

Sutcliffe, I. C. & Harrington, D. J. (2002). Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in Gram-positive bacterial genomes. *Microbiology* **148**, 2065-2077.

Terradot, L. & Waksman, G. (2011). Architecture of the Helicobacter pylori Cag-type IV secretion system. *FEBS J* **278**, 1213-1222.

Thomas, C. M. & Nielsen, K. M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol* **3**, 711-721.

Thomas, J., Lee, C. A. & Grossman, A. D. (2013). A conserved helicase processivity factor is needed for conjugation and replication of an integrative and conjugative element. *PLoS Genet* **9**, e1003198.

Tock, M. R. & Dryden, D. T. (2005). The biology of restriction and anti-restriction. *Curr Opin Microbiol* **8**, 466-472.

Turner, S. L., Bailey, M. J., Lilley, A. K. & Thomas, C. M. (2002). Ecological and molecular maintenance strategies of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol* **42**, 177-185.

Ubeda, C., Barry, P., Penades, J. R. & Novick, R. P. (2007). A pathogenicity island replicon in *Staphylococcus aureus* replicates as an unstable plasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 14182-14188.

Ubukata, K., Konno, M. & Fujii, R. (1975). Transduction of drug resistance to tetracycline, chloramphenicol, macrolides, lincomycin and clindamycin with phages induced from *Streptococcus pyogenes*. *J Antibiot (Tokyo)* **28**, 681-688.

Unterholzner, S. J., Poppenberger, B. & Rozhon, W. (2013). Toxin-antitoxin systems: Biology, identification, and application. *Mob Genet Elements* **3**, e26219.

van Elsas, J. D. & Bailey, M. J. (2002). The ecology of transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol* **42**, 187-197.

Vergara-Irigaray, M., Maira-Litran, T., Merino, N., Pier, G. B., Penades, J. R. & Lasa, I. (2008). Wall teichoic acids are dispensable for anchoring the PNAG exopolysaccharide to the *Staphylococcus aureus* cell surface. *Microbiology* **154**, 865-877.

Vollmer, W. & Seligman, S. J. (2010). Architecture of peptidoglycan: more data and more models. *Trends Microbiol* **18**, 59-66.

Wagner, A., Whitaker, R. J., Krause, D. J., Heilers, J. H., van Wolferen, M., van der Does, C. & Albers, S. V. (2017). Mechanisms of gene flow in archaea. *Nat Rev Microbiol* **15**, 492-501.

Wagner, P. L., Livny, J., Neely, M. N., Acheson, D. W., Friedman, D. I. & Waldor, M. K. (2002). Bacteriophage control of Shiga toxin 1 production and release by *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **44**, 957-970.

Waldor, M. K. & Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**, 1910-1914.

Wang, H., Smith, M. C. & Mullany, P. (2006). The conjugative transposon Tn5397 has a strong preference for integration into its *Clostridium difficile* target site. *J Bacteriol* **188**, 4871-4878.

Wang, Y. (2017). Spatial distribution of high copy number plasmids in bacteria. *Plasmid* **91**, 2-8.

Waters, C. M., Hirt, H., McCormick, J. K., Schlievert, P. M., Wells, C. L. & Dunny, G. M. (2004). An amino-terminal domain of *Enterococcus faecalis* aggregation substance is required for aggregation, bacterial internalization by epithelial cells and binding to lipoteichoic acid. *Mol Microbiol* **52**, 1159-1171.

Webb, A. J., Karatsa-Dodgson, M. & Grundling, A. (2009). Two-enzyme systems for glycolipid and polyglycerolphosphate lipoteichoic acid synthesis in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* **74**, 299-314.

Welman, A. D. & Maddox, I. S. (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol* **21**, 269-274.

Winstel, V., Liang, C., Sanchez-Carballo, P. & other authors (2013). Wall teichoic acid structure governs horizontal gene transfer between major bacterial pathogens. *Nat Commun* **4**, 2345.

Wood, M. M. & Gardner, J. F. (2015). The Integration and Excision of CTnDOT. *Microbiol Spectr* **3**, MDNA3-0020-2014.

Wormann, M. E., Corrigan, R. M., Simpson, P. J., Matthews, S. J. & Grundling, A. (2011). Enzymatic activities and functional interdependencies of *Bacillus subtilis* lipoteichoic acid synthesis enzymes. *Mol Microbiol* **79**, 566-583.

Wozniak, R. A., Fouts, D. E., Spagnoletti, M., Colombo, M. M., Ceccarelli, D., Garriss, G., Dery, C., Burrus, V. & Waldor, M. K. (2009). Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet* **5**, e1000786.

Wozniak, R. A. & Waldor, M. K. (2009). A toxin-antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS Genet* **5**, e1000439.

Wozniak, R. A. & Waldor, M. K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nat Rev Microbiol* **8**, 552-563.

Wright, L. D., Johnson, C. M. & Grossman, A. D. (2015). Identification of a Single Strand Origin of Replication in the Integrative and Conjugative Element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **11**, e1005556.

Wright, L. D. & Grossman, A. D. (2016). Autonomous Replication of the Conjugative Transposon Tn916. *J Bacteriol* **198**, 3355-3366.

Wyrsh, E. R., Roy Chowdhury, P., Chapman, T. A., Charles, I. G., Hammond, J. M. & Djordjevic, S. P. (2016). Genomic Microbial Epidemiology Is Needed to Comprehend the Global Problem of Antibiotic Resistance and to Improve Pathogen Diagnosis. *Front Microbiol* **7**, 843.

Xia, G., Corrigan, R. M., Winstel, V., Goerke, C., Grundling, A. & Peschel, A. (2011). Wall teichoic Acid-dependent adsorption of staphylococcal siphovirus and myovirus. *J Bacteriol* **193**, 4006-4009.

Yu, L. & Baldwin, J. N. (1971). Intraspecific transduction in *Staphylococcus epidermidis* and interspecific transduction between *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. *Can J Microbiol* **17**, 767-773.

V. Annexes

ICE	Système RM ou M orphelines	Méthylation		Restriction	
		Meilleur hit REBASE (% d'identité aa) ou domaine conservé (E-value)	Spécificité (Séquence de reconnaissance)	Meilleur hit REBASE (% d'identité aa) ou domaine conservé (E-value)	Séquence de reconnaissance
ICE <i>St3</i>	II	M1.Sth586568P (100%) M2.Sth586568P (100%)	^{m5} C (inconnue) ^{m5} C (inconnue)	Sth586568P	GCSGC
ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i>	II	M1.BceNORF1126P (60%) M2.BceNORF1126P (67%)	^{m5} C (CCCGT)	LfaORFBP (51%) LfaORFAP (22%)	GCNGC inconnue
ICE_ <i>SsaF4-2_fda</i> , ICE_ <i>SsaF1-8_rpmG</i> , ICE_ <i>Spn2842STDY5753514_rpmG</i> , ICE_ <i>SsaL64_fda</i> , ICE_ <i>SsaL60_rpsI</i> ICE_ <i>Ssa1270_rpsI</i>	M orpheline	M.Mge28LORF1600P (70%)	^{m5} C (GAATTC)		
ICE_ <i>SsaN20_rpsI</i>	II	pfam02384 N-6 DNA Methylase (E=9.74e-33) M.Sth368I (98%)	^{m6} A (inconnue) ^{m5} C (GATC)	Sth368I (95%)	GATC
ICE_ <i>SsaL50_rpsI</i>	II	M.Sth302ORFAP (85%)	^{m5} C (inconnue)	Sth302ORFAP (79%)	inconnue
ICE_ <i>SsaB35_rpsI</i>	II (M seulement)	M1.LlaJI (56%) M2.LlaJI (68%)	^{m5} C (GACGC) ^{m5} C (GACGC)		
	IV (R seulement)			PRK113315-methylcytosine-specific restriction enzyme McrB (E=4.46e-50)	inconnue
ICE_ <i>SsaB57_fda</i>	II	M.BsoBI (54%)	^{m4} C (CYCGRG)	BsoBI (48%)	CYCGRG
ICE_ <i>SsaN5_fda</i>	M orpheline	M.VpaVORF513P (63%)	^{m5} C (inconnue)		

Annexe 1 : Systèmes de restriction-modification (RM) et gènes de méthyltransférases orphelines (M) mis en évidence dans les ICE de la famille ICE*St3*. R, enzyme de restriction.

La spécificité de méthylation et de restriction a été analysée en utilisant REBASE et s'est avérée être différente pour six des systèmes RM. La majorité (5/6) des systèmes RM identifiés appartiennent à la famille de restriction de type II. Le dernier (ICE_*SsaB35_rpsI*) porte les gènes *mcrBC* codant un système de restriction de type IV. Ces gènes sont associés à deux gènes de méthyltransférases présentant une similarité avec les sous-unités de la méthylase du système de restriction de type II (LlaJI). Trois différentes méthylases orphelines sont codées par les ICE de la

famille ICE*St3* : (i) une cytosine-5 méthyltransférase de type II retrouvée dans 5 souches et reconnaissant potentiellement la séquence GAATTC ; (ii) une N6-adénosine méthylase de spécificité inconnue retrouvée dans la souche *S. salivarius* 1270 et (iii) une cytosine-5 méthyltransférase de spécificité inconnue retrouvée dans la souche *S. salivarius* N5. Il est intéressant de noter que les gènes codant les systèmes RM ou les méthylases orphelines sont insérés dans les régions immédiatement adjacentes au module de régulation des ICE, en aval d'un gène codant une petite protéine hypothétique (99-100 aa) de fonction inconnue, telle qu'observée pour ICE*St3* (*orf385H*).

	Donatrices	Réceptrices	Tc
Transfert intraspécifique <i>S. salivarius</i>	T93 (ICE_ <i>SsaT93_fda</i>)	F1-99	-
		JIM8777	-
		L33	-
	L64 (ICE_ <i>SsaL64_fda</i>)	F1-99	-
		JIM8777	-
		L33	-
	F6-1 (ICE_ <i>SsaF6-1_rpsI</i>)	L44	-
		JIM8777	+
		F1-99	-
	F1-4 (ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i>)	F1-8	+
		JIM8777	+
		L20	-
		L28	-
		L29	-
		L32	-
		L33	-
		L40	-
		L44	-
		N2	-
		N11	-
		N14	-
		N23	-
	F4-2 (ICE_ <i>SsaF4-2_fda</i>)	JIM8777	+
		F1-8	+
Transfert interspécifique <i>S. salivarius</i> → <i>S. thermophilus</i> ou <i>E. faecalis</i>	T93 (ICE_ <i>SsaT93_fda</i>)	LMG 18311	-
	L64 (ICE_ <i>SsaL64_fda</i>)	LMG 18311	-
	F6-1 (ICE_ <i>SsaF6-1_rpsI</i>)	LMG 18311	-
	F1-4 (ICE_ <i>SsaF1-4_fda</i>)	LMG 18311	+
		JH2-2	+
	F4-2 (ICE_ <i>SsaF4-2_fda</i>)	LMG 18311	+
		JH2-2	+
Transfert interspécifique <i>S. thermophilus</i> → <i>S. salivarius</i>	CNRZ385 (ICE <i>St3</i>)	F1-99	-
		F1-8	-
		JIM8777	-
		L33	-

Annexe 2 : résumé des tests de conjugaison sur filtre réalisés avec les couples mis en jeu.

Le signe (-) indique l'absence de détection de transconjugants (Tc). Le signe (+) indique la détection de transconjugants.

RESUME - Les éléments intégratifs conjugatifs (ICE) sont des éléments génétiques mobiles se transférant par transfert horizontal d'une bactérie à une autre, parfois indépendamment de l'espèce ou de tout autre classification, bénéficiant ainsi d'un large spectre d'hôte. Les ICE sont porteurs de gènes adaptatifs pouvant significativement améliorer le fitness de la bactérie hôte et permettre son adaptation à de nouvelles niches écologiques. Ceux-ci peuvent également conférer à l'hôte des propriétés de virulence, ou lui permettre de résister à différents antibiotiques. L'ensemble de ces gènes adaptatifs constituent alors un réservoir de gènes pouvant être échangés horizontalement par des bactéries partageant le même écosystème. Entre autres, l'émergence de souches multirésistantes aux antibiotiques même les plus récents, décrit l'urgente nécessité de comprendre les mécanismes fondamentaux gouvernant le transfert conjugatif de ces éléments.

L'objectif de ces travaux était de caractériser les ICE appartenant à la famille ICE*St3*, dont le premier représentant a été auparavant décrit chez la bactérie d'importance alimentaire *Streptococcus thermophilus*. Des ICE apparentés à ICE*St3*, ont été retrouvés chez la bactérie commensale et pathogène opportuniste *Streptococcus salivarius*. Les analyses *in silico* réalisées ont démontré la diversité des ICE de cette famille, notamment au niveau de leurs modules de recombinaison, de régulation mais aussi de leurs gènes adaptatifs potentiellement mis à disposition de la communauté microbienne orale et digestive de l'Homme. La fonctionnalité de deux de ces ICE a également été mise en évidence expérimentalement à travers l'évaluation de la capacité de ces éléments à se transférer intra- et inter-spécifiquement. Ainsi, la mise en évidence d'un transfert entre la bactérie commensale *S. salivarius* et la bactérie alimentaire *S. thermophilus* reflète les épisodes de transfert horizontaux de gènes pouvant se produire au sein de l'hôte humain à partir de bactéries provenant du bol alimentaire. Les résultats obtenus ont par ailleurs présenté une première indication quant à l'impact des facteurs d'hôte sur le transfert de ces éléments. Une étude plus poussée visant à identifier les facteurs d'hôte influençant la mobilité d'ICE*St3* a ensuite été réalisée chez *S. thermophilus*. Celle-ci a révélé l'importance, pour le transfert et l'acquisition de cet ICE, des molécules de surface retrouvées chez les bactéries à Gram positif notamment les lipoprotéines, les acides téichoïques et les exopolysaccharides. Il a ainsi été démontré que la mutation des cellules réceptrices au niveau de certaines molécules de surface de *S. thermophilus* pouvait significativement augmenter (jusqu'à 400 fois) la fréquence d'acquisition de cet élément. De plus, cette étude a révélé un impact différent de mêmes molécules de surface selon si celles-ci sont altérées au niveau de la cellule donatrice ou au niveau de la cellule réceptrice de l'ICE, démontrant ainsi un comportement distinct de la cellule en lien avec la présence et/ou l'activité de l'ICE.

En conclusion, ces travaux de thèse ont permis d'élargir les connaissances sur les éléments génétiques mobiles de la famille ICE*St3*. Il a ainsi été démontré que ces éléments participent à l'évolution du génome chez différentes espèces de streptocoques et aux échanges génétiques entre bactéries issues de l'alimentation et bactéries de la flore digestive humaine. Enfin, ces travaux ont contribué à une meilleure compréhension des mécanismes et des facteurs d'hôte influençant la mobilité de ces éléments génétiques mobiles.

Mots clés : ICE, MGE, transfert conjugatif, mobilité, *Streptococcus thermophilus* et *Streptococcus salivarius*.

SUMMARY - Integrative Conjugative Elements (ICEs) are mobile genetic elements that can be horizontally transferred from a bacterium to another, eventually regardless of the species or any other classification, allowing them to benefit from a broad host spectrum. ICEs can carry adaptive genes that can significantly improve the bacterial fitness and allow its adaptation to new ecological niches. These genes can also provide virulence properties to the recipient cell or allow its resistance to different antimicrobial agents. Hence, adaptive genes constitute a rich reservoir of genes that can be transferred horizontally within the bacterial community. Among others, the emergence of multidrug-resistant bacteria depicts the absolute need of a better comprehension of the fundamental mechanisms that govern the conjugative transfer of these elements.

The purpose of this work was to characterize ICEs belonging to the ICE*St3* family, whose first described element was found in *Streptococcus thermophilus*, a bacterium of first interest in the food industry. ICE*St3* related ICEs were found in the commensal and opportunistic pathogen *Streptococcus salivarius*. *In silico* analysis carried out in this work highlighted the diversity of the ICE*St3* family within this species, especially concerning their recombination and regulation modules, but also their adaptive genes likely available for the oral and digestive microbial community of the human host. The functionality of two ICEs found in *S. salivarius* was experimentally confirmed through their ability to transfer in intra- and interspecific manners. Hence, the evidence of transfer between the commensal species *S. salivarius* and the food bacterium *S. thermophilus* reflects the eventual lateral gene transfer taking place in the human host by bacteria brought by food. Moreover, the obtained results stand as a first indication in favor of the impact of host factors on the transfer of these elements. To go further, a study that aims to identify the host factors influencing the mobility of ICE*St3* of *S. thermophilus* was carried out. This work revealed the importance, for the transfer and the acquisition of this ICE, of cell surface molecules that compose the Gram positive cell envelope, especially lipoproteins, teichoic acids and exopolysaccharides. Thus, the results highlighted that the mutation of some cell surface components in the recipient cell can significantly increase (up to 400 fold) the acquisition frequency of ICE*St3*. Moreover, this study revealed a different impact of the same cell surface molecule depending on whether this latter is affected in the donor or the recipient cell, thus indicating a distinct behavior of the cell linked to the presence and/or activity of the ICE.

In conclusion, this thesis allowed expanding the knowledge regarding the mobile genetic elements of the ICE*St3* family. This work demonstrated that these elements contribute to genome evolution of different streptococci species and gene exchanges between bacteria originated from food and the human gut flora. Finally, this work contributed to a better comprehension of the mechanisms and host factors influencing the mobility of these mobile genetic elements.

Key words: ICE, MGE, conjugative transfer, mobility, *Streptococcus thermophilus* and *Streptococcus salivarius*.