

ÉCOLE DOCTORALE Santé, Sciences, Technologies

Laboratoire Plasticité Génomique, Biodiversité, Antibiorésistance

Unité d'Infectiologie Animale et de Santé Publique, INRA (Tours-Nouzilly)

THÈSE présentée par :

Grégory DOUARD

soutenue le : **01 juin 2011**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université François - Rabelais**

Discipline ou Spécialité : **Sciences de la Vie et de la Santé**

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS LE TRANSFERT HORIZONTAL DE L'ÎLOT GÉNOMIQUE DE MULTI-RÉSISTANCE AUX ANTIBIOTIQUES SALMONELLA GENOMIC ISLAND 1

THÈSE dirigée par :

Dr. CLOECKAERT Axel

Directeur de Recherche, INRA (Tours-Nouzilly, France)

co-encadrée par :

Dr. DOUBLET Benoît

Chargé de Recherche, INRA (Tours-Nouzilly, France)

RAPPORTEURS :

Pr. ARLET Guillaume

Professeur, Université Pierre et Marie Curie (Paris, France)

Pr. GUÉDON Gérard

Professeur, Université Henri Poincaré (Nancy, France)

JURY :

Pr. ARLET Guillaume

Professeur, Université Pierre et Marie Curie (Paris, France)

Pr. BUTAYE Patrick

Professeur, Université de Gent (Gent, Belgique)

Dr. CLOECKAERT Axel

Directeur de Recherche, INRA (Tours-Nouzilly, France)

Dr. DOUBLET Benoît

Chargé de Recherche, INRA (Tours-Nouzilly, France)

Pr. GOUDEAU Alain

Professeur, Université François Rabelais (Tours, France)

Pr. GUÉDON Gérard

Professeur, Université Henri Poincaré (Nancy, France)

Remerciements

Ce travail de thèse a été réalisé, avec le soutien financier du ministère de l'enseignement supérieur et de la Recherche, au sein de l'équipe Plasticité Génomique, Biodiversité, Antibiorésistance du centre INRA de Tours-Nouzilly, sous la direction d'Axel Cloeckaert et de Benoît Doublet.

*Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde reconnaissance à **Axel Cloeckaert** pour m'avoir accueilli dans son équipe, pour avoir pris le temps qu'il fallait pour m'aider quand c'était nécessaire, aussi bien lorsque Benoît était en post-doc au début de cette thèse que pour la rédaction de ce travail (le choix de présentation des résultats n'était pas une mince affaire...).*

*Je tiens aussi à exprimer une toute aussi grande reconnaissance à **Benoît Doublet** pour m'avoir accepté déjà pour le stage de Master 2 et ensuite, pour avoir bien su doser autonomie et conseils avisés tout au long de cette thèse. L'autonomie que tu m'a accordée m'a permis (entre autres) de faire des erreurs qui sont toujours sources d'enseignement, et tes conseils ont permis de me guider et de me remotiver quand c'était nécessaire, autrement dit, j'ai appris beaucoup de choses à ton contact ! Merci aussi pour ton aide, ta disponibilité et ta rapidité de correction pendant la rédaction (heureusement que tu as été plus rapide à corriger que moi à rédiger !).*

*Mes remerciements s'adressent ensuite aux professeurs **Gérard Guédon** et **Guillaume Arlet** pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail. Je tiens à remercier également le professeur **Alain Goudeau** pour avoir accepté de présider mon jury et le professeur **Patrick Butaye** pour être venu de Belgique afin de juger ce travail.*

*Je remercie aussi le reste de l'équipe PGBA : **Karine Praud** pour ton aide, ton amitié et ta bonne humeur quotidienne (enfin...quand tu n'étais pas dans un de tes nombreux congés maternité !!), **Isabelle Monchaux**, pour ta gentillesse et pour toutes les boîtes de Pétri que tu m'a préparées..., **Sylvie Baucheron**, **Nelly Bernardet**, **Etienne Giraud** et **Michel Zygmunt**, pour vos conseils ou votre aide, mais aussi pour votre sympathie durant ces quatre années.*

*A mes camarades de thèse, **Nicolas Combelas**, **Damien Coupeau** et **Aymeric Fauvin**, merci pour votre amitié, votre soutien, pour avoir partagé les mêmes difficultés et les mêmes joies depuis le DEUG, mais surtout pour les soirées indispensables pour décompresser !!*

*Merci en particulier à Aymeric qui est resté à l'INRA jusqu'au bout !! Je remercie aussi pour leur amitié, les « un peu plus anciennes » thésardes, **Alexia Normand** et **Géraldine Rouquet** qui nous ont montré la voie à suivre, et les « un peu plus jeunes », **Gaëlle Porcheron**, **Sosthène Barbachou**, **Mohamed Issouf** et **Nicolas Richerieux**, je vous souhaite bon courage pour la suite.*

*Je remercie aussi toute les personnes de l'unité Infectiologie Animale et Santé Publique pour leur accueil et l'aide que j'ai pu avoir besoin pendant cette thèse, l'équipe laverie pour tous les milieux de culture, et en particulier **Maryline Ferter** et **Fabrice Guegnard** pour leur amitié. Fabrice, en plus de ton amitié, merci de m'avoir fait partager tes « connaissances en œnologie », et de m'avoir accepté dans ton équipe de foot malgré mes performances...ça m'a été très utile tout de même pour me défouler. Merci aussi de m'avoir délégué quelques « responsabilités »...*

*Enfin, je souhaite remercier **mes parents**, **mon frère**, **ma soeur** et **mes amis de Pithiviers**, pour m'avoir permis d'oublier un peu cette thèse de temps en temps ! Je remercie surtout infiniment mes parents, sans leur soutien (et leurs réprimandes quand j'étais plus jeune !!), je ne suis pas sur que j'aurais fait un doctorat...*

Résumé

L'îlot génomique SGI1 est un élément intégratif mobilisable identifié initialement chez le clone épidémique penta-résistant de *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. La présence de SGI1 chez différents sérotypes de *Salmonella* et chez *Proteus mirabilis* a conduit à démontrer son transfert conjugatif. SGI1 s'excise du chromosome pour former un intermédiaire circulaire capable d'être mobilisé en *trans* par un élément conjugatif corésident. Dans la bactérie réceptrice, SGI1 s'intègre de manière site-spécifique grâce à l'intégrase codée par l'îlot. L'objectif de ce travail était d'étudier les mécanismes impliqués dans la mobilisation de l'îlot génomique. Des expériences de mobilisation de SGI1 avec des plasmides de différents groupes d'incompatibilités ont montré que seuls les plasmides de résistance du groupe IncA/C étaient capables de mobiliser l'îlot génomique. L'origine de transfert (*oriT*) de SGI1 a été identifiée sur un fragment de 135 pb capable de rendre mobilisable un plasmide non mobile. La diminution du transfert de SGI1 dépourvu de ce fragment a permis de confirmer la localisation de l'*oriT*. L'implication de l'ORF S020 dans le transfert de l'îlot a aussi été démontrée. Une autre région comprise entre les ORF S013 et S019 contient un élément indispensable au transfert de l'îlot. L'identification des différents composants moléculaires impliqués dans la mobilisation de SGI1 est une étape importante pour comprendre la dissémination de l'îlot génomique.

Mots-clés : *Salmonella*, SGI1, mobilisation, relaxosome, protéines, origine de transfert

Abstract

The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element (IME) originally identified in epidemic multidrug-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. The occurrence of SGI1 in several *S. enterica* serovars and recently in *Proteus mirabilis* has led to demonstrate its horizontal transfer. SGI1 excises from the donor chromosome to form a circular extrachromosomal intermediate that can be mobilized *in trans* to the recipient. SGI1 integrates site-specifically into the chromosome at the 3' end of the *trmE* gene. Here, we have studied the mechanism of conjugative transfer of SGI1. First, we have shown by SGI1 mobilization assays with different plasmid incompatibility groups that only multidrug-resistance IncA/C plasmids were able to mobilize SGI1. The transfer origin of SGI1 has been located on a 135 bp DNA region by mobilization assays of a non mobile plasmid containing this region. The decrease in transfer frequency of a SGI1 lacking this putative *oriT* region confirmed this location. The involvement in the SGI1 transfer of the S020 ORF coding for a putative integrase was also demonstrated. One other region located between S013-S019 ORFs contained an element required for SGI1 mobilization. The identification of the different molecular components involved in SGI1 mobilization is an important step for understanding the dissemination of the genomic island.

Keywords: *Salmonella*, SGI1, mobilization, relaxosome, proteins, transfer origin

Table des matières

Liste des tableaux	1
Liste des figures	2
Liste des annexes.....	5
INTRODUCTION	6
ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	10
A. La résistance aux antibiotiques	11
A.1. Le résistome : origines, diffusion et moyens de lutte.....	11
a) D'où viennent les résistances aux antibiotiques ?.....	11
b) Facteurs favorisant l'émergence et la diffusion des gènes de résistance	13
c) Conséquences et perspectives de lutte	15
A.2. Résistances aux antibiotiques chez <i>Salmonella</i>	18
a) Épidémiologie du genre <i>Salmonella</i>	18
b) Résistance aux antibiotiques des <i>Salmonella</i> isolées chez l'Homme	19
c) Résistance aux antibiotiques des <i>Salmonella</i> isolées d'élevages	22
A.3. Mécanismes acquis de résistance aux antibiotiques.....	24
a) Diminution de la concentration en antibiotique	24
b) Modification et protection de la cible	26
c) Inactivation enzymatique de l'antibiotique	28
B. Les éléments génétiques mobiles : outils de dissémination de la résistance aux antibiotiques	30
B.1. Les éléments génétiques responsables de la mobilité intra-cellulaire	30
a) Le système intégron-cassettes de gènes	30
b) Les éléments transposables	32
c) Le cas particulier des intégrons complexes et des ISCR.....	33
B.2. Les éléments génétiques responsables de la mobilité inter-cellulaire	34
a) Les plasmides	34
b) Les éléments intégrés et transférables.....	36
c) L'effet « poupée russe » des éléments mobiles.....	38
B.3. L'îlot génomique SGI1 : un élément intégratif mobilisable.....	40
a) Identification de l'intégron In104 de SGI1	40
b) La plasticité génétique de l'intégron In104	41

c) Organisation génétique de SGI1 et mobilité	43
C. Les mécanismes du transfert conjugatif chez les bactéries Gram négatif	46
C.1 Importance de la conjugaison dans les transferts horizontaux	47
a) Les différents modes de transferts horizontaux	47
b) Principe général de la conjugaison bactérienne	48
c) Mécanismes de régulation du transfert conjugatif	51
C.2 Les acteurs de la conjugaison bactérienne.....	54
a) Les relaxases	54
b) Les origines de transfert.....	57
c) Les protéines auxiliaires du relaxosome	59
d) Les protéines de couplage	61
e) Le transférosome	63
C.3 Mécanismes de conjugaison des éléments reliés à SGI1.....	67
a) Les ICE : des îlots génomiques conjugatifs	67
b) Les éléments mobilisables	68
ÉTUDE EXPÉRIMENTALE	71
A. Problématique et objectifs du travail	72
B. Matériel et méthodes	74
B.1. Méthodes générales de bactériologie et de biologie moléculaire	74
a) Souches bactériennes et conditions de culture	74
b) Détermination de la sensibilité aux antibiotiques par antibiogramme	75
c) Préparations d'ADN et analyses bioinformatiques	75
d) Amplification d'ADN par PCR	77
B.2 Mobilisation de SGI1.....	77
a) Plasmides utilisés	77
b) Conjugaison en milieu liquide	78
c) Principe des tests de mobilisation	79
B.3 Mobilisation du plasmide pACYC184	80
a) Construction des souches pour la recherche de l'origine de transfert de SGI1	80
b) Construction des souches d' <i>E. coli</i> DH1	81
c) Principe des tests de mobilisation	82
B.4 Délétions des régions nucléotidiques d'intérêts	82
a) Principe de la méthode	82

b) Modification des plasmides utilisés dans la méthode Datsenko & Wanner	83
c) Remplacement des régions d'intérêts par la cassette <i>kan</i>	84
d) Élimination de la cassette de résistance à la kanamycine	85
C. Résultats	87
C.1 Détermination du spectre de plasmides capables de mobiliser SGI1	87
a) Tests de mobilisation de SGI1 par des plasmides de différents groupes d'incompatibilité	87
b) Analyses génétiques des plasmides IncA/C.....	91
C.2. Identification de l'origine de transfert requise pour la mobilisation de SGI1	93
a) Localisation préliminaire de l'origine de transfert.....	93
b) Identification de la séquence minimale contenant l'origine de transfert de SGI1 ...	95
c) Mise en évidence de l'origine de transfert de SGI1 par délétion.....	97
C.3 Identification des régions de SGI1 impliquées dans son transfert.....	99
a) Mise en évidence de l'implication d'ORF de SGI1 dans son transfert.....	99
b) Délétions ciblées d'ORF de SGI1.....	101
c) Grandes délétions de régions de SGI1.....	102
DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVE.....	105
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	117
ANNEXE	137

Liste des tableaux

Tableau I : Relations temporelles entre la découverte, l'utilisation en médecine et l'apparition de bactéries résistantes pour quelques antibiotiques	13a
Tableau II : Prévalence des dix sérotypes de <i>Salmonella</i> les plus souvent isolés chez l'Homme en France entre 2006 et 2008 ou en Europe entre 2007 et 2008	18a
Tableau III : Résistances aux antibiotiques chez <i>Salmonella</i> dans le monde en 2006	19a
Tableau IV : Principaux profils de multi-résistance identifiés chez <i>S. Typhimurium</i> en France en 2000 et 2007	20a
Tableau V : Principaux sérotypes de <i>Salmonella</i> isolés dans les filières aviaires, bovines et porcines en France entre 2003 et 2006	22a
Tableau VI : Principales familles d'antibiotiques, cibles, et modes de résistance associés.....	26a
Tableau VII : Groupes d'incompatibilités présents chez les entérobactéries	35a
Tableau VIII : Fonctions et noms des protéines impliquées dans les différents systèmes de conjugaison décrits	55a
Tableau IX : Souches utilisées dans cette étude	74a
Tableau X : Plasmides utilisés pour mobiliser SGI1	75a
Tableau XI : Amorces permettant l'amplification de séquences plasmidiques	76a
Tableau XII : Amorces permettant l'amplification de séquences de SGI1	77a
Tableau XIII : Amorces utilisées pour le clonage dans le plasmide pACYC184	78a
Tableau XIV : Plasmides construits à partir de pACYC184	81a
Tableau XV : Plasmides utilisés pour la délétion des régions nucléotidiques d'intérêts	83a
Tableau XVI : Amorces utilisées dans le cadre des délétions	85a
Tableau XVII : Mobilisation de SGI1 par des plasmides de différents groupes d'incompatibilité	87a

Liste des figures

Figure 1 : Évolution de la résistance à la pénicilline chez <i>Staphylococcus aureus</i>	7a
Figure 2 : Chronologie des évènements impliqués dans la résistance aux antibiotiques	7a
Figure 3 : Sélection de bactéries résistantes sous la pression d'un traitement antibiotique	8a
Figure 4 : Ventes annuelles d'antibiotiques destinées au traitement des animaux d'élevages en France en 2006	13a
Figure 5 : Dissémination plausible ou avérée des antibiotiques et de leurs résistances à travers les écosystèmes	14a
Figure 6 : Évolution du nombre de salmonelloses en Europe	18a
Figure 7 : Proportion du phénotype de résistance ACSSuT parmi les souches de <i>S. Typhimurium</i> DT104 isolées en Angleterre et au Pays de Galles entre 1984 et 1996	20a
Figure 8 : Dissémination des <i>Salmonella</i> résistantes aux céphalosporines à large spectre à travers le monde	21a
Figure 9 : Résistances aux antibiotiques des souches de <i>Salmonella</i> isolées dans les principales filières de production animale en France en 2006.....	23a
Figure 10 : Évolution du nombre de résistance aux antibiotiques des souches de <i>Salmonella</i> isolées dans les principales filières de production animale en France	23a
Figure 11 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par les bactéries	24a
Figure 12 : Structure schématique des principales familles de pompes d'efflux	25a
Figure 13 : Évolution du nombre cumulé de β -lactamases uniques identifiées	28a
Figure 14 : Mécanisme d'intégration de cassette au niveau d'un site <i>attI</i>	30a
Figure 15 : Acquisition de cassettes de gène par les intégrons de résistance	31a
Figure 16 : Comparaison structurale d'un intégron de résistance et d'un super-intégron.....	31a
Figure 17 : Exemples d'organisations génétiques d'une séquence d'insertion et de quelques transposons non conjuguatifs	32a

Figure 18 : Diversité des gènes de résistance aux antibiotiques associés aux ISCR.....	33a
Figure 19 : Mécanisme de transposition réplcatif supposé des séquences ISCR.....	34a
Figure 20 : Modules communs aux ICE, exemple de Tn916 et des ICE de la famille SXT-R391	36a
Figure 21 : Mécanisme de transfert des ICE et des éléments reliés	37a
Figure 22 : L'effet poupée russe des éléments génétiques mobiles	38a
Figure 23 : Organisation génétique de l'intégron In104 de SGI1	40a
Figure 24 : Principaux évènements à l'origine de l'apparition des variants de SGI1	41a
Figure 25 : Distribution des sérotypes de <i>Salmonella</i> , en dehors de Typhimurium, contenant SGI1 ou variants identifiés à travers le monde	42a
Figure 26 : Organisation génétique de l'îlot génomique SGI1.....	43a
Figure 27 : Intégration/excision et mobilisation de SGI1	44a
Figure 28 : Les différents modes de transfert horizontal d'ADN chez les bactéries.....	47a
Figure 29 : Mécanisme impliqué dans le transfert du plasmide F.....	49a
Figure 30 : Mécanismes impliqués dans la régulation du transfert des plasmides du groupe IncF	52a
Figure 31 : Mécanismes impliqués dans la régulation du transfert des plasmides du groupe IncP	53a
Figure 32 : Motifs conservés des séquences N-terminales des différentes familles de relaxases	54a
Figure 33 : Exemples d'organisation d'origines de transfert	58a
Figure 34 : Représentation des différents rôles des T4SS.....	63a
Figure 35 : Système de transféosome VirB/D4 du plasmide Ti.....	64a
Figure 36 : Protocole des tests de mobilisation de l'îlot génomique.....	79a
Figure 37 : Carte du plasmide pACYC184	80a
Figure 38 : Tests de mobilisation du plasmide pACYC184 réalisés à partir d' <i>E. coli</i>	82a
Figure 39 : Principe de délétion d'ADN selon la technique de Datsenko & Wanner	83a

Figure 40 : Représentation schématique des plasmides pKD46 et pCP20, ainsi que des modifications réalisées	84a
Figure 41 : Profils de restriction des plasmides IncA/C utilisés pour mobiliser SGI1.....	91a
Figure 42 : Organisation génétique des plasmides pRA1 et pAM04528	92a
Figure 43 : Localisation des fragments de SGI1 clonés dans le plasmide pACYC184	94a
Figure 44 : Délimitation de la région de SGI1 susceptible de contenir son origine de transfert.....	94a
Figure 45 : Détermination de la séquence nucléotidique minimale susceptible de contenir l'origine de transfert de SGI1	96a
Figure 46 : Effet de la délétion de la séquence <i>oriT</i> potentielle de SGI1 sur le transfert de l'îlot génomique	97a
Figure 47 : Représentation schématique de l'origine de transfert de SGI1.....	98a
Figure 48 : Mise en évidence du rôle de SGI1 dans son propre transfert	100a
Figure 49 : Effets des délétions d'ORF potentiellement impliquées dans le transfert de SGI1	102a
Figure 50 : Localisation des larges délétions effectuées sur SGI1	103a
Figure 51 : Effet des larges délétions sur le transfert de SGI1	103a

Liste des annexes

Annexe 1 : Sérotypes de <i>Salmonella</i> et variants de l'îlot génomique SGI1	138
Annexe 2 : Variants de l'intégron In104 de l'îlot génomique SGI1	142
Annexe 3 : Article I	151
Annexe 4 : Article II	155
Annexe 5 : Communication orale 1	164
Annexe 6 : Communication orale 2	169
Annexe 7 : Communication écrite	172

INTRODUCTION

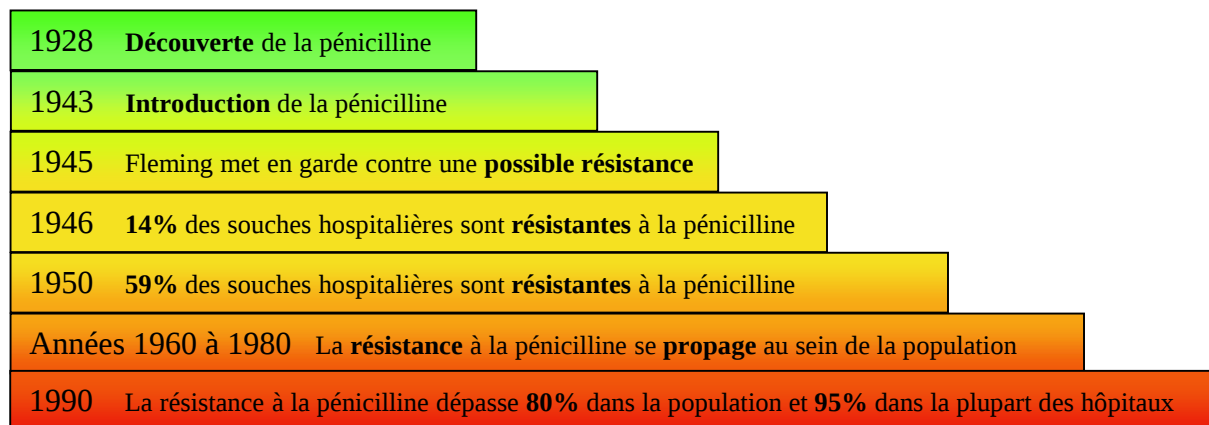


Figure 1 : Évolution de la résistance à la pénicilline chez *Staphylococcus aureus* (OMS, 2007).

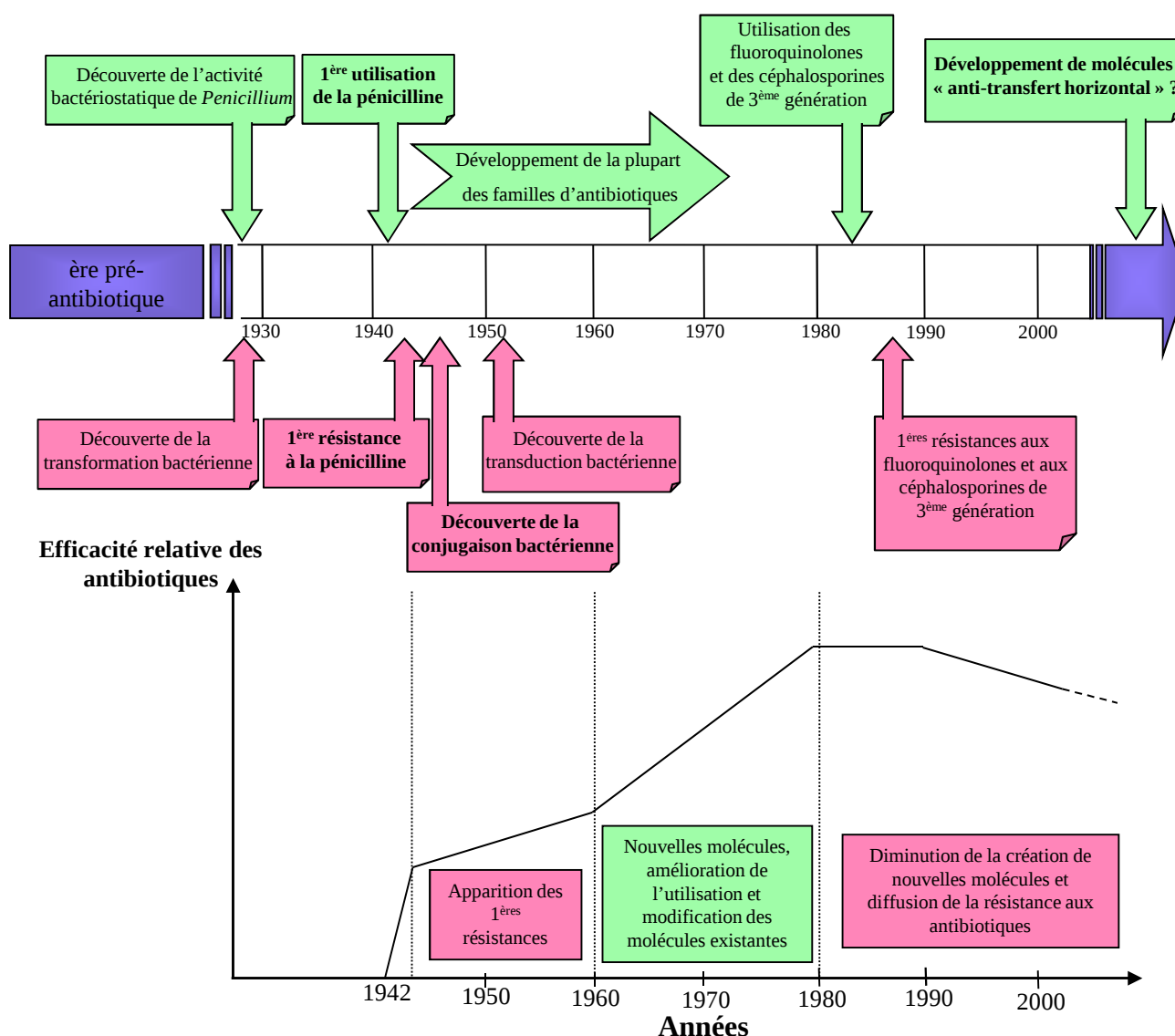


Figure 2: Chronologie des événements impliqués dans la résistance aux antibiotiques.

« ... un mauvais usage de la substance aboutirait à ce que, au lieu d'éliminer l'infection, on apprenne aux microbes à résister à la pénicilline et à ce que ces microbes soient transmis d'un individu à l'autre jusqu'à ce qu'ils en atteignent un chez qui ils provoqueraient une pneumonie ou une septicémie que la pénicilline ne pourrait guérir... » (Fleming, 1945)

Dès 1945, Alexander Fleming, qui découvrit la pénicilline quelques années auparavant, émit l'hypothèse que des résistances aux antibiotiques risquaient d'apparaître et que l'efficacité des antibiotiques à long terme dépendrait de l'usage qui en serait fait. En effet, seulement quelques années après les premières utilisations de la pénicilline, des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à cette molécule furent isolées (Plough, 1945). Cinquante années plus tard, 80% de la population de *S. aureus* étaient résistantes à la pénicilline (Figure 1). Aujourd'hui, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) constate une évolution continue et croissante de la résistance aux antibiotiques partout dans le monde, et pour la plupart des antibiotiques. L'utilisation de ces molécules a pourtant révolutionné le traitement des maladies infectieuses en médecine humaine. Au cours du XX^{ème} siècle, les traitements par les antibiotiques associés à une amélioration de l'hygiène et au développement de la vaccination ont permis d'augmenter considérablement l'espérance de vie dans les pays développés. Entre le début du XX^{ème} siècle et les années 1970, une douzaine de familles d'antibiotiques regroupant une centaine de molécules ont été développées et sont toujours utilisées aujourd'hui pour le traitement des maladies infectieuses (Figure 2). Cet arsenal thérapeutique est constitué de molécules produites naturellement comme la pénicilline synthétisée par le champignon *Penicillium notatum* ou la streptomycine produite par la bactérie *Streptomyces griseus*, d'autres sont issues de synthèse chimique partielle ou totale comme le chloramphénicol. Cependant, le développement de nouvelles molécules s'est largement réduit. Aucune nouvelle classe d'antibiotique n'a été développée depuis les années 1970 alors que la résistance aux antibiotiques n'a pas cessé de progresser pendant la même période. Sachant que l'OMS estime que le temps nécessaire pour mettre au point de nouvelles molécules anti-infectieuses prendrait entre 10 et 20 ans, la résistance aux antibiotiques des bactéries responsables de maladies infectieuses est donc un problème majeur de santé publique qui pourrait devenir critique si elle continue à s'accroître.

Les facteurs potentiels à l'origine de la propagation de ces phénomènes de résistances peuvent être nombreux et seront abordés dans la partie bibliographique. Cependant, il ne fait aucun doute que l'apparition de ces résistances soit reliée à la théorie de l'Évolution de Charles Darwin. En effet, selon son ouvrage *De l'origine des espèces*, l'Évolution

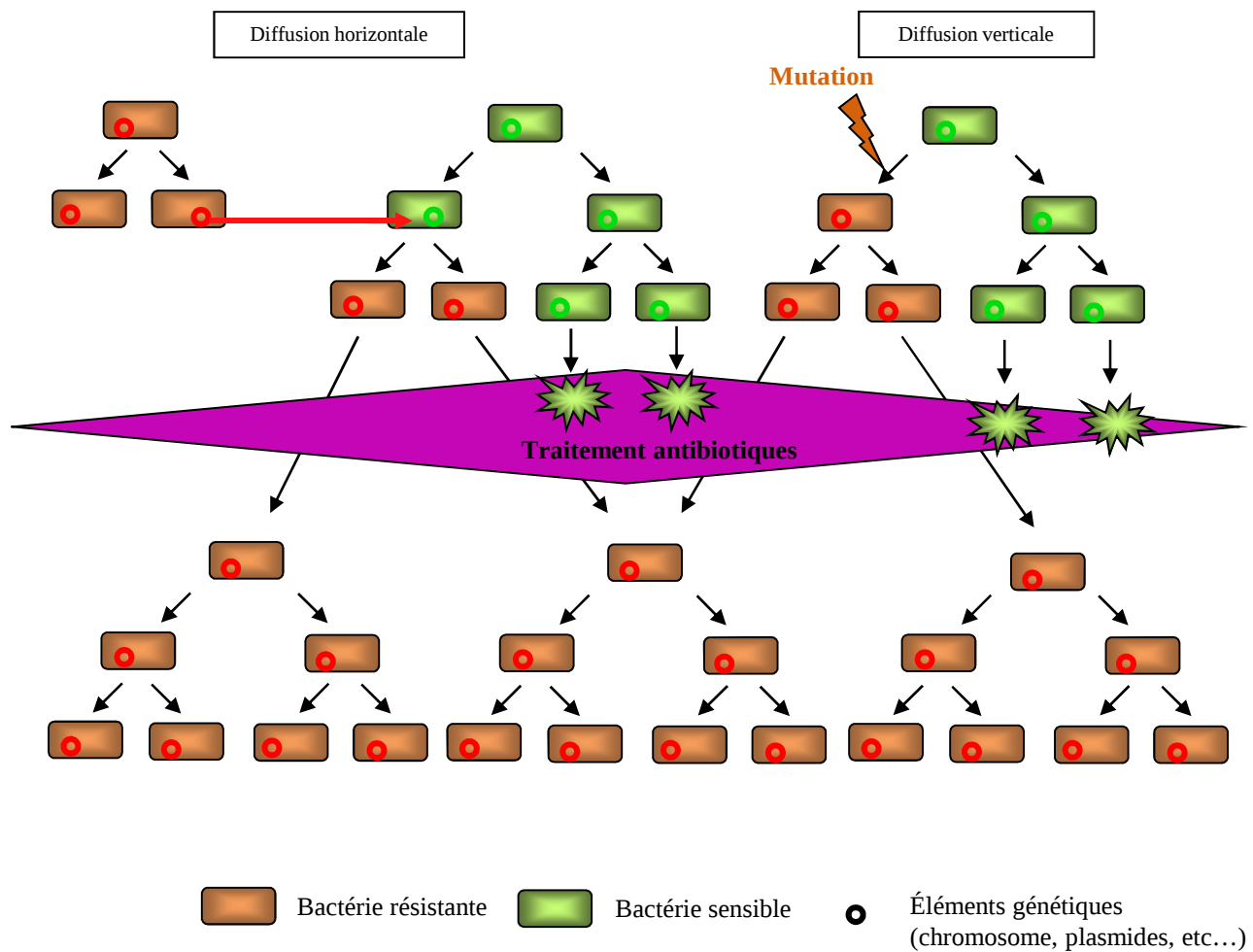


Figure 3 : Sélection de bactéries résistantes sous la pression d'un traitement antibiotique.

s'expliquerait par la sélection naturelle qui favoriserait l'apparition au sein d'une population de variations aléatoires, ou mutations, au niveau de l'ADN. En résumé, si ces mutations procurent un avantage pour la survie ou la reproduction de l'organisme, elles seront transmises à la descendance et verront leur fréquence augmenter au sein de la population au fil du temps. En ce qui concerne la résistance des bactéries aux antibiotiques, ce phénomène de sélection est accéléré par les propriétés bactéricides (ou bactériostatiques) des antibiotiques, l'utilisation d'antibiotiques constitue donc un facteur majeur de pression de sélection. Ainsi, sous la pression d'un traitement antibiotique, l'apparition d'une mutation qui permettrait à une bactérie de résister à cet antibiotique favoriserait cette bactérie qui se multiplierait en transmettant cette mutation aux générations suivantes, occupant la place laissée par les organismes sensibles à cette molécule (Figure 3). Toutefois, l'apparition de mutations spontanées reste un phénomène relativement rare, et surtout aléatoire, qui ne suffirait pas à expliquer l'augmentation du nombre de bactéries résistantes observée au sein de la population bactérienne. Curieusement, le phénomène bactérien qui pourrait expliquer cette dissémination a été mis en évidence en parallèle de la découverte des antibiotiques. C'est en effet dans la première moitié du XX^{ème} siècle que furent identifiés les trois types de transferts horizontaux de gènes (Figure 2). La transformation et la transduction bactérienne consistent respectivement en l'acquisition d'un fragment d'ADN exogène et au gain d'informations génétiques d'origines bactériennes via l'intégration d'un bactériophage. Le troisième type mis en évidence en 1945, la conjugaison bactérienne, est un système de transfert « professionnel » qui nécessite un contact étroit entre deux bactéries et sur lequel nous reviendrons dans la partie bibliographique. A l'instar de l'évolution selon Darwin, les transferts horizontaux de gènes permettent une adaptation à l'environnement, mais ils sont en plus des facteurs importants de plasticité génétique à l'origine de l'évolution des génomes bactériens. Depuis sa découverte, le phénomène de conjugaison bactérienne a été très étudié, de nombreux transferts conjugatifs intra-espèces et inter-espèces ont ainsi été mis en évidence, mais également entre bactéries et cellules eucaryotes.

Les recherches sur ces phénomènes de mobilité ont permis de découvrir que presque toutes les bactéries avaient à leur disposition un arsenal complet d'éléments génétiques doués de mobilité et complémentaires les uns des autres, citons entre autres : les plasmides, capables de se répliquer indépendamment du chromosome et de se transférer entre bactéries ; le système « intégron-cassettes de gène », spécialisé dans la capture et l'expression de gènes ; les transposons, qui permettent de transporter des informations génétiques entre les réplicons

de la cellule ou même entre les réplicons de deux cellules différentes comme c'est le cas avec les ICE (Integrative Conjugative Element). Tous ces éléments, qui seront abordés plus en détails dans la partie bibliographique, sont des vecteurs d'informations génétiques pouvant conférer un avantage à la bactérie comme la résistance aux anti-bactériens, une capacité accrue à provoquer des infections, ou des avantages métaboliques.

Afin de préserver notre capacité à lutter contre les agents infectieux, il est nécessaire de développer de nouvelles « armes », mais également de connaître les moyens de défense dont disposent les bactéries. Pour cela, il est donc important d'étudier les mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par les bactéries, mais aussi de comprendre les systèmes de diffusion de gènes dont elles disposent.

Dans ce contexte, l'îlot génomique SGI1 (*Salmonella* Genomic Island 1) constitue un bon modèle d'étude des résistances aux antibiotiques et de leur dissémination. En effet, il s'agit du premier îlot génomique de multi-résistance identifié chez *Salmonella* pour lequel la mobilité a été démontrée. SGI1, qui sera décrit plus en détail dans la partie bibliographique, a été d'abord identifié chez un clone épidémique de *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium de lysotype DT104 penta-résistant qui sévit à la fin du XX^{ème} siècle. Par la suite, SGI1, ou un de ces nombreux variants avec des phénotypes de résistance différents, ont été mis en évidence chez plusieurs sérotypes de *S. enterica* et également chez *Proteus mirabilis*, ce qui a conduit à étudier et à démontrer sa mobilité. SGI1 est un Élément Intégratif Mobilisable (IME) puisque son transfert dépend au moins d'une partie de la machinerie de conjugaison apportée en *trans* par un élément conjugatif présent dans la même cellule. Outre sa mobilité, l'intérêt de cet îlot est son intégron complexe qui lui confère sa grande plasticité génétique et qui pourrait lui donner l'occasion de s'enrichir par l'acquisition de gènes de résistance à des antibiotiques d'importance clinique. L'étude de son mécanisme de transfert pourrait donc étendre les connaissances sur la mobilité des éléments génétiques, mais pourrait également permettre de mieux caractériser cet îlot génomique avant, potentiellement, qu'il ne vienne à se perfectionner avec des gènes de résistance aux antibiotiques d'importance clinique.

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

A. La résistance aux antibiotiques

Les résistances aux antibiotiques sont dues à des gènes susceptibles d'être exprimés dans n'importe quelles bactéries. Cette notion est illustrée par le terme « résistome » qui définit l'ensemble des gènes de résistance aux antibiotiques qui peuvent être retrouvés aussi bien chez les bactéries de l'environnement que chez les bactéries pathogènes présentes dans les hôpitaux. Cette partie est consacrée à la compréhension de ce résistome, aussi bien sur l'origine et le réservoir des gènes de résistance que sur les facteurs responsables de leur diffusion. Les problèmes de résistance rencontrés avec les bactéries de l'espèce *S. enterica*, principales porteuses de l'îlot génomique SGI1, seront également décrits, ainsi que les principaux mécanismes impliqués dans la résistance aux antibiotiques et leur capacité à être transférés entre bactéries.

A.1. Le résistome : origines, diffusion et moyens de lutte

a) D'où viennent les résistances aux antibiotiques ?

Les antibiotiques sont, à l'origine, des molécules chimiques produites naturellement par une grande diversité d'organismes. Leur propriété bactéricide ou bactériostatique avait conduit à imaginer que ces molécules conféraient un avantage évolutif aux bactéries qui les produisaient par rapport aux autres bactéries. En effet, l'hypothèse concernant le rôle de ces molécules était qu'elles servaient à tuer ou empêcher la croissance des bactéries en concurrence pour une niche écologique ou encore qu'elles permettaient aux bactéries de se défendre contre leurs prédateurs (cytotoxicité des antibiotiques contre les protistes) (Linares *et al.*, 2006; Aminov, 2009). Cependant, leurs propriétés bactéricide ou bactériostatique sont observées à de fortes concentrations comme celles utilisées en thérapie anti-infectieuse. Or, ces concentrations sont bien plus fortes que celles produites naturellement par les bactéries. Le rôle de ces molécules dans la nature pourrait donc être différent de celui qu'on leur prêtait (Martinez, 2008). En effet, à faible concentration, les antibiotiques pourraient servir à la coopération entre les bactéries plutôt qu'à leur compétition. Plusieurs exemples ont été cités dans la littérature : une faible concentration de tétracycline, de tobramycine ou de ciprofloxacine provoquerait des variations dans l'expression de gènes de *Pseudomonas*

aeruginosa, notamment de gènes impliqués dans la mobilité ou la virulence. Ainsi, ces trois molécules, à des doses inférieures à leurs Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI), induisent la formation de biofilm chez ces bactéries. La tobramycine induit également une augmentation de leur mobilité, alors que la tétracycline permettrait d'augmenter la virulence en favorisant la production du système de sécrétion de type III, impliqué dans la cytotoxicité de la bactérie (Linares *et al.*, 2006). De la même manière, des faibles doses de rifampicine moduleraient la transcription des gènes chez *S. enterica* (Yim *et al.*, 2006). Des bactéries issues du sol, résistantes à de fortes doses d'antibiotiques, seraient capables d'utiliser les antibiotiques comme seules sources de carbones : des bactéries pathogènes qui hériteraient de cet atout métabolique posséderaient un avantage sélectif important sur les autres bactéries (Dantas *et al.*, 2008). Le véritable rôle des antibiotiques dans la nature n'est donc pas encore bien défini. Cependant, ces substances pouvant être toxiques, les organismes producteurs d'antibiotiques ont dû développer simultanément des mécanismes pour se protéger de l'effet des molécules qu'elles produisent.

Beaucoup de gènes de résistance seraient donc apparus au cours de l'évolution de ces organismes par mutation de gènes préexistants, conséquences d'altérations de l'ADN ou d'erreurs lors de la réplication (Martinez & Baquero, 2000). La plupart des antibiotiques utilisés en thérapie anti-infectieuse sont produits par des bactéries du sol du groupe des actinomycètes (D'Costa *et al.*, 2006). Les bactéries de ce groupe, rarement pathogènes, jouent un rôle important dans la décomposition des matières organiques du sol. L'étude de ces bactéries s'est amplifiée lorsqu'il a été mis en évidence la présence de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques, orthologues à ceux identifiés chez les bactéries pathogènes (Davies, 1994; Marshall *et al.*, 1998). Une étude menée sur 480 bactéries isolées du sol avec 21 molécules appartenant à différentes classes d'antibiotiques a révélé que deux tiers de ces bactéries étaient résistantes à au moins sept antibiotiques différents, dont deux d'entre elles résistantes à 15 molécules différentes (D'Costa *et al.*, 2006). Le résistome des bactéries du sol se serait construit au fil de l'évolution de ces bactéries, avant même l'utilisation des antibiotiques en médecine humaine (Aminov & Mackie, 2007). Ce résistome pourrait donc être un réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques à l'origine des problèmes de résistance rencontrés chez les bactéries pathogènes, bien qu'aucun transfert de gènes n'ait encore été mis en évidence entre les bactéries du sol et les bactéries d'importances cliniques. De plus, l'importance de ce réservoir de résistance aux antibiotiques pourrait être sous-estimée puisqu'une partie seulement des bactéries du sol serait cultivable en laboratoire, ces

Tableau I : Relations temporelles entre la découverte, l'utilisation en médecine et l'apparition de bactéries résistantes pour quelques antibiotiques
(adapté de Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001).

Antibiotiques	Découvertes ou productions	Utilisations cliniques	Identifications de bactéries résistantes
Pénicilline	1940	1943	1945
Streptomycine	1944	1947	1947
Tétracyclines	1948	1952	1956
Érythromycine	1952	1955	1956
Vancomycine	1956	1972	1987
Acide nalidixique	1960	1962	1966
Gentamicine	1963	1967	1970
Fluoroquinolones	1978	1982	1985

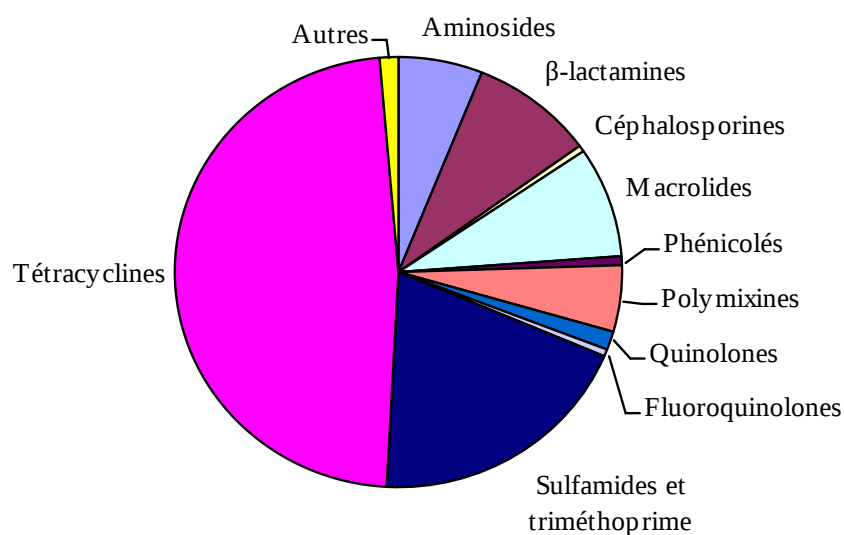


Figure 4 : Ventes annuelles d'antibiotiques destinées au traitement des animaux d'élevage en France en 2006 (FARM, 2009).

études ne permettent donc pas de révéler les résistances que les bactéries non cultivables pourraient posséder. Toutefois, l'importance de ce réservoir peut être tempérée par la présence de résistances intrinsèques (ou naturelles) qui sont communes à toute une espèce, à l'inverse des résistances dites acquises. Elles peuvent être simplement dues à l'absence de la cible d'un antibiotique, comme c'est le cas pour les bactéries du genre *Streptomyces* qui sont résistantes au triméthoprimé puisqu'elles ne produisent pas la cible de cet antibiotique (la dihydrofolate réductase) (D'Costa *et al.*, 2006). Un exemple intéressant de résistance intrinsèque concerne les quinolones. Ces dernières sont des molécules de synthèse qui ont donc peu de chance d'être retrouvées dans la nature. Pourtant, des souches de *P. aeruginosa* isolées de l'environnement avant l'introduction de cet antibiotique se sont avérées résistantes aux quinolones. Le mécanisme mis en cause était un système d'efflux responsable de multi-résistances (Alonso *et al.*, 1999). Certaines résistances peuvent donc être causées par un mécanisme déjà présent dans la cellule avant l'introduction d'un antibiotique. Ces résistances intrinsèques ne sont ni dépendantes de l'exposition à un antibiotique, ni apportées par transferts horizontaux mais elles peuvent servir de base pour l'élaboration de véritables mécanismes de résistance. Leur présence avant même l'introduction d'un antibiotique peut expliquer la rapidité d'apparition de résistances lorsqu'un nouvel antibiotique est utilisé en médecine (Tableau I) (Fajardo *et al.*, 2008; Davies & Davies, 2010). De plus, les bactéries du sol seraient capables de développer de nouveaux mécanismes de résistances. En effet, un mécanisme d'inactivation de la rifampicine a été découvert chez ces bactéries alors que le principal mécanisme de résistance connu contre cette molécule consistait en une modification de sa cible (une sous-unité de l'ARN polymérase) (D'Costa *et al.*, 2006). Les bactéries du sol pourraient donc être un réservoir de gènes de résistance à l'origine de l'apparition de résistance chez les bactéries pathogènes. Cependant, les bactéries productrices d'antibiotiques et les bactéries pathogènes ne vivent pas dans les mêmes environnements, il pourrait donc exister des facteurs qui contribuent à la diffusion des gènes de résistance entre ces bactéries.

b) Facteurs favorisant l'émergence et la diffusion des gènes de résistance

Les gènes de résistance aux antibiotiques se dissémineraient dans le monde principalement par deux voies : par diffusion clonale d'une bactérie résistante et par transferts horizontaux, puisque la plupart des gènes de résistance ont été identifiés sur des éléments génétiques mobiles (transposons, cassettes de gène, plasmides, etc.). Toutefois, de nombreux

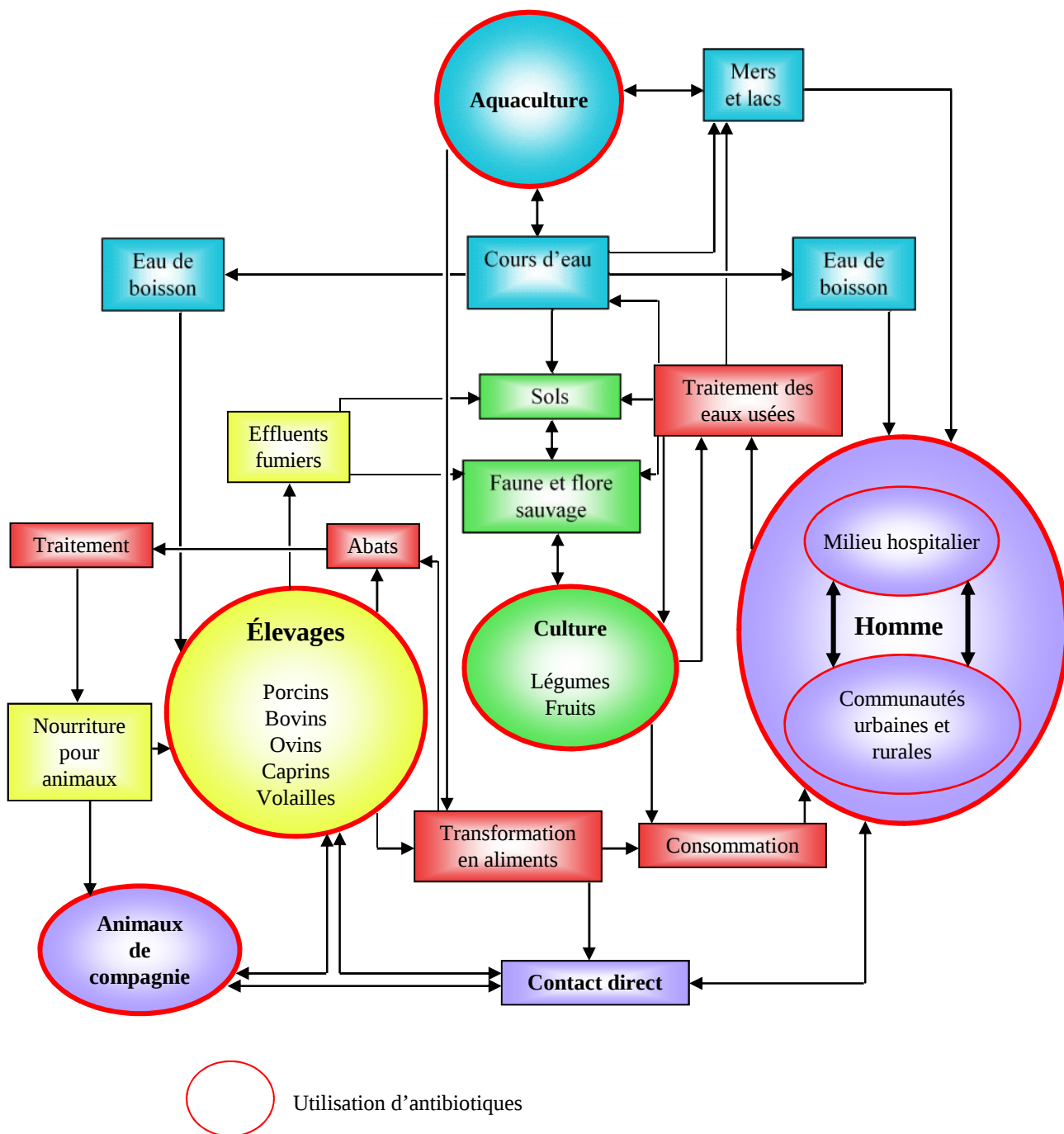


Figure 5 : Dissémination plausible ou avérée des antibiotiques et de leurs résistances à travers les écosystèmes (adaptée de Davies & Davies, 2010).

facteurs, dus à l'Homme ou à l'environnement, peuvent favoriser cette dissémination (Allen *et al.*, 2010).

L'une des premières causes d'émergence de résistance aux antibiotiques est due à l'excès d'utilisation de ces molécules. En effet, plus de la moitié des utilisations d'antibiotiques ne concerneraient pas la médecine humaine (Davies & Davies, 2010). Les mêmes familles d'antibiotique (Figure 4), voir les mêmes molécules, sont utilisées aussi bien en élevage qu'en médecine humaine. De plus, dans certains élevages, les animaux malades ne sont pas soignés spécifiquement, les antibiotiques sont ajoutés à la nourriture ou à l'eau qui sont consommés aussi bien par les animaux malades que par les animaux sains. Cette utilisation massive d'antibiotiques en métaphylaxie associée à leur emploi comme facteurs de croissance ou en prophylaxie ont sans doute largement contribué à la sélection de bactéries résistantes qui peuvent alors se retrouver dans les produits consommés par l'Homme (Figure 5) (Schwarz *et al.*, 2001). Des bactéries porteuses de gènes de résistance aux tétracyclines auraient par exemple pu passer d'élevages aquatiques à des patients hospitalisés. Ces résistances pourraient être apparues à cause de l'utilisation prophylactique des tétracyclines en aquaculture (Rhodes *et al.*, 2000).

La mondialisation et l'augmentation des voyages peuvent être également mis en cause dans la diffusion des résistances aux antibiotiques (MacPherson *et al.*, 2009). Dans les pays en développement, les traitements des maladies infectieuses ne sont pas toujours adéquats ou respectés comme ils le devraient par manque de moyens financiers, or une sous-utilisation d'antibiotique peut également conduire à l'émergence de souches résistantes. L'augmentation du transit entre ces pays et les pays développés favoriserait ensuite la dissémination de ces bactéries résistantes aux autres continents (OMS, 2000). Au Royaume-Uni, des souches d'*Escherichia coli* résistantes aux β -lactamines à large spectre ont causé l'hospitalisation de patients qui avaient séjourné en Inde quelque temps auparavant. Dans le même hôpital, une autre infection due à cet *E. coli* a été détectée sans que le patient n'ait voyagé (M'Zali *et al.*, 1997). Plus récemment, des patients venant d'Amérique du Sud ont été hospitalisés en Espagne suite à une infection par des *S. aureus* résistants à la méthicilline (Cercenado *et al.*, 2008). De plus, la globalisation de l'économie entraîne également un flux de marchandises pouvant être un vecteur de dissémination de résistances puisque des poulets importés du Brésil vers le Royaume-Uni se sont avérés être porteurs de souches d'*E. coli* véhiculant des β -lactamases à spectre élargi de type CTX-M-2, type de β -lactamases qui était alors absent du Royaume-Uni (Warren *et al.*, 2008). Ces exemples montrent bien la possibilité de

dissémination des bactéries, et donc des gènes de résistances entre les continents, ainsi que leur capacité à coloniser un nouveau milieu.

Les activités humaines ont également modifié la prévalence des gènes de résistances dans l'environnement. Les antibiotiques utilisés en médecine humaine ou en agriculture peuvent persister dans les sols et dans l'eau, et donc imposent une pression de sélection durable dans l'environnement (Figure 5) (Segura *et al.*, 2009; Davies & Davies, 2010). Des phénomènes naturels comme le vent pourraient alors disséminer les bactéries résistantes entre les continents (Kellogg & Griffin, 2006). De plus, plusieurs études ont montré une plus forte proportion de bactéries résistantes chez les animaux sauvages, notamment les rongeurs, dans les pays à fortes densités de populations comparés aux pays plus faiblement peuplés (Allen *et al.*, 2010). Ce constat a été fait également chez des oiseaux, qui sont quant à eux, capables de couvrir de plus grandes distances, notamment les oiseaux migrateurs, et qui pourraient donc potentiellement disséminer des bactéries porteuses de résistances tout au long de leur voyage. Les activités humaines auraient donc tendance à faire augmenter la prévalence des gènes de résistances dans la nature. L'augmentation des transits, les phénomènes naturels ou même la faune sauvage se chargeraient alors de favoriser la dissémination de ces résistances (Allen *et al.*, 2010).

c) Conséquences et perspectives de lutte

Les autorités publiques ont pris conscience de ces problèmes de résistances aux antibiotiques, qui peuvent avoir des conséquences aussi bien en terme de santé publique qu'en matière d'économie (OMS, 2000). Ces problèmes de résistance ont en premier lieu un coût humain, ils peuvent engendrer des échecs thérapeutiques et donc conduire à une augmentation des taux de mortalité et de morbidité d'une maladie. De plus, les résistances les plus courantes sont celles qui touchent les molécules les plus anciennes, or ce sont ces molécules qui sont les plus abordables d'un point de vue financier. Les résistances aux antibiotiques obligent donc à utiliser des molécules plus récentes, et donc plus coûteuses, mais qui ne sont pas toujours accessibles en quantité suffisante dans les pays en voie de développement. Ces problèmes de résistance engendrent également des pertes économiques dues à la diminution de production de richesse causée par une personne malade. Une autre conséquence souvent négligée est la perturbation des services de santé due à ces résistances : l'isolement du patient, le contrôle des infections croisées, l'annulation de procédures ou de programmes entraînent une diminution de l'efficacité des services de santé (Hawkey, 2008).

L'OMS, dans son rapport de 2000 sur la résistance aux antimicrobiens, a établi un plan d'action pour lutter contre cette expansion des résistances aux antibiotiques (OMS, 2000). Parmi ces mesures, elle recommande tout d'abord de favoriser la vaccination, empêchant ainsi toutes infections par des bactéries, qu'elles soient résistantes ou sensibles. Outre l'éducation et la responsabilisation des patients et des professionnels de santé, elle préconise de réduire l'utilisation des antibiotiques en agriculture et dans les élevages, notamment pour les molécules utilisées en médecine humaine. Au Danemark et en Suède, le contrôle des molécules administrées dans les élevages a en effet permis de réduire les niveaux de résistances des bactéries hébergées par les animaux d'élevages (Hawkey, 2008). Cependant, la diminution d'utilisation d'un antibiotique n'est pas toujours corrélée avec une baisse du niveau de résistance contre cet antibiotique. Au Royaume-Uni, une diminution de la résistance à la pénicilline a bien été observée suite à une baisse de la vente de cet antibiotique, cependant le même effet n'a pu être montré après une diminution des ventes de macrolides (Livermore *et al.*, 2006). L'OMS encourage également la recherche de nouvelles molécules pour lutter contre ces résistances. En effet, en plus d'offrir de nouvelles possibilités de traitement, l'apparition de nouveaux antibiotiques permettrait de réduire les niveaux de résistance contre les molécules plus anciennes comme cela a été observé par le passé lors de l'introduction de nouvelles molécules (Ruiz-Palacios *et al.*, 1986; Gerding & Larson, 1985).

Il existe également d'autres pistes à explorer qui pourraient conduire à une diminution de la résistance aux antibiotiques. Des médicaments « anti-résistances » qui agiraient sur les principaux mécanismes de résistances développés par les bactéries pourraient être développés. D'autres cibles pourraient être également définies : l'inactivation de gènes dont le rôle dans la résistance était inconnu a permis de réduire le niveau de résistance contre plusieurs molécules chez *P. aeruginosa*, l'identification de tels gènes pourrait permettre de trouver des cibles pour des médicaments anti-résistances (Fajardo *et al.*, 2008). Enfin, beaucoup de résistances aux antibiotiques sont dues à des inactivations enzymatiques dont les gènes responsables sont portés par des plasmides, de nouvelles molécules pourraient donc être développées pour empêcher l'action de ces enzymes, à la manière des inhibiteurs de β -lactamases. De la même manière, il pourrait également être intéressant de développer des molécules « anti-plasmides » qui agiraient sur la répllication des plasmides et induiraient leur élimination comme cela a déjà été étudié (DeNap & Hergenrother, 2005).

Toutefois, tous ces moyens qui existent ne pourront être efficaces que s'ils sont appliqués à l'échelle mondiale puisque les bactéries porteuses de résistances aux antibiotiques sont capables d'être véhiculées sur de grandes distances par l'Homme ou par la nature.

Nombre de cas confirmés de
salmonellose pour 100 000 personnes

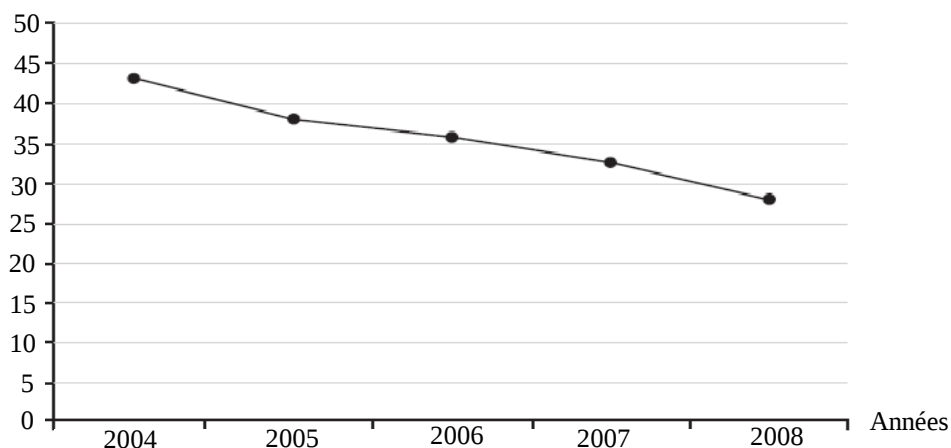


Figure 6 : Évolution du nombre de salmonelloses en Europe. Données provenant de 24 pays européens (EFSA, 2010).

Tableau II : Prévalence des dix sérotypes de *Salmonella* les plus souvent isolés chez l'Homme en France entre 2006 et 2008 ou en Europe entre 2007 et 2008 (CNR-Salm, 2008; EFSA, 2010).

Rang	Données françaises			Données européennes (regroupant 26 pays)	
	2006 (n=10 154)	2007 (n=8 124)	2008 (n=10 322)	2007 (n=126 281)	2008 (n=120 760)
1	Typhimurium (39,5%)	Typhimurium (37,2%)	Typhimurium (45,6%)	Enteritidis (64,5%)	Enteritidis (58%)
2	Enteritidis (28,3%)	Enteritidis (26,9%)	Enteritidis (18,7%)	Typhimurium (16,5%)	Typhimurium (21,9%)
3	Derby (1,5%)	Derby (1,6%)	1,4,[5],12:i:- (4%)	Infantis (1%)	Infantis (1,1%)
4	Typhi (1,5%)	Hadar (1,5%)	Derby (1,7%)	Virchow (<1%)	Virchow (<1%)
5	Napoli (1,4%)	1,4,[5],12:i:- (1,5%)	Kentucky (1,3%)	Newport (<1%)	Newport (<1%)
6	Hadar (1,4%)	Typhi (1,5%)	Typhi (1,3%)	Stanley (<1%)	Agona (<1%)
7	Infantis (1,3%)	Newport (1,5%)	Newport (1,2%)	Hadar (<1%)	Derby (<1%)
8	Virchow (1,2%)	Kentucky (1,4%)	Panama (1%)	Derby (<1%)	Stanley (<1%)
9	1,4,[5],12:i:- (1,1%)	Infantis (1,3%)	Hadar (1%)	Kentucky (<1%)	Bovismorbificans (<1%)
10	Newport (1%)	Panama (1,1%)	Infantis (<1%)	Agona (<1%)	Kentucky (<1%)

A.2. Résistances aux antibiotiques chez *Salmonella*

a) Épidémiologie du genre *Salmonella*

Les infections à *Salmonella* constituent un problème majeur de santé publique partout dans le monde. Il a été recensé plus de 2500 sérotypes de *Salmonella* dont la plupart appartiennent à l'espèce *S. enterica* sous-espèce *enterica*. On y retrouve les trois sérotypes strictement humains, Typhi, Paratyphi A et Paratyphi C, responsables avec le sérotype Paratyphi B, des fièvres entériques (typhoïdes et paratyphoïdes), ainsi que les principaux sérotypes impliqués dans les infections gastro-intestinales chez l'Homme et l'animal. En 2010, une étude a permis d'estimer à 93,8 millions, le nombre de cas de gastro-entérites causés par *Salmonella* chaque année dans le monde, dont 155 000 cas mortels. L'origine alimentaire de ces maladies est suspectée pour 80,3 millions de ces cas (Majowicz *et al.*, 2010). En effet, les bactéries du genre *Salmonella* sont l'un des principaux responsables de Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC). En 2008, l'institut de veille sanitaire (InVS) français a estimé que 50,8% des TIAC étaient dues à des bactéries du genre *Salmonella* parmi les 260 TIAC dont l'agent causal a été identifié (InVS, 2009). Les sérotypes les plus représentés étaient Typhimurium (47% des TIAC dues à *Salmonella*) et Enteritidis (22,7%). En Europe, l'EFSA (European Food Safety Authority) a recensé 131 468 cas confirmés de salmonelloses en 2008, soit 13,5% de moins qu'en 2007 (EFSA, 2010a). Ce chiffre confirme la baisse enregistrée depuis plusieurs années du nombre de salmonelloses en Europe (Figure 6). Au niveau européen, les sérotypes majoritairement retrouvés restent Enteritidis suivi par Typhimurium (Tableau II). Toutefois, la prédominance du sérotype Enteritidis a tendance à diminuer depuis quelques années en Europe. En France, le sérotype Typhimurium est même majoritaire depuis quelques années selon le Centre National de Référence des *Salmonella* (CNR-Salm) (Tableau II). Hormis ces deux sérotypes, la prévalence des autres sérotypes change régulièrement sans qu'aucun ne réussisse vraiment à émerger, mise à part éventuellement le sérotype 4,[5],12:i:-, considéré comme un variant monophasique du sérotype Typhimurium. Ce sérotype pourrait constituer une menace pour ces prochaines années puisque sa prévalence est en constante augmentation, prenant même la 3^{ème} place des sérotypes isolés en France en 2008 (Tableau II). De plus, ce sérotype 4,[5],12:i:- semble particulièrement virulent : lors d'une épidémie de salmonelloses à New-York en 1998, il fut à l'origine d'un taux d'hospitalisation important (70% des personnes atteintes), et en Thaïlande et au Brésil, il a été associé à des cas de septicémie (Hopkins *et al.*, 2010). Cependant, les

Tableau III : Résistances aux antibiotiques chez *Salmonella* dans le monde en 2006. Données provenant de 82 888 souches de *Salmonella* d'origine humaine, regroupées à partir des rapports trimestriels du réseau international de surveillance des infections entériques (Enter-net, 2006).

Antibiotiques	Pourcentage d'isolats résistants
Sulfamides	28,3%
Ampicilline	20,9%
Tétracyclines	20,4%
Acide nalidixique	18,7%
Streptomycine	18,5%
Triméthoprine	11,3%
Chloramphénicol	9,3%
Kanamycine	3,7%
Gentamicine	2,5%
Céfotaxime	1,1%
Ciprofloxacin	1,1%

bactéries du genre *Salmonella* causent la plupart du temps de simples gastro-entérites qui ne nécessitent pas de traitements antibiotiques, toutefois, les sérotypes Choleraesuis, Virchow et Dublin ont tendance à provoquer des maladies invasives (Parry & Threlfall, 2008). Dans ce cas, et lorsque les salmonelloses touchent les enfants, les personnes âgées, ou les immunodéprimés, un traitement par les antibiotiques est souvent nécessaire.

b) Résistance aux antibiotiques des *Salmonella* isolées chez l'Homme

Pendant longtemps, les molécules préconisées pour traiter les salmonelloses étaient le chloramphénicol, l'ampicilline, ou l'association triméthoprim/sulfaméthoxazole. Cependant, les problèmes de résistance rencontrés contre ces molécules ont conduit à utiliser des antibiotiques plus récents, notamment les céphalosporines de 3^{ème} génération (C3G) et les fluoroquinolones (Parry & Threlfall, 2008). Toutefois, des résistances contre ces dernières molécules ont déjà été mises en évidence chez *Salmonella*.

Les principaux problèmes de résistance rencontrés chez *Salmonella* sont assez récents puisqu'ils datent de la fin du XX^{ème} siècle. Ils sont principalement causés par la multi-résistance aux antibiotiques, et les résistances aux deux molécules d'intérêts thérapeutiques, les C3G et les fluoroquinolones. Bien que le nombre de salmonelloses diminue régulièrement depuis plusieurs années, la proportion d'isolats résistants de *Salmonella* tend plutôt à augmenter. Entre 2000 et 2004 en Europe, cette proportion est passée de 57 à 66% d'isolats résistants, toutes molécules confondues (Meakins *et al.*, 2008). Dans cette étude, 80% des sérotypes étaient Enteritidis, Typhimurium ou Virchow. Le sérotype Enteritidis n'est pas très concerné par la résistance aux antibiotiques comparé aux deux autres. Pour les sérotypes Typhimurium et Virchow, le taux de résistance en 2004 en Europe à au moins un antibiotique concernait près de 75% des isolats de ces sérotypes. Ce pourcentage est stable pour Typhimurium, mais pour Virchow, il montre une nette augmentation de la résistance chez ce sérotype par rapport aux années précédentes (Meakins *et al.*, 2008; Parry & Threlfall, 2008). Cette observation s'est confirmée en 2005 et en 2006 où le taux de *S. Virchow* résistantes à au moins un antibiotique se situait autour des 70% (Enter-net, 2006). Tous sérotypes confondus, les principales molécules touchées par la résistance (>18% des isolats) sont les sulfamides, l'ampicilline, les tétracyclines, l'acide nalidixique et la streptomycine (Tableau III). Cependant, ces résistances sont souvent associées entre elles, et avec la résistance au chloramphénicol, pour former des souches multi-résistantes. L'un des premiers exemples de multi-résistance a été observé chez un clone épidémique penta-résistant de *S. Typhimurium* de

Nombre de cas reportés

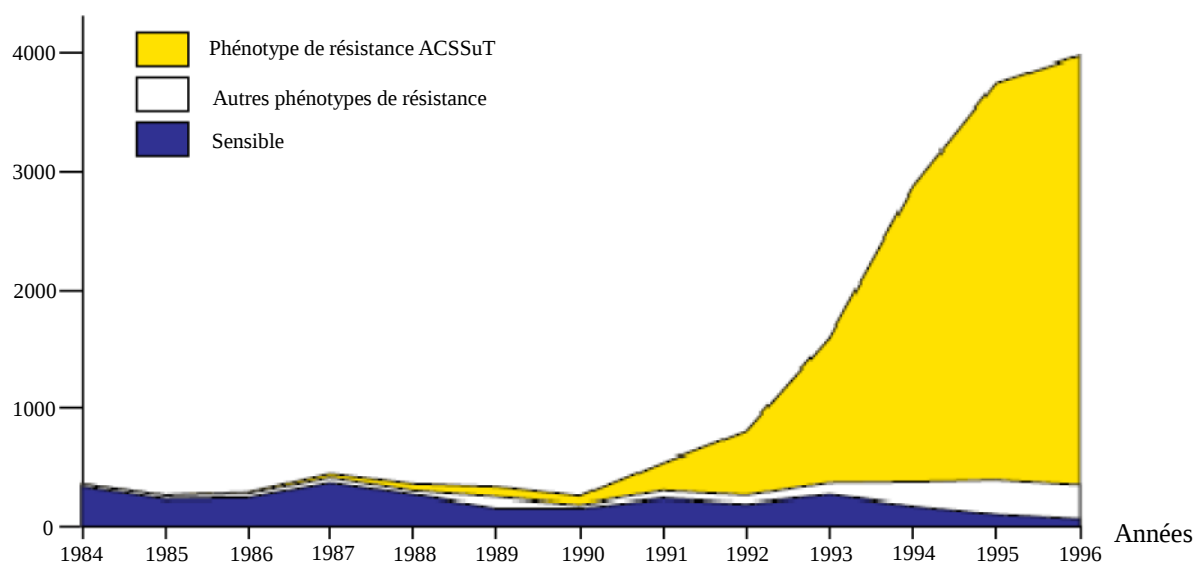


Figure 7 : Proportion du phénotype de résistance ACSSuT parmi les souches de *S. Typhimurium* DT104 isolées en Angleterre et au Pays de Galles entre 1984 et 1996. Phénotype ACSSuT = Ampicilline, Chloramphénicol, Streptomycine, Sulfamides, Tétracyclines (tirée de PHLS, 1997).

Tableau IV : Principaux profils de multi-résistance identifiés chez *S. Typhimurium* en France en 2000 et 2007 (CNR-Salm, 2008).

Phénotypes de résistance ^a	% de souches de <i>S. Typhimurium</i>	
	2000	2007
ACSSuT	50,9	32
ACSSuTNal	3,8	2
ACSSuTTm	2,8	1
ASSuT	2,8	4
ASuTTm	0	4
Total	60,3	43

^a A : ampicilline, C : chloramphénicol, Nal : acide nalidixique, S : streptomycine, Su : sulfamides, T : tétracyclines, Tm : triméthoprim

lysotype DT104 qui a émergé au Royaume-Uni au début des années 1990 (Figure 7) et qui s'est disséminé partout dans le monde durant les vingt dernières années (Davis *et al.*, 2002). Ce clone présentait un phénotype de résistance de type ACSSuT (Ampicilline, Chloramphénicol, Streptomycine, Sulfamides, Tétracyclines). Depuis, différents phénotypes de multi-résistance sont apparus au sein du genre *Salmonella*, associant ces résistances à des résistances à d'autres antibiotiques comme le triméthoprim (Tm), l'acide nalidixique (Nal), la gentamicine ou encore la kanamycine. Le sérotype Typhimurium reste le plus touché par ces problèmes de multi-résistance, cependant, d'autres sérotypes comme Virchow ou Hadar sont également atteints par ces phénomènes (Threlfall, 2002). Toutefois, au cours des dernières années, le taux de multi-résistance (défini comme la résistance à au moins 4 antibiotiques) a sensiblement diminué : en France, la multi-résistance aux antibiotiques (notamment les phénotypes ACSSuT, ACSSuTNal et ACSSuTTm) chez le sérotype Typhimurium est passé de 60,3% en 2000 à 43% en 2007 (Tableau IV). Cependant, la multi-résistance demeure un problème chez *Salmonella* puisqu'elle oblige à utiliser les C3G ou les fluoroquinolones pour traiter les salmonelloses, ce qui peut tendre à favoriser l'émergence de résistances à ces deux molécules.

Les résistances aux C3G et aux fluoroquinolones restent peu fréquentes chez *Salmonella* mais elles pourraient devenir un réel problème de santé publique si elles venaient à se propager. Les premiers isolats de *Salmonella* résistants aux fluoroquinolones datent du début des années 1990, peu de temps après que cette molécule ait été utilisée en santé humaine et animale (Piddock *et al.*, 1990; Giraud *et al.*, 2006). Selon les mutations et le mécanisme mis en jeu (voir partir A.3.b), la bactérie peut avoir un phénotype de résistance « totale » aux fluoroquinolones ou elle peut simplement avoir une sensibilité diminuée à cette molécule. Dans ce cas, cette baisse de sensibilité est souvent associée à une résistance à l'acide nalidixique et quelquefois à une multi-résistance de type ACSSuT (Molbak *et al.*, 1999). En 2004, 22% des principaux sérotypes isolés en Europe (Enteritidis, Typhimurium et Virchow) avaient une sensibilité diminuée à la ciprofloxacine (fluoroquinolone), ce taux atteignait même 59% pour le sérotype Virchow. Les isolats résistants à la ciprofloxacine représentaient, quant à eux, 0,9% de cette population (Parry & Threlfall, 2008), et 1,1% en 2006 (Tableau III). Ce taux, plutôt faible par rapport à d'autres genres d'entérobactéries, peut être expliqué par le coût énergétique de cette résistance qui entraînerait la perte de la résistance aux fluoroquinolones en l'absence de pression de sélection chez *Salmonella* (Giraud *et al.*, 2003). Cependant, des pics de résistance à ces molécules peuvent être observés comme au

Nombre de pays ou de cas

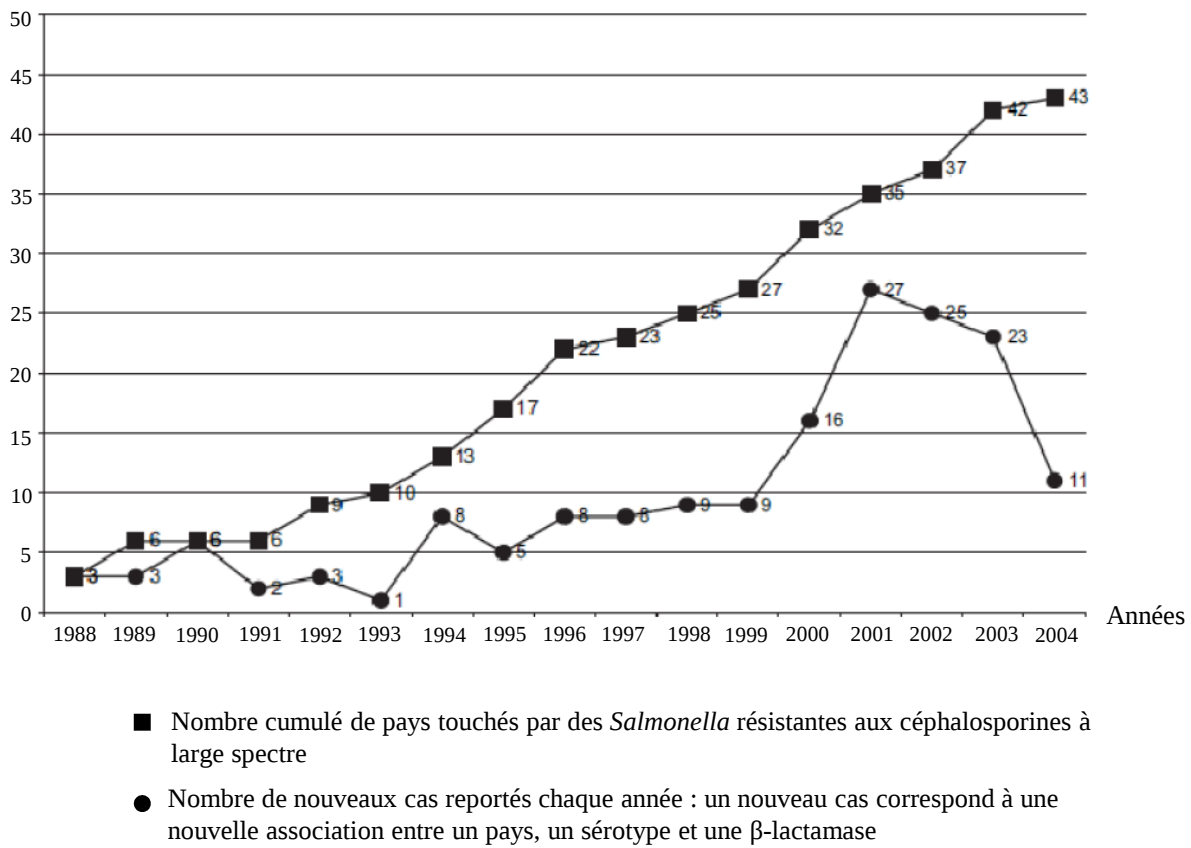


Figure 8 : Dissémination des *Salmonella* résistantes aux céphalosporines à large spectre à travers le monde (tirée de Arlet *et al.*, 2006).

début des années 2000 à Taiwan où une augmentation du nombre d'isolements de souches de *Salmonella* résistantes à la ciprofloxacine a été observée. Ces résistances concernaient principalement le sérotype Choleraesuis pour lequel le pourcentage d'isolats résistants aux fluoroquinolones a même atteint 60% au cours du 3^{ème} trimestre de l'année 2001 (Chiu *et al.*, 2002).

Les C3G ont été introduites en thérapie anti-infectieuse au cours des années 1980. La résistance à ces molécules est apparue encore une fois quelques années après, d'abord chez *Klebsiella pneumoniae* et chez *E. coli*, puis chez *Salmonella* à la fin des années 1980 (Miriagou *et al.*, 2004). Tout comme la résistance aux fluoroquinolones, le taux de *Salmonella* résistante aux C3G reste faible avec 1,1% des isolats résistants à la céfotaxime en Europe en 2006 (Tableau III), toutefois, la multiplication des publications sur ce sujet montre une dissémination de la résistance aux C3G à travers le monde, et chez différents sérotypes de *Salmonella*, ainsi qu'une augmentation de la diversité des enzymes mises en cause (Figure 8). Ces résistances sont principalement dues à des β -lactamases à spectre élargi (BLSE) ou à des céphalosporinases (voir partie A.3.c). Entre les années 2000 et 2005 en France, plusieurs cas de salmonelloses humaines dus à une souche de *S. Newport* résistante aux C3G ont été décrits. En 2003, 17,5% de ces isolats de *S. Newport* étaient résistants à ces antibiotiques. Cette souche présentait des similarités avec une souche de *S. Newport* qui sévît aux États-Unis à la fin des années 1990 (Egorova *et al.*, 2008).

Ces problèmes de résistance chez *Salmonella* pourraient conduire au risque de voir se propager une épidémie due à une souche multi-résistante aux antibiotiques, y compris aux C3G et aux fluoroquinolones. Plusieurs cas isolés de salmonelloses dues à de telles souches ont déjà été mis en évidence au cours des dernières années. En 2002, une infection due à *S. Choleraesuis*, n'a pu être traitée à temps à Taiwan. Cette souche était résistante à dix antibiotiques dont le triméthoprim, la ciprofloxacine et le ceftriaxone (C3G) (Chiu *et al.*, 2004). Dans les trois dernières années, deux cas similaires ont été mis en évidence en Belgique et en Australie où des souches multi-résistantes, et porteuses de résistances à ces deux antibiotiques d'intérêts thérapeutiques, ont sévi et dont l'une d'entre elles a conduit à un échec thérapeutique (Collard *et al.*, 2007; Nordmann *et al.*, 2008).

La plupart des cas de salmonelloses étant d'origine alimentaire (notamment par les produits à base de volailles ou d'œufs), la surveillance de la résistance dans les élevages est

Tableau V : Principaux sérotypes de *Salmonella* isolés dans les filières aviaires, bovines et porcines en France entre 2003 et 2006 (FARM, 2006 ; FARM, 2009).

Aviaire				
Rang	2003 (n=8 975)	2004 (n=10 141)	2005 (n=9 241)	2006 (n=7 866)
1	Indiana (16,2%)	Senftenberg (19,7%)	Typhimurium (18,0%)	Senftenberg (17,6%)
2	Senftenberg (15,9%)	Typhimurium (17,1%)	Senftenberg (16,5%)	Typhimurium (15,1%)
3	Typhimurium (13,4%)	Indiana (16,7%)	Indiana (13,6%)	Indiana (13,0%)
4	Kottbus (7,4%)	Kottbus (8,5%)	Kottbus (9,8%)	Kottbus (8,1%)
5	Enteritidis (6,5%)	Enteritidis (4,7%)	Montevideo (7,1%)	Enteritidis (7,6%)

Bovine				
Rang	2003 (n=712)	2004 (n=673)	2005 (n=444)	2006 (n=699)
1	Typhimurium (34,6%)	Typhimurium (35,8%)	Typhimurium (35,8%)	Montevideo (38,9%)
2	Dublin (22,9%)	Montevideo (25,1%)	Montevideo (18,0%)	Typhimurium (15,7%)
3	Montevideo (15,3%)	Dublin (9,3%)	Dublin (9,4%)	Mbandaka (10,0%)
4	Kedougou (4,2%)	Kedougou (5,8%)	Mbandaka (8,6%)	Dublin (6,6%)
5	Enteritidis (2,0%)	Enteritidis (3,9%)	Kedougou (5,6%)	Anatum (5,9%)

Porcine				
Rang	2003 (n=220)	2004 (n=94)	2005 (n=118)	2006 (n=94)
1	Derby (27,7%)	Typhimurium (39,4%)	Typhimurium (26,3%)	Typhimurium (37,2%)
2	Typhimurium (25%)	Derby (19,1%)	Derby (15,3%)	Derby (29,8%)
3	Infantis (23,6%)	Infantis (9,6%)	Manhattan (10,2%)	Infantis (12,8%)
4	Ohio (2,7)	Kedougou (4,3%)	Kedougou (8,5%)	Livingston (9,6%)
5	Anatum (2,7)	Agona (4,3%)	Infantis (8,5%)	Kedougou (3,2%)

une précaution indispensable pour anticiper l'apparition de telles souches ou encore de nouveaux mécanismes de résistance.

c) Résistance aux antibiotiques des *Salmonella* isolées d'élevages

Malgré les recommandations de l'OMS sur l'usage des antibiotiques en élevages, des molécules analogues à celles utilisées en clinique sont toujours utilisées dans certains pays et sont sans doute à l'origine de l'apparition de résistances croisées. Globalement, les mêmes problèmes de résistances aux antibiotiques sont retrouvés chez les souches de *Salmonella* qu'elles soient d'origine animale ou humaine. Ainsi, les souches de *Salmonella* isolées des élevages sont également touchées par la multi-résistance aux antibiotiques et les résistances aux fluoroquinolones et aux C3G. Cependant, des variations existent selon les sérotypes, les types d'élevage et les pays considérés (Foley & Lynne, 2008, EFSA, 2010b). La filière aviaire est la plus touchée par les infections à *Salmonella*, le nombre d'isolats dans cette filière est entre 10 et 100 fois supérieurs à celui des filières bovines ou porcines chaque année. En Europe, en 2008, le sérotype le plus fréquemment isolés chez la volaille était Enteritidis (34,2% en moyenne dans les pays européens) (EFSA, 2010b). Il existe pourtant des variations selon les pays, ainsi en France, les sérotypes Typhimurium, Senftenberg et Indiana sont les plus courants dans la filière aviaire (Tableau V). En Hongrie, le sérotype Infantis était majoritaire avec 68,5% des isolats alors qu'au Pays-Bas, le sérotype Paratyphi B était le plus retrouvé (57,1%) (EFSA, 2010b). Dans les élevages porcins, le sérotype le plus rencontré est Typhimurium (31,5% en Europe) suivi par Derby (13,2%), ces sérotypes sont également les plus incriminés dans les élevages porcins français (Tableau V). Le sérotype Choleraesuis est, quant à lui, le plus présent dans les élevages porcins de certains pays d'Europe de l'est (33,3% en Estonie et en Roumanie). Chez les bovins enfin, les sérotypes Typhimurium et Derby sont également les plus souvent incriminés en Europe alors qu'en France, le sérotype Montevideo est également assez courant dans ces élevages (Tableau V) (EFSA, 2010b). Ces observations sont à peu près les mêmes aux États-Unis, excepté chez les volailles pour lesquelles les sérotypes prédominants sont Heidelberg et Kentucky (Foley & Lynne, 2008).

Les résistances aux antibiotiques chez les *Salmonella* isolées d'élevages dépendent également de la nature de l'élevage et du sérotype en question. Cependant, en Europe et en France, les résistances aux antibiotiques qui entrent dans la composition du phénotype ACSSuT sont les plus courantes dans les trois types d'élevages (Figure 9) (EFSA, 2010a). Ces résistances sont souvent associés entre elles pour former des souches multi-résistantes,

Pourcentage de
souches résistantes (%)

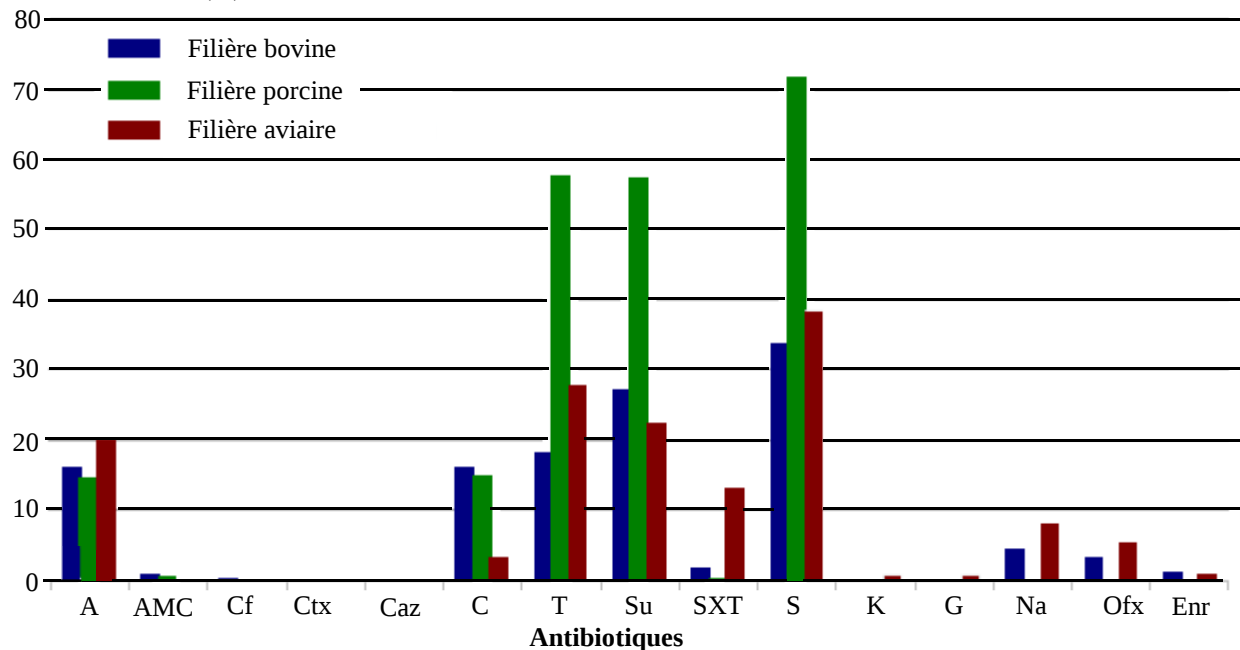


Figure 9 : Résistances aux antibiotiques des souches de *Salmonella* isolées dans les principales filières de production animale en France en 2006. Abréviations : A : amoxicilline, AMC : amoxicilline/acide clavulanique, Cf : céfalotine, Ctx : céfotaxime, Caz : ceftazidime, C : chloramphénicol, T : tétracyclines, Su : sulfamides, SXT : sulfaméthoxazole/triméthoprimine, S : streptomycine, K : kanamycine, G : gentamicine, Na : acide nalidixique, Ofx : ofloxacine, Enr : enrofloxacine ; (FARM, 2009).

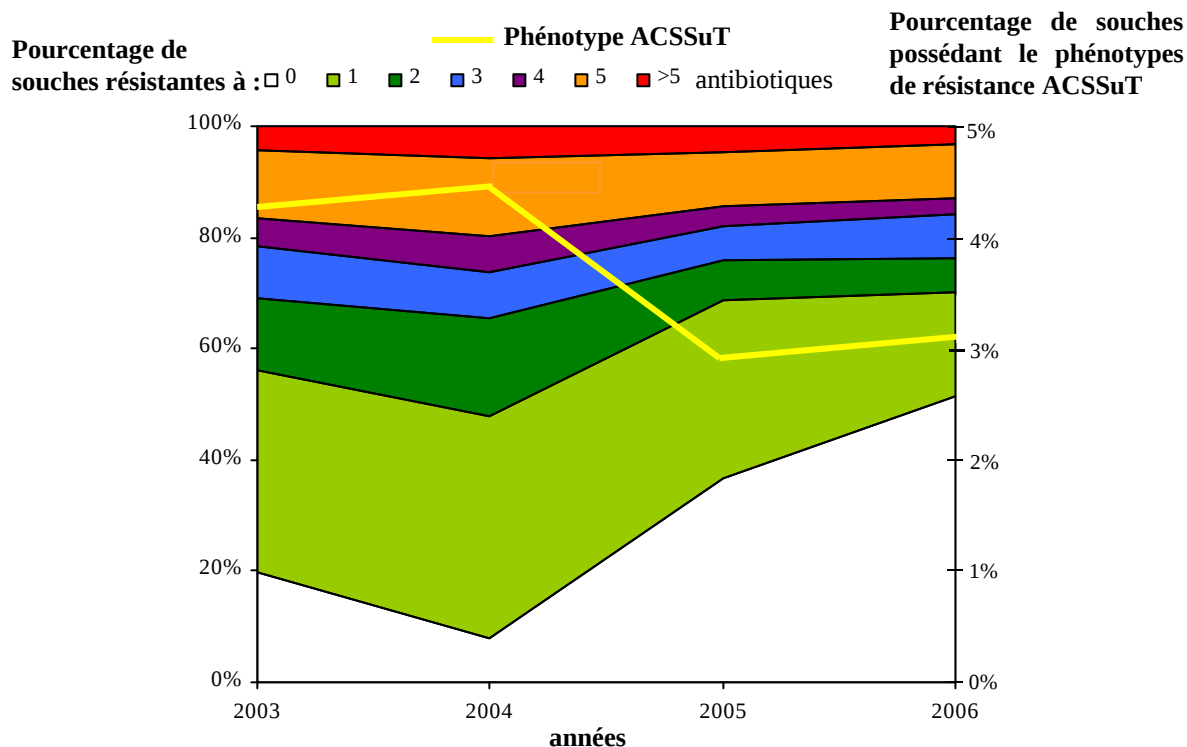


Figure 10 : Évolution du nombre de résistance aux antibiotiques des souches de *Salmonella* isolées dans les principales filières de production animale en France (FARM, 2006 ; FARM, 2009).

même si en France, la proportion d'isolats « multi-sensibles » tend à augmenter ces dernières années (Figure 10). Aux États-Unis, tout élevage confondu, les mêmes résistances sont retrouvées, notamment le phénotype de multi-résistance ACSSuT, toutefois, un fort taux de résistance à l'association amoxicilline/acide clavulanique et au ceftiofur, qui est une C3G réservée à l'usage vétérinaire, a été enregistré depuis le début des années 2000. Cette augmentation est sans doute due à la dissémination d'une BLSE, sur laquelle l'effet inhibiteur de l'acide clavulanique est inefficace (Foley & Lynne, 2008). Comme pour les salmonelloses humaines, les résistances aux C3G, même si elles restent faibles en élevage (aucun cas de résistance à la céftazidime et au céfotaxime en France en 2006, Figure 9), tendent à faire l'objet de plus en plus de publications au cours des dernières années du fait de l'augmentation du nombre d'enzymes responsables de ces résistances (Carattoli, 2008). Enfin, la résistance aux fluoroquinolones est aussi rare en élevage que chez les isolats d'origines humaines. Seules les filières aviaires et bovines ont été concernées en 2006 par un faible pourcentage de résistance à ces antibiotiques (ofloxacine et enrofloxacine), ainsi qu'à l'acide nalidixique (Figure 9).

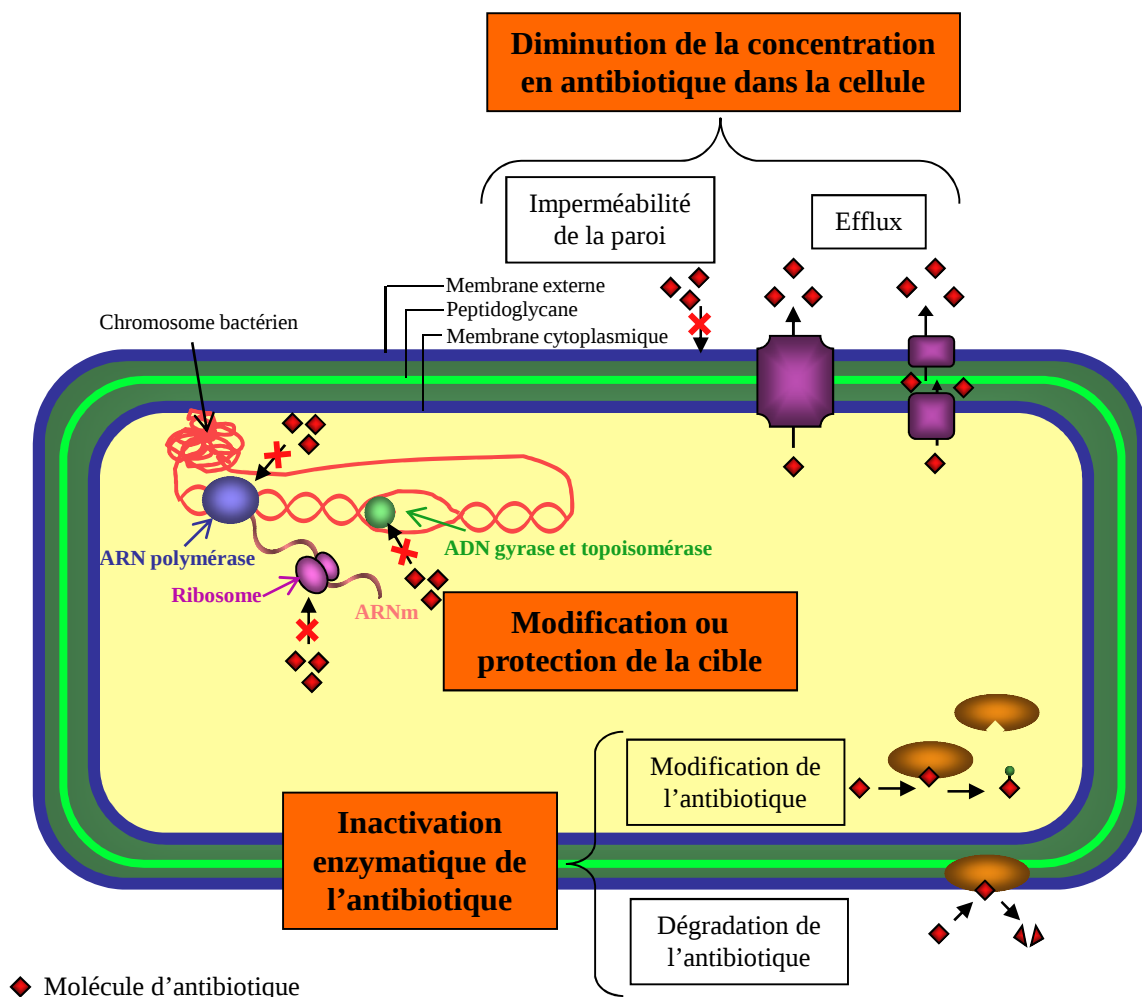


Figure 11 : Principaux mécanismes de résistances aux antibiotiques développés par les bactéries. Les différents mécanismes de résistance sont représentés : la diminution de la concentration en antibiotiques dans la cellule grâce à l'efflux et l'imperméabilité de la membrane, les modifications ou protections de la cible des antibiotiques (l'ADN gyrase et topoisomérase, l'ARN polymérase, et les sous-unités ribosomales) et l'inactivation des antibiotiques par des enzymes membranaires ou cytoplasmiques.

A.3. Mécanismes acquis de résistance aux antibiotiques

Il est nécessaire de différencier les résistances intrinsèques et les résistances acquises aux antibiotiques. Les résistances intrinsèques sont communes à toutes les bactéries d'une espèce. Ces résistances ne sont pas transférables puisqu'elles sont la plupart du temps liées au chromosome bactérien et impliquées dans des processus physiologiques de la bactérie. Les bactéries du genre *Mycoplasma*, dépourvues de paroi bactérienne, sont par exemple naturellement résistantes aux β -lactamines puisque ces antibiotiques inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. Les bactéries à Gram négatif possèdent, quant à elles, une membrane externe qui protège la paroi bactérienne. Cette membrane étant peu perméable, les molécules de grosses tailles comme les glycopeptides ont des difficultés à la traverser et donc à atteindre leur cible (Chaslus-Dancla, 2002). Les résistances intrinsèques n'ont pas toujours des conséquences cliniques mais elles définissent un niveau de résistance basal de la bactérie. À l'inverse, les principaux mécanismes de résistance acquis permettent de conférer un niveau de résistance qui a des conséquences cliniques. Ces mécanismes sont la modification ou protection de la cible de l'antibiotique, l'inactivation enzymatique de la molécule, et la diminution de la concentration de l'antibiotique dans la cellule (Figure 11).

a) Diminution de la concentration en antibiotique

Afin de diminuer l'effet toxique des antibiotiques, un des mécanismes de défense de la bactérie consiste à diminuer la concentration de la molécule dans la cellule à des niveaux sub-toxiques. Pour cela, les bactéries sont capables de modifier la perméabilité de leur membrane externe pour limiter l'entrée des molécules toxiques et elles disposent également de pompes qui permettent d'expulser ces molécules en dehors de la cellule (Figure 11). Ces deux mécanismes ne sont généralement pas spécifiques à une molécule donnée. Bien qu'ils soient souvent intrinsèques, ces modes de résistances peuvent être également acquis par la bactérie suite à des mutations ou par transfert horizontal (Delcour, 2009; Butaye *et al.*, 2003).

La perméabilité de la membrane externe, formée par une bicouche lipidique, dépend principalement du lipopolysaccharide (LPS), principal constituant de la face externe de la bicouche, et des porines, qui sont des protéines formant des canaux à travers la membrane externe (Hancock, 1997). Le LPS et les porines sont impliqués dans l'entrée des antibiotiques dans la cellule : les porines, présentes en grand nombre dans la membrane externe, permettent la diffusion des petites molécules hydrophiles comme les β -lactamines alors que les

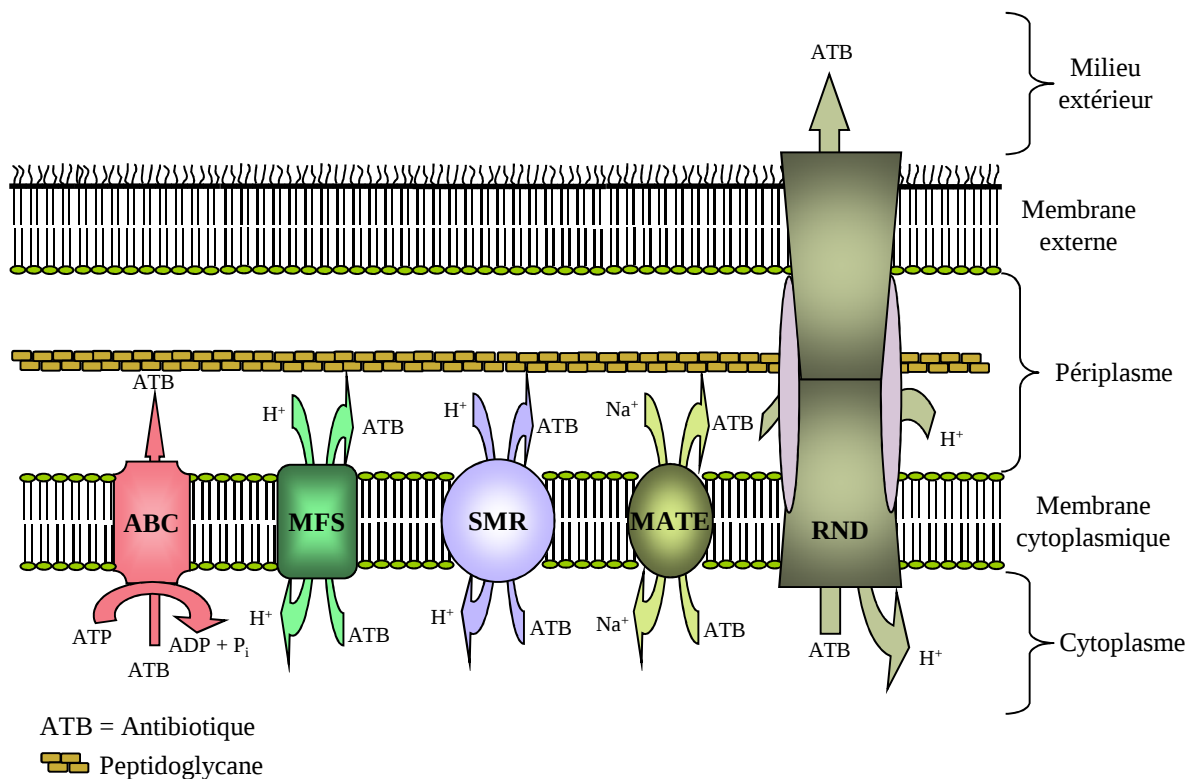


Figure 12 : Structure schématique des principales familles de pompes d'efflux.

Les 5 familles de pompes d'efflux sont représentées : ABC (ATP Binding Cassette), MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion), et RND (Resistance-Nodulation-Division). La plupart fonctionne par antiport de protons (H⁺) ou d'ions sodium (Na⁺), exceptés celles de la famille ABC dont le fonctionnement nécessite l'hydrolyse de molécules d'ATP.

antibiotiques hydrophobes comme les aminosides ou les macrolides se servent du LPS pour entrer dans la cellule. D'autres comme les tétracyclines et les quinolones utilisent les deux systèmes (Delcour, 2009). Le LPS constitue une barrière qui limite l'accès des antibiotiques à la partie interne hydrophobe de la membrane externe. Cette imperméabilité serait due aux cations divalents comme Mg^{2+} ou Ca^{2+} qui neutralisent partiellement les charges négatives portées par le LPS et stabilisent la membrane. Toutefois, les aminosides, comme d'autres molécules polycationiques, sont capables de prendre la place des cations pour favoriser leur propre diffusion à travers la membrane, ainsi que celle d'autres antibiotiques hydrophobes (Hancock, 1997).

Les bactéries sont capables de modifier leur membrane externe pour limiter l'accès des antibiotiques aux autres compartiments cellulaires. Des modifications dans la nature du LPS peuvent entraîner une diminution de leur charge négative. Ainsi, les molécules de LPS se repoussent moins et constituent une couche plus compacte et donc plus imperméable aux antibiotiques hydrophobes (Delcour, 2009). En ce qui concerne les porines, les bactéries sont capables de diminuer leur nombre à la surface et ainsi diminuer l'entrée des antibiotiques hydrophiles. Chez *K. pneumoniae*, le remplacement des porines habituellement exprimées par des porines possédant un pore plus petit contribue à la résistance à certaines céphalosporines de 3^{ème} génération (Delcour, 2009). Cependant, même si la perméabilité de la membrane peut réduire la pénétration des antibiotiques, elle ne permet pas de l'empêcher totalement. La bactérie dispose donc de systèmes d'efflux qui lui permettent de maintenir la concentration des antibiotiques dans la cellule à des niveaux sub-inhibiteurs.

Les systèmes d'efflux peuvent être spécifiques à certains antibiotiques comme ceux du chloramphénicol ou des tétracyclines, mais ils peuvent aussi être multi-drogues lorsqu'ils sont capables de prendre en charge un large spectre de substrats tels que, différentes familles d'antibiotiques, mais aussi des détergents, des solvants et autres substances toxiques pour la cellule (Kumar & Schweizer, 2005). Les systèmes d'efflux sont habituellement regroupés dans cinq familles (Figure 12). La famille ABC (ATP Binding Cassette) est la seule famille de transporteur dépendante de l'apport d'énergie sous forme ATP, alors que les familles MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance), RND (Resistance-Nodulation-Division), et MATE (Multidrug And Toxic compound Extrusion) sont des transporteurs dits secondaires qui fonctionnent par antiport de protons H^+ ou d'ions sodium Na^+ (Kumar & Schweizer, 2005). Les systèmes d'efflux sont retrouvés aussi bien chez les bactéries Gram positif que chez les bactéries Gram négatif, cependant, ils sont plus élaborés

Tableau VI : Principales familles d'antibiotiques, cibles, et modes de résistance associés.

Familles d'antibiotiques	Principales molécules	Cibles	Modes de résistance connus
β -lactamines	Ampicilline (pénicilline), ceftriaxone (céphalosporine), imipénème (carbapénème), aztréonam (monobactame), (acide clavulanique, inhibiteur)	Biosynthèse du peptidoglycane	Inactivation enzymatique, efflux, modification de la cible
Aminosides	Gentamicine, kanamycine, streptomycine	Biosynthèse des protéines	Inactivation enzymatique, efflux, modification de la cible
Phénicolées	Chloramphénicol, florfénicol	Biosynthèse des protéines	Inactivation enzymatique, efflux, modification de la cible
Quinolones	Acide nalidixique, ciprofloxacine (fluoroquinolone)	Réplication de l'ADN	Modification et protection de la cible
Tétracyclines	Tétracycline	Biosynthèse des protéines	Efflux, modification de la cible
Sulfamides	Sulfaméthoxazole	Biosynthèse de l'acide folique	Efflux, modification de la cible
Pyrimidines	Triméthoprim	Biosynthèse des acides nucléiques	Efflux, modification de la cible
Glycopeptides	Vancomycine	Biosynthèse du peptidoglycane	Modification de la cible
Macrolides	Érythromycine	Biosynthèse des protéines	Inactivation enzymatique, efflux
Lincosamides	Clindamycine	Biosynthèse des protéines	Efflux, modification de la cible
Streptogramines	Synercide	Biosynthèse des protéines	Efflux, modification de la cible
Oxazolidinones	Linezolid	Biosynthèse des protéines	Efflux, modification de la cible
Rifamycines	Rifampicine	Transcription	Efflux, modification de la cible
Peptides cationiques	Colistine	Membrane	Modification de la cible, efflux
Lipopeptides	Daptomycine	Membrane	Modification de la cible

chez ces dernières du fait de la plus grande complexité de leur enveloppe cellulaire (Poole, 2004). Parmi les pompes de la famille RND, les systèmes AcrAB-TolC d'*E. coli* et MexAB-OprM de *P. aeruginosa* sont parmi les plus étudiés. Ils sont tout deux constitués de protéines enchâssées dans la membrane cytoplasmique (AcrB et MexB) auxquelles sont associées deux autres protéines : l'une d'elles forme un canal dans la membrane externe (TolC et OprM) alors que l'autre, localisée dans le périplasme (AcrA et MexA), permet de faire le lien entre les deux protéines membranaires (Blair & Piddock, 2009).

Ces transporteurs multi-drogues sont responsables de résistances intrinsèques à diverses familles d'antibiotiques comme les tétracyclines, les phénicolés, les β -lactamines ou les fluoroquinolones (Tableau VI). Toutefois, ces résistances atteignent rarement des niveaux cliniquement significatifs. Pour cela, la pompe doit être surexprimée, les niveaux de résistance peuvent être alors très élevés et aboutir à des phénotypes de multi-résistance (Webber & Piddock, 2003). La surexpression de ces systèmes peut être due à des mutations ou des insertions de séquence (IS) dans les régions régulatrices comme cela a été montré pour la pompe AcrAB-TolC (Abouzeed *et al.*, 2008).

b) Modification et protection de la cible

Outre la diminution de la concentration en antibiotique dans la cellule, une autre stratégie développée par les bactéries consiste à modifier ou protéger la cible des antibiotiques pour éviter leur action toxique (Figure 11).

La modification de la cible est le mécanisme majeur de résistance aux quinolones (Tableau VI). Ces antibiotiques ont pour cible l'ADN gyrase et la topoisomérase IV qui participent à la réplication de l'ADN. Ces deux enzymes sont composées de deux sous-unités, GyrA et GyrB pour l'ADN gyrase, et ParC et ParE pour la topoisomérase IV. Des mutations dans les régions appelées QRDR (Quinolone Resistance Determining Region) des sous-unités GyrA et ParC principalement, sont à l'origine de la résistance aux quinolones (Piddock, 1999). Ces mutations aboutissent à des changements d'acides aminés qui, lorsqu'ils s'accumulent au sein d'un même organisme, provoquent un fort niveau de résistance aux quinolones. Les fluoroquinolones peuvent également être touchées par ce mécanisme de résistance lorsque plusieurs mutations s'accumulent dans ces gènes. Cependant, les isolats les plus résistants associent accumulation des mutations et système d'efflux pour obtenir un haut niveau de résistance aux fluoroquinolones (Piddock, 1999). Toutefois, ces résistances qui sont

dues à des mutations de la cible de l'antibiotique sont rarement transférables et il est très improbable que plusieurs mutations surviennent simultanément dans la même cellule pour donner un phénotype de résistance. Un autre mécanisme de résistance aux quinolones, dû à un groupe de gènes appelé *qnr*, permet d'obtenir une diminution de la sensibilité aux fluoroquinolones (Martinez-Martinez *et al.*, 1998). Cette baisse de sensibilité serait alors suffisante pour permettre à la bactérie de subir les différentes mutations dans les régions QRDR nécessaires pour résister à des concentrations thérapeutiques. Le mécanisme d'action du produit des gènes *qnr* est mal connu, mais ils permettraient de protéger l'ADN gyrase et la topoisomérase de l'action de ces molécules (Strahilevitz *et al.*, 2009). Ces gènes sont la plupart du temps portés par des plasmides, offrant donc aux bactéries, un moyen de résistance aux quinolones transférable par conjugaison (Gunell *et al.*, 2009). Plus récemment, un autre mécanisme transférable entre bactéries, basé sur l'inactivation enzymatique des fluoroquinolones, a également été mis en évidence. Il fait intervenir une enzyme, codée par le gène *aac(6')-Ib*, dont la fonction connue était l'inactivation des aminosides mais pour laquelle, le spectre de substrat semble s'être étendu aux fluoroquinolones (Robicsek *et al.*, 2006).

La modification de la cible est à l'origine de résistances à d'autres familles d'antibiotiques, notamment les sulfamides, le triméthoprim et les glycopeptides (Tableau VI). Pour les deux premiers, des mutations dans l'ADN codant les cibles de ces molécules, la dihydroptéroate synthétase pour les sulfamides et la dihydrofolate réductase pour le triméthoprim, ont permis l'apparition de variants de ces cibles insensibles à l'action de ces deux antibiotiques (Aleksun & Levy, 2007). En ce qui concerne la résistance aux glycopeptides comme la vancomycine, c'est une ligase qui intervient dans la formation du peptidoglycane, cible de ces antibiotiques, qui a une action un peu différente chez les bactéries résistantes. Le produit de sa réaction entraîne une modification du peptidoglycane qui a pour conséquence une diminution de l'affinité de la vancomycine pour sa cible (Aleksun & Levy, 2007). D'autres mécanismes de résistances font appel à des enzymes qui modifient la cible de l'antibiotique. C'est le cas de la résistance aux macrolides, lincosamides et streptogramines B qui agissent sur la sous-unité 23S du ribosome. Des ARN méthylases sont capables de modifier l'ARN ribosomal conférant ainsi une résistance croisée à ces antibiotiques (Aleksun & Levy, 2007). Ces résistances qui sont dues à l'activité d'une enzyme sur la cible de l'antibiotique sont potentiellement transférables comme cela a été

Nombre d'enzymes uniques identifiées

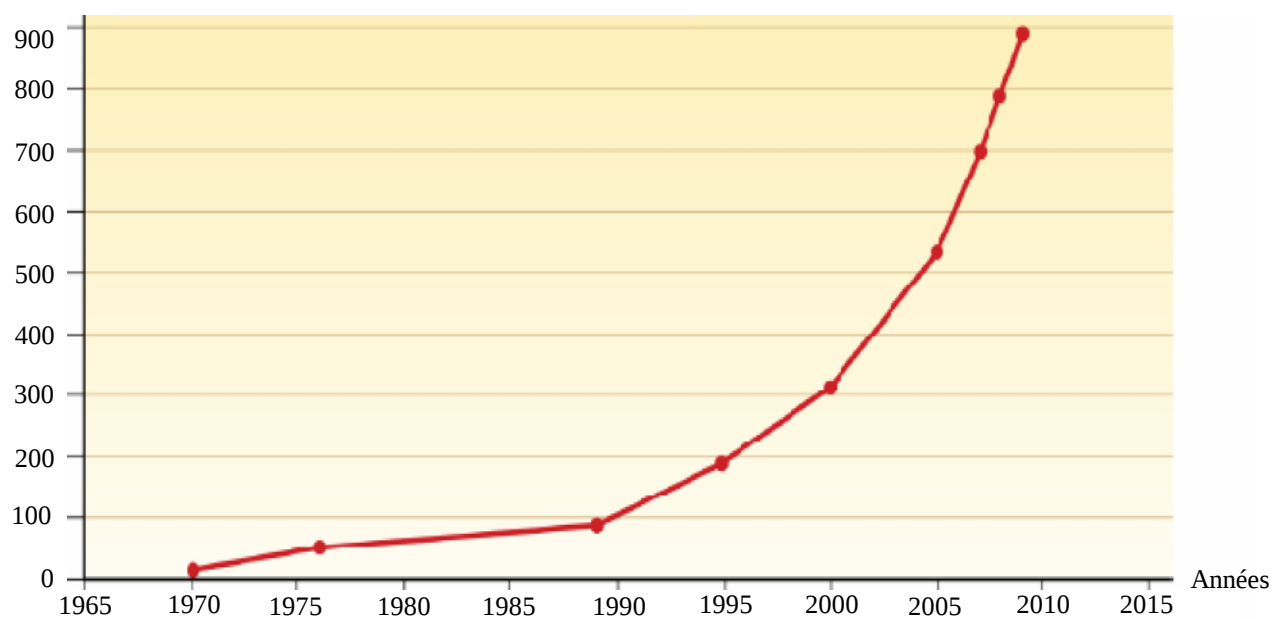


Figure 13 : Évolution du nombre cumulé de β -lactamases uniques identifiées. (tirée de Davies & Davies, 2010).

montré pour la résistance à la vancomycine, dont le gène responsable peut être véhiculé par un plasmide conjugatif (Weigel *et al.*, 2003).

c) Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Le dernier mécanisme majeur de résistance utilisé par les bactéries est l'inactivation de l'antibiotique par des enzymes. Les familles d'antibiotiques touchées par ce mécanisme sont très variées : il concerne une dizaine de familles d'antibiotiques dont les β -lactamines, les aminosides et les phénicolés (Tableau VI). Ces enzymes ont généralement des spectres limités à une famille d'antibiotique voir seulement à certaines molécules d'une famille. Elles agissent soit en détruisant la molécule, soit en la rendant non fonctionnelle par ajout de groupements chimiques (Figure 11) (Wright, 2005).

En ce qui concerne les aminosides, il existe de nombreuses enzymes qui modifient ces molécules pour les rendre inefficaces. Ces enzymes sont regroupées en trois classes selon le radical qu'elles ajoutent à l'antibiotique : les N-acétyltransférases (AAC), les O-nucléotidyltransférase (ANT), et les O-phosphotransférases (APH). Elles sont ensuite classées en fonction de la position modifiée sur la molécule, et selon leur spectre d'activité : les AAC peuvent modifier plusieurs molécules de la famille des aminosides (tobramycine, gentamicine, amikacine,...) alors que les APH ont une action limitée à l'amikacine (Wright, 2005). Les phénicolés, notamment le chloramphénicol, sont également inactivés par des enzymes. Les Chloramphénicol Acétyl Transférases (CAT) sont les principales responsables de la résistance au chloramphénicol. Elles agissent en acétylant des groupements hydroxyl empêchant ainsi le chloramphénicol d'inhiber la synthèse protéique. Le florfénicol qui possède un atome de fluor sur un des carbones-cibles de la CAT est insensible à son action. Il existe deux types de CAT, qui diffèrent par leur séquence et par leur structure, et qui ne semblent donc pas reliées entre elles (Wright, 2005).

Enfin le dernier exemple de résistance par inactivation enzymatique de la molécule concerne les β -lactamines. Il s'agit du principal mécanisme de résistance contre cette famille d'antibiotiques. En effet, des centaines de β -lactamases ont été identifiées depuis la première, mise en évidence peu après l'introduction de la pénicilline (Figure 13) (Bush & Jacoby, 2010). Leur spectre d'activité est variable, les β -lactamines étant une famille d'antibiotiques très diversifiée comprenant différentes classes de molécules (les pénicillines, les céphalosporines, les carbapénèmes, les monobactames). Certaines β -lactamases confèrent une

résistance à seulement une classe d'antibiotiques (enzyme PC1 contre les pénicillines) alors que d'autres comme les BLSE (TEM-10 ou CTX-M par exemple) permettent de résister à plusieurs classes de β -lactamines comme les céphalosporines et les pénicillines. Des inhibiteurs de β -lactamases comme l'acide clavulanique ont été développés pour augmenter le spectre d'action d'un antibiotique en empêchant la dégradation de celui-ci par la β -lactamase. Cependant, il existe des enzymes insensibles à leur action comme CMY-2 (Bush & Jacoby, 2010). La dernière β -lactamase mise en évidence, codée par le gène *bla_{NDM-1}*, permet de résister à quasiment toutes les β -lactamines, excepté à l'aztréonam (monobactame). Cependant, il est souvent associé à d'autres gènes de résistance dont les produits permettent d'inhiber l'action de l'aztréonam, mais aussi de conférer une résistance à beaucoup d'autres familles d'antibiotiques (Yong *et al.*, 2009; Moellering, 2010). A l'instar de ce gène, *bla_{NDM-1}*, retrouvé sur un plasmide chez plusieurs genres d'entérobactéries (Kumarasamy *et al.*, 2010), la plupart des résistances causées par une inactivation enzymatique sont portées sur des éléments génétiques mobiles, et donc potentiellement transférables entre bactéries (Alekshun & Levy, 2007).

Comme le chapitre suivant le montrera, ces éléments génétiques mobiles sont très variés et sont grandement responsables de la dissémination de ces gènes de résistance à travers le monde bactérien.

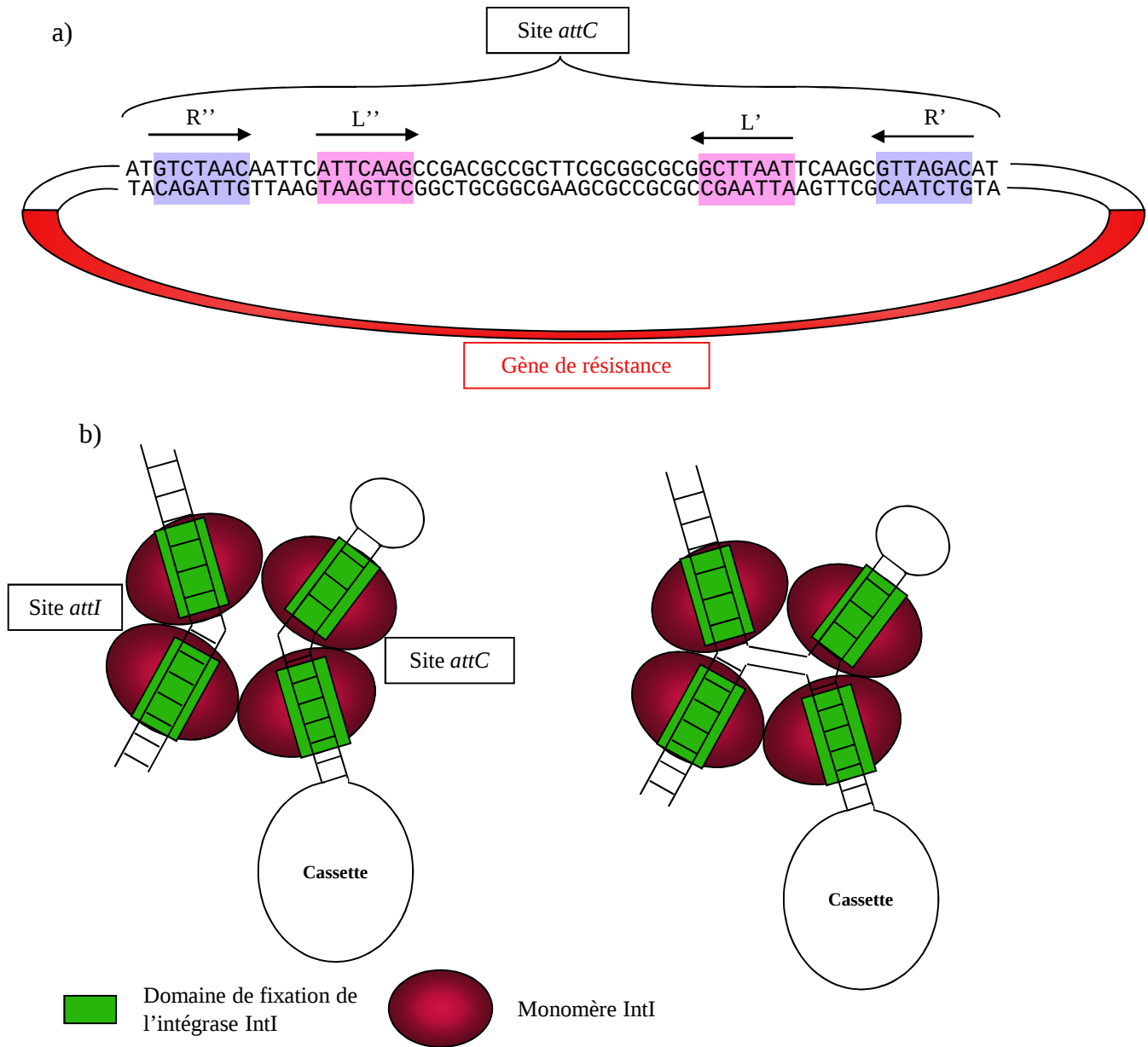


Figure 14 : Mécanisme d'intégration de cassette au niveau d'un site *attI*. a) Représentation de la cassette comprenant le gène *aadA7* et son site *attC*, les flèches représentent les séquences répétées inversées qui permettent la formation de structures secondaires. b) Représentation de la recombinaison réalisée par l'intégrase IntI, entre le site *attI* et le site *attC* représenté par sa structure secondaire (adaptée de Mazel, 2006).

B. Les éléments génétiques mobiles : outils de dissémination de la résistance aux antibiotiques

Les éléments génétiques mobiles, identifiés et étudiés depuis le milieu du XX^{ème} siècle, jouent un rôle considérable dans l'adaptation et l'évolution des bactéries. Comme cela a été vu dans la partie précédente, ils sont capables de véhiculer un grand nombre de gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques, mais aussi dans le métabolisme ou encore la pathogénicité. Ils peuvent également être responsables de variations dans le génome, certains éléments génétiques mobiles pouvant en effet causer des inversions, des délétions ou des inactivations/activations de gènes lorsqu'ils sont capables de se déplacer à l'intérieur même d'un génome. Cette partie présente les différents types d'éléments mobiles : ceux capables de se déplacer entre les réplicons d'une même cellule (chromosome et plasmides), il s'agit alors de mobilité intra-cellulaire, et ceux capables de se déplacer entre les bactéries, permettant ainsi une mobilité inter-cellulaire. Enfin, l'îlot génomique SGI1 de *Salmonella*, qui est un élément intégratif mobilisable (IME), sera abordé plus en détail.

B.1. Les éléments génétiques responsables de la mobilité intra-cellulaire

a) Le système intégron-cassettes de gènes

Les intégrons ne sont pas des éléments mobiles à proprement parler mais ils permettent l'intégration à un des réplicons de la cellule de cassettes de gènes qui, elles, sont mobiles. Lorsqu'elles sont libres, les cassettes de gènes existent sous forme circulaire et sont généralement constituées uniquement d'un gène et d'un site *attC* impliqué dans la recombinaison avec l'intégron (Figure 14a). Grâce à un système de recombinaison site-spécifique (Figure 14b), les cassettes de gènes sont intégrées et exprimées par l'intégron (Recchia & Hall, 1995). Plusieurs centaines de cassettes de gène ont été décrites, beaucoup d'entre elles sont responsables de résistances à différentes familles d'antibiotiques comme les β -lactamines, les aminosides, les phénicolés et le triméthoprim (Recchia & Hall, 1995),

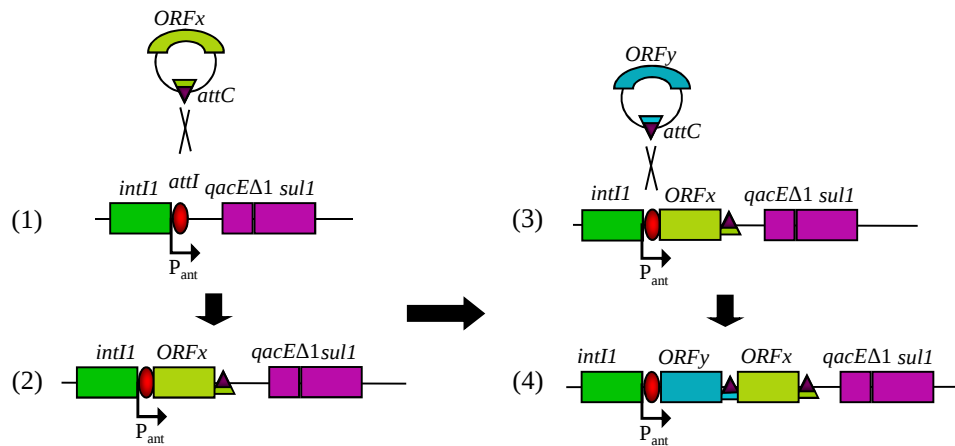


Figure 15 : Acquisition de cassettes de gène par les intégrons de résistance.

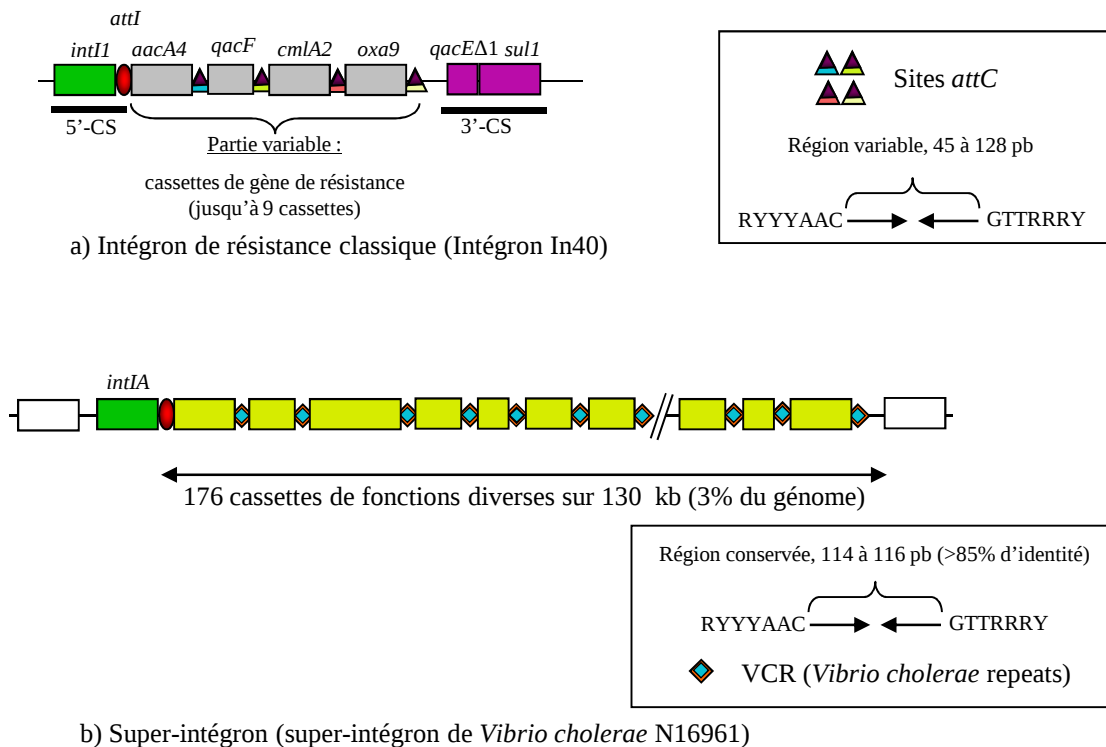


Figure 16 : Comparaison structurale d'un intégron de résistance et d'un super-intégron.

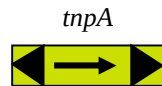
R = purines, nucléotides A ou G, et Y = pyrimidine, nucléotides T ou C (tirée de Mazel, 2006).

d'autres apportent diverses fonctions comme des toxines, ou des éléments de pathogénicité ou de métabolismes (Fluit & Schmitz, 2004).

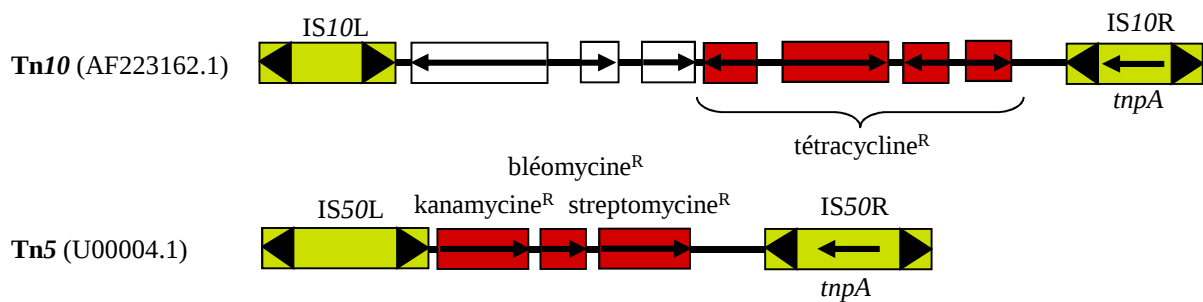
Lors de leurs identifications, plusieurs classes d'intégrons ont été définies, principalement en fonction du pourcentage d'homologies de leurs intégrases, l'enzyme responsable de l'intégration des cassettes, et de quelques différences structurales. Cependant, les mêmes cassettes, comprenant essentiellement des gènes de résistance aux antibiotiques, peuvent être insérées dans ces différentes classes d'intégrons et leurs intégrases sont interchangeables, si bien que dans la littérature, ces éléments ont été regroupés dans un même groupe dit des « intégrons de résistance » (Fluit & Schmitz, 2004). Parmi les intégrons de résistance, les intégrons de classe I sont les plus répandus. Ils possèdent deux segments conservés, 5'-CS et 3'-CS, qui encadrent la partie variable où viennent s'intégrer les cassettes de gène (Figures 15 et 16a). Le segment 5'-CS contient le gène codant l'intégrase *IntI1*, la région promotrice *P_{ANT}*, responsable de l'expression des gènes insérés dans la partie variable et le site de recombinaison *attI1* avec lequel le site *attC* des cassettes interagit lors de l'intégration ou de l'excision des cassettes. Le segment 3'-CS est la plupart du temps constitué des gènes *qacEΔ1* et *sul1* qui codent respectivement des résistances aux ammoniums quaternaires et aux sulfamides. Ces intégrons peuvent contenir de 1 à 9 cassettes, cependant, l'expression des gènes est dépendante de la distance qui les sépare du promoteur du segment 5'-CS, les gènes les plus éloignés étant moins exprimés (Partridge *et al.*, 2009). Les autres classes d'intégrons de résistance sont beaucoup moins courantes. Outre les différences d'homologie au niveau de l'intégrase, elles diffèrent de la classe I par l'absence de la région 3'-CS. Ces intégrons n'ont été identifiés que dans quelques cas : les intégrons de classe II dans le transposon Tn7 et des transposons reliés, et un seul intégron de classe III a été identifié dans un transposon de la famille Tn5053 (Partridge *et al.*, 2009). Les intégrons de résistance sont souvent les vecteurs de multi-résistance aux antibiotiques puisqu'ils peuvent être à l'origine de la formation de cluster de résistance. Ils sont immobiles par définition, mais la plupart ont été identifiés sur des éléments mobiles, tels que des transposons, des plasmides, ou des ICE (Mazel, 2006).

Tous ces intégrons constituent la première grande famille, la seconde est formée par les super-intégrons localisés sur le chromosome de plusieurs genres de bactéries (*Vibrio*, *Xanthomonas*, *Shewanella*, *Pseudomonas*) (Figure 16b). A la différence des premiers, ces super-intégrons ne sont généralement pas localisés sur des éléments mobiles. Leur intégrase ne présente qu'environ 45% d'homologies avec celle des intégrons de résistance de classe I et ils diffèrent également des intégrons de résistance par le nombre et la nature des cassettes

Les séquences d'insertion IS



Les transposons composites



Les transposons non composites

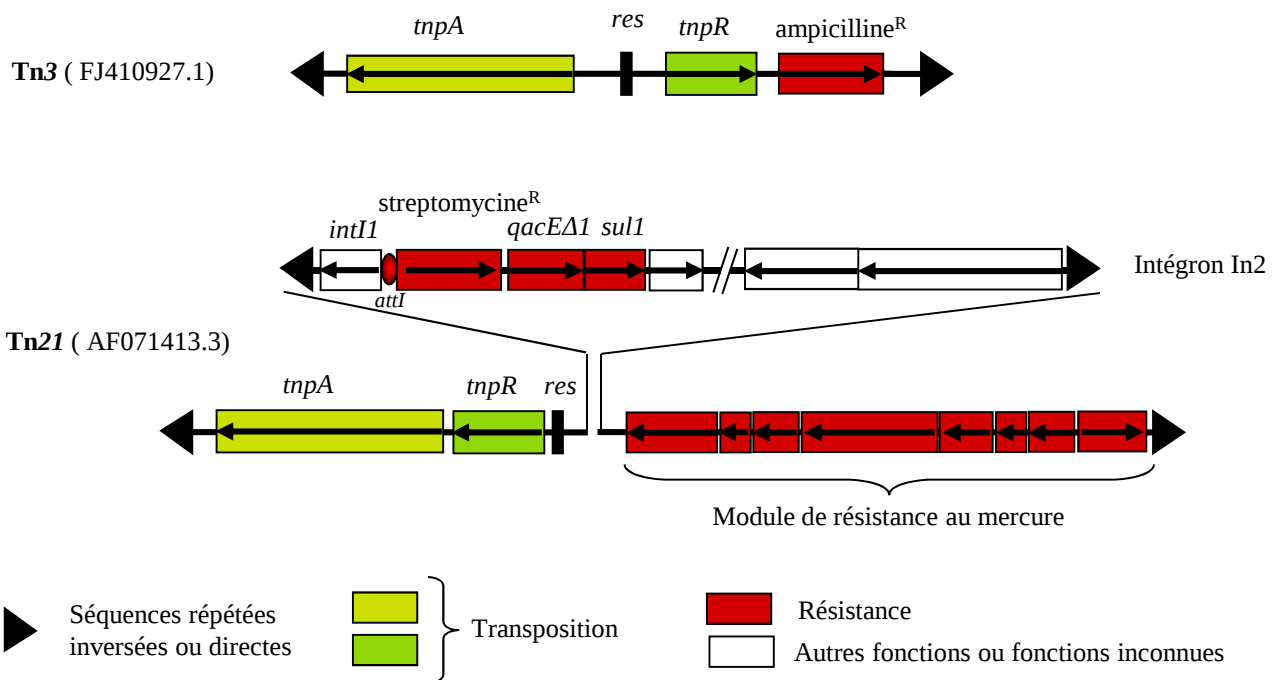


Figure 17 : Exemples d'organisations génétiques d'une séquence d'insertion et de quelques transposons non conjugatifs.

qu'ils peuvent contenir. Ces super-intégrons peuvent en effet contenir plus d'une centaine de cassettes possédant des séquences répétées différentes de la séquence *attC* des cassettes présentes dans les intégrons de résistance, mais très conservées au sein d'un même super-intégron (Figure 16b). La fonction de la majorité de ces cassettes est souvent inconnue, pour les autres, leurs fonctions (virulence, production de toxines, métabolismes, résistance aux antibiotiques) procurent souvent un avantage adaptatif à la bactérie (Mazel, 2006, Fluit & Schmitz, 2004).

Toutefois, ce système de classification ne fait pas encore l'unanimité puisque, entre autres, des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être retrouvés parmi les cassettes des super-intégrons (Hall & Stokes, 2004). Une autre classification en fonction de leur mobilité pourrait également être faite, différenciant ainsi les intégrons pouvant être mobiles des super-intégrons immobiles (Mazel, 2006).

b) Les éléments transposables

Les séquences d'insertion et les transposons sont les principaux éléments mobiles à l'intérieur d'une cellule. Ils sont capables de se déplacer entre les réplicons de la cellule ou au sein d'un même réplicon, pouvant ainsi causer divers réarrangements génétiques comme des insertions, des délétions, ou des inversions de l'ADN. Les séquences d'insertion (IS) (Figure 17) sont une grande famille d'éléments mobiles comprenant plus de 700 membres, identifiés aussi bien chez les procaryotes que chez les eucaryotes. La séquence d'insertion est l'unité transposable élémentaire, elle est simplement constituée de deux séquences répétées inversées (IR) entourant un gène codant l'enzyme nécessaire à sa propre transposition, la transposase. Les séquences IR sont des sites de reconnaissance et de fixation de la transposase, dont l'interaction initie la coupure, l'excision et la transposition de la séquence ADN au niveau d'une séquence-cible, la spécificité de la cible dépendant de l'IS en question. La transposition peut être rélicative lorsque le transfert est accompagné d'une réplication simultanée de l'IS, ou conservative quand le transfert de l'IS restaure la séquence-cible originale (Mahillon & Chandler, 1998). Lorsque deux IS s'associent, elles peuvent former un transposon composite (ou transposon de classe I) (Figure 17) capable de se déplacer par recombinaison entre les deux IS. Si ces dernières encadrent des gènes, notamment des gènes de résistance, elles sont alors capables de les véhiculer entre les réplicons de la cellule. Ce mécanisme de mobilité permet entre autre de déplacer des gènes de résistance à la tétracycline, au chloramphénicol ou à la kanamycine par exemple, grâce aux transposons

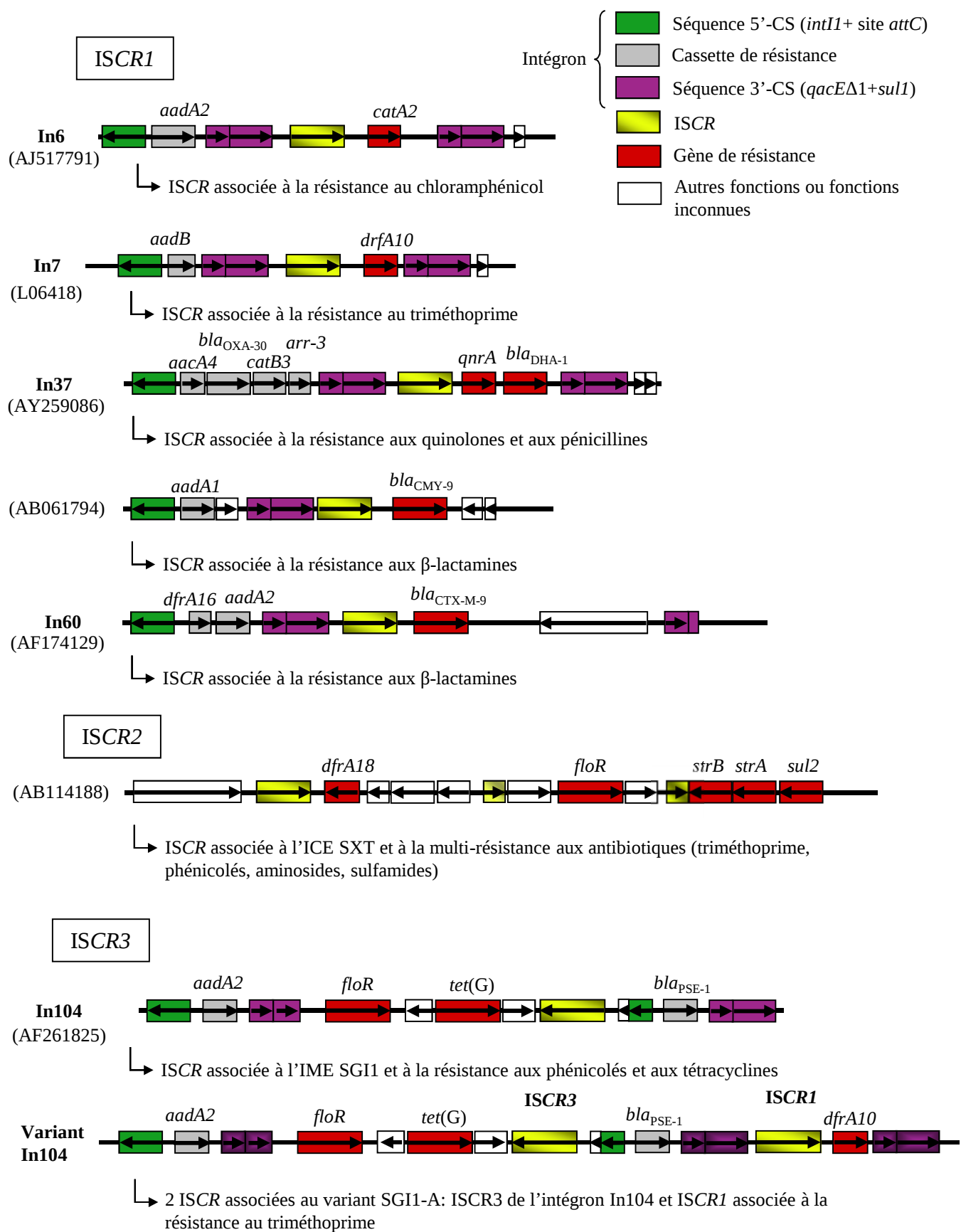


Figure 18: Diversité des gènes de résistance aux antibiotiques associés aux ISCR.

Tn10, Tn9 et Tn5 respectivement (Mahillon & Chandler, 1998). La deuxième catégorie de transposons, les transposons non composites (ou transposons de classe II) (Figure 17) ont un fonctionnement assez différent. N'étant pas constitué d'IS, ils sont délimités par des séquences répétées inversées (IR) de 35 à 48 pb, qui permettent la transposition. Ils contiennent au moins deux gènes (*tnpA* et *tnpR*) codant une transposase et une résolvase qui interagissent avec les IR pour induire le phénomène de transposition. Outre ces deux gènes, ils peuvent contenir une multitude de gènes, dont des gènes impliqués dans la résistance aux antibiotiques entre autres, la taille de ces transposons pouvant aller jusqu'à 70 kb (Grindley, 2002).

D'autres transposons, plus complexes, seront abordés dans la partie B.2. Ces transposons non composites étant également capables de mobilité inter-cellulaire, ils possèdent des caractéristiques différentes des transposons abordés ici.

c) Le cas particulier des intégrons complexes et des ISCR

Les régions CR (Common Regions) sont des séquences ADN mises en évidence dans les années 1990 à proximité d'intégrons de résistance de classe I dits complexes (Stokes *et al.*, 1993). Ces intégrons complexes sont constitués d'une séquence 5'-CS et de deux séquences 3'-CS (Figure 18). La séquence 5'-CS et la première 3'-CS forment un intégron classique, avec une ou plusieurs cassettes intégrées dans la partie variable. La région CR a été retrouvée en aval de cet intégron classique, et en amont de la seconde séquence 3'-CS (Figure 18) (Stokes *et al.*, 1993). L'intérêt suscité par ces régions CR a grandi depuis le début du XXI^{ème} siècle lorsque leur lien avec la mobilité des gènes de résistance a été suspecté (Partridge & Hall, 2003). En effet, entre la région CR et la seconde séquence 3'-CS, des gènes de résistance à différentes familles d'antibiotiques, comme les β -lactamines, les aminosides, les quinolones, les phénicolés ou les tétracyclines, ont été identifiés (Figure 18). A la différence des cassettes, ces gènes ne sont pas pourvus de site *attC* permettant leur intégration. La séquence CR possède en général un unique cadre de lecture de 2 kb environ correspondant à l'ORF513 (initialement nommée ORF341, (Stokes *et al.*, 1993)) (Partridge & Hall, 2003). Les recherches d'homologies nucléotidiques et protéiques ont amené à suspecter que le produit de cette ORF pourrait être une transposase, bien que l'identité ne soit pas forte, des motifs d'acides aminés caractéristiques des transposases de la famille de l'IS91 ont été identifiés dans le produit du gène codé par ces régions CR (Cloeckaert *et al.*, 2000a; Toleman *et al.*, 2006). Une autre caractéristique des IS de la famille IS91 a été retrouvée dans la région CR et

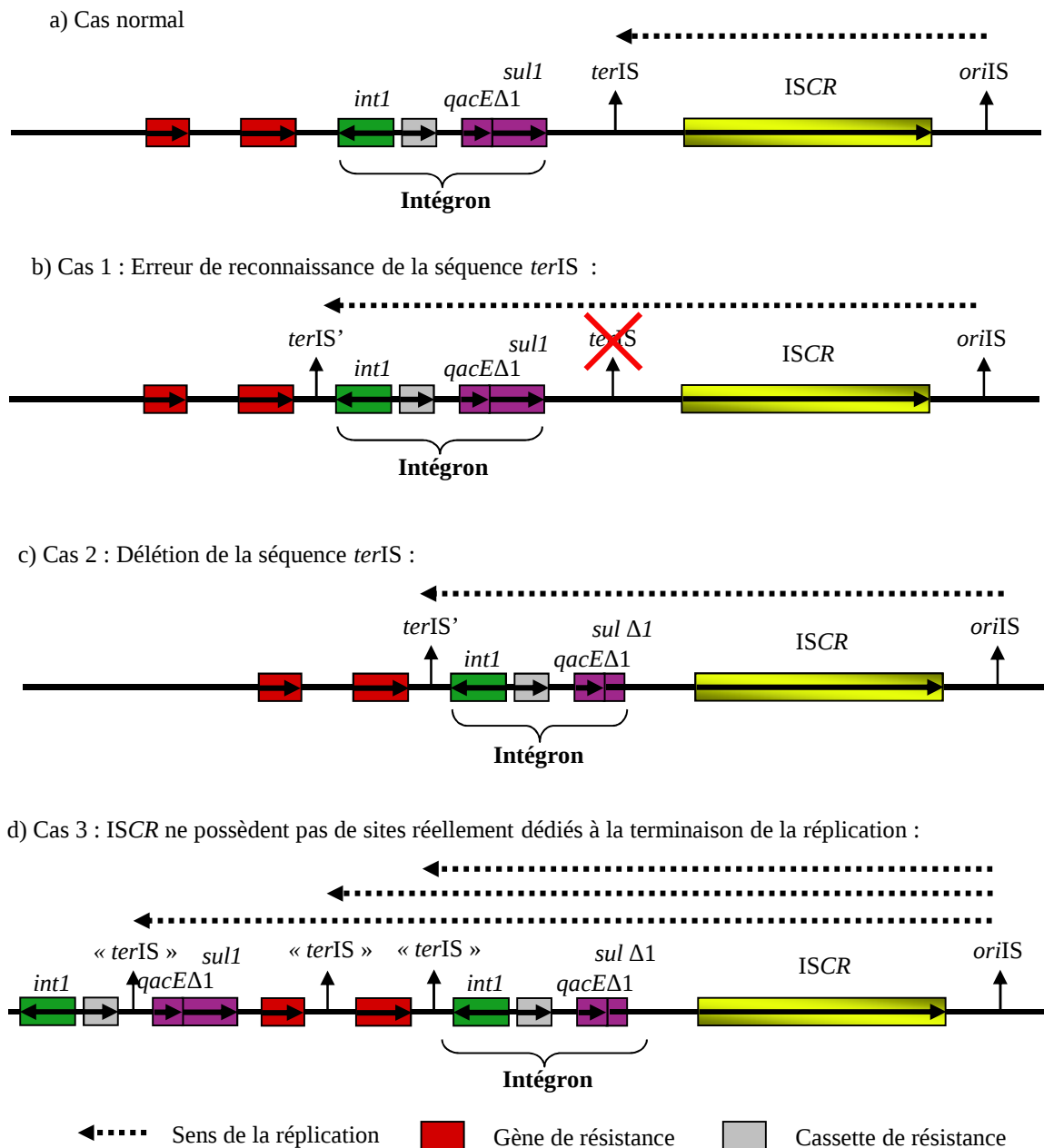


Figure 19 : Mécanisme de transposition réplcatif supposé des séquences ISCR. Le modèle est basé sur celui des éléments génétiques de la famille de l'IS91. a) la transposase codée par l'ISCR permet la transposition et la réplication simultanée en cercle roulant de l'élément grâce aux séquences *oriIS* et *terIS*. b) à la manière de l'IS91, la transposase ne reconnaîtrait pas tout le temps la séquence *terIS* et répliquerait l'ADN adjacent jusqu'à une séquence *terIS* alternative. D'autres hypothèses sur le fonctionnement peuvent cependant être faite : c) la délétion d'une région d'ADN contenant *terIS* et une partie du gène *sul1* obligerait la transposase à reconnaître une séquence *terIS* alternative. d) Les ISCR ne possèdent peut-être pas de véritable séquence *terIS*, la terminaison de la réplication serait alors aléatoire (adaptée de Toleman *et al.*, 2006).

a conduit à les considérer comme des éléments transposables : cette région CR possède une séquence fortement similaire à la séquence *oriIS* qui sert d'origine de répllication à l'IS91, et une séquence légèrement similaire à la séquence *terIS* qui permet la terminaison de la répllication de l'IS91 (Toleman *et al.*, 2006). En effet, l'IS91 et les séquences d'insertions proches (IS801 et IS1294) possèdent un mécanisme de transposition associé à une répllication en cercle roulant comme les plasmides ou les phages (Garcillan-Barcia, 2002). Comme pour les IS de la famille IS91, la transposition en cercle roulant des CR serait réalisée par la transposase codée par l'élément. La transposase reconnaîtrait les séquences *oriIS* et *terIS* présentes à chacune de ces extrémités pour induire la transposition et la répllication de l'élément. Ces ressemblances ont conduit à renommer ces régions ISCR et à les incorporer dans la famille de la transposase IS91 (Toleman *et al.*, 2006). A ce jour, 22 ISCR ont été mises en évidence (Schleinitz *et al.*, 2010). Comme cela a été montré notamment pour l'IS1294 (Tavakoli *et al.*, 2000) et l'IS91 (Mendiola *et al.*, 1994), dans 1 à 10% des cas, la transposase ne reconnaîtrait pas la séquence *terIS* et donc mobiliserait en même temps, une séquence ADN adjacente. Les séquences ISCR auraient le même défaut qui pourrait être à l'origine de la formation des intégrons complexes bien que cette hypothèse n'ait jamais été vérifiée expérimentalement, d'autres hypothèses ont également été faites sur leur fonctionnement (Figure 19) (Toleman *et al.*, 2006). Les ISCR seraient alors un outil puissant de mobilisation d'ADN qui, contrairement aux intégrons, n'aurait pas besoin d'être sous forme de cassette (Toleman *et al.*, 2006).

B.2. Les éléments génétiques responsables de la mobilité inter-cellulaire

a) Les plasmides

Les plasmides sont les principaux éléments de la bactérie impliqués dans les transferts horizontaux, notamment dans la conjugaison bactérienne. En dehors du chromosome bactérien, ces éléments circulaires d'une taille variable (quelques kb à plusieurs centaines de kb) sont les seuls capables de se répliquer de manière autonome grâce à leur origine de répllication. Ils sont présents en nombre de copies variables, d'une à plusieurs centaines de copies selon le plasmide en question. Ils possèdent pour cela des systèmes leur permettant de contrôler leur nombre de copies et d'assurer leur transmission aux cellules-filles lors des divisions cellulaires (Novick, 1987). Les plasmides sont généralement facultatifs, les

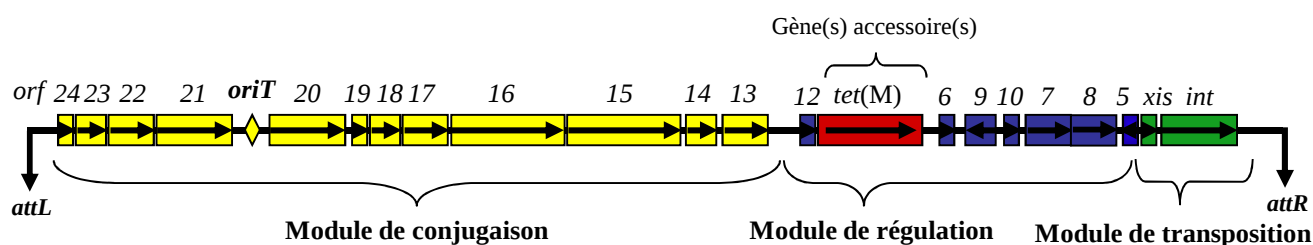
Tableau VII : Groupes d'incompatibilités présents chez les entérobactéries.

Groupes	Plasmides	Profils de résistances	Groupes	Plasmides	Profils de résistance
IncA/C	RA1	SuT	IncHII	pHH1508a	STmTe
	pIP40a	AKSuHg	IncI1	R64	ST
	R55	ACGKSu		R483	STm
	R16a	AKSu	IncI2	R175	A
IncB/O	R16	ASSuT		pHH721	STm
	R16-1	SSu	IncIy	R621a	T
IncD	R711b	K	IncJ	R391	KNmHg
IncFI	F	Ø	IncK	R387	CS
	R386	T	IncL/M	R69	AKTHg
	R455	ACSSuTHg		R446b	ST
IncFII	R1	ACKSSu	IncN	R46	ASSuT
	R1-16	K		RPC3	KSPm
IncFIII	Col B-K98	Ø	IncP	RP1, RP4	AKT
IncFIV	R124	T		R702	KSSuTHg
IncFV	pED208	Ø	IncQ	RSF1010	SSu
IncFVI	pSU104	Ø	IncT	R401	ASHg
IncFVII	pSU233	Ø		Rts1	K
IncHI1	pIP522	CSSu	IncU	RA3	CSSu
	R27	T	IncV	R753	ACSSu
	R726	CSSuT	IncW	R388	SuTm
IncHI2	R478	CKTHgTe		RS-a	CGKSSuTo
	R826	ACGKSTHgTe	IncX	R6K	AS
IncHI3	MIP233	SuTe	IncY	P1Cm	C

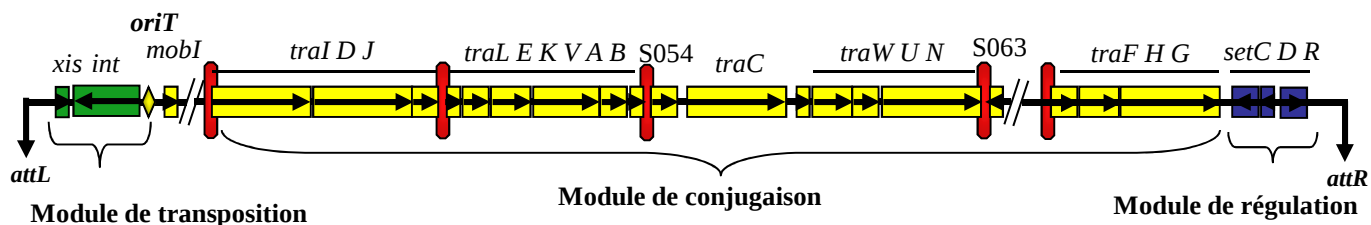
A : ampicilline, C : chloramphénicol, G : gentamicine, Hg : mercure, K : kanamycine, Nm : néomycine, Pm : paramomycine, S : streptomycine, Su : sulfamides, T : tétracyclines, Te : tellurium, Tm : triméthoprine, To : tobramycine

informations génétiques qu'ils véhiculent sont rarement indispensables à la vie de la cellule. Cependant, ces informations génétiques procurent souvent un avantage pour la survie de la bactérie, allant de la résistance aux produits toxiques (antibiotiques, métaux lourds) à des capacités métaboliques accrues, en passant par une augmentation de la virulence. Les plasmides peuvent alors être dits de virulence ou de résistance selon les fonctions qu'ils apportent à la bactérie, bien qu'un plasmide de virulence puisse posséder des gènes de résistance, et *vice versa* (Bennett, 2008). Le grand nombre de plasmides identifiés a conduit à adopter un système de classification (Tableau VII). Cette classification est basée sur l'observation que, lorsqu'un plasmide était introduit dans une cellule qui possédait déjà un autre plasmide, les deux plasmides pouvaient ou non cohabiter dans la même cellule de manière stable au cours des divisions cellulaires : cette observation a abouti à la notion d'incompatibilité plasmidique. La classification des plasmides est basée sur ces groupes d'incompatibilité, les plasmides appartenant à un même groupe ne pouvant pas se maintenir de manière stable dans la même lignée cellulaire (Couturier *et al.*, 1988). L'incompatibilité des plasmides est une conséquence de la similarité, entre les plasmides d'un même groupe, de certaines fonctions responsables du maintien des plasmides dans une lignée cellulaire, notamment le système de répllication, et le système de partition. Ce dernier permet de positionner les copies d'un plasmide de manière à ce que chaque cellule-fille hérite d'une de ces copies. La présence dans la même cellule de deux plasmides d'un même groupe crée des interférences dans la répllication et la partition de ces plasmides qui aboutit à l'élimination de l'un d'entre eux. (Novick, 1987). Chez les entérobactéries, 29 groupes d'incompatibilités sont représentés, dont les groupes IncFII, IncA/C, IncL/M et IncI1 particulièrement impliqués dans la résistance aux antibiotiques (Tableau VII). Les plasmides, quelque soient leur groupe d'incompatibilité, sont porteurs de résistances à beaucoup, voir à tous les antibiotiques d'importance clinique (toutes les classes de β -lactamines, les aminosides, les quinolones, etc.) et sont susceptibles de transférer ces résistances à n'importe quelle famille de bactéries (Bennett, 2008). Cependant, le spectre d'hôte des plasmides dépend également du groupe d'incompatibilité en question. Les plasmides du groupe IncF sont limités aux entérobactéries, donc des gènes de résistance plasmidiques comme *bla*_{CTX-M-15}, responsable de résistances aux C3G et véhiculé par un plasmide du groupe IncF, ont peu de chance d'être retrouvés ailleurs que chez des entérobactéries (Carattoli, 2009). La situation inverse est également possible : par exemple, le gène *bla*_{OXA-58}, codant une carbapénèmase, a été localisé sur un plasmide présent chez *Acinetobacter baumannii*, de groupe d'incompatibilité non défini, et qui ne serait pas capable de se répliquer chez *E. coli* (Poirel *et al.*, 2005). A l'inverse, les gènes retrouvés

Tn916 (EF432727.1)



SXT-R391



Sites d'insertions de segments d'ADN qui différencient les ICE de la famille SXT-R31

Figure 20 : Modules communs aux ICE, exemple de Tn916 et des ICE de la famille SXT-R391.

Tous les éléments génétiques considérés comme ICE possèdent les trois modules identifiés dans cette figure (conjugaison, régulation, transposition) et sont délimités par des séquences *attL* et *attR*.

sur des plasmides de groupes tels que IncP ou IncQ pourraient être transférés à plusieurs familles de bactéries, et même chez des bactéries Gram positif, puisque ces groupes d'incompatibilités possèdent un large spectre d'hôtes (Carattoli, 2009).

Bien qu'il existe des plasmides non mobiles, ces éléments génétiques sont les premiers dont le transfert conjugatif a été mis en évidence et étudié. Les mécanismes de conjugaison des plasmides sont donc les mieux caractérisés et servent de base pour comprendre la mobilité des autres éléments conjugatifs comme les ICE.

b) Les éléments intégrés et transférables

Jusqu'au début des années 1980, les plasmides étaient considérés comme les seuls vecteurs d'informations génétiques par transfert conjugatif entre deux bactéries. Cependant, c'est à cette période que fut mis en évidence Tn916, un transposon capable de s'exciser du chromosome bactérien pour se transférer à une autre bactérie, sans l'aide de plasmide conjugatif, et capable de s'intégrer au chromosome de la bactérie réceptrice (Figure 20) (Franke & Clewell, 1981). Ce transposon fut le premier élément d'une nouvelle classe d'éléments mobiles, les transposons conjugatifs. Par définition, ces éléments sont capables de mobilité intra-cellulaire non site-spécifique à la manière des transposons classiques et de mobilité inter-cellulaire comme les plasmides (Salyers *et al.*, 1995). Cependant, depuis la caractérisation de Tn916 et de nombreux autres transposons conjugatifs, des éléments mobiles similaires mais possédant une spécificité d'intégration ont été mis en évidence : les Éléments Conjugatifs et Intégratifs (ICE) (Burrus *et al.*, 2002). Toutefois, cette spécificité d'intégration qui distingue les ICE des transposons conjugatifs n'est pas si pertinente puisque Tn916, même s'il possède plusieurs sites d'intégration chez *Enterococcus faecalis*, posséderait un site unique préférentiel d'intégration chez *Clostridium difficile* (Wang *et al.*, 2000). Ces éléments, qu'ils possèdent un site d'intégration spécifique ou non, ont donc été regroupés dans la famille des ICE vu leur similarité : les ICE regroupent tous les éléments intégrés au chromosome, capables de s'exciser sous une forme circulaire, non répliquative, pour être transféré par conjugaison à une cellule réceptrice où ils s'intègrent soit au niveau d'un site privilégié soit au niveau de plusieurs sites (Burrus *et al.*, 2002). Des ICE avérés ou potentiels ont été identifiés aussi bien chez les bactéries Gram négatif que chez les bactéries Gram positif, cette famille regroupe une grande variété d'éléments génétiques : les éléments dont l'intégration est site-spécifique tel que SXT ou R391 (identifiés chez *Vibrio cholerae* et *Providencia rettgeri* respectivement), les éléments dont l'intégration est moins spécifique

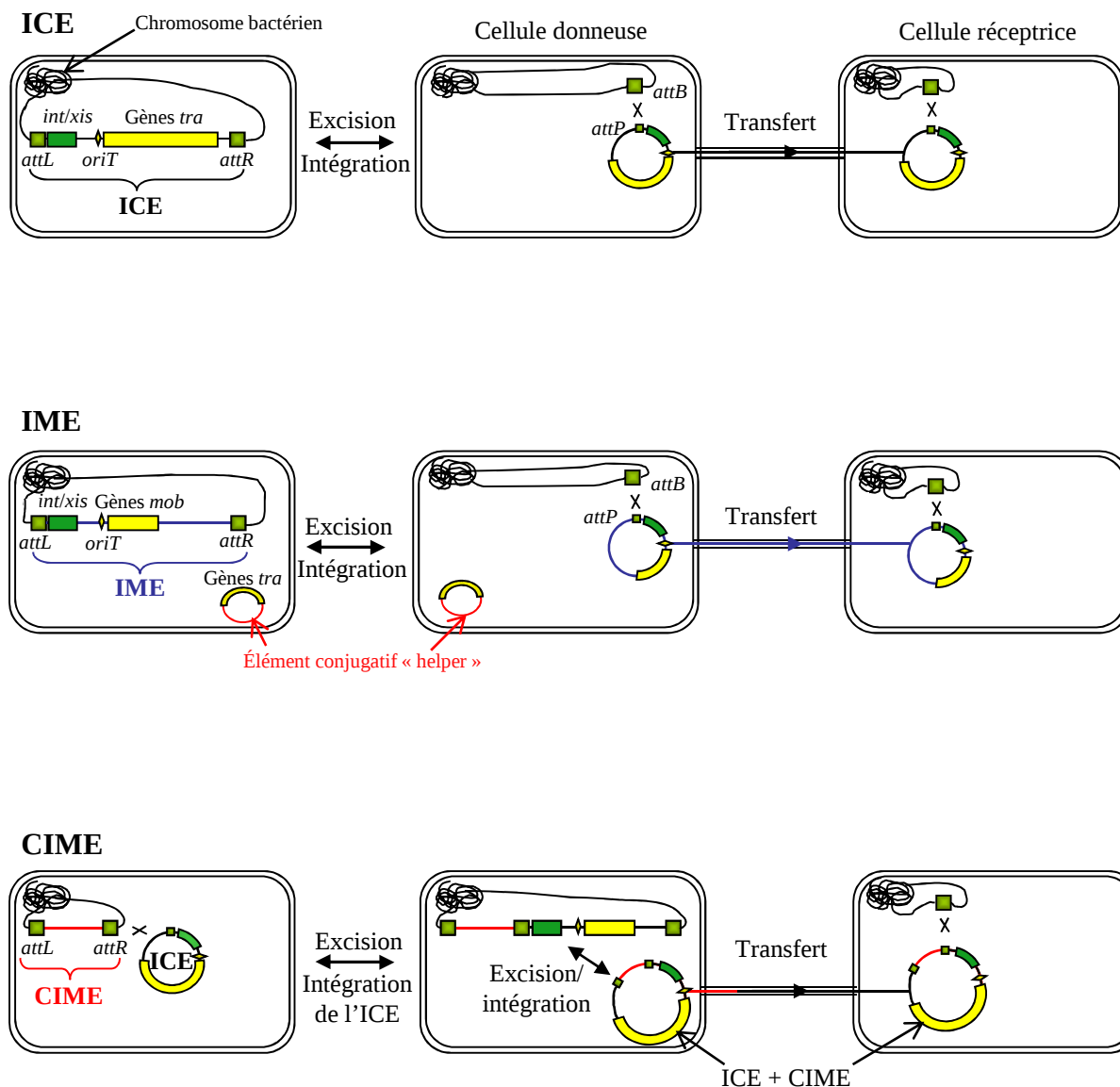


Figure 21 : Mécanisme de transfert des ICE et des éléments reliés. Les ICE disposent de tout le matériel génétique nécessaire à leur transposition (intégration et excision) et à leur transfert conjuguatif. Les IME sont capables de s'exciser et de s'intégrer seuls, mais dépendent de la présence d'un élément conjuguatif « helper » pour assurer leur transfert. La mobilité d'un CICE nécessite l'intégration d'un ICE à ses côtés, les deux éléments sont alors excisés et transférés ensemble.

comme Tn916 (*E. faecalis*) ou CTnDOT (*Bacteroides thetaiotaomicron*), mais aussi des îlots génomiques mobiles comme ICE_{clc} (*Pseudomonas knackmussii*) et ICE_{MI}Sym (*Mesorhizobium loti*) (Wozniak & Waldor, 2010). Tous les ICE ont en commun de posséder trois modules impliqués dans (1) la transposition (incluant les gènes requis pour l'intégration et l'excision), (2) le transfert conjugatif, ainsi que dans (3) des systèmes de régulation qui contrôlent ces deux mécanismes (Figure 20). Ils possèdent également des sites *attL* et *attR* qui marquent leurs extrémités, ainsi que, généralement, d'autres fonctions accessoires comme la résistance (aux antibiotiques et aux métaux lourds), la capacité à dégrader des composés aromatiques, ou encore des gènes de symbiose ou de virulence (Wozniak & Waldor, 2010). Des échanges et/ou acquisitions de modules entre les ICE ont été soupçonnés puisque certains ICE comme Tn916 et Tn5397 possèdent des modules fortement reliés (transfert, régulation et résistance aux tétracyclines) alors que leurs modules de recombinaison sont très différents. D'autres au contraire comme Tn5801 et ICE_{LM1} ont les trois modules principaux en commun (transposition, transfert et régulation) mais le module de résistance aux tétracyclines du premier est remplacé par un module putatif de résistance au cadmium sur le second (Burrus *et al.*, 2002).

L'excision et l'intégration des ICE sont réalisées par l'intégrase qu'ils encodent, avec l'aide indispensable ou non d'une excisionase. En effet, la présence de l'excisionase est nécessaire pour l'excision de Tn916 alors que pour l'élément SXT, l'absence de l'excisionase diminue seulement le taux d'excision de l'élément. Ces deux enzymes agissent au niveau des extrémités *attL* et *attR* de l'élément intégré au chromosome. Elles assurent la recombinaison entre ces deux sites conduisant à la formation de l'intermédiaire circulaire extra-chromosomique qui contient le site *attP*. L'excision de l'ICE restaure ainsi le site chromosomique *attB* qui permet l'intégration de l'élément au chromosome par recombinaison avec le site *attP* de l'élément excisé (Figure 21) (Wozniak & Waldor, 2010). La transposition et le transfert conjugatif des ICE seraient régulés par le module de régulation de l'ICE lui-même. La régulation de la mobilité de l'élément SXT est parmi les mieux documentées. En effet, la transposition et le transfert conjugatif de SXT sont activés par les protéines SetC et SetD, deux activateurs transcriptionnels codés par le module de régulation de l'ICE, qui activent l'expression du gène *int* et des gènes de transfert *tra* (Beaber *et al.*, 2002b). Cependant, l'expression de SetC et SetD est réprimée par la protéine SetR, également codée par le module de régulation. (Beaber *et al.*, 2004). La répression médiée par SetR peut être levée lorsque la réponse SOS est activée, suite à des dommages sur l'ADN notamment. En

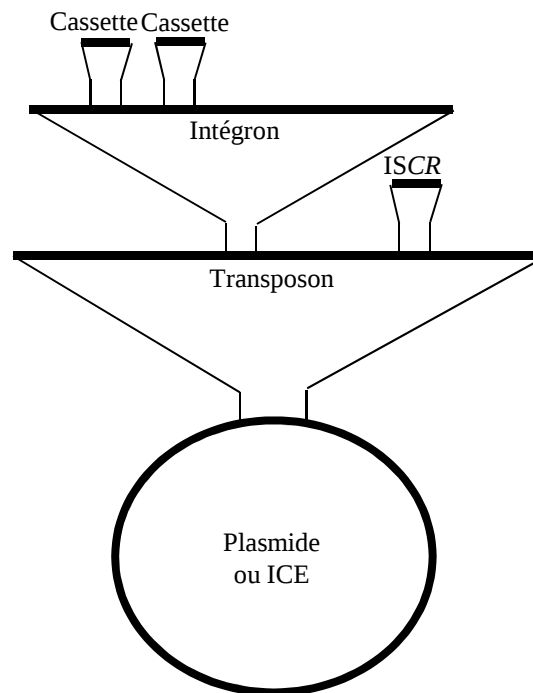


Figure 22 : L'effet poupée russe des éléments génétiques mobiles. Les éléments génétiques de différentes natures ont la possibilité de s'assembler ensemble pour former des structures plus complexes capables de transporter de nombreux gènes de résistances aux antibiotiques (adaptée de Amabile-Cuevas & Chicurel, 1992)

effet, la réponse SOS permet l'activation de la protéine RecA qui favorise l'autoprotéolyse de plusieurs régulateurs dont SetR, favorisant ainsi la transposition et le transfert horizontal de SXT (Beaber *et al.*, 2004). La réponse SOS peut être induite par différents facteurs environnementaux comme la présence de quinolones dans la bactérie montrant ainsi comment un traitement par les antibiotiques peut provoquer la dissémination de gènes de résistance. De même pour Tn916, la présence de tétracycline induirait l'expression des gènes impliqués dans le transfert de l'élément, mais pas ceux impliqués dans son excision toutefois (Celli & Trieu-Cuot, 1998). D'autres facteurs comme l'état physiologique de la bactérie peuvent également induire une régulation. Ainsi, l'excision de ICE clc est plus importante lors de la phase stationnaire de croissance, alors qu'à l'inverse, celle de ICE $MSym$ est favorisée pendant la phase exponentielle (Wozniak & Waldor, 2010).

D'autres éléments sont reliés aux ICE mais dont certaines des fonctions nécessaires à leur mobilité dépendent d'éléments conjugatifs présents dans la cellule : les IME (Éléments Mobilisables et intégratifs) et les CIME (Éléments *cis*-Mobilisables et -intégratifs) (Figure 21) (Wozniak & Waldor, 2010). Ces deux types d'éléments sont dérivés des ICE mais auraient perdu certaines de leur fonction. Les IME, comme tous les éléments mobilisables, ne possèdent pas toutes les fonctions requises pour pouvoir assurer leur propre transfert conjugatif. Leur transfert dépend de la présence d'un autre élément conjugatif dans la cellule qui apporte les fonctions manquantes aux éléments mobilisables (pour plus de détails, voir le chapitre suivant sur les mécanismes de conjugaison). Toutefois, les mécanismes d'excision, de formation de l'intermédiaire circulaire extrachromosomique, et d'intégration des IME sont identiques à ceux des ICE. Les CIME, quant à eux, sont des ICE qui auraient perdu leur fonction de transferts et leur intégrase nécessaire à la transposition, mais pourvus de sites *attL* et *attR*. Ils peuvent toutefois être excisés et transférés en *cis* lorsqu'un ICE s'intègre à ses cotés via les sites *attL* ou *attR*, et que l'intégrase codée par l'ICE excise le tout, une fois sous forme circulaire extrachromosomique, les deux éléments se comportent comme un ICE classique (Figure 21) (Wozniak & Waldor, 2010).

c) L'effet « poupée russe » des éléments mobiles

La nature des différents éléments mobiles d'une bactérie peut conduire à des assemblages rappelant les poupées russes qui s'imbriquent les unes dans les autres (Amabile-Cuevas & Chicurel, 1992). Les éléments mobiles peuvent s'imbriquer de la même manière créant ainsi, des éléments d'une plus grande complexité : un plasmide peut contenir un transposon qui

contient à son tour un intégron (Figure 22) (Amabile-Cuevas & Chicurel, 1992). L'intégron peut alors enrichir l'élément mobile avec de nouvelles cassettes de gènes, le transposon permet de laisser une copie des gènes qu'il porte sur le chromosome bactérien, avant d'être disséminé à d'autres bactéries grâce au transfert conjugatif du plasmide qui porte le tout. Des associations de ce genre entre éléments mobiles sont certainement à l'origine de la formation d'éléments mobiles plus complexes véhiculant et disséminant des multi-résistances aux antibiotiques (Walsh, 2006). Les plasmides de résistance aux C3G ont souvent une structure de ce genre impliquant des IS et des transposons : le plasmide porteur du gène *bla*_{CTX-M-15} se serait formé à partir du plasmide R100 sur lequel se serait insérée une large région de multi-résistance contenant plusieurs transposons, cinq copies de l'IS26, ainsi que le gène *bla*_{CTX-M-15} lui-même associé à une IS (*ISEcp1*) (Boyd *et al.*, 2004). Des structures complexes peuvent également passer du chromosome bactérien pour aller enrichir un plasmide ou à l'inverse d'un plasmide vers le chromosome bactérien ce qui permet d'assurer la stabilité de la structure au cours des divisions cellulaires. Ce phénomène expliquerait la formation du plasmide pTB11 du groupe IncP : ce plasmide possède une région très conservée entre les plasmides de ce groupe d'incompatibilité, associée à une région hypervariable formée par le transposon Tn402 qui contient un intégron auquel est associé plusieurs gènes de résistance (*bla*_{OXA-2}, *aacA4* et *aadA1*) et une IS (*ISpa7*). Cette organisation est très similaire à une région retrouvée sur le chromosome d'une souche de *P. aeruginosa*, ce qui suggère la translocation de cette région entre le chromosome de la bactérie et le plasmide pTB11 (Tennstedt *et al.*, 2005; Walsh, 2006). Toutes ces permutations et ces combinaisons d'éléments mobiles constituent un facteur majeur de plasticité des génomes bactériens, notamment les IS et les ISCR qui se déplacent de manière « hasardeuse » et qui seraient capables d'emmener avec elles des gènes situés à proximité du fait de l'imprécision de leur excision (Walsh, 2006). Ces associations peuvent également permettre de rendre mobile un élément qui était immobile. L'insertion d'un ICE de *Bacteroides* dans un plasmide non mobile a certainement permis de créer un nouveau plasmide conjugatif grâce aux capacités de transferts apportées par l'ICE (Salyers *et al.*, 1995). Elles peuvent également ajouter à un élément, un module de multi-résistance comme cela a été supposé pour l'ICE SXT dont le cluster de multi-résistance semble constitué d'un transposon composite (Burrus *et al.*, 2002). Beaucoup d'autres exemples d'associations entre éléments mobiles ont été décrits dans la littérature. Cependant, les éléments intégrés au chromosome et transférables tels que les ICE, ou les éléments dérivés, sont les moyens les plus sûrs pour la bactérie d'assurer la stabilité des gènes de résistance au cours des divisions (les plasmides pouvant être perdus si aucune pression de sélection ne les maintient), ainsi que

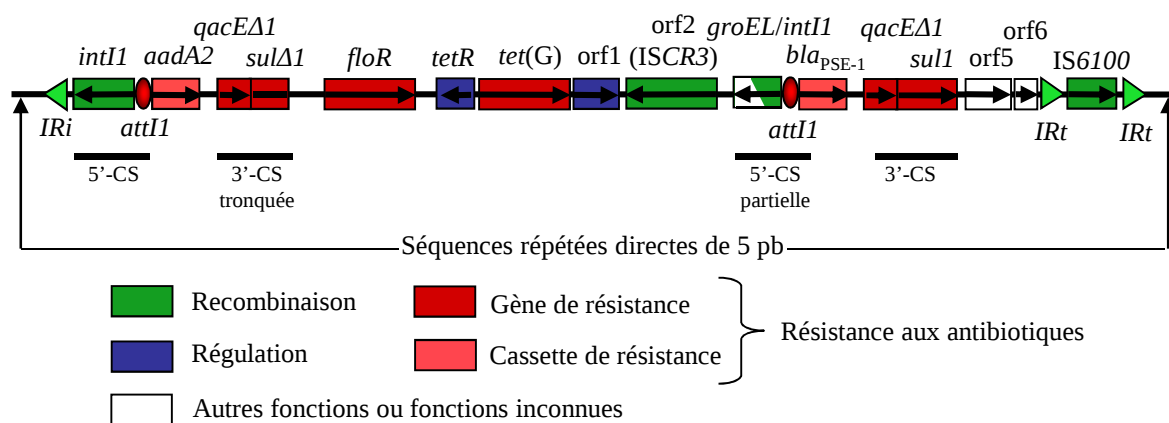


Figure 23 : Organisation génétique de l'intégron In104 de SGI1. L'intégron In104 est constitué de deux copies des séquences conservées 5'CS et 3'CS qui encadrent les deux cassettes de résistance à la streptomycine et à l'ampicilline (*aadA2* et *bla_{PSE-1}*). Il possède en plus des gènes conférant la résistance aux phénicolés (*floR*), et aux tétracyclines (*tet(G)*). Il est délimité par des séquences répétées inversées *IRi* et *IRt*, le tout encadré par des séquences répétées directes de 5 pb probablement générées suite à un événement de transposition. Numéro d'accèsion GenBank : AF261825.

leur diffusion à travers le monde bactérien grâce à leur capacité conjugative. L'îlot génomique SGI1, considéré comme un IME, est un bon exemple de « poupées russes » puisqu'il contient un intégron, associé à une IS et à des ISCR, le tout au sein d'une structure de type transposon dont l'acquisition a été supposée suite à un évènement de transposition.

B.3. L'îlot génomique SGI1 : un élément intégratif mobilisable

a) Identification de l'intégron In104 de SGI1

SGI1 est le premier îlot génomique de multi-résistance identifié chez *Salmonella* dont la mobilité a été démontrée (Mulvey *et al.*, 2006). Sa découverte fait suite à une épidémie de salmonelloses qui toucha les bovins et l'Homme au Royaume-Uni à la fin des années 1980. Cette épidémie était due à une souche de *S. Typhimurium* de lysotype DT104 penta-résistante aux antibiotiques, qui se propagea au monde entier au cours des années 1990 par diffusion épidémique clonale (Threlfall, 2000). DT104 devint alors le lysotype de *Typhimurium* majoritairement impliqué dans les salmonelloses humaines (Helms *et al.*, 2005). La diffusion de ce clone a conduit à s'intéresser aux mécanismes moléculaires à l'origine du phénotype de résistance ACSSuT qu'il véhicule. Les gènes responsables de ces résistances ont tous été identifiés au sein d'une région de 13 kb constituée d'un intégron complexe nommé In104, apparenté aux intégrons du groupe In4 (Figure 23) (Briggs & Fratamico, 1999; Arcangioli *et al.*, 1999). En effet, les intégrons de ce groupe sont caractérisés par la présence de séquences répétées inversées, IRi et IRt, de 25 pb autour de la structure, ainsi que par la présence de l'IS6100 insérée en aval. Comme les intégrons complexes décrits dans la partie B.1.c, In104 possède deux copies des séquences 5'-CS et 3'-CS avec deux sites d'insertion de cassettes de gène *attI*, qui entourent une séquence ISCR (ISCR3). Toutefois, la copie de *sul1* de la première séquence 3'-CS est tronquée et ne semble pas coder une protéine fonctionnelle. De même pour le gène *int1* de la seconde séquence 5'-CS qui est incomplet car fusionné avec le gène *groEL* codant une protéine chaperonne. Deux cassettes de résistance ont été identifiées au niveau des sites *attI* : *aadA2* et *bla_{PSE-1}* conférant respectivement la résistance à la streptomycine et à l'ampicilline (Briggs & Fratamico, 1999). Entre ces deux structures type intégron, un nouveau gène de résistance au chloramphénicol et au florfenicol avait été découvert, le gène *floR* qui code une pompe d'efflux. Ce gène *floR* est entouré par des séquences répétées directes suggérant son intégration par un évènement de transposition (Arcangioli *et al.*, 1999). En aval de ce gène, deux gènes *tetR* et *tet(G)*, dont la séquence est

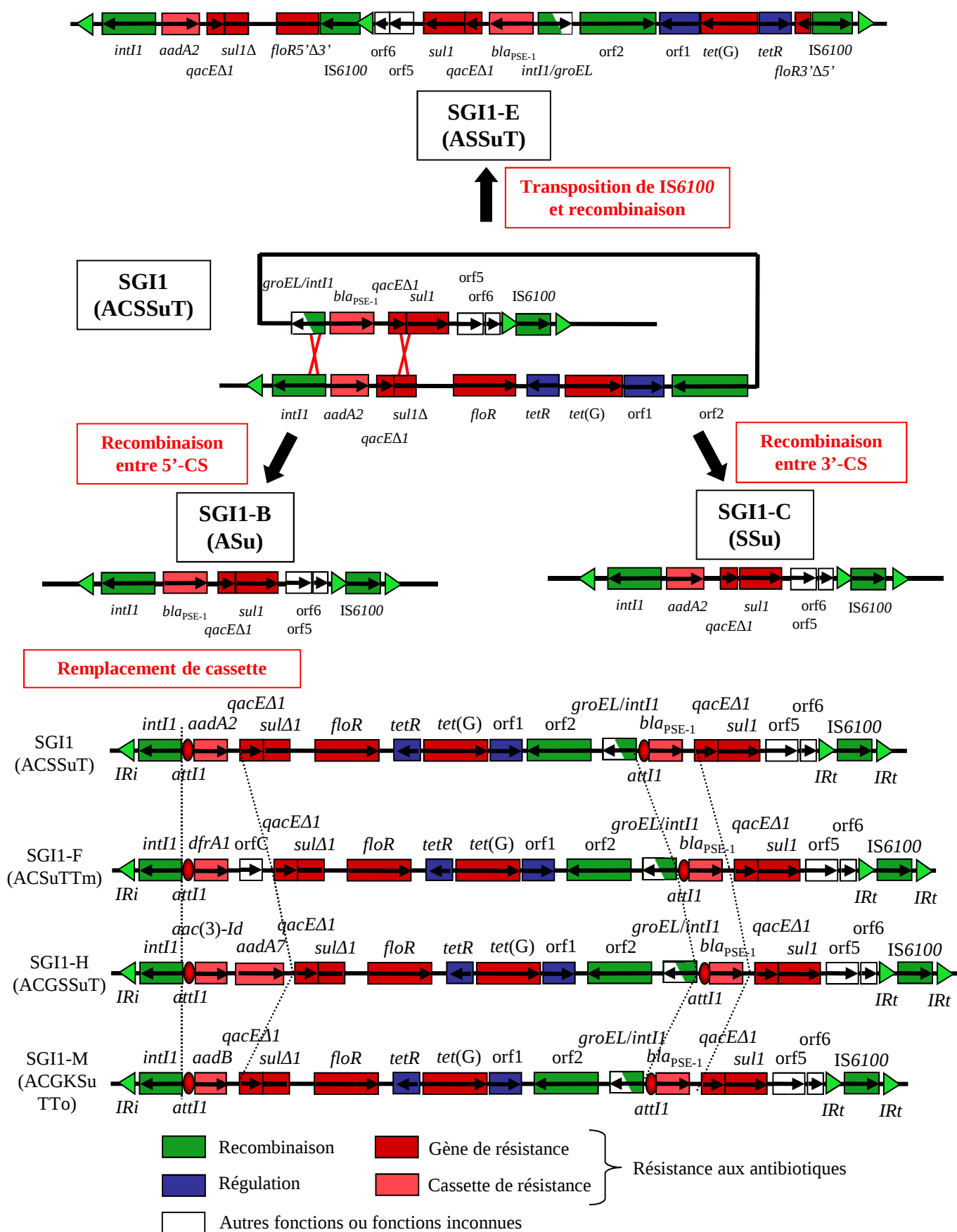


Figure 24 : Principaux évènements à l'origine de l'apparition des variants de SGI1.

proche de la séquence d'un plasmide de résistance retrouvé chez *Vibrio*, apportent la résistance aux tétracyclines. En aval de *tet(G)*, deux ORF, *orf1* et *orf2*, ont également été mises en évidence (Briggs & Fratamico, 1999; Arcangioli *et al.*, 1999; Mulvey *et al.*, 2006). La première coderait un régulateur transcriptionnel de la famille *lysR*, et la seconde coderait la transposase potentielle de la famille d'éléments mobiles *ISCR3*. Cette *ISCR3* est susceptible d'avoir participé à la construction de l'intégron de SGI1, elle a, par exemple, toujours été retrouvée avec le gène *groEL* dans son environnement 3', que ce soit sur SGI1 ou sur le locus *rmtB* de *Serratia marcescens* (Toleman *et al.*, 2006).

Cet intégron constitue le locus de multi-résistance de l'îlot génomique SGI1 qui sera décrit dans la partie c) de cette section. Depuis l'identification de In104, de nombreux variants de cet intégron ont été identifiés aussi bien chez Typhimurium que chez divers sérotypes de *S. enterica*.

b) La plasticité génétique de l'intégron In104

La composition particulière de l'intégron de SGI1 est à l'origine de l'apparition de nombreux variants (voir annexe 1 et 2). Malgré le nom donné à chaque variant (SGI1-A à SGI1-U), seul l'intégron de SGI1 subit des modifications, l'organisation génétique du reste de l'îlot génomique restant identique, excepté pour le variant SGI1-J dont la particularité sera abordée plus en détail à la fin de cette partie. En premier lieu, les deux sites d'insertions de cassettes de gènes *attI* sont, par définition, capables d'intégrer de nouvelles cassettes pouvant conduire à l'apparition de nouveaux phénotypes de résistance (Figure 24, annexe 2). Ainsi, de nombreux variants ont subi un remplacement de cassette, la plupart du temps au niveau du premier site *attI* (SGI1-F, -H, -I, -K, -L, -M, -O, -S) (Doublet *et al.*, 2003; Doublet *et al.*, 2004b; Levings *et al.*, 2005; Cloeckert *et al.*, 2006; Levings *et al.*, 2007; Vo *et al.*, 2007; Boyd *et al.*, 2008; Wilson & Hall, 2010). Les seuls changements observés au niveau du second site *attI* sont la perte de la cassette *bla_{PSE-1}* pour certains variants (SGI1-J) ou son remplacement par la cassette *dfrA1* qui confère la résistance au triméthoprim pour le variant SGI1-I (Levings *et al.*, 2005). Ces changements de cassettes ont notamment permis de créer des variants de SGI1 véhiculant des résistances à la gentamicine et/ou à la kanamycine (SGI1-H, -K, -M, -S) ou au triméthoprim (SGI1-F, -I, -J, -L, -O, -S). Outre ces variations au niveau des sites *attI*, In104, avec ses deux copies des séquences 5'-CS et 3'-CS et la présence de l'*IS6100*, est prédisposé à subir des recombinaisons pouvant également aboutir à d'autres phénotypes de résistance (Figure 24, annexe 2). Ainsi, plusieurs variants seraient apparus par



Figure 25 : Distribution des sérotypes de *Salmonella*, en dehors de Typhimurium, contenant SGI1 ou variants identifiés à travers le monde (adaptée de Doublet *et al.*, 2009).

recombinaison entre les séquences 5'-CS (SGI1-B et -G) ou entre les séquences 3'-CS (SGI1-C et -D) (Boyd *et al.*, 2002; Doublet *et al.*, 2004a). La séquence d'insertion IS6100 est impliquée dans la formation du variant SGI1-E (Figure 24, annexe 2) : une copie de cette IS s'est insérée dans le gène *floR*, et aurait alors permis une recombinaison entre les deux copies de cette IS qui serait à l'origine de l'apparition de ce variant (Boyd *et al.*, 2002). L'intégron de SGI1 semble être un lieu privilégié d'insertion d'éléments génétiques mobiles. Outre l'IS6100, des séquences d'insertions comme IS26, ISEcp1, ISKpn14 ou ISCfr1 ont été identifiées sur plusieurs variants de l'intégron de SGI1 (SGI1-K, -P, -Q, -S) (Levings *et al.*, 2007; Doublet *et al.*, 2008c; Wilson & Hall, 2010). Des transposons tels que Tn402, Tn512 ou Tn21 sont également venus s'insérer dans l'intégron des variants SGI1-K, -L et -S notamment (Doublet *et al.*, 2009b). Enfin, la séquence ISCR1 est présente chez trois variants (SGI1-A, -D et -G) bien que les variants SGI1-D et -G soient probablement apparus par recombinaisons entre les séquences 5'- et 3'-CS de SGI1-A (Boyd *et al.*, 2002; Doublet *et al.*, 2004a).

SGI1-L est le premier variant de SGI1 à avoir été identifié chez un autre genre de bactéries que *Salmonella*, il a en effet été identifié chez *P. mirabilis* (Ahmed *et al.*, 2007). Par la suite, l'intégron In104 original de SGI1, et les variants SGI1-I, -O et le tout dernier SGI1-U ont également été identifiés chez des souches de *P. mirabilis* (Boyd *et al.*, 2008; Doublet *et al.*, 2010; Bi *et al.*, 2011). Au total, plus de 25 variants de l'intégron de SGI1 ont été mis en évidence (Annexe 1 et 2), certains comme SGI1-J, -K ou -L étant eux-mêmes subdivisés en plusieurs variants (Doublet *et al.*, 2009a; Doublet *et al.*, 2009b). Ces variants ont été identifiés un peu partout dans le monde, le sud-est de l'Asie et l'Afrique de l'est semblent être les régions où les diversités de variants et de sérotypes de *S. enterica* sont les plus fortes (Figure 25) (Doublet, 2009).

Parmi ces variants, les avis divergent sur la nature de SGI1-J. Son intégron complexe est le seul à avoir été identifié à une position différente sur SGI1. En effet, l'intégron In104 et tous ses variants ont été localisés à la fin 3' de SGI1, entre les ORF S027 et S044 (voir partie B.3.c). L'intégron de SGI1-J, quant à lui, a été localisé au milieu de l'ORF S023 (Levings *et al.*, 2005; Doublet *et al.*, 2009a). Levings *et al.* ont alors choisi de renommer ce variant SGI2, à cause de cette différence de localisation, mais aussi parce qu'ils ont observé une différence de la composition nucléotidique entre SGI1 et SGI2 de 0,3% sur une portion correspondante à 20% de la taille de l'îlot génomique. Les intégrons de SGI1 et de SGI2 étant plus proches au niveau séquence nucléotidique que le reste de l'îlot génomique, cette différence suggère selon eux que les deux îlots SGI1 et SGI2 ont divergé avant l'acquisition de l'intégron. Selon leur

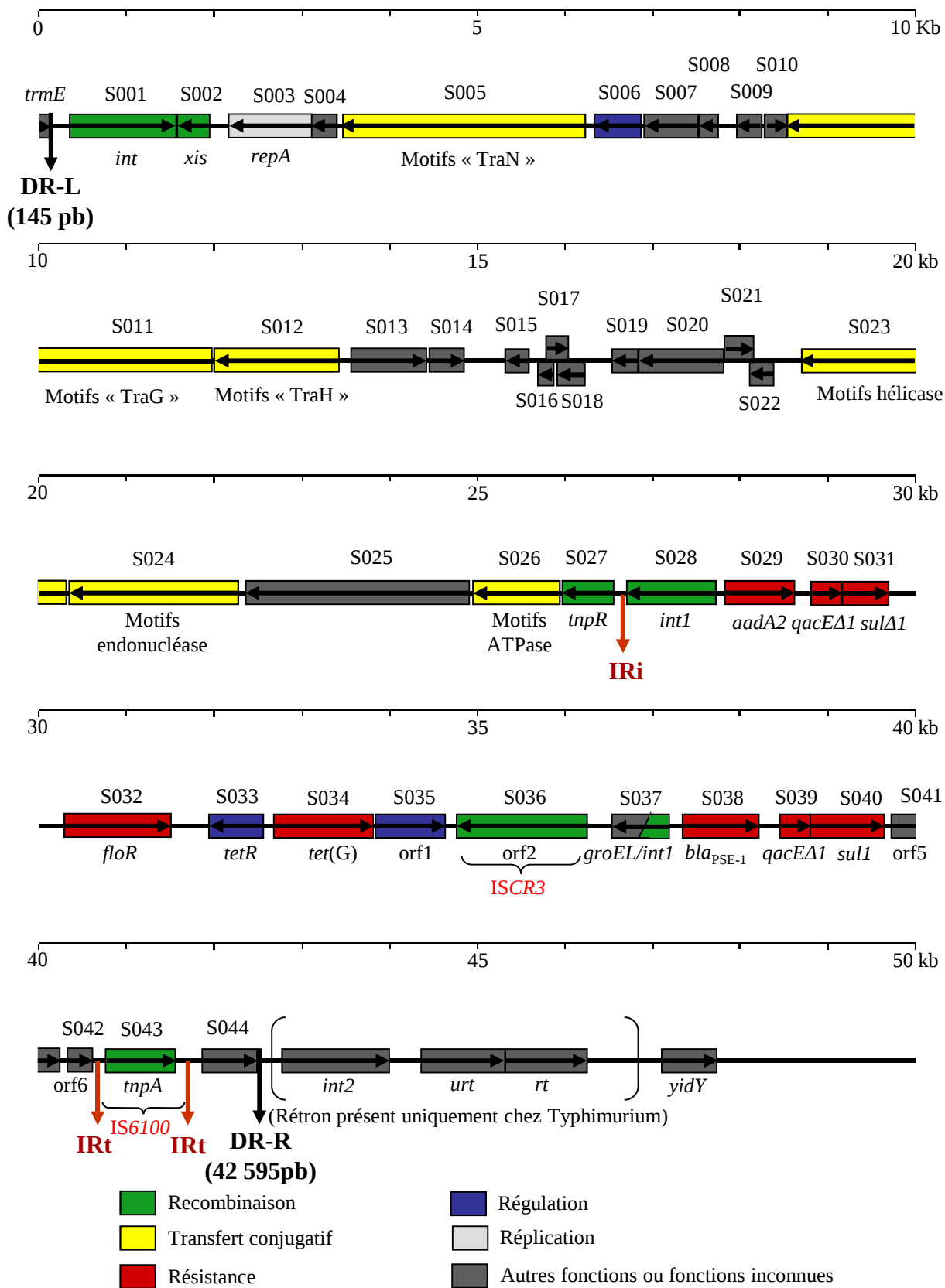


Figure 26 : Organisation génétique de l'îlot génomique SGI1. Numéro d'accèsion GenBank : F261825.2 (Boyd *et al.*, 2001).

estimation, SGI1 et SGI2 auraient divergé depuis 1 000 à 30 000 ans. (Levings *et al.*, 2008; Wilson & Hall, 2010). Doublet *et al.* suggérèrent, quant à eux, de continuer à le nommer dans la série des SGI1 au vue des ressemblances entre ces îlots génomiques : en effet, ils possèdent tout deux le même site d'intégration au niveau du chromosome de *Salmonella*, et ils sont constitués du même enchaînement d'ORF, la seule différence étant la localisation de l'intégron dans l'îlot génomique (Doublet *et al.*, 2009a). Quoi qu'il en soit, la grande diversité de variant dérivé de l'intégron de SGI1 montre bien la plasticité de cet intégron, qui est capable de s'enrichir de nouveaux gènes de résistance, et qui semble être un site privilégié d'intégration d'éléments mobiles (transposons, IS, ISCR) qui pourraient par la suite encore augmenter sa plasticité.

c) Organisation génétique de SGI1 et mobilité

SGI1 est un îlot génomique de 42 450 pb intégré dans le chromosome de *Salmonella* entre les gènes *trmE*, qui code une protéine modifiant certains ARNt (Elseviers *et al.*, 1984), et *yidY*, codant un transporteur membranaire de la famille MFS. Chez *Typhimurium*, qui contient une structure de type rétron entre les gènes *trmE* et *YidY*, SGI1 est intégré entre *trmE* et le gène *int2* codant l'intégrase du prophage (Boyd *et al.*, 2000; Mulvey *et al.*, 2006). Plus précisément, SGI1 est intégré au niveau des 18 dernières paires de bases de *trmE* mais sans toutefois inactiver le gène puisque les 18 premières paires de bases de SGI1 sont identiques à deux nucléotides près à la fin de *trmE*, les 18 paires de bases appartenant à *trmE* étant retrouvées du côté 3' de SGI1. Ces séquences répétées directes imparfaites, nommées DR-L et DR-R (correspondantes aux sites *attL* et *attR* des ICE), constituent les extrémités 5' et 3' de l'îlot génomique (Figure 26) (Boyd *et al.*, 2000).

Ces séquences DR sont une des caractéristiques qui permettent d'identifier un îlot génomique. Par définition, les îlots génomiques sont de larges fragments d'ADN (10 à 200 kb) présents chez certaines souches, mais absents de souches très proches. Leurs caractéristiques nucléotidiques (pourcentage de nucléotides GC, fréquences de tétranucléotide ou l'usage des codons) diffèrent de celles du reste du chromosome où ils sont insérés. Ils sont également insérés préférentiellement dans des gènes codant un ARNt et sont souvent dotés d'un gène codant une intégrase. Enfin, ils portent généralement des éléments mobiles tels que des IS ou des transposons, ainsi que des gènes qui confèrent des avantages à la bactérie (symbiose, résistance, métabolisme, pathogénicité) (Juhas *et al.*, 2009). Mise à part l'intégration dans un gène d'ARNt (même si SGI1 s'intègre tout de même de manière site-

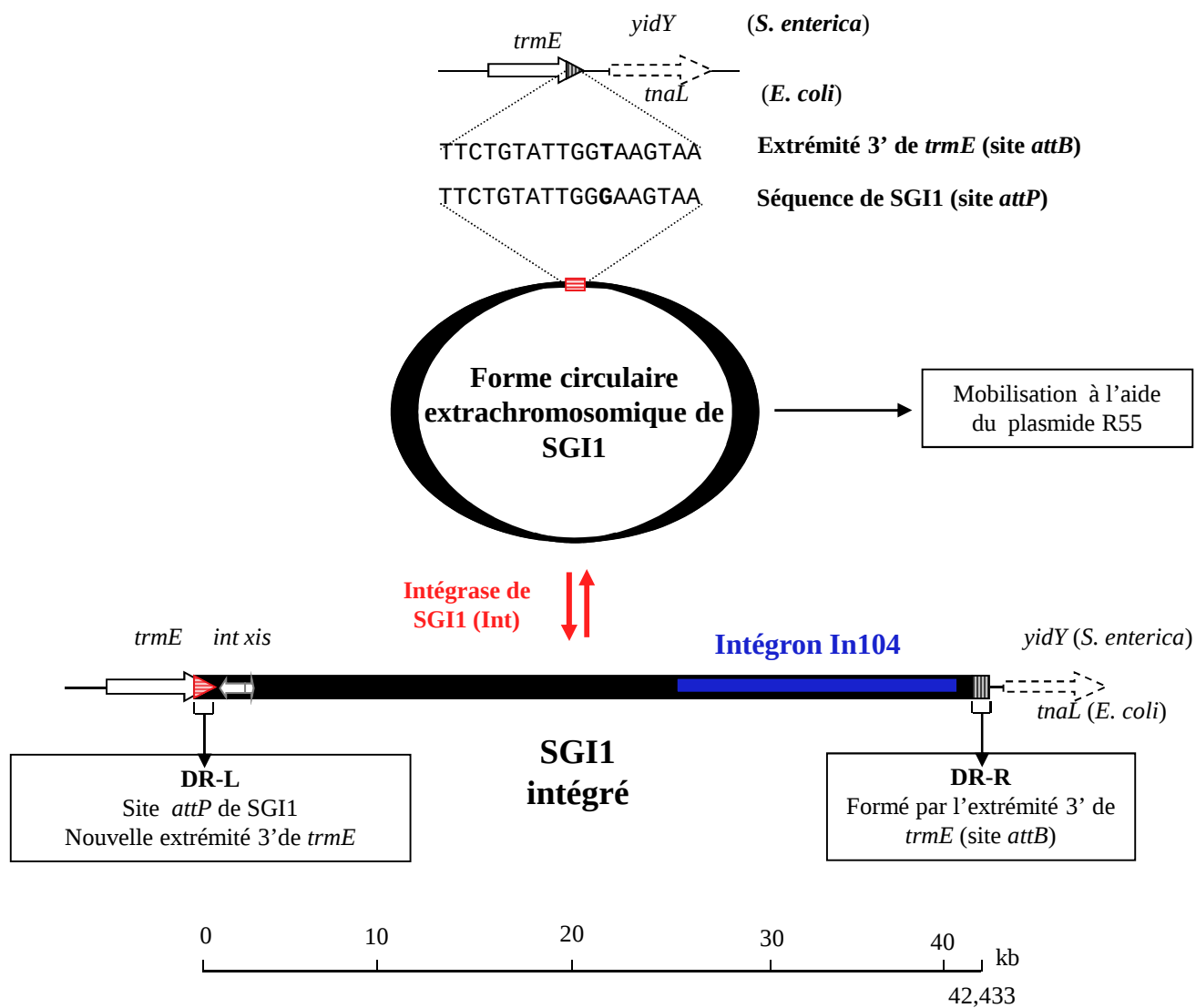


Figure 27 : Intégration/excision et mobilisation de SGI1. La forme circulaire extrachromosomique de SGI1 est générée par recombinaison entre les séquences DR-L et DR-R grâce à l'intégrase Int codée par SGI1. Sous forme circulaire, SGI1 peut être mobilisé vers une bactérie réceptrice grâce au plasmide IncA/C R55 et réintégré au chromosome par recombinaison entre les sites *attP* et *attB*, grâce à l'intégrase (adaptée de Doublet *et al.*, 2005).

spécifique au niveau d'un gène impliqué dans la biosynthèse de certains ARNt), tous les critères d'identification d'un îlot génomique sont retrouvés pour SGI1 : le pourcentage de GC de l'îlot génomique est considérablement différent de celui du chromosome de *Salmonella*, SGI1 est entouré de séquences répétées directes et il porte aussi bien des éléments mobiles que des gènes de résistance aux antibiotiques. Enfin, le séquençage complet de SGI1, qui a révélé la présence de 44 ORF, a montré que la première de ces ORF, S001, codait une intégrase potentielle (Boyd *et al.*, 2001). Le séquençage a révélé également que quinze ORF, dont huit sont impliquées dans la résistance aux antibiotiques, appartiennent à l'intégron In104 qui constitue environ le tiers de l'îlot génomique. La fonction de quinze autres ORF n'a pas pu être déterminée puisque aucune homologie avec une protéine de fonction connue n'a pu être définie. Parmi les ORF restantes en dehors de l'intégron In104, trois d'entre elles auraient des fonctions de recombinaisons, l'intégrase S001 et S002 qui code une excisionase, toutes deux présentant des similarités avec celles du transposon Tn4555. La troisième ORF est S027 qui code une résolvase putative. Six ORF auraient un rôle dans le transfert conjugatif. Les protéines potentiellement codées par ces ORF possèdent des motifs protéiques qui permettent de supposer leur rôle : ainsi, l'ORF S005 coderait la protéine TraN, impliquée dans la stabilisation de la jonction entre les cellules ; les ORF S011 et S012 coderaient respectivement les protéines TraG et TraH impliquées dans la formation des pili nécessaires à la conjugaison (voir chapitre C), les protéines potentiellement codées par les ORF S023, S024 et S026 posséderaient, respectivement des motifs caractéristiques des hélicase, des endonucléase et des ATPase, trois fonctions également impliquées dans le transfert conjugatif (Figure 26) (Boyd *et al.*, 2001). D'autres ORF ont certainement des rôles importants puisque nombres d'entre elles sont transcrites à un niveau relativement fort, notamment celles impliquées dans la résistance aux antibiotiques, mais aussi un régulateur potentiel codé par S006 ou des ORF de fonctions inconnues comme S019, S041 ou S042 (Golding *et al.*, 2007). Ainsi, certaines ORF de SGI1 seraient impliquées dans la virulence puisque la présence de l'îlot génomique semble avoir un effet sur l'expression de gènes codant des facteurs connus de virulence (Golding *et al.*, 2007). De même, la présence de SGI1 dans une cellule semble favoriser la formation de biofilm chez le sérotype Typhimurium (Malcova *et al.*, 2008).

La présence de gènes potentiellement impliqués dans le transfert conjugatif, associée à la multitude de sérotypes dans lesquels SGI1 a été retrouvé, a conduit à suspecter et à démontrer sa mobilité. Le transfert conjugatif de SGI1 a été réalisé entre souches de *Salmonella* ainsi qu'entre *Salmonella* et *E. coli* (Figure 27) (Doublet *et al.*, 2005). SGI1 s'excise du

chromosome pour former un intermédiaire circulaire par recombinaison entre les répétitions DR-L et DR-R. L'excision de SGI1 est réalisée par l'intermédiaire de l'intégrase codée par le gène *int* de l'îlot génomique. Seule l'intégrase est requise pour l'excision et la formation de l'intermédiaire extrachromosomique, l'excisionase ne semble pas indispensable mais elle permet toutefois de faciliter l'excision de SGI1, comme c'est également le cas pour SXT (Doublet *et al.*, 2005). La forme circulaire extrachromosomique de SGI1 est alors capable de transférer par conjugaison vers la bactérie réceptrice où elle s'intègre de manière site-spécifique sur le chromosome bactérien au niveau du gène *trmE*. La recombinaison s'effectue par l'intermédiaire de l'intégrase grâce aux séquences de 18 pb, *attP* présent sur la forme circulaire de SGI1, et *attB* qui correspond aux 18 dernières paires de bases de *trmE* (Figure 27) (Doublet *et al.*, 2005). Toutefois, lorsque *trmE* est absent, une étude *in vitro* a montré que SGI1 était capable de s'intégrer au niveau d'un site secondaire dans une région intergénique située entre les gènes *sodB* et *purR*. Bien que l'intégration au niveau de ce site semble moins efficace, SGI1 serait capable de s'intégrer en tandem, jusqu'à 6 copies de l'îlot génomique (Doublet *et al.*, 2008b). Le mode de transfert de SGI1 est très proche de celui des ICE, à la différence près que le transfert de SGI1 nécessite la présence d'un élément conjugatif dans la cellule donneuse, comme le plasmide R55 (groupe d'incompatibilité IncA/C). SGI1 est donc un élément intégratif mobilisable (IME) dont les fonctions conjugatives qui lui manquent pour pouvoir se transférer sont apportées en *trans* par le plasmide helper (Doublet *et al.*, 2005). Les mécanismes de transfert des éléments conjugatifs tels que les ICE et des éléments mobilisables comme SGI1 seront décrits dans le chapitre suivant.

C. Les mécanismes du transfert conjugatif chez les bactéries Gram négatif

Les transferts horizontaux de gènes constituent les principaux mécanismes permettant l'évolution des génomes bactériens. Parmi les trois types de transferts horizontaux décrits jusqu'à présent et sur lesquels nous reviendrons dans cette partie, la conjugaison bactérienne est certainement le plus efficace, le plus répandu et le plus complexe de ces systèmes. Depuis la découverte de la conjugaison bactérienne, beaucoup de progrès ont été faits sur la compréhension générale du processus même si de nombreuses incertitudes résident sur le mécanisme exact et l'organisation des différents acteurs de ce mécanisme. Chez les bactéries Gram négatif, les protéines impliquées dans la conjugaison peuvent être regroupées dans trois catégories : les protéines du relaxosome, responsables de la préparation du brin d'ADN transféré ; celles du transférosome qui permettent la formation d'un pont cytoplasmique entre les cellules ; et les protéines de couplage qui font le lien entre ces deux complexes. Ces trois composants seraient également impliqués dans le transfert des plasmides présents chez les bactéries Gram positif. Le plasmide pIP501 de *Streptococcus agalactiae*, qui est capable d'être transféré entre bactéries Gram positif et bactéries Gram négatif, possède des gènes fortement similaires à ceux impliqués dans le transfert des plasmides présents chez les bactéries Gram négatif (Abajy *et al.*, 2007). Cependant, il existe des mécanismes propres aux bactéries Gram positif, notamment au niveau du processus permettant le contact entre les cellules donneuses et réceptrices. Ainsi, chez les bactéries du genre *Enterococcus*, il a été montré que la cellule réceptrice pouvait produire une phéromone qui provoquait chez la bactérie porteuse d'un plasmide particulier (pAD1, pCF10 ou encore pPD1) la synthèse d'une adhésine à la surface de la cellule. Cette dernière permettrait par la suite de faciliter la formation de la jonction entre les cellules donneuses et réceptrices (Grohmann *et al.*, 2003). Toutefois, ce chapitre se limitera aux mécanismes de conjugaison identifiés chez les bactéries Gram négatif qui sont d'une manière générale proches de ceux présents chez les bactéries Gram positif.

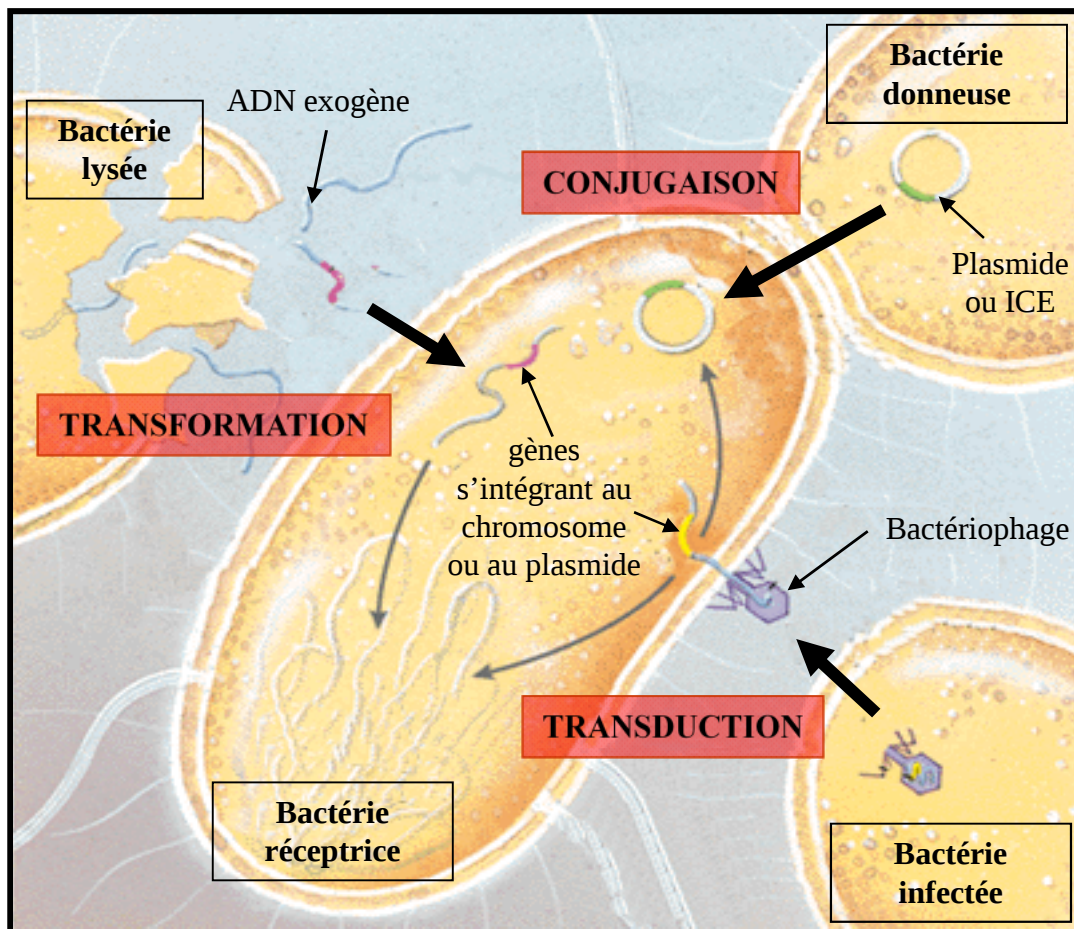


Figure 28 : Les différents modes de transfert horizontal d'ADN chez les bactéries.

Les trois mécanismes de transfert horizontal d'ADN entre bactéries sont représentés. La transformation fait suite à la libération d'ADN dans le milieu extérieur suite à une lyse cellulaire par exemple, une bactérie compétente peut alors l'assimiler et l'intégrer à un réplicon de la cellule. La transduction est un transfert d'ADN *via* l'infection de la bactérie par un phage contenant de l'ADN bactérien obtenu lors d'une infection précédente. La conjugaison permet le transfert d'éléments génétiques (plasmides ou ICE notamment) par un mécanisme spécialisé dans le transfert d'ADN lorsque deux bactéries sont reliées par un pont cytoplasmique.

C.1 Importance de la conjugaison dans les transferts horizontaux

a) Les différents modes de transferts horizontaux

Chez les bactéries, la reproduction asexuée ne permet pas le brassage génétique indispensable à l'évolution et à la survie d'une espèce. En effet, la reproduction sexuée réalisée par les organismes supérieurs assure un brassage génétique leur permettant d'évoluer et de pouvoir s'adapter indirectement à leur environnement. Cette lacune des bactéries est cependant compensée par d'autres mécanismes qui leur permet de faire évoluer leur génome, notamment les trois mécanismes de transferts horizontaux de gènes que sont la transformation, la transduction et la conjugaison (Figure 28) (Boto, 2010).

La transformation bactérienne est le premier de ces trois mécanismes à avoir été mis en évidence, elle consiste en l'acquisition d'un fragment d'ADN exogène par une cellule dite compétente. Plusieurs genres de bactéries ont été démontrés comme étant naturellement compétents (*Bacillus*, *Neisseria*, *Streptococcus*, etc.), cependant, pour de nombreuses bactéries, aucune transformation naturelle n'a pu être mise en évidence (Thomas & Nielsen, 2005). Cet état de compétence serait dû à l'expression régulée de gènes codant des protéines impliquées dans la formation d'un complexe transmembranaire. Ce complexe serait responsable de la reconnaissance et de la fixation à l'extérieur de la cellule de fragments d'ADN (Chen *et al.*, 2005). Outre la compétence des bactéries, ce mécanisme nécessite en effet qu'un fragment d'ADN soit relâché dans le milieu extérieur, suite à une lyse cellulaire ou encore par excrétion active d'ADN. Ce fragment d'ADN doit alors persister dans le milieu extérieur jusqu'à ce qu'une bactérie compétente l'incorpore. Enfin, le fragment d'ADN ne pourra s'intégrer au chromosome bactérien uniquement si ses caractéristiques nucléotidiques sont suffisamment proches de celles du chromosome bactérien pour que la recombinaison entre les deux ADN puissent se faire (Thomas & Nielsen, 2005).

Le mécanisme de transduction, quant à lui, est dépendant de l'action d'un bactériophage (Brigulla & Wackernagel, 2010). Lors d'une infection, l'ADN de ces virus de bactéries peut s'intégrer au chromosome bactérien lors de leur cycle lysogénique. Au moment de l'excision du prophage, des imprécisions peuvent se produire conduisant à l'excision simultanée d'un fragment d'ADN bactérien situé à proximité du lieu d'intégration du bactériophage. Ce fragment d'ADN bactérien est alors encapsidé avec le matériel génétique viral. Lors d'une nouvelle infection, le phage peut s'intégrer au chromosome de la nouvelle cellule-hôte et

laisser le fragment d'ADN d'origine bactérienne sur le chromosome de la bactérie après s'être excisé de celui-ci. Cependant, ce mécanisme de transfert a également ses limites. Le volume de la capside limite la taille du fragment d'ADN qui peut être transféré, jusqu'à 200 kb selon le phage en question (Brigulla & Wackernagel, 2010). De plus, il existe une spécificité assez étroite des phages pour les bactéries qu'ils infectent, c'est pourquoi, comme pour la transformation bactérienne, les échanges d'ADN par transduction sont limités à des bactéries phylogénétiquement proches la plupart du temps, certains phages pouvant toutefois avoir un spectre d'hôte plus large (Brigulla & Wackernagel, 2010).

Enfin, le dernier système de transfert horizontal connu est la conjugaison bactérienne. Ce mécanisme a été décrit pour la plupart des genres bactériens, et il semble être responsable de la majorité des transferts horizontaux. Comme cela sera décrit dans les parties suivantes, la conjugaison est réalisée, la plupart du temps, par et pour un élément génétique, son transfert n'est donc pas dû au hasard. Contrairement aux autres modes de transfert horizontaux, la conjugaison bactérienne est un mécanisme particulièrement efficace puisque, théoriquement, une seule cellule donneuse est capable de convertir toute une population de cellules réceptrices en cellules donneuses (Frost & Koraimann, 2010). Autre différence avec la transduction et la transformation, l'ADN est préparé et organisé sous forme de complexe nucléo-protéique avant d'être transféré, et l'information portée par cet ADN confère la plupart du temps un avantage sélectif à la bactérie (virulence, résistance, etc.). De plus, ce transfert est initié uniquement lorsqu'un contact étroit est établi entre les deux cellules impliquées. La conjugaison peut donc être considérée comme un système spécialisé dans le transfert d'informations génétiques qui est probablement le principal responsable de l'évolution et de l'adaptation des bactéries à leur environnement (Thomas & Nielsen, 2005, Brigulla & Wackernagel, 2010).

b) Principe général de la conjugaison bactérienne

La conjugaison bactérienne a été mise en évidence en 1946 par Lederberg et Tatum (Lederberg & Tatum, 1946). Des associations de bactéries avaient déjà été observées avant 1945 mais ces « accouplements » de bactéries avaient uniquement été décrits sans fournir d'explication sur leur nature. Lederberg et Tatum procédèrent à des expériences ayant pour but de mettre en évidence un transfert de gène lors de ces accouplements de bactérie. Pour cela, ils utilisèrent deux souches d'*E. coli* poly-auxotrophes pour des acides aminés différents. Lorsqu'ils ensemencèrent chacune de ces souches, seules, sur un milieu minimum, ils

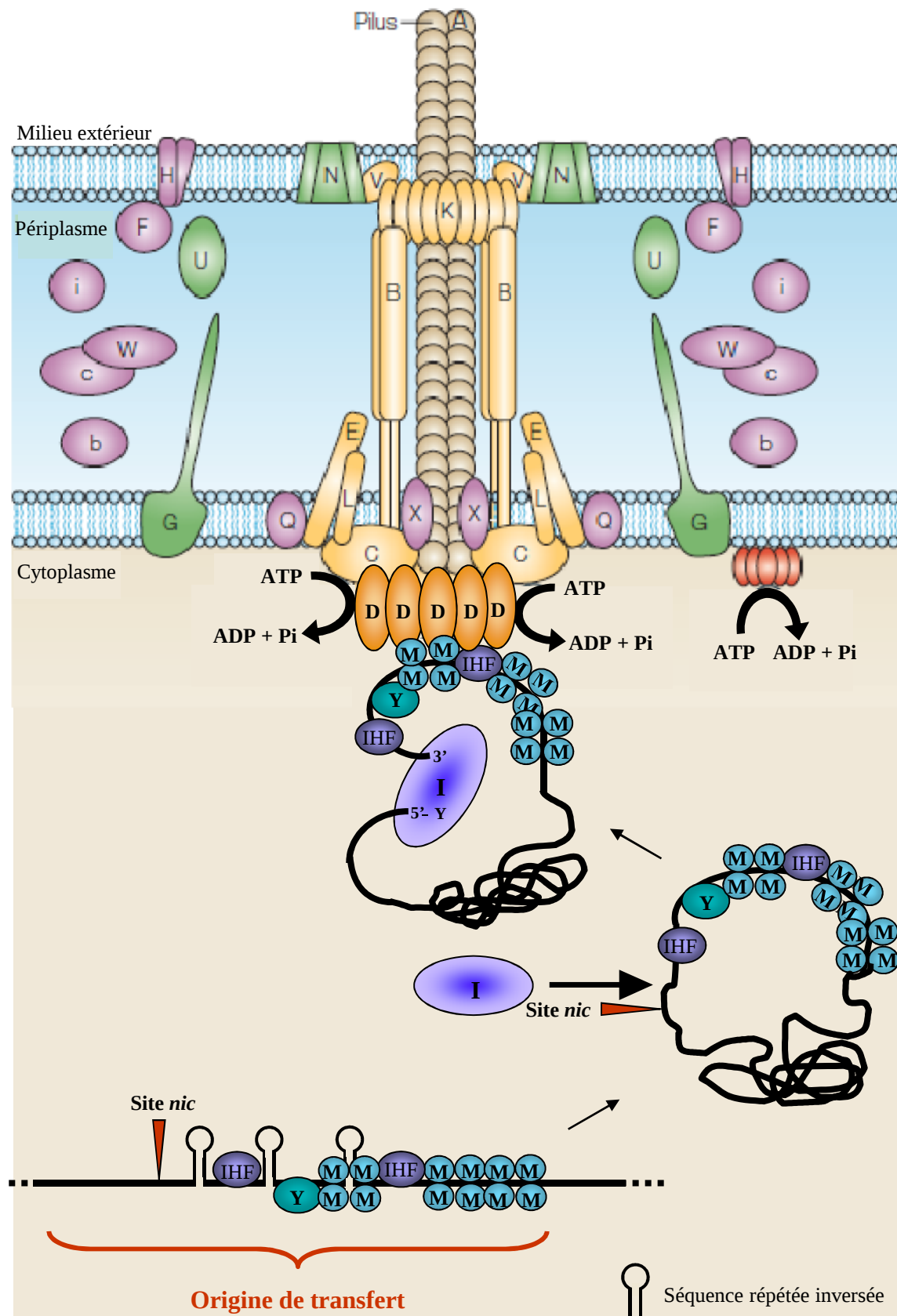


Figure 29 : Mécanisme impliqué dans le transfert du plasmide F. Seul le brin d'ADN transféré est représenté. Les protéines Tra sont désignées par une lettre majuscule, les protéines Trb par une lettre minuscule. En bleu, protéines du relaxosome (relaxase TraI et protéines auxiliaires, TraY, TraM et IHF) ; en orange, protéines de couplage ; en jaune, protéines du transférosome communes à la plupart des systèmes ; en vert et en violet, celles spécifiques au plasmide F ; en rouge, l'ATPase caractéristique des systèmes type-P (VirB11 pour le plasmide Ti). (adaptée de Frost *et al.*, 2005).

n'observèrent aucune culture, mais ils se rendirent compte qu'en ensemençant un mélange de ces deux souches, des colonies avec un caractère prototrophe pour ces acides aminés apparaissaient (Lederberg & Tatum, 1946). Lederberg et Tatum venaient en fait de mettre en évidence le premier plasmide conjugatif, le facteur F, et ses propriétés conjugatives ainsi que sa capacité à s'intégrer sur le chromosome bactérien.

Depuis, les recherches ont permis de montrer que la conjugaison était la propriété des plasmides conjugatifs et des ICE, qui sont les seuls éléments identifiés pour le moment à coder toute la machinerie nécessaire au transfert conjugatif (de la Cruz *et al.*, 2010). Les systèmes de conjugaison possèdent trois composantes : le relaxosome, le transférosome, et la protéine de couplage qui connecte les deux complexes ensemble (Figure 29). Le relaxosome est un complexe nucléo-protéique qui permet l'initiation du transfert conjugatif ainsi que sa terminaison. Ses principaux constituants sont la relaxase : l'enzyme responsable de la coupure spécifique simple brin, et l'origine de transfert (*oriT*) qui est la séquence ADN reconnue par les protéines du relaxosome (Willets & Wilkins, 1984). Outre ces deux éléments, une ou plusieurs autres protéines, dites protéines auxiliaires (ou accessoires), participent à la formation du relaxosome selon les systèmes. Le relaxosome s'assemble au niveau de l'*oriT* superenroulée. Cette fixation des protéines du relaxosome entraînerait des distorsions de l'ADN qui permettrait de faciliter l'action de la relaxase (Howard *et al.*, 1995). Cette dernière agit de manière brin-spécifique au niveau d'un site précis au sein de l'*oriT*, appelé site *nic* (Byrd & Matson, 1997). C'est pourquoi il existe une forte relation de spécificité entre une relaxase et l'*oriT* sur laquelle elle agit. Après clivage au niveau du site *nic*, la relaxase reste covalamment liée à l'extrémité 5' de l'ADN clivé, et elle garderait aussi une certaine affinité pour l'extrémité 3'. Par conséquent, l'action de la relaxase est réversible, un équilibre existerait entre la forme clivée et non clivée de l'*oriT* jusqu'à ce qu'un signal autorisant le début du transfert conjugatif ne parvienne au relaxosome (Lanka & Wilkins, 1995, Byrd & Matson, 1997). Le transférosome, quant à lui, est un complexe multi-protéique transmembranaire constitué d'au moins une dizaine de protéines selon les systèmes. Il est constitué par un système de sécrétion de type IV (T4SS) qui forme un pore à travers la paroi bactérienne et qui permet la synthèse d'un filament extracellulaire, le pilus (Fronzes *et al.*, 2009). Ce complexe, une fois formée, permettrait la reconnaissance d'une cellule réceptrice et établit un contact étroit entre les deux cellules. Ce mécanisme provoquerait alors l'envoi du signal autorisant le début du transfert conjugatif (de la Cruz *et al.*, 2010). Ce signal provoquerait l'activation du relaxosome et donc l'initiation du désenroulement de l'ADN et sa

réplication simultanée en cercle roulant dans le sens 5'-3' comme cela a été démontré pour le plasmide F (Lanka & Wilkins, 1995). Des doutes existent à ce niveau, la nature du signal permettant le début du transfert conjugatif reste inconnue et *a priori*, ce signal parviendrait au relaxosome lorsque celui-ci interagit avec la protéine de couplage (Figure 29) (Lawley, 2004). La protéine de couplage est une protéine de la membrane interne, liée au T4SS, et qui possède au niveau de son extrémité cytoplasmique des motifs de liaisons à des molécules d'ATP, ainsi que ceux permettant l'interaction avec le relaxosome (Tato *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2008). La longueur du brin d'ADN transféré nécessite en effet un transport actif de la molécule à travers la membrane, c'est pourquoi tous les systèmes de transfert décrits possèdent au moins deux protéines avec un rôle d'ATPase. La protéine de couplage permet donc de pomper activement le complexe « relaxase-ADN » à travers le transféosome grâce à l'hydrolyse de molécules d'ATP (Gomis-Ruth *et al.*, 2002). Une fois dans la cellule réceptrice, les mécanismes permettant la reformation de l'élément génétique mobile restent relativement inconnus. L'ADN simple brin serait protégé de l'action des nucléases par des protéines Ssb (single-strand binding protein) et il se circulariserait grâce à l'action réversible de la relaxase. Le brin complémentaire serait alors synthétisé par les mécanismes de réplication de la cellule-hôte ou bien, dans certains systèmes, par des primases qui permettent la synthèse du brin complémentaire à l'aide d'amorces ARN. Les deux cellules sont alors désolidarisées par un mécanisme encore indéterminé (Lawley, 2004; de la Cruz *et al.*, 2010).

Les éléments mobilisables ont un mode de transfert proche des éléments conjugatifs. Cependant, ils ne possèdent pas tous les gènes requis pour réaliser leur propre transfert (Francia *et al.*, 2004). La plupart du temps, les éléments mobilisables possèdent au minimum une séquence *oriT* et un gène codant la relaxase correspondante. Ils peuvent également coder des protéines auxiliaires qui participent à la préparation de l'ADN, et dans certains cas, une protéine de couplage. Les protéines manquantes doivent être apportées en *trans* par un élément conjugatif corésident, notamment les protéines qui entrent dans la composition du T4SS (Lanka & Wilkins, 1995). Les éléments mobilisables seraient donc capables de réaliser les étapes de préparation de l'ADN mais profiteraient des protéines de transfert codées par l'élément conjugatif « helper ». Le transfert des éléments mobilisables sera abordé plus en détail dans la partie C.3.b.

Les systèmes de conjugaison semblent avoir évolué en même temps que les systèmes de réplication puisque, la plupart du temps, les plasmides appartenant à un même groupe d'incompatibilité ont des systèmes de transfert très proches. Un lien entre réplication

végétative et réplication conjugative a été fait pour certains plasmides comme RP4 (IncP) et R1162 (ou RSF1010, IncQ) qui possèdent tous les deux des protéines impliquées dans les deux mécanismes (Motallebi-Veshareh *et al.*, 1992; Henderson & Meyer, 1999). Les systèmes de transfert les mieux étudiés sont ceux des plasmides F et RP4. Bien que le transfert de ces deux plasmides suive le schéma général décrit dans cette partie, ils présentent quelques différences qui ont permis de définir deux systèmes de conjugaisons appelés type-F et type-P (pour le plasmide F et le plasmide RP4 respectivement) (de la Cruz *et al.*, 2010). Les principales différences se situent au niveau de la séquence de leur relaxase, de l'organisation de leur relaxosome, et de leur protéine de couplage. Comme cela sera montré dans la partie C.2, les éléments proches des plasmides F et RP4 présentent les mêmes caractéristiques que ces derniers. Une propriété remarquable qui dépend du système de conjugaison en question est la variabilité du spectre d'hôte dans lequel un élément génétique peut être transféré. Ainsi, les plasmides apparentés au plasmide F ont une mobilité restreinte aux entérobactéries alors que les plasmides du groupe IncP comme RP4 peuvent être retrouvés chez toutes les bactéries Gram négatif, voir chez des bactéries Gram positif (Lawley, 2004). D'autres systèmes comme celui du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* permettent des transferts entre bactéries et cellules eucaryotes (Kado, 1994, Waters, 2001).

c) Mécanismes de régulation du transfert conjugal

Il a été montré que l'efficacité du transfert conjugal était dépendante de plusieurs paramètres physiologiques comme la température, la densité cellulaire, l'oxygénation ou la phase de croissance dans laquelle la bactérie se trouve (Lawley, 2004). La formation de la jonction entre les deux bactéries a tendance à être plus efficace en condition d'aérobie qu'en anaérobie. Toutefois, cette observation est dépendante de la souche donneuse, mais également du milieu utilisé pour réaliser la conjugaison. Ainsi, lorsque des souches d'*E. coli* sont cultivées en bouillon LB, le transfert conjugal du plasmide F est aussi efficace en condition d'anaérobie qu'en présence d'oxygène alors qu'une croissance de ces souches en milieu synthétique ne permet pas la même efficacité de transfert en absence d'oxygène (Stallions & Curtiss, 1972). Cependant, une autre souche d'*E. coli* (MC4100) porteuse du plasmide F a montré une bien plus faible capacité de transfert conjugal en bouillon sans oxygénation (Lawley, 2004). L'oxygénation et la nature du milieu de culture influenceraient la piliation des cellules : en anaérobie, les bactéries qui se sont développées en bouillon synthétiseraient trois à quatre longs pili, alors qu'en milieu synthétique, très peu de pili peuvent être observés

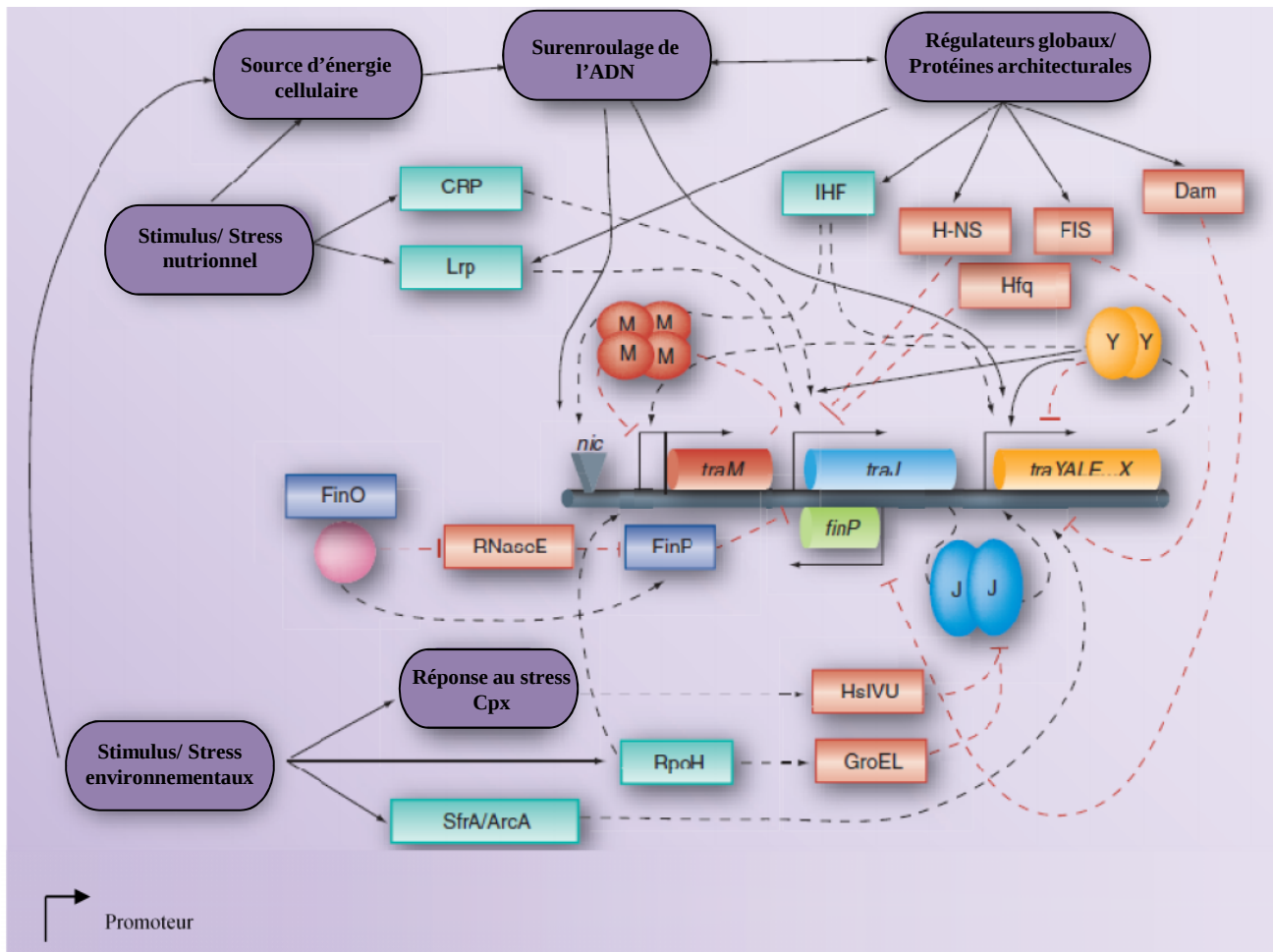


Figure 30 : Mécanismes impliqués dans la régulation du transfert des plasmides du groupe IncF. Les trois régions impliquées dans le transfert (*traM*, *traJ* et l'opéron *traY-traX*) et les protéines avec une fonction dans la régulation codées par ces régions (le tétramère TraM, et les dimères TraJ et TraY) sont représentées. Les formes violettes représentent les facteurs physiologiques et environnementaux qui influencent l'expression des gènes de transfert. Les rectangles représentent les régulateurs codés par le plasmide (en bleu), ou par la cellule hôte (en rouge pour les inhibiteurs, et en bleu clair pour les activateurs). Les lignes pointillés rouge et noir représentent respectivement les effets négatifs et positifs des régulateurs sur le transfert conjugatif (tirée de Frost & Koraimann, 2010).

sur les cellules donneuses. En présence d'oxygène, et quelque soit le milieu, une piliation maximale peut-être observée en phase exponentielle de croissance (Biebricher & Duker, 1984). L'influence de la température dépend surtout du type de plasmide. Le transfert des plasmides de groupe IncF ou IncP (F et RP4) est optimal à 37°C et pour un pH de 7,5 (Lawley, 2004). La formation des pili du plasmide F est quasiment nulle en dessous de 25°C et au dessus de 55°C. A l'inverse, les plasmides du groupe IncH possèdent un système de transfert qui s'assemble de façon optimal à 20°C (Lawley, 2004). La conjugaison du plasmide R27 (IncHI1) serait favorisée à une température comprise entre 22°C et 28°C, cette caractéristique serait due à une régulation transcriptionnelle de ses gènes *tra* (Alonso *et al.*, 2005).

Ces paramètres physiologiques qui influencent l'efficacité de la conjugaison sont certainement impliqués dans des mécanismes de régulation induits par la cellule ou par l'élément génétique lui-même. En effet, la mise en place d'un système de conjugaison représente un coût métabolique conséquent pour la cellule, et nécessite donc des systèmes de régulation. Les plasmides les mieux étudiés, F et RP4, ont permis de mettre en évidence différents types de régulation : le système de transfert du plasmide F semble être régulé en grande partie par des facteurs codés par la bactérie alors que celui du plasmide RP4 semble indépendant de protéines codées par l'hôte puisque seules des protéines codées par le plasmide lui-même seraient impliquées dans sa régulation (Frost & Koraimann, 2010). Cette observation peut apporter une explication sur le spectre d'hôte de ces deux plasmides, celui de RP4 étant plus large que celui du plasmide F. Cependant, hormis pour F et RP4, il existe peu d'informations au niveau moléculaire sur la régulation du transfert d'autres éléments mobiles, seule la capacité à établir une jonction sous différentes conditions a été étudiée pour d'autres éléments (Frost & Koraimann, 2010).

Pour le plasmide F, les différents facteurs de régulation agissent sur les protéines auxiliaires TraM et TraY, et TraJ, ou au niveau de l'expression des gènes codant ces protéines. Les régions impliquées dans le transfert du plasmide F et des plasmides apparentés sont constituées de deux opérons monocistroniques codant les protéines TraM et TraJ et d'un grand opéron polycistronique débutant par le gène *traY* (Figure 30) (de la Cruz *et al.*, 2010). La régulation de ces trois protéines est liée : TraJ active le promoteur de l'opéron *traY-traX* conduisant à l'expression de TraY qui active l'expression de son propre opéron ainsi que celle de TraM. Toutefois, lorsque la concentration de TraM et de TraJ dans la cellule devient trop forte, ces deux protéines répriment leur propre promoteur (Polzleitner *et al.*, 1997).

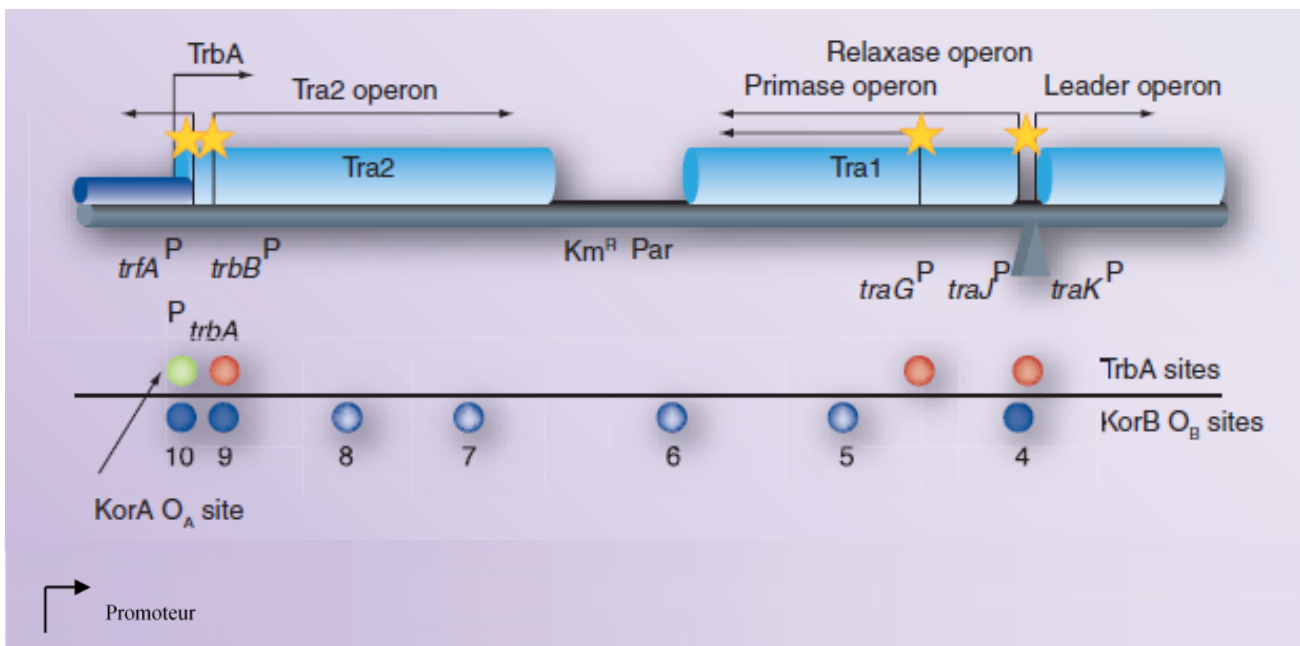
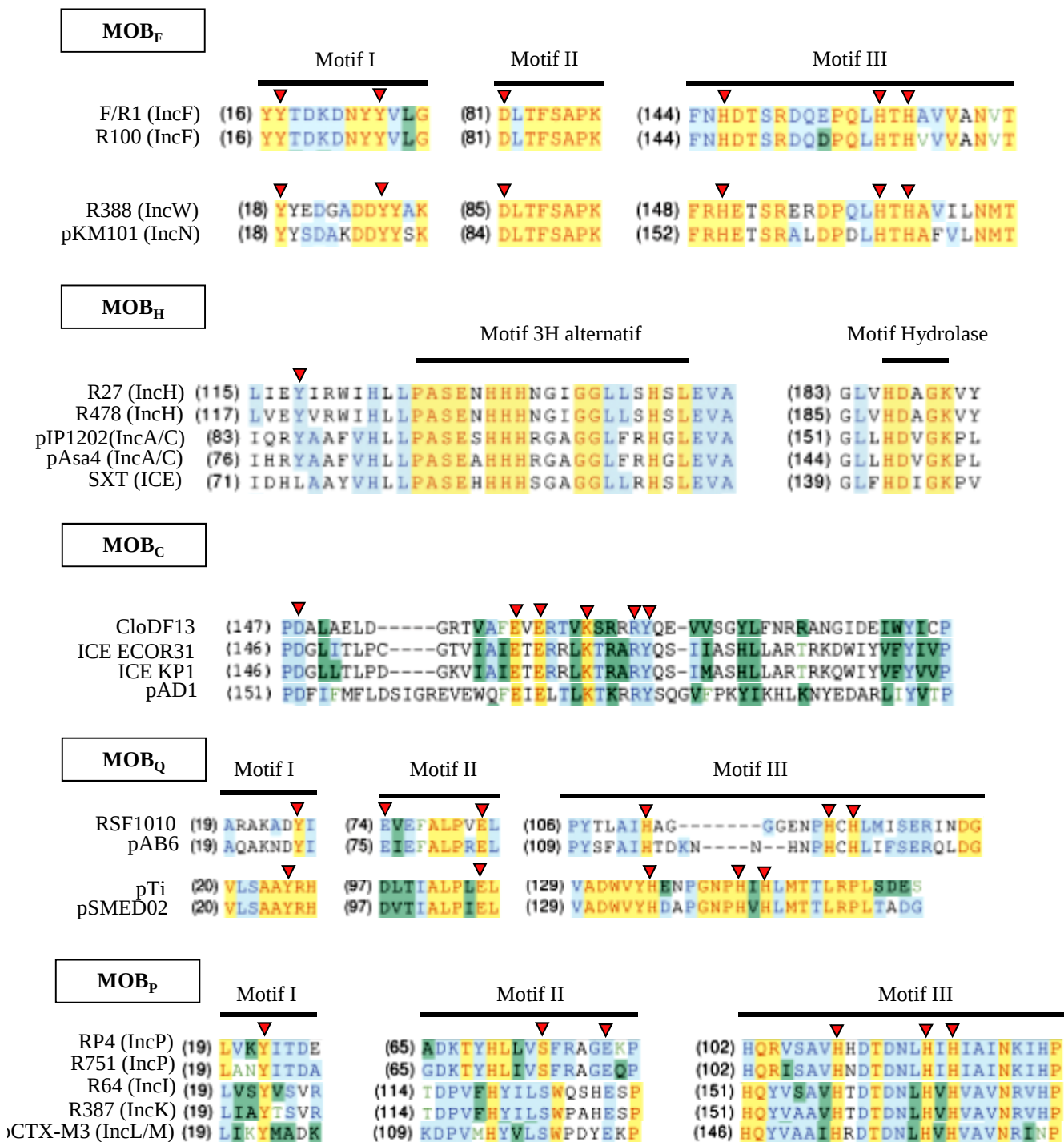


Figure 31 : Mécanismes impliqués dans la régulation du transfert des plasmides du groupe IncP. Les trois opérons impliqués dans le transfert sont représentés en bleu. Les cercles placés en dessous représentent les sites de fixation des protéines KorA (en vert), TrbA (en rouge) et KorB (en bleu foncé pour les sites de forte affinité et bleu clair pour les sites de plus faible affinité). Les étoiles représentent les sites de coopération entre KorA et TrbA, ou entre KorA et TrfA (TrfA permettant une connexion entre la régulation de la réplication et de la conjugaison) (tirée de Frost & Koraimann, 2010).

L'expression de *TraJ*, quant à elle, est contrôlée par un ARN anti-sens *FinP* complémentaire de l'extrémité 5' du gène *traJ*. *FinP* forme alors un duplex ARN-ARN avec l'ARNm de *traJ* empêchant ainsi la fixation du ribosome et donc l'expression de la protéine (Frost & Koraimann, 2010). Un réseau complexe de régulation faisant intervenir des protéines codées par l'hôte comme IHF (Integration Host Factor), Dam, H-NS, SfrA (*ArcA*) et répondant à divers stimuli environnementaux, permet alors de moduler l'expression des gènes *tra* (Figure 30) (Frost & Koraimann, 2010). Par exemple, il a été montré que *ArcA* influençait l'expression des gènes de transfert des plasmides IncF, et notamment de l'opéron *traY-X* du plasmide pSLT (IncF) en réponse à une variation du niveau d'oxygène (Serna *et al.*, 2010). La protéine H-NS, quant à elle, diminuerait le transfert du plasmide F lors de l'entrée en phase stationnaire en réprimant la transcription de *traJ* (Will *et al.*, 2004).

Les plasmides du groupe IncP comme RP4 possèdent un mode de régulation de leur fonction de transfert différent de celui des plasmides IncF, puisqu'il est indépendant de protéines codées par la cellule (Frost & Koraimann, 2010). En effet, ces plasmides régulent eux-mêmes et coordonnent l'expression des gènes impliquées dans la conjugaison, mais aussi dans la répllication et dans la partition des plasmides, grâce à quatre principaux régulateurs : KorA, -B, -C et TrbA (Figure 31). Une cinquième protéine, TrfA, impliquée dans la régulation de la répllication possède un site de fixation au niveau de son promoteur qui chevauche celui de l'opéron *tra2*, créant ainsi un lien entre régulation de la répllication et régulation de la conjugaison (Frost & Koraimann, 2010). KorB semble avoir un rôle central dans ces mécanismes de régulation. Avec ses douze sites de liaisons, dont sept localisés dans la région contenant les gènes de transfert, cette protéine réprime l'expression du système de transfert souvent en association avec les protéines KorA et TrbA qui possèdent des sites de fixations proches de ceux de KorB (Chiu *et al.*, 2008). Ces protéines ne possèdent toutefois pas la même affinité pour chacun de leur site, permettant ainsi une inhibition graduée de l'expression des gènes qu'elles contrôlent (Kostelidou & Thomas, 2000). Cette coopération entre les différentes protéines régulatrices codées par le plasmide crée un réseau complexe de régulation.

Ces deux systèmes abordés ici constituent des bons exemples de systèmes de régulation complexes qui font intervenir plusieurs facteurs pouvant être codés par la cellule ou par le plasmide. Cependant, il existe certainement d'autres mécanismes de régulation comme cela a été décrit dans la partie B.2.b avec l'induction du transfert de l'ICE SXT par la réponse SOS ou l'activation de la transcription des gènes de transfert de Tn916 induite par la présence de



▼ Résidus importants pour la fonction de relaxase

Figure 32 : Motifs conservés des séquences N-terminales des différentes familles de relaxases.
En jaune, résidus invariants ; en bleu, résidus fortement conservés ; en vert, résidus similaires ; en blanc, résidus légèrement conservés ou non conservés (tirée de Garcillan-Barcia *et al.*, 2009).

tétracyclines, mécanisme également décrit pour l'ICE CTnDOT (Jeters *et al.*, 2009). Un dernier exemple intéressant de mécanisme de contrôle du transfert conjugatif dépendant des CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) a été mis en évidence chez *Staphylococcus epidermidis* (Marraffini & Sontheimer, 2008). En effet, outre le rôle des CRISPR dans l'immunité acquise contre les phages (Barrangou *et al.*, 2007), ces petits ARN semblent également pouvoir interférer avec des éléments de la machinerie de conjugaison et donc bloquer le transfert entre bactéries (Marraffini & Sontheimer, 2008).

C.2 Les acteurs de la conjugaison bactérienne

a) Les relaxases

La relaxase est une protéine qui contient habituellement au moins deux domaines. Le domaine relaxase à proprement parlé est toujours localisé du côté N-terminal de la protéine, l'autre domaine varie selon la relaxase en question. Malgré la diversité des relaxases, le domaine relaxase, relativement bien conservé, est la plupart du temps constitué de trois motifs d'acides aminés (Figure 32) (Pansegrau *et al.*, 1994). Le motif I contient le site actif de la protéine qui est souvent un résidu tyrosil responsable de l'attaque nucléophile permettant la liaison protéine-ADN. Le motif II, quant à lui, serait responsable de l'interaction non covalente entre la protéine et l'extrémité 3' de l'ADN clivé, l'absence de ce motif provoque en effet une perte de cette interaction et donc le déenroulement de l'ADN. Enfin, le motif III, qui contient le « motif 3H » composé de trois histidines, semble particulièrement impliqué dans le clivage. Ce motif permet une interaction entre la protéine et des cations divalents, comme Mg^{2+} , indispensable à la réaction de clivage (Lanka & Wilkins, 1995). En effet, l'absence de ce motif entraîne une forte réduction du clivage de l'ADN par la relaxase, bien que la spécificité de l'enzyme pour sa séquence *oriT* ne semble pas affectée (Pansegrau *et al.*, 1994; Lanka & Wilkins, 1995; Byrd & Matson, 1997). L'activité de la relaxase étant retrouvée intacte *in vitro* sans l'aide d'autres protéines, la réaction de transestérification qu'elle catalyse au niveau du site *nic* ne semble pas être dépendante d'autres facteurs protéiques. Les autres composants du relaxosome auraient donc un rôle accessoire dans la réaction de clivage.

Il existe une grande diversité de relaxases qui ont été identifiés sous différents noms selon les systèmes en question (Tableau VIII). Une classification des systèmes de conjugaison a été réalisée en fonction des homologies entre les relaxases qui ont été séquencées. Cette

Tableau VIII : Fonctions et noms des protéines impliquées dans les différents systèmes de conjugaison décrits (adapté de Lawley *et al.*, 2004).

Fonctions	Noms des protéines selon les principaux systèmes de conjugaison décrits (plasmide représentatif)						
	IncFI	IncHI1	IncP	Ti	IncN	IncW	IncI1
	(F)	(R27)	(RP4)	(pTi)	(pKM101)	(R388)	(R64)
Piline	TraA	TrhA	TrbC	VirB2	TraM	TrwM	TraX
Cyclase		TrhP	TraF				
Acétylase	TraX		TrbP				
Lysozyme	Orf169	Orf130		VirB1	TraL		TrbN
Pore	TraL	TrhL	TrbD	VirB3	TraA	TrwL	
Sécrétion	TraC	TrhC	TrbE	VirB4	TraB	TrwK	TraU
Pore	TraE	TrhE	TrbJ	VirB5	TraC	TrwJ	
Pore	TraG	TrhG	TrbL	VirB6	TraD	TrwI	
Lipoprotéine	TraV	TrhV	TrbH	VirB7	TraN	TrwH	
Pore			TrbF	VirB8	TraE	TrwG	
Sécrétine/pore	TraK	TrhK	TrbG	VirB9	TraO	TrwF	TraN
Pore	TraB	TrhB	TrbI	VirB10	TraF	TrwE	TraO
Sécrétion			TrbB	VirB11	TraG	TrwD	TraJ
Pore	TraF	TrhF					
Pore	TraH	TrhH					
Pore	TraW	TrhW					
Pore	TrbC	TrhW					
Pore	TraU	TrhU					
Adhésine	TraN	TrhN					
Relaxase	TraI	TraI	TraI	VirD2	TraI	TrwC	NikB
Transport (protéine de couplage)	TraD	TraG	TraG	VirD4	TraJ	TrwB	TrbC
Protéines auxiliaires	TraY TraM (+IHF)	TraJ TraH	TraH TraJ TraK	VirC2		TrwA (+IHF)	

classification a permis de déterminer six familles de relaxases, MOB_C, MOB_F, MOB_H, MOB_P, MOB_Q, et MOB_V (Figure 32) (Francia *et al.*, 2004; Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). Cependant, les différences entre les familles MOB_P, MOB_Q, et MOB_V ne sont pas toujours évidentes, c'est pourquoi certaines relaxases peuvent appartenir à plusieurs de ces familles. Des relaxases codées par des plasmides des groupes IncF (plasmide F, R1, R100), IncN (pKM101), ou IncW (R388) ont pu être classées dans la famille MOB_F (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). Les principales caractéristiques des relaxases de cette famille sont la présence d'un domaine hélicase à leur extrémité C-terminale ainsi que deux résidus tyrosils dans le motif I (Grandoso *et al.*, 2000; Street *et al.*, 2003). Le domaine hélicase, qui permet sans doute le désenroulement de l'ADN, semble indispensable au transfert mais pas à la réaction de clivage (Matson *et al.*, 2001). Cependant, les autres familles de relaxases ne possèdent pas ce domaine hélicase, et les plasmides correspondants comme RP4 ne semblent pas coder de protéines possédant cette fonction. Toutefois, pour ce dernier, le gène *traE*, qui code un homologue de la topoisomérase III, pourrait assurer ce rôle (Li *et al.*, 1997; de la Cruz *et al.*, 2010). La famille de relaxase MOB_H dont le prototype est la relaxase du plasmide R27 (IncHI1) contient essentiellement des relaxases codées par des plasmides conjugatifs de grandes tailles, ces plasmides appartiennent principalement aux groupes d'incompatibilité IncH, IncJ, IncT et IncA/C (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). La famille MOB_H contient aussi des relaxases codées par des éléments génétiques dérivés de ces groupes comme l'ICE SXT ou des îlots génomiques. Plusieurs sous-classes de la famille MOB_H regroupent des plasmides dont la conjugaison est favorisée à une température inférieure à 37°C (entre 25°C et 30°C) (Sherburne *et al.*, 2000). Une autre sous-classe met en évidence une similarité entre les relaxases codées par les plasmides du groupe IncA/C et celles des ICE de la famille SXT/R391. Outre un motif 3H alternatif à celui de la famille MOB_F, certaines relaxases de la famille MOB_H ont pour particularités de posséder un motif hydrolase dont la fonction dans la conjugaison n'a pas été déterminée expérimentalement, cependant ce motif pourrait jouer un rôle dans la fixation des cations divalents (Figure 32) (Aravind & Koonin, 1998). Les relaxases de la famille MOB_C sont représentées par la relaxase codée par le plasmide CloDF13, qui est un élément mobilisable, et par celle codée par le plasmide pAD1 présent chez *Enterococcus faecalis*. Cette famille contient également des protéines codées par des ICE (ICEKp1 ou ECOR31) ou des éléments proches comme des îlots génomiques présents chez des entérobactéries. Les relaxases de la famille MOB_C diffèrent des autres familles par l'absence des motifs I et III (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). Cependant, un résidu tyrosil serait tout de même responsable de l'attaque nucléophile au niveau du site *nic* de l'*oriT*. Quant au

motif 3H nécessaire pour interagir avec les cations bivalents, il serait remplacé par un motif constitué d'une aspartate et de deux glutamates qui aurait une fonction similaire à la triade d'histidines (Figure 30). Une particularité remarquable est que cette famille contient la seule relaxase, celle du plasmide CloDF13, qui ne resterait pas covalamment lié à l'ADN après la réaction de clivage (Nunez & De La Cruz, 2001). Enfin, les trois dernières familles MOB_P, MOB_Q, et MOB_V sont, en partie, plus difficilement distinguables entre elles. Les relaxases représentatives des familles MOB_P et MOB_Q sont celles codées par les plasmides RP4 et RSF1010 respectivement (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). Or, lors des recherches d'homologies, certaines relaxases montraient des ressemblances aussi bien avec celle de RP4 qu'avec celle de RSF1010. Ces relaxases, communes aux deux familles, forment une sous-classe de la famille MOB_Q dont les membres sont exclusivement codés par des plasmides mobilisables du groupe IncQ, proche de RSF1010 (Francia *et al.*, 2004). Par contre, les autres membres de la famille MOB_Q ne présentent pas de ressemblance avec les relaxases de la famille MOB_P. Les relaxases de cette famille peuvent avoir, en plus du domaine relaxase présent du côté N-terminal, un domaine primase du côté C-terminal qui participerait à la réplication de l'ADN dans la cellule réceptrice (Zhang & Meyer, 1995; Francia *et al.*, 2004). Parmi les relaxases MOB_Q, on retrouve notamment une des deux relaxases codées par le plasmide Ti, d'*A. tumefaciens*. En effet, ce plasmide, responsable de tumeur chez les plantes, a une relaxase, VirD2, qui entre dans son mécanisme de transfert aux cellules de plantes, et une seconde, TraA, qui joue un rôle dans le transfert entre bactéries (Lanka & Wilkins, 1995). La première appartient à la famille MOB_P alors que la seconde appartient la famille MOB_Q (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). La famille MOB_P, quant à elle, est la famille qui contient le plus grand nombre de relaxases, elles sont codées par des plasmides de différents groupes d'incompatibilités (IncP, IncI, IncL/M, IncQ, IncU, IncX) particulièrement impliqués dans la dissémination des résistances aux antibiotiques. Les relaxases MOB_P ont une structure classique avec un seul résidu tyrosil dans le motif I responsable de l'attaque nucléophile et la triade d'histidine habituelle du motif III des relaxases (Figure 32) (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). De la même manière que la famille MOB_Q, une partie des relaxases de la famille MOB_V constituent une sous-classe de la famille MOB_P, ces trois familles pourraient donc être dérivées d'un ancêtre commun. Les relaxases de la famille MOB_V sont codées par différents éléments dont quelques unes par des ICE et des IME comme les transposon Tn4555 et Tn5520 de *Bacteroides*. Les motifs I et III des relaxases sont généralement bien conservés au sein de cette famille, cependant des mutations réalisées dans la séquence de la relaxase du plasmide pBBR1 n'ont pas permis de mettre en évidence un résidu tyrosil impliqué dans la

liaison à l'ADN (Szpirer *et al.*, 2001). Des incertitudes sur les mécanismes d'action au niveau de l'ADN existent donc pour cette famille de relaxase (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009).

Enfin, d'autres relaxases ne possèdent pas d'homologie avec ces six familles comme la relaxase de Tn916 par exemple. Pourtant, cette dernière agit comme la majorité des relaxases décrites précédemment : elle clive l'ADN de Tn916 au niveau d'une séquence *oriT* et reste covalamment attaché à l'extrémité 5' de l'ADN. Des recherches d'homologies réalisées avec la relaxase de Tn916 n'ont révélé aucune similarité avec des relaxases connues, cependant des homologues de cette ORF ont été retrouvés sur un grand nombre d'ICE de bactéries Gram positif (Tn5397, Tn5251, ICESt1, etc.) (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). D'autres systèmes de conjugaison ne semblent pas posséder de relaxases telles que celles décrites précédemment. Le plasmide pCW3 de *Clostridium perfringens* possède un locus de onze gènes impliqués dans la conjugaison mais aucun de ces gènes ne montrent une similarité avec une relaxase connue (Parsons *et al.*, 2007). Il est donc fort probable que de nouvelles protéines possédant ce rôle de relaxase soient identifiées à l'avenir. En effet, outre les systèmes qui ne présentent pas d'homologies évidentes, de nombreux systèmes ne sont pas encore séquencés et pourraient donc apporter de nouveaux éléments pour enrichir cette classification.

b) Les origines de transfert

Les séquences *oriT*, d'une taille pouvant aller de 30 pb à quelques centaines de pb, sont la plupart du temps situées à proximité de la région de transfert (*tra*) qui code toutes les protéines requises pour le transfert conjugal, et souvent dans l'entourage du gène qui code la relaxase. Par définition, la séquence *oriT* est capable de rendre transférable un élément non mobile dès l'instant où toutes les protéines du relaxosome sont apportées en *trans* dans la cellule (Lanka & Wilkins, 1995). En effet, cette région contient différents sites de fixation pour les protéines du relaxosome, notamment pour la relaxase et les protéines auxiliaires. Bien que les régions *oriT* soient différentes entre les systèmes, certaines analogies structurales sont retrouvées pour la plupart de ces régions. Tout d'abord, les *oriT* ont la plupart du temps été identifiées dans des régions riches en nucléotides AT, cette composition nucléotidique permettrait de faciliter la séparation des brins lors de l'initiation du transfert (Lanka & Wilkins, 1995). Ces régions sont également riches en séquences répétées inversées ou directes qui permettent la formation de structures secondaires. Ces motifs constituent probablement des sites de reconnaissance et de fixation pour les protéines du relaxosome (Lanka & Wilkins, 1995). Les régions *oriT* contiennent généralement des courbures intrinsèques (différentes des

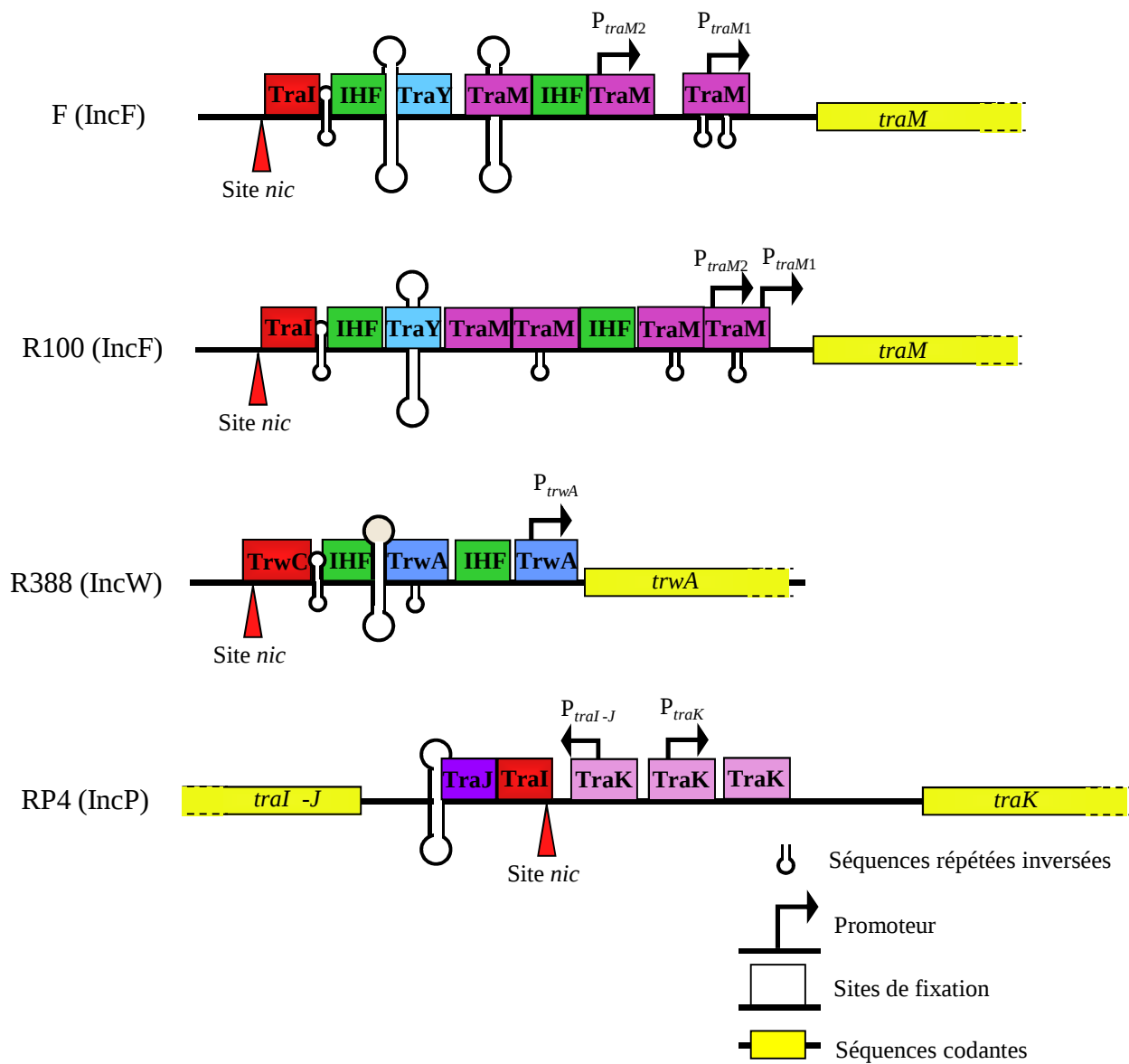


Figure 33 : Exemples d'organisation d'origines de transfert.

courbures extrinsèques causées par la fixation d'une protéine) qui altèrent localement la structure de l'ADN, facilitant ainsi l'accès des protéines à leur site de fixation. Ces courbures peuvent être causées par la composition nucléotidique d'une séquence, les régions riches en nucléotides AT par exemple peuvent être à l'origine de courbures de l'ADN dues à un encombrement stérique causé par le groupement méthyle des thymines, mais ces courbures peuvent également dépendre des concentrations en sels ou en ions divalents (Lanka & Wilkins, 1995).

Parmi les *oriT* les mieux décrites, l'*oriT* du plasmide F mesure environ 250 pb, elle est située juste en amont des gènes codant les protéines qui participent à la formation du relaxosome (Figure 33). Elle contient plusieurs séquences répétées inversées ou directes, et deux courbures intrinsèques, qui sont localisées au niveau des sites de fixations des protéines du relaxosome. Outre le site de fixation pour sa relaxase TraI, l'*oriT* du plasmide F possède trois sites de fixation pour TraM et un site pour TraY, deux protéines auxiliaires codées par le plasmide, ainsi que deux sites pour la protéine IHF codée par l'hôte (voir partie C.2.c) (Gao *et al.*, 1994; Lanka & Wilkins, 1995). La réaction de clivage nécessite seulement la présence de la relaxase TraI et de cations bivalents comme Mg^{2+} . Cependant, la présence des protéines auxiliaires permet d'augmenter l'efficacité du clivage réalisé par la relaxase. Des changements de nucléotides dans les séquences des sites de fixations des protéines IHF et TraY réduisent la fixation de ces protéines, mais ne diminuent pas beaucoup le transfert du plasmide. Par contre, la distance entre ces sites semble important : lorsque des insertions sont introduites entre les sites de fixations des protéines IHF et TraY, la capacité de transfert du plasmide devient beaucoup plus faible (Williams & Schildbach, 2007). Cette information montre l'importance de la coopération entre les protéines du relaxosome pour l'initiation du transfert conjugatif. Contrairement au transfert du plasmide F, celui du plasmide RP4 est indépendant de la protéine IHF. En effet, aucun site de fixation pour cette protéine n'a été mis en évidence sur l'*oriT* de RP4. D'une taille d'environ 350 pb, l'*oriT* de RP4 possède par contre des sites de fixation pour deux protéines auxiliaires codées par le plasmide, TraJ et TraK (Pansegrau *et al.*, 1990). Ces deux protéines avec la relaxase TraI, et la protéine TraH, forment le relaxosome de RP4 (Figure 33). TraJ se lie au niveau du bras droit d'une des séquences répétées inversées présentes au sein de l'*oriT*, de même pour TraK pour laquelle une autre séquence répétée inversée serait impliquée, montrant ainsi l'importance de ces structures secondaires pour la formation du relaxosome (de la Cruz *et al.*, 2010). Les séquences *oriT* des plasmides du groupe d'incompatibilité IncQ, dont le plasmide RSF1010

est le principal représentant, sont très conservées et mesurent au maximum 38 pb. Le transfert de ces plasmides est également indépendant de la protéine IHF. Ces séquences *oriT* possèdent une séquence répétée inversée imparfaite de 10 pb localisée à proximité du site *nic* qui se situe dans une région riche en nucléotides GC. Entre les deux, une région riche en nucléotides AT a été identifiée à partir de laquelle la séparation des brins d'ADN est initiée. Cependant, aucun site de fixation pour les deux protéines auxiliaires, MobC et MobB, codées par ces plasmides n'a pu être clairement mis en évidence alors que ces protéines semblent indispensables au transfert de ces plasmides (Scherzinger *et al.*, 1992; de la Cruz *et al.*, 2010). Le plasmide R6K (IncX), quant à lui, a la particularité de posséder deux séquences *oriT* fonctionnelles sur lesquelles peuvent s'assembler deux relaxosomes simultanément. Les deux sites sont aussi efficaces l'un que l'autre pour permettre le transfert de ce plasmide (Avila *et al.*, 1996). Cette particularité a aussi été retrouvée plus récemment pour un ICE, ICE*clc*, présent chez *Pseudomonas knackmussii* B13 et pour lequel les deux séquences *oriT* peuvent également être utilisées pour initier le transfert de l'élément (Miyazaki & Van der Meer, 2011).

Plus généralement, des similitudes sont souvent observées entre les origines de transfert des plasmides codant des relaxases appartenant à une même famille (voir partie C.2.a). Ainsi, l'origine de transfert de plasmide R388, dont la relaxase est proche de celle du plasmide F (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009), possède également des sites de fixation pour la protéine IHF (Figure 33) (Moncalian *et al.*, 1997). Les plasmides R1, R100 ou pED208, proche du plasmide F également, ont des origines de transfert similaires avec un site *nic* conservé entre elles et des sites de fixation pour les mêmes protéines auxiliaires, bien que la position et le nombre de ces sites varient selon les plasmides (Inamoto *et al.*, 1994). Ces séquences *oriT* sont par contre différentes de celles du plasmide RP4 et des plasmides apparentés (IncQ, etc.), qui eux sont indépendants de la protéine IHF, mettant ainsi en évidence une différence notable entre les systèmes type-F et les systèmes type-P (de la Cruz *et al.*, 2010).

c) Les protéines auxiliaires du relaxosome

En plus de la relaxase, trois ou quatre autres protéines, selon les systèmes, participent à la formation du relaxosome mais pas au clivage lui-même. Cependant, l'initiation du transfert ne peut se faire sans ces protéines. Ces protéines dites auxiliaires peuvent avoir un (ou plusieurs) site(s) de fixation au niveau de l'*oriT*, certaines d'entre elles interagissent uniquement avec d'autres protéines pour stabiliser le complexe (de la Cruz *et al.*, 2010). Toutefois, chaque

système possède au moins une protéine auxiliaire caractérisée par un motif RHH (ribbon-helix-helix) qui permet la liaison avec l'ADN (TraY et TraM pour F, TrwA pour R388, TraJ pour RP4, VirC2 pour le plasmide Ti, ...) (Tableau VIII) (Bowie & Sauer, 1990; Moncalian & de la Cruz, 2004; Lu *et al.*, 2009). La fixation de ces protéines induit notamment des courbures de l'ADN qui permettent de faciliter l'action de la relaxase au niveau du site *nic*. Comme cela a été cité précédemment, des protéines codées par le chromosome bactérien, comme la protéine IHF, peuvent jouer un rôle dans certains systèmes, cependant les systèmes indépendants d'éléments codés par le chromosome bactérien auront tendance à avoir un plus large spectre d'hôte à partir duquel le transfert est possible, comme c'est le cas pour les plasmides IncQ ou IncP (Lawley, 2004). La protéine IHF est une protéine impliquée dans plusieurs processus cellulaires comme la réplication, la régulation transcriptionnelle, ou lors d'événements de recombinaisons sites-spécifiques. En effet, sa fixation provoque des courbures de l'ADN qui permettent généralement de faciliter l'accès d'une autre protéine à son site d'action comme c'est le cas avec la relaxase lors de la formation du relaxosome (Gomis-Ruth & Coll, 2006). Il existe deux principaux types de relaxosome décrits, les relaxosome type-F et type-P dont les principaux représentants sont respectivement le plasmide F et le plasmide RP4.

Les systèmes de transfert apparentés au plasmide F nécessitent plusieurs protéines auxiliaires dont les protéines TraM et TraY. Ces deux protéines permettent d'améliorer le clivage réalisé par la relaxase, l'absence de l'une pouvant être compensée par la présence de l'autre (Karl *et al.*, 2001). Par contre l'absence de ces deux protéines diminue nettement la réaction de clivage. La protéine IHF, quant à elle, est indispensable à cette réaction puisque aucun clivage n'a pu être montré en son absence. En ce qui concerne le transfert, la présence de la protéine TraM est indispensable et ne peut être compensé par TraY, qui elle, n'est pas obligatoire. TraM a donc un rôle supplémentaire par rapport à TraY qui sera abordé dans la partie suivante (Karl *et al.*, 2001). TraM a également un rôle dans la régulation de l'expression des gènes de transfert. L'un de ses sites de fixations, situé au niveau de son promoteur, permet notamment de réguler sa propre transcription (Polzleitner *et al.*, 1997). Le système de transfert du plasmide R388 montre encore une fois des ressemblances avec celui du plasmide F. Outre la protéine IHF, le plasmide R388 n'aurait cependant qu'une seule protéine auxiliaire, TrwA, qui regrouperait les rôles des protéines TraY et TraM du plasmide F. En effet, la partie N-terminale de TrwA est homologue à TraY, alors que sa partie C-terminale contient, comme TraM, des motifs qui permettent de former des tétramères

(Moncalian *et al.*, 1997). De plus, une surexpression de TrwA entraîne une diminution du transfert conjugatif puisque, comme TraM, la fixation de TrwA sur un de ses sites au sein de l'*oriT* provoque une répression de la transcription de l'opéron *trwABC*, qui codent les protéines du relaxosome, ainsi que la protéine de couplage. Enfin, comme TraM et TraY, TrwA améliore la réaction de clivage réalisée par la relaxase TrwC (Moncalian *et al.*, 1997). A l'inverse, la protéine IHF semble avoir des rôles opposés entre les systèmes des plasmides F et R388. Alors qu'elle semble augmenter la réaction de clivage réalisée par la protéine TraI du plasmide F, sa fixation sur la séquence *oriT* du plasmide R388 inhiberait le clivage effectué par la relaxase TrwC de ce plasmide (Nelson *et al.*, 1995; Moncalian *et al.*, 1999b).

Le relaxosome du plasmide RP4 est constitué de la relaxase TraI associée aux protéines auxiliaires TraK, TraH et TraJ (de la Cruz *et al.*, 2010). Les protéines TraJ et TraK, qui possèdent des sites de fixation au niveau de l'*oriT*, recruterait la relaxase soit en altérant la topologie de l'ADN pour permettre l'accès à son site de fixation, soit par interaction protéine-protéine (Pansegrau *et al.*, 1990). La protéine TraH ne possède pas de site de fixation au niveau de l'*oriT*, elle participerait cependant au complexe par des interactions protéine-protéine qui permettraient de stabiliser le complexe (Byrd & Matson, 1997).

d) Les protéines de couplage

Bien que le transfert de l'ADN soit piloté par la relaxase, la longueur du brin d'ADN nécessite un transport actif de la molécule. Les protéines de couplage des différents systèmes permettraient d'assurer cette fonction en pompant activement le complexe nucléo-protéique grâce à l'hydrolyse de molécules d'ATP afin de le faire passer dans le canal formé par le T4SS. Ce rôle des protéines de couplage est conforté par leur séquence qui est similaire à celle de protéines impliquées dans le transport d'ADN auxquelles sont assimilées les protéines de la famille FtsK. Cette dernière, tout comme les protéines de couplage, est enchâssée dans la membrane interne via son extrémité N-terminale et possède une extrémité C-terminale cytoplasmique contenant des motifs de liaison à l'ATP (Errington *et al.*, 2001).

D'un certain point de vue, ces protéines permettraient de « coupler » deux processus bactériens, à savoir la réplication de l'ADN et le transport de protéines à travers la paroi, pour en créer un troisième, spécialisé dans l'échange de matériel génétique entre bactéries (Llosa *et al.*, 2002). En effet, les systèmes de conjugaison présentent des similarités à la fois, avec les mécanismes de réplication en cercle roulant (Waters & Guiney, 1993) et les transporteurs

formés par l'assemblage d'un T4SS (Christie, 2001), ces deux mécanismes pourraient donc avoir évolué et s'être associés grâce aux protéines de couplage pour permettre le transfert d'éléments génétiques entre bactéries.

D'une manière générale, ce rôle de liaison entre les deux complexes impliqués dans le transfert est démontré car les protéines de couplage interagissent aussi bien avec des composants du relaxosome, qu'avec ceux du transférosome. Cependant, vu que leur absence n'empêche ni la formation des pili, ni celle du relaxosome, elles n'entrent donc pas dans la composition de ces deux complexes. Les protéines de couplage sont des protéines membranaires hexamériques retrouvées dans tous les systèmes de conjugaisons : cette fonction est apportée par TrwB pour R388, TraD pour F, TraG pour RP4 ou R27 et VirD4 pour le plasmide Ti (Tableau VIII) (Gomis-Ruth *et al.*, 2002). Il est intéressant de noter que les protéines de couplage semblent avoir évolué en même temps que la relaxase à laquelle elles sont associées. En effet, lors de la classification des relaxases, les auteurs ont remarqué que la phylogénie des protéines de couplage correspondait à la phylogénie des relaxases appartenant au même système (Garcillan-Barcia *et al.*, 2009). Les différences entre les systèmes de conjugaison type-F et type-P sont retrouvées au niveau de leur protéine de couplage.

Les systèmes apparentés à celui du plasmide F ont une protéine de couplage qui interagit au niveau du relaxosome avec une protéine auxiliaire. En effet, la protéine de couplage du plasmide F (ainsi que celle des plasmides apparentés), TraD, possède une forte affinité pour la protéine auxiliaire TraM, c'est pourquoi l'absence de TraM empêche tout transfert conjugatif (Disque-Kochem & Dreiseikermann, 1997; Beranek *et al.*, 2004). Cette relation est retrouvée pour le plasmide R388 pour lequel la protéine de couplage TrwB interagit principalement avec la protéine auxiliaire TrwA (Llosa *et al.*, 2003). Le système de transfert du plasmide RP4 est un peu différent. Bien qu'ils possèdent également des protéines auxiliaires, sa protéine de couplage TraG interagit directement avec la relaxase (Schroder *et al.*, 2002). Toutefois, dans les deux types de systèmes, un lien a été fait entre protéine de couplage et relaxosome. La protéine de couplage de R388 a été particulièrement étudiée. Un lien a notamment été fait entre elle et le transférosome grâce à l'interaction entre TrwB et la protéine TrwE qui entre dans la composition du T4SS (Llosa *et al.*, 2003). La capacité de TrwB à lier l'ATP a également été démontrée via son extrémité C-terminale cytoplasmique. La fixation d'ATP est indispensable au transfert conjugatif puisqu'un seul changement d'acide aminé dans le site de liaison à l'ATP de TrwB empêche tout transfert (Llosa *et al.*, 2003). TrwB se lie également de

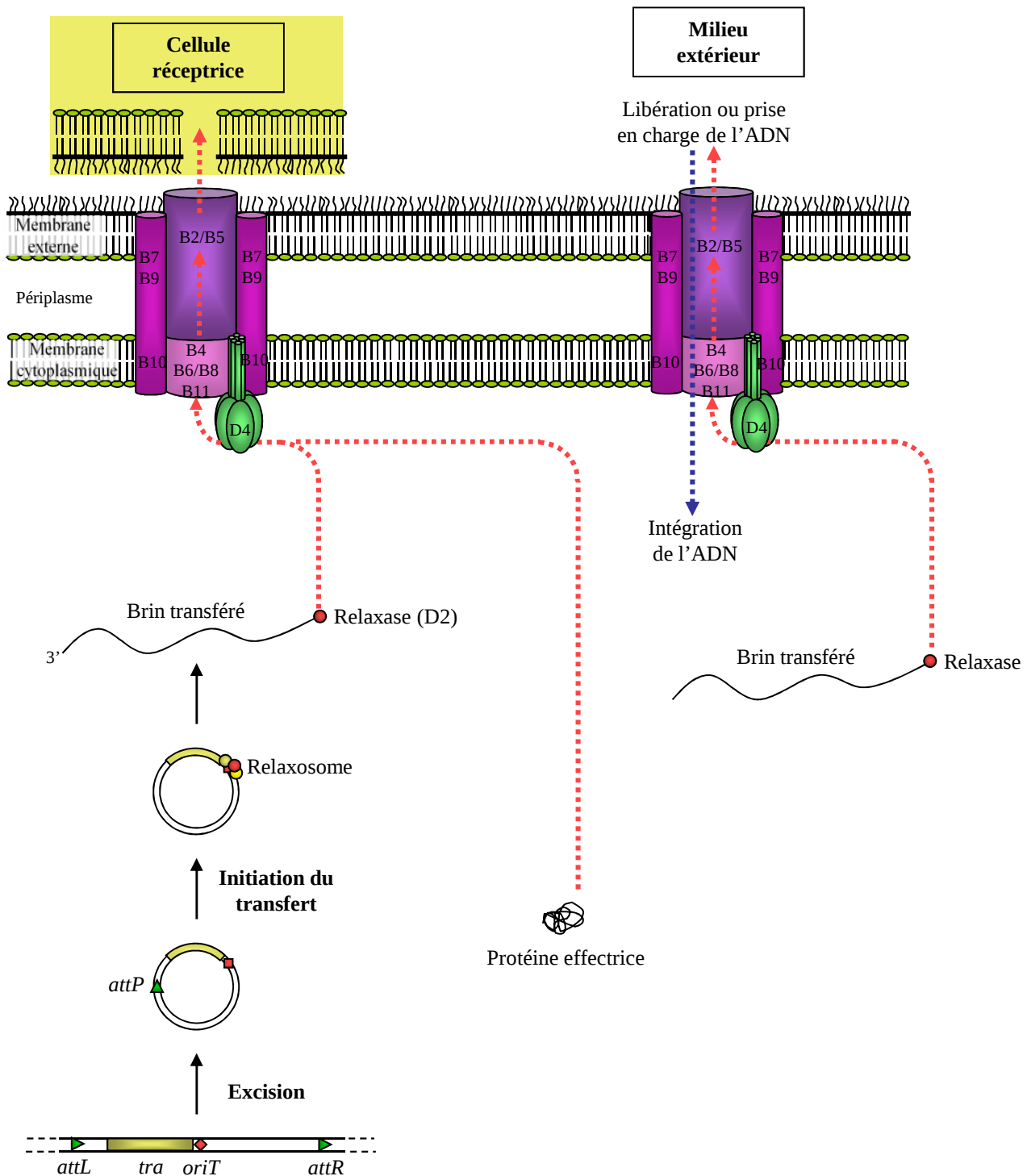


Figure 34 : Représentation des différents rôles des T4SS. Les protéines représentées sont celles du système VirB du plasmide Ti. Outre le transfert conjugatif, les T4SS sont aussi impliqués dans le transfert de molécules effectrices ou dans le transfert et/ou la prise en charge d'ADN à partir du (ou vers) le milieu extérieur (adaptée de Alvarez-Martinez & Christie, 2009).

manière non spécifique à l'ADN, une telle liaison a également été mise en évidence pour la protéine de couplage TraG de RP4 (Schroder *et al.*, 2002). Grâce à ces études, un modèle de fonctionnement des protéines de couplage peut être mis en place. Ces protéines font clairement l'interface entre relaxosome et transférosome grâce à leur localisation à la fois cytoplasmique et enchâssée dans la membrane interne. Elles sont indispensables au mécanisme de conjugaison puisque leur inactivation aboutit à une absence de transfert (Moncalian *et al.*, 1999a). L'hydrolyse de molécules d'ATP étant également nécessaire au transfert, elles permettraient d'apporter de l'énergie au système afin que le complexe nucléoprotéique soit transporté à travers le T4SS. Un autre point intéressant est que l'interaction entre la protéine de couplage et le relaxosome est plus spécifique que celle entre la protéine de couplage et le transférosome. Ainsi, un relaxosome et sa protéine de couplage pourront utiliser plusieurs types de T4SS. La protéine de couplage de R388 peut en effet interagir avec des protéines orthologues à la protéine du transférosome TrwE (celles des systèmes des plasmides R6K et pKM101) (Llosa *et al.*, 2003). A l'inverse, aucune interaction n'a été mise en évidence entre la protéine auxiliaire TrwA et la protéine de couplage de pKM101, alors que cette dernière partage 40% d'identité avec TrwB, et que les deux protéines ont des caractéristiques similaires (poids moléculaires, structures secondaires) (Llosa *et al.*, 2003). Ces problèmes de spécificités sont importants pour le transfert des éléments mobilisables. La plupart de ces systèmes ne codant pas leur propre protéine de couplage, leur relaxosome doit donc correspondre aux critères de spécificité imposés par la protéine de couplage pour pouvoir être mobilisé comme cela sera abordé dans la partie C.3.b.

e) Le transférosome

Les systèmes de sécrétion qui traversent la membrane sont classiquement regroupés dans six familles. Parmi ces familles, les T4SS permettent de sécréter dans le milieu extérieur ou d'injecter directement dans une autre cellule des protéines ou de l'ADN (Wallden *et al.*, 2010). La plupart d'entre eux requiert une protéine avec un rôle d'ATPase, comme les protéines de couplage, pour apporter l'énergie nécessaire au transport de l'ADN ou de la protéine (Alvarez-Martinez & Christie, 2009; Jurik *et al.*, 2010). Les T4SS sont les seuls parmi les systèmes de sécrétions connus à pouvoir transporter de l'ADN, même si dans le cadre de la conjugaison, le substrat transporté semble plutôt être la relaxase à laquelle l'ADN est lié et non pas l'ADN directement (Christie, 2001). D'une manière générale, les T4SS permettent trois types de transport : le transport de molécules effectrices vers une cellule-cible

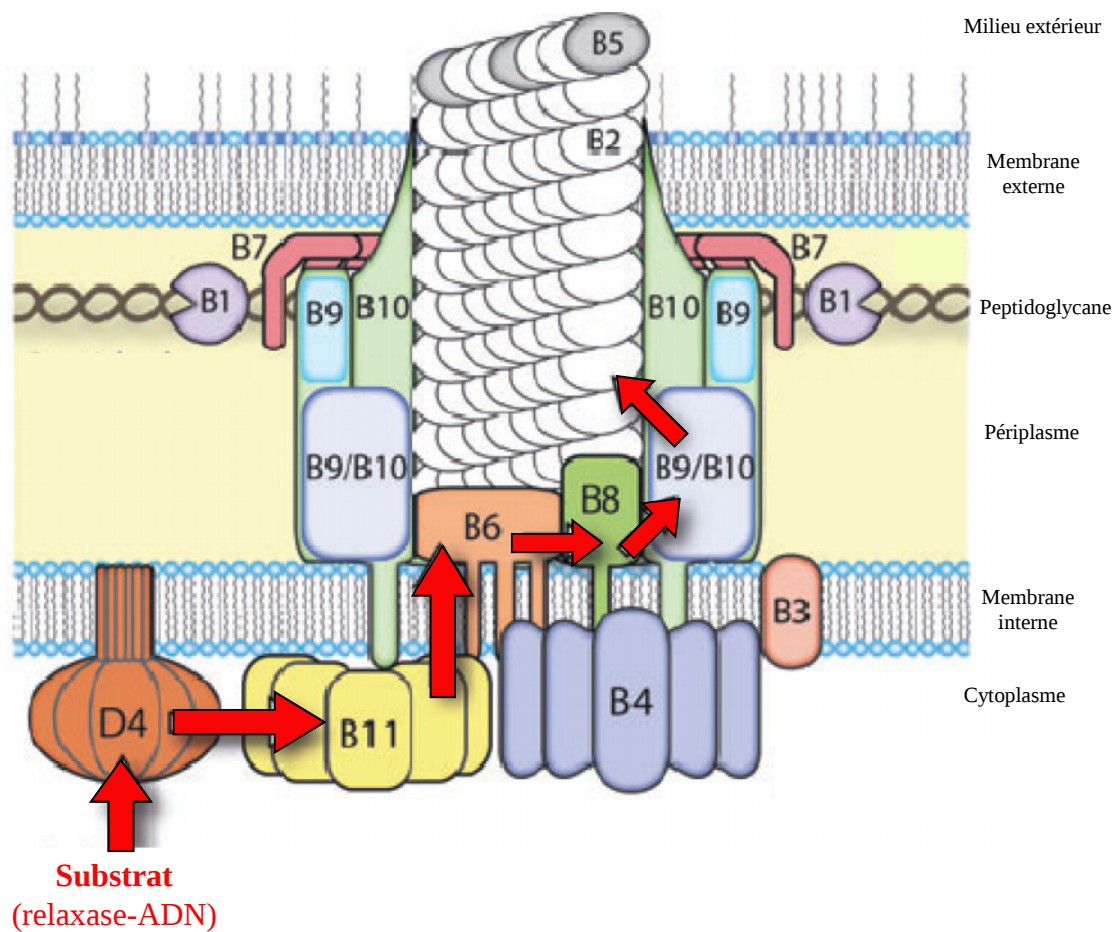


Figure 35 : Système de transférosome VirB/D4 du plasmide Ti. Les flèches rouges représentent le trajet suivi par le substrat (relaxase+ADN dans le cas des éléments conjuguatifs) (adaptée de Wallden *et al.*, 2010).

eucaryote, la libération ou la prise en charge d'ADN à partir du milieu extérieur et le transport d'ADN vers une cellule réceptrice par contact entre les cellules (Figure 34) (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). En effet, les T4SS ne servent pas seulement à la conjugaison bactérienne, ils permettent également d'exporter différents types de macromolécules : des toxines produites par *Bordetella pertussis* vers le milieu extérieur, la protéine CagA d'*Helicobacter pylori* vers les cellules épithéliales gastriques où elle induit des interférences dans les voies de signalisation de la cellule, ou encore des protéines permettant à certaines bactéries de survivre dans les cellules phagocytaires (Burns, 2003, Backert & Selbach, 2008). Ainsi, des gènes homologues aux gènes codant le T4SS du plasmide Ti d'*A. tumefaciens* ont été retrouvés chez différentes espèces comme *Legionella pneumophila*, *Brucella suis* ou *Brucella abortus*, ou encore *Rickettsia prowazekii* (Alvarez-Martinez & Christie, 2009).

En ce qui concerne la conjugaison bactérienne, le T4SS le plus étudié est celui du plasmide Ti (Figure 35). Les autres T4SS codés par les bactéries Gram négatif étant très proches de celui du plasmide Ti, cette partie sera principalement consacrée à celui-ci, les principales différences observées avec les autres systèmes étant le nombre de sous-unités impliquées et quelquefois la composition qui peut varier légèrement (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Cependant, la plupart des systèmes possèdent des gènes homologues à ceux qui codent les protéines du T4SS du plasmide Ti. Ainsi, pour le plasmide R388, onze gènes, *trwD* à *trwN*, proches de gènes présents sur le plasmide Ti, participeraient à la formation de son transférosome (Tableau VIII) (Gomis-Ruth *et al.*, 2002). De même pour le plasmide F, la formation du pilus requiert six protéines (TraA, -L, -E, -K, -C, et -G) (Figure 29). Cependant, ces protéines ne sont pas suffisantes pour établir une jonction entre les cellules. En effet, l'extension du pilus qui permet d'établir cette jonction impliquerait six autres protéines (TraB, -F, -H, -W, et -V, ainsi que TrbC). Enfin, deux autres protéines, TraP et TrbI, seraient impliquées dans la stabilité du pilus et la détermination de sa longueur (Lawley, 2004).

Le T4SS du plasmide Ti est composé de onze protéines associées à la protéine de couplage VirD4 (Figure 35) (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Les protéines VirB4 et VirB11 sont des ATPases. En effet, la plupart des systèmes ont une ou deux protéines qui apportent cette fonction, en plus de la protéine de couplage. À l'inverse de cette dernière, les autres ATPases entrent dans la composition du T4SS et seraient impliquées dans la formation de la structure transmembranaire et dans la synthèse du pilus. Les deux principaux systèmes de transfert, type-F et type-P, diffèrent également à ce niveau là : le plasmide F ne possède qu'une seule ATPase dans son T4SS (TraC proche de VirB4) (Lawley *et al.*, 2003), alors que

le plasmide RP4 en possèdent deux (TrbB et TrbE) comme le plasmide Ti. La protéine VirB4, comme la protéine de couplage VirD4, est enchâssée dans la membrane interne et possède une extrémité cytoplasmique qui contient les motifs de liaison à l'ATP. La protéine VirB11, bien qu'elle soit associée à la membrane, ne semble pas être enchâssée dedans, son homologue TrbB de RP4, principalement cytoplasmique, confirme cette localisation (Alvarez-Martinez & Christie, 2009).

Quatre protéines permettent au T4SS de traverser la membrane interne : VirB3, VirB6, VirB8 et VirB10 (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Des homologues à ces quatre protéines sont codés par tous les systèmes. VirB3 interagirait avec les protéines VirB4 et VirB2 au niveau de la membrane interne, dans certains systèmes les protéines VirB3 et VirB4 étant même fusionnées (Christie *et al.*, 2005). La protéine VirB6 est formée d'une extrémité N-terminale périplasmique, de cinq domaines transmembranaires et d'une extrémité C-terminale cytoplasmique. Elle jouerait un rôle dans l'exclusion d'entrée qui permet d'éviter le transfert redondant d'un élément conjugatif vers une cellule donneuse comme cela a été montré pour SXT entre autre (Marrero & Waldor, 2007, Alvarez-Martinez & Christie, 2009). Les protéines VirB8 et VirB10 sont des protéines bitopiques avec une grande extrémité périplasmique. Ces deux protéines joueraient un rôle central puisqu'elles interagissent avec plusieurs composants du T4SS. La protéine VirB10 subit des changements conformationnels induits par l'hydrolyse d'ATP réalisée par les ATPases. Cet apport d'énergie lui permettrait de relier et de stabiliser les protéines de la membrane interne et de la membrane externe (Alvarez-Martinez & Christie, 2009).

La partie la plus externe du T4SS est constituée des protéines VirB1, VirB7 et VirB9 (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). La protéine VirB1 est une transglycosylase qui permet notamment de faciliter la synthèse du T4SS en dégradant localement le peptidoglycane, elle est donc essentiellement périplasmique (Zahrl *et al.*, 2005). Les protéines VirB7 et VirB9 sont particulièrement associées à la membrane externe. VirB7 est une petite lipoprotéine qui ne possède pas toujours d'homologues dans les autres systèmes. Cependant, beaucoup de systèmes possèdent une lipoprotéine dont la séquence n'est pas similaire mais qui jouerait le même rôle (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). VirB7 interagirait particulièrement avec VirB9 qui est une protéine hydrophile périplasmique liée à la membrane externe. Avec VirB10, ces deux protéines, VirB7 et VirB9, constituent « l'échafaudage » du T4SS, formant ainsi un canal à travers lequel les sous-unités VirB2 s'assemblent pour former le pilus (Alvarez-Martinez & Christie, 2009). En effet, le pilus est constitué d'un assemblage de sous-

unités de piline VirB2 qui traverse la paroi des bactéries. La protéine VirB5 est localisée à l'extrémité des pili où elle permettrait d'assurer le contact entre les cellules donneuses et réceptrices (Aly & Baron, 2007).

En résumé, le substrat est pris en charge par la protéine de couplage (VirD4 pour le plasmide Ti) (Figure 35). Cette dernière, ainsi que l'ATPase VirB4 peuvent être considérées comme des sites de chargement pour le substrat (Middleton *et al.*, 2005). Le substrat interagit ensuite avec VirB11, VirB6 et VirB8 pour traverser la membrane interne et passe alors dans le pilus via la protéine VirB9 jusqu'à la membrane externe (Wallden *et al.*, 2010). Ce mécanisme de translocation est probablement similaire pour tous les systèmes de transfert conjugatif des bactéries Gram négatif. Parmi toutes les protéines du T4SS, six (l'ATPase VirB4, VirB6, la transglycosylase VirB1, VirB7, VirB10, et VirB11) sont très conservées et présentes dans la plupart des systèmes de transfert des bactéries Gram négatif (Alvarez-Martinez & Christie, 2009).

Bien que les T4SS aient une organisation similaire au niveau moléculaire, les pili formés diffèrent selon les systèmes. Encore une fois, les différences entre les systèmes type-P (plasmide RP4) et type-F (plasmide F) permettent de définir deux catégories de pili (Lawley, 2004). Les pili type-F, présents dans les groupes d'incompatibilités IncF et IncHI1 entre autres, sont généralement longs et flexibles et sont capables d'assurer un transfert conjugatif en milieu liquide alors que les pili type-P (groupes d'incompatibilités IncP, IncN, IncL/M, IncI entre autres) sont plutôt courts et rigides et ils permettent plutôt des transferts sur milieu solide. Un troisième type de pili, appelée type-I, peut être décrit. Ils sont apparentés aux pili type-P mais ils possèdent un système de stabilisation en plus par rapport à ces pili. Ce rôle est assuré par un second type de pili, plus fins, assemblés par un système de sécrétion de type II (Lawley, 2004). La stabilisation de la jonction entre les cellules est nécessaire surtout pour les conjugaisons en milieu liquide. Les systèmes type-F sont dotés de pili rétractables, dont l'extension est permise par addition de sous-unités de piline, et de deux protéines, TraG et TraN, qui assurent la stabilisation de la jonction. Aucun système de stabilisation n'a été mis en évidence pour les pili type-P (Bradley, 1984, Lawley, 2004).

C.3 Mécanismes de conjugaison des éléments reliés à SGI1

a) Les ICE : des îlots génomiques conjuguatifs

Les îlots génomiques dont les caractéristiques ont été citées précédemment (partie B.3.c) regroupent aussi bien des éléments mobiles que des éléments immobiles, ces derniers ayant certainement perdus leur fonction de transfert au cours de l'évolution (Juhas *et al.*, 2009). Cependant, la majorité des îlots génomiques mobiles sont désormais classés dans la catégorie des ICE ou des IME selon le mode de transfert qu'ils sont capables d'effectuer. Une fois excisés du chromosome, les ICE se présentent sous la forme d'un intermédiaire circulaire, incapable de se répliquer de façon autonome mais, qui semble doté des mêmes mécanismes de conjugaison que les plasmides conjuguatifs classiques. En effet, bien que le transfert des ICE soit moins bien documenté dans la littérature que celui des plasmides, les protéines impliquées dans le transfert des ICE et des plasmides semblent similaires. Chez plusieurs ICE, des éléments du relaxosome (*oriT* et relaxase), potentiels ou prouvés expérimentalement, ont été identifiés. Le transposon Tn916, premier élément intégratif et conjuguatif identifié, possède une séquence *oriT* de 466 pb qui contient six séquences répétées inversées de 10 à 20 pb (Jaworski & Clewell, 1995). L'*oriT* de Tn916 possède trois séquences qui présentent une identité quasi parfaite (9 nucléotides sur 12) avec la séquence consensus du site *nic* des plasmides IncP, mais aussi une région similaire au site *nic* du plasmide F (Jaworski & Clewell, 1995). Le rôle de relaxase serait assuré par une protéine codée par l'ORF20. Cependant, sans l'aide de l'intégrase codée par l'élément, la relaxase de Tn916 ne possède pas, *in vitro*, d'activité site- et brin-spécifique, elle est capable de cliver l'ADN double brin au niveau de différents sites. L'intégrase, qui joue un rôle important dans l'excision et l'intégration de l'élément, possède en plus un site de liaison au niveau de l'*oriT* (Hinerfeld & Churchward, 2001), elle permettrait de guider la relaxase et d'assurer sa spécificité de clivage puisqu'en sa présence, la relaxase réalise un clivage simple brin site-spécifique. L'intégrase de Tn916 peut donc être considérée comme une des protéines auxiliaire du relaxosome de Tn916 (Rocco & Churchward, 2006). L'*oriT* et la relaxase de l'ICE ICEBs1 de *Bacillus subtilis* ont également été identifiées. Bien que ces deux composants du relaxosome soient proches de l'*oriT* et de la relaxase de Tn916, l'intégrase de ICEBs1 ne semble pas nécessaire, *in vivo*, à la spécificité de clivage de la relaxase (Lee & Grossman, 2007). Des éléments de réponse concernant le transfert des ICE appartenant à la famille SXT/R391 ont également été publiés. Une région comprenant les gènes *traI*, *traD* et *traJ* codant potentiellement une

relaxase, une protéine de couplage et une protéine auxiliaires, respectivement, semble impliquée dans le transfert de ces ICE puisque l'absence d'un de ces gènes empêche le transfert de SXT (Beaber *et al.*, 2002b). En plus de ces trois gènes, un autre gène de SXT, *mobI*, interagirait avec l'*oriT* qui a été localisée dans une région de 299 pb à proximité de ce gène *mobI* (Ceccarelli *et al.*, 2008). Outre ces gènes qui participeraient à la formation du relaxosome de SXT, quatorze autres gènes avec des fonctions putatives de transfert ont été localisés dans trois autres clusters. Les protéines codées par ces gènes participent probablement à la formation des pili. Ces gènes présentent notamment des similarités avec les gènes de transfert codés par les plasmides IncA/C (Wozniak & Waldor, 2010). Toutes ces régions qui seraient impliquées dans le transfert de SXT et R391 font parties des régions communes à tous les ICE de la famille SXT/R391 (voir partie B.2.b) (Beaber *et al.*, 2002a).

Même s'il existe encore peu de preuves expérimentales concernant le transfert des ICE, il semble que, une fois sous forme circulaire, les ICE se comportent comme des plasmides conjugatifs, avec la même préparation de l'ADN transféré et la participation de protéine de couplage et d'un T4SS pour assurer le transfert de l'élément entre bactéries. De la même manière, les plasmides mobilisables et les IME qui seront l'objet de la partie suivante, semblent se comporter de façon analogue.

b) Les éléments mobilisables

Comme cela a été décrit dans la partie C.1.c, les éléments mobilisables ne possèdent pas toutes les fonctions requises pour assurer leur propre transfert. Si on considère comme l'a montré la partie précédente que les ICE, une fois sous forme circulaire, se comportent comme les plasmides conjugatifs, il est logique de penser que la même relation peut-être retrouvée entre les plasmides mobilisables et les IME.

Les plasmides RSF1010 et ColE1 sont les plasmides mobilisables les plus étudiés. Tout deux possèdent une origine de transfert ainsi qu'au moins trois gènes impliqués dans leur transfert (Boyd *et al.*, 1989; Scherzinger *et al.*, 1992). Au niveau du relaxosome, il existe peu de différence avec les éléments conjugatifs : la relaxase MobA de RSF1010 clive l'ADN de manière simple brin en présence d'ions Mg^{2+} et reste liée à l'extrémité 5' de l'ADN clivé. *In vitro*, les protéines MobB et MobC semblent stimuler le clivage réalisé par MobA, et joueraient donc le rôle de protéines auxiliaires. Une séquence répétée inversée de 10 pb située à proximité du site *nic* est impliquée dans le transfert, et constitue certainement un site de

fixation pour les protéines du relaxosome (Scherzinger *et al.*, 1992). Le plasmide RSF1010 est particulièrement mobilisé par le plasmide RP4. Le gène *traF* et ceux de la région *tra2* codant les protéines du T4SS, ainsi que le gène *traG* codant la protéine de couplage, sont les seuls gènes de RP4 nécessaires pour mobiliser RSF1010 (Lessl *et al.*, 1993). De même pour le plasmide ColE1, seuls les gènes impliqués dans la formation des pili et le gène codant la protéine de couplage TraD des plasmides apparentés au plasmide F sont nécessaires à sa mobilisation (Willett, 1980). Ces deux plasmides présentent pourtant des différences intéressantes. RSF1010 est mobilisé beaucoup plus efficacement par les systèmes type-P (RP4) que par les systèmes type-F (F, R388) alors que la situation inverse est observée pour le transfert de ColE1 (Selvaratnam & Gealt, 1993; Cabezon *et al.*, 1997). Peu de différences dans la mobilisation de ColE1 sont observées lorsque la protéine de couplage de RP4 remplace celle de R388, toutefois la fréquence de mobilisation de ColE1 est beaucoup plus élevée lorsque le T4SS et la protéine de couplage du plasmide F sont associés que lorsque le T4SS du plasmide F est associé à une autre protéine de couplage. Par contre, le plasmide RSF1010 est mobilisé beaucoup plus efficacement par le système qui associe la protéine de couplage et le T4SS de RP4 que par n'importe quelles autres combinaisons de T4SS et de protéine de couplage. Outre l'affinité entre une protéine de couplage et son T4SS, le transfert des éléments mobilisables semblent être dépendants de l'affinité entre la protéine de couplage codée par l'élément helper et le relaxosome généralement produit par l'élément mobilisable lui-même (Cabezon *et al.*, 1997; Hamilton *et al.*, 2000). Un contact direct entre la protéine de couplage TraG de RP4 et la relaxase d'un élément mobilisable a été mis en évidence pour le plasmide pBHR1, plasmide mobilisé préférentiellement par les systèmes type-P (Szpirer *et al.*, 2000). Cette notion de spécificité d'interaction entre les différents composants de la machinerie de transfert est soutenue par les études réalisées sur le plasmide mobilisable CloDF13. Ce plasmide peut, en effet, être mobilisé par des plasmides conjugatifs appartenant à différents groupes d'incompatibilités (IncF, IncI, IncN, IncP, et IncW) (Cabezon *et al.*, 1997). Or, ce plasmide est un des seuls plasmides mobilisables à coder sa propre protéine de couplage. A l'inverse des autres plasmides mobilisables, la mobilisation de CloDF13 est indépendante de la protéine de couplage codée par le plasmide helper, elle nécessite seulement le transférosome codé par celui-ci (Cabezon *et al.*, 1997; Nunez & De La Cruz, 2001). Dans certains cas, la spécificité entre une protéine de couplage et un transférosome est peut-être moins importante que celle entre un relaxosome et une protéine de couplage.

Les IME, une fois sous formes circulaires, semblent adopter le même fonctionnement que les plasmides mobilisables. Le transposon mobilisable Tn5520 est capable d'être mobilisé par le plasmide R751 (IncP). Une origine de transfert de 71 pb, qui contient une séquence répétée inversée de 17 pb indispensable au transfert ainsi qu'un site *nic*, ont été identifiés. Une seule protéine avec un rôle dans le transfert conjugatif semble impliquée dans le transfert de cet élément, cette protéine BmpH clive l'ADN au niveau du site *nic* et reste certainement liée à l'extrémité 5', elle semble donc jouer le rôle de relaxase (Vedantam *et al.*, 2006). Étrangement, aucune protéine auxiliaire n'a été mise en évidence, la relaxase semble être la seule protéine codée par Tn5520 nécessaire à son transfert.

Dernièrement, un système de mobilisation qui ne nécessite aucune protéine codée par l'élément mobilisable lui-même a été mis en évidence (Daccord *et al.*, 2010). En effet, des îlots génomiques présents chez *Vibrio* (MGIVchUSA1, MGIVvuTaï1, MGIVflInd1) possèdent une région présentant plus de 63% d'identité avec la séquence *oriT* de l'ICE SXT, cette conservation est particulièrement retrouvée au niveau des séquences répétées inversées et directes présentes au sein de l'*oriT* de SXT. Ces îlots mimeraient donc la séquence *oriT* de SXT et profiteraient alors de toute la machinerie de transfert, y compris la relaxase et les protéines auxiliaires du relaxosome, de l'élément SXT pour transférer. Bien que ces îlots possèdent une intégrase et des séquences répétées directes à leurs extrémités, l'excision et l'intégration de ces îlots seraient également dépendantes de la présence de SXT (Daccord *et al.*, 2010). Cette capacité de mobilisation a également été mise en évidence avec le plasmide R1162 qui est capable de mobiliser des fragments d'ADN chromosomique à partir de séquences proches de sa séquence *oriT* (Meyer, 2009). Le mimétisme de la séquence *oriT* d'un élément conjugatif pourrait expliquer la présence chez une souche d'îlots génomiques (îlots de pathogénicité ou de virulence), par définition, absents de souches très proches, qui ne possèdent aucun gène impliqué dans le transfert conjugatif.

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE

A. Problématique et objectifs du travail

L'îlot génomique SGI1, identifié initialement chez le lysotype DT104 du sérotype Typhimurium de *S. enterica*, a été mis en évidence par la suite chez de nombreux autres sérotypes et semble avoir participé aux succès épidémiques de ces souches. Cet avantage peut être conféré, d'une part, certainement grâce aux résistances aux antibiotiques qu'il véhicule, mais peut-être aussi grâce à des facteurs de virulence qu'il pourrait coder puisque la fonction potentielle d'une grande partie des ORF de SGI1 reste indéterminée. Le succès de SGI1 vient également sans doute de sa plasticité qui lui permet d'évoluer, d'acquérir de nouveaux gènes de résistance ou de s'enrichir en éléments génétiques mobiles, lesquels pouvant encore augmenter sa plasticité. Puisque SGI1 semble être un site privilégié d'insertions de tels éléments, il pourrait, dans le futur, acquérir des résistances aux antibiotiques de premières intentions utilisés contre les infections à *Salmonella*, les C3G et les fluoroquinolones. En effet, des gènes codant des BLSE, souvent associés à des structures de type transposon, ou encore des gènes *qnr*, responsables de diminution de sensibilité aux fluoroquinolones et déjà identifiés à proximité de séquences ISCR, pourraient être transférés sur SGI1 grâce aux éléments mobiles auxquels ils sont associés. Une fois sur SGI1 et contrairement aux gènes plasmidiques, ces gènes seraient maintenus stablement au cours des divisions cellulaires grâce à la capacité de SGI1 à s'intégrer au chromosome bactérien. De plus, les possibilités de transfert conjugatif offertes par SGI1 permettraient à ces gènes de se disséminer à d'autres sérotypes de *S. enterica*. SGI1 ayant également été identifié chez un autre genre bactérien, *Proteus mirabilis*, sa dissémination à d'autres bactéries, notamment des pathogènes humains, est un risque plausible puisque son site primaire d'intégration (ou un site proche) a été identifié chez différents genres de bactéries (*Brucella*, *Klebsiella*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Vibrio*) (Doublet *et al.*, 2007). De plus, la mise en évidence expérimentale d'un site secondaire d'intégration montre que l'intégration de SGI1 au chromosome bactérien ne serait pas restreinte à un seul et unique site. L'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans le transfert horizontal de SGI1 permettrait éventuellement d'anticiper ces événements de diffusion, et à plus long terme de participer à l'identification de cibles potentielles pour inhiber les transferts conjugatifs d'éléments véhiculant des résistances aux antibiotiques.

Le transfert des éléments génétiques mobiles nécessite l'assemblage de plusieurs complexes à l'origine de la mobilité de l'élément. SGI1 est un îlot génomique mobilisable qui, par définition, dépend de la présence d'un élément conjugatif dans la cellule pour permettre sa mobilité. Le séquençage complet de cet îlot génomique a révélé la présence de plusieurs ORF qui présentent des similarités avec des gènes pour lesquels le rôle dans la conjugaison bactérienne a été démontré. Dans ce cadre, ce travail a pour but de comprendre les mécanismes moléculaires mis en jeu dans le transfert de SGI1, ainsi que, d'établir quelles sont les fonctions apportées par le plasmide conjugatif helper, et quelle est la part de l'îlot génomique, lui-même, dans son propre transfert. Le transfert de SGI1 a été mis en évidence uniquement à l'aide du plasmide R55 du groupe d'incompatibilité IncA/C. Il serait donc intéressant dans un premier temps de vérifier si SGI1 est capable d'être mobilisé par d'autres plasmides, du même groupe d'incompatibilité ou de groupes d'incompatibilités différents. De plus, le plasmide R55 étant un plasmide qui a été identifié au début des années 1970, il serait également intéressant de savoir si des plasmides plus contemporains ont aussi la capacité de mobiliser l'îlot génomique. Comme cela a été abordé dans la partie étude bibliographique, un élément mobilisable doit posséder au minimum une origine de transfert. La plupart du temps, il code également la relaxase qui reconnaît spécifiquement l'origine de transfert pour réaliser le clivage simple brin. Si SGI1 se comporte comme un élément mobilisable classique, il devrait posséder une origine de transfert et coder sa propre relaxase, ainsi que, éventuellement une ou plusieurs protéines auxiliaires. Toutefois, SGI1 pourrait également « mimer » l'origine de transfert d'un autre système et donc avoir recours à toutes les protéines qui entrent dans la composition de ce système, dans ce cas, seule l'origine de transfert serait apportée par SGI1. Comme la plupart des éléments mobilisables, SGI1 profite certainement du transférosome apporté par le plasmide helper donc aucun gène présent sur SGI1 ne devrait être essentiel à la formation de ce complexe. D'autre part, nous savons que certains éléments mobilisables codent leur propre protéine de couplage. SGI1 pourrait éventuellement coder une protéine ayant ce rôle de liaison entre le relaxosome et le transférosome.

Dans ce cadre, les objectifs de ce travail étaient de:

- Déterminer le spectre de plasmides capable de mobiliser SGI1
- Identifier l'origine de transfert de SGI1
- Déterminer quelles sont les ORF de SGI1 impliquées dans son transfert.

Tableau IX : Souches utilisées dans cette étude.

Souches	Caractéristiques génétiques	Profils de résistance ^a	Références ou sources ^b
<i>S. Agona</i> 959SA97	SGI1	ACSSuT	Cloeckaert <i>et al.</i> , 2000
<i>S. Agona</i> 47SA97	SGI1-C	SSu	Boyd <i>et al.</i> , 2002
<i>S. Albany</i> 7205.00	SGI1-F	ACSuTTm	Doublet <i>et al.</i> , 2003
<i>S. Agona</i> 47SA97 <i>Δxis::kan</i>	SGI1-C, cassette de résistance à la kanamycine insérée dans le gène <i>xis</i>	SSuK	Doublet <i>et al.</i> , 2005
<i>S. Agona</i> 959SA97 <i>ΔS009::kan</i>	SGI1, cassette de résistance à la kanamycine insérée dans l'ORF S009	ACKSSuT	Cette étude
<i>S. Agona</i> 777SA01	SGI1-A, plasmide IncI1 porteur du gène <i>bla</i> _{TEM-52}	ACSSuTTm + C3G	Cloeckaert <i>et al.</i> , 2007
<i>S. Typhimurium</i> 04-3486	SGI1, plasmide IncI1 porteur du gène <i>bla</i> _{TEM-52}	ACSSuT + C3G	Cloeckaert <i>et al.</i> , 2007
<i>E. coli</i> BM14	absence du facteur F	Az	Institut Pasteur, France
<i>E. coli</i> DH1	absence du facteur F, <i>recA1</i>	Nal	ND
<i>E. coli</i> TOP10	absence du facteur F	S	Invitrogen, Cergy-Pontoise, France

^a Abréviations : A : ampicilline, Az : azide de sodium, C : chloramphénicol, C3G : céphalosporines de 3^{ème} génération, K : kanamycine, Nal : acide nalidixique, S : streptomycine, Su : sulfamides, T : tétracyclines, Tm : triméthoprine .

^b ND : Non déterminé.

B. Matériel et méthodes

B.1. Méthodes générales de bactériologie et de biologie moléculaire

a) Souches bactériennes et conditions de culture

Les souches utilisées dans cette étude sont répertoriées dans le tableau IX. Deux souches de *S. enterica*, isolées de volailles en Belgique, ont été utilisées pour la plupart des expérimentations concernant le transfert de SGI1. Il s'agit des souches de *S. Agona* 959SA97, porteuse de l'îlot SGI1 original, et de *S. Agona* 47SA97, porteuse du variant SGI1-C. Dans certains cas, il était en effet nécessaire d'utiliser la souche de *S. Agona* 47SA97, qui possède un phénotype de résistance réduit, pour pouvoir sélectionner les différents éléments introduits dans ces cellules. La présence de multi-résistance aux antibiotiques sur certains plasmides nous a également contraint à utiliser des souches avec un phénotype de résistance différent : *S. Agona* 47SA97 Δ *xis::kan* et *S. Agona* 959SA97 Δ S009::*kan* qui possèdent une cassette de résistance à la kanamycine insérée dans des régions non essentielles au transfert de SGI1. Certains plasmides helper qui portent un grand nombre de résistance aux antibiotiques, y compris à la kanamycine, nous ont contraint à utiliser la souche de *S. Albany* 7205.00 (isolée d'un poisson provenant de Thaïlande), porteuse du variant SGI1-F qui confère, entre autres, la résistance au triméthoprime, permettant ainsi d'avoir un marqueur de sélection absent de ces plasmides. Deux souches de terrain, qui contiennent SGI1 (ou variant) et un plasmide de résistance du groupe IncI1, ont été utilisées dans le cadre de l'identification des plasmides capables de mobiliser SGI1 (*S. Agona* 777SA01 isolée de volailles en Belgique et *S. Typhimurium* 04-3486 isolée d'un cas français de salmonellose humaine). Tous les tests de mobilisation de SGI1 ont été réalisés vers la souche réceptrice d'*E. coli* BM14 résistante à l'azide de sodium. Enfin, deux autres souches d'*E. coli*, DH1 et TOP10, ont servi respectivement de donneurs lors de certains tests de mobilisation et d'hôtes pour certaines constructions.

Toutes les souches sont conservées à -80°C dans un milieu glycérolé à 20%. Les cultures de routine et les isolements sur milieu gélosé ont été réalisés en bouillon BHI (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) sous agitation ou en gélose BHI à 37°C (sauf

Tableau X : Plasmides utilisés pour mobiliser SGI1.

Plasmides	Inc ^a	Hôte d'origine	<i>tra</i> ^b	Profil de résistance ^c	Marqueur de sélection ^c	Référence ou source
pRA1	IncA/C	<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	SuT	T	Aoki <i>et al.</i> , 1971
pIP40A	IncA/C	<i>P. aeruginosa</i>	+	AKSu	K	Datta <i>et al.</i> , 1971
R55	IncA/C	<i>K. pneumoniae</i>	+	ACGKSu	K ou G	Witchitz & Chabbert, 1971
R16a	IncA/C	<i>Providencia stuartii</i>	+	AKSu	K	Chabbert <i>et al.</i> , 1972
p13688	IncA/C	<i>E. coli</i>	+	ACGSSuTTm-C3G	C3G	Meunier <i>et al.</i> 2010
p13956	IncA/C	<i>E. coli</i>	+	ACSSuTTm-C3G	C3G	Meunier <i>et al.</i> 2010
pAM04528	IncA/C	<i>S. Newport</i>	-	ACSSuT-C3G	C3G	Call <i>et al.</i> , 2010
pN418	IncA/C	<i>S. Heidelberg</i>	+	ACGKSSuT-C3G	C3G	Fricke <i>et al.</i> , 2009
pOX38	IncFI	<i>E. coli</i>	+	K	K	Institut Pasteur, France
R1-16	IncFII	<i>E. coli</i>	+	K	K	Couturier <i>et al.</i> , 1988
pCEB6542	IncHI2	<i>S. Llandoff</i>	+	SuT-C3G	C3G	Cloekaert <i>et al.</i> , 2010
p1639-SA-00	IncHI2	<i>S. Virchow</i>	+	ASuTTm-C3G	C3G	Garcia Fernandez <i>et al.</i> , 2007
p142-SA-01	IncHI2	<i>S. Virchow</i>	+	ASuTTm-C3G	C3G	Garcia Fernandez <i>et al.</i> , 2007
p3464b	IncHI2	<i>S. Virchow</i>	+	ASSuTTm-C3G	C3G	Weill <i>et al.</i> , 2004
p777-SA-01	IncI1	<i>S. Agona</i>	+	A-C3G	C3G	Cloekaert <i>et al.</i> , 2007
p04-3486	IncI1	<i>S. Typhimurium</i>	+	A-C3G	C3G	Cloekaert <i>et al.</i> , 2007
R112	IncI1	<i>S. Panama</i>	+	K	K	Chabbert <i>et al.</i> , 1972
R69	IncL/M	<i>S. Paratyphi B</i>	+	AKT	K	Chabbert <i>et al.</i> , 1972
RPC3	IncN	<i>E. coli</i>	+	KS	K	Chabbert <i>et al.</i> , 1972
RP4	IncP	<i>P. aeruginosa</i>	+	AKT	K	Datta <i>et al.</i> , 1971
RSa	IncW	<i>Shigella flexneri</i>	+	CKSSu	K	Roussel & Chabbert, 1978

^a Groupes d'incompatibilité.

^b Capacité conjugative.

^c Abréviations : A : ampicilline, C: chloramphénicol, Ff : florfenicol, G : gentamicine, K : kanamycine, S : streptomycine, Su : sulfamides, T : tétracyclines, Tm : triméthoprim, C3G : céphalosporine de 3^{ème} génération (ceftriaxone, céfépime ou ceftiofur).

indications contraires) supplémentés par le (ou les) antibiotique(s) nécessaire(s) pour le maintien des plasmides (Tableau X). Le milieu SOC (tryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 2,5 mM, MgSO₄ 10 mM, glucose 20 mM) a été utilisé pour reprendre les cellules après les électroporations. Enfin, des géloses *Salmonella-Shigella* (SS ; Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) ont été utilisées pour isoler les bactéries lors des conjugaisons ou des tests de mobilisation. Ce milieu permettait notamment, grâce au lactose qu'il contient, de différencier facilement les colonies de *Salmonella* (blanches à centre noir) des colonies d'*E. coli* (rouges).

b) Détermination de la sensibilité aux antibiotiques par antibiogramme

Les antibiogrammes ont été principalement utilisés comme un moyen de contrôle de la présence ou de l'absence d'un élément génétique, grâce aux résistances aux antibiotiques conférées par les gènes portés par cet élément. Les antibiogrammes ont été réalisés par diffusion en milieu gélosé sur milieu Mueller-Hinton (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) selon les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM) (Soussy *et al.*, 2010). Les géloses ont donc été inondées à l'aide d'une culture calibrée à 0,5 McFarland avant le dépôt des disques imprégnés d'antibiotique (Bio-Rad, Marnes-La-Coquette, France) : ampicilline (Amp, 10 µg), chloramphénicol (Cm, 30 µg), kanamycine (Km, 30 UI), gentamicine (Gm, 15 µg), streptomycine (Sm, 10 UI), sulfamides (Sul, 200 µg), tétracyclines (Tc, 30 UI), triméthoprim (Tm, 5 µg), ceftriaxone (Cro, 30 µg), céfépime (Fep, 30 µg), et ceftiofur (Xnl, 30 µg). Après incubation des géloses à 37°C pendant 18h, les diamètres d'inhibition, dus aux gradients de concentration en antibiotiques qui se sont établis à partir du disque, ont été comparés aux valeurs critiques données par le CA-SFM, permettant ainsi de définir la sensibilité ou la résistance d'une souche vis-à-vis d'un antibiotique.

c) Préparations d'ADN et analyses bioinformatiques

Des étapes d'extraction et/ou purification d'ADN ont été nécessaires lors de plusieurs protocoles. Les ADN génomiques ont été extraits par le kit QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France), les ADN plasmidiques à l'aide du kit Wizard Plus SV Miniprep DNA purification system (Promega, Madison, WI, États-Unis) ou du kit NucleoBond Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel, Hoerd, France) lorsque de plus grandes quantités de plasmide étaient nécessaires. Les purifications d'ADN sur gel d'agarose ont été réalisées avec les kits

Tableau XI : Amorces permettant l'amplification de séquences plasmidiques.

Amorces	T ^a	Localisation	Séquences 5'-3' ^b
FwCAT	50°C	<i>cat</i> (sur pACYC184)	CGCAGTACTGTTGTAATTCA
RvCAT	50°C	<i>cat</i> (sur pACYC184)	CCTTTTAAAGACCGTAAAG
A/C FW	60°C	Gène <i>repA</i> des plasmides IncA/C	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA
A/C RV	60°C	Gène <i>repA</i> des plasmides IncA/C	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT
F _{repB} FW	52°C	Région RNA _I / <i>repA</i> des plasmides IncF	TGATCGTTTAAAGGAATTTTG
F _{repB} RV	52°C	Région RNA _I / <i>repA</i> des plasmides IncF	GAAGATCAGTCACACCATCC
HI2 FW	60°C	Itérons des plasmides IncHI2	TTTCTCTGAGTCACCTGTTAACAC
HI2 RV	60°C	Itérons des plasmides IncHI2	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT
I1 FW	60°C	RNA _I des plasmides IncI1	CGAAAGCCGGACGGCAGAA
I1 RV	60°C	RNA _I des plasmides IncI1	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT
L/M FW	60°C	Gènes <i>repABC</i> des plasmides IncL/M	GGATGAAAATATCAGCATCTGAAG
L/M RV	60°C	Gènes <i>repABC</i> des plasmides IncL/M	CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG
N FW	60°C	Gène <i>repA</i> des plasmides IncN	GTCTAACGAGCTTACCGAAG
N RV	60°C	Gène <i>repA</i> des plasmides IncN	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC
P FW	60°C	Itérons des plasmides IncP	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA
P RV	60°C	Itérons des plasmides IncP	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC
W FW	60°C	Gènes <i>repA</i> des plasmides IncW	CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG
W RV	60°C	Gènes <i>repA</i> des plasmides IncW	GGTGCGCGGCATAGAACCGT
R55-3	63°C	Région du gène <i>floR</i> sur R55	ACTGCTGCTGATGGCTCCTT
R55-4	63°C	Région du gène <i>floR</i> sur R55	GAACAATGAAAGTCTCGCCG
OT3	52°C	Gène <i>bla</i> _{TEM}	ATGAGTATTCAACATTTCCG
OT4	52°C	Gène <i>bla</i> _{TEM}	CCAATGCTTAATCAGTGAGG
MA-1	52°C	Gène <i>bla</i> _{CTX-M}	SCSATGTGCAGYACCAGTAA
MA-2	52°C	Gène <i>bla</i> _{CTX-M}	CCGCRATATGRTTGGTGGTG
FCMY	56°C	Gène <i>bla</i> _{CMY}	GACAGCCTCTTTCTCCACA
RCMY	56°C	Gène <i>bla</i> _{CMY}	TGGAACGAAGGCTACGTA
k2	63°C	Cassette <i>kan</i>	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
kt	63°C	Cassette <i>kan</i>	CGGCCACAGTCGATGAATCC

^a Températures d'hybridation.

^b S = G ou C, Y = C ou T, R = A ou G.

NucleoSpin Extact II (Macherey-Nagel, Hoerd, France) ou QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Les purifications de produits de PCR, ainsi que l'élimination de sels, de tampons ou d'enzymes ont été effectuées avec le kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Tous ces kits ont été utilisés en suivant les recommandations des fabricants.

Les ADN ainsi extraits ou purifiés ont été dosés avec un spectrophotomètre (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, États-Unis) et leur qualité, ainsi que leurs tailles, ont été vérifiées sous rayons ultra-violet après électrophorèse sur gel d'agarose. Les gels d'agarose contenaient, selon la taille attendue du fragment d'ADN, 0,8 à 2% d'agarose (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) dissout dans du Tris-Borate-EDTA 1X (Euromedex, Souffelweyersheim, France) auquel est ajouté 0,5 µg/mL de bromure d'éthidium (Fluka Biochemika, Buchs, Suisse). Après amplification, les produits de PCR ont également été visualisés de la même manière.

Les réactions de digestion d'ADN ont été réalisées dans un volume final compris entre 20 et 50 µL, contenant 10 unités d'enzyme (Promega, Madison, WI, États-Unis), le tampon recommandé par le fabricant (pour les doubles digestions NcoI/EcoRI du pACYC184, le tampon Multiplex de Promega a été utilisé), du sérum albumine bovine (100 µg/mL) et environ 500 ng d'ADN purifié. Les digestions ont ensuite été incubées à 37°C pendant au moins deux heures avant purification de la bande d'intérêt sur gel d'agarose. Les profils de restriction des plasmides IncA/C ont été réalisés à partir de 2,5 µg de plasmides qui ont été digérés pendant 18h à 37°C par l'enzyme *DraI* avant migration sur gel d'agarose à 0,6%.

Les fragments d'ADN d'intérêts ont été séquencés par la société Beckman Coulter Genomics Inc (Takeley, Royaume-Uni). Les comparaisons de séquences nucléotidiques ont été réalisées à l'aide de l'algorithme BLAST et des logiciels Artemis (Altschul *et al.*, 1990; Carver *et al.*, 2008). Les cartes des plasmides pRA1 (numéro d'accèsion GenBank : FJ05807) et pAM04528 (FJ621857) ont été réalisées grâce à DNA Plotter à l'aide des annotations présentes dans la base de données GenBank. Les recherches de motifs au sein d'une séquence protéique ont été effectuées par le programme Pfam (Sanger Institute). Les programmes « palindrome » (Rice *et al.*, 2000) et « mfold » (Zuker, 2003) ont été utilisés pour identifier les structures secondaires potentiellement formées par l'ADN. Des recherches de régions promotrices putatives ont été menées à l'aide du programme BPROM (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>)

Tableau XII : Amorces permettant l'amplification de séquences de SGI1.

Amorces	T ^a (°C)	Localisation	Positions dans SGI1 ^b	Région amplifiée / rôle	Séquences 5'-3'
U7-L12	52	<i>trmE</i>	1-20	Jonction gauche	ACACCTTGAGCAGGGCAAAG
LJ-R1	52	<i>Int</i>	480-500	Jonction gauche	AGTTCTAAAGGTTTCGTAGTCG
104-RJ	56	S044	42373-42392	Jonction droite	TGACGAGCTGAAGCGAATTG
104-D	56	<i>yidY</i> chez <i>Salmonella</i>		Jonction droite	ACCAGGGCAAACTACACAG
C9-L2	56	<i>Int2</i> (sérotyp Typhimurium)		Jonction droite	AGCAAGTGTGCGTAATTTGG
EcU7-L12	52	<i>trmE</i> chez <i>E. coli</i>		Jonction gauche	ACATCTACAACAGGGCAAAG
Ec104-D	56	<i>tnaL</i> chez <i>E. coli</i>		Jonction droite	AACCATTTTGAGGTCACACA
intI1	60	<i>intI1</i>	27304-27323	Pint + <i>aac(3)-Id</i>	GCTCTCGGGTAACATCAAGG
aacR	60	Cassette <i>aadA7</i> du variant SGI1-H		Pint + <i>aac(3)-Id</i>	GCGGGCACTTTTTCACATCAT
FwKR1	61	S002	1471-1491	Vérification délétion région S003-S010	GTCGCCGGGTAACAGCAATG
FwKrS009	61	S007	7463-7483	Vérification délétions régions S009 et S007-S013	ATTGCTAACCTGGGATGGCG
RvKrS009	61	S013	8790-8810	Vérification délétions régions S009 et S003-S010	TAGTCAGGCAGGAGCAGAAT
FwKrS013	61	S012	13021-13041	Vérification délétions régions S013 et S012-S019	GGCACCATCAGGAAAAACAT
RvKrS013	61	S013	14332-14352	Vérification délétions régions S013 et S007-S0013	TCGCTGACCTGGGAGAAAAAT
FwKS020	61	S019	16507-16527	Vérification délétions ORF S020 et région S020-S024	CACAAGAGTCGGAACGCATAAA
RvKS020	61	S021	17958-17978	Vérification délétions ORF S020 et région S012-S019	TCCAAAGAATGACACGACAGTA
FwKS023	61	Entre S022 et S023	18517-18537	Vérification délétions ORF S023 et ORF S023-S024	ATGGCTTTTGGGTGATGTTTTTC
RvKS023	61	S024	20583-20603	Vérification délétion ORF S023	GTGTTACAGCAGGAGGTTTCAGA
FwKS024	61	S023	20162-20182	Vérification délétion ORF S024	TTCTCTTCGGATAACGGCAGGT
RvKS024	61	Entre S024 et S025	22188-22208	Vérification délétions ORF S024, ORF S023-S024 et région S020-S024	TGGGTGGTTTTTAGGGAGTCAA
FwKr10D4B	61	S021	17932-17952	Vérification délétion région 10D4B (<i>oriT</i>)	AACAAACTGCCAGCAGATCC
RvKr10D4B	61	Entre S022 et S023	18436-18456	Vérification délétion région 10D4B (<i>oriT</i>)	AACGGTAGCTGGCCCAAAAC

^a Températures d'hybridation des fragments P1 et P2.

^b Positions par rapport à la séquence de SGI1 dans GenBank (AF261825).

et du programme de prédiction de promoteur développé par BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project ; http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html). Les recherches d'ORF ont été menées avec les programmes ORF finder (NCBI), EasyGene (Larsen & Krogh, 2003) et GeneMark (Lukashin & Borodovsky, 1998).

d) Amplification d'ADN par PCR

Les réactions d'amplification d'ADN par PCR ont été réalisées à partir d'une matrice ADN provenant soit de 2 µL d'un bouillon bactérien de 18h, soit d'une colonie bactérienne. La réaction est réalisée dans un volume total de 25 µL, en présence de 800 µM de chaque amorce (Tableau XI, XII et XIII), 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de chaque dNTP (Promega, Madison, WI, Etats-Unis), de 1X de tampon Green GoTaq® Flexi et d'une unité de GoTaq® Flexi DNA polymérase (Promega, Madison, WI, États-Unis). Le programme d'amplification utilisé pour ces vérifications était le suivant : après une dénaturation initiale de l'ADN pendant 5 min à 94°C, 30 cycles d'amplifications ont été programmés comprenant 1 min de dénaturation à 94°C, 1 min d'hybridation des amorces (les températures d'hybridation utilisées sont répertoriées dans les tableaux d'amorces), et une étape d'élongation à 72°C pendant 1 à 3 min selon la taille attendue des produits de PCR. Enfin, une étape d'extension finale de 8 min à 72°C a été réalisée pour terminer le programme.

B.2 Mobilisation de SGI1

a) Plasmides utilisés

Les plasmides utilisés pour mobiliser SGI1 sont listés dans le tableau X. Ces plasmides constituent un échantillon représentatif d'une grande partie des groupes d'incompatibilité identifiés chez les bactéries Gram négatif : IncA/C, IncF, IncH, IncI, IncL/M, IncN, IncP, et IncW. Notre collection regroupe des plasmides conjugatifs identifiés au cours des années 1970 dont pRA1 (IncA/C), pOX38 (dérivé du plasmide F, IncF), R69, (IncL/M), RPC3 (IncN), ou RP4 (IncP). D'autres plasmides qui diffusent actuellement chez les entérobactéries ont également été inclus dans notre collection. Ces plasmides, appartenant aux groupes IncI1 et IncHI2, comme pCEB6542, p1639-SA-00, p777-SA-01 ou p04-3486, sont des plasmides porteurs de résistance aux C3G, présents chez plusieurs souches épidémiques de *Salmonella* et pour lesquels il était intéressant de vérifier leur capacité à mobiliser SGI1. Enfin, des plasmides du groupe IncA/C, comme p13688 ou pN418, impliqués dans la multi-résistance

Tableau XIII : Amorces utilisées pour le clonage dans le plasmide pACYC184.

Amorces	T ^a	Positions dans SGI1 ^b	Séquences 5'-3' ^c
FwEcoRIoriT1	52°C	145-165	attgtgaattcTTCTGTATTGGGAAGTAAAT
RvNcoRIoriT1	52°C	1331-1351	attgtccatggCGTGGAAGTAACATGTTTT
FwEcoRIoriT2	52°C	1331-1351	attgtgaattcAAAACATGTTACTTTCCACG
RvNcoRIoriT2	52°C	2304-2324	attgtccatggATTCCATACCGTAATTGACT
FwEcoRIoriT3	52°C	2354-2374	attgtgaattcGCCAGTCACCTTTCTTAACCT
RvNcoRIoriT3	52°C	3854-3874	attgtccatggGGATATTGATTGGAGTAAGG
FwEcoRIoriT4	55°C	3921-3941	attgtgaattcACCAAAGTTAAGGCCAAGTT
RvNcoRIoriT4	55°C	6516-6536	attgtccatggTTAATCAGCGAACATGTGTT
FwEcoRIoriT5	55°C	6516-6536	attgtgaattcAACACATGTTGCTGATTAA
RvNcoRIoriT5	55°C	8831-8851	attgtccatggCAGATAGCAATGGATACTGC
FwEcoRIoriT6	55°C	8860-8880	attgtgaattcGTCACCATATTGCTGAACAA
RvNcoRIoriT6	55°C	11734-11754	attgtccatggCTATTGAGGACGCGTACAAC
FwEcoRIoriT7	55°C	11734-11754	attgtgaattcGTTGTACGCGTCCTCAATAG
RvNcoRIoriT7	55°C	13414-13434	attgtccatggATTGGAGCAACAGTATGAGA
FwEcoRIoriT8	55°C	13414-13434	attgtgaattcTCTCATACTGTTGCTCCAAT
RvNcoRIoriT8	55°C	15144-15164	attgtccatggATGCTCCAAGATCTGGTCTA
FwEcoRIoriT9	55°C	15144-15164	attgtgaattcTAGACCAGATCTTGGAGCAT
RvNcoRIoriT9	55°C	16893-16913	attgtccatggCGGTAAAAGCAGGTGTTAAA
FwEcoRIoriT10	55°C	16984-17004	attgtgaattcGTAGGCTTCTTGCCGAACT
RvNcoRIoriT10	55°C	19813-19833	attgtccatggACGGATCAGCAATATGAACCT
FwEcoRIoriT11	55°C	19852-19872	attgtgaattcAAGAAAACATCGCTGTAAGT
RvNcoRIoriT11	55°C	21910-21930	attgtccatggGGTACGGTATCGCCTAAGTG
FwEcoRIoriT12	52°C	21981-22001	attgtgaattcACGCTTGAGTTATCTTCTTC
RvNcoRIoriT12	52°C	23570-23590	attgtccatggGCCGGTAACAACCTAGATAT
FwEcoRIoriT13	52°C	23570-23590	attgtgaattcATATCTAAGTTGTTACCGGC
RvNcoRIoriT13	52°C	25230-25250	attgtccatggTAGAGCAAGATGCATCAGAG
FwEcoRIoriT14	55°C	25230-25250	attgtgaattcCTCTGATGCATCTTGCTCTA
RvNcoRIoriT14	55°C	28121-28141	attgtccatggAATATCGCTGTATGGCTTCA
RvNcoRIoriT10A	58°C	18328-18348	attgtccatggATCTCCCCGGAGGAAAATCA
RvNcoRIoriT10B	58°C	18732-18752	attgtccatggTATGGCGAACGAATCGCTCT
RvNcoRIoriT10C	58°C	17535-17555	attgtccatggAGTCCGAACAGGGCATAAAG
FwEcoRIoriT10D	58°C	17535-17555	attgtgaattcCTTTATGCCCTGTTCCGACT
RvNcoRIoriT10D2	58°C	17918-17938	attgtccatggTTTGTTCCGTCGGAACAGAC
RvNcoRIoriT10D3	58°C	18131-18151	attgtccatggTCCGGCTTACTCTATGCTCC
FwEcoRIoriT10D3A	58°C	17798-17818	attgtgaattcCTCTGCATGCTAAGGCCAAC
FwEcoRIoriT10D4B	58°C	18016-18036	tattgtgaattcTATAATTCGCGCACATTCTGT
FwEcoRIoriT10D4C	58°C	18131-18151	tattgtgaattcGGAGCATAGAGTAAGCCGGA
RvNcoRIoriT10D4D	58°C	18241-18261	attgtccatggAGGCTTCCATATCGCGATCT
FwEcoRIoriT10D6	58°C	18085-18105	tattgtgaattcGCTCTACCCCGTCTCTGTT

^a Températures d'hybridation.^b Positions par rapport à la séquence de SGI1 dans GenBank (AF261825).^c Majuscules : séquences correspondantes à SGI1, minuscules : sites de restriction pour les enzymes *NcoI* et *EcoRI*.

aux antibiotiques d'isolats de *Salmonella* ou d'*E. coli* ont également été utilisés dans cette étude pour essayer de mobiliser SGI1.

b) Conjugaison en milieu liquide

Les plasmides helper utilisés pour la mobilisation de SGI1 ont été introduits par conjugaison dans les souches de *Salmonella* porteuses de SGI1 ou des variants SGI1-C ou -F, selon les résistances aux antibiotiques portées par les plasmides. Des bouillons en fin de phase exponentielle de croissance ont été utilisés pour la mise en contact entre les souches donneuses d'*E. coli* porteuses de plasmides et les souches réceptrices de *Salmonella*. Ces mélanges ont été réalisés dans un ratio donneur/réceptrice 1:4 avant d'être incubés pendant 18h à 37°C sans agitation. Les transconjugants, qui possédaient SGI1 (ou variant) et le plasmide helper, ont alors été sélectionnés sur géloses SS supplémentées par les antibiotiques (Sigma-aldrich, Saint-Louis, MO, États-Unis) permettant la sélection de ces éléments : Sm (50 µg/mL) et Tc (10 µg/mL) pour SGI1, Sm pour SGI1-C, Km (50 µg/mL) pour SGI1::kan et SGI1-C::kan, ou Tm (40 µg/mL) pour SGI1-F ; et pour les plasmides : par Gm (30 µg/mL), Km, Tc ou une C3G (Cro, Fep ou Xnl, toutes à 2 µg/mL) selon le plasmide en question (voir tableau X). La plupart des plasmides étaient présents chez des souches d'*E. coli* avant d'être transférés vers *Salmonella*, seul le plasmide pAM04528 était initialement présent chez *S. Newport*, ce dernier est d'ailleurs le seul à avoir été introduit par électroporation puisqu'il n'est pas auto-transférable. Cependant, une fois transformées par ce plasmide, et après ajout de milieu SOC et incubation à 37°C pendant 1h, les bactéries possédant ce plasmide et l'îlot génomique ont été sélectionnées d'une manière similaire aux transconjugants. La présence des plasmides dans les souches de *S. enterica* a été vérifiée par antibiogramme et par PCR à l'aide des amorces permettant le typage des réplicons des plasmides (Tableau XI) (Carattoli *et al.*, 2005), et par amplification par PCR de certains gènes de résistance présents sur ces plasmides (*floR*, *cat*, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} ou *bla*_{CMY}) (Tableau XI). La présence de SGI1 (ou variant) dans ces transconjugants a également été vérifiée par antibiogramme, et par les PCR qui permettent d'amplifier les jonctions gauches et droites entre l'îlot génomique et le chromosome de *Salmonella* (respectivement, grâce aux couples d'amorces LJ-R1/U7-L12 et 104RJ-104-D, tableau XII). Lorsque des délétions ont été réalisées sur SGI1 (ou variant), les PCR permettant de vérifier la présence de ces délétions ont également été réalisées (voir partie B.4.d). Ces souches ont alors été utilisées dans les tests de mobilisation de SGI1.

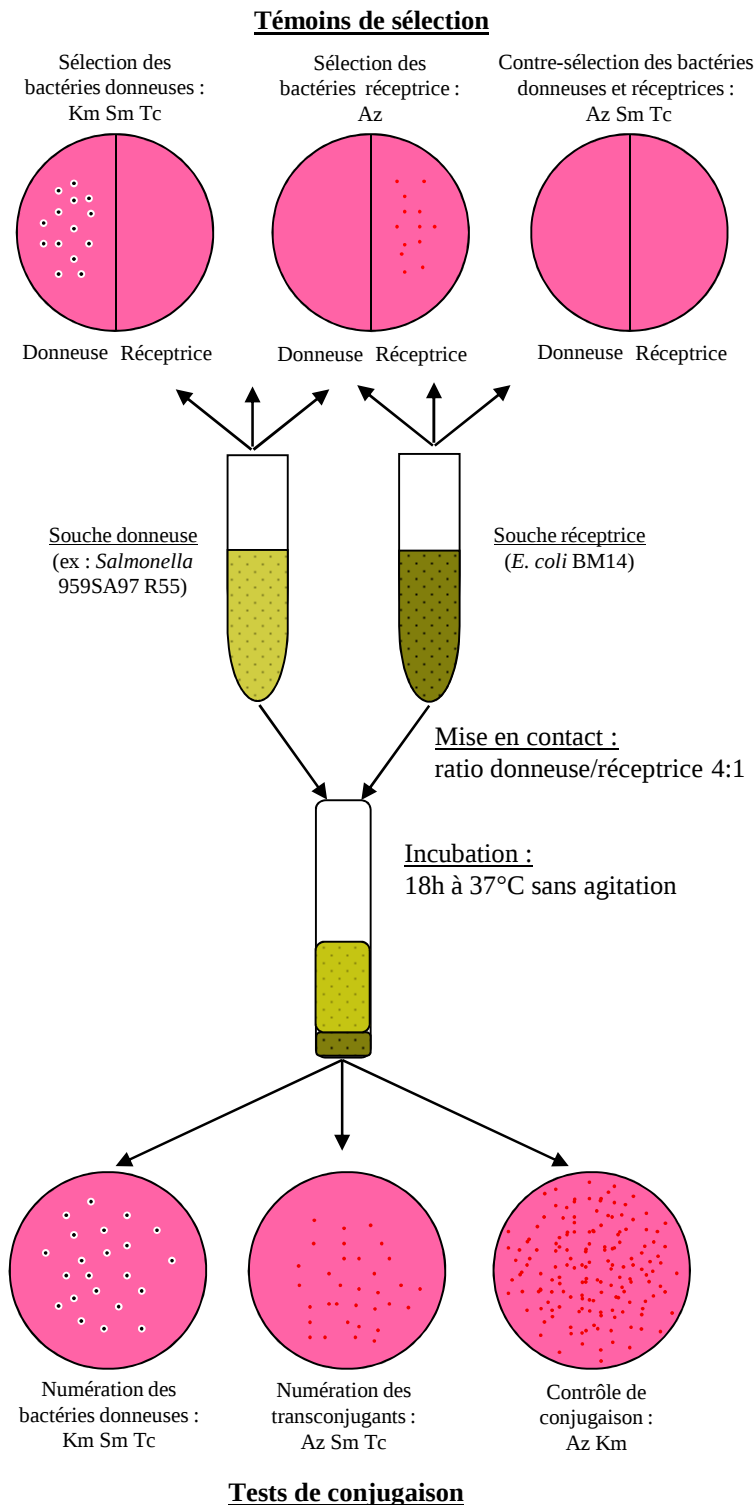


Figure 36 : Protocole des tests de mobilisation de l'îlot génomique. Exemple de la mobilisation de SGI1 par le plasmide R55 à partir de la souche de *S. Agona* 959SA97 vers la souche réceptrice d'*E. coli* BM14 résistante à l'azide de sodium. Abréviations : Az : azide de sodium, Km : kanamycine, Sm : streptomycine, Tc : tétracyclines.

c) Principe des tests de mobilisation

Les tests de mobilisation de SGI1 ont été effectués entre les différentes souches de *Salmonella* porteuses d'un plasmide helper et de l'îlot génomique (SGI1 ou un de ces variants), et la souche réceptrice d'*E. coli* BM14 résistante à l'azide de sodium.

Le protocole utilisé pour ces tests était proche de celui de la conjugaison en milieu liquide décrite dans la partie précédente : les cultures en fin de phase exponentielle de croissance ont été également mélangées mais dans un ratio donneur/réceptrice de 4:1. Après incubation pendant 18h à 37°C sans agitation, des dilutions de ce mélange ont été étalées sur des géloses SS contenant les antibiotiques adéquats pour sélectionner les bactéries donneuses et les transconjugants (Figure 36). Les bactéries donneuses sont les souches de *Salmonella* qui contenaient un plasmide helper et SGI1 (ou variant), elles ont été sélectionnées par les marqueurs spécifiques à l'îlot génomique (Sm et Tc pour SGI1, Sm pour SGI1-C, Km pour les îlots modifiés avec la cassette *kan*, et Tm pour SGI1-F) associés aux marqueurs utilisés pour la sélection des plasmides (voir Tableau X). Les transconjugants sont les souches réceptrices d'*E. coli* BM14 qui ont reçu l'îlot génomique, ils ont été sélectionnés par les marqueurs spécifiques aux îlots génomiques (voir ci-dessus) associés à l'azide de sodium (500 µg/mL) pour contre-sélectionner les souches de *Salmonella*. Différents contrôles ont été réalisés pour s'assurer de la sélectivité des antibiotiques utilisés (voir figure 36), mais aussi pour vérifier les capacités conjugatives des plasmides helper en sélectionnant leur propre transfert vers la souche réceptrice pour chaque test de mobilisation (sélection des *E. coli* BM14 qui ont reçu le plasmide en question, par l'azide de sodium et l'antibiotique spécifique au plasmide, voir exemple de la figure 36). La présence de SGI1 dans la souche réceptrice a été vérifiée par l'amplification par PCR des jonctions gauches et droites entre l'îlot génomique et le chromosome d'*E. coli*, grâce aux couples d'amorces EcU7-L12/LJ-R1 et 104-RJ/Ec104-D, respectivement. Le transfert de l'îlot génomique a été évalué par le calcul de la fréquence de transfert de SGI1 qui correspond au nombre de cellules réceptrices qui ont acquis SGI1 divisé par le nombre de bactéries donneuses.

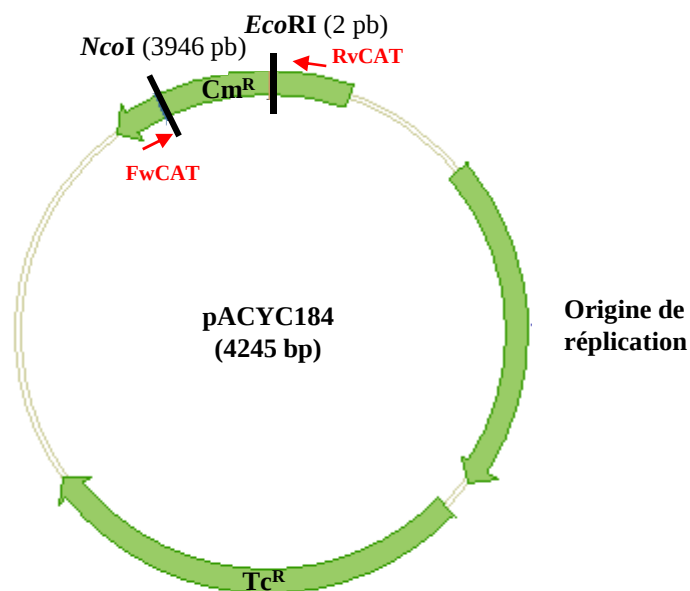


Figure 37 : Carte du plasmide pACYC184. Les trois gènes présents sur le plasmide sont représentés par les flèches vertes : Cm^R et Tc^R sont, respectivement, les gènes de résistance au chloramphénicol et aux tétracyclines. Les sites de restriction des enzymes *EcoRI* et *NcoI* sont localisés avec leurs positions nucléotidiques. Les flèches rouges représentent les sites d'hybridation des amorces qui ont servi à vérifier les clonages entre les sites *NcoI*-*EcoRI*.

B.3 Mobilisation du plasmide pACYC184

a) Construction des souches pour la recherche de l'origine de transfert de SGI1

La localisation de l'origine de transfert de SGI1 a été réalisée grâce aux propriétés de ces régions. En effet, les origines de transfert sont capables de rendre mobilisable en *cis*, un plasmide non mobile lorsque toute la machinerie nécessaire au transfert est apportée en *trans*. Le plasmide choisi pour cela, pACYC184, est un plasmide non mobile, donc ni conjugatif ni mobilisable, qui a été utilisé plusieurs fois dans la littérature pour ce type d'expérience (Vedantam *et al.*, 2006; Tsvetkova *et al.*, 2010). D'une taille de 4,2 kb, il a l'avantage de ne posséder que trois gènes : un gène impliqué dans sa réplication, et les deux autres conférant les résistances au chloramphénicol et aux tétracyclines (Figure 37).

Pour localiser l'origine de transfert de SGI1, l'îlot génomique a été divisé dans un premier temps en 14 fragments, mesurant entre 900 et 3000 pb (Tableau XIV), qui ont été amplifiés par PCR à l'aide d'amorces dotées de sites de restriction pour les enzymes *NcoI* ou *EcoRI* (Tableau XIII). Ces 14 fragments recouvraient tout l'îlot génomique excepté l'intégron In104. L'hypothèse que l'origine de transfert de SGI1 n'était pas localisée dans son intégron a été faite suite à l'observation que seule la composition de l'intégron différait entre tous les variants de SGI1, le reste de l'îlot génomique restant inchangé. Or, le variant SGI1-C, qui possède l'un des plus petits dérivés de l'intégron In104, est capable d'être transféré. Après l'amplification par PCR (dont la matrice était l'ADN génomique extrait de la souche *S. Agona* 47SA97), les produits de PCR purifiés et le plasmide pACYC184 extrait ont été digérés simultanément par les enzymes *NcoI* et *EcoRI* (à 37°C pendant 2h), puis purifiés, avant d'être mis en contact dans une réaction de ligation réalisée à 16°C pendant 18h. La ligation ainsi réalisée a permis de cloner les fragments issus de SGI1 entre les sites *NcoI* et *EcoRI* de pACYC184, localisés dans le gène de résistance au chloramphénicol. Les produits de ligation ont ensuite été utilisés pour transformer par électroporation la souche d'*E. coli* TOP10. Après addition d'1 mL de milieu SOC, les cellules fraîchement électroporées ont été incubées à 37°C pendant 1h, avant l'isolement des transformants sur géloses BHI grâce aux antibiotiques Tc et Sm pour sélectionner le plasmide pACYC184 et les cellules TOP10 respectivement. Les constructions ont été vérifiées par PCR à partir des colonies sélectionnées (ou des bouillons BHIensemencés par les transformants sélectionnés) grâce aux amorces FwCAT et RvCAT

Tableau XIV : Plasmides construits à partir de pACYC184.

Plasmides	Insert cloné dans pACYC184 (entre les sites <i>EcoRI</i> et <i>NcoI</i>)		
	Tailles	Positions dans SGI1 (pb) ^a	Amorces utilisées pour l'amplification
pACYC1	1206 pb	145-1351	FwEcoR1oriT1-RvNcoIoriT1
pACYC2	993 pb	1331-2324	FwEcoR1oriT2-RvNcoIoriT2
pACYC3	1520 pb	2354-3874	FwEcoR1oriT3-RvNcoIoriT3
pACYC4	2615 pb	3921-6536	FwEcoR1oriT4-RvNcoIoriT4
pACYC5	2335 pb	6516-8851	FwEcoR1oriT5-RvNcoIoriT5
pACYC6	2894 pb	8860-11754	FwEcoR1oriT6-RvNcoIoriT6
pACYC7	1700 pb	11734-13434	FwEcoR1oriT7-RvNcoIoriT7
pACYC8	1750 pb	13414-15164	FwEcoR1oriT8-RvNcoIoriT8
pACYC9	1769 pb	15144-16913	FwEcoR1oriT9-RvNcoIoriT9
pACYC10	2829 pb	17004-19833	FwEcoR1oriT10-RvNcoIoriT10
pACYC11	2078 pb	19852-21930	FwEcoR1oriT11-RvNcoIoriT11
pACYC12	1609 pb	21981-23590	FwEcoR1oriT12-RvNcoIoriT12
pACYC13	1680 pb	23570-25250	FwEcoR1oriT13-RvNcoIoriT13
pACYC14	2911 pb	25230-28141	FwEcoR1oriT14-RvNcoIoriT14
pACYC10A	1344 pb	17004-18348	FwEcoR1oriT10-RvNcoIoriT10A
pACYC10B	1748 pb	17004-18752	FwEcoR1oriT10-RvNcoIoriT10B
pACYC10C	551 pb	17004-17555	FwEcoR1oriT10-RvNcoIoriT10C
pACYC10D	813 pb	17535-18348	FwEcoR1oriT10D-RvNcoIoriT10A
pACYC10D2	403 pb	17535-17938	FwEcoR1oriT10D-RvNcoIoriT10D2
pACYC10D4	550 pb	17798-18348	FwEcoR1oriT10D3A-RvNcoIoriT10A
pACYC10D4B	332 pb	18016-18348	FwEcoR1oriT10D4B-RvNcoIoriT10A
pACYC10D4C	217 pb	18131-18348	FwEcoR1oriT10D4C-RvNcoIoriT10A
pACYC10D4E	245 pb	18016-18261	FwEcoR1oriT10D4B-RvNcoIoriT10D4D
pACYC10D7	135 pb	18016-18151	FwEcoR1oriT10D4B-RvNcoIoriT10D3
pACYC10D8	66 pb	18085-18151	FwEcoR1oriT10D6-RvNcoIoriT10D3

^a Positions par rapport à la séquence de SGI1 dans GenBank (AF261825).

(Tableau XI) qui s'hybrident sur le gène de résistance au chloramphénicol de part et d'autre des sites de clonage *NcoI* et *EcoRI* de pACYC184 (Figure 37).

Ces constructions ont été extraites des souches d'*E. coli* TOP10 afin de transformer par électroporation des souches de *S. Agona* 47SA97, porteuses du plasmide R55 et du variant SGI1-C. Après électroporation, les cellules, auxquelles 1 mL de SOC et 10 µg/mL de florfénicol (Ff, pour le maintien de R55) ont été ajoutés, ont été incubées à 37°C pendant 2h. Les souches de *Salmonella* possédant à la fois SGI1-C, R55 et l'une des constructions réalisées à partir de pACYC184 ont été sélectionnées sur géloses BHI complémentées par Km, Ff (20 µg/mL, pour sélectionner R55), Sm (pour SGI1-C) et Tc (pour pACYC184 ou un de ses dérivés). La présence de ces différents éléments a ensuite été vérifiée par antibiogramme, et par PCR grâce aux couples d'amorces R55-3/R55-4 (pour R55), FwCAT/RvCAT (pour vérifier la présence de l'insert dans pACYC184), et LJ-R1/U7-L12 (jonction gauche entre SGI1 et le chromosome de *Salmonella*). Les souches possédant ces trois éléments ont été utilisées dans les tests de mobilisation décrits dans la partie B.3.c.

Par la suite, plusieurs autres constructions (Tableau XIV) ont été réalisées de la même manière pour délimiter le fragment minimal d'ADN susceptible de contenir l'origine de transfert de SGI1.

b) Construction des souches d'*E. coli* DH1

Afin de mettre en évidence le rôle potentiel de régions de SGI1, hormis son origine de transfert, dans la mobilisation de l'îlot génomique, des tests de mobilisation du plasmide pACYC184 contenant l'origine de transfert de SGI1 ont été menés en présence de différentes associations entre les plasmides helper, R55 ou R16a, et le variant SGI1-C (Figure 38). Tout d'abord, le plasmide pACYC184 contenant la région 10D4 de SGI1 (appelé par la suite pACYC10D4) a été utilisé pour transformer par électroporation la souche d'*E. coli* DH1. Les transformants ont été sélectionnés sur géloses BHI supplémentées par Tc et vérifiés par PCR grâce au couple d'amorces FwCAT/RvCAT. Le plasmide helper R16a et/ou le variant SGI1-C ont alors été introduits par conjugaison (selon les méthodes décrites respectivement dans les parties B.2.b et B.2.c) dans la souche d'*E. coli* possédant le plasmide pACYC10D4, créant ainsi trois souches d'*E. coli* DH1 : une possédant pACYC10D4 et R16a, une deuxième avec pACYC10D4 et SGI1-C, et enfin une dernière avec pACYC10D4, R16a et SGI1-C. Les mêmes souches ont été réalisées en remplaçant pACYC10D4 par le plasmide pACYC184

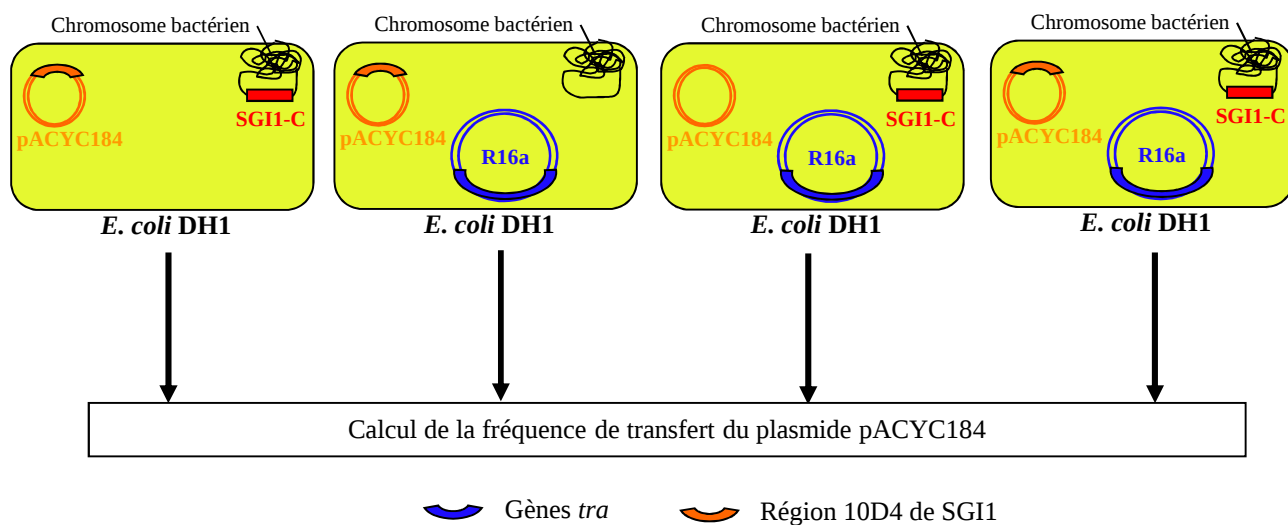


Figure 38 : Tests de mobilisation du plasmide pACYC184 réalisés à partir d'*E. coli*. Différentes associations entre les plasmides helper (R55 et R16a), le variant SGI1-C et le plasmide pACYC184, porteur ou non de la région 10D4 contenant l'*oriT* de SGI1, ont été réalisées.

original, ces dernières ont servi de témoins négatifs aux tests de mobilisation. La présence des différents éléments génétiques a été vérifiée par PCR grâce aux couples d'amorces FwCAT/RvCAT (pour pACYC184 et pACYC10D4), A/C Fw/A/C Rv (pour R16a et R55) et LJ-R1/EcU7-L12 (pour la jonction gauche entre SGI1-C et le chromosome d'*E. coli*), ainsi que par antibiogramme pour vérifier le phénotype de résistance conféré par ces différents éléments.

c) Principe des tests de mobilisation

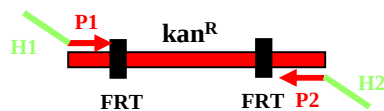
Les souches de *S. Agona* 47SA97 et d'*E. coli* DH1 des parties B.3.a et B.3.b ont été utilisées avec la souche d'*E. coli* BM14 résistante à l'azide de sodium dans des tests de mobilisation proches de ceux décrits dans la partie B.2., les différences étant seulement les antibiotiques utilisés pour la sélection des bactéries donneuses et des transconjugants. Ainsi, après mise en contact dans un ratio donneuse/réceptrice 4:1 et incubation 18h à 37°C sans agitation, les transconjugants (*E. coli* BM14 qui ont reçu le plasmide dérivé de pACYC184) ont été sélectionnés par l'azide de sodium et Tc. Les souches donneuses de *S. Agona* 47SA97 d'une part, possédant SGI1-C, R55 et un dérivé de pACYC184 ont été sélectionnées par Km, Ff, Sm et Tc. D'autre part, les souches donneuses d'*E. coli* DH1 possédant pACYC10D4 et, R16a et/ou SGI1-C ont été sélectionnées respectivement par Tc, Km et/ou Sm. Les mêmes types de contrôles que ceux présentés dans la figure 36 ont été réalisés, aussi bien ceux pour s'assurer de la sélectivité des antibiotiques sur les souches donneuses et réceptrices que les contrôles de conjugaison réalisés en sélectionnant spécifiquement le transfert du plasmide helper utilisé (par Km et l'azide de sodium), ainsi que celui de l'îlot SGI1-C lorsque celui-ci était présent (par Sm et l'azide de sodium). Les transconjugants contenant les plasmides dérivés de pACYC184 ont été vérifiés par PCR grâce au couple d'amorces FwCAT/RvCAT. Le transfert de pACYC184 ou de ses dérivés a été estimé en divisant le nombre de transconjugants par le nombre de donneurs.

B.4 Délétions des régions nucléotidiques d'intérêts

a) Principe de la méthode

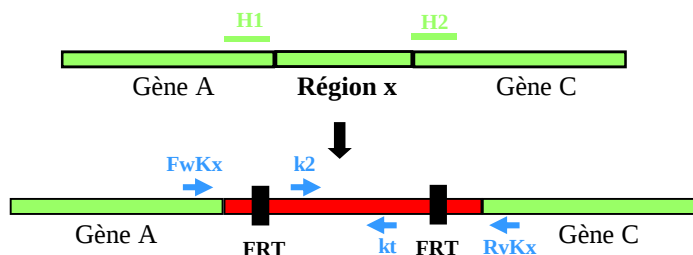
Les délétions des régions nucléotidiques d'intérêts réalisées dans ce travail ont été inspirées de la technique publiée par Datsenko & Wanner (Datsenko & Wanner, 2000). Cette technique a été utilisée pour déléter les ORF potentiellement impliquée dans le transfert de

1) Amplification par PCR :



Cassette de résistance à la kanamycine présente sur le plasmide pKD4

2) Recombinaison grâce aux extrémités H1 et H2 :



Système de recombinaison λ red (plasmide pKD46)

Recombinase FLP (plasmide pCP20)

3) Élimination du gène de résistance :

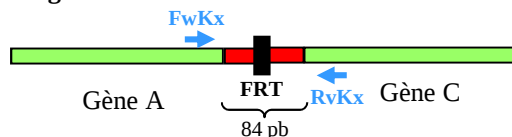


Figure 39 : Principe de délétion d'ADN selon la technique de Datsenko & Wanner. Les amorces P1 et P2 s'hybrident autour du gène de résistance à la kanamycine (kan^R) présent sur pKD4 et portent respectivement les extensions H1 et H2, homologues au gène à déléter. Après recombinaison grâce à ces extensions et le système λ red apporté par le plasmide pKD46, la FLP recombinase (apportée par pCP20) reconnaît les séquences FRT pour enlever le gène kan^R , en laissant une séquence de 84 pb. Les flèches bleues représentent les sites d'hybridation des amorces utilisées pour la vérification des constructions, x = nom de la région délétée. Adaptée de Datsenko & Wanner, 2000.

Tableau XV : Plasmides utilisés pour la délétion des régions nucléotidiques d'intérêts.

Plasmides	Caractéristiques génétiques	Profil de résistance ^a	Marqueur de sélection ^a	Références
pKD4	Plasmide-matrice pour l'amplification de la cassette <i>kan</i>	AK	K	Datsenko & Wanner, 2000
pKD46	Système de recombinaison λ Red	A	A	Datsenko & Wanner, 2000
pCP20	Gène codant la FLP recombinase	AC	A	Datsenko & Wanner, 2000
pBD12	Plasmide-matrice pour l'amplification du gène <i>aac(3)-Id</i>	AGK	G	Doublet <i>et al.</i> , 2004b
pKD46-Gm	Système de recombinaison λ Red	G	G	Cette étude, Doublet <i>et al.</i> , 2008a
pCP20-Gm	Gène codant la FLP recombinase	CG	G	Cette étude, Doublet <i>et al.</i> , 2008a

^a Abréviations : A : ampicilline, C: chloramphénicol, G : gentamicine, K : kanamycine.

SGI1 : S020, S023 et S024, ainsi que la séquence *oriT* suspectée de SGI1. Cette technique a également été utilisée pour remplacer une portion d'ADN sans rôle particulier (au niveau de l'ORF S009) par un gène de résistance à la kanamycine afin d'obtenir une souche avec un phénotype de résistance différent permettant ainsi l'introduction des plasmides de multi-résistance p13688 et p13956. Des mutants de régions plus larges ont également été réalisés (entre les ORF S003 et S010, S007 et S013, et S013 et S019). Ces délétions ont été réalisées dans les souches de *S. Agona* 47SA97 et *S. Agona* 959SA97. Cette technique de délétion consiste à remplacer, par recombinaison homologue, une séquence nucléotidique cible par un gène de résistance à un antibiotique, et d'éliminer ce gène de résistance une fois l'ADN-cible délété (Figure 39). Après amplification, le produit de PCR, qui contient le gène de résistance entouré par des séquences FRT (FLP Recognition Target) et des extrémités homologues à la séquence nucléotidique à déléter, est introduit par électroporation dans les souches de *Salmonella* porteuses du plasmide pKD46. Ce plasmide contient le système λ red qui permet la recombinaison entre la séquence nucléotidique d'intérêt et le produit de PCR, grâce aux extrémités de ce dernier, homologues aux extrémités de la région à déléter (Tableau XV). Une fois la cassette insérée, un second plasmide, pCP20 (Tableau XV), porteur du gène de la recombinase FLP, est introduit dans ces cellules. La recombinase FLP agit en éliminant la cassette de résistance à la kanamycine grâce aux séquences FRT qui l'entourent. La technique, toutefois, ne permet pas d'éliminer tous les fragments nucléotidiques introduits, cependant l'ADN restant (d'une taille de 84 pb) ne provoque pas de décalage du cadre de lecture, et donc n'empêche pas l'expression des gènes d'un même opéron.

b) Modification des plasmides utilisés dans la méthode Datsenko & Wanner

Afin de réaliser des délétions dans les souches de *Salmonella* porteuses de SGI1, les plasmides pKD46 et pCP20 utilisés dans la technique Datsenko & Wanner ont dû être modifiés pour pouvoir être introduits dans ces souches (Figure 40). En effet, le phénotype de résistance conféré par SGI1 (ACSSuT) est incompatible avec les résistances portées par les plasmides pKD46 et pCP20 (A et AC, respectivement). Une cassette de résistance à la gentamicine (présente sur le variant SGI1-H) a donc été ajoutée à ces plasmides, dans leur gène *bla* qui confère la résistance à l'ampicilline, créant ainsi les plasmides pKD46-Gm et pCP20-Gm (Figure 40, tableau XV).

Pour cela, le plasmide pBD12, dans lequel a été clonée une partie de l'intégron du variant SGI1-H, a servi de matrice à une réaction de PCR avec les amorces intI1 et aacR, permettant

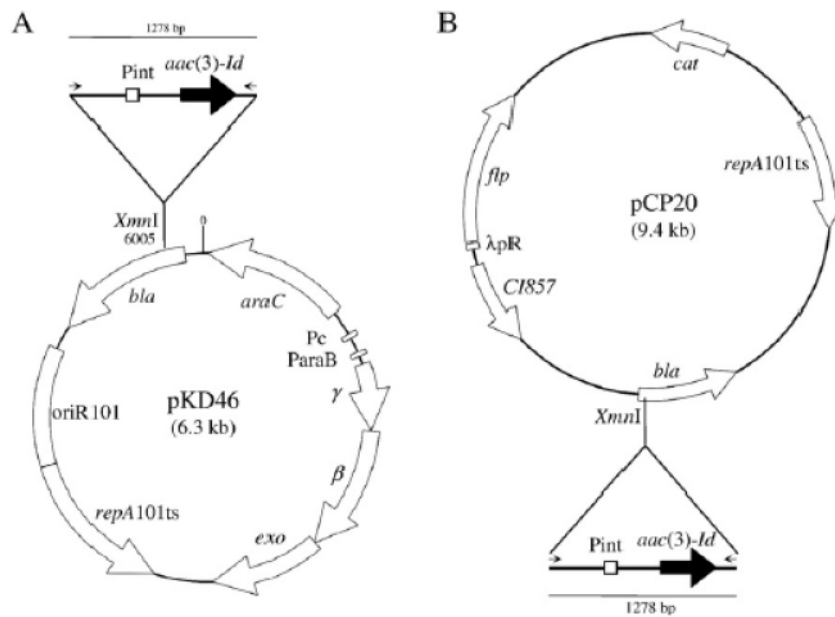


Figure 40 : Représentation schématique des plasmides pKD46 et pCP20, ainsi que des modifications réalisées. Les promoteurs Pint, Pc, ParaB sont indiqués par des carrés blancs. Le site de restriction pour l'enzyme XmnI, présent dans le gène de résistance à l'ampicilline *bla*, est représenté avec le fragment d'ADN inséré qui contient le gène *aac(3)-Id* et le promoteur associé des intégrons de classe I, Pint. Les petites flèches noires représentent les sites d'hybridations des amorces int1 et aacR qui ont permis d'amplifier le fragment d'ADN inséré dans les plasmides. Le gène *repA101ts* et *oriR101* permettent la réplication thermosensible des plasmides. (A) plasmide pKD46, le système λ red inclus les gènes γ, β et *exo* dont l'expression est contrôlé par le promoteur Parab induit par l'arabinose. (B) plasmide pCP20 : le gène *flp* codant la recombinase FLP est sous le contrôle du promoteur λpR et du répresseur sensible à la température ci857. Le gène *cat* confère la résistance au chloramphénicol (tirée de Doublet *et al.* 2008).

ainsi d'amplifier un fragment d'ADN de 1278 pb qui contient le promoteur *P_{int}* de l'intégron et la cassette contenant le gène de résistance à la gentamicine *aac(3)-Id*. Une réaction de ligation, à 16°C pendant 18h, a ensuite été réalisée entre ce produit de PCR purifié et les plasmides pKD46 ou pCP20, préalablement extraits, digérés par l'enzyme *XmnI* (à 37°C pendant 2h) et purifiés. Cette enzyme possède un site unique de coupure, localisé dans le gène *bla*, qui a donc permis de linéariser les deux plasmides. Les produits de ligation ont ensuite été électroporés dans des souches d'*E. coli* TOP10, qui ont été incubées à 30°C pendant 2h dans du milieu SOC. Ces plasmides possèdent un système de réplication thermosensible qui est inactivé à 37°C, les souches qui les contiennent ont donc toujours été cultivées à 30°C pour assurer le maintien de ces plasmides au cours des divisions. Après sélection des transformants sur géloses BHI (incubées également à 30°C) contenant de la Gm (30 µg/mL), la présence de l'insert dans les plasmides pKD46-Gm et pCP20-Gm a été vérifiée par amplification par PCR à l'aide du couple d'amorces *intI1/aacR*. La résistance de ces souches à la gentamicine a également été contrôlée par antibiogramme.

c) Remplacement des régions d'intérêts par la cassette *kan*

Les souches dans lesquelles les délétions ont été réalisées ont tout d'abord été transformées par électroporation avec les plasmides pKD46 (pour *S. Agona* 47SA97) ou pKD46-Gm (pour *S. Agona* 959SA97). Après incubation pendant 2h à 30°C dans 1 mL de milieu SOC, les clones transformants ont été sélectionnés sur géloses BHI supplémentées par de l'ampicilline (Amp, 50 µg/mL) et Sm pour *S. Agona* 47SA97 ou par Gm, Sm, Tc pour les souches porteuses de SGI1. La présence de SGI1 (ou du variant SGI1-C) et celle du plasmide pKD46-Gm ont été vérifiées par PCR à l'aide des couples d'amorces LJ-R1/U7-L12 et *intI1/aacR*, respectivement. Des antibiogrammes ont également été réalisés pour vérifier la présence des résistances portées par pKD46, pKD46-Gm et par les îlots génomiques.

Les fragments d'ADN contenant la cassette de résistance à la kanamycine (*kan*), bordée de deux extensions de 50 nucléotides spécifiques aux extrémités de la séquence nucléotidique à déléter, ont été générés par PCR à partir du plasmide-matrice pKD4 (Figure 39). Les amorces utilisées pour cette amplification étaient constituées de segments de 20 nucléotides (P1 et P2) qui s'hybrident de part et d'autre de la cassette *kan* et de segments de 50 nucléotides (H1 et H2) qui permettent la recombinaison (Tableau XVI). Ces PCR ont été réalisées dans un volume final de 400 µL contenant environ 400 ng du plasmide pKD4 extrait, 0,4 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTP, 1X de tampon Green GoTaq® Flexi et de 17

Tableau XVI : Amorces utilisées dans le cadre des délétions.

Amorces	T ^a (°C)	Localisations	Positions ^b	Rôles	Séquences 5'-3' ^c
P1H1S009	52	S008	7492-7542	Délétions régions S009 et S007-S013	ATAAAAGCTTCAGTAGTGCCACAGAGTC AAATCGAACTCATAAATATCT GTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
P2H2S009	52	S010	8742-8792	Délétion région S009	TAAGAGAAAATCTCAGAGAAGAGGTTGGT GATAACGTATTGGCAGATAAA CATATGAA TATCCTCCTTAG
P1H1S013	52	S012	13074-13124	Délétions régions S013 et S012-S019	CATTTCGTGCCACAGCTCGCATCAGTTGAA CAATCTGATCTGCATTACAG GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
P2H2S013	52	S013	14270-14320	Délétions régions S013 et S007-S013	CCACAAAGGCTGGTGTTCACGGATTA GGCATTGTAACGTTGTATGC CATATGAA TATCCTCCTTAG
P1H1S020	52	S019	16696-16746	Délétions ORF S020 et région S020-S024	CCATGCCGCACATAAACATGGCTTCTTTCT CTTACCCATTTTCCATCAA GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
P2H2S020	52	S021	17762-17812	Délétion ORF S020	CGGACGGGCCAACAAAGTAACAATTTTGA TTAACAGAGTTAGGGGGATCA CATATGAA TATCCTCCTTAG
P1H1S023	52	Entre S022 et S023	18367-18417	Délétions ORF S023 et S023-S024	AAAAGCGCCTTTTGGGCGGTGTTTGATG CTCAACTAAGTTACTATCGGC GTGTAGGCTG GAGCTGCTTC
P2H2S023	52	S024	20378-20428	Délétion ORF S023	GTGATAGCCAAGCTTGCGGAGCTGCCCCGA GTGATTGCTGTAGATGCATGG CATATGAA TATCCTCCTTAG
P1H1S024	52	S023	20295-20345	Délétion ORF S024	ATTGGGTTCAAGTGTTAGCCCATCAGAAG GCAACCATGCATCTACAGCAA GTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
P2H2S024	52	S025	22320-22370	Délétions ORF S024, S023-S024 et région S020-S024	CCTGTCTTATTTAAGACAAGAAAATACTT CTAGGAGTTGAAGGCAAGG CATATGAATA TCCTCCTTAG
P1H1r10D4B	52	S021	17966-18016	Délétion région 10D4B (<i>oriT</i>)	TGTCATTCTTTGGAAAGGAAAGCGCGAAG CGCGCTAACCGCCGAAGCGGG GTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
P2H2r10D4B	52	Entre S022 et S023	18398-18448	Délétion région 10D4B (<i>oriT</i>)	TTAACCCCTCAGGGGGACTGTCCCCTAGGG GCACTCCTCCGTCTAAAACCT CATATGAAT ATCCTCCTTAG
P1H1R1	52	Entre S002 et S003	2235-2285	Délétion région S003-S010	AACCAACAGTGTTCACAACTTTTGCAA AACAATAACATAAAAAAACCG GTGTAGGC TGGAGCTGCTTC
P2H2R1	52	S010	8528-8578	Délétion région S003-S010	GAGCTGAATATAGACGCGCAATTAAAGAG CTTAAAGTGATGATATTACTG CATATGAAT ATCCTCCTTAG
P2H2R2	52	S019	16663-16713	Délétion région S012-S019	GTTTATGTGCGGCATGGAGGGAAGACGGC TCGGCGAGCTATGGTAAAAAG CATATGAA TATCCTCCTTAG

^a Températures d'hybridation des fragments P1 et P2.

^b Positions par rapport à la séquence de SGI1 dans GenBank (AF261825).

^c En noir : séquences correspondantes à SGI1 (fragments H1 et H2), en rouge : séquences correspondantes au plasmide pKD4 (fragments P1 et P2).

unités de GoTaq[®] Flexi DNA polymérase. Le programme d'amplification est semblable à celui décrit dans la partie B.1.d. (la température d'hybridation des segments P1 et P2 des amorces étaient de 52°C). Après purification sur gel d'agarose, les produits de PCR (d'une taille de 1477 pb) ont été utilisés pour transformer les cellules de *Salmonella* contenant les plasmides pKD46 ou pKD46-Gm, préalablement cultivées en présence d'arabinose (1,5 mM) pour induire l'expression du système de recombinaison λ Red. Les cellules transformées ont alors été incubées à 30°C pendant 3h avant la sélection, à 30°C pendant 18h sur géloses BHI supplémentées par Km et Sm (et Tc pour les souches porteuses de SGI1), des bactéries pour lesquelles la cassette *kan* a été intégrée au chromosome. Les colonies présentes sur ces boîtes ont été vérifiées par amplification par PCR des jonctions entre la cassette *kan* et l'îlot génomique, grâce aux amorces k2 et kt qui s'hybrident dans la cassette *kan*, et aux amorces spécifiques à l'îlot génomique qui s'hybrident de part et d'autre de la région délétée (nommées FwKx et RvKx, x représentant le nom de la région délétée, par exemple FwKS020 et RvKS020 pour les amorces qui s'hybrident autour de l'ORF S020) (Figure 39). La résistance de ces clones à la kanamycine conférée par la cassette *kan* a également été vérifiée par antibiogramme. Deux à trois cultures successives à 37°C (ou 43°C) pendant au moins 8h ont ensuite été réalisées pour éliminer le plasmide pKD46 (ou pKD46-Gm), avant de vérifier son absence par antibiogramme.

d) Élimination de la cassette de résistance à la kanamycine

La résistance à la kanamycine étant souvent le marqueur utilisé pour sélectionner les plasmides helper utilisés pour mobiliser SGI1, la cassette *kan* a dû être ensuite enlevée des mutants réalisés ci-dessus. Pour cela, les souches délétées de ces régions ont été transformées par électroporation par le plasmide pCP20-Gm (ou pCP20 pour les souches possédant le variant SGI1-C) avant d'être incubées à 30°C pendant 2h. Les transformants ont été ensuite sélectionnés sur géloses BHI supplémentées par Gm, Sm et Tc (ou Ampi et Sm pour les souches possédant le variant SGI1-C et le plasmide pCP20) après incubation 18h à 30°C. Les colonies présentes ont ensuite été mises en culture pendant 18h à 30°C en bouillon BHI avec les mêmes antibiotiques, étape nécessaire à la synthèse et à l'action de la recombinase FLP. Après isolement à partir de ces bouillons sur gélose BHI (toujours à 30°C et avec les mêmes antibiotiques), les colonies présentes ont été repiquées sur deux géloses BHI contenant Km pour l'une, et Sm et Tc pour l'autre (ou uniquement Sm pour les souches porteuses du variant SGI1-C). Cette étape permettait d'identifier les clones sensibles à Km. Ces clones,

susceptibles d'avoir perdu la cassette *kan*, ont été cultivés en bouillon BHI et vérifiées par amplification par PCR de la région délétée grâce aux amorces FwKx/RvKx, qui s'hybrident autour des régions délétées. L'élimination du plasmide pCP20 (ou pCP20-Gm) a alors été réalisée par deux à trois cultures successives à 37°C (ou 43°C) pendant 8h, et l'absence de ces plasmides a ensuite été vérifiée par antibiogramme.

Ces souches, délétées de certaines régions et dépourvues de la cassette *kan*, ont alors été utilisées dans les tests de mobilisation de SG11 après introduction d'un plasmide helper (R55 ou R16a le plus souvent) (voir les parties B.2.b et B.2.c).

Tableau XVII : Mobilisation de SGI1 par des plasmides de différents groupes d'incompatibilité.

Souches donneuses de <i>S. enterica</i>	Îlots génomiques	Plasmides conjugatifs helper et groupes d'incompatibilité		Fréquences de transfert de SGI1 ^a
Agona 959SA97	SGI1	-	-	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97 ΔS009::kan	SGI1ΔS009::kan	-	-	<10 ⁻⁹
Agona 47SA97	SGI1-C	-	-	<10 ⁻⁹
Agona 47SA97 Δxis::kan	SGI1-CΔxis::kan	-	-	<10 ⁻⁹
Albany 7205.00	SGI1-F	-	-	<10 ⁻⁹
Agona 777SA01	SGI1-A	p777-SA-01	IncI1	<10 ⁻⁹
Typhimurium 04-3486	SGI1	p04-3486	IncI1	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	R55	IncA/C	1,9.10⁻³
Agona 959SA97	SGI1	R16a	IncA/C	4,4.10⁻³
Agona 959SA97	SGI1	pOX38	IncFI	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	R1-16	IncFII	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	pCEB6542	IncHI2	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	p1639-SA-00	IncHI2	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	p142-SA-01	IncHI2	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	p3464b	IncHI2	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	p777-SA-01	IncI1	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	p04-3486	IncI1	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	R112	IncI1	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	R69	IncL/M	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	RPC3	IncN	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	RP4	IncP	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97	SGI1	RSa	IncW	<10 ⁻⁹
Agona 959SA97 ΔS009::kan	SGI1ΔS009::kan	R55	IncA/C	3,7.10⁻⁵
Agona 959SA97 ΔS009::kan	SGI1ΔS009::kan	p13688	IncA/C	6,7.10⁻⁵
Agona 959SA97 ΔS009::kan	SGI1ΔS009::kan	p13956	IncA/C	2,2.10⁻⁵
Agona 47SA97	SGI1-C	R55	IncA/C	3,4.10⁻³
Agona 47SA97	SGI1-C	pRA1	IncA/C	9,8.10⁻³
Agona 47SA97	SGI1-C	pIP40a	IncA/C	1,9.10⁻²
Agona 47SA97	SGI1-C	R16a	IncA/C	8,9.10⁻³
Agona 47SA97 Δxis::kan	SGI1-CΔxis::kan	R55	IncA/C	3,1.10⁻⁷
Agona 47SA97 Δxis::kan	SGI1-CΔxis::kan	p13688	IncA/C	5,2.10⁻⁶
Agona 47SA97 Δxis::kan	SGI1-CΔxis::kan	p13956	IncA/C	2,2.10⁻⁶
Albany 7205.00	SGI1-F	R55	IncA/C	7,2.10⁻⁵
Albany 7205.00	SGI1-F	pAM04528	IncA/C	<10 ⁻⁹
Albany 7205.00	SGI1-F	pN418	IncA/C	<10 ⁻⁹

^a Les fréquences de transfert correspondent au nombre de transconjugants contenant SGI1 divisé par le nombre de donneurs.

C. Résultats

C.1 Détermination du spectre de plasmides capables de mobiliser SGI1

a) Tests de mobilisation de SGI1 par des plasmides de différents groupes d'incompatibilité

Depuis le début des années 2000, des plasmides conjugatifs, appartenant principalement aux groupes d'incompatibilité IncI1 et IncHI2, ont été identifiés chez des souches multi-résistantes de *Salmonella* et chez d'autres Entérobactéries isolées chez l'Homme ou l'animal (Weill *et al.*, 2004; Bertrand *et al.*, 2006; Garcia Fernandez *et al.*, 2007; Cloeckaert *et al.*, 2007; Girlich *et al.*, 2007; Cloeckaert *et al.*, 2010). L'intérêt suscité par ces plasmides était dû à la présence sur ces derniers de gènes codant des BLSE dont la diffusion pouvait conduire à des problèmes de santé publique ou animale. En ce qui nous concerne, la présence accrue de ces plasmides chez les entérobactéries augmentait la probabilité pour que l'un d'eux cohabite avec l'îlot SGI1 chez une souche de *Salmonella*. Sachant que, jusqu'à présent, seul le plasmide R55 du groupe IncA/C avait montré ses capacités à mobiliser SGI1, l'objectif de cette étude était de vérifier si ces plasmides porteurs de gènes de BLSE étaient capables de mobiliser l'îlot génomique et donc de participer à la dissémination de celui-ci. Dix sept plasmides porteurs de gènes de BLSE ($bla_{CTX-M-1}$, $bla_{CTX-M-2}$, $bla_{CTX-M-9}$, ou bla_{TEM-52}) ont tout d'abord été introduits dans la souche de *S. Agona* 959SA97, servant de donneuse lors des tests de mobilisation vers la souche réceptrice d'*E. coli* BM14. Alors qu'avec le plasmide helper « de référence » R55, SGI1 était transféré à une fréquence moyenne de $1,9.10^{-3}$, aucun transconjugant de SGI1 n'a été obtenu avec les plasmides porteurs de gènes de BLSE lors de deux tests de mobilisation indépendants (Tableau XVII). Seuls quelques résultats représentatifs de ceux obtenus avec ces plasmides sont présentés dans le Tableau XVII, il s'agit de ceux obtenus avec les plasmides pCEB6542 ($bla_{CTX-M-1}$), p1639-SA-00 et p142-SA-01 ($bla_{CTX-M-2}$), p3464b ($bla_{CTX-M-9}$), et p777-SA-01 et p04-3486 (bla_{TEM-52}). Pour chaque plasmide utilisé, le contrôle de conjugaison, qui met en évidence le transfert du plasmide helper vers la souche d'*E. coli* réceptrice, était positif. Le même résultat a été obtenu avec les

deux souches de terrain, *S. Typhimurium* 04-3486 et *S. Agona* 777SA01, qui contiennent respectivement SGI1 ou le variant SGI1-A, et un plasmide du groupe IncI1, porteur du gène *bla*_{TEM-52} codant une BLSE (Cloeckaert *et al.*, 2007).

L'îlot génomique SGI1 n'est donc pas mobilisable par ces plasmides, porteurs de gènes de BLSE, présents chez *Salmonella*. La présence d'un plasmide conjugatif, qui véhicule pourtant toute la machinerie requise pour son propre transfert conjugatif, dans une cellule contenant SGI1 ne semble donc pas être une condition suffisante pour permettre la mobilisation de l'îlot génomique. Des plasmides de différents groupes d'incompatibilité ont alors été testés afin de déterminer le spectre de plasmides capables de mobiliser SGI1.

Des plasmides conjugatifs représentatifs des principaux groupes d'incompatibilité présents chez les bactéries Gram négatif (Lawley, 2004) (pRA1 pour IncA/C, pOX38 pour IncFI, R1-16 pour IncFII, R112 pour IncI1, R69 pour IncL/M, RPC3 pour IncN, RP4 pour IncP et Rsa pour IncW ; tableau X) ont donc été introduits dans les souches de *S. Agona* 959SA97 ou *S. Agona* 47SA97, véhiculant respectivement, SGI1 ou le variant SGI1-C. La présence des différents éléments a été confirmée par PCR et par antibiogramme. En parallèle de chaque test de mobilisation, le plasmide R55 a été utilisé comme « référence » pour mobiliser SGI1. Parmi tous ces plasmides, seul le plasmide pRA1 (IncA/C) a permis de mobiliser l'îlot génomique à une fréquence de $9,8.10^{-3}$, comparable à celle obtenue lorsque le plasmide R55 était utilisé en parallèle pour mobiliser SGI1 ($3,4.10^{-3}$) (Tableau XVII). Les transconjugants ainsi obtenus présentaient bien le profil de résistance conféré par le variant SGI1-C, ainsi que la résistance à l'azide de sodium due à la souche d'*E. coli* BM14. Plusieurs PCR réalisées sur SGI1 ou les jonctions entre l'îlot génomique et le chromosome d'*E. coli*, ont permis de vérifier l'intégrité de l'îlot génomique, et sa présence dans son site d'intégration préférentiel (l'extrémité 3' du gène *trmE*). Les transconjugants contenant SGI1 étant sensibles à la kanamycine, le plasmide pRA1 n'a donc pas été transféré en même temps que l'îlot génomique, son absence a également été confirmée par PCR. La mobilisation de SGI1 par le plasmide pRA1 s'effectue donc bien en *trans*. Aucun des plasmides appartenant aux autres groupes d'incompatibilité n'a permis de mobiliser SGI1, dans des expériences répétées au moins deux fois. Cependant, leur propre transfert vers la souche réceptrice d'*E. coli* a pu être sélectionné lors des contrôles de conjugaison réalisés en parallèle des tests de transfert de SGI1, montrant ainsi que la capacité de transfert conjugatif des plasmides helper était intacte. En plus de confirmer l'hypothèse émise précédemment, à savoir que la présence d'un plasmide conjugatif dans la même cellule que SGI1 n'est pas une condition suffisante pour

mobiliser l'îlot génomique, ces derniers résultats permettent de s'apercevoir que de nombreux plasmides de différents groupes d'incompatibilité sont incapables de permettre le transfert de SGI1. Seul le plasmide pRA1, représentant le groupe IncA/C dans ces expériences, possède la capacité de mobiliser l'îlot génomique. Le plasmide R55 étant également du groupe IncA/C, ces résultats suggèrent que la mobilisation de SGI1 pourrait être exclusivement reliée à la présence de plasmides du groupe IncA/C dans la cellule.

Pour vérifier cette hypothèse, plusieurs plasmides du groupe IncA/C ont été utilisés pour essayer de mobiliser SGI1. Tout d'abord, les plasmides pIP40a et R16a (Tableau X), identifiés au début des années 70 tout comme R55 et pRA1, ont été introduits par conjugaison dans les souches de *S. Agona* 959SA97 ou 47SA97. Les tests de mobilisation réalisés à partir de ces souches ont montré que les plasmides pIP40a et R16a permettaient de mobiliser le variant SGI1-C à des fréquences de $1,9.10^{-2}$ et $8,9.10^{-3}$, respectivement (et $4,4.10^{-3}$ pour SGI1 par R16a) (Tableau XVII). Les transconjugants analysés présentaient le profil de résistance conféré par SGI1 ou le variant SGI1-C, la résistance à l'azide de sodium, ainsi qu'une sensibilité aux marqueurs de résistance spécifiques aux plasmides helper utilisés. La présence de l'îlot génomique et l'absence des plasmides helper dans les transconjugants ont aussi été suggérées par diverses PCR. Ces résultats permettent de mettre en évidence que d'autres plasmides du groupe IncA/C que pRA1 et R55 ont la capacité de mobiliser SGI1. L'hypothèse que seuls les plasmides IncA/C seraient capables de mobiliser en *trans* l'îlot génomique ou ses variants semble donc se vérifier.

Cependant, les plasmides de référence utilisés ci-dessus ont tous été identifiés dans les années 1970, ils peuvent donc être génétiquement proches les uns des autres, donc si l'un d'eux est capable de mobiliser SGI1, il n'est pas surprenant qu'un plasmide proche en ait aussi la capacité. De plus, ces plasmides sont moins répandus de nos jours chez les entérobactéries, et chez *Salmonella* en particulier. Leur capacité à mobiliser SGI1 ne constitue pas actuellement un risque de diffusion accrue de l'îlot génomique. Des plasmides du groupe IncA/C identifiés plus récemment ont donc également été testés pour mobiliser SGI1. Les plasmides p13688 et p13956, responsables de multi-résistance aux antibiotiques y compris aux C3G grâce au gène *bla*_{CMY-2}, font partie d'une famille de plasmides qui a émergé, principalement chez *Salmonella* et *E. coli* partout dans le monde depuis le début du XXI^{ème} siècle (Meunier *et al.*, 2010). A l'inverse des plasmides de référence utilisés précédemment, il existe un risque que ces plasmides co-résident avec l'îlot génomique puisqu'ils circulent actuellement chez *Salmonella*. Pour vérifier leur capacité à mobiliser SGI1, les plasmides

p13688 et p13956 ont dû être introduits dans des souches dérivées de *S. Agona* 959SA97 et *S. Agona* 47SA97, porteuses d'une cassette supplémentaire de résistance à la kanamycine. Ce marqueur, spécifique à l'îlot génomique, était nécessaire pour pouvoir sélectionner le transfert de SGI1 vers la souche réceptrice en raison du grand nombre de résistances présent sur les plasmides p13688 et p13956 (Tableaux X). Bien que l'excision de SGI1 soit légèrement affectée par l'absence de l'excisionase, l'îlot modifié SGI1-C Δ xis::kan de la souche de *S. Agona* 47SA97 était toujours capable d'être transféré vers la bactérie réceptrice (Doublet *et al.*, 2005). L'insertion de la cassette au niveau de l'ORF S009, sans fonction connue, n'empêche pas non plus le transfert SGI1 puisque la mobilisation de l'îlot génomique modifié SGI1 Δ S009::kan par le plasmide R55 a été possible à une fréquence de $3,7 \cdot 10^{-5}$. Les tests de mobilisation de ces îlots modifiés ont révélé que les plasmides p13688 et p13956 étaient capables de les mobiliser à des fréquences similaires (respectivement, $6,7 \cdot 10^{-5}$ et $2,2 \cdot 10^{-5}$) à celle obtenue avec le plasmide R55 (Tableau XVII). Bien que ces fréquences de transfert soient plus faibles que celles obtenues précédemment, la présence de SGI1, intégré dans le chromosome d'*E. coli*, a été montrée par différentes PCR et le profil de résistance ACKSSuT des transconjugants a permis d'attester de la présence de l'îlot génomique modifié. La sensibilité de ces transconjugants aux C3G montre que les plasmides helper étaient absents de ces souches, et que ces îlots génomiques modifiés étaient bien mobilisés en *trans*. Les deux derniers plasmides utilisés, pAM04528 et pN418, identifiés respectivement chez *S. Newport* et *S. Heidelberg* à la fin des années 2000, sont aussi des plasmides de multi-résistance du groupe IncA/C véhiculant le gène *bla*_{CMY-2} (Fricke *et al.*, 2009; Call *et al.*, 2010). Les conjugaisons de ces plasmides entre leurs hôtes originels et la souche réceptrice d'*E. coli* ne permirent pas d'obtenir de transconjugants pour pAM04528. A l'inverse, beaucoup de transconjugants furent obtenus avec le plasmide pN418. Ce dernier a donc été introduit par conjugaison dans la souche de *S. Albany* 7205.00, porteuse du variant SGI1-F et de sa résistance au triméthoprim. L'utilisation de ce variant de SGI1 était indispensable pour avoir un marqueur de sélection spécifique à l'îlot génomique. Le plasmide pAM04528, quant à lui, a été introduit dans la même souche par électroporation. La présence des plasmides et du variant SGI1-F ont été vérifiées par PCR et, celle de leurs résistances par antibiogramme. Les tests de mobilisation réalisés à partir de ces souches ont révélé qu'aucun de ces deux plasmides n'était capable de mobiliser le variant SGI1-F au cours de deux tests indépendants alors que le plasmide R55 a permis le transfert de ce variant à une fréquence de $7,2 \cdot 10^{-5}$ (Tableau XVII). Comme cela était suspecté, le contrôle de conjugaison pour le plasmide pAM04528 était négatif. Par contre, malgré son incapacité à mobiliser l'îlot génomique, le

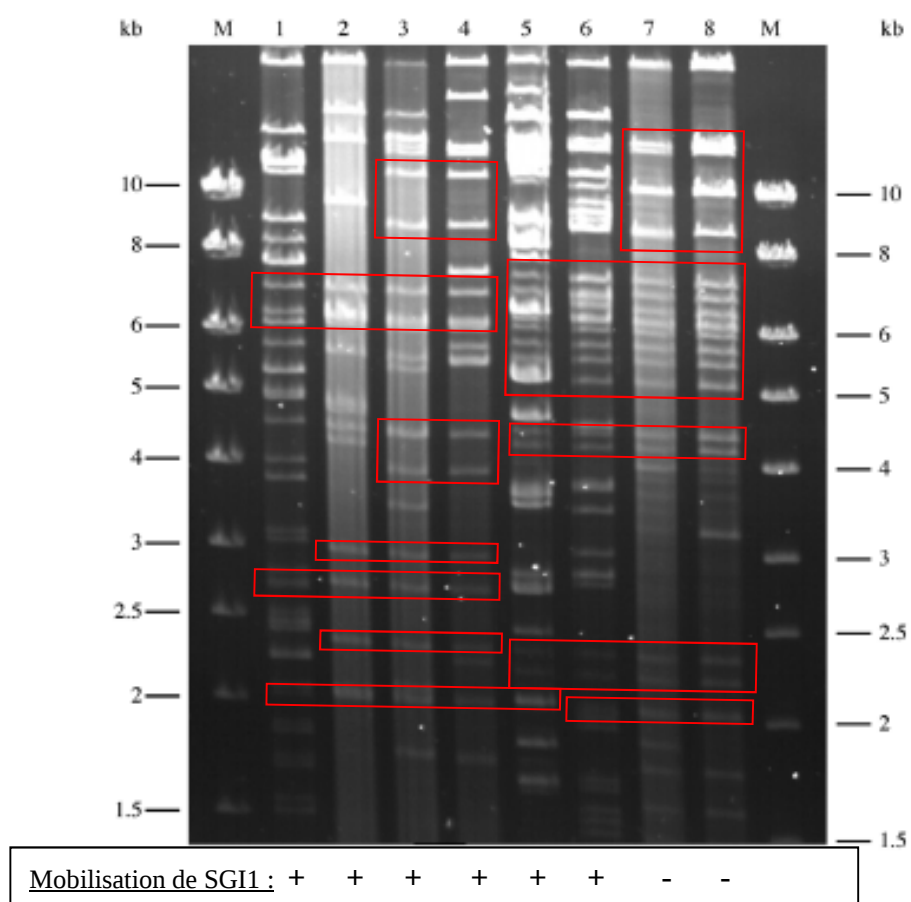


Figure 41 : Profils de restriction des plasmides IncA/C utilisés pour mobiliser SGI1. Les plasmides ont été digérés par l'enzyme *DraI*. Ligne 1 : pRA1, ligne 2 : R55, ligne 3 : R16a, ligne 4 : pIP40a, ligne 5 : p13956, ligne 7 : pN418, ligne 8 : pAM04528, M :Marqueur de taille (Smartladder, Eurogentec, Seraing, Belgique).

plasmide pN418 était bien transférable par conjugaison puisque son contrôle de conjugaison s'est avéré être positif. Ces derniers résultats montrent que des plasmides du groupe IncA/C qui circulent actuellement chez les entérobactéries ont, comme ceux des années 1970, la capacité de mobiliser SGI1. Toutefois, ils suggèrent aussi que tous les plasmides du groupe IncA/C ne seraient pas capables d'assurer la mobilité de l'îlot génomique puisque pN418, bien qu'il soit conjugatif, n'a pas pu permettre la mobilisation de SGI1.

Pour la suite de ce travail, les plasmides R55 ou R16a ont été utilisées pour mobiliser SGI1 ou les éléments génétiques qui en sont dérivés, les deux plasmides offrant des capacités mobilisatrices similaires.

b) Analyses génétiques des plasmides IncA/C

Afin de mettre en évidence des similarités ou des différences qui pourraient expliquer la capacité des plasmides IncA/C à mobiliser ou non SGI1, une analyse comparative a été menée en réalisant les profils de digestion des plasmides IncA/C utilisés dans cette étude et par comparaison de l'organisation génétique des deux seuls plasmides dont la séquence est disponible (pRA1 et pAM04528), les autres plasmides n'étant pas encore séquencés.

L'enzyme de restriction *DraI* a été choisie pour réaliser les profils de restriction des différents plasmides IncA/C en fonction de l'analyse des séquences nucléotidiques des plasmides pRA1 et pAM04528. L'analyse de ces profils de restriction a permis de mettre en évidence deux types de profil : le premier regroupe trois des quatre plasmides isolés au début des années 1970 : R55, R16a et pIP40a (Figure 41). Les profils de ces trois plasmides diffèrent seulement par quelques fragments de tailles différentes. Le second type de profil regroupe tous les plasmides, porteurs du gène *bla*_{CMY-2}, identifiés dans des souches isolées plus récemment. Ces plasmides diffèrent également seulement de quelques fragments dont la taille varie. Il est intéressant de noter que le profil de restriction du plasmide p13688, à même de mobiliser SGI1, et celui du plasmide pN418 incapable de mobiliser l'îlot génomique, possèdent aussi un grand nombre de fragments en commun (Figure 41). Le plasmide pRA1, quant à lui, présente un profil relativement différent avec peu de fragments communs aux deux autres types de profils. Cependant, l'analyse de ces profils suggère que les plasmides identifiés au début des années 1970 ont une grande partie de leurs séquences nucléotidiques en commun, tout comme ceux identifiés depuis le début du XXI^{ème} siècle. Pourtant, malgré les différences observées entre les deux types de profils, les plasmides correspondants, mis à

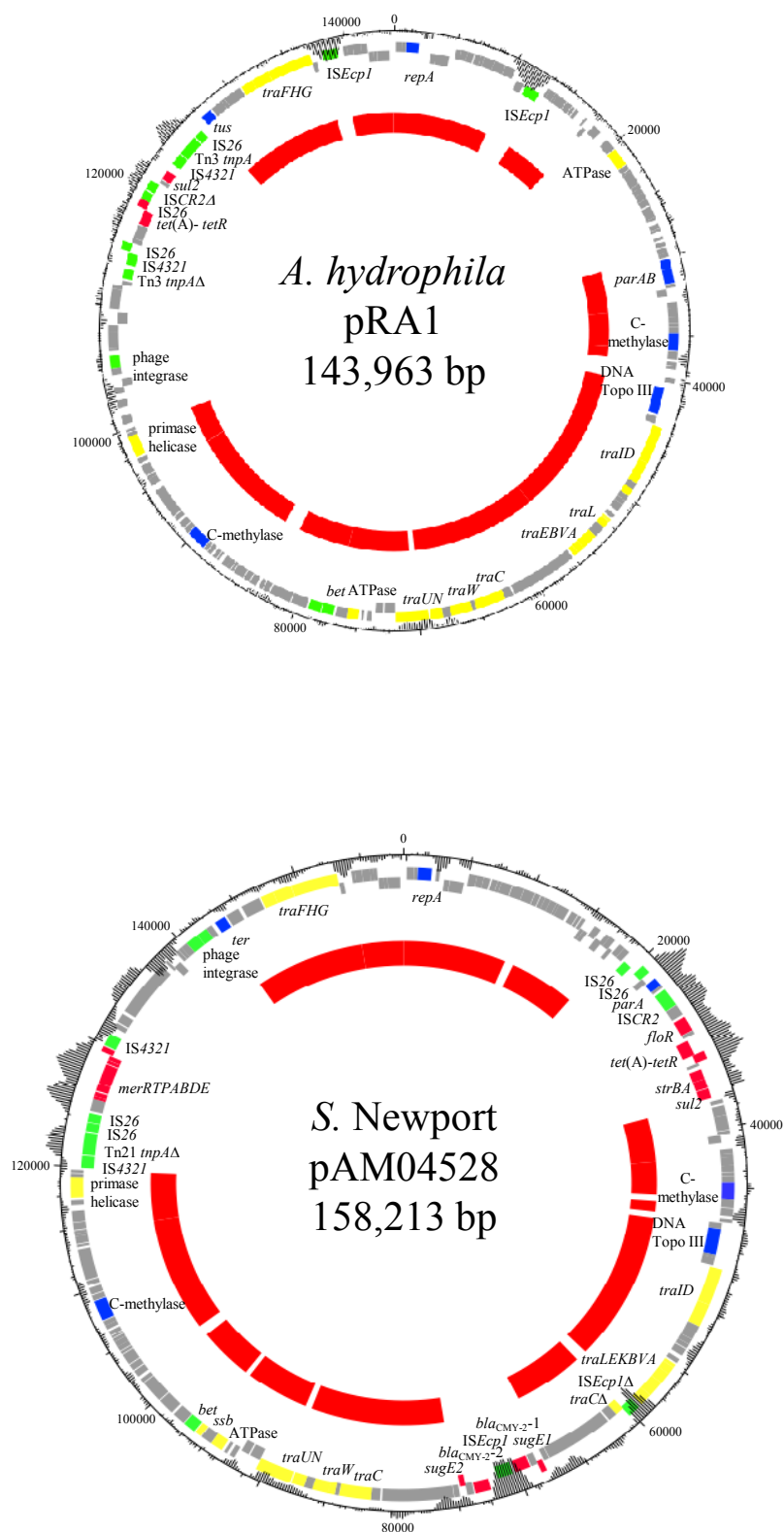


Figure 42 : Organisation génétique des plasmides pRA1 et pAM04528. Les séquences nucléotidiques communes aux deux plasmides sont représentées par une barre rouge au centre. Les régions riches en nucléotide GC sont identifiées par des barres dirigées vers l'extérieur, riches en nucléotides AT par des barres dirigées vers l'intérieur. La couleur des gènes dépend de leur fonction : en bleu : réplication/maintenance, en vert : transposition/recombinaison, en jaune, transfert conjugatif, en rouge, résistance aux antibiotiques, en gris : autres fonctions et protéines hypothétiques. Numéros d'accèsion GenBank : FJ705807 pour pRA1, FJ621587 pour pAM04528.

part pN418, sont autant capables les uns que les autres de mobiliser SGI1. De plus, pN418, le seul plasmide IncA/C testé qui était incapable de mobiliser SGI1, a un profil semblable à ceux des plasmides IncA/C contemporains. Les profils observés n'apportent donc aucun élément de réponse à propos de l'incapacité de pN418 à mobiliser SGI1.

Parmi tous les plasmides IncA/C utilisés, seules les séquences des plasmides pRA1 et pAM04528 sont disponibles (Figure 42). La comparaison de ces deux séquences a permis de mettre en évidence les régions d'ADN conservées entre une majorité des plasmides IncA/C (Fricke *et al.*, 2009). Ces parties communes représentent environ 100 kb, soit environ deux tiers de ces deux plasmides, pour lesquelles l'identité entre les deux séquences est comprise entre 88 et 94%. Bien que les plasmides pRA1 et pAM04528 aient la majorité de leur séquence en commun, leurs profils de restriction réalisés par l'enzyme *DraI* sont différents. Cette différence peut s'expliquer par l'absence d'identité parfaite entre les deux plasmides qui peuvent donc posséder plus ou moins de sites de restriction, ainsi que par des événements d'insertion/transposition qui sont venus interrompre la synténie globale de ces deux plasmides. En effet, des insertions d'éléments génétiques mobiles, souvent associés à des gènes de résistance aux antibiotiques peuvent être observées sur le plasmide pRA1 (IS26, IS4321, et les gènes *tet(A)* et *sul2* entre les positions 110 000 et 130 000 pb et des *ISEcp1* à différents endroits) et sur le plasmide pAM04528 (les IS26, l'*ISCR2* et les gènes *floR*, *tet(A)*, *strAB* et *sul2* entre les position 20 000 et 40 000 pb, ou encore l'*ISEcp1* et les gènes *bla_{CMY-2}* entre les positions 68 000 et 75 000 pb ; figure 42). Ces événements d'insertion/transposition sont facilement identifiables par la composition nucléotidique de ces régions qui diffèrent de celle des parties communes aux plasmides IncA/C. Outre la présence de nombreuses ORF hypothétiques ou de gènes de fonctions inconnues, les parties communes sont principalement composées de gènes prédits pour être impliqués dans les fonctions essentielles à la pérennité des plasmides telles que la réplication, la maintenance ou le transfert conjugatif. Pourtant, les tests de mobilisation ont montré que le plasmide pAM04528 était incapable d'être transféré par conjugaison. En comparant les séquences, et plus particulièrement les fonctions impliquées dans le transfert conjugatif, trois différences peuvent être identifiées sur le plasmide pAM04528 par rapport au plasmide pRA1. La première concerne une duplication partielle/inversion du gène annoté comme étant *traC*, liée à l'insertion de l'*ISEcp1* et des gènes *bla_{CMY-2}*, au niveau de la position 70 000 pb de pAM04528. La protéine codée par le gène *traC*, très proche de la protéine du même nom du système de transfert du plasmide F, correspondrait à l'ATPase VirB4 du système du plasmide Ti (Tableau VIII), impliquée dans

la formation du pilus (Schandel *et al.*, 1992; Lawley, 2004). Cependant, la comparaison des séquences des plasmides pRA1 et pAM04528 a montré que le gène *traC* était présent en deux copies, dont une dans son intégralité, sur le plasmide pAM04528 et que les deux plasmides étaient identiques à 98% au niveau de la séquence protéique traduite à partir de leur gène *traC*. La séquence promotrice de *traC* sur pAM04528 semblait également intacte puisque la région en amont du gène présentait une identité d'environ 90% jusqu'au gène *bla_{CMY-2}*, dont 98% localement au niveau du promoteur putatif de *traC* identifié avec les programmes de prédiction de promoteur (BPROM et BDGP). La deuxième différence est l'absence sur pAM04528 de la région nucléotidique localisée entre les positions 20 000 et 30 000 pb du plasmide pRA1. Cette région contient plusieurs ORF de fonctions inconnues et un gène codant une ATPase potentiellement impliquée dans le mécanisme de conjugaison. Cette dernière est une ATPase de la famille AAA qui peut jouer de nombreux rôles dans la bactérie, aussi bien dans la régulation des cycles cellulaires que dans le transport intracellulaire (Neuwald *et al.*, 1999). La dernière différence concerne le gène *traN*. Les 1700 premières paires de bases de ce gène diffèrent entre les plasmides pRA1 et pAM04528, les deux séquences protéiques traduites à partir de ces 1700 pb étant identiques à 54%. L'identité entre les séquences protéiques traduites à partir du reste de ces gènes (environ 1000 pb) est par contre plus forte (85%). Dans le système de transfert du plasmide F, la protéine TraN jouerait un rôle dans la stabilisation de la jonction entre les deux cellules (Lawley, 2004). Cependant, la recherche de motifs protéiques réalisée à l'aide du programme Pfam sur le début de la séquence traduite à partir du gène *traN* de pAM04528 donne le même résultat que celle pour le début de la séquence traduite à partir du gène *traN* de pRA1. Malgré l'absence d'homologie entre les extrémités 5' des gènes *traC* de ces deux plasmides, les protéines codées par ces gènes semblent donc jouer le même rôle.

C.2. Identification de l'origine de transfert requise pour la mobilisation de SGI1

a) Localisation préliminaire de l'origine de transfert

La technique utilisée pour localiser l'origine de transfert de SGI1 fait appel aux propriétés de ces régions. Puisqu'elles possèdent des sites de fixation pour les protéines du relaxosome qui permettent d'initier le transfert conjugal, elles sont capables, une fois clonées, de rendre mobilisable un plasmide non mobile dès l'instant où tous les gènes codant les protéines

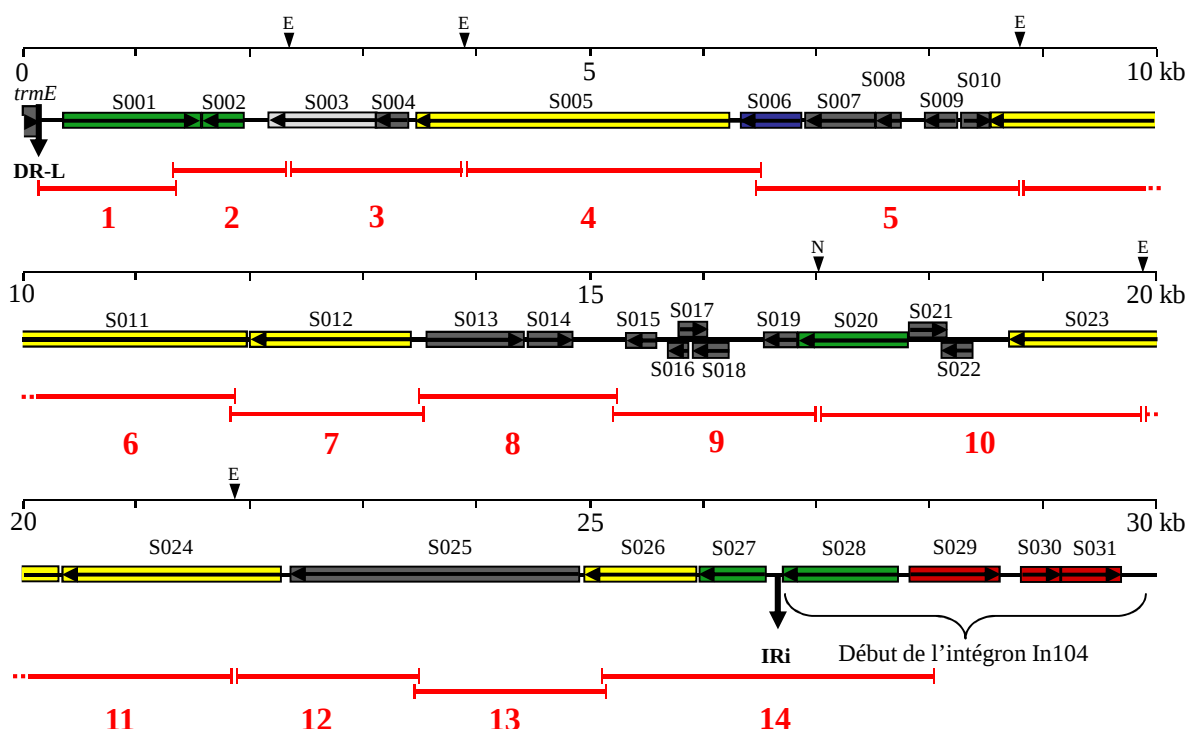


Figure 43 : Localisation des fragments de SGI1 clonés dans le plasmide pACYC184. Les triangles noirs représentent les sites de restriction des enzymes *EcoRI* (E) et *NcoI* (N) présents sur SGI1.

Fréquences de transfert

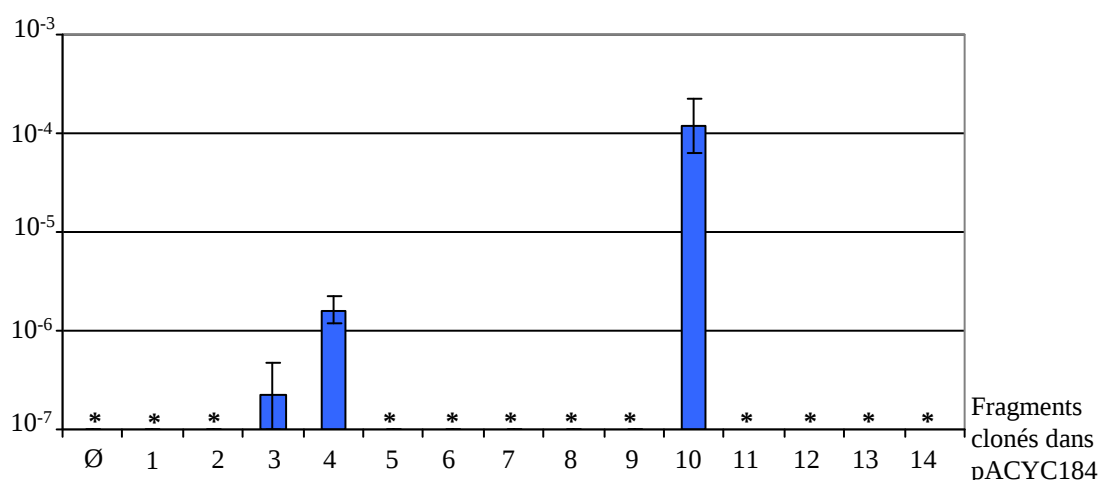


Figure 44 : Délimitation de la région de SGI1 susceptible de contenir son origine de transfert. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne des fréquences de transfert obtenus lors de trois tests de mobilisations indépendants, et leurs écarts-type. Les fréquences de transfert ont été calculées en divisant le nombre de transconjugants par le nombre de bactéries donneuses. Les numéros correspondent aux fragments représentés sur la figure 42 qui ont été clonés dans pACYC184. Le symbole Ø correspond au plasmide pACYC184 sans insert. Les astérisques indiquent que les fréquences de transfert sont en dessous de la limite de détection (10⁻⁷).

nécessaires au transfert conjugatif sont apportées en *trans*. L'intégron In104 de SGI1 a été exclu de cette analyse préliminaire. En effet, il est peu probable que la séquence *oriT* de l'îlot génomique soit située dans son intégron puisque, parmi tous les variants identifiés, seule la partie intégron (à quelques exceptions près) est concernée par des modifications. De plus, variant SGI1-C, qui possède un des plus petits intégrons dérivés de In104, est toujours mobilisable.

Les 27 kb restants de l'îlot génomique ont été divisés en 14 fragments d'environ 1000 à 3000 pb. Ces fragments ont été délimités en fonction des sites de restriction *NcoI* et *EcoRI* présents sur SGI1, et autant que possible, de manière à ne pas interrompre les séquences répétées inversées identifiées sur SGI1 grâce au programme « palindrome » (Rice *et al.*, 2000) (Figure 43). Ces fragments ont ensuite été clonés dans le plasmide non mobile pACYC184. Les tests de mobilisation de ces plasmides ont été réalisés à partir d'une souche de *S. Agona* (47SA97) contenant le plasmide helper R55, nécessaire (au minimum) pour la formation du transférosome, et le variant SGI1-C, dont les produits de certains de ses gènes pourraient éventuellement être requis pour la formation du relaxosome. Les résultats présentés dans la figure 44 correspondent à la moyenne de trois expérimentations indépendantes. La plupart des fragments de SGI1 clonés dans pACYC184 n'ont pas permis de rendre ce dernier mobilisable, leurs fréquences de transfert étant, comme celle du plasmide pACYC184 original, inférieures à la limite de détection pour cette expérimentation (figure 44). En plus des contrôles mis en place pour s'assurer de la sélectivité des antibiotiques utilisés, les contrôles de conjugaison réalisés pour chacun des tests de mobilisation étaient positifs : le transfert du plasmide R55 et celui de l'îlot SGI1-C vers la souche réceptrice ont pu être sélectionnés, montrant ainsi qu'un transfert conjugatif entre les cellules était possible, et donc, que l'absence de transfert des plasmides pACYC184 modifiés était due à leur incapacité à être mobilisé. Parmi les fragments de SGI1 clonés dans pACYC184, le meilleur candidat susceptible de contenir l'origine de transfert de SGI1 semblait être la région 10. La présence de cette région dans pACYC184 permettait un transfert du plasmide à une fréquence de $1,2 \cdot 10^{-4}$, soit au moins 1200 fois plus que le plasmide vide (Figure 44). Toutefois, deux autres régions ont aussi permis de mobiliser le plasmide pACYC184 mais à des fréquences plus faibles que celle offerte par la région 10. La région 4 est capable de mobiliser le plasmide à une fréquence de $2,6 \cdot 10^{-6}$. La région 3 semble avoir également un léger effet mobilisateur bien que la fréquence de transfert du plasmide contenant cette région soit quasiment à la limite de détection ($3,1 \cdot 10^{-7}$). Les transconjugants du plasmide pACYC184 ainsi obtenus, que ce soit à l'aide des

régions 3, 4 ou 10, ont été analysés par PCR pour s'assurer de la présence du plasmide pACYC184 et de l'insert correspondant. L'absence, dans ces transconjugants, du variant SGI1-C intégré au chromosome de la bactérie réceptrice, ainsi que celle du plasmide helper R55 ont également été suggérées par absence d'amplification par PCR. L'analyse des profils de résistance des transconjugants par antibiogramme a permis de confirmer l'absence de R55 et de SGI1-C. Les plasmides pACYC184 modifiés, pACYC3 et pACYC10, ont donc bien été mobilisés en *trans*.

Parmi les trois régions identifiées précédemment, la région 10 semblait être la meilleure candidate susceptible de contenir l'origine de transfert de SGI1. En effet, cette région est celle qui permettait de mobiliser le plus efficacement le plasmide pACYC184 lorsqu'elle était ajoutée en *cis*. Contrairement aux fréquences obtenues lorsque les régions 3 ou 4 étaient clonées dans pACYC184, la fréquence de transfert du plasmide contenant la région 10 était du même ordre de grandeur (environ 10^{-4}) que celle obtenue lors des tests de mobilisation de l'îlot génomique lui-même. La région 10 recouvre une partie des ORF S020 et S023 ainsi que la séquence nucléotidique localisée entre ces deux ORF. Or, dans la plupart des systèmes de conjugaison, les origines de transfert sont localisées à proximité de gènes dont les produits jouent un rôle dans la formation du relaxosome (de la Cruz *et al.*, 2010). La région 10 répond à ces critères puisque les ORF de SGI1 les plus susceptibles de participer à la formation du relaxosome sont les ORF S023 et S024. La région 10 a donc été choisie pour continuer la recherche de l'origine de transfert de SGI1.

b) Identification de la séquence minimale contenant l'origine de transfert de SGI1

La taille de la région 10 identifiée dans la partie précédente a par la suite été réduite jusqu'à délimiter le fragment nucléotidique minimal capable de mobiliser le plasmide pACYC184 à la même fréquence que celle procurée par la région 10. Le fragment ainsi obtenu devrait correspondre à la séquence minimale susceptible de contenir l'origine de transfert de SGI1.

Pour cela, les troncations réalisées à partir de la région 10 ont été clonées dans le plasmide pACYC184 et les constructions ainsi obtenues ont été testées comme précédemment trois fois indépendamment (Figure 45). Les premières troncations, 10B et 10A, étaient destinées à exclure l'ORF S023 de la recherche et à déterminer si une séquence répétée inversée (en

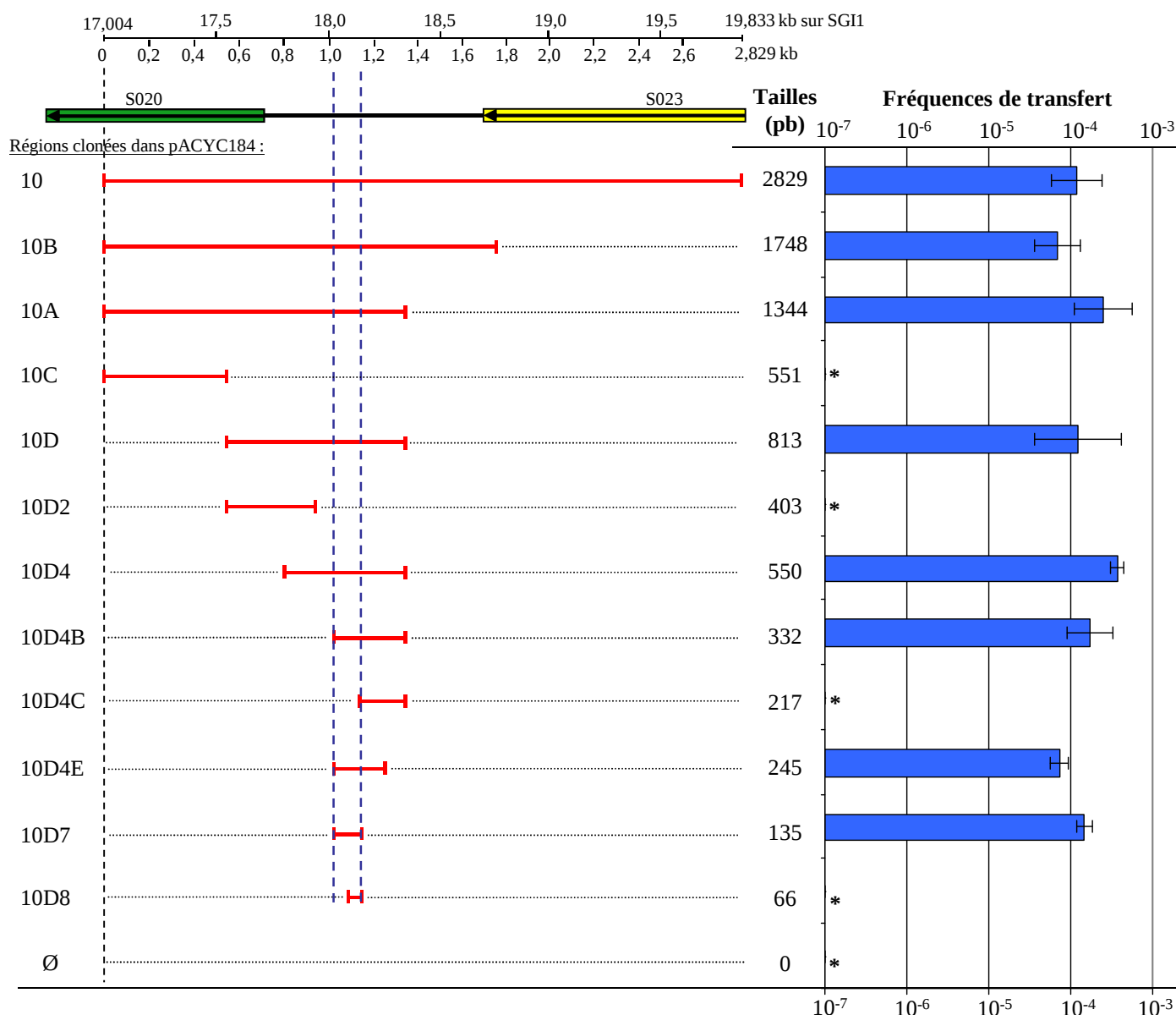


Figure 45 : Détermination de la séquence nucléotidique minimale susceptible de contenir l'origine de transfert de SGI1. Les segments représentés en rouge correspondent aux régions clonées dans le plasmide pACYC184, le nom donné à ces régions est indiqué à gauche. Les valeurs représentées dans l'histogramme correspondent aux moyennes des fréquences de transfert obtenus lors de trois tests de mobilisation indépendants, et leurs écarts-type. Les fréquences de transfert ont été calculées en divisant le nombre de transconjugants par le nombre de bactéries donneuses. Le symbole Ø correspond au plasmide pACYC184 sans insert. Les astérisques indiquent que les fréquences de transfert sont en dessous de la limite de détection (10^{-7}).

position 18 570 de SGI1) était impliquée dans le transfert de SGI1. Cette séquence répétée inversée était particulièrement intéressante car elle était située à proximité d'une région riche en nucléotides AT, caractéristique souvent retrouvée dans les origines de transfert (Lanka & Wilkins, 1995). Les plasmides pACYC184 contenant ces deux régions, 10B et 10A, ont été mobilisés à des fréquences similaires, respectivement $7,7.10^{-5}$ et $3,4.10^{-4}$ démontrant ainsi que la région suspectée préalablement ne contenait pas la séquence *oriT* recherchée (Figure 45). La recherche a été poursuivie par le clonage des fragments 10C et 10D dans pACYC184. Les résultats obtenus avec ces deux fragments ont permis de limiter la taille de la séquence suspectée à 813 pb. L'absence de transfert de pACYC184 contenant la région 10C a été validée grâce aux témoins de conjugaison qui ont permis de montrer que les transferts du plasmide helper R55 et du variant SGI1-C étaient possibles à partir de la même souche donneuse. Ces vérifications étaient également positives pour les tests de mobilisation de pACYC184 contenant la région 10D2 qui s'est avérée incapable de mobiliser le plasmide malgré les capacités conjuguatives intactes de la souche donneuse. Ce résultat, associé au résultat positif obtenu avec la région 10D4, a permis d'exclure l'ORF S020 de la recherche et de limiter la taille du fragment suspecté à 550 pb. Cette séquence a ensuite été diminuée à partir de son extrémité 5' jusqu'à celle du fragment 10D4C qui était incapable de permettre le transfert de pACYC184, malgré les témoins de conjugaison positifs. Le même procédé a été appliqué à l'extrémité 3' pour obtenir le fragment 10D7, d'une taille de 135 pb, qui permettait de transférer le plasmide pACYC184 à une fréquence similaire ($1,5.10^{-4}$) à celle obtenue lorsque la région 10 était clonée dans le plasmide ($1,2.10^{-4}$) (Figure 45). Le fragment 10D8 étant incapable de permettre le transfert de pACYC184 malgré les contrôles de conjugaison positifs, la taille du fragment suspectée n'a pas pu être réduite davantage. La séquence 10D7 était donc la plus petite région obtenue susceptible de contenir l'origine de transfert de SGI1. La présence, dans tous les transconjugants testés, du plasmide pACYC184 et de l'insert cloné, ainsi que l'absence du plasmide R55 et du variant SGI1-C, ont été suggérées par les résultats des antibiogrammes et des amplifications par PCR. Le transfert des plasmides pACYC184 modifiés s'effectuait donc bien en *trans*. Le séquençage du site de clonage du plasmide pACYC184 contenant le fragment 10D7 de SGI1 a permis de vérifier la composition nucléotidique de ce fragment. L'identité parfaite entre la séquence clonée dans pACYC184, et la séquence correspondante dans GenBank (AF261825) a permis de confirmer que ce fragment de 135 pb était bien la séquence *oriT* suspectée de SGI1.

Facteur de mobilisation par rapport à l'îlot sauvage (exprimé en log)

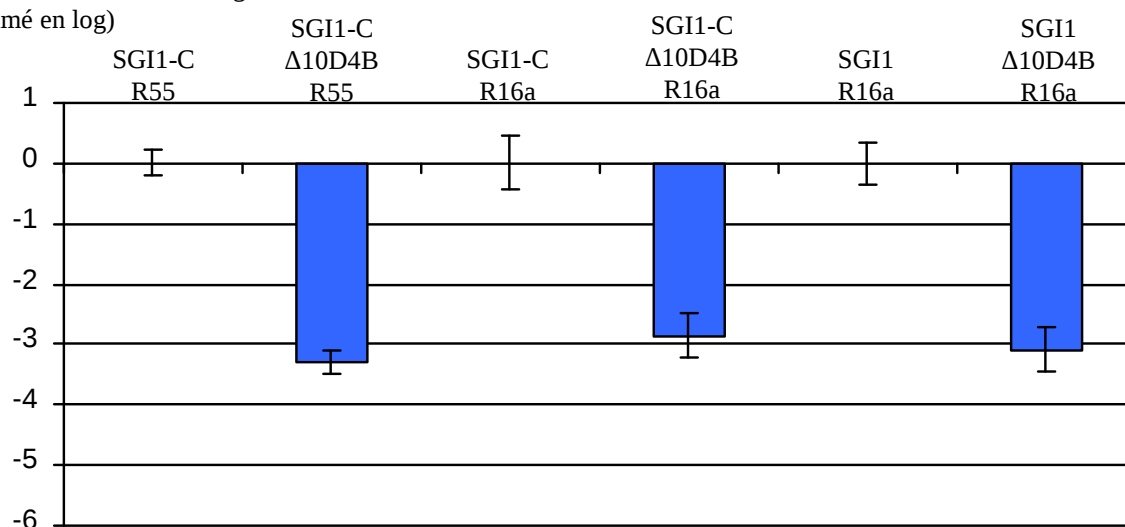
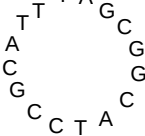


Figure 46 : Effet de la délétion de la séquence *oriT* potentielle de SGI1 sur le transfert de l'îlot génomique. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne des facteurs de diminution de la fréquence de transfert des îlots SGI1 ou SGI1-C délétés de l'*oriT* suspectée ($\Delta 10D4B$) par rapport à celle de l'îlot « sauvage », ainsi que leurs écarts-type, obtenus lors de trois tests de mobilisation indépendants. Le zéro correspond au transfert de l'îlot génomique « sauvage » (environ 10^{-3}). Le facteur de diminution -6 correspond à la limite de détection (10^{-9}). Les fréquences de transfert ont été calculées en divisant le nombre de transconjugants par le nombre de bactéries donneuses.

c) Mise en évidence de l'origine de transfert de SGI1 par délétion

Afin de démontrer que la région de 135 pb (10D7) identifiée dans la partie précédente contenait bien l'origine de transfert de SGI1, un fragment d'ADN comprenant cette région de 135 pb a été délétée de l'îlot génomique à l'aide de la technique développée par Datsenko et Wanner. Le fragment ainsi délété correspondait à la région de 550 pb appelée 10D4B dans la partie précédente. Cette région permettait de déléter l'origine de transfert suspectée de SGI1 sans toucher aux ORF S020 et S023, ni à la région régulatrice putative de l'ORF S020. En effet, les programmes de prédiction de promoteur (BPROM et BDGP) ont révélé que la région promotrice putative de l'ORF S020 débutait à la position 17 913 pb de SGI1, soit 53 pb en amont de la région délétée. Cette délétion ne risquait donc probablement pas d'altérer le produit potentiel de cette ORF. Cette manipulation oblige toutefois à déléter les ORF S021 et S022. Cependant, des doutes existent quant à l'existence réelle de ces deux ORF. En effet, selon les programmes d'identification d'ORF utilisés, ces deux ORF ne sont pas systématiquement identifiées. De plus, aucune homologie avec une fonction connue n'a pu être identifiée pour ces deux ORF.

La délétion de cette région 10D4B de 550 pb a tout d'abord été réalisée chez la souche *S. Agona* 47SA97, porteuse du variant SGI1-C. Les plasmides helper R16a ou R55 ont été introduits dans cette souche pour essayer de mobiliser l'îlot modifié SGI1- Δ 10D4B, dépourvu de la séquence *oriT* suspectée, au cours de trois tests indépendants. L'îlot SGI1-C « sauvage » a été mobilisé en parallèle par ces mêmes plasmides afin de pouvoir comparer les fréquences de transfert. Les contrôles de conjugaison réalisés en sélectionnant spécifiquement le transfert des plasmides helper à partir des souches contenant soit l'îlot génomique entier, soit l'îlot génomique modifié Δ 10D4B ont permis de s'assurer que les capacités conjuguatives des éléments présents dans ces souches étaient intactes et similaires. Les résultats présentés dans la figure 46 correspondent au facteur de diminution de la fréquence de transfert calculé en divisant la fréquence de transfert d'un îlot modifié par celle obtenue en parallèle avec l'îlot « sauvage » correspondant. Le facteur de diminution dû à l'absence de la région 10D4 supposée contenir l'origine de transfert de l'îlot génomique était de l'ordre de 1000 à 1500 selon le plasmide helper utilisé (Figure 46). La délétion de cette région réduit considérablement le transfert de l'îlot, même si toutefois, elle ne l'abolit pas complètement puisqu'un transfert résiduel non négligeable a pu être observé. Les PCR réalisées sur les transconjugants obtenus ont permis de vérifier la présence de l'îlot génomique inséré dans son site d'intégration préférentiel (l'extrémité 3' du gène *trmE*). Elles ont également permis de



Les structures secondaires putatives représentées ici ont été déterminées à l'aide du logiciel mfold.

s'assurer que la région 10D4B était bien absente. Le plasmide helper était la plupart du temps absent des transconjugants analysés, confirmant ainsi la mobilisation en *trans*. La présence dans quelques cas du plasmide helper était probablement due à un évènement de sur-conjugaison compte tenu du grand laps de temps pendant lequel les bactéries étaient en contact.

Grâce à l'addition de la cassette de résistance à la gentamicine sur les deux plasmides, pKD46 et pCP20, utilisés dans la technique de délétion de Datsenko et Wanner, la région 10D4B a pu également être délétée de l'îlot génomique SGI1 original (porteur du phénotype ACSSuT). Cette délétion a été réalisée dans la souche de *S. Agona* 959SA97 et l'îlot génomique modifié SGI1Δ10D4B a été mobilisé par le plasmide R16a. En parallèle, l'îlot SGI1 « sauvage » a aussi été mobilisé par R16a pour pouvoir comparer les fréquences de transfert. Les résultats de trois tests indépendants ont montré que l'îlot modifié SGI1Δ10D4B était transféré vers les bactéries réceptrices à une fréquence moyenne de $2,1 \cdot 10^{-6}$, soit à une fréquence similaire à celle du variant modifié SGI1-CΔ10D4B. La fréquence de transfert moyenne de l'îlot génomique « sauvage » étant de $2,5 \cdot 10^{-3}$, le facteur de diminution calculé était du même ordre de grandeur que celui obtenu avec l'îlot SGI1-C délété de sa séquence *oriT* potentielle (environ 1000 fois) (Figure 46). Les transconjugants obtenus présentaient la délétion de la région 10D4B ainsi que l'îlot inséré dans le gène *trmE*. Excepté les mêmes évènements probables de sur-conjugaison que précédemment, la plupart des transconjugants ne possédaient pas le plasmide R16a.

La région 10D4B semble contenir un élément important pour le transfert conjugatif de SGI1 puisque son absence réduit considérablement le transfert de l'îlot. Comme les parties précédentes l'ont montré, cette région contient un élément qui permet de mobiliser un plasmide non mobile lorsqu'elle est ajoutée en *cis*. Cette région contient donc l'origine de transfert de SGI1. Bien que la délétion réalisée ici concerne une région de 550 pb, le plus petit fragment, d'une taille de 135 pb, qui a permis d'assurer la mobilité du plasmide pACYC184 est inclus dans la région délétée. L'origine de transfert de SGI1 est donc localisée dans ce fragment de 135 pb dont la séquence est présentée dans la figure 47. Cependant, un transfert résiduel a été observé lorsque la région 10D4B était délétée. Ce transfert est bien réel puisqu'il a été retrouvé à la fois pour l'îlot SGI1 et pour son variant SGI1-C avec différents plasmides helper et ce, lors de plusieurs tests indépendants.

Le programme « palindrome » a permis de mettre en évidence trois séquences répétées inversées au sein du fragment de 135 pb (figure 47). Ces séquences répétées inversées peuvent potentiellement former des structures secondaires : deux parfaites de 7 et 12 pb, et une autre de 12 pb qui présente un mésappariement. Le programme mfold a permis de retrouver ces structures secondaires qui pourraient donc être des sites de fixations pour les protéines du relaxosome. En amont de la première de ces séquences, une séquence de 7 pb composée exclusivement de nucléotides AT pourrait constituer la région nucléotidique où les deux brins se désolidarisent lors de l'initiation du transfert conjugatif.

C.3 Identification des régions de SGI1 impliquées dans son transfert

a) Mise en évidence de l'implication d'ORF de SGI1 dans son transfert

Après avoir localisé l'origine de transfert de SGI1, la suite de ce travail était d'identifier quels étaient les autres éléments, en plus de la séquence *oriT*, présents sur SGI1 indispensables à son transfert. Plus précisément, cette recherche s'est focalisée sur les ORF de SGI1 dont les produits pourraient intervenir dans le transfert conjugatif. La plupart du temps, les éléments mobilisables codent une partie des protéines qui entrent dans la composition de leur relaxosome, notamment la relaxase. Cependant, les îlots génomiques identifiés chez *Vibrio* (MGIVchUSA1, MGIVvuTaï1, MGIVflInd1), qui profitent de toute la machinerie de transfert de l'ICE SXT (y compris la relaxase), possèdent uniquement une origine de transfert proche de celle de SXT (Daccord *et al.*, 2010). Or, il a été montré précédemment que l'îlot génomique SGI1 était mobilisé spécifiquement par les plasmides du groupe IncA/C. Par analogie avec les îlots génomiques de *Vibrio*, cette relation entre SGI1 et les plasmides IncA/C est peut-être due à l'exploitation pour le transfert de l'îlot génomique des protéines codées par les plasmides IncA/C, y compris leur relaxase, auquel cas, SGI1 mimerait l'origine de transfert de ces plasmides.

Pour vérifier cette hypothèse, la souche DH1 d'*E. coli* a été utilisée pour recevoir différentes combinaisons entre les éléments génétiques suivants : les plasmides helper R55 ou R16a, et/ou le variant SGI1-C, et le plasmide pACYC184 contenant ou non la séquence *oriT* de SGI1. Les tests de mobilisation des plasmides pACYC184 (ou dérivés) présents dans ces souches ont été réalisés, trois fois indépendamment, vers la souche d'*E. coli* BM14 résistante à l'azide de sodium (Figure 48).

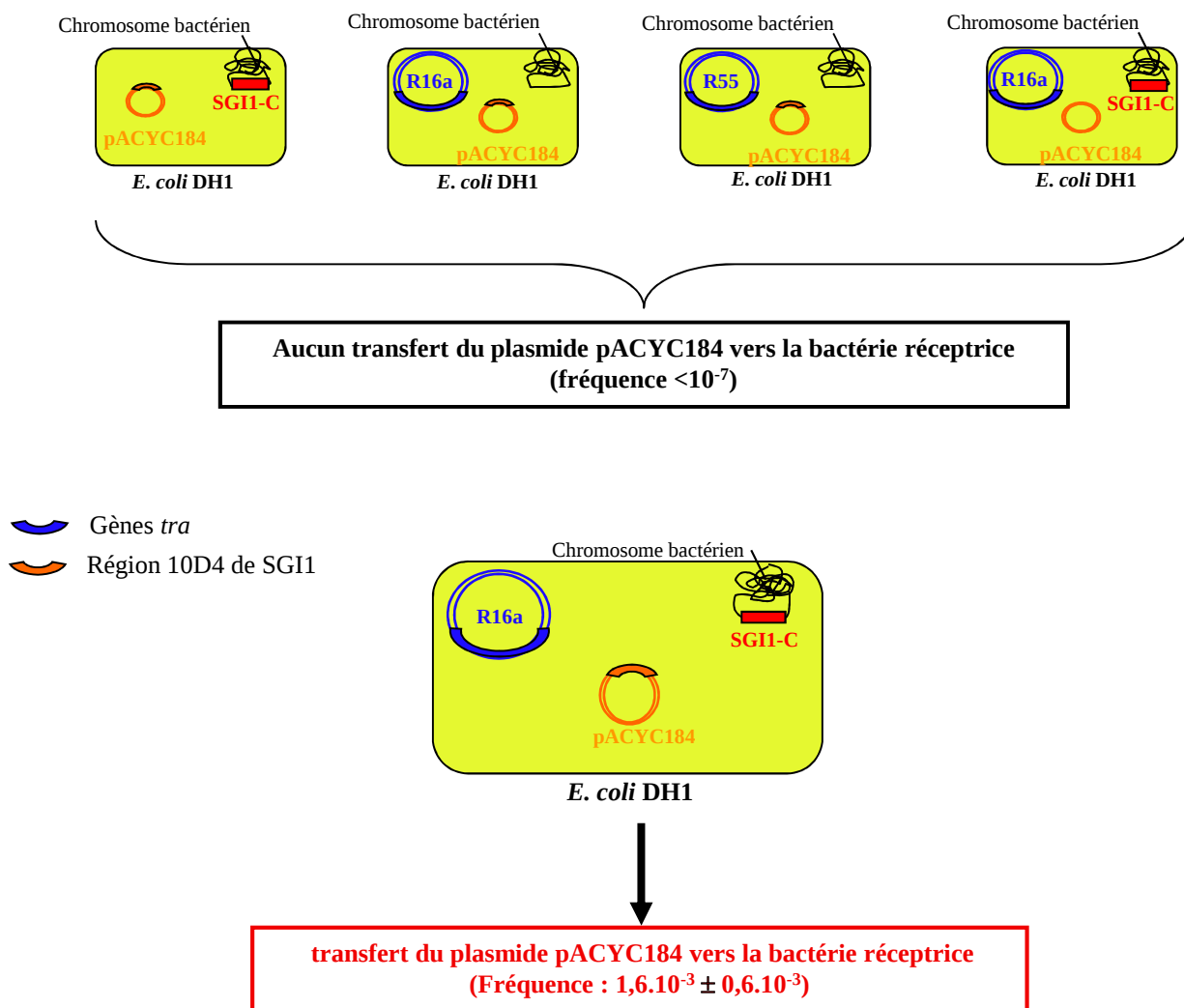


Figure 48 : Mise en évidence du rôle de SGI1 dans son propre transfert. Les différentes associations entre les plasmides helper (R55 ou R16a), le variant SGI1-C et le plasmide pACYC184, porteur ou non de la région 10D4 contenant l'*oriT* de SGI1, sont représentés. Les fréquences reportées correspondent à la moyenne des fréquences de transfert obtenues lors de trois tests de mobilisation indépendants, et leurs écarts-type. Les fréquences de transfert ont été calculées en divisant le nombre de transconjugants par le nombre de bactéries donneuses. La limite de détection est de 10^{-7} .

Dans un premier temps, le transfert du plasmide pACYC184 contenant la séquence *oriT* de SGI1 (appelé par la suite pACYC10D4) a été testé en présence de l'îlot SGI1-C et du plasmide helper R16a. Cette configuration était identique à celle des tests de mobilisation du plasmide pACYC184 réalisés dans les parties C.2.a et C.2.b. Toutefois, il existe une différence notable avec les expériences précédentes puisque, dans cette partie, la souche donneuse était une souche d'*E. coli* (DH1) déficiente pour la recombinaison homologue. Les tests de mobilisation du plasmide pACYC10D4 réalisés à partir de cette souche permettait de vérifier que ces expériences étaient indépendantes de phénomènes de recombinaison. Dans cette configuration, le transfert du plasmide pACYC10D4 a pu être observé à une fréquence moyenne de $1,6 \cdot 10^{-3}$ (Figure 48). Cette fréquence étant semblable à celle obtenue dans la partie C.2.b lorsque le fragment 10D4 était cloné dans pACYC184, ce résultat prouve que la recombinaison homologue n'était pas impliquée dans le transfert des plasmides pACYC184 modifiés. L'analyse des transconjugants obtenus a permis de vérifier la présence du plasmide pACYC184 avec l'insert 10D4. A part quelques événements de sur-conjugaison, la plupart du temps, SGI1-C et R16a étaient absents de ces transconjugants. La même expérience a été réalisée en utilisant à la place du plasmide pACYC10D4, le plasmide pACYC184 original. Dans ces conditions, ce dernier était incapable d'être transféré vers la bactérie réceptrice (fréquence de transfert $<10^{-7}$), alors que le transfert de l'îlot SGI1-C et celui du plasmide R16a avaient bien pu être montré. Cette observation permet de confirmer que le transfert du plasmide était bien dépendant de la présence du fragment 10D4 de SGI1 dans ce système de conjugaison.

Les configurations testées par la suite étaient soit l'absence du plasmide helper, soit celle de l'îlot SGI1-C. Comme cela était attendu, en l'absence d'un plasmide helper, le plasmide pACYC10D4 était incapable d'être transféré vers la bactérie réceptrice (fréquence de transfert $<10^{-7}$). La seule présence de l'îlot SGI1-C n'est pas suffisante puisque dans cette configuration, aucun élément génétique présent dans la cellule donneuse ne code les protéines requises pour la formation des pili. Plus intéressant, lorsque seul le plasmide helper R16a était présent avec le plasmide pACYC10D4 dans la cellule donneuse, ce dernier n'était pas non plus capable d'être mobilisé vers la cellule réceptrice. Le même résultat a été obtenu lorsque le plasmide R55 était utilisé comme plasmide helper (dans les deux cas, fréquence de transfert $<10^{-7}$). Pourtant, en parallèle de ces expériences, le transfert des plasmides R55 ou R16a vers la cellule réceptrice avait bien été observé, l'absence de transfert de pACYC10D4 n'était donc pas due à une déficience de transfert conjugatif.

Ces résultats ont permis de mettre clairement en évidence que la seule présence d'un plasmide helper dans la cellule donneuse n'était pas une condition suffisante pour mobiliser le plasmide pACYC184 qui contient l'origine de transfert de SGI1 et que la présence de l'îlot génomique était indispensable à cette mobilisation. De plus, la souche d'*E. coli* DH1 étant déficiente pour la recombinaison homologue (RecA-), ces résultats montrent que le transfert du plasmide pACYC10D4 est bien dû à une mobilisation en *trans* dépendante à la fois de R16a et de SGI1-C. Le plasmide pACYC184 étant mobilisable uniquement lorsque la séquence 10D4 de SGI1 était présente sur celui-ci, les résultats obtenus avec ce plasmide peuvent être transposés à l'îlot génomique SGI1 lui-même. Ainsi, le système de transfert de l'îlot génomique SGI1 requiert, en plus de son origine de transfert, un ou des éléments apportés par l'îlot génomique lui-même, ainsi que les protéines codées par le plasmide helper, ces dernières étant au minimum nécessaires pour la mise en place des pili. Dans le système de mobilisation du plasmide pACYC10D4, SGI1 est simplement présent dans la cellule, le ou les éléments de SGI1 nécessaires au transfert de pACYC10D4 agissent donc probablement en *trans*. Il est fort probable que cet ou ces éléments soient des protéines codées par l'îlot génomique.

b) Délétions ciblées d'ORF de SGI1

Puisque SGI1 semble coder des protéines impliquées dans son propre transfert, les ORF pour lesquelles les analyses bio-informatiques ont révélé leur implication potentielle dans le transfert conjugatif ont été délétées de SGI1 (Boyd *et al.*, 2001). Dans un premier temps, les trois ORF les plus proches de l'origine de transfert ont été ciblées : les ORF S023 et S024 dont les fonctions putatives, respectivement hélicase et endonucléase, sont particulièrement impliquées au niveau du relaxosome (Lanka & Wilkins, 1995), et l'ORF S020 qui code une intégrase putative. La fonction de cette dernière n'est pas une fonction habituellement retrouvée dans les systèmes de conjugaison, cependant, l'intégrase du transposon Tn916 a clairement été identifiée comme étant une protéine auxiliaire de ce système de conjugaison (Hinerfeld & Churchward, 2001). Les ORF S023 et S024 semblent former un opéron. Toutefois, la technique de délétion utilisée permettait de ne pas décaler le cadre de lecture lors de la traduction en protéine, la délétion de l'ORF S024 n'empêchait donc pas l'expression potentielle de l'ORF S023. L'origine de transfert de SGI1 étant localisée entre S020 et S023, les délétions de ces ORF ont été réalisées en prenant soin de ne pas toucher à cette séquence essentielle au transfert de l'îlot.

Facteur de mobilisation par
rapport à l'îlot sauvage
(exprimé en log)

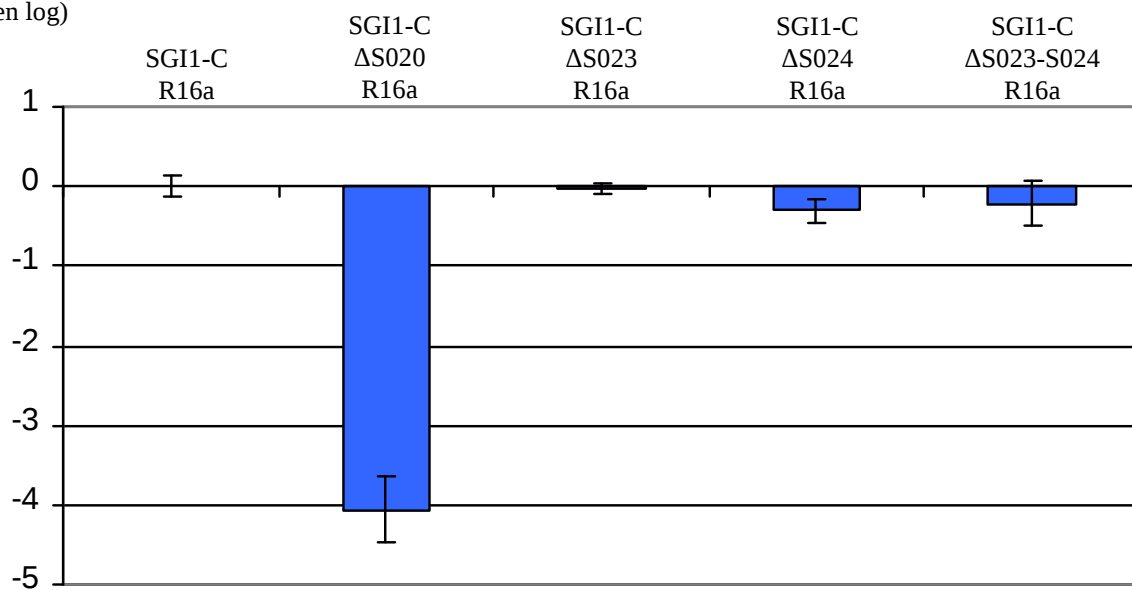


Figure 49 : Effets des délétions d'ORF potentiellement impliquées dans le transfert de SGI1. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes des facteurs de diminution de la fréquence de transfert de l'îlot SGI1-C modifié (Δ S020, Δ S023, Δ S024, Δ S023-S024) par rapport à celle de l'îlot sauvage, ainsi que leurs écarts-type, obtenus lors de deux tests de mobilisation indépendants. Le zéro correspond au transfert de l'îlot génomique sauvage (environ 10^{-4}). Le facteur de diminution -5 correspond à la limite de détection (10^{-9}). Les fréquences de transfert ont été calculées en divisant le nombre de transconjugants par le nombre de bactéries donneuses.

Ces délétions ont été réalisées chez *S. Agona* 47SA97, porteuse du variant SGI1-C, et ces îlots modifiés ont été mobilisés, lors de deux tests indépendants, par le plasmide R16a. Lors des tests de mobilisation, l'effet des différentes délétions a été mis en évidence en comparant les fréquences de transfert de ces îlots modifiés à celles obtenues en parallèle pour l'îlot génomique « sauvage ». Les résultats présentés dans la figure 49 correspondent aux facteurs de diminution moyens calculés en divisant la fréquence de transfert de l'îlot modifié par celle de l'îlot « sauvage » correspondant. Pour chaque test de mobilisation, le transfert du plasmide helper a été observé spécifiquement, permettant ainsi de vérifier que les plasmides helper présents dans les souches donneuses, modifiées et « sauvages », possédaient des capacités conjugatives similaires. Cependant, l'absence des ORF S023 et S024 ne semble pas avoir d'influence sur le transfert de l'îlot génomique puisque les fréquences de transfert étaient du même ordre de grandeur que celle obtenue en parallèle avec l'îlot génomique sauvage (environ 10^{-4}). La délétion des deux ORF, S023 et S024, simultanément donne le même résultat. L'analyse des transconjugants obtenus a permis de s'assurer que l'îlot génomique délété de ces ORF était bien présent dans son site d'intégration. Contrairement à ces deux ORF, la délétion de S020 semble avoir un effet sur le transfert de SGI1 puisque l'îlot génomique « sauvage » transférait environ 10 000 fois mieux que l'îlot dépourvu de l'ORF S020. L'absence de l'ORF S020 permet donc de réduire considérablement le transfert de SGI1, mais pas de l'abolir complètement comme c'était déjà le cas lorsque l'origine de transfert était délétée.

Malgré leur fonction potentielle souvent requise au niveau d'un relaxosome, les ORF S023 et S024 semblent n'avoir aucun effet sur le transfert de l'îlot puisque l'absence de l'une ou de l'autre, ou des deux à la fois, n'a pas permis de diminuer la fréquence de transfert de l'îlot. Par contre, l'intégrase potentielle codée par l'ORF S020 semble jouer un rôle important dans le transfert de SGI1, bien que, en son absence, l'îlot génomique puisse être toujours mobilisé mais à une fréquence beaucoup plus faible.

c) Grandes délétions de régions de SGI1

Les délétions ciblées d'ORF de SGI1 ont permis de mettre en évidence que seule l'ORF S020 semble avoir un effet sur le transfert de l'îlot. Cependant, hormis S020 et la séquence *oriT* identifiée, il existe peut-être d'autres éléments sur SGI1 qui jouent un rôle dans le transfert de l'îlot génomique. De grandes délétions, épargnant l'ORF S020 et l'origine de transfert, ont donc été réalisées afin d'identifier ces autres éléments potentiels (Figure 50).

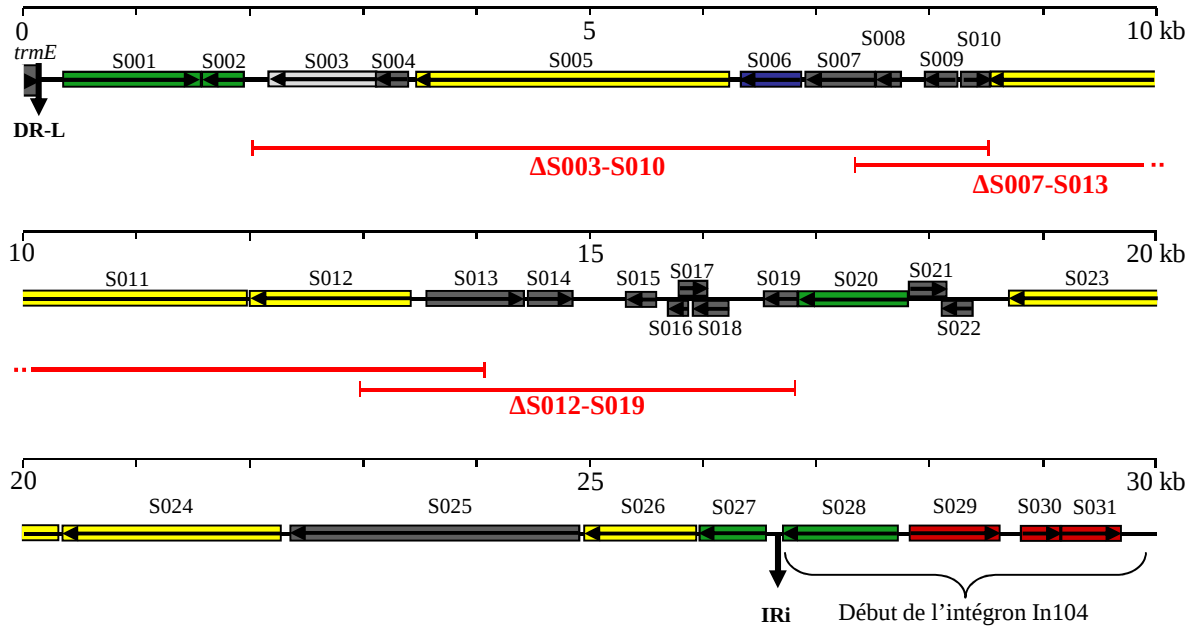


Figure 50 : Localisation des larges délétions effectuées sur SGI1.

Facteur de mobilisation par rapport à l'îlot sauvage (exprimé en log)

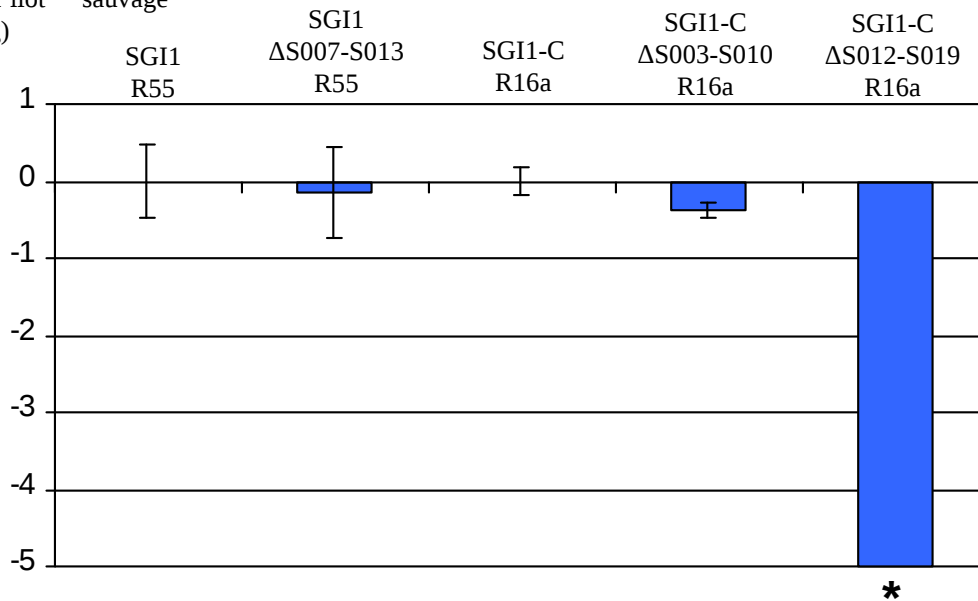


Figure 51 : Effet des larges délétions sur le transfert de SGI1. Les valeurs représentées correspondent aux moyennes des facteurs de diminution de la fréquence de transfert des îlots, SGI1 ou SGI1-C, modifiés ($\Delta S003-S010$, $\Delta S007-S013$, $\Delta S012-S019$) par rapport à celle des îlots, SGI1 ou SGI1-C, sauvages, ainsi que leurs écarts-type, obtenus lors de deux tests de mobilisation indépendants. Le zéro correspond au transfert de l'îlot génomique sauvage (environ 10^{-4}). Le facteur de diminution -5 correspond à la limite de détection (10^{-9}). L'astérisque indique que la fréquence de transfert était inférieure à la limite de détection. Les fréquences de transfert ont été calculées en divisant le nombre de transconjugants par le nombre de bactéries donneuses.

Comme lors de la recherche de l'origine de transfert, l'intégron In104 a été exclu de cette analyse puisqu'il n'est vraisemblablement pas impliqué dans le transfert de l'îlot. Les deux premières ORF, codant l'intégrase et l'excisionase, ont également été préservées puisque ces deux protéines sont importantes pour une intégration et une excision efficace de l'îlot. De plus, mis à part leurs rôles dans la transposition, elles ne semblent pas avoir de rôle dans la conjugaison (Doublet *et al.*, 2005). Ces délétions ont été réalisées dans les souches de *S. Agona*, 959SA97 ou 47SA97, qui possèdent respectivement SGI1 et le variant SGI1-C, ces deux îlots étant mobilisés de manière similaire par les plasmides helper R55 ou R16a. Comme dans la partie précédente, l'effet des délétions a été estimé en comparant les fréquences de transfert des ces îlots modifiés lors de deux expérimentations indépendantes à celles obtenues en parallèle avec les îlots génomiques « sauvages » correspondants. Les résultats sont présentés dans la figure 51 sous forme de moyennes des facteurs de diminution qui ont été calculés en divisant les fréquences de transfert des îlots modifiés par celles des îlots « sauvages ». Les contrôles de conjugaison réalisés lors de chaque test ont permis de s'assurer que les plasmides helper transféraient à des fréquences similaires entre les souches modifiées et « sauvages ».

Les deux premières délétions réalisées visaient essentiellement à vérifier l'implication dans le transfert de l'îlot des ORF S005, S011, et S012. Les produits de ces trois ORF possèdent des motifs protéiques qui seraient impliqués dans le transfert conjugatif, notamment dans la formation des pili (Boyd *et al.*, 2001). La première délétion, qui permettait de vérifier le rôle potentiel des ORF S003 à S010, a été réalisée dans le variant SGI1-C pour lequel les tests de mobilisation ont été effectués avec le plasmide R16a. Une très légère diminution de la fréquence de transfert de l'îlot a pu être observée lorsque cette région était absente. L'îlot « sauvage » transférait environ 2 fois plus que l'îlot délété des ORF S003 à S010. La délétion de la région S007-S013 a été réalisée sur l'îlot SGI1 original. Cet îlot modifié, mobilisé par le plasmide R55, transférait à une fréquence similaire à celle de l'îlot « sauvage » (environ 10^{-4}). Les transconjugants testés obtenus lors de ces deux tests possédaient bien les délétions réalisées sur l'îlot et ce dernier était bien inséré dans son site primaire d'intégration (le gène *trmE*).

La dernière délétion a été réalisée dans la souche de *S. Agona* 47SA97, elle concernait une région comprise entre les ORF S012 et S019 incluses. Les tests de mobilisation de l'îlot SGI1-C ont été réalisés à l'aide du plasmide R16a. Le transfert de ce dernier vers la souche réceptrice a été mis en évidence permettant ainsi de vérifier ses capacités conjugatives. A

l'inverse des deux premières délétions, la délétion de la région comprise entre les ORF S012 et S019, abolissait totalement le transfert de l'îlot génomique. La fréquence obtenue pour le variant modifié SGI1- Δ S012-S019 était en dessous de la limite de détection (10^{-9}). Le facteur de diminution de la fréquence de transfert était supérieur à 100 000 lorsque cette région était absente. Ce résultat est surprenant car cette région ne contient que des ORF pour lesquelles aucune fonction connue n'a pu être mise en évidence. L'ORF S013 ne semble pas être l'élément important de cette région puisque la délétion réalisée entre les ORF S007 et S013 ne diminuait pas le transfert de l'îlot.

Ces délétions ont permis de montrer que la région comprise entre les ORF S003 à S013 ne semble pas contenir d'éléments essentiels au transfert de l'îlot génomique. Les ORF de cette région, y compris celles qui codent les protéines putatives TraN, TraG et TraH (respectivement S005, S011 et S012) ne semblent donc pas jouer de rôle important dans le transfert de SGI1. La seule région importante identifiée par ces expériences concerne la région comprise entre les ORF S014 et S019 qui abolit tout transfert de l'îlot lorsqu'elle est absente.

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVE

Les éléments génétiques mobiles capables de se transférer entre bactéries sont certainement les principaux responsables de la dissémination des résistances aux antibiotiques à travers les populations bactériennes. La compréhension de leurs mécanismes de transfert est donc une précaution indispensable pour pouvoir espérer endiguer la propagation de ces résistances. Dans ce contexte, l'intérêt de l'îlot génomique SGI1, outre les multi-résistances aux antibiotiques qu'il véhicule et sa plasticité génétique, est son mode de transfert. En effet, SGI1 est un élément mobilisable qui, comme tout élément mobilisable, a la particularité de dépendre d'un élément conjugatif dit *helper* pour assurer son propre transfert entre bactéries. Bien qu'elle peut nous permettre de mieux comprendre le fonctionnement des systèmes de conjugaison, cette relation entre un élément conjugatif et son élément *helper* rend l'identification des acteurs de ce système plus compliquée. Le système de transfert de SGI1 ne déroge pas à cette règle. Comment SGI1 prend-il part à son propre transfert conjugatif ? Quelles composantes de ce système de conjugaison sont apportées par le plasmide *helper* ? Existe-t-il une spécificité entre l'îlot génomique et le plasmide *helper* qui participe à son transfert ? C'est à ces questions que ce travail avait pour objectif de répondre. Cependant, avant toute chose, la première de ces questions était de savoir si d'autres plasmides *helper* que R55 étaient capables de mobiliser l'îlot génomique. En effet, avant ce travail, seul le plasmide R55 du groupe IncA/C avait été utilisé pour mobiliser l'îlot génomique (Doublet *et al.*, 2005). Afin de s'assurer que ce résultat n'était pas juste un événement isolé, le premier objectif de ce travail était de déterminer si d'autres plasmides que R55 étaient capables d'assurer la mobilité de SGI1.

Cette question a été développée notamment suite à la diffusion chez les Entérobactéries d'une famille de plasmides, appartenant aux groupes d'incompatibilités IncI1 et IncHI2, porteurs de gènes de résistance aux C3G. Certains de ces plasmides ayant déjà pu être identifiés chez *Salmonella*, il existe une probabilité non négligeable pour que l'un de ces plasmides se retrouve dans la même cellule que l'îlot génomique, la question était donc de savoir si ces plasmides étaient capables de participer à la dissémination de SGI1. Cette hypothèse, si elle s'avérait exacte, conduirait probablement à une augmentation de la prévalence de SGI1 chez les bactéries du genre *Salmonella*, voir à sa diffusion vers d'autres genres bactériens. Cependant, les résultats des tests de mobilisation réalisés à l'aide de 17 de ces plasmides se sont avérés négatifs. Les plasmides testés étaient pourtant relativement différents puisque certains portaient les gènes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, ou *bla*_{CTX-M-9}, d'autres, le gène *bla*_{TEM-52} ; il est donc probable que ces plasmides aient évolué indépendamment les uns

des autres. De plus, le choix des plasmides testés a été fait en fonction de leurs caractéristiques génotypiques en prenant soin de choisir des plasmides qui présentaient notamment des profils de restriction relativement différents (Weill *et al.*, 2004; Bertrand *et al.*, 2006; Girlich *et al.*, 2007; Cloeckaert *et al.*, 2010).

Ces résultats ne permettant pas de répondre à la question qui était de savoir si d'autres plasmides que R55 étaient capables de mobiliser SGI1, différents plasmides représentant une majorité des groupes d'incompatibilités présents chez les Entérobactéries ont été testés (IncA/C, IncF, IncH, IncI, IncL/M, IncN, IncP, IncW). Parmi eux, seul le plasmide pRA1 du groupe IncA/C a été capable de mobiliser l'îlot génomique. Par la suite, d'autres plasmides du même groupe, identifiés dans les années 1970 pour certains (R16a, pIP40a) ou depuis le début des années 2000 pour d'autres (p13688, p13956), ont montré les mêmes capacités. Les deux seules exceptions étant les plasmides pN418 et pAM04528 qui n'ont pas été capables de mobiliser SGI1, cependant pAM04528 n'a pas été non plus capable d'être transféré lui-même. Hormis ces derniers, les plasmides helper utilisés ont permis de transférer l'îlot génomique à une fréquence comprise entre 10^{-3} et 10^{-6} selon le plasmide utilisé. Cette différence entre les fréquences de transfert peut être retrouvé dans d'autres études dans lesquelles les fréquences de transfert des plasmides du groupe IncA/C variaient entre 10^{-2} et 10^{-6} (Welch *et al.*, 2007; Poole *et al.*, 2009). Cet écart de fréquences suggère que les fonctions de ces plasmides impliquées dans le transfert conjugatif présentent sans doute quelques différences. Ces différences peuvent être également à l'origine de l'incapacité du plasmide pN418 à mobiliser SGI1 malgré son appartenance au groupe IncA/C. Malheureusement, la séquence de ce plasmide n'est pas disponible, les deux seuls plasmides utilisés dans cette étude, dont les séquences sont disponibles, sont les plasmides pRA1 et pAM04528. Ce dernier ne semble cependant pas doté de toutes les fonctions nécessaires au transfert conjugatif. Les principales différences qui touchent les gènes potentiellement impliqués dans le transfert conjugatif de ces deux plasmides ne permettent pas d'expliquer clairement l'absence de transfert du plasmide pAM04528 (pour rappel, duplication/inversion du gène *traC*, l'absence d'une région d'ADN comprenant le gène d'une ATPase putative et des ORF de fonctions inconnues, et l'absence d'homologie entre pRA1 et pAM04528 au niveau de l'extrémité 5' du gène *traN*). Cependant, le nombre important d'éléments mobiles (IS, transposons, ISCR) présents sur les plasmides IncA/C pourrait être la raison des différences de capacités conjugatives entre ces plasmides. En effet, bien que les plasmides IncA/C partagent la majeure partie de leur séquence nucléotidique, notamment les fonctions impliquées dans la pérennité des plasmides

(réplication, partition, transfert conjugatif) (Welch *et al.*, 2007; Fricke *et al.*, 2009), l'insertion de ces séquences mobiles interrompt la synténie globale de ces plasmides et ainsi, pourrait localement empêcher l'expression d'un gène important, par exemple, pour le transfert conjugatif.

Le spectre de plasmides utilisé lors de cette étude ne constitue pas une liste exhaustive de tous les groupes d'incompatibilités retrouvés chez les Entérobactéries, il manque notamment des représentants des groupes IncB/O, IncK, IncT, IncX, IncY (le groupe IncQ étant principalement constitué de plasmides mobilisables, les plasmides de ce groupe ne pouvaient pas être testés pour mobiliser SGI1). Cependant, une revue publiée en 2009, qui a recensé 1459 plasmides de résistance identifiés chez les Entérobactéries, a montré que 1224 de ces plasmides (83,9%) appartenaient aux groupes IncA/C, IncF, IncL/M, IncH, IncI, ou IncN (Carattoli, 2009). Les huit groupes d'incompatibilité représentés dans notre échantillon de plasmides contiennent 86,4% des plasmides identifiés chez les Entérobactéries au cours de cette étude. Les principaux groupes d'incompatibilité retrouvés chez ces bactéries ont donc pu être testés. Il est intéressant de noter que le groupe IncA/C est le groupe d'incompatibilité majoritairement retrouvé chez les souches de *S. enterica* multi-résistantes aux antibiotiques (Lindsey *et al.*, 2009; Poole *et al.*, 2009). Tous sérotypes confondus, 38% des isolats de *S. enterica* testés possédaient un plasmide du groupe IncA/C (Lindsey *et al.*, 2009), ce taux pouvant même atteindre 90% chez les souches de *S. enterica* multi-résistantes aux antibiotiques (Poole *et al.*, 2009). Cette prévalence des plasmides IncA/C pourrait expliquer la diffusion de SGI1 à travers le genre *Salmonella* puisque, à ce jour et sans compter les îlots identifiés chez *P. mirabilis*, SGI1 ou un de ses variants ont été mis en évidence chez 26 sérotypes différents de *S. enterica* (Voir annexe 1). Lindsey *et al.* ont également montré que les plasmides IncA/C, porteurs de multi-résistance, semblaient associés stablement avec des souches de *Salmonella* depuis très longtemps. Le seul sérotype pour lequel cette association est moins évidente est le sérotype Typhimurium dont la multi-résistance serait due à l'îlot SGI1. Ainsi, ils ont démontré une relation intéressante entre la présence/absence de SGI1, la présence/absence d'un plasmide IncA/C et le succès épidémique de certains sérotypes comme Typhimurium ou Newport (Lindsey *et al.*, 2009). Par ailleurs, les gènes de résistance présents sur SGI1 ou un de ses variants sont souvent proches de ceux présents sur les plasmides IncA/C, suggérant une origine commune à ces gènes de résistance (Lindsey *et al.*, 2009; Glenn *et al.*, 2011). Toutes ces observations permettent de penser qu'il existe une relation particulière entre les plasmides IncA/C et SGI1 qui ne se limite pas seulement à leur mobilité.

Cette relation très particulière entre un élément mobilisable et un groupe d'incompatibilité n'est pas un évènement courant dans la littérature. Le transfert des plasmides mobilisables pBHR1 et pJRD215 n'est pas dépendant d'un groupe de plasmides spécifique puisque le premier peut être mobilisé par les plasmides des groupes IncL/M et IncP, et le second par des plasmides IncL/M, IncN, IncW, IncX, voir IncF bien que la mobilisation soit moins efficace avec ce dernier (Szpirer *et al.*, 2000). Le plasmide RSF1010 est un des plasmides mobilisables les plus étudiés dont le transfert est particulièrement efficace lorsqu'il est assisté par un plasmide du groupe IncP (Cabezón *et al.*, 1997). Toutefois, des plasmides appartenant à différents groupes d'incompatibilité (IncI, IncN, IncW, IncX) ont aussi été capables de permettre sa mobilisation (Willett & Crowther, 1981; Cabezón *et al.*, 1997). Il en est de même avec le système de virulence Dot/Icm de *Legionella* ou le système de transfert de l'ICE SXT, même si les fréquences de transfert de RSF1010 sont bien plus faibles en présence de ces derniers (Vogel *et al.*, 1998; Hochhut *et al.*, 2000). Bien que RSF1010 ait une relation particulière avec les plasmides IncP, il est donc difficile de parler de mobilisation spécifique à propos de ce plasmide. Il en est de même avec un autre des plasmides mobilisables les plus étudiés, ColE1 qui, même s'il semble avoir plus d'affinité avec les systèmes de transfert type-F (plasmides IncF ou IncW), est capable d'être mobilisé à des fréquences non négligeables par des plasmides de différents groupes d'incompatibilité (IncA/C, IncN, IncH, IncI, IncP, IncX) (Selvaratnam & Gealt, 1993). Les mêmes études n'ont pas été menées sur les transposons mobilisables puisque beaucoup de ces transposons sont retrouvés chez les bactéries Gram positif. Hormis les plasmides du groupe IncP qui possèdent un large spectre d'hôte, aucun autre plasmide n'a été utilisé pour essayer de mobiliser ces transposons mobilisables (Murphy & Malamy, 1993, Crellin & Rood, 1998). Cette relation privilégiée entre un élément mobilisable et un groupe d'incompatibilité serait donc une originalité supplémentaire de l'îlot génomique SGI1. Même si les raisons de cette relation privilégiée restent inconnues, il est possible que SGI1 dépende d'un plus grand nombre de protéines provenant du plasmide helper que les autres éléments mobilisables cités avant. Toutefois, au cours de ce travail, des éléments importants, voir indispensables, pour le transfert de SGI1 ont été mis en évidence.

L'objectif était d'identifier les éléments présents sur SGI1, notamment son origine de transfert putative et les ORF potentielles, qui participent au transfert de l'îlot génomique. En utilisant la caractéristique des origines de transfert de pouvoir rendre mobilisable un élément non mobile, un fragment d'ADN d'une taille de 135 pb localisé entre les ORF S020 et S023

(10D7, figure 45), susceptible de contenir l'origine de transfert de l'îlot génomique, a été identifié. La présence de ce fragment sur un plasmide non mobile a permis de transférer ce dernier à une fréquence similaire à celle de l'îlot génomique SGI1 lui-même (de l'ordre de 10^{-4}), à l'inverse, l'absence de ce fragment sur l'îlot génomique a entraîné une diminution considérable de la fréquence de transfert de SGI1 (entre 1000 et 1500 fois). Même si cette délétion n'a pas permis d'abolir totalement le transfert de l'îlot génomique, ces deux résultats montrent que ce fragment de 135 pb contient vraisemblablement l'origine de transfert de SGI1. Les recherches de séquences répétées inversées au sein de cette région ont permis de mettre en évidence trois structures secondaires potentielles pouvant servir de sites de fixation pour les protéines du relaxosome (figure 47). Malgré que la dernière de ces séquences soit localisée dans un fragment plus court qui n'a pas été capable de mobiliser le plasmide non mobile (figure 45), son rôle dans le transfert de SGI1 ne peut pas être exclu puisque, au moins, une des deux premières séquences répétées inversées peut être indispensable au transfert de l'îlot.

Les expériences de mobilisation du plasmide pACYC184 ont révélé que, en plus de son origine de transfert, deux autres régions de SGI1 présentaient des capacités mobilisatrices. En effet, les régions 3 et 4 (figure 44) ont permis de mobiliser le plasmide non mobile à des fréquences, certes beaucoup plus faibles que celle obtenue avec la séquence *oriT* (10D7) mais cependant, non négligeables (de l'ordre de 10^{-7} et 10^{-6} respectivement). Le transfert résiduel observé lorsque l'origine de transfert était déléetée de l'îlot génomique était donc peut-être dû aux capacités mobilisatrices d'une de ces deux régions. Cette hypothèse est soutenue par les valeurs des fréquences de transfert obtenues : en l'absence de sa séquence *oriT*, l'îlot SGI1 était transféré à une fréquence de l'ordre de 10^{-6} , soit une fréquence proche de celle obtenue pour le plasmide pACYC184 lorsque la région 4 était clonée dans celui-ci. Une explication possible est qu'une séquence proche de l'origine de transfert de SGI1 pourrait être présente au sein de cette région. Pourtant, seule une faible homologie a pu être mise en évidence entre la séquence *oriT* et la région 4 (60% d'identité). Cependant, l'organisation des sites de fixation des protéines du relaxosome semble plus importante que la composition nucléotidique de ces sites (Williams & Schildbach, 2007). Au sein de la région 4 de SGI1, des structures secondaires pas forcément identiques à celles présentes dans l'origine de transfert, mais suffisamment proches pour pouvoir être reconnues par les protéines du relaxosome, pourraient permettre à ces dernières d'interagir avec la séquence ADN et d'initier le transfert de l'îlot génomique. Toutefois, cette absence d'homologie parfaite entraînerait une affinité

réduite des protéines du relaxosome pour cette région qui expliquerait la fréquence de transfert plus faible obtenue, aussi bien lorsque cette région est clonée sur le plasmide pACYC184 que lorsque l'origine de transfert de SGI1 est déléetée de l'îlot génomique.

En ce qui concerne la région 3, aucune homologie avec l'origine de transfert identifiée entre les ORF S020 et S023 n'a pu être mise en évidence. La fréquence de transfert du plasmide pACYC184 contenant cette région était toutefois proche de la limite de détection. Cependant, une hypothèse liée à la relation particulière entre SGI1 et les plasmides IncA/C peut être avancée pour expliquer ces transferts résiduels. En effet, de la même manière que l'hypothèse concernant la présence sur SGI1 d'une seconde séquence *oriT* proche de la première, SGI1 pourrait posséder une séquence similaire à l'origine de transfert des plasmides IncA/C. Les plasmides appartenant à un même groupe d'incompatibilité présentent généralement une séquence *oriT* très conservée, cette observation a notamment été faite pour les groupes d'incompatibilités les plus étudiés (IncF, IncP, IncQ) (Lanka & Wilkins, 1995), mais aussi pour les ICE de la famille SXT/R391 (Ceccarelli *et al.*, 2008; Wozniak *et al.*, 2009). Comme cela a été montré pour les plasmides IncQ, cette homologie entre les séquences *oriT* est notamment importante au niveau du site *nic*, site d'action de la relaxase (Parker *et al.*, 2005). Il est donc possible que les plasmides du groupe IncA/C possèdent également une séquence *oriT* commune et qu'une séquence proche de celle-ci soit présente sur l'îlot génomique SGI1. Le système de transfert des plasmides IncA/C permettrait alors de transférer également l'îlot génomique SGI1, mais à une fréquence plus faible qui peut être expliquée par l'affinité réduite du système de transfert de ces plasmides pour l'*oriT* éventuellement présente sur SGI1. Ces hypothèses de mimétismes de séquences *oriT* peuvent être crédibles puisque Daccord *et al.* ont montré que certains îlots génomiques de *Vibrio* pouvaient profiter de toutes la machinerie de conjugaison de l'ICE SXT en possédant seulement une séquence proche de la séquence *oriT* de SXT (parmi ces îlots génomiques, l'identité la plus faible était de 63% avec la séquence *oriT* de SXT) (Daccord *et al.*, 2010; Waldor, 2010). Cependant, les mécanismes de transfert des plasmides du groupe IncA/C ne sont pas aussi documentés que ceux des plasmides des groupes IncP ou IncF, ou encore des ICE de la famille SXT. L'origine de transfert des plasmides IncA/C étant inconnue à ce jour, cette hypothèse de mimétisme d'*oriT* entre SGI1 et ces plasmides ne peut donc pas être vérifiée pour le moment, mais elle pourrait participer à la compréhension de cette relation privilégiée entre les plasmides IncA/C et SGI1. Cependant, l'hypothèse la plus probable

concernant cette relation serait que des protéines codées par les plasmides IncA/C participent de manière étroite au transfert de l'îlot génomique.

Hormis l'origine de transfert, ce travail a montré que d'autres régions de SGI1 étaient impliquées dans le transfert de l'îlot génomique. Plusieurs délétions ont été réalisées afin de vérifier tout d'abord si les produits de certaines ORF jouaient un rôle dans ce transfert. Les fonctions prédites des ORF ainsi ciblées correspondent à des fonctions souvent impliquées dans la préparation de l'ADN avant le transfert conjugatif. Il s'agit des ORF S020, S023 et S024 qui codent respectivement une intégrase, une hélicase et une endonucléase potentielle (figure 49). Dans les systèmes de conjugaison, une fonction endonucléase est requise pour réaliser la coupure simple brin de l'ADN au niveau du site *nic* et une fonction hélicase est nécessaire pour séparer les deux brins d'ADN avant l'initiation du transfert. Dans les systèmes type-F (plasmide F, R388, etc.), ces deux fonctions sont apportées par une seule protéine, la relaxase (Gomis-Ruth & Coll, 2006, Dostal & Schildbach, 2010). En ce qui concerne l'intégrase, cette fonction n'est pas requise à proprement parler, mais le système de transfert du transposon conjugatif Tn916 implique l'action d'une intégrase qui permet à la relaxase d'effectuer une coupure simple-brin site-spécifique (Rocco & Churchward, 2006). A notre grande surprise, l'absence des ORF S023 et/ou S024 n'a pas permis de diminuer la fréquence de transfert de l'îlot génomique. En effet, puisque les gènes codant les protéines impliquées dans la formation du relaxosome sont souvent localisés à proximité de leur séquence *oriT* (de la Cruz *et al.*, 2010), la localisation de ces ORF, ainsi que la fonction potentielle des protéines qu'elles codent, nous avaient conduit à suspecter leur participation au transfert de SGI1.

A l'inverse, l'ORF S020, également située à proximité de l'origine de transfert de SGI1 semble impliquée dans le transfert conjugatif de l'îlot puisque son absence entraîne une forte diminution de la fréquence de transfert de SGI1, sans toutefois l'abolir complètement. L'hypothèse suggérée par ce résultat est que l'intégrase putative codée par S020 jouerait, à l'instar de celle de Tn916 (Rocco & Churchward, 2006), le rôle de protéine auxiliaire. En effet, les protéines auxiliaires jouent un rôle important dans les étapes d'initiation de la conjugaison, mais en l'absence de certaines d'entre elles (TraY du plasmide F ou TraJ de RK2), un léger transfert peut tout de même avoir lieu (Guiney *et al.*, 1989; Frost *et al.*, 1994). Cependant, le transfert résiduel observé en l'absence de l'ORF S020 est plus faible que celui observé lorsque l'origine de transfert était délétée. Cette différence peut suggérer une autre hypothèse. Cette dernière repose sur l'idée qu'il existerait plusieurs systèmes capables

d'initier le transfert de SGI1 : un système dépendant de S020 et de l'origine de transfert identifiée (entre S020 et S023), et un autre indépendant de ces deux éléments mais qui serait moins efficace que le premier. Dans ce cas, le transfert résiduel observé en l'absence de la séquence *oriT* serait dû à la présence sur l'îlot d'une séquence, similaire mais pas identique à l'origine de transfert de SGI1 (fragment 10D7), pour laquelle la protéine codée par S020 aurait une affinité réduite. Par contre, le transfert résiduel, plus faible, observé en l'absence de S020 serait dû à l'autre système de transfert indépendant de S020 et de la séquence *oriT* de SGI1, peut-être un système de transfert relié à celui des plasmides IncA/C.

D'autres délétions, plus larges, ont été également réalisées pour essayer d'identifier toutes les régions de SGI1 qui jouent un rôle dans le transfert de l'îlot génomique. Ces délétions permettaient notamment de déterminer le rôle potentiel des ORF S005, S011 et S012 pour lesquelles les analyses bio-informatiques avaient identifié des motifs caractéristiques de protéines impliquées dans le transfert conjugatif. Les protéines potentiellement codées par ces ORF (TraN, TraG, et TraH) possèdent des motifs communs aux protéines du même nom du système de transfert du plasmide F. Chez ce dernier, ces protéines ne sont pas impliquées au niveau du relaxosome, mais plutôt au niveau du transférosome (Frost *et al.*, 1994). Même si toutes les protéines du transférosome sont sensées être apportées par le plasmide helper, il était intéressant de vérifier l'implication potentielle du produit de ces trois ORF. Cependant, la délétion Δ S007-S013 n'a eu aucune influence sur le transfert de l'îlot génomique (figures 50 et 51). Les produits potentiels des ORF S011 et S012, ainsi que ceux de toutes les ORF localisées dans cette région ne semblent donc pas jouer de rôle dans le transfert de SGI1. La délétion Δ S003-S010 n'a pas non plus eu d'effets importants sur le transfert de l'îlot, il est donc peu probable que les protéines potentiellement codées par les ORF de cette région participent au transfert de SGI1. Cependant, une légère baisse de la fréquence de transfert a pu être montrée lorsque cette région était absente comparée à l'îlot « sauvage » (facteur inférieur à 10). Cette diminution pourrait être liée aux capacités mobilisatrices des régions 3 et 4 observées lorsque ces régions étaient clonées dans un plasmide non mobile. Ainsi, l'origine de transfert localisée entre les ORF S020 et S023 participeraient majoritairement au transfert de l'îlot, d'où la fréquence de transfert qui reste forte lorsque la région S003-S010 est délétée. Cependant, cette région S003-S010 participerait aussi au transfert de SGI1, mais de manière moins importante, ce qui expliquerait la faible diminution de la fréquence de transfert observée lorsque cette région était absente.

Par contre, la délétion de la région comprise entre les ORF S012 et S019 incluses a permis d'abolir tout transfert de l'îlot. Étonnamment, un élément important pour le transfert de SGI1 semble donc être localisé dans cette région qui ne comporte pourtant aucune ORF dont la fonction a pu être prédite par des analyses bio-informatiques.

Une collaboration sur le transfert de SGI1 a vu le jour à la fin de ma thèse entre l'équipe hongroise de Ferenc Olsasz et l'équipe PGBA. Olsasz *et al.* nous avaient demandé le plasmide R55 car ils s'intéressaient au transfert des éléments mobiles et en particulier de SGI1. Cette collaboration naissante a permis de vérifier et de compléter les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse. En effet, par une approche un peu différente, Olsasz *et al.* ont montré qu'un fragment d'ADN de SGI1, comprenant les ORF S019, S020, S021 et S022, y compris donc l'origine de transfert localisée au cours de ce travail, était suffisant pour mobiliser un plasmide non mobile en présence uniquement du plasmide helper R55. La présence de SGI1 n'étant pas nécessaire lors de ce test de mobilisation, cette région semble contenir tous les éléments de SGI1 qui participent au transfert de l'îlot. L'élément important de la région S012-S019 délétée au cours de ce travail semble donc être l'ORF S019. L'inactivation des ORF S019 et S020 leur a permis d'abolir le transfert du plasmide non mobile. Cependant, le transfert du plasmide pouvait être restauré lorsque ces inactivations étaient complétées *in trans* par ces mêmes ORF, prouvant ainsi le rôle dans la conjugaison des protéines codées par ces ORF.

L'intégrase putative codée par S020 présente des domaines protéiques conservés communs aux recombinaisons XerC/XerD. Bien qu'elle ne présente aucune homologie au niveau protéique avec l'intégrase de Tn916, toutes deux appartiennent à la famille des recombinaisons site-spécifique (ou recombinaisons à tyrosine). La majorité des recombinaisons de cette famille agissent en clivant l'ADN de manière simple-brin grâce à l'attaque nucléophile via un résidu tyrosine conservé (Grainge & Jayaram, 1999). En ce qui concerne l'ORF S019, aucun domaine protéique conservé n'a pu être mis en évidence dans la séquence traduite à partir de cette ORF. Bien que cette séquence ne contienne que 98 acides aminés, la protéine putative codée par cette ORF semble exprimée à un niveau non négligeable (Golding *et al.*, 2007).

Dans le cadre de ma thèse, le « plasmide- référence » pour mobiliser SGI1, R55, a été séquencé en collaboration avec l'équipe canadienne de Michael Mulvey. Sa séquence, en cours d'assemblage, a permis de localiser le gène codant la relaxase potentielle de ce

plasmide. Dans le cadre de la collaboration naissante avec Olasz *et al.*, la relaxase potentielle de R55 a été inactivée afin de déterminer son rôle dans la conjugaison. Les résultats préliminaires semblent indiquer que, en plus d'empêcher le transfert de R55, cette inactivation bloquait aussi le transfert de SGI1. La relaxase de R55 semble donc jouer un rôle dans le transfert de l'îlot génomique. Même si cette découverte permet d'expliquer, au moins en partie, la relation particulière entre SGI1 et les plasmides IncA/C, elle ouvre aussi de nouvelles interrogations, notamment sur le rôle des protéines codées par les ORF S019 et S020, et donc de nouvelles perspectives.

Tout d'abord, maintenant qu'une grande partie des acteurs du transfert de SGI1 semble identifiée, des expériences d'interactions protéines-ADN et protéines-protéines devront être réalisées pour identifier les sites de fixation des protéines et comprendre les étapes de la formation du relaxosome de SGI1. Des expériences de clivage d'ADN pourront aussi être réalisées pour vérifier l'implication de la relaxase de R55 au niveau de l'origine de transfert de SGI1. Ces expériences permettront en plus de localiser le site de coupure *nic* au sein de l'origine de transfert. La caractérisation de l'origine de transfert de SGI1 pourrait être terminée par des expériences de mutagénèse dirigée afin d'identifier les séquences répétées inversées présentes au sein de cette région indispensables au transfert de l'îlot, mais aussi pour estimer l'importance des nucléotides localisés autour du site *nic*.

Cette relation particulière entre SGI1 et les plasmides IncA/C nécessite également de poursuivre les recherches dans cette direction. Le plasmide R55 étant en cours de séquençage, des délétions pourraient être réalisées sur ce plasmide pour identifier, en plus de sa relaxase, les protéines qui joueraient éventuellement un rôle dans le transfert de l'îlot génomique, notamment la protéine de couplage et les protéines auxiliaires du relaxosome. Les problèmes de transfert résiduel observés lors des délétions de l'ORF S020 et de l'origine de transfert nécessitent aussi de caractériser le mécanisme de transfert, en particulier de localiser l'origine de transfert des plasmides IncA/C, pour vérifier l'interaction potentielle entre le système de transfert de ces plasmides et l'îlot SGI1.

SGI1 serait donc un élément particulier dont le mécanisme de transfert semble être compris entre celui des éléments mobilisables classiques et celui des îlots génomiques de *Vibrio* qui miment l'origine de transfert de SXT. En effet, la relation de SGI1 avec son élément helper est plus étroite que celle des éléments mobilisables classiques, mais pas aussi

dépendante que celle des îlots génomiques de *Vibrio* puisque, à l'inverse de ces derniers, certaines protéines apportées par SGI1 sont indispensables à son transfert.

Les systèmes de transfert conjugatif des éléments génétiques mobiles semblent être presque aussi diversifiés que les différents types d'éléments mobiles. Les différents transferts conjugatifs autonomes, le mimétisme d'origine de transfert, les différents mécanismes de mobilisation dépendants de plus ou moins de protéines du plasmide helper, sont autant de variantes d'un même processus qui semble en constante évolution.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abajy, M. Y., J. Kopec, K. Schiwon, M. Burzynski, M. Doring, C. Bohn & E. Grohmann,** (2007) A type IV-secretion-like system is required for conjugative DNA transport of broad-host-range plasmid pIP501 in gram-positive bacteria. *Journal of Bacteriology* **189**: 2487-2496.
- Abouzeed, Y. M., S. Baucheron & A. Cloeckaert,** (2008) *ramR* mutations involved in efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 2428-2434.
- Ahmed, A. M., A. I. Hussein & T. Shimamoto,** (2007) *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**: 184-190.
- Akiba, M., K. Nakamura, D. Shinoda, N. Yoshii, H. Ito, I. Uchida & M. Nakazawa,** (2006) Detection and characterization of variant *Salmonella* genomic island 1s from *Salmonella* Derby isolates. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **59**: 341-345.
- Alekshun, M. N. & S. B. Levy,** (2007) Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* **128**: 1037-1050.
- Allen, H. K., J. Donato, H. H. Wang, K. A. Cloud-Hansen, J. Davies & J. Handelsman,** (2010) Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 251-259.
- Alonso, A., F. Rojo & J. L. Martinez,** (1999) Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environmental Microbiology* **1**: 421-430.
- Alonso, G., K. Baptista, T. Ngo & D. E. Taylor,** (2005) Transcriptional organization of the temperature-sensitive transfer system from the IncHI1 plasmid R27. *Microbiology* **151**: 3563-3573.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers & D. J. Lipman,** (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Alvarez-Martinez, C. E. & P. J. Christie,** (2009) Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **73**: 775-808.
- Aly, K. A. & C. Baron,** (2007) The VirB5 protein localizes to the T-pilus tips in *Agrobacterium tumefaciens*. *Microbiology* **153**: 3766-3775.
- Amabile-Cuevas, C. F. & M. E. Chicurel,** (1992) Bacterial plasmids and gene flux. *Cell* **70**: 189-199.
- Aminov, R. I. & R. I. Mackie,** (2007) Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters* **271**: 147-161.
- Aminov, R. I.,** (2009) The role of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Environmental Microbiology* **11**: 2970-2988.
- Anjum, M. F., S. Choudhary, V. Morrison, L. C. Snow, M. Mafura, P. Slickers, R. Ehricht & M. J. Woodward,** (2011) Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **66**: 550-559.
- Aoki, T., S. Egusa, Y. Ogata & T. Watanabe,** (1971) Detection of resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquefaciens*. *Journal of General Microbiology* **65**: 343-349.
- Aravind, L. & E. V. Koonin,** (1998) The HD domain defines a new superfamily of metal-dependent phosphohydrolases. *Trends in Biochemical Sciences* **23**: 469-472.
- Arcangioli, M. A., S. Leroy-Setrin, J. L. Martel & E. Chaslus-Dancla,** (1999) A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters* **174**: 327-332.

- Arlet, G., T. J. Barrett, P. Butaye, A. Cloeckaert, M. R. Mulvey & D. G. White, (2006)** *Salmonella* resistant to extended-spectrum cephalosporins: prevalence and epidemiology. *Microbes and Infection* **8**: 1945-1954.
- Avila, P., B. Nunez & F. de la Cruz, (1996)** Plasmid R6K contains two functional *oriTs* which can assemble simultaneously in relaxosomes *in vivo*. *Journal of Molecular Biology* **261**: 135-143.
- Backert, S. & M. Selbach, (2008)** Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cellular Microbiology* **10**: 1573-1581.
- Barrangou, R., C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D. A. Romero & P. Horvath, (2007)** CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709-1712.
- Beaber, J. W., V. Burrus, B. Hochhut & M. K. Waldor, (2002a)** Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants. *Cellular and Molecular Life Sciences* **59**: 2065-2070.
- Beaber, J. W., B. Hochhut & M. K. Waldor, (2002b)** Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* **184**: 4259-4269.
- Beaber, J. W., B. Hochhut & M. K. Waldor, (2004)** SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. *Nature* **427**: 72-74.
- Bennett, P. M., (2008)** Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology* **153 Suppl 1**: S347-357.
- Beranek, A., M. Zettl, K. Lorenzoni, A. Schauer, M. Manhart & G. Koraimann, (2004)** Thirty-eight C-terminal amino acids of the coupling protein TraD of the F-like conjugative resistance plasmid R1 are required and sufficient to confer binding to the substrate selector protein TraM. *Journal of Bacteriology* **186**: 6999-7006.
- Bertrand, S., F. X. Weill, A. Cloeckaert, M. Vrints, E. Mairiaux, K. Praud, K. Dierick, C. Wildemaue, C. Godard, P. Butaye, H. Imberechts, P. A. Grimont & J. M. Collard, (2006)** Clonal emergence of extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-2)-producing *Salmonella enterica* serovar Virchow isolates with reduced susceptibilities to ciprofloxacin among poultry and humans in Belgium and France (2000 to 2003). *Journal of Clinical Microbiology* **44**: 2897-2903.
- Bi, S., H. Yan, M. Chen, Z. Zhang, L. Shi & H. Wang, (2011)** New variant *Salmonella* genomic island 1-U in *Proteus mirabilis* clinical and food isolates from South China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* doi:10.1093/jac/dkr030.
- Biebricher, C. K. & E. M. Duker, (1984)** F and type 1 piliation of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **130**: 951-957.
- Blair, J. M. & L. J. Piddock, (2009)** Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current Opinion in Microbiology* **12**: 512-519.
- Boto, L., (2010)** Horizontal gene transfer in evolution: facts and challenges. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* **277**: 819-827.
- Bowie, J. U. & R. T. Sauer, (1990)** TraY proteins of F and related episomes are members of the Arc and Mnt repressor family. *Journal of Molecular Biology* **211**: 5-6.
- Boyd, A. C., J. A. Archer & D. J. Sherratt, (1989)** Characterization of the ColE1 mobilization region and its protein products. *Molecular and General Genetics* **217**: 488-498.

- Boyd, D. A., G. A. Peters, L. Ng & M. R. Mulvey**, (2000) Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters* **189**: 285-291.
- Boyd, D., G. A. Peters, A. Cloeckaert, K. S. Boumedine, E. Chaslus-Dancla, H. Imberechts & M. R. Mulvey**, (2001) Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *Journal of Bacteriology* **183**: 5725-5732.
- Boyd, D., A. Cloeckaert, E. Chaslus-Dancla & M. R. Mulvey**, (2002) Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 1714-1722.
- Boyd, D. A., S. Tyler, S. Christianson, A. McGeer, M. P. Muller, B. M. Willey, E. Bryce, M. Gardam, P. Nordmann & M. R. Mulvey**, (2004) Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 3758-3764.
- Boyd, D. A., X. Shi, Q. H. Hu, L. K. Ng, B. Doublet, A. Cloeckaert & M. R. Mulvey**, (2008) *Salmonella* genomic island 1 (SGI1), variant SGI1-I, and new variant SGI1-O in *Proteus mirabilis* clinical and food isolates from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 340-344.
- Bradley, D. E.**, (1984) Characteristics and function of thick and thin conjugative pili determined by transfer-derepressed plasmids of incompatibility groups I1, I2, I5, B, K and Z. *Journal of General Microbiology* **130**: 1489-1502.
- Briggs, C. E. & P. M. Fratamico**, (1999) Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella* Typhimurium DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **43**: 846-849.
- Brigulla, M. & W. Wackernagel**, (2010) Molecular aspects of gene transfer and foreign DNA acquisition in prokaryotes with regard to safety issues. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**: 1027-1041.
- Burns, D. L.**, (2003) Type IV transporters of pathogenic bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **6**: 29-34.
- Burrus, V., G. Pavlovic, B. Decaris & G. Guedon**, (2002) Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Molecular Microbiology* **46**: 601-610.
- Bush, K. & G. A. Jacoby**, (2010) Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**: 969-976.
- Butaye, P., A. Cloeckaert & S. Schwarz**, (2003) Mobile genes coding for efflux-mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* **22**: 205-210.
- Byrd, D. R. & S. W. Matson**, (1997) Nicking by transesterification: the reaction catalysed by a relaxase. *Molecular Microbiology* **25**: 1011-1022.
- Cabezón, E., J. I. Sastre & F. de la Cruz**, (1997) Genetic evidence of a coupling role for the TraG protein family in bacterial conjugation. *Molecular and General Genetics* **254**: 400-406.
- Call, D. R., R. S. Singer, D. Meng, S. L. Broschat, L. H. Orfe, J. M. Anderson, D. R. Herndon, L. S. Kappmeyer, J. B. Daniels & T. E. Besser**, (2010) *bla*_{CMY-2}-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct component of a larger lineage of plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**: 590-596.

- Carattoli, A., A. Bertini, L. Villa, V. Falbo, K. L. Hopkins & E. J. Threlfall**, (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods* **63**: 219-228.
- Carattoli, A.**, (2008) Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection* **14 Suppl 1**: 117-123.
- Carattoli, A.**, (2009) Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 2227-2238.
- Carver, T., M. Berriman, A. Tivey, C. Patel, U. Bohme, B. G. Barrell, J. Parkhill & M. A. Rajandream**, (2008) Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics* **24**: 2672-2676.
- Ceccarelli, D., A. Daccord, M. Rene & V. Burrus**, (2008) Identification of the origin of transfer (*oriT*) and a new gene required for mobilization of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements. *Journal of Bacteriology* **190**: 5328-5338.
- Celli, J. & P. Trieu-Cuot**, (1998) Circularization of Tn916 is required for expression of the transposon-encoded transfer functions: characterization of long tetracycline-inducible transcripts reading through the attachment site. *Molecular Microbiology* **28**: 103-117.
- Cercenado, E., O. Cuevas, M. Marin, E. Bouza, P. Trincado, T. Boquete, B. Padilla & A. Vindel**, (2008) Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Madrid, Spain: transcontinental importation and polyclonal emergence of Panton-Valentine leukocidin-positive isolates. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **61**: 143-149.
- Chabbert, Y. A., M. R. Scavizzi, J. L. Witchitz, G. R. Gerbaud & D. H. Bouanchaud**, (1972) Incompatibility groups and the classification of fi - resistance factors. *Journal of Bacteriology* **112**: 666-675.
- Chaslus-Dancla, E., A. Cloeckaert, S. Payot, and S. Baucheron**, (2002) Les multiples façons de faire de la résistance aux antibiotiques. In C. Legrand (ed.), *Antibiothérapie bovine Acquis et consensus*. Le Point Vétérinaire, Maison-Alfort.
- Chen, I., P. J. Christie & D. Dubnau**, (2005) The ins and outs of DNA transfer in bacteria. *Science* **310**: 1456-1460.
- Chiu, C. H., T. L. Wu, L. H. Su, C. Chu, J. H. Chia, A. J. Kuo, M. S. Chien & T. Y. Lin**, (2002) The emergence in Taiwan of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis. *New England Journal of Medicine* **346**: 413-419.
- Chiu, C. H., L. H. Su, C. Chu, J. H. Chia, T. L. Wu, T. Y. Lin, Y. S. Lee & J. T. Ou**, (2004) Isolation of *Salmonella enterica* serotype Choleraesuis resistant to ceftriaxone and ciprofloxacin. *Lancet* **363**: 1285-1286.
- Chiu, C. M., S. E. Manzoor, S. M. Batt, S. Muntaha, L. E. Bingle & C. M. Thomas**, (2008) Distribution of the partitioning protein KorB on the genome of IncP-1 plasmid RK2. *Plasmid* **59**: 163-175.
- Christie, P. J.**, (2001) Type IV secretion: intercellular transfer of macromolecules by systems ancestrally related to conjugation machines. *Molecular Microbiology* **40**: 294-305.
- Christie, P. J., K. Atmakuri, V. Krishnamoorthy, S. Jakubowski & E. Cascales**, (2005) Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems. *Annual Review of Microbiology* **59**: 451-485.
- Chu, C., B. Doublet, Y. L. Lee, A. Cloeckaert, C. S. Chiou, S. W. Chen, C. W. Lin & C. H. Chiu**, (2011) *Salmonella* genomic island 1-J variants associated with change in the antibiotic resistance gene cluster in multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Virchow isolated

- from humans, Taiwan, 2004-2006. *Clinical Microbiology and Infection* **accepted article**, doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03464.x.
- Cloeckaert, A., S. Baucheron, G. Flaujac, S. Schwarz, C. Kehrenberg, J. L. Martel & E. Chaslus-Dancla**, (2000a) Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 2858-2860.
- Cloeckaert, A., K. Sidi Boumedine, G. Flaujac, H. Imberechts, I. D'Hooghe & E. Chaslus-Dancla**, (2000b) Occurrence of a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104-like antibiotic resistance gene cluster including the *floR* gene in *S. enterica* serovar Agona. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1359-1361.
- Cloeckaert, A., K. Praud, B. Doublet, M. Demartin & F. X. Weill**, (2006) Variant *Salmonella* genomic island 1-L antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Newport. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**: 3944-3946.
- Cloeckaert, A., K. Praud, B. Doublet, A. Bertini, A. Carattoli, P. Butaye, H. Imberechts, S. Bertrand, J. M. Collard, G. Arlet & F. X. Weill**, (2007) Dissemination of an extended-spectrum-beta-lactamase *bla*_{TEM-52} gene-carrying IncI1 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**: 1872-1875.
- Cloeckaert, A., K. Praud, M. Lefevre, B. Doublet, M. Pardos, S. A. Granier, A. Brisabois & F. X. Weill**, (2010) IncI1 plasmid carrying extended-spectrum-beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M-1} in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003 to 2008. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**: 4484-4486.
- CNR-Salm (Centre National de Référence des Salmonella)**, (2008) Rapport d'activité 2008, <http://www.pasteur.fr/ip/portal/action/WebdriveActionEvent/oid/01s-00003k-03o>, consulté le 05/08/10.
- Collard, J. M., S. Place, O. Denis, H. Rodriguez-Villalobos, M. Vrints, F. X. Weill, S. Baucheron, A. Cloeckaert, M. Struelens & S. Bertrand**, (2007) Travel-acquired salmonellosis due to *Salmonella* Kentucky resistant to ciprofloxacin, ceftriaxone and cotrimoxazole and associated with treatment failure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **60**: 190-192.
- Couturier, M., F. Bex, P. L. Bergquist & W. K. Maas**, (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological Reviews* **52**: 375-395.
- Crellin, P. K. & J. I. Rood**, (1998) Tn4451 from *Clostridium perfringens* is a mobilizable transposon that encodes the functional Mob protein, TnpZ. *Molecular Microbiology* **27**: 631-642.
- D'Costa, V. M., K. M. McGrann, D. W. Hughes & G. D. Wright**, (2006) Sampling the antibiotic resistome. *Science* **311**: 374-377.
- Daccord, A., D. Ceccarelli & V. Burrus**, (2010) Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands. *Molecular Microbiology* **78**: 576-588.
- Dantas, G., M. O. Sommer, R. D. Oluwasegun & G. M. Church**, (2008) Bacteria subsisting on antibiotics. *Science* **320**: 100-103.
- Datsenko, K. A. & B. L. Wanner**, (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 6640-6645.
- Datta, N., R. W. Hedges, E. J. Shaw, R. B. Sykes & M. H. Richmond**, (1971) Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* **108**: 1244-1249.

- Davies, J., (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**: 375-382.
- Davies, J. & D. Davies, (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **74**: 417-433.
- Davis, M. A., D. D. Hancock & T. E. Besser, (2002) Multiresistant clones of *Salmonella enterica*: The importance of dissemination. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* **140**: 135-141.
- de la Cruz, F., L. S. Frost, R. J. Meyer & E. L. Zechner, (2010) Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **34**: 18-40.
- Delcour, A. H., (2009) Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et Biophysica Acta* **1794**: 808-816.
- DeNap, J. C. & P. J. Hergenrother, (2005) Bacterial death comes full circle: targeting plasmid replication in drug-resistant bacteria. *Organic & Biomolecular Chemistry* **3**: 959-966.
- Disque-Kochem, C. & B. Dreiseikermann, (1997) The cytoplasmic DNA-binding protein TraM binds to the inner membrane protein TraD in vitro. *Journal of Bacteriology* **179**: 6133-6137.
- Djordjevic, S. P., A. K. Cain, N. J. Evershed, L. Falconer, R. S. Levings, D. Lightfoot & R. M. Hall, (2009) Emergence and evolution of multiply antibiotic-resistant *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B D-tartrate-utilizing strains containing SGI1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 2319-2326.
- Dostal, L. & J. F. Schildbach, (2010) Single-stranded DNA binding by F TraI relaxase and helicase domains is coordinately regulated. *Journal of Bacteriology* **192**: 3620-3628.
- Doublet, B., R. Lailier, D. Meunier, A. Brisabois, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla & A. Cloeckaert, (2003) Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. *Emerging Infectious Diseases* **9**: 585-591.
- Doublet, B., P. Butaye, H. Imberechts, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla & A. Cloeckaert, (2004a) *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance gene clusters in *Salmonella enterica* serovar Agona isolated in Belgium in 1992 to 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 2510-2517.
- Doublet, B., F. X. Weill, L. Fabre, E. Chaslus-Dancla & A. Cloeckaert, (2004b) Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, *aac(3)-Id*, in *Salmonella enterica* serovar Newport. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 3806-3812.
- Doublet, B., D. Boyd, M. R. Mulvey & A. Cloeckaert, (2005) The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Molecular Microbiology* **55**: 1911-1924.
- Doublet, B., G. R. Golding, M. R. Mulvey & A. Cloeckaert, (2007) Potential integration sites of the *Salmonella* genomic island 1 in *Proteus mirabilis* and other bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**: 801-803.
- Doublet, B., G. Douard, H. Targant, D. Meunier, J. Y. Madec & A. Cloeckaert, (2008a) Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains. *Journal of Microbiological Methods* **75**: 359-361.
- Doublet, B., G. R. Golding, M. R. Mulvey & A. Cloeckaert, (2008b) Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable *Salmonella* genomic island 1. *PLoS One* **3**: e2060.

- Doublet, B., K. Praud, S. Bertrand, J. M. Collard, F. X. Weill & A. Cloeckaert**, (2008c) Novel insertion sequence- and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SGI1 of *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 3745-3754.
- Doublet, B., D. A. Boyd, G. R. Golding, M.R. Mulvey and A. Cloeckaert**, (2009). The global spread of *Salmonella* Genomic Island 1 carrying various antibiotic resistance gene clusters. In: *Molecular Biology and Molecular Epidemiology of Salmonella Infections*. J. J. Calva & E. Calva (ed). pp. 125-143.
- Doublet, B., C. Chu, C. H. Chiu, Y. C. Fan & A. Cloeckaert**, (2009a) Truncated *tni* module adjacent to the complex integron of *Salmonella* genomic island 1 in *Salmonella enterica* serovar Virchow. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 824-827.
- Doublet, B., K. Praud, F. X. Weill & A. Cloeckaert**, (2009b) Association of IS26-composite transposons and complex In4-type integrons generates novel multidrug resistance loci in *Salmonella* genomic island 1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **63**: 282-289.
- Doublet, B., L. Poirel, K. Praud, P. Nordmann & A. Cloeckaert**, (2010) European clinical isolate of *Proteus mirabilis* harbouring the *Salmonella* genomic island 1 variant SGI1-O. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **10**:2260-2262.
- Ebner, P., K. Garner & A. Mathew**, (2004) Class 1 integrons in various *Salmonella enterica* serovars isolated from animals and identification of genomic island SGI1 in *Salmonella enterica* var. Meleagridis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**: 1004-1009.
- EFSA (European Food Safety Agence)**, (2010a) The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. *EFSA Journal* **8**, <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1658.pdf>, consulté le 06/08/10.
- EFSA (European Food Safety Agence)**, (2010b) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal* **8**, <http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1496.pdf>, consulté le 06/08/10.
- Egorova, S., M. Timinouni, M. Demartin, S. A. Granier, J. M. Whichard, V. Sangal, L. Fabre, A. Delaune, M. Pardos, Y. Millemann, E. Espie, M. Achtman, P. A. Grimont & F. X. Weill**, (2008) Ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serotype Newport, France. *Emerging Infectious Diseases* **14**: 954-957.
- Elseviers, D., L. A. Petrullo & P. J. Gallagher**, (1984) Novel *E. coli* mutants deficient in biosynthesis of 5-methylaminomethyl-2-thiouridine. *Nucleic Acids Research* **12**: 3521-3534.
- Enter-net**, (2006) Enter-net quarterly Salmonella Report, January-Dec 2006, <http://www.ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/pages/enter-net.aspx>, consulté le 09/08/10.
- Errington, J., J. Bath & L. J. Wu**, (2001) DNA transport in bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **2**: 538-545.
- Fajardo, A., N. Martinez-Martin, M. Mercadillo, J. C. Galan, B. Ghysels, S. Matthijs, P. Cornelis, L. Wiehlmann, B. Tummeler, F. Baquero & J. L. Martinez**, (2008) The neglected intrinsic resistome of bacterial pathogens. *PLoS One* **3**: e1619.
- FARM (French Antimicrobial Resistance Monitoring)**, (2006) Programme français de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries d'origine animale, 2003-2004, <http://www.afssa.fr/Documents/SANT-Ra-FARM.pdf>, consulté le 03/12/2010.

- FARM (French Antimicrobial Resistance Monitoring)**, (2009) Programme français de surveillance de l'antibiorésistance des bactéries d'origine animale, 2005-2006, <http://www.afssa.fr/Documents/SANT-Ra-FARM2006.pdf>, consulté le 03/12/2010.
- Fleming, A.**, (1945) Nobel Lecture. http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/fleming-lecture.pdf, consulté le 12/07/10.
- Fluit, A. C. & F. J. Schmitz**, (2004) Resistance integrons and super-integrons. *Clinical Microbiology and Infection* **10**: 272-288.
- Foley, S. L. & A. M. Lynne**, (2008) Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *Journal of Animal Science* **86**: E173-187.
- Francia, M. V., A. Varsaki, M. P. Garcillan-Barcia, A. Latorre, C. Drainas & F. de la Cruz**, (2004) A classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids. *FEMS Microbiology Reviews* **28**: 79-100.
- Franke, A. E. & D. B. Clewell**, (1981) Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of "conjugal" transfer in the absence of a conjugative plasmid. *Journal of Bacteriology* **145**: 494-502.
- Fricke, W. F., T. J. Welch, P. F. McDermott, M. K. Mammel, J. E. LeClerc, D. G. White, T. A. Cebula & J. Ravel**, (2009) Comparative genomics of the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *Journal of Bacteriology* **191**: 4750-4757.
- Fronzes, R., E. Schafer, L. Wang, H. R. Saibil, E. V. Orlova & G. Waksman**, (2009) Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* **323**: 266-268.
- Frost, L. S., K. Ippen-Ihler & R. A. Skurray**, (1994) Analysis of the sequence and gene products of the transfer region of the F sex factor. *Microbiological Reviews* **58**: 162-210.
- Frost, L. S., R. Leplae, A. O. Summers & A. Toussaint**, (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 722-732.
- Frost, L. S. & G. Koraimann**, (2010) Regulation of bacterial conjugation: balancing opportunity with adversity. *Future Microbiology* **5**: 1057-1071.
- Gao, Q., Y. Luo & R. C. Deonier**, (1994) Initiation and termination of DNA transfer at F plasmid *oriT*. *Molecular Microbiology* **11**: 449-458.
- Garcia Fernandez, A., A. Cloeckaert, A. Bertini, K. Praud, B. Doublet, F. X. Weill & A. Carattoli**, (2007) Comparative analysis of IncHI2 plasmids carrying *bla*_{CTX-M-2} or *bla*_{CTX-M-9} from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and humans. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**: 4177-4180.
- Garcillan-Barcia, M. P., I. Bernales, M. V. Mendiola, and F. de la Cruz**, (2002) IS91 rolling-circle transposition, p. 891-904. In N. L. Craig, R. Craigie, M. Gellert, and A. M. Lambowitz (ed.), Mobile DNA II. American Society for Microbiology Press, Washington, D. C.
- Garcillan-Barcia, M. P., M. V. Francia & F. de la Cruz**, (2009) The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiology Reviews* **33**: 657-687.
- Gerding, D. N. & T. A. Larson**, (1985) Aminoglycoside resistance in gram-negative bacilli during increased amikacin use. Comparison of experience in 14 United States hospitals with experience in the Minneapolis Veterans Administration Medical Center. *American Journal of Medicine* **79**: 1-7.
- Giraud, E., A. Cloeckaert, S. Baucheron, C. Mouline & E. Chaslus-Dancla**, (2003) Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Journal of Medical Microbiology* **52**: 697-703.

- Giraud, E., S. Baucheron & A. Cloeckaert**, (2006) Resistance to fluoroquinolones in *Salmonella*: emerging mechanisms and resistance prevention strategies. *Microbes and Infection* **8**: 1937-1944.
- Girlich, D., L. Poirel, A. Carattoli, I. Kempf, M. F. Lartigue, A. Bertini & P. Nordmann**, (2007) Extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-1 in *Escherichia coli* isolates from healthy poultry in France. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 4681-4685.
- Glenn, L. M., R. L. Lindsey, J. F. Frank, R. J. Meinersmann, M. D. Englen, P. J. Fedorka-Cray & J. G. Frye**, (2011) Analysis of Antimicrobial Resistance Genes Detected in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Isolated from Food Animals. *Microbial Drug Resistance* doi:10.1089/mdr.2010.0189.
- Golding, G. R., A. B. Olson, B. Doublet, A. Cloeckaert, S. Christianson, M. R. Graham & M. R. Mulvey**, (2007) The effect of the *Salmonella* genomic island 1 on *in vitro* global gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Microbes and Infection* **9**: 21-27.
- Gomis-Ruth, F. X., F. de la Cruz & M. Coll**, (2002) Structure and role of coupling proteins in conjugal DNA transfer. *Research in Microbiology* **153**: 199-204.
- Gomis-Ruth, F. X. & M. Coll**, (2006) Cut and move: protein machinery for DNA processing in bacterial conjugation. *Current Opinion in Structural Biology* **16**: 744-752.
- Grainge, I. & M. Jayaram**, (1999) The integrase family of recombinase: organization and function of the active site. *Molecular Microbiology* **33**: 449-456.
- Grandoso, G., P. Avila, A. Cayon, M. A. Hernando, M. Llosa & F. de la Cruz**, (2000) Two active-site tyrosyl residues of protein TrwC act sequentially at the origin of transfer during plasmid R388 conjugation. *Journal of Molecular Biology* **295**: 1163-1172.
- Grindley, N. D. G.**, (2002) The movement of Tn3-like elements: Transposition and cointegrate resolution. In N. L. Craig, R. Craigien M. Gellert, and A. M. Lambowitz (ed.), *Mobile DNA II*. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Grohmann, E., G. Muth & M. Espinosa**, (2003) Conjugative plasmid transfer in Gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **67**: 277-301.
- Guiney, D. G., C. Deiss, V. Simnad, L. Yee, W. Pansegrau & E. Lanka**, (1989) Mutagenesis of the Tra1 core region of RK2 by using Tn5: identification of plasmid-specific transfer genes. *Journal of Bacteriology* **171**: 4100-4103.
- Gunell, M., M. A. Webber, P. Kotilainen, A. J. Lilly, J. M. Caddick, J. Jalava, P. Huovinen, A. Siitonen, A. J. Hakanen & L. J. Piddock**, (2009) Mechanisms of resistance in nontyphoidal *Salmonella enterica* strains exhibiting a nonclassical quinolone resistance phenotype. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 3832-3836.
- Hall, R. M. & H. W. Stokes**, (2004) Integrons or super integrons? *Microbiology* **150**: 3-4.
- Hamilton, C. M., H. Lee, P. L. Li, D. M. Cook, K. R. Piper, S. B. von Bodman, E. Lanka, W. Ream & S. K. Farrand**, (2000) TraG from RP4 and TraG and VirD4 from Ti plasmids confer relaxosome specificity to the conjugal transfer system of pTiC58. *Journal of Bacteriology* **182**: 1541-1548.
- Hancock, R. E.**, (1997) The bacterial outer membrane as a drug barrier. *Trends in Microbiology* **5**: 37-42.
- Havlickova, H., H. Hradecka, I. Bernardyova & I. Rychlik**, (2009) Distribution of integrons and SGI1 among antibiotic-resistant *Salmonella enterica* isolates of animal origin. *Veterinary Microbiology* **133**: 193-198.

- Hawkey, P. M.**, (2008) The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **62 Suppl 1**: i1-9.
- Helms, M., S. Ethelberg & K. Molbak**, (2005) International *Salmonella* Typhimurium DT104 infections, 1992-2001. *Emerging Infectious Diseases* **11**: 859-867.
- Henderson, D. & R. Meyer**, (1999) The MobA-linked primase is the only replication protein of R1162 required for conjugal mobilization. *Journal of Bacteriology* **181**: 2973-2978.
- Hinerfeld, D. & G. Churchward**, (2001) Specific binding of integrase to the origin of transfer (*oriT*) of the conjugative transposon Tn916. *Journal of Bacteriology* **183**: 2947-2951.
- Hochhut, B., J. Marrero & M. K. Waldor**, (2000) Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in *Vibrio cholerae* O139. *Journal of Bacteriology* **182**: 2043-2047.
- Hopkins, K. L., M. Kirchner, B. Guerra, S. A. Granier, C. Lucarelli, M. C. Porrero, A. Jakubczak, E. J. Threlfall & D. J. Mevius**, (2010) Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Eurosurveillance* **15**: 19580.
- Howard, M. T., W. C. Nelson & S. W. Matson**, (1995) Stepwise assembly of a relaxosome at the F plasmid origin of transfer. *The Journal of biological chemistry* **270**: 28381-28386.
- Inamoto, S., H. Fukuda, T. Abo & E. Ohtsubo**, (1994) Site- and strand-specific nicking at *oriT* of plasmid R100 in a purified system: enhancement of the nicking activity of TraI (helicase I) with TraY and IHF. *Journal of Biochemistry* **116**: 838-844.
- InVS (Institut de Veille Sanitaire)**, (2009) Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2008. http://www.invs.sante.fr/surveillance/tiac/donnees_2008/tiac_donnees_2008.pdf, consulté le 05/08/10
- Jaworski, D. D. & D. B. Clewell**, (1995) A functional origin of transfer (*oriT*) on the conjugative transposon Tn916. *Journal of Bacteriology* **177**: 6644-6651.
- Jeters, R. T., G. R. Wang, K. Moon, N. B. Shoemaker & A. A. Salyers**, (2009) Tetracycline-associated transcriptional regulation of transfer genes of the *Bacteroides* conjugative transposon CTnDOT. *Journal of Bacteriology* **191**: 6374-6382.
- Juhas, M., J. R. van der Meer, M. Gaillard, R. M. Harding, D. W. Hood & D. W. Crook**, (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiology Reviews* **33**: 376-393.
- Jurik, A., E. Hausser, S. Kutter, I. Pattis, S. Prassl, E. Weiss & W. Fischer**, (2010) The coupling protein Cagbeta and its interaction partner CagZ are required for type IV secretion of the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Infection and Immunity* **78**: 5244-5251.
- Kado, C. I.**, (1994) Promiscuous DNA transfer system of *Agrobacterium tumefaciens*: role of the *virB* operon in sex pilus assembly and synthesis. *Molecular Microbiology* **12**: 17-22.
- Karl, W., M. Bamberger & E. L. Zechner**, (2001) Transfer protein TraY of plasmid R1 stimulates TraI-catalyzed *oriT* cleavage *in vivo*. *Journal of Bacteriology* **183**: 909-914.
- Kellogg, C. A. & D. W. Griffin**, (2006) Aerobiology and the global transport of desert dust. *Trends in Ecology & Evolution* **21**: 638-644.
- Khemtong, S. & R. Chuanchuen**, (2008) Class 1 integrons and *Salmonella* genomic island 1 among *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine. *Microbial Drug Resistance* **14**: 65-70.
- Kim, S., S. H. Kim, J. Kim, J. H. Shin, B. K. Lee & M. S. Park**, (2011) Occurrence and distribution of various genetic structures of class 1 and class 2 integrons in *Salmonella enterica* isolates from foodborne disease patients in Korea for 16 years. *Foodborne Pathogens Disease* **8**: 319-324.

- Kostelidou, K. & C. M. Thomas**, (2000) The hierarchy of KorB binding at its 12 binding sites on the broad-host-range plasmid RK2 and modulation of this binding by IncC1 protein. *Journal of Molecular Biology* **295**: 411-422.
- Kumar, A. & H. P. Schweizer**, (2005) Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Advanced Drug Delivery Review* **57**: 1486-1513.
- Kumarasamy, K. K., M. A. Toleman, T. R. Walsh, J. Bagaria, F. Butt, R. Balakrishnan, U. Chaudhary, M. Doumith, C. G. Giske, S. Irfan, P. Krishnan, A. V. Kumar, S. Maharjan, S. Mushtaq, T. Noorie, D. L. Paterson, A. Pearson, C. Perry, R. Pike, B. Rao, U. Ray, J. B. Sarma, M. Sharma, E. Sheridan, M. A. Thirunarayan, J. Turton, S. Upadhyay, M. Warner, W. Welfare, D. M. Livermore & N. Woodford**, (2010) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet Infectious Diseases* **10**(9):597-602.
- Lanka, E. & B. M. Wilkins**, (1995) DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annual Review of Biochemistry* **64**: 141-169.
- Larsen, T. S. & A. Krogh**, (2003) EasyGene--a prokaryotic gene finder that ranks ORFs by statistical significance. *BMC Bioinformatics* **4**: 21.
- Lawley, T. D., W. A. Klimke, M. J. Gubbins & L. S. Frost**, (2003) F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiology Letters* **224**: 1-15.
- Lawley, T. D., B. M. Wilkins and L. S. Frost**, (2004) Bacterial Conjugation in Gram-Negative Bacteria. In: Plasmid Biology. B. E. F. a. G. J. Phillips (ed). Washington, D. C.: ASM press, pp. 203-226.
- Lederberg, J. & E. L. Tatum**, (1946) Gene recombination in *Escherichia coli*. *Nature* **158**: 558.
- Lee, C. A. & A. D. Grossman**, (2007) Identification of the origin of transfer (*oriT*) and DNA relaxase required for conjugation of the integrative and conjugative element ICEBs1 of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **189**: 7254-7261.
- Lessl, M., D. Balzer, K. Weyrauch & E. Lanka**, (1993) The mating pair formation system of plasmid RP4 defined by RSF1010 mobilization and donor-specific phage propagation. *Journal of Bacteriology* **175**: 6415-6425.
- Levings, R. S., D. Lightfoot, S. R. Partridge, R. M. Hall & S. P. Djordjevic**, (2005) The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. *Journal of Bacteriology* **187**: 4401-4409.
- Levings, R. S., S. R. Partridge, S. P. Djordjevic & R. M. Hall**, (2007) SGI1-K, a variant of the SGI1 genomic island carrying a mercury resistance region, in *Salmonella enterica* serovar Kentucky. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **51**: 317-323.
- Levings, R. S., S. P. Djordjevic & R. M. Hall**, (2008) SGI2, a relative of *Salmonella* genomic island SGI1 with an independent origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 2529-2537.
- Li, Z., H. Hiasa, U. Kumar & R. J. DiGate**, (1997) The *traE* gene of plasmid RP4 encodes a homologue of *Escherichia coli* DNA topoisomerase III. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 19582-19587.
- Linares, J. F., I. Gustafsson, F. Baquero & J. L. Martinez**, (2006) Antibiotics as intermicrobial signaling agents instead of weapons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 19484-19489.

- Lindsey, R. L., P. J. Fedorka-Cray, J. G. Frye & R. J. Meinersmann**, (2009) Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 1908-1915.
- Livermore, D. M., R. Reynolds, P. Stephens, G. Duckworth, D. Felmingham, A. P. Johnson, S. Murchan, O. Murphy, U. Gungabissoon, P. Waight, R. Pebody, J. Shackcloth, M. Warner, L. Williams & R. C. George**, (2006) Trends in penicillin and macrolide resistance among pneumococci in the UK and the Republic of Ireland in relation to antibiotic sales to pharmacies and dispensing doctors. *International Journal of Antimicrobial Agents* **28**: 273-279.
- Llosa, M., F. X. Gomis-Ruth, M. Coll & F. de la Cruz Fd**, (2002) Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Molecular Microbiology* **45**: 1-8.
- Llosa, M., S. Zunzunegui & F. de la Cruz**, (2003) Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous VirB10-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 10465-10470.
- Lu, J., J. J. Wong, R. A. Edwards, J. Manchak, L. S. Frost & J. N. Glover**, (2008) Structural basis of specific TraD-TraM recognition during F plasmid-mediated bacterial conjugation. *Molecular Microbiology* **70**: 89-99.
- Lu, J., A. den Dulk-Ras, P. J. Hooykaas & J. N. Glover**, (2009) *Agrobacterium tumefaciens* VirC2 enhances T-DNA transfer and virulence through its C-terminal ribbon-helix-helix DNA-binding fold. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 9643-9648.
- Lukashin, A. V. & M. Borodovsky**, (1998) GeneMark.hmm: new solutions for gene finding. *Nucleic Acids Research* **26**: 1107-1115.
- M'Zali, F. H., J. Heritage, D. M. Gascoyne-Binzi, M. Denton, N. J. Todd & P. M. Hawkey**, (1997) Transcontinental importation into the UK of *Escherichia coli* expressing a plasmid-mediated AmpC-type beta-lactamase exposed during an outbreak of SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase in a Leeds hospital. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **40**: 823-831.
- MacPherson, D. W., B. D. Gushulak, W. B. Baine, S. Bala, P. O. Gubbins, P. Holtom & M. Segarra-Newnham**, (2009) Population mobility, globalization, and antimicrobial drug resistance. *Emerging Infectious Diseases* **15**: 1727-1732.
- Mahillon, J. & M. Chandler**, (1998) Insertion sequences. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**: 725-774.
- Majowicz, S. E., J. Musto, E. Scallan, F. J. Angulo, M. Kirk, S. J. O'Brien, T. F. Jones, A. Fazil & R. M. Hoekstra**, (2010) The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases* **50**: 882-889.
- Malcova, M., H. Hradecka, R. Karpiskova & I. Rychlik**, (2008) Biofilm formation in field strains of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: identification of a new colony morphology type and the role of SGI1 in biofilm formation. *Veterinary Microbiology* **129**: 360-366.
- Marraffini, L. A. & E. J. Sontheimer**, (2008) CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**: 1843-1845.
- Marrero, J. & M. K. Waldor**, (2007) Determinants of entry exclusion within Eex and TraG are cytoplasmic. *Journal of Bacteriology* **189**: 6469-6473.
- Marshall, C. G., I. A. Lessard, I. Park & G. D. Wright**, (1998) Glycopeptide antibiotic resistance genes in glycopeptide-producing organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**: 2215-2220.

- Martinez-Martinez, L., A. Pascual & G. A. Jacoby**, (1998) Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet* **351**: 797-799.
- Martinez, J. L. & F. Baquero**, (2000) Mutation frequencies and antibiotic resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 1771-1777.
- Martinez, J. L.**, (2008) Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* **321**: 365-367.
- Matson, S. W., J. K. Sampson & D. R. Byrd**, (2001) F plasmid conjugative DNA transfer: the TraI helicase activity is essential for DNA strand transfer. *Journal of Biological Chemistry* **276**: 2372-2379.
- Mazel, D.**, (2006) Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology* **4**: 608-620.
- Meakins, S., I. S. Fisher, C. Berghold, P. Gerner-Smidt, H. Tschape, M. Cormican, I. Luzzi, F. Schneider, W. Wannett, J. Coia, A. Echeita & E. J. Threlfall**, (2008) Antimicrobial drug resistance in human nontyphoidal *Salmonella* isolates in Europe 2000-2004: a report from the Enter-net International Surveillance Network. *Microbial Drug Resistance* **14**: 31-35.
- Mendiola, M. V., I. Bernales & F. de la Cruz**, (1994) Differential roles of the transposon termini in IS91 transposition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**: 1922-1926.
- Meunier, D., D. Boyd, M. R. Mulvey, S. Baucheron, C. Mammina, A. Nastasi, E. Chaslus-Dancla & A. Cloeckaert**, (2002) *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT 104 antibiotic resistance genomic island I in serotype paratyphi B. *Emerging Infectious Diseases* **8**: 430-433.
- Meunier, D., E. Jouy, C. Lazizzera, B. Doublet, M. Kobisch, A. Cloeckaert & J. Y. Madec**, (2010) Plasmid-borne florfenicol and ceftiofur resistance encoded by the *floR* and *bla_{CMY-2}* genes in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle in France. *Journal of Medical Microbiology* **59**: 467-471.
- Meyer, R.**, (2009) The r1162 Mob proteins can promote conjugative transfer from cryptic origins in the bacterial chromosome. *Journal of Bacteriology* **191**: 1574-1580.
- Middleton, R., K. Sjolander, N. Krishnamurthy, J. Foley & P. Zambryski**, (2005) Predicted hexameric structure of the *Agrobacterium* VirB4 C terminus suggests VirB4 acts as a docking site during type IV secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 1685-1690.
- Miriagou, V., P. T. Tassios, N. J. Legakis & L. S. Tzouvelekis**, (2004) Expanded-spectrum cephalosporin resistance in non-typhoid *Salmonella*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **23**: 547-555.
- Miyazaki, R. & J. R. Van der Meer**, (2011) A dual functional origin of transfer in the ICE_{clc} genomic island of *Pseudomonas knackmussii* B13. *Molecular Microbiology* doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07484.x.
- Moellering, R. C., Jr.**, (2010) NDM-1--a cause for worldwide concern. *New England Journal of Medicine* **363**: 2377-2379.
- Molbak, K., D. L. Baggesen, F. M. Aarestrup, J. M. Ebbesen, J. Engberg, K. Frydendahl, P. Gerner-Smidt, A. M. Petersen & H. C. Wegener**, (1999) An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *New England Journal of Medicine* **341**: 1420-1425.

- Moncalian, G., G. Grandoso, M. Llosa & F. de la Cruz**, (1997) *oriT*-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. *Journal of Molecular Biology* **270**: 188-200.
- Moncalian, G., E. Cabezon, I. Alkorta, M. Valle, F. Moro, J. M. Valpuesta, F. M. Goni & F. de La Cruz**, (1999a) Characterization of ATP and DNA binding activities of TrwB, the coupling protein essential in plasmid R388 conjugation. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 36117-36124.
- Moncalian, G., M. Valle, J. M. Valpuesta & F. de la Cruz**, (1999b) IHF protein inhibits cleavage but not assembly of plasmid R388 relaxosomes. *Molecular Microbiology* **31**: 1643-1652.
- Moncalian, G. & F. de la Cruz**, (2004) DNA binding properties of protein TrwA, a possible structural variant of the Arc repressor superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta* **1701**: 15-23.
- Motallebi-Veshareh, M., D. Balzer, E. Lanka, G. Jagura-Burdzy & C. M. Thomas**, (1992) Conjugative transfer functions of broad-host-range plasmid RK2 are coregulated with vegetative replication. *Molecular Microbiology* **6**: 907-920.
- Mulvey, M. R., D. A. Boyd, A. B. Olson, B. Doublet & A. Cloeckaert**, (2006) The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes and Infection* **8**: 1915-1922.
- Murphy, C. G. & M. H. Malamy**, (1993) Characterization of a "mobilization cassette" in transposon Tn4399 from *Bacteroides fragilis*. *Journal of Bacteriology* **175**: 5814-5823.
- Nelson, W. C., M. T. Howard, J. A. Sherman & S. W. Matson**, (1995) The *traY* gene product and integration host factor stimulate *Escherichia coli* DNA helicase I-catalyzed nicking at the F plasmid *oriT*. *Journal of Biological Chemistry* **270**: 28374-28380.
- Neuwald, A. F., L. Aravind, J. L. Spouge & E. V. Koonin**, (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Research* **9**: 27-43.
- Nielsen, E. M., M. Torpdahl, S. Ethelberg & A. M. Hammerum**, (2009) Variation in Antimicrobial resistance in sporadic and outbreak-related *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Emerging Infectious Diseases* **15**: 101-103.
- Nordmann, P., L. Poirel, J. K. Mak, P. A. White, C. J. McIver & P. Taylor**, (2008) Multidrug-resistant *Salmonella* strains expressing emerging antibiotic resistance determinants. *Clinical Infectious Diseases* **46**: 324-325.
- Novick, R. P.**, (1987) Plasmid incompatibility. *Microbiological Reviews* **51**: 381-395.
- Nunez, B. & F. De La Cruz**, (2001) Two atypical mobilization proteins are involved in plasmid CloDF13 relaxation. *Molecular Microbiology* **39**: 1088-1099.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé)**, (2000) Overcoming Antimicrobial Resistance. *World Health Organization Report in Infectious Diseases*. <http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/index.html>, consulté le 27/07/10.
- OMS (Organisation Mondiale de la Santé)**, (2007) Rapport sur la santé dans le monde 2007 : un avenir plus sûr. La sécurité sanitaire mondiale au XXI^e siècle. http://www.who.int/whr/2007/07_report_fr.pdf, consulté le 03/12/2010.
- Pansegrau, W., D. Balzer, V. Kruft, R. Lurz & E. Lanka**, (1990) *In vitro* assembly of relaxosomes at the transfer origin of plasmid RP4. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 6555-6559.
- Pansegrau, W., W. Schroder & E. Lanka**, (1994) Concerted action of three distinct domains in the DNA cleaving-joining reaction catalyzed by relaxase (TraI) of conjugative plasmid RP4. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 2782-2789.

- Parker, C., E. Becker, X. Zhang, S. Jandle & R. Meyer**, (2005) Elements in the co-evolution of relaxases and their origins of transfer. *Plasmid* **53**: 113-118.
- Parry, C. M. & E. J. Threlfall**, (2008) Antimicrobial resistance in typhoidal and nontyphoidal salmonellae. *Current Opinion in Infectious Diseases* **21**: 531-538.
- Parsons, J. A., T. L. Bannam, R. J. Devenish & J. I. Rood**, (2007) TcpA, an FtsK/SpoIIIE homolog, is essential for transfer of the conjugative plasmid pCW3 in *Clostridium perfringens*. *Journal of Bacteriology* **189**: 7782-7790.
- Partridge, S. R. & R. M. Hall**, (2003) In34, a complex In5 family class 1 integron containing *orf513* and *dfrA10*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **47**: 342-349.
- Partridge, S. R., G. Tsafnat, E. Coiera & J. R. Iredell**, (2009) Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiology Reviews* **33**: 757-784.
- PHLS (Public Health Laboratory Service)**, (1997) Investigating *Salmonella* Typhimurium DT104 infections. *Communicable Disease Report (London: England Review)* **7**: 137-144.
- Piddock, L. J., K. Whale & R. Wise**, (1990) Quinolone resistance in *Salmonella*: clinical experience. *Lancet* **335**: 1459.
- Piddock, L. J.**, (1999) Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs* **58 Suppl 2**: 11-18.
- Plough, H. H.**, (1945) Penicillin resistance of *Staphylococcus aureus* and its clinical implications. *American Journal of Clinical Pathology* **15**: 446-451.
- Poirel, L., S. Marque, C. Heritier, C. Segonds, G. Chabanon & P. Nordmann**, (2005) OXA-58, a novel class D β -lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 202-208.
- Polzleitner, E., E. L. Zechner, W. Renner, R. Fratte, B. Jauk, G. Hogenauer & G. Koraimann**, (1997) TraM of plasmid R1 controls transfer gene expression as an integrated control element in a complex regulatory network. *Molecular Microbiology* **25**: 495-507.
- Poole, K.**, (2004) Efflux-mediated multiresistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection* **10**: 12-26.
- Poole, T. L., T. S. Edrington, D. M. Brichta-Harhay, A. Carattoli, R. C. Anderson & D. J. Nisbet**, (2009) Conjugative transferability of the A/C plasmids from *Salmonella enterica* isolates that possess or lack *bla*(CMY) in the A/C plasmid backbone. *Foodborne Pathogen Diseases* **6**: 1185-1194.
- Recchia, G. D. & R. M. Hall**, (1995) Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* **141** (Pt 12): 3015-3027.
- Rhodes, G., G. Huys, J. Swings, P. McGann, M. Hiney, P. Smith & R. W. Pickup**, (2000) Distribution of oxytetracycline resistance plasmids between aeromonads in hospital and aquaculture environments: implication of Tn1721 in dissemination of the tetracycline resistance determinant *tet A*. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 3883-3890.
- Rice, P., I. Longden & A. Bleasby**, (2000) EMBL: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics* **16**: 276-277.
- Robicsek, A., J. Strahilevitz, G. A. Jacoby, M. Macielag, D. Abbanat, C. H. Park, K. Bush & D. C. Hooper**, (2006) Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside acetyltransferase. *Nature Medicine* **12**: 83-88.
- Rocco, J. M. & G. Churchward**, (2006) The integrase of the conjugative transposon Tn916 directs strand- and sequence-specific cleavage of the origin of conjugal transfer, *oriT*, by the endonuclease Orf20. *Journal of Bacteriology* **188**: 2207-2213.

- Roussel, A. F. & Y. A. Chabbert**, (1978) Taxonomy and epidemiology of Gram-negative bacterial plasmids studied by DNA-DNA filter hybridization in formamide. *Journal of General Microbiology* **104**: 269-276.
- Ruiz-Palacios, G. M., S. Ponce de Leon, J. Sifuentes, S. Ponce de Leon, J. J. Calva, F. Huazano, C. Ontiveros, F. Ojeda & M. Bobadilla**, (1986) Control of emergence of multi-resistant Gram-negative bacilli by exclusive use of amikacin. *American Journal of Medicine* **80**: 71-75.
- Salyers, A. A., N. B. Shoemaker, A. M. Stevens & L. Y. Li**, (1995) Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiological Reviews* **59**: 579-590.
- Schandel, K. A., M. M. Muller & R. E. Webster**, (1992) Localization of TraC, a protein involved in assembly of the F conjugative pilus. *Journal of Bacteriology* **174**: 3800-3806.
- Scherzinger, E., R. Lurz, S. Otto & B. Dobrinski**, (1992) *In vitro* cleavage of double- and single-stranded DNA by plasmid RSF1010-encoded mobilization proteins. *Nucleic Acids Research* **20**: 41-48.
- Schleinitz, K. M., T. Vallaey & S. Kleinstaub**, (2010) Structural characterisation of ISCR8, ISCR22 and ISCR23, subgroups of IS91-like insertion elements. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**(10):4321-4328.
- Schroder, G., S. Krause, E. L. Zechner, B. Traxler, H. J. Yeo, R. Lurz, G. Waksman & E. Lanka**, (2002) TraG-like proteins of DNA transfer systems and of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system: inner membrane gate for exported substrates? *Journal of Bacteriology* **184**: 2767-2779.
- Schwarz, S. & E. Chaslus-Dancla**, (2001) Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research* **32**: 201-225.
- Schwarz, S., C. Kehrenberg & T. R. Walsh**, (2001) Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents* **17**: 431-437.
- Segura, P. A., M. Francois, C. Gagnon & S. Sauve**, (2009) Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters. *Environmental Health Perspectives* **117**: 675-684.
- Selvaratnam, S. & M. A. Gealt**, (1993) Transcription of ColE1Ap *mbeC* induced by conjugative plasmids from twelve different incompatibility groups. *Journal of Bacteriology* **175**: 6982-6987.
- Serna, A., E. Espinosa, E. M. Camacho & J. Casades**, (2010) Regulation of bacterial conjugation in microaerobiosis by host-encoded functions ArcAB and *sdhABCD*. *Genetics* **184**: 947-958.
- Sherburne, C. K., T. D. Lawley, M. W. Gilmour, F. R. Blattner, V. Burland, E. Grotbeck, D. J. Rose & D. E. Taylor**, (2000) The complete DNA sequence and analysis of R27, a large IncHI plasmid from *Salmonella* Typhi that is temperature sensitive for transfer. *Nucleic Acids Research* **28**: 2177-2186.
- Soussy, C. J., R. Bonnet, J. D. Cavallo, H. Chardon, C. Chidiac, P. Courvalin, H. Dabernat, H. Drugeon, L. Dubreuil, B. Guery, V. Jarlier, F. Jehl, T. Lambert, R. Leclercq, M. H. Nicolas-Chanoine, P. Plesiat, C. Quentin, B. Rouveix, E. Varon & P. Weber**, (2010) Comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie - Recommandations 2010. http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/file/casfm_2010.pdf, consulté le 07/03/11.
- Stallions, D. R. & R. Curtiss, 3rd**, (1972) Bacterial conjugation under anaerobic conditions. *Journal of Bacteriology* **111**: 294-295.

- Stokes, H. W., C. Tomaras, Y. Parsons & R. M. Hall**, (1993) The partial 3'-conserved segment duplications in the integrons In6 from pSa and In7 from pDGO100 have a common origin. *Plasmid* **30**: 39-50.
- Strahilevitz, J., G. A. Jacoby, D. C. Hooper & A. Robicsek**, (2009) Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical Microbiology Reviews* **22**: 664-689.
- Street, L. M., M. J. Harley, J. C. Stern, C. Larkin, S. L. Williams, D. L. Miller, J. A. Dohm, M. E. Rodgers & J. F. Schildbach**, (2003) Subdomain organization and catalytic residues of the F factor TraI relaxase domain. *Biochimica et Biophysica Acta* **1646**: 86-99.
- Szpirer, C. Y., M. Faalen & M. Couturier**, (2000) Interaction between the RP4 coupling protein TraG and the pBHR1 mobilization protein Mob. *Molecular Microbiology* **37**: 1283-1292.
- Szpirer, C. Y., M. Faalen & M. Couturier**, (2001) Mobilization function of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1. *Journal of Bacteriology* **183**: 2101-2110.
- Targant, H., B. Doublet, F. M. Aarestrup, A. Cloeckert & J. Y. Madec**, (2010) IS6100-mediated genetic rearrangement within the complex class 1 integron In104 of the *Salmonella* genomic island 1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**: 1543-1545.
- Tato, I., S. Zunzunegui, F. de la Cruz & E. Cabezon**, (2005) TrwB, the coupling protein involved in DNA transport during bacterial conjugation, is a DNA-dependent ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 8156-8161.
- Tavakoli, N., A. Comanducci, H. M. Dodd, M. C. Lett, B. Albiger & P. Bennett**, (2000) IS1294, a DNA element that transposes by RC transposition. *Plasmid* **44**: 66-84.
- Tennstedt, T., R. Szczepanowski, I. Krahn, A. Puhler & A. Schluter**, (2005) Sequence of the 68,869 bp IncP-1alpha plasmid pTB11 from a waste-water treatment plant reveals a highly conserved backbone, a Tn402-like integron and other transposable elements. *Plasmid* **53**: 218-238.
- Thomas, C. M. & K. M. Nielsen**, (2005) Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nature Reviews Microbiology* **3**: 711-721.
- Threlfall, E. J.**, (2000) Epidemic *salmonella* Typhimurium DT 104--a truly international multiresistant clone. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**: 7-10.
- Threlfall, E. J.**, (2002) Antimicrobial drug resistance in *Salmonella*: problems and perspectives in food- and water-borne infections. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 141-148.
- Toleman, M. A., P. M. Bennett & T. R. Walsh**, (2006) ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **70**: 296-316.
- Tsvetkova, K., J. C. Marvaud & T. Lambert**, (2010) Analysis of the mobilization functions of the vancomycin resistance transposon Tn1549, a member of a new family of conjugative elements. *Journal of Bacteriology* **192**: 702-713.
- Vedantam, G., S. Knopf & D. W. Hecht**, (2006) *Bacteroides fragilis* mobilizable transposon Tn5520 requires a 71 base pair origin of transfer sequence and a single mobilization protein for relaxosome formation during conjugation. *Molecular Microbiology* **59**: 288-300.
- Vo, A. T., E. van Duijkeren, A. C. Fluit, W. J. Wannet, A. J. Verbruggen, H. M. Maas & W. Gaastra**, (2006) Antibiotic resistance, integrons and *Salmonella* genomic island 1 among non-typhoidal *Salmonella* serovars in The Netherlands. *International Journal of Antimicrobial Agents* **28**: 172-179.
- Vo, A. T., E. van Duijkeren, A. C. Fluit & W. Gaastra**, (2007) A novel *Salmonella* genomic island 1 and rare integron types in *Salmonella* Typhimurium isolates from horses in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**: 594-599.

- Vo, A. T., E. van Duijkeren, W. Gaastra & A. C. Fluit**, (2010) Antimicrobial resistance, class 1 integrons, and genomic island 1 in *Salmonella* isolates from Vietnam. *PLoS One* **5**: e9440.
- Vogel, J. P., H. L. Andrews, S. K. Wong & R. R. Isberg**, (1998) Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* **279**: 873-876.
- Waldor, M. K.**, (2010) Mobilizable genomic islands: going mobile with *oriT* mimicry. *Molecular Microbiology* **78**: 537-540.
- Wallden, K., A. Rivera-Calzada & G. Waksman**, (2010) Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cellular Microbiology* **12**: 1203-1212.
- Walsh, T. R.**, (2006) Combinatorial genetic evolution of multiresistance. *Current Opinion in Microbiology* **9**: 476-482.
- Wang, H., A. P. Roberts & P. Mullany**, (2000) DNA sequence of the insertional hot spot of Tn916 in the *Clostridium difficile* genome and discovery of a Tn916-like element in an environmental isolate integrated in the same hot spot. *FEMS Microbiology Letters* **192**: 15-20.
- Wannaprasat, W., P. Padungtod & R. Chuanchuen**, (2011) Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. *International Journal of Antimicrobial Agents* **37**(5):457-461.
- Warren, R. E., V. M. Ensor, P. O'Neill, V. Butler, J. Taylor, K. Nye, M. Harvey, D. M. Livermore, N. Woodford & P. M. Hawkey**, (2008) Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**: 504-508.
- Waters, V. L. & D. G. Guiney**, (1993) Processes at the nick region link conjugation, T-DNA transfer and rolling circle replication. *Molecular Microbiology* **9**: 1123-1130.
- Waters, V. L.**, (2001) Conjugation between bacterial and mammalian cells. *Nature Genetics* **29**: 375-376.
- Webber, M. A. & L. J. Piddock**, (2003) The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **51**: 9-11.
- Weigel, L. M., D. B. Clewell, S. R. Gill, N. C. Clark, L. K. McDougal, S. E. Flannagan, J. F. Kolonay, J. Shetty, G. E. Killgore & F. C. Tenover**, (2003) Genetic analysis of a high-level vancomycin-resistant isolate of *Staphylococcus aureus*. *Science* **302**: 1569-1571.
- Weill, F. X., R. Lailier, K. Praud, A. Kerouanton, L. Fabre, A. Brisabois, P. A. Grimont & A. Cloeckaert**, (2004) Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. *Journal of Clinical Microbiology* **42**: 5767-5773.
- Weill, F. X., L. Fabre, B. Grandry, P. A. Grimont & I. Casin**, (2005) Multiple-antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serotype Paratyphi B isolates collected in France between 2000 and 2003 is due mainly to strains harboring *Salmonella* genomic islands 1, 1-B, and 1-C. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**: 2793-2801.
- Welch, T. J., W. F. Fricke, P. F. McDermott, D. G. White, M. L. Rosso, D. A. Rasko, M. K. Mammel, M. Eppinger, M. J. Rosovitz, D. Wagner, L. Rahalison, J. E. Leclerc, J. M. Hinshaw, L. E. Lindler, T. A. Cebula, E. Carniel & J. Ravel**, (2007) Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. *PLoS One* **2**: e309.
- Will, W. R., J. Lu & L. S. Frost**, (2004) The role of H-NS in silencing F transfer gene expression during entry into stationary phase. *Molecular Microbiology* **54**: 769-782.
- Willetts, N.**, (1980) Interactions between the F conjugal transfer system and CloDF13::Tna plasmids. *Molecular and General Genetics* **180**: 213-217.

- Willetts, N. & C. Crowther**, (1981) Mobilization of the non-conjugative IncQ plasmid RSF1010. *Genetical Research* **37**: 311-316.
- Willetts, N. & B. Wilkins**, (1984) Processing of plasmid DNA during bacterial conjugation. *Microbiological Reviews* **48**: 24-41.
- Williams, S. L. & J. F. Schildbach**, (2007) TraY and integration host factor *oriT* binding sites and F conjugal transfer: sequence variations, but not altered spacing, are tolerated. *Journal of Bacteriology* **189**: 3813-3823.
- Wilson, N. L. & R. M. Hall**, (2010) Unusual class 1 integron configuration found in *Salmonella* genomic island 2 from *Salmonella enterica* serovar Emek. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**: 513-516.
- Witchitz, J. L. & Y. A. Chabbert**, (1971) Résistance transférable à la gentamicine. *Annales de l'Institut Pasteur* **121**: 733-742.
- Wozniak, R. A., D. E. Fouts, M. Spagnoletti, M. M. Colombo, D. Ceccarelli, G. Garriss, C. Dery, V. Burrus & M. K. Waldor**, (2009) Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genetics* **5**: e1000786.
- Wozniak, R. A. & M. K. Waldor**, (2010) Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature Reviews Microbiology* **8**: 552-563.
- Wright, G. D.**, (2005) Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews* **57**: 1451-1470.
- Xiong, N., M. T. Brewer, T. A. Day, M. J. Kimber, A. E. Barnhill & S. A. Carlson**, (2011) Evaluation of the pathogenicity and virulence of three strains of *Salmonella* organisms in calves and pigs. *American Journal of Veterinary Research* **71**: 1170-1177.
- Yim, G., F. de la Cruz, G. B. Spiegelman & J. Davies**, (2006) Transcription modulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promoters by sub-MIC levels of rifampin. *Journal of Bacteriology* **188**: 7988-7991.
- Yong, D., M. A. Toleman, C. G. Giske, H. S. Cho, K. Sundman, K. Lee & T. R. Walsh**, (2009) Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **53**: 5046-5054.
- Zahrl, D., M. Wagner, K. Bischof, M. Bayer, B. Zavec, A. Beranek, C. Ruckstuhl, G. E. Zarfel & G. Koraimann**, (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* **151**: 3455-3467.
- Zhang, S. & R. J. Meyer**, (1995) Localized denaturation of *oriT* DNA within relaxosomes of the broad-host-range plasmid R1162. *Molecular Microbiology* **17**: 727-735.
- Zuker, M.**, (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* **31**: 3406-3415.

ANNEXE

Annexe 1 :
Sérotypes de *Salmonella* et variants
de l'îlot génomique SGI1 associés

Espèces	Sérotypes	Variants	Profils de résistance ^a	Références
<i>S. enterica</i>	[4,12]	SGI1-B	ASu	Havlickova <i>et al.</i> , 2009
	Agona	SGI1	ACSSuT	Boyd <i>et al.</i> , 2001
		SGI1-A	ACSSuTTm	Boyd <i>et al.</i> , 2002
		SGI1-C	SSu	Boyd <i>et al.</i> , 2002
		SGI1-D	SSuTm	Boyd <i>et al.</i> , 2002
		SGI1-G	ASuTm	Doublet <i>et al.</i> , 2004a
	Albany	SGI1-F	ACSuTTm	Doublet <i>et al.</i> , 2003
		SGI1-G	ASuTm	Wannaprasat <i>et al.</i> , 2011
	Anatum	SGI1	ACSSuT	Anjum <i>et al.</i> , 2011
	Cerro	SGI1-F	ACSuTTm	Levings <i>et al.</i> , 2005
	Choleraesuis	SGI1	ACSSuT	Xiong <i>et al.</i> , 2011
	Derby	SGI1	ACSSuT	Vo <i>et al.</i> , 2006
		SGI1-A	ACSSuTTm	Akiba <i>et al.</i> , 2006
		SGI1-C	SSu	Akiba <i>et al.</i> , 2006
		SGI1-I	CSSuTTm	Levings <i>et al.</i> , 2005
	Dublin	SGI1	ACSSuT	Xiong <i>et al.</i> , 2011
	Düsseldorf	SGI1-F	ACSuTTm	Levings <i>et al.</i> , 2005
	Emek	SGI1-F	ACSuTTm	Khemtong <i>et al.</i> , 2008
		SGI1-J1/SGI2	CSuTTm	Levings <i>et al.</i> , 2005 ; Levings <i>et al.</i> , 2008
		SGI1-J2/SGI2-A	SuTm	Levings <i>et al.</i> , 2005 ; Levings <i>et al.</i> , 2008
		SGI1-J3	CSuTTm	Vo <i>et al.</i> , 2010
	Haifa	SGI1-H	ACGSSuT	Doublet <i>et al.</i> , 2009
	Infantis	SGI1-D	SSuTm	Levings <i>et al.</i> , 2005
	Kedougou	SGI1-F	ACSuTTm	Khemtong <i>et al.</i> , 2008

Suite du tableau page suivante

Espèces	Sérotypes	Variants	Profils de résistance ^a	Références
<i>S. enterica</i>	Kentucky	SGI1-K1	AGSSuT	Levings <i>et al.</i> , 2007
		SGI1-K2	ASSuT	Doublet <i>et al.</i> , 2008c
		SGI1-K3	AGSSuT	Doublet <i>et al.</i> , 2008c
		SGI1-K4	GSSuT	Doublet <i>et al.</i> , 2008c
		SGI1-K5	GSSu	Doublet <i>et al.</i> , 2008c
		SGI1-P1	A	Doublet <i>et al.</i> , 2008c
		SGI1-P2	A	Doublet <i>et al.</i> , 2008c
		SGI1-Q1	Ø	Doublet <i>et al.</i> , 2008c
		SGI1-Q2	Ø	Doublet <i>et al.</i> , 2008c
		SGI1-Q3	Ø	Doublet <i>et al.</i> , 2008c
	Kiambu	SGI1-A	ACSSuTTm	Levings <i>et al.</i> , 2005
	Kingston	SGI1-A	ACSSuTTm	Khemtong <i>et al.</i> , 2008
	Kottbus	SGI1	ACSSuT	Anjum <i>et al.</i> , 2011
	Mbandaka	SGI1	ACSSuT	Anjum <i>et al.</i> , 2011
	Meleagridis	SGI1	ACSSuT	Ebner <i>et al.</i> , 2004
	Newport	SGI1-H	ACGSSuT	Doublet <i>et al.</i> , 2004b
		SGI1-K6	AGSSuT	Doublet <i>et al.</i> , 2009b
		SGI1-L1	ACGSSuTTm	Doublet <i>et al.</i> , 2009b
		SGI1-L2	ACGSSuTTm	Doublet <i>et al.</i> , 2009b
	Ohio	SGI1	ACSSuT	Anjum <i>et al.</i> , 2011
	Paratyphi B	SGI1	ACSSuT	Meunier <i>et al.</i> , 2002
		SGI1-B	ASu	Weill <i>et al.</i> , 2005
		SGI1-C	SSu	Weill <i>et al.</i> , 2005
		SGI1-R	ACST	Djordjevic <i>et al.</i> , 2009
	Schleissheim	SGI1	ACSSuT	Kim <i>et al.</i> , 2011
	Tallahassee	SGI1-F	ACSuTTm	Vo <i>et al.</i> , 2010

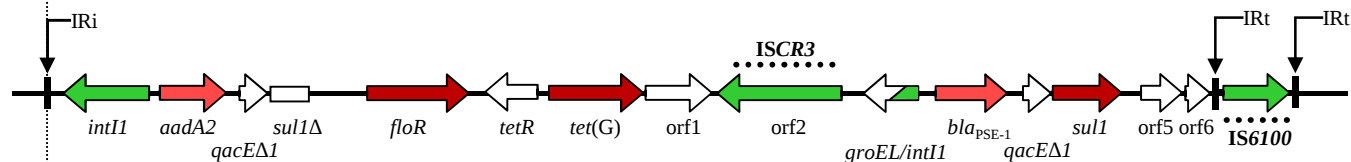
Suite du tableau page suivante

Espèces	Sérotypes	Variants	Profils de résistance ^a	Références
<i>S. enterica</i>	Typhimurium	SGI1	ACSSuT	Boyd <i>et al.</i> , 2000
		SGI1-A	ACSSuTTm	Nielsen <i>et al.</i> , 2009
		SGI1-B	ASu	Boyd <i>et al.</i> , 2002
		SGI1-C	SSu	Boyd <i>et al.</i> , 2002
		SGI1-E	ASSuT	Boyd <i>et al.</i> , 2002
		SGI1-M	ACGKSuTTo	Vo <i>et al.</i> , 2007
		SGI1-T	CST	Targant <i>et al.</i> , 2010
	Virchow	SGI1-J3	CSuTTm	Doublet <i>et al.</i> , 2009a
		SGI1-J4	Su	Chu <i>et al.</i> , 2011
		SGI1-J5	CSuTTm	Chu <i>et al.</i> , 2011
		SGI1-S	AkGKSuTmTo	Wilson <i>et al.</i> , 2010
<i>P. mirabilis</i>		SGI1	ACSSuT	Boyd <i>et al.</i> , 2008
		SGI1-I	CSSuTTm	Boyd <i>et al.</i> , 2008
		SGI1-L	ACSuTTm	Ahmed <i>et al.</i> , 2007
		SGI1-O	SuTm	Boyd <i>et al.</i> , 2008
		SGI1-U	SuTm	Bi <i>et al.</i> , 2011

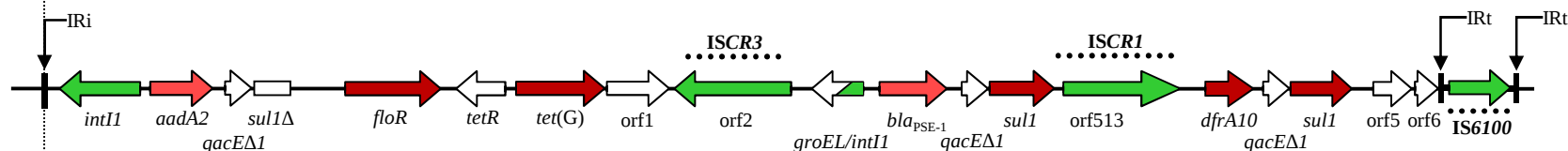
^a abréviations : A : ampicilline, Ak : amikacine, C : chloramphénicol, G : gentamicine, K : kanamycine, S : streptomycine, Su : sulfamides, T : tétracyclines, Tm : triméthoprine, To : tobramycine

Annexe 2 :
Variants de l'intégron In104 de l'îlot génomique SGI1

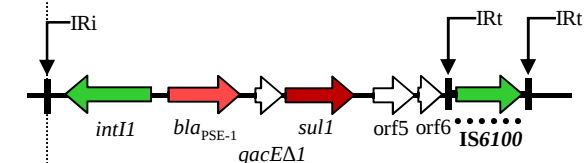
SGI1
ACSSuT
(Boyd *et al.*, 2000)



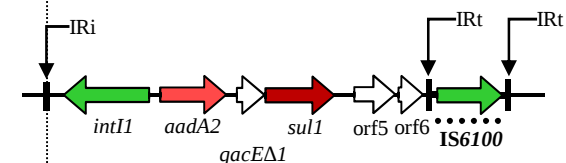
SGI1-A
ACSSuTTm
(Boyd *et al.*, 2002)



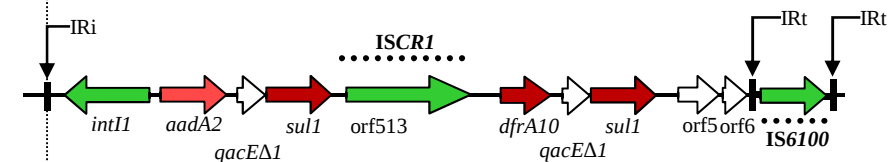
SGI1-B
ASu
(Boyd *et al.*, 2002)



SGI1-C
SSu
(Boyd *et al.*, 2002)



SGI1-D
SSuTm
(Boyd *et al.*, 2002)



Fonctions :

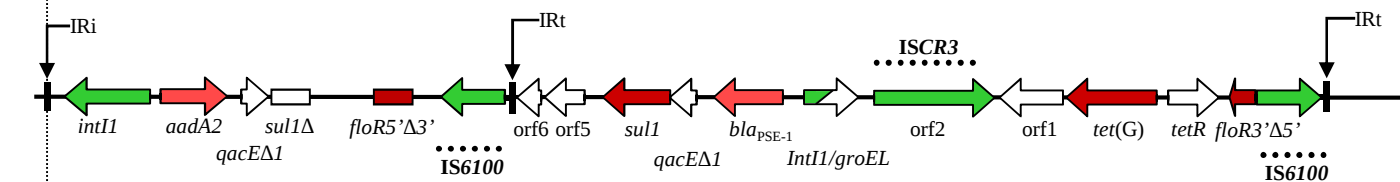
- Recombinaison
 - Cassettes de résistance
 - Gènes de résistance
 - Transfert conjugatif
 - Autres fonctions ou fonctions inconnues
- } Résistances aux antibiotiques

Abréviations :

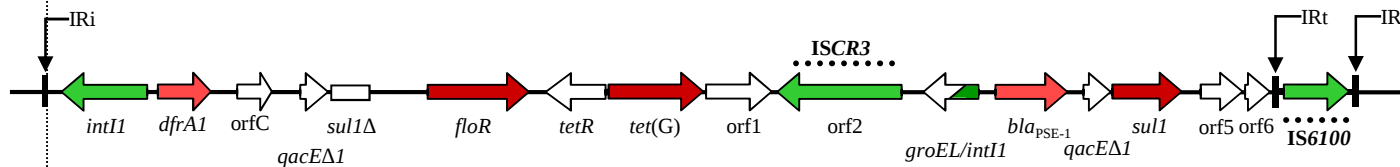
A : ampicilline, Ak : amikacine, C : chloramphénicol,
G : gentamicine, K : kanamycine, S : streptomycine,
Su : sulfamides, T : tétracyclines, Tm : triméthoprime,
To : tobramycine

Sauf précision, l'intégron est toujours inséré entre les ORF S027 et S044 de SGI1

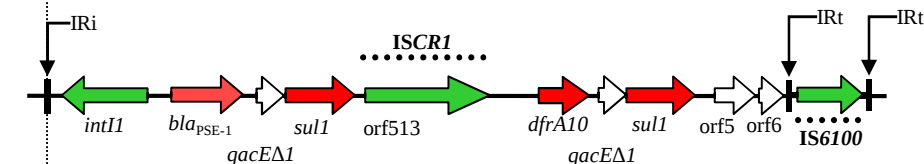
SGI1-E
ASSuT
(Boyd *et al.*, 2002)



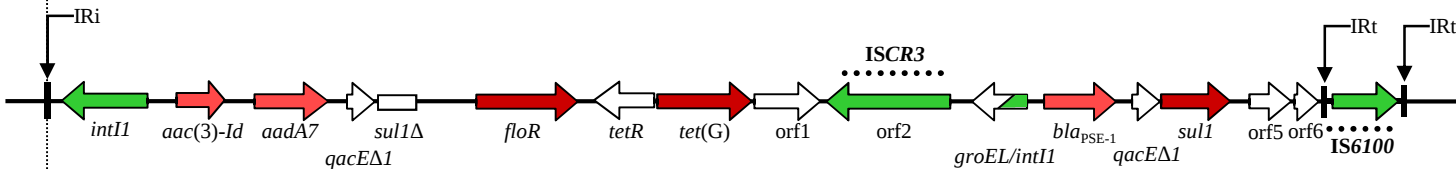
SGI1-F
ACSuTTm
(Doublet *et al.*, 2003)



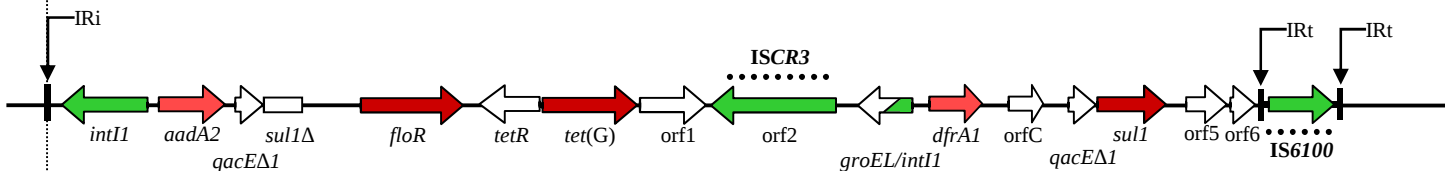
SGI1-G
ASuTm
(Doublet *et al.*, 2004a)



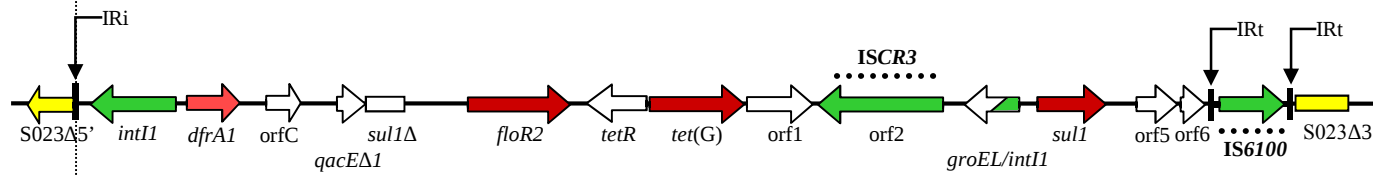
SGI1-H
ACGSSuT
(Doublet *et al.*, 2004b)



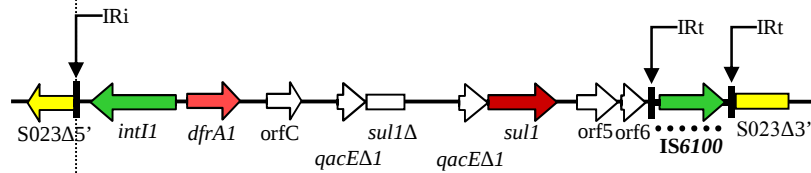
SGI1-I
CSSuTTm
(Levings *et al.*, 2005)



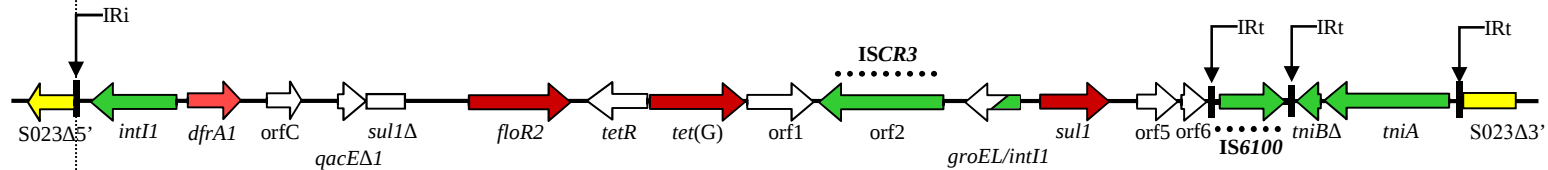
SGI1-J1/SGI2
CSuTTm
(Levings *et al.*, 2005)



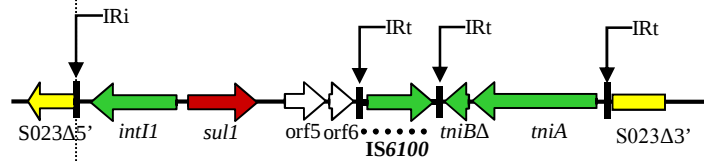
SGI1-J2/SGI2-A
SuTm
(Levings *et al.*, 2008)



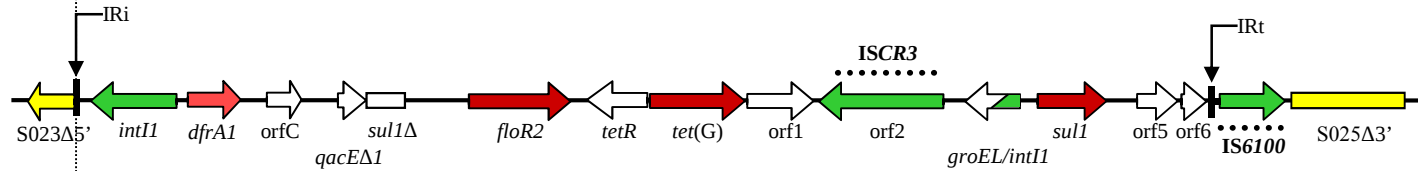
SGI1-J3
CSuTTm
(Doublet *et al.*, 2009a)



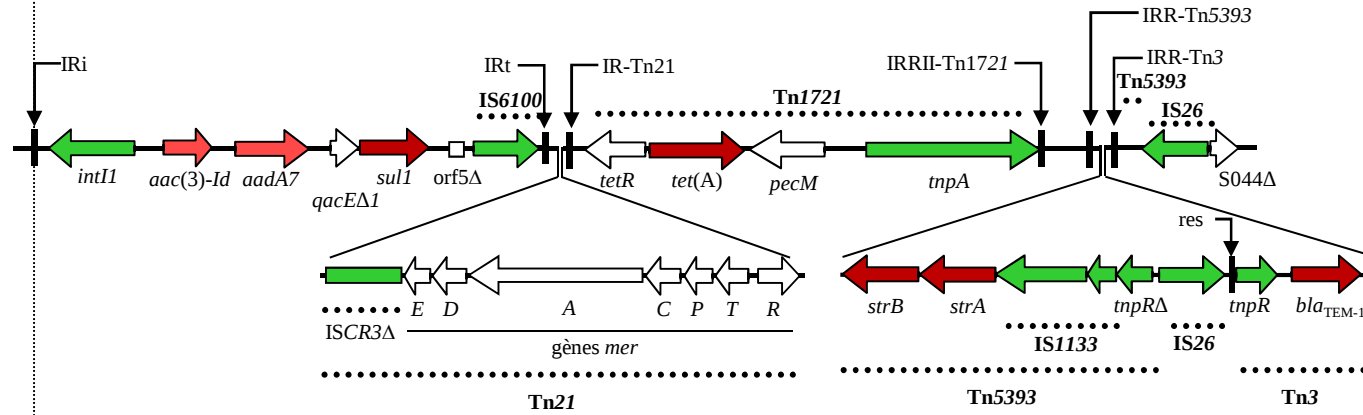
SGI1-J4
Su
(Chu *et al.*, 2011)



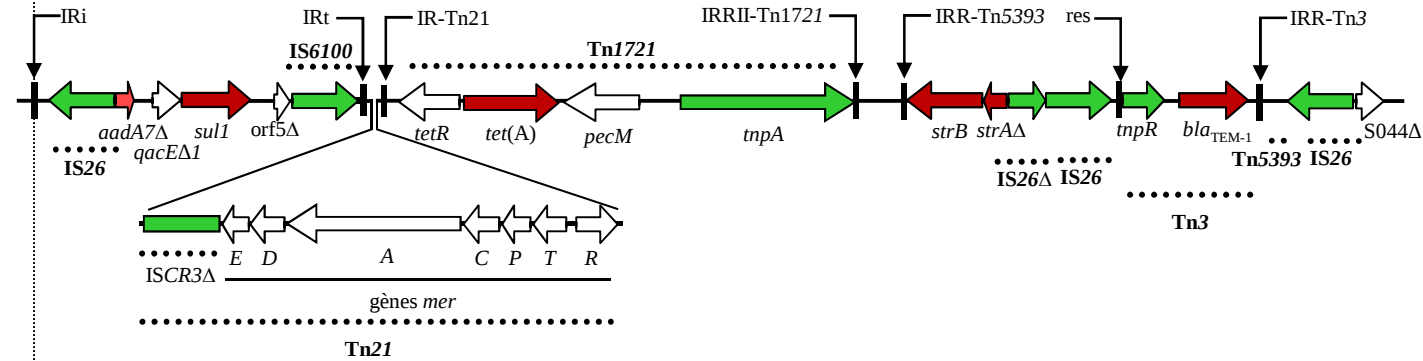
SGI1-J5
CSuTTm
(Chu *et al.*, 2011)



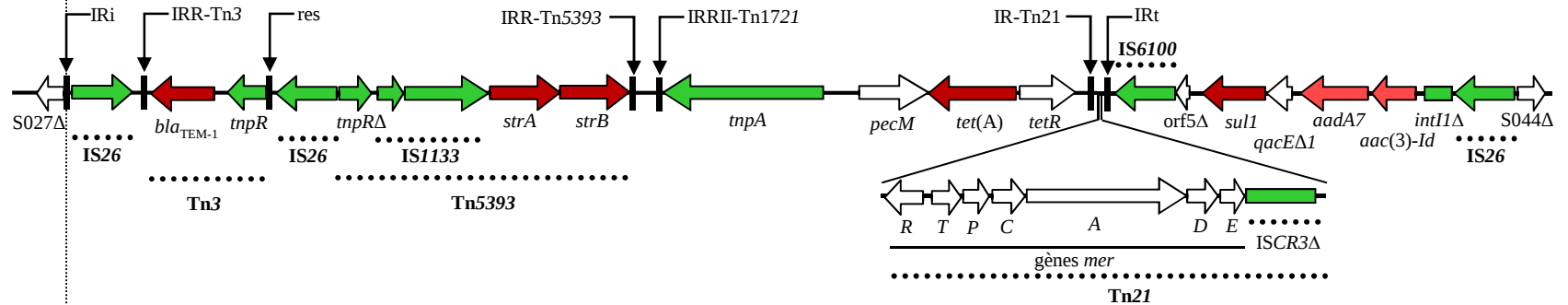
SGI1-K1
AGSSuT
(Levings *et al.*, 2007 ;
Doublet *et al.*, 2008c)



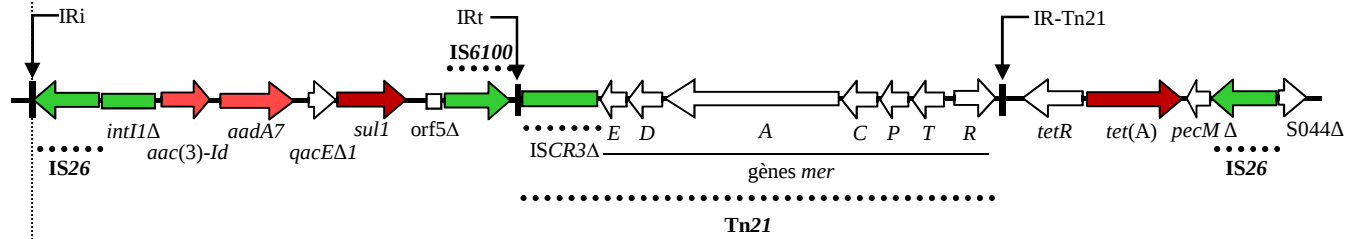
SGI1-K2
ASSuT
(Doublet *et al.*, 2008c)



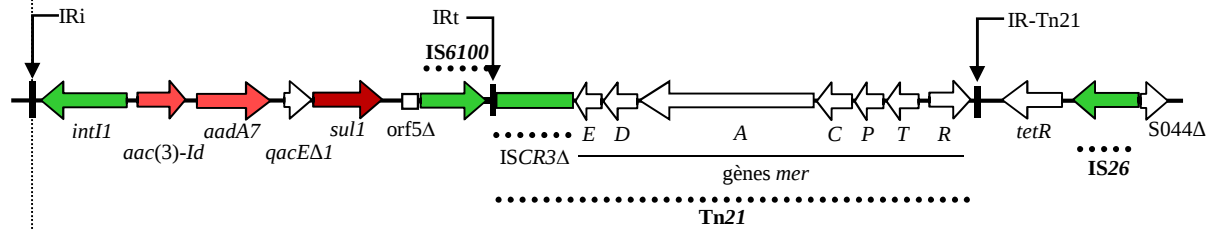
SGI1-K3
AGSSuT
(Doublet *et al.*, 2008c)



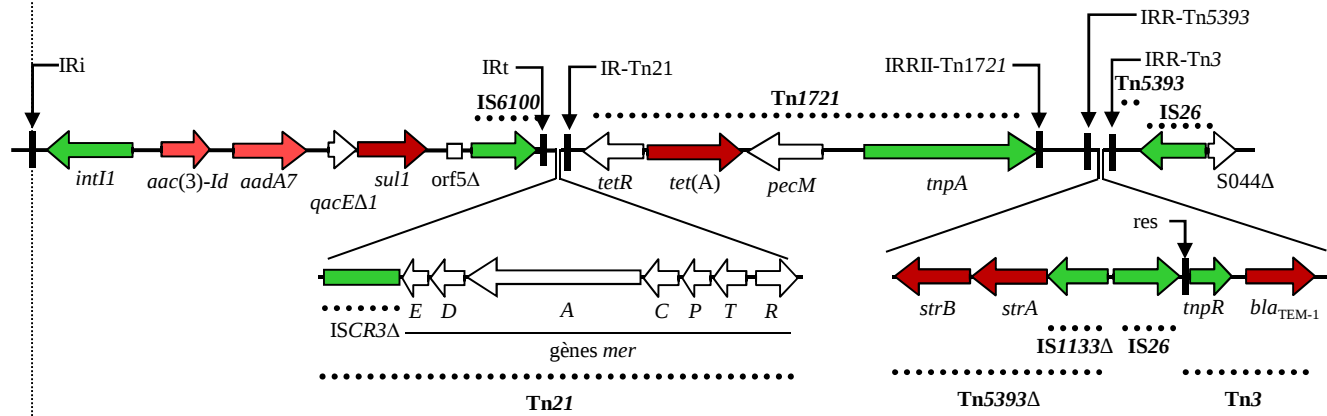
SGI1-K4
GSSuT
(Doublet *et al.*, 2008c)



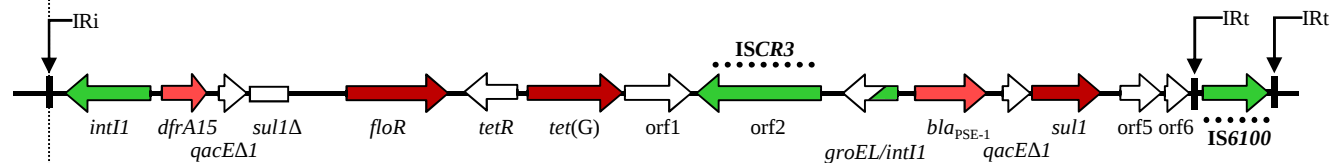
SGI1-K5
GSSu
(Doublet *et al.*, 2008c)



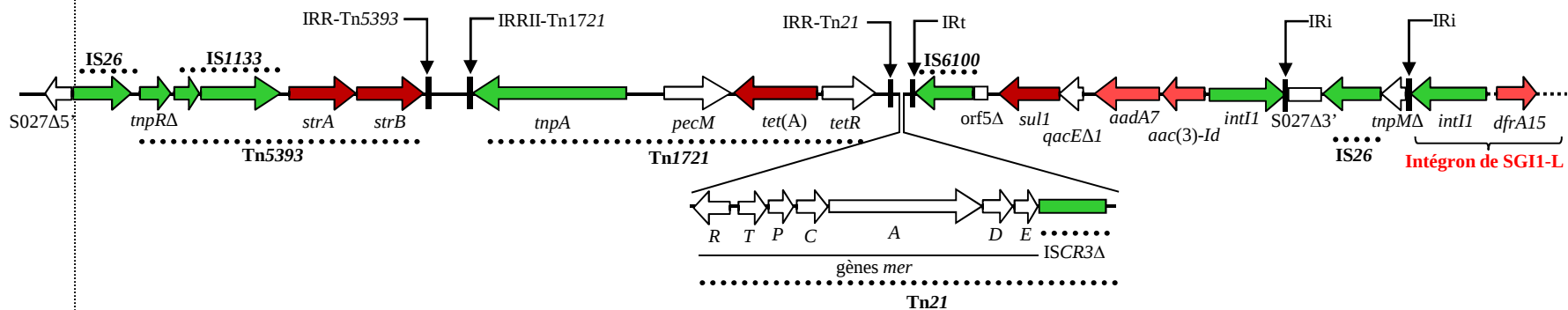
SGI1-K6
AGSSuT
(Doublet *et al.*, 2009b)



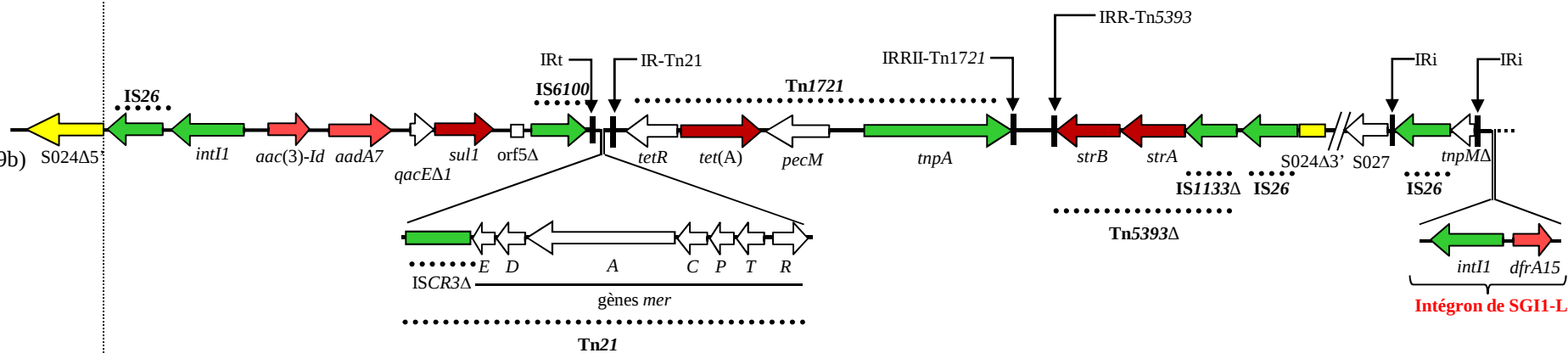
SGI1-L
ACSuTTm
(Ahmed *et al.*, 2006)



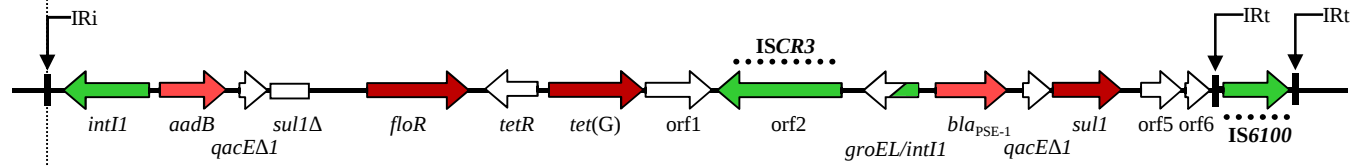
SGI1-L1
ACGSSuTTm
(Doublet *et al.*, 2009b)



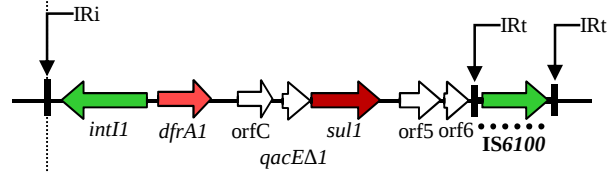
SGI1-L2
ACGSSuTTm
(Doublet *et al.*, 2009b)



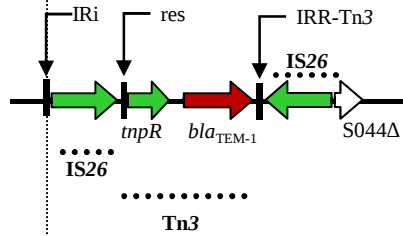
SGI1-M
ACGKSuTTto
(Vo *et al.*, 2007)



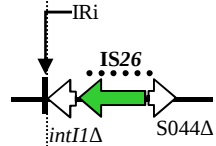
SGI1-O
SuTm
(Boyd *et al.*, 2008)



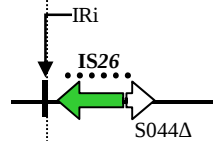
SGI1-P1 et -P2
A
(Doublet *et al.*, 2008c)



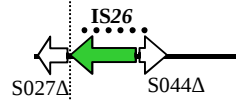
SGI1-Q1
Ø
(Doublet *et al.*, 2008c)



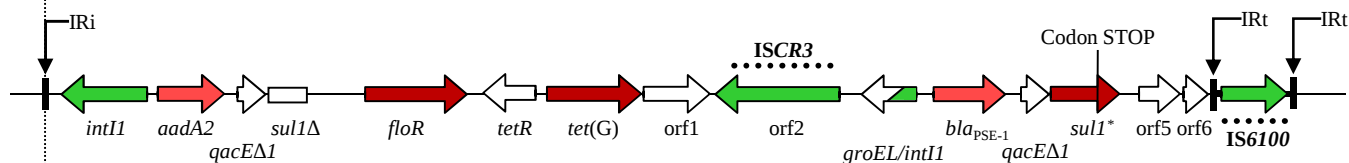
SGI1-Q2
Ø
(Doublet *et al.*, 2008c)



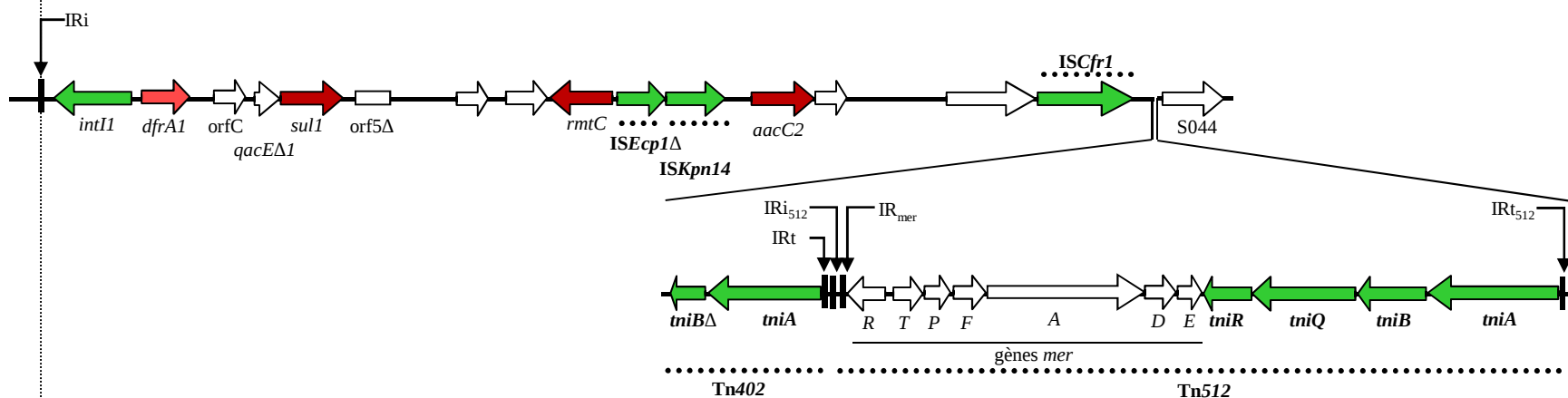
SGI1-Q3
Ø
(Doublet *et al.*, 2008)



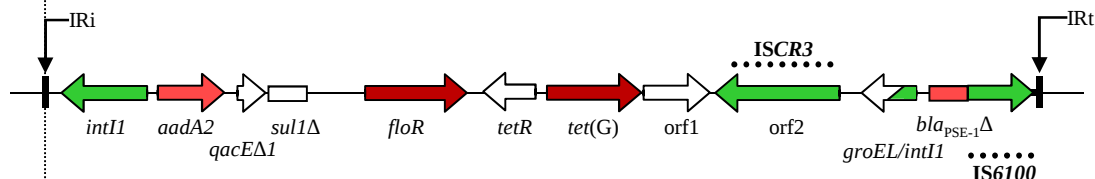
SGI1-R
ACST
(Djordjevic *et al.*, 2009)



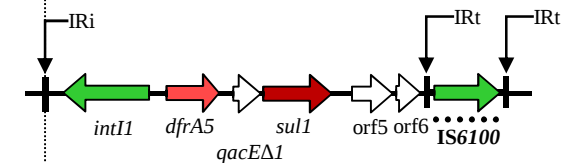
SGI1-S
AkGKSuTmTo
(Wilson *et al.*, 2010)



SGI1-T
CST
(Targant *et al.*, 2010)



SGI1-U
SuTm
(Bi *et al.*, 2011)



Annexe 3 :

Article I

Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains

Doublet B., Douard G., Targant H., Meunier D., Madec J. Y., Cloeckaert A.

Journal of microbiological methods, 2008, 75(2) : 359-361



Note

Antibiotic marker modifications of λ Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains

Benoît Doublet^{a,*}, Gregory Douard^a, Hayette Targant^b, Danièle Meunier^b, Jean-Yves Madec^b, Axel Cloeckaert^a

^a INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, Nouzilly, 37380, France

^b AFSSA, Unité de Bactériologie Bovine et Sécurité des Viandes, Lyon, 69364, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 February 2008

Received in revised form 4 June 2008

Accepted 17 June 2008

Available online 21 June 2008

Keywords:

Lambda red recombinase

FLP recombinase

Multidrug-resistant *Salmonella*

SGI1

ABSTRACT

The Red recombinase system of bacteriophage Lambda has been used to inactivate chromosomal genes in bacteria using PCR products. In this study, we describe the replacement of the ampicillin resistance marker of helper plasmids pKD46 and pCP20 by a gentamicin resistance gene to disrupt chromosomal genes and then to eliminate FRT flanked resistance gene in multiple antibiotic-resistant *Salmonella enterica* strains.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

Over the last few years, bacteriophage-encoded recombinases have been used for engineering homologous recombination in the chromosomes of *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and other bacteria (Datsenko and Wanner, 2000; Uzzau et al., 2001). The gene replacement method developed by Datsenko and Wanner was initially used for the disruption of chromosomal genes using linear PCR products which provide the homology with the targeted genes (Datsenko and Wanner, 2000). Modifications of the gene disruption method have been developed for epitope tagging of chromosomal genes and phage genes, single transcriptional and translational fusions in the chromosome of *E. coli* or *S. enterica* and also for the construction of vaccine carrier of *S. Typhimurium* strains (Uzzau et al., 2001; Ellermeier et al., 2002; Husseiny and Hensel, 2005; Serra-Moreno et al., 2006). All these Red recombinase approaches require the phage λ Red recombinase expression in the bacterial strain for an efficient recombination between the targeted gene and a linear PCR product. This PCR product may contain different antibiotic resistance genes flanked by FLP recognition target (FRT) sites. Thus, mutants of the targeted gene are isolated as antibiotic-resistant colonies. Then, the elimination of the resistance gene can be mediated by the FLP recombinase which acts on the FRT sites (Datsenko and Wanner, 2000). Expression of the λ Red recombinase or FLP recombinase is required from helper plasmids such as pKD46 and pCP20, respectively, which are temperature-sensitive and thus can

be easily eliminated. However, the introduction of the pKD46 helper plasmid in bacterial strains requires to be realized on ampicillin-susceptible strains because pKD46 carries an ampicillin resistance marker (GenBank accession number AY048746). The pCP20 helper plasmid, which expresses the FLP recombinase, carries ampicillin and chloramphenicol resistance markers and thus, its introduction also requires a chloramphenicol or ampicillin-susceptible strain (Cherepanov and Wackerneagel, 1995; Datsenko and Wanner, 2000).

The 43-kb *Salmonella* Genomic island 1 (SGI1) is a chromosomally integrative mobilizable element that was originally identified in epidemic multidrug-resistant *S. enterica* serovar Typhimurium phage type DT104 strains (Boyd et al., 2001; for review, Mulvey et al., 2006). SGI1 contains an antibiotic resistance gene cluster conferring resistance to ampicillin (Ap), chloramphenicol (Cm), florfenicol (Ff), streptomycin (Sm), spectinomycin (Sp), sulfonamides (Su), and tetracycline (Tc) (Boyd et al., 2001; Mulvey et al., 2006). Since the identification of SGI1 in *S. Typhimurium* DT104, variant SGI1 antibiotic resistance gene clusters have been described in a wide variety of *S. enterica* serovars and thus conferred various antibiotic resistance phenotypes (Mulvey et al., 2006). Few recent studies regarding the putative role of SGI1 in virulence revealed that multidrug-resistant *Salmonella* spp. possessing SGI1 presented a hypervirulence phenotype in different invasion and infection models compared to non-resistant strains (Mulvey et al., 2006).

In this study, we describe the modification of the antibiotic resistance markers of helper plasmids pKD46 and pCP20 to construct a

* Corresponding author. Tel.: +33 2 47 42 72 95; fax: +33 2 47 42 77 74.

E-mail address: Benoit.Doublet@tours.inra.fr (B. Doublet).

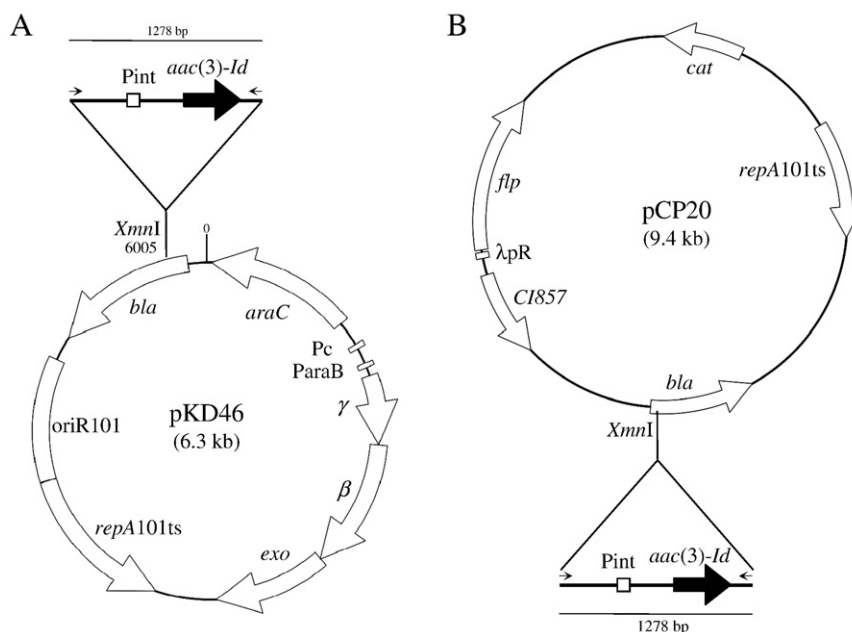


Fig. 1. Schematic view of λ Red recombinase expression plasmid pKD46 (A), Flp recombinase expression plasmid pCP20 (B), and the 1278-bp PCR fragment containing the gentamicin resistance gene, *aac(3)-Id*. Promoters Pint, Pc, ParaB, and λ pR are represented by white boxes. The single XmnI restriction site in the ampicillin resistance gene, *bla*, is indicated. Small black arrows represent primers int1 and aacR to amplify the *aac(3)-Id* resistance gene and the promoter (Pint) which transcribes cassette-associated genes in class 1 integron. (A). The λ Red system includes three genes: γ , β , and *exo*. (B). The *flp* recombinase gene is under the control of the λ pR promoter and the temperature-sensitive repressor *ci857* of the phage λ ;

S. Typhimurium DT104 mutant strain lacking SGI1 to demonstrate in future animal experimentation its implication in the pathogenicity of multidrug-resistant *S. Typhimurium* DT104 strains. This modification of helper plasmids pKD46 and pCP20 will be useful to inactivate SGI1 ORFs suspected to be implicated in the enhancement of virulence. We chose to introduce a gentamicin resistance gene, *aac(3)-Id*, also called *aacC5*, within the *bla* resistance gene of pKD46 and pCP20. The XmnI enzyme, which possesses a single site within the *bla* resistance gene, was used to linearize these plasmids (Fig. 1) (GenBank accession number AY048746) (Cherepanov and Wackernagel, 1995; Datsenko and Wanner, 2000). The gentamicin resistance gene, *aac(3)-Id* and the promoter region of class 1 integron was amplified by PCR using the template plasmid pBD12 and primers int1 and aacR (Table 1, Fig. 1) (Doublet et al., 2004). This blunt-end PCR product of 1278 bp in size was ligated into the linearized plasmids pKD46 (Fig. 1) or pCP20 (not shown). The resulting plasmids were named pKD46-Gm and pCP20-Gm.

Deletion of the entire SGI1 was performed in *S. Typhimurium* DT104 strain 1948SA96 by use of the one-step chromosomal gene inactivation

technique (Datsenko and Wanner, 2000). Briefly, the kanamycin resistance gene *kan* flanked by FRT sites was amplified by PCR using the template plasmid pKD4 and hybrid primers (Table 1). These primers, RecSGI1-F and RecSGI1-R, were synthesized with 20 nucleotides of priming sites of pKD4 and with 50 nucleotides from each side of SGI1 (GenBank accession number AF261825). The 1.6 kb PCR product was purified and electroporated into the *S. Typhimurium* DT104 strain 1948SA96 in which the λ Red recombinase expression plasmid pKD46-Gm was introduced. Homologous recombination between the PCR product and the genomic DNA resulted in the deletion of the 43 kb SGI1 and in its replacement by the *kan* cassette. This mutant strain was named 1948SA96 Δ SGI1::kan. After primary selection, mutant colonies were grown at 37 °C and/or 43 °C for loss of the helper plasmid pKD46-Gm. Different PCRs were used to show that the SGI1 mutants had the correct structure using primers k2, kt (*kan*), and U7L12, C9L2 flanking SGI1 in the chromosome (Table 1). PCR products of the expected sizes were obtained using target-flanked primers and *kan*-specific primers. The loss of the antibiotic resistance phenotype conferred by SGI1 was

Table 1
Plasmids and primers used in the present study

Plasmid or primer Name	Resistance profile and relevant characteristics or sequence (5' to 3')	Reference
pKD46	Ap, λ Red recombinase expression	Datsenko and Wanner (2000)
pCP20	ApCm, FLP recombinase expression	Datsenko and Wanner (2000)
pKD4	ApKm, <i>kan</i> cassette template	Datsenko and Wanner (2000)
pBD12	ApGmKm, <i>aac(3)-Id</i> gene template	Doublet et al. (2004)
pKD46-Gm	Gm, λ Red recombinase expression	This study
pCP20-Gm	CmGm, FLP recombinase expression	This study
int1	GCTCTCGGGTAACATCAAGG	Doublet et al. (2004)
aacR	GCGGGCACTTTTCTCACTCAT	Doublet et al. (2004)
RecSGI1-F	CCGACGACCTGCTGGGACGATTTTCTCCAGCTTCTGTATTGGGAAGTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	This study
RecSGI1-R	GGCAGTTAATGCGGGTAGTGAACGTTCACTGACGAGGGTGGACTAAAACCATATGAATATCCTCCTTAG	This study
k2	CGGTGCCCTGAATGAAGTGC	Datsenko and Wanner (2000)
Kt	CGGCCACAGTCGATGAATCC	Datsenko and Wanner (2000)
U7-L12	ACACCTTGAGCAGGGCAAG	Boyd et al. (2001)
C9-L2	AGCAAGTGTGCGTAATTGG	Boyd et al. (2001)

also confirmed by the antibiotic disc diffusion method. All SGI1 mutants tested were only resistant to kanamycin.

To eliminate the *kan* cassette, the kanamycin-resistant mutant strain 1948SA96ΔSGI1::*kan* was transformed with the FLP recombinase expression plasmid pCP20-Gm, and gentamicin-resistant transformants were selected at 30 °C. After culture at 37 °C and/or 43 °C, a large majority of transformants lost the FRT flanked *kan* gene and also the FLP helper plasmid pCP20-Gm and thus, were fully antibiotic susceptible. The resulting mutants named 1948SA96ΔSGI1 were tested by PCR using primers flanking the deleted region and revealed that all harboured a 85 nucleotide scar in place of SGI1 (Boyd et al., 2001; Datsenko and Wanner, 2000). The efficiency of the one-step chromosomal inactivation technique using plasmids pKD46-Gm and pCP20-Gm was comparable to the use of the original helper plasmids pKD46 and pCP20 (data not shown) (Datsenko and Wanner, 2000). The modification of the helper plasmids of the one-step chromosomal gene inactivation method of Datsenko and Wanner appeared useful to generate deletions in multidrug-resistant *S. enterica* field strains especially for strains resistant to ampicillin and chloramphenicol. Moreover, this technique has been applied to delete a large genomic island of 43 kb in size and should be useful to create large chromosomal deletions. However, to adapt it to multidrug-resistant strains that are gentamicin-resistant, the same modifications of the λ Red recombinase and FLP recombinase expression plasmids pKD46 and pCP20, respectively, may be realized with another resistance marker following the same methodology.

Acknowledgments

This study was supported by public funds from the French National Institute of Agronomic Research and French Food Safety Agency.

References

- Boyd, D.A., Peters, G.A., Cloeckart, A., Sidi-Boumedine, K., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., Mulvey, M.R., 2001. Complete nucleotide sequence of a 43-kb genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. *J. Bacteriol.* 83, 5725–5732.
- Cherepanov, P.P., Wackernagel, W., 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of FLP-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158, 9–14.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6640–6645.
- Doublet, B., Weill, F.X., Fabre, L., Chaslus-Dancla, E., Cloeckart, A., 2004. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster containing a novel 3'-N-aminoglycoside acetyltransferase gene cassette, *aac(3)-Id*, in *Salmonella enterica* serovar Newport. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3806–3812.
- Ellermeier, C.D., Janakiraman, A., Slauch, J.M., 2002. Construction of targeted single copy *lac* fusions using λ Red and FLP-mediated site-specific recombination in bacteria. *Gene* 290, 153–161.
- Hussein, M.I., Hensel, M., 2005. Rapid method for the construction of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium vaccine carrier strains. *Infect. Immun.* 73, 1598–1605.
- Mulvey, M.R., Boyd, D.A., Olson, A.B., Doublet, B., Cloeckart, A., 2006. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes Infect.* 8, 1915–1922.
- Serra-Moreno, R., Acosta, S., Hernalsteens, J.P., Jofre, J., Muniesa, M., 2006. Use of the λ Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes. *BMC Mol. Biol.* 7, 31.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., Bossi, L., 2001. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 15264–15269.

Annexe 4 :

Article II

**The *Salmonella* genomic island 1 is specifically mobilized in *trans*
by the IncA/C multidrug resistance plasmid family**

Douard G., Praud K., Cloeckaert A., and Doublet B.

PLoS one, 2010, 5(12) : e15302

The *Salmonella* Genomic Island 1 Is Specifically Mobilized *In Trans* by the IncA/C Multidrug Resistance Plasmid Family

Gregory Douard, Karine Praud, Axel Cloeckaert, Benoît Doublet*

INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, Nouzilly, France

Abstract

Background: The *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) is a *Salmonella enterica*-derived integrative mobilizable element (IME) containing various complex multiple resistance integrons identified in several *S. enterica* serovars and in *Proteus mirabilis*. Previous studies have shown that SGI1 transfers horizontally by *in trans* mobilization in the presence of the IncA/C conjugative helper plasmid pR55.

Methodology/Principal Findings: Here, we report the ability of different prevalent multidrug resistance (MDR) plasmids including extended-spectrum β -lactamase (ESBL) gene-carrying plasmids to mobilize the multidrug resistance genomic island SGI1. Through conjugation experiments, none of the 24 conjugative plasmids tested of the IncFI, FII, HI2, I1, L/M, N, P incompatibility groups were able to mobilize SGI1 at a detectable level (transfer frequency $<10^{-9}$). In our collection, ESBL gene-carrying plasmids were mainly from the IncHI2 and I1 groups and thus were unable to mobilize SGI1. However, the horizontal transfer of SGI1 was shown to be specifically mediated by conjugative helper plasmids of the broad-host-range IncA/C incompatibility group. Several conjugative IncA/C MDR plasmids as well as the sequenced IncA/C reference plasmid pRA1 of 143,963 bp were shown to mobilize *in trans* SGI1 from a *S. enterica* donor to the *Escherichia coli* recipient strain. Depending on the IncA/C plasmid used, the conjugative transfer of SGI1 occurred at frequencies ranging from 10^{-3} to 10^{-6} transconjugants per donor. Of particular concern, some large IncA/C MDR plasmids carrying the extended-spectrum cephalosporinase *bla*_{CMY-2} gene were shown to mobilize *in trans* SGI1.

Conclusions/Significance: The ability of the IncA/C MDR plasmid family to mobilize SGI1 could contribute to its spread by horizontal transfer among enteric pathogens. Moreover, the increasing prevalence of IncA/C plasmids in MDR *S. enterica* isolates worldwide has potential implications for the epidemic success of the antibiotic resistance genomic island SGI1 and its close derivatives.

Citation: Douard G, Praud K, Cloeckaert A, Doublet B (2010) The *Salmonella* Genomic Island 1 Is Specifically Mobilized *In Trans* by the IncA/C Multidrug Resistance Plasmid Family. PLoS ONE 5(12): e15302. doi:10.1371/journal.pone.0015302

Editor: Shuang-yong Xu, New England Biolabs, Inc, United States of America

Received: August 24, 2010; **Accepted:** November 10, 2010; **Published:** December 20, 2010

Copyright: © 2010 Douard et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This research was supported by public funds from the French National Institute of Agronomic Research. GD was supported by a doctoral fellowship from the Ministère de l'Éducation Nationale et de la Recherche, France. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Benoit.Doublet@tours.inra.fr

Introduction

Acquisition of foreign DNA by horizontal gene transfer (HGT) is a crucial mechanism that allows bacteria to acquire new traits, and it represents a key driving force in bacterial evolution. HGT is widely recognized as the mechanism responsible for the widespread distribution of antibiotic resistance genes. Among HGT mechanisms, those specified by conjugative plasmids seem to be the most sophisticated and implicated in the diffusion of antibiotic resistance genes [1]. Bacterial conjugation appears to be a conserved molecular process by which transfer of DNA from a donor to a recipient cell occurs during a close cell-cell contact. In Gram-negative bacteria, conjugation requires the elaboration of a type IV secretion system, called the transferosome and the formation of a nucleoprotein complex involved in processing the DNA and delivering it to the transferosome, called the relaxosome [2]. Although conjugation is a conserved mechanism, conjugative

systems (transferosome and relaxosome) have shown some differences depending on the incompatibility (Inc) group of plasmids [2]. Incompatibility is a manifestation of the relatedness of plasmids that share common replication controls. Incompatibility was defined as the inability of two related plasmids to be propagated stably in the same bacterial strain [3,4].

Localization of antimicrobial resistance genes on transferable genetic elements such as broad-host range plasmids, integrative conjugative elements facilitates the HGT of these genes among bacteria and provides a rapid mean of spread [5]. Certain replicon types (correlated with Inc groups) are associated with multidrug resistance (MDR) from bacteria implicated in disease outbreaks or found in food-producing animals [6]. In this context, IncA/C MDR plasmids are widely distributed among foodborne pathogens such as *Salmonella* [7]. IncA/C replicon types are associated with plasmids carrying and disseminating extended-spectrum β -lactamase (ESBL) genes in animals and humans [6]. During the

past decade, specific attention has been focused on IncA/C MDR plasmids that encode the AmpC β -lactamase CMY-2 (*bla*_{CMY-2} gene) especially among *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* [5,6,8,9].

On the other hand, the 43-kb *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) is the first genomic island conferring a MDR phenotype identified in *S. enterica* [10]. SGI1 is an integrative mobilizable element (IME) which contains a complex class 1 integron, named In104, located at the 3' end of the island [11]. The In104 complex integron confers the common penta-resistance profile to ampicillin (Amp), chloramphenicol (Chl), streptomycin (Str), sulphonamides (Sul) and tetracycline (Tet) of the epidemic MDR *S. enterica* serovar Typhimurium defined phage type DT104 (*S. Typhimurium* DT104) strains [10,11]. Since the identification of SGI1 in *S. Typhimurium* DT104, variant SGI1 MDR complex integrons have been described in a wide variety of *S. enterica* serovars and more recently also in *Proteus mirabilis* [11–14]. The identification of SGI1 in *P. mirabilis* clinical isolates is of great concern as the spread of the SGI1 (or variants) MDR phenotype could have significant implications in other pathogenic bacteria.

In all cases and until now, in field or clinical *S. enterica* and *P. mirabilis* strains, SGI1 is found integrated into the bacterial chromosome within the last 18 bp of the *tmE* gene (also named *thdF*) [10,11]. In 2005, we reported that SGI1 could be conjugally transferred from *S. enterica* donor strains to non-SGI1 *S. enterica* and *E. coli* recipient strains where it integrated into the recipient chromosome in a site-specific manner [15]. Briefly, after excision of SGI1 from the *Salmonella* chromosome, the conjugative mobilization *in trans* by the conjugative helper IncA/C plasmid pR55 occurs between donor and recipient strains. In the recipient cell, the circular form of SGI1 integrates in a site-specific manner at the 3' end of the chromosomal *tmE* gene [15]. SGI1 appeared to be a non-self-transmissible but mobilizable element and was thus classified within the group of site-specific integrative mobilizable elements (IMEs) that are related to integrative conjugative elements (ICEs) [15].

In the present study, we report the conjugative *in trans* mobilization assays of SGI1 by several plasmids of different incompatibility groups. We have tested epidemic successful plasmids carrying Extended Spectrum Cephalosporins (ESC) resistance genes encoding CTX-Ms, TEM-52 ESBLs, and CMY-2 AmpC β -lactamase [16]. According to the results of our plasmid collection tested, we found that only the broad-host-range conjugative IncA/C plasmids were able to mobilize *in trans* SGI1. Conjugative IncHI2 and IncI1 plasmids carrying ESBL genes (*bla*_{CTX-M} or *bla*_{TEM}) were unable to mobilize SGI1. Although certain IncA/C MDR *bla*_{CMY-2} plasmids seemed to have lost their self-transferable capacity, some conjugative IncA/C MDR *bla*_{CMY-2} plasmids permitted the conjugative mobilization of SGI1 [5,7,8]. Our findings suggest that a close relationship, probably at a molecular conjugative process level, may exist between the IncA/C MDR plasmid family and the MDR genomic island SGI1.

Results and Discussion

The identification of SGI1 in the chromosome of several *S. enterica* serovars, i.e. Agona, Cerro, Derby, Dusseldorf, Emek, Haifa, Infantis, Kedougou, Kentucky, Kiambu, Kingston, Meleagridis, Newport, Paratyphi B, Tallahassee, Typhimurium, Virchow, and also in *P. mirabilis* suggested that SGI1 might be horizontally mobilized by conjugative elements concomitantly borne by field strains [11–15]. Mobilization experiments were undertaken to determine whether SGI1 was mobilizable *in trans* by different conjugative plasmids previously described as spreading

among MDR *Salmonella* strains and/or other pathogenic Enterobacteriaceae [16]. We firstly introduced by conjugation a set of 17 conjugative ESBL plasmids (CTX-M-1, -2, -9 and TEM-52) of IncHI2 and IncI1 groups in the SGI1-carrying *S. Agona* strain 959SA97 previously described to conjugally transfer SGI1 in the presence of the conjugative IncA/C helper plasmid pR55 (Table 1 and data not shown) [15]. These ESBL IncHI2 and IncI1 plasmids are representative of the ESBL plasmid families that spread among several *S. enterica* serovars in animal and human isolates representing a major concern [17,18]. In all mobilization assays between ESBL plasmids/SGI1-carrying *S. Agona* strain 959SA97 and the recipient *E. coli* K-12 strain BM14, no SGI1 transconjugants could be obtained in 3 repeated attempts (Table S1 in the supplemental material). In all mating experiments, control of conjugative transfer of the introduced helper plasmid was positive (data not shown). Two TEM-52 IncI1 conjugative plasmids p777SA01 and p04-3486 were initially isolated from *S. Agona* and *S. Typhimurium* field strains that also harboured SGI1 or SGI1-A variant, respectively (Table 1) [17]. Mobilization of SGI1 was also tested from these field strains and resulted also negatively (Table S1). These results indicated that SGI1 is not mobilized by our set of ESBL plasmids of IncHI2 and IncI1 groups from *S. enterica* to *E. coli*. These data suggested that IncHI2 and IncI1 plasmids are not able to mobilize SGI1. Moreover, these results indicated that the presence of any conjugative plasmid, which would provide all conjugal transfer functions for successful conjugation, is not the only sufficient prerequisite for mobilization of SGI1. However, our ESBL plasmid collection is mainly from *S. enterica* sources and does not contain plasmids of other Inc groups than HI2 and I1 that are also described to harbour various ESBL genes (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}) in bacterial isolates from other sources such as *E. coli* from humans [19].

In spite of these negative results, we decided to test reference conjugative plasmids of main different incompatibility groups previously described for plasmid typing [20–22]. Conjugative plasmids pRA1 (IncA/C), pOX38 (IncFI), R1-16 (IncFII), R112 (IncI1), R69 (IncL/M), RPC3 (IncN), RP4 (IncP), and Rsa (IncW) were introduced by conjugation into SGI1-carrying *S. Agona* strain 959SA97 or SGI1-C-carrying *S. Agona* strain 47SA97 depending on antibiotic selection used to introduce the plasmid and thereafter for the transfer of SGI1 (Table 1). The presence of each reference plasmid in *S. Agona* SGI1 donor strains was confirmed by PCR based-replicon typing [3]. Among all the reference plasmids tested, only the IncA/C reference plasmid pRA1 initially isolated from *Aeromonas hydrophila* in 1971 was able to mobilize variant SGI1-C from *S. Agona* donor strain 47SA97 in mating experiments with the *E. coli* recipient strain BM14 (Table 2). *E. coli* SGI1-C transconjugants showed the antibiotic resistance profile conferred by SGI1-C (StrSul) and the additional resistance to sodium azide. The presence of SGI1 or variants of it was confirmed by several PCRs indicating that the entire SGI1 was presented in *E. coli* transconjugants and integrated into the chromosome (data not shown). The kanamycin resistance conferred by plasmid pRA1 was not transferred to the *E. coli* recipient. The absence of plasmid pRA1 in *E. coli* transconjugants was also confirmed by the specific IncA/C replicon PCR (data not shown) [3]. These results indicated that the IncA/C reference plasmid pRA1 was not transferred into the transconjugants tested and confirmed that SGI1 was mobilized *in trans* by pRA1. Using the IncA/C reference plasmid pRA1 as helper plasmid, *E. coli* SGI1-C transconjugants were found at a frequency of around 10^{-3} (Table 2). All other conjugative reference plasmids of IncFI, IncFII, IncI1, IncL/M, IncN, IncP, and IncW were unable to mobilize SGI1 or variant SGI1-C in repeated mating experiments

Table 1. Bacterial strains, and plasmids used in this study.

Strains and plasmid	Relevant genotype, resistance profile ^a , original host or characteristics	Reference or source
<i>S. enterica</i> SGI1 donors		
Agona 959SA97	SGI1 ⁺ ; AmpChlStrSulTet	[10]
Agona 959SA97ΔS009::kan	SGI1ΔS009::kan ⁺ ; AmpChlKanStrSulTet	[10]
Agona 47SA97	SGI1-C ⁺ ; StrSul	[30]
Agona 47SA97Δxis::kan	SGI1-CΔxis::kan ⁺ ; KanStrSul	[30]
Agona 777SA01	SGI1-A ⁺ ; IncI1 ⁺ (TEM-52); AmpChlStrSulTetTmp-3GC	[17]
Albany 7205.00	SGI1-F ⁺ ; AmpChlSulTetTmp	[31]
Typhimurium 04-3486	SGI1 ⁺ ; IncI1 ⁺ (TEM-52); AmpChlStrSulTet-3GC	[17]
<i>E. coli</i> recipient		
BM14	K-12 J53 derivative; F- <i>pro met azi</i> ; Az ^R	Institut Pasteur, France
Plasmids		
IncA/C pRA1	Tra ⁺ ; SulTet; <i>A. hydrophila</i>	[32]
IncA/C pIP40A	Tra ⁺ ; AmpKanSul; <i>P. aeruginosa</i>	[33]
IncA/C pR55	Tra ⁺ ; AmpChlGenKanSul; <i>K. pneumoniae</i>	[24]
IncA/C pR16a	Tra ⁺ ; AmpKanSul; <i>P. stuartii</i>	[21]
IncA/C p13688	Tra ⁺ ; AmpChlGenStrSulTetTmp-3GC; CMY-2; <i>E. coli</i>	[9]
IncA/C p13956	Tra ⁺ ; AmpChlStrSulTetTmp-3GC; CMY-2; <i>E. coli</i>	[9]
IncA/C pAM04528	Tra ⁻ ; AmpChlStrSulTet-3GC; CMY-2; <i>S. Newport</i>	[8]
IncA/C pN418	Tra ⁻ ; AmpChlGenKanStrSulTet-3GC; CMY-2; <i>S. Heidelberg</i>	[7]
IncFI pOX38	Tra ⁺ ; Kan; F factor derivative; <i>E. coli</i>	Institut Pasteur, France
IncFII R1-16	Tra ⁺ ; Kan; R1 derivative; <i>E. coli</i>	[20]
IncHI2 pCEB6542	Tra ⁺ ; SulTet-3GC; CTX-M-1; <i>S. Llandoff</i>	[34]
IncHI2 p1639-SA-00	Tra ⁺ ; AmpSulTetTmp-3GC; CTX-M-2; <i>S. Virchow</i>	[18]
IncHI2 p142-SA-01	Tra ⁺ ; AmpSulTetTmp-3GC; CTX-M-2; <i>S. Virchow</i>	[fernandez2007]
IncHI2 p3464b	Tra ⁺ ; AmpStrSulTetTmp-3GC; CTX-M-9; <i>S. Virchow</i>	[35]
IncI1 p777-SA-01	Tra ⁺ ; Amp-3CG; TEM-52; <i>S. Agona</i>	[17]
IncI1 p04-3486	Tra ⁺ ; Amp-3CG; TEM-52; <i>S. Typhimurium</i>	[17]
IncI1 R112	Tra ⁺ ; Kan; <i>S. Panama</i>	[21]
IncL/M R69	Tra ⁺ ; AmpKanTet; <i>S. Paratyphi B</i>	[21]
IncN RPC3	Tra ⁺ ; KanStr; <i>E. coli</i>	[21]
IncP RP4	Tra ⁺ ; AmpKanTet; <i>P. aeruginosa</i>	[33]
IncW RSa	Tra ⁺ ; ChlKanStrSul; <i>Shigella flexneri</i>	[22]

^aabbreviations: Amp, ampicillin; Az, sodium azide; Chl, chloramphenicol; Gen, gentamicin; Kan, kanamycin; Str, streptomycin; Sul, sulphonamides; Tet, tetracyclines; Tmp, trimethoprim; 3GC, third generation cephalosporin.

doi:10.1371/journal.pone.0015302.t001

(Table S1). In all mating experiments, conjugative transfer control of the different conjugative helper plasmids was positive (data not shown). These results suggested that the *in trans* mobilization of SGI1 may be correlated with the presence of a helper conjugative plasmid of the IncA/C family in the *Salmonella* SGI1 donor strain.

To assess whether the IncA/C plasmid family is specifically implicated in the mobilization of SGI1, and whether different IncA/C plasmids may mobilize *in trans* SGI1, we introduced by conjugation different MDR IncA/C plasmids into SGI1-carrying *S. Agona* strain 959SA97 or SGI1-C-carrying *S. Agona* strain 47SA97 or SGI1-F-carrying *S. Albany* strain 7205.00 (Table 1). A first set of historical MDR IncA/C plasmids isolated at the end of the 1960's like the reference IncA/C plasmid pRA1, i.e. pIP40a (from *Pseudomonas aeruginosa* in 1969), pR16a (from *Providencia stuartii* in 1966), and pR55 (from *Klebsiella pneumoniae* in 1969) that was firstly used to experimentally mobilize SGI1, was tested in SGI1 mobilization assays (Table 1) [15,21,23,24]. *E. coli* SGI1

transconjugants were obtained in all mobilization assays (Table 2). Transconjugants showed the antibiotic resistance profile of the SGI1 variant horizontally transferred and susceptibility to specific antibiotic markers of the different helper IncA/C plasmids used in the donor strains. All these results were confirmed by PCRs on *E. coli* transconjugants (data not shown). Depending on the helper conjugative IncA/C plasmid used, and also on the *S. enterica* SGI1 donor strain, the SGI1 transfer frequencies were found to range from 10⁻³ to 10⁻⁵. These results indicated that several conjugative IncA/C plasmids were able to mobilize *in trans* SGI1 or variants of it. Thus, these results strengthen the hypothesis that there is a specific relation between the IncA/C plasmid family and the ability to mobilize SGI1.

To further confirm this hypothesis, other current MDR IncA/C plasmids encoding the extended spectrum cephalosporinase CMY-2 were also tested in SGI1 mobilization assays (Table 1). Since 2000, the emergence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *S.*

Table 2. SGI1 mobilization by IncA/C plasmids.

<i>S. enterica</i> donor strain	SGI1 variant	Conjugative plasmid	SGI1 transfer frequency ^a
Field strain			
Agona 959SA97	SGI1	—	$<10^{-9}$
Agona 47SA97	SGI1-C	—	$<10^{-9}$
Albany 7205.00	SGI1-F	—	$<10^{-9}$
Derivative of field strain			
Agona 959SA97ΔS009::kan	SGI1ΔS009::kan	—	$<10^{-9}$
Agona 47SA97Δxis::kan	SGI1-CΔxis::kan	—	$<10^{-9}$
Transconjugant strain			
Agona 47SA97	SGI1-C	IncA/C pRA1	9.8×10^{-3}
Agona 47SA97	SGI1-C	IncA/C pIP40a	1.9×10^{-2}
Agona 959SA97	SGI1	IncA/C pR55	1.9×10^{-3}
Agona 47SA97	SGI1-C	IncA/C pR55	3.4×10^{-3}
Albany 7205.00	SGI1-F	IncA/C pR55	7.2×10^{-5}
Agona 959SA97	SGI1	IncA/C pR16a	4.4×10^{-3}
Agona 47SA97	SGI1-C	IncA/C pR16a	8.9×10^{-3}
Agona 47SA97Δxis::kan	SGI1-CΔxis::kan	IncA/C pR55	3.1×10^{-7}
Agona 959SA97ΔS009::kan	SGI1ΔS009::kan	IncA/C p13688 (CMY-2)	6.7×10^{-5}
Agona 959SA97ΔS009::kan	SGI1ΔS009::kan	IncA/C p13956 (CMY-2)	2.2×10^{-5}
Agona 47SA97Δxis::kan	SGI1-CΔxis::kan	IncA/C p13688 (CMY-2)	5.2×10^{-6}
Agona 47SA97Δxis::kan	SGI1-CΔxis::kan	IncA/C p13956 (CMY-2)	2.2×10^{-6}
Albany 7205.00	SGI1-F	IncA/C pAM04528 (CMY-2)	$<10^{-9}$
Albany 7205.00	SGI1-F	IncA/C pN418 (CMY-2)	$<10^{-9}$

^athe frequency of transfer was calculated by dividing the number of SGI1 transconjugants by the number of SGI1 donor cells. Transfer frequencies correspond to the result of one experiment which has been repeated two times and showing the same results.

doi:10.1371/journal.pone.0015302.t002

enterica carrying IncA/C plasmid-mediated CMY-2 AmpC β-lactamase has been reported in numerous countries around the world. Such CMY-2 IncA/C plasmids have been also identified in *E. coli* isolates [8,9]. Two CMY-2 IncA/C plasmids p13688 and p13956 isolated from *E. coli* animal strains were introduced by conjugation from an *E. coli* transconjugant to *S. Agona* derivative strain 959SA97ΔS009::kan or *S. Agona* derivative strain 47SA97Δxis::kan [9]. These mutant strains contain a kanamycin marker in SGI1 that was necessary for the selection of SGI1 in mating experiments according to the large antibiotic resistance profile of these plasmids (Table 1). The ORF S009 initially annotated in the SGI1 sequence revealed to be non-functional, thus the insertion of the kanamycin marker gene would not affect the transfer of SGI1 (B. Doublet, unpublished results). Strain 47SA97Δxis::kan has been previously described and the deletion of the *xis* gene in SGI1-C did not abolish the SGI1 transfer but slightly affected its transfer frequency [15]. Like with the previously tested IncA/C plasmids, these 2 conjugative CMY-2 IncA/C plasmids allowed the mobilization of SGI1 at frequencies ranging from 10^{-5} to 10^{-6} (Table 2). Two other current CMY-2 IncA/C plasmids, pAM04528 and pN418, isolated from representative strains of clonal epidemic *S. Heidelberg* and *S. Newport* in the U.S. were also studied to mobilize SGI1 [7,8]. Conjugation experiments from the original *S. enterica* host strains to *E. coli* recipient strain failed for the CMY-2 IncA/C plasmid pAM04528 and yielded many *E. coli* transconjugants for the CMY-2 IncA/C plasmid pN418. Then, the CMY-2 IncA/C plasmid pN418 was introduced by conjugation into SGI1-F-carrying *S. Albany* strain

7205.00 and plasmid pAM04528 was transferred by electroporation into the same SGI1 donor strain. For both plasmids no *E. coli* SGI1 transconjugants were obtained in 3 independent assays of SGI1 mobilization (Table 2). Control of conjugative transfer of helper plasmid was positive for pN418 and as suspected, negative for pAM04528. As expected, these results indicated that a non-self-transferable IncA/C plasmid, i.e. pAM04528 from *S. Newport*, was not able to mobilize *in trans* SGI1. However surprisingly, the CMY-2 MDR IncA/C plasmid pN418 from *S. Heidelberg*, which is self-transmissible, was also not able to mobilize SGI1. These two plasmids have been previously described in different studies and seemed to be very similar [7,8]. Thus, these data suggested that there might exist genetic differences between these two CMY-2 MDR IncA/C plasmids and also between the 2 others CMY-2 MDR IncA/C plasmids isolated from *E. coli* strains of this study that could explain the efficiency or not to mobilize SGI1. Moreover, the difference in SGI1 transfer rates ranging from 10^{-3} to 10^{-6} could be another result of transfer function differences between IncA/C plasmids. These results are in accordance with other studies which showed that transfer rates for different IncA/C plasmids can vary by as much as 10^4 fold [5,7,25].

A comparative genetic analysis of the large IncA/C MDR plasmids used in this study was set up based on restriction profile and comparison of two sequenced plasmids pRA1 and pAM04528 to assess their genetic relationship and to determine if their transfer efficiency could be explained by particular traits. According to the full-length sequences of plasmids pRA1 and pAM04528, enzymatic digestion of the historical and current IncA/C MDR plasmids was

performed using restriction enzyme *DraI*. Among the IncA/C MDR plasmids studied, the historical plasmids pR55, pR16, and pIP40a showed related *DraI* patterns being only different by few fragments of different sizes (Figure 1). The same result was also observed for the 4 current epidemic CMY-2 IncA/C MDR plasmids, i.e. p13956, p13688, pN418, and pAM04528 (Figure 1). However, this second set of plasmids presented really distinct profiles compared to the historical ones. Interestingly, the IncA/C reference plasmid pRA1 revealed a distinct *DraI* profile from all other IncA/C plasmids (Figure 1). Sequence comparison of the two sequenced IncA/C plasmids pRA1 and pAM04528 used in this study allowed to define a common IncA/C plasmid backbone between these 2 plasmids which represents around 100 kb in size indicated as an inner red circle in Figure 2. This common IncA/C plasmid backbone showed an overall genomic synteny and a nucleotide identity ranging from 88 to 94%. Moreover, the functional predictions inferred from the plasmid annotations

showed that this IncA/C backbone corresponds to essential functions of a plasmid lifestyle such as replication, maintenance, and conjugative transfer (Figure 2). The main regions of difference between these plasmids correspond to different antibiotic resistance gene clusters and insertion sequences as shown by the deviating nucleotide composition (Figure 2), which seem to be acquired by insertion/transposition events. It is worth to note that although a large common IncA/C backbone is shared, the *DraI* restriction profiles of these plasmids are very different from each other (Figure 1).

A recent study from Lindsey et al. showed that the combination of *Salmonella*, IncA/C plasmids, and MDR is very ancient. In their work, they demonstrated an interesting relation between the presence/absence of IncA/C MDR plasmids, the presence/absence of SGI1 and epidemic successful serovars of *S. enterica* like Typhimurium DT104 and Newport [6]. MDR plasmids belonging to the IncA/C family are widely distributed among

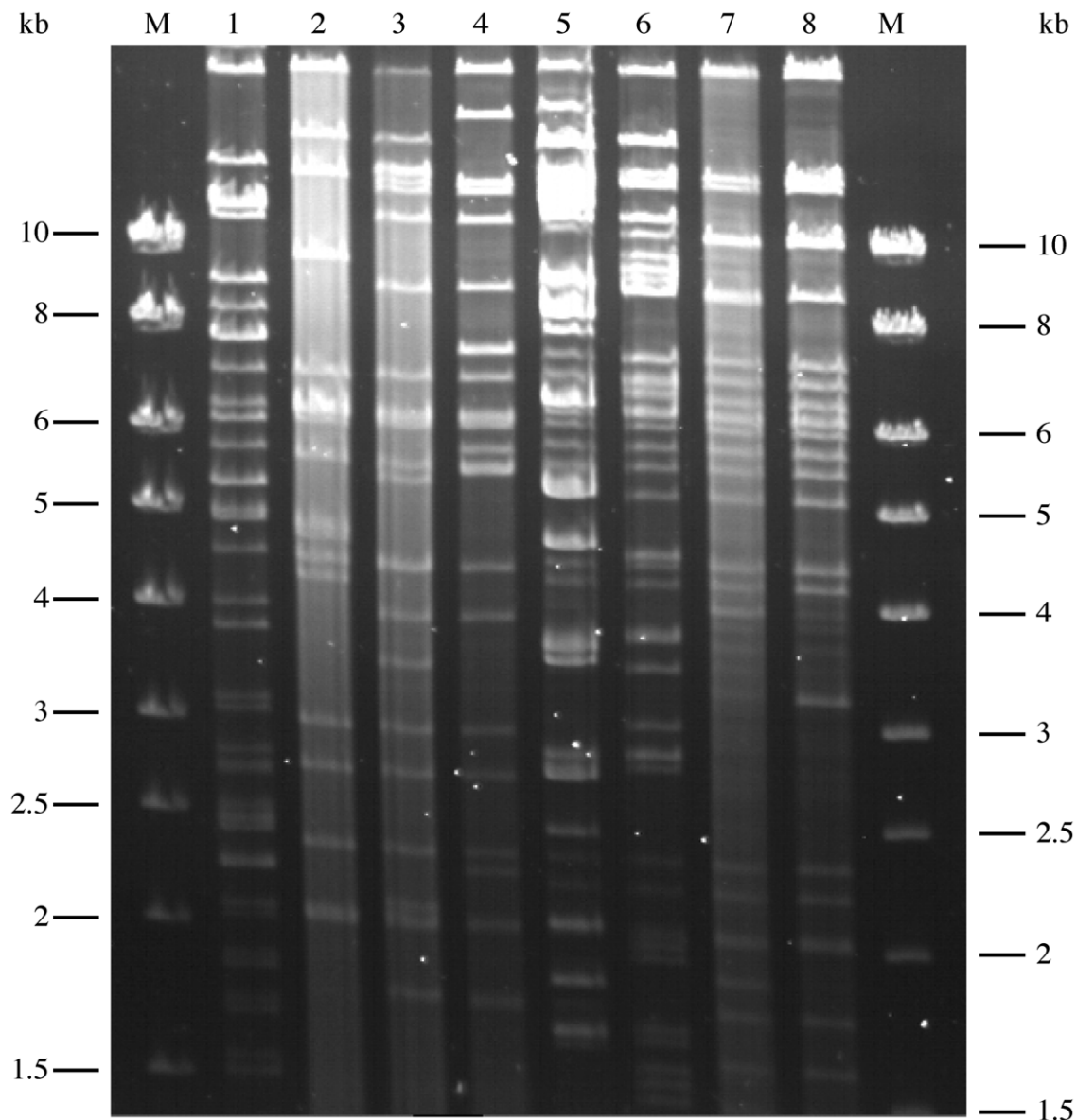


Figure 1. Restriction profile analysis of IncA/C plasmids digested by the restriction enzyme *DraI*. Lane 1, pRA1; lane 2, pR55; lane 3, pR16a; lane 4, pIP40a; lane 5, p13956; lane 6, p13688; lane 7, pN418; lane 8, pAM04528; M, kbp molecular marker (Smartladder, Eurogentec, Seraing, Belgium).

doi:10.1371/journal.pone.0015302.g001

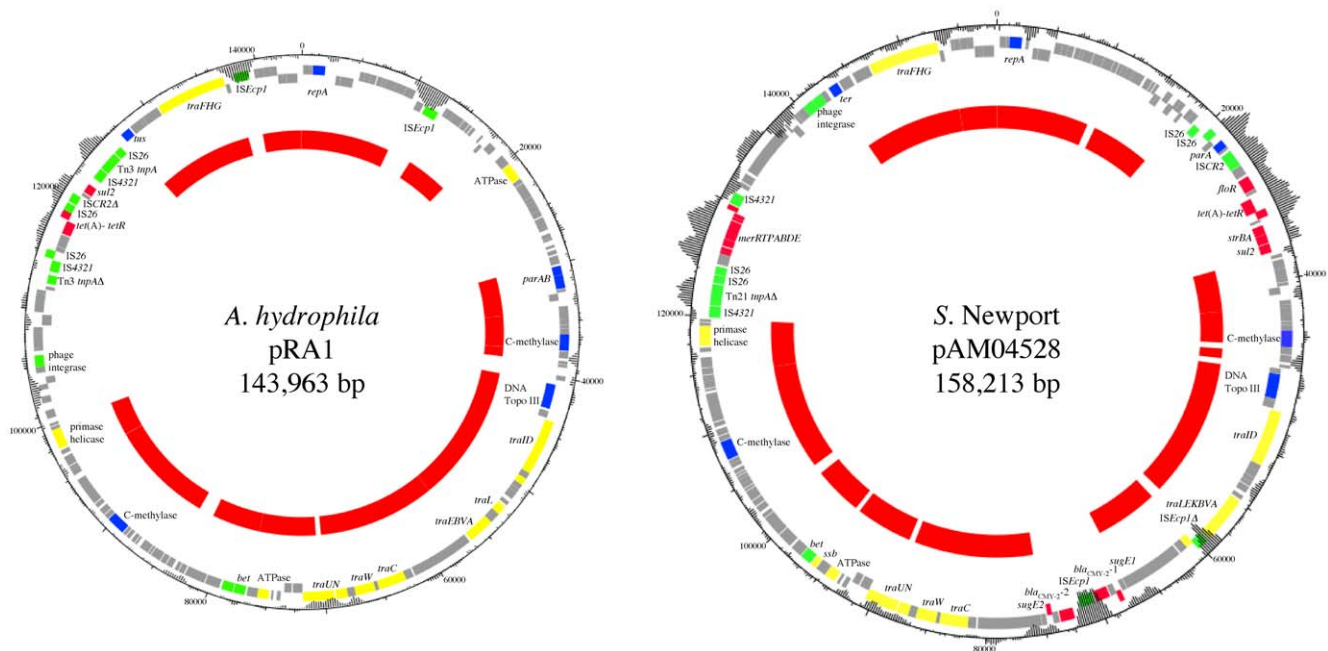


Figure 2. Circular representations of previously sequenced IncA/C plasmids pRA1 and pAM04528 and their common IncA/C backbone (red inner circle). Nucleotide composition (GC plot) is represented on each plasmid and genes were color coded, depending on functional annotations, as follows: plasmid replication/maintenance, blue; transposition/recombination, green; conjugative plasmid transfer, yellow; antimicrobial resistance, red; other functions/hypothetical proteins, gray. Distance scales in base pair are given around each map. Sequences and annotations of pRA1 and pAM04528 are accessible in GenBank database under accession numbers FJ705807 and FJ621587, respectively. doi:10.1371/journal.pone.0015302.g002

Salmonella and other Enterobacteriaceae from animal sources and have caused considerable concern in public health community [6,7]. Moreover, a stronger association of MDR with IncA/C replicon was observed in *Salmonella* than with other replicon types [6]. This association is probably related to a highly conserved IncA/C plasmid backbone into which horizontally acquired antibiotic resistance fragments were integrated in few sites [25].

An important trait for the epidemic spread of IncA/C plasmids lies in their conjugative self-transmissibility. Welch et al. demonstrated that a large majority of IncA/C plasmids found in *Salmonella* strains were able to transfer horizontally [25]. However, several studies showed that the conjugal transfer could not be demonstrated for all CMY-2 MDR IncA/C plasmids of epidemic *S. Newport* isolates in the U.S. [25]. Poole et al. also observed that CMY-2 MDR IncA/C plasmids from *Salmonella* strains rarely transferred when it was the only replicon detected in the donor strain [5]. Regarding the majority of large MDR IncA/C plasmids sequenced and their self-transferability when it is known, there are few differences, which could explain the conjugative efficiency or not. The only difference identified involving *tra* genes was a partial duplication of *traC* genes associated with the duplication of the *bla*_{CMY-2} locus in non-self-transferable plasmid identified in *S. Newport* isolates [7,8,25]. Only one larger fragment upstream of the *parAB* cluster is absent from pAM04528 but present on the IncA/C reference plasmid pRA1 [7]. However, this region contains several ORFs of unknown function and only one putative ATPase which could be implicated in transfer function. When transferability of sequenced plasmids were known, no correlation was observed between the presence of this region and the self-transferability [5,7,8]. The loss of transfer efficiency of current epidemic CMY-2 IncA/C plasmids of *S. Newport* isolates may be due to numerous insertion sequences present on these plasmids compared to historical ones. However, several questions remain to be answered: (i) Why the self-transferable IncA/C plasmid pN418 is unable to

mobilize SGI1; and (ii) What and/or where is the specific link between IncA/C transferability and SGI1 mobilization. To answer these questions, further studies need to be undertaken on specific transfer elements of SGI1 to connect them to IncA/C transfer functions.

In summary, we have shown that the MDR genomic island SGI1 is specifically mobilized *in trans* by the conjugative IncA/C plasmid family. Depending on the IncA/C plasmid used, the conjugative transfer of SGI1 occurred at frequencies ranging from 10^{-3} to 10^{-6} transconjugants per donor. Of particular concern, some large IncA/C MDR plasmids carrying the extended-spectrum cephalosporinase *bla*_{CMY-2} gene were shown to mobilize *in trans* SGI1. To the best of our knowledge, this study represents the first description of a specific relation between an incompatibility plasmid group and the specific mobilization of another mobile genetic element. Related IncA/C MDR plasmids have been detected in several fish pathogens such as *Aeromonas*, *Yersinia*, *Photobacterium*, *Edwardsiella* indicating that IncA/C plasmids mediates environmental MDR dissemination between bacteria from mammalian enteric flora and from aquatic ecosystem [7,8,25–27]. Thus, aquatic environment may be a favourable ecologic niche where horizontal transfer takes place between different bacterial genera. More than just their own dissemination, conjugative IncA/C plasmids may also contribute to the spread of the antibiotic resistance genomic island SGI1 and its close-derivatives among enteric pathogens and potentially more widely.

Materials and Methods

Bacterial strains, media, plasmids and antibiotic susceptibility testing

The *Salmonella* strains harbouring SGI1 or variants of it used in conjugation experiments are described in Table 1. *S. enterica* strains 959SA97 (serovar Agona harbouring SGI1), 47SA97 (serovar

Agona harbouring the SGI1-C variant), 7205.00 (serovar Albany harbouring the SGI1-F variant) were used as donor strains [15]. *E. coli* K-12 strain BM14 was used as recipient strain. All strains were grown at 37°C in brain heart infusion broth or agar plates. The *Salmonella-Shigella* (SS) medium with addition of appropriate antibiotics was used for selection of *S. enterica* donors and *E. coli* SGI1 transconjugants in mobilization experiments. Conjugative helper plasmids of different host origins used in mobilization experiments are listed in Table 1. These plasmids (except pAM04528 and pN418) have been previously described to be self-transmissible (Tra⁺) [see references in Table 1]. Donor, recipient, and transconjugant strains were screened for antibiotic resistance by the disk diffusion method on Mueller-Hinton agar plates [28]. Susceptibility was tested using disks containing the following antibiotics: Amx (10 µg), Chl (30 µg), Kan (30 IU), Gen (15 µg), Str (10 IU), Sul (200 µg), Tet (30 IU), Tmp (5 µg) and for third generation cephalosporins, ceftriaxone (30 µg), cefepime (30 µg), and ceftiofur (30 µg). All antibiotic disks were purchased from BioRad (Marnes la Coquette, France).

Bacterial conjugations

Bacterial conjugation was performed to introduce the different helper plasmids into the SGI1-containing *S. enterica* strains. Briefly, end-log exponential phase liquid cultures of an *E. coli* donor containing helper plasmid and a recipient SGI1-carrying *S. enterica* strain were mixed together in a approximately 1:4 ratio. After overnight incubation without shaking at 37°C, the mating was streaked on appropriate selective SS agar plates. Antibiotics for which resistances were conferred by SGI1, were used to select *Salmonella* SGI1 recipient strains and antibiotic resistances displayed by helper plasmids were chosen to select transconjugants.

SGI1 mobilization assays were performed by mixing *S. enterica* SGI1 donor strain harbouring different helper plasmid and the sodium azide-resistant *E. coli* recipient strain BM14 together with a donor-to-recipient ratio of 4:1. This broth was incubated overnight at 37°C without shaking. The next day, the cells were streaked on appropriate selective SS agar plates. Sodium azide (500 µg/ml) was used to select against *Salmonella* donor cells, and Str (50 µg/ml) and/or Tet (10 µg/ml) and/or Tmp (40 µg/ml) to select against unmated recipient cells. *Salmonella* donors in the mating were numbered on SS agar plates supplemented with antibiotics selecting for SGI1 (Str, Tet, Tmp) and the helper plasmid (antibiotic resistance only conferred by the plasmid and not by SGI1). Appropriate control plates were performed for the conjugative transfer of the helper plasmid in each mating experiment. The SGI1 frequency of transfer was determined by dividing the number of *E. coli* SGI1 transconjugants by the number of *Salmonella* donor cells.

SGI1 PCR detection, PCR-based replicon typing, IncA/C plasmid restriction profile, and sequence analysis

Detection of SGI1 and its location in *Salmonella* strains and in *E. coli* transconjugants were performed using primers corresponding

to the left and right junctions in the chromosome as described previously [15,23]. Primers U7-L12 (located in the *tmE* gene) and 104D (located in the *yidY* gene) corresponding to the *Salmonella* chromosome and primers EcU7-L12 and Ec104D (located in the *tnaL* gene) corresponding to the *E. coli* chromosome were used to assess SGI1 junctions in its specific attachment site in *Salmonella* and *E. coli*, respectively (Table S1).

Conjugative helper plasmids in *E. coli* donor strains were typed by the PCR-based replicon typing as previously described [3]. The same method was applied to confirm the presence of the different helper plasmids in the *Salmonella* SGI1 donor strains. Additional PCRs were performed to amplify known resistance genes carried by the helper plasmids especially for ESC resistance genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY}, and for phenicol resistance genes, *cat* and *floR* (Table S1).

To assess the genetic relationship between IncA/C helper plasmids used to mobilize SGI1, plasmid DNA was extracted and purified from *E. coli* host strains with the QIAGEN plasmid midi kit (Courtaboeuf, France) used according to the manufacturer's recommendations. According to the sequence of the IncA/C reference plasmid pRA1, plasmid DNA was digested with the restriction enzyme *DraI* (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Fragments of DNA were separated by electrophoresis in 0.6% ultra pure DNA grade Agarose gel (BioRad, Marnes la Coquette, France).

Sequence comparisons at the nucleotide level were carried out with the BLAST algorithm using the Artemis Comparison Tool [29]. Plasmid maps of pRA1 and pAM04528 were designed using DNA plotter according the annotations in GenBank database under accession numbers FJ705807 and FJ621587, respectively. Their common IncA/C backbone was assigned for region of high nucleotide identity and of genomic synteny.

Supporting Information

Table S1 SGI1 mobilization assays by different incompatibility group plasmids.
(DOC)

Acknowledgments

We thank I. Monchaux for expert technical assistance. We also thank A. Carattoli (Istituto Superiore di Sanita, Rome), P. Courvalin (Institut Pasteur, Paris), and the Health Protection Agency Culture Collections for providing reference plasmids of different incompatibility groups.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: AC BD. Performed the experiments: GD KP BD. Analyzed the data: GD KP BD. Contributed reagents/materials/analysis tools: GD KP AC BD. Wrote the paper: GD AC BD.

References

- Amabile-Cuevas CF, Chicurel ME (1992) Bacterial Plasmids and gene flux. *Cell* 70: 189–199.
- De la Cruz F, Frost LS, Meyer RJ, Zechner EL (2010) Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34: 18–40.
- Carattoli A, Bertini A, Vila L, Falbo V, Hopkins KL, et al. (2005) Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 63: 219–228.
- Carattoli A (2009) Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 2227–2238.
- Poole TL, Edrington TS, Brichtha-Harhay DM, Carattoli A, Anderson RC, et al. (2009) Conjugative transferability of the A/C plasmids from *Salmonella enterica* isolates that possess or lack *bla*_{CMY} in the A/C plasmid backbone. *Foodborne Path Dis* 6: 1185–1194.
- Lindsey RL, Fedorka-Cray PJ, Frye JG, Meinersmann RJ (2009) IncA/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant *Salmonella enterica* isolates. *Appl Environ Microbiol* 75: 1908–1915.
- Fricke WF, Welch TJ, McDermott PF, Mammel MK, LeClerc JE, et al. (2009) Comparative genomics of the IncA/C multidrug resistance plasmid family. *J Bacteriol* 191: 4750–4757.
- Call DR, Singer RS, Meng D, Broschat SL, Orfe LH, et al. (2010) *bla*_{CMY-2}-positive IncA/C plasmids from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are a distinct

- component of a larger lineage of plasmids. Antimicrob Agents Chemother 54: 590–596.
9. Meunier D, Jouy E, Lazizzera C, Doublet B, Kobisch M, et al. (2010) Plasmid-borne florfenicol and ceftiofur resistance encoded by the *floR* and *bla_{CMY-2}* genes in *Escherichia coli* isolates from diseased cattle in France. J Med Microbiol 59: 467–471.
 10. Boyd D, Peters GA, Cloeckaert A, Sidi Boumedine K, Chaslus-Dancla E, et al. (2001) Complete nucleotide sequence of a 43-kilobase genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and its identification in phage type DT120 and serovar Agona. J Bacteriol 183: 5725–5732.
 11. Mulvey MR, Boyd DA, Olson AB, Doublet B, Cloeckaert A (2006) The genetics of *Salmonella* genomic island 1. Microbes Infect 8: 1915–1922.
 12. Ahmed AM, Hussein AIA, Shimamoto T (2007) *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. J Antimicrob Chemother 59: 184–190.
 13. Boyd DA, Shi X, Hu QH, Ng LK, Doublet B, et al. (2008) *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1), Variant SGI1-I, and a New Variant SGI1-O in *Proteus mirabilis* Clinical and Food Isolates from China. Antimicrob Agents Chemother 52: 340–344.
 14. Doublet B, Poirel L, Praud K, Nordmann P, Cloeckaert A (2010) European clinical isolate of *Proteus mirabilis* harbouring the *Salmonella* genomic island 1 variant SGI1-O. J Antimicrob Chemother 65: 2260–2262.
 15. Doublet B, Boyd D, Mulvey MR, Cloeckaert A (2005) The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. Mol Microbiol 55: 1911–1924.
 16. Su LH, Chu C, Cloeckaert A, Chiu CH (2008) An epidemic of plasmids? Dissemination of extended-spectrum cephalosporinases among *Salmonella* and other Enterobacteriaceae. FEMS Immunol Med Microbiol 52: 155–168.
 17. Cloeckaert A, Praud K, Doublet B, Bertini A, Carattoli A, et al. (2007) Dissemination of an extended-spectrum- β -lactamase *bla_{TEM-52}* gene-carrying IncI1 plasmid in various *Salmonella enterica* serovars isolated from poultry and humans in Belgium and France between 2001 and 2005. Antimicrob Agents Chemother 51: 1872–1875.
 18. García Fernández A, Cloeckaert A, Bertini A, Praud K, Doublet B, et al. (2007) Comparative analysis of IncHI2 plasmids carrying *bla_{CTX-M-2}* or *bla_{CTX-M-9}* from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* strains isolated from poultry and humans. Antimicrob Agents Chemother 51: 4177–4180.
 19. Marcades G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, et al. (2009) Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. J Antimicrob Chemother 63: 67–71.
 20. Couturier M, Bex F, Bergquist PL, Maas WK (1988) Identification and classification of bacterial plasmids. Microbiol Reviews 52: 375–395.
 21. Chabbert YA, Scavizzi MR, Witchitz JL, Gerbaud GR, Bouanchaud DH (1972) Incompatibility groups and the classification of *f_I⁻* resistance factors. J Bacteriol 112: 666–675.
 22. Roussel A, Chabbert YA (1978) Taxonomy and epidemiology of Gram-negative bacterial plasmids studied by DNA-DNA filter hybridization in formamide. J Gen Microbiol 104: 269–276.
 23. Doublet B, Golding GR, Mulvey MR, Cloeckaert A (2008) Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable *Salmonella* genomic island 1. PLoS One 3: e2060.
 24. Witchitz JL, Chabbert YA (1971) Résistance transférable à la gentamicine. Ann Inst Pasteur 121: 733–742.
 25. Welch TJ, Fricke WF, McDermott PF, White DG, Rosso ML, et al. (2007) Multiple antimicrobial resistance in plague: an emerging public health risk. PLoS One 2: e309.
 26. McIntosh D, Cunningham M, Ji B, Fekete FA, Parry EM, et al. (2008) Transferable, multiple antibiotic and mercury resistance in Atlantic Canadian isolates of *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* is associated with carriage of an IncA/C plasmid similar to the *Salmonella enterica* plasmid pSN254. J Antimicrob Chemother 61: 1221–1228.
 27. Welch TJ, Evenhuis J, White DG, McDermott PF, Harbottle H, et al. (2009) IncA/C plasmid-mediated florfenicol resistance in the catfish pathogen *Edwardsiella ictaluri*. Antimicrob Agents Chemother 53: 845–846.
 28. Members of the SFM antibiogram committee (2003) comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie report 2003. Int J Antimicrob Agents 21: 364–391.
 29. Carver T, Berriman M, Tivey A, Patel C, Böhme U, et al. (2008) Artemis and ACT: viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. Bioinformatics 24: 2672–2676.
 30. Boyd D, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E, Mulvey MR (2002) Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. Antimicrob Agents Chemother 46: 1714–1722.
 31. Doublet B, Lailler R, Meunier D, Brisabois A, Boyd D, et al. (2003) Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. Emerg Infect Dis 9: 585–591.
 32. Aoki T, Egusa S, Ogata Y, Watanabe T (1971) Detection and resistance factors in fish pathogen *Aeromonas liquefaciens*. J Gen Microbiol 65: 343–349.
 33. Datta N, Hedges RW, Shaw EJ, Sykes RB, Richmond MH (1971) Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 108: 1244–1249.
 34. Cloeckaert A, Praud K, Lefevre M, Doublet B, Pardos M, et al. (2010) Extended-spectrum- β -lactamase *bla_{CTX-M-1}* gene-carrying IncI1 plasmid in *Salmonella enterica* isolates from poultry and humans in France, 2003–2008. Antimicrob Agents Chemother 54: 4484–4486.
 35. Weill FX, Lailler R, Praud K, Kérouanton A, Fabre L, et al. (2004) Emergence of extended-spectrum- β -lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* Serotype Virchow in Poultry and Humans in France. J Clin Microbiol 42: 5767–5773.

Annexe 5 :

Communication orale 1

**Identification of specific functions for the conjugal transfer of the mobile genomic island
Salmonella Genomic Island 1 (SGI1)**

Douard G., Doublet B., and Cloeckaert A.

International Symposium Salmonella and Salmonellosis, 29 juin 2010, Saint-Malo, France

Identification of specific functions for the conjugal transfer of the mobile genomic island *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1)

Gregory Douard, Benoît Doublet, and Axel Cloeckaert

INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, IASP, Nouzilly, F-37380, France

ABSTRACT

The *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) is an integrative mobilizable element (IME) of 43 kb originally identified in the epidemic multidrug-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 clone. The occurrence of SGI1 in several *S. enterica* serovars and recently in *Proteus mirabilis* has led to demonstrate its horizontal transfer potential by mobilization. Mobilization *in trans* to *Escherichia coli* or *Salmonella* recipient strains required the presence of a conjugative helper plasmid in the SGI1 donor strain. SGI1 was further shown to integrate site-specifically into the chromosome at the 3' end of the *trmE* (*thdF*) gene. Here, we have studied specific transfer functions required for the mobilization *in trans* of SGI1, i.e. the origin of transfer (*oriT*) and putative open reading frames (ORFs) of SGI1 involved in relaxosome formation. The *oriT*-containing region of SGI1 was first identified by mobilization assays of the non-conjugative plasmid pACYC184 containing several DNA fragments of 1 to 3 kb covering the entire SGI1 except the multidrug resistance region part. The *oriT* location was further specified on a 135 bp fragment located close to the putative helicase ORF S023 of SGI1. The absence of transfer of a SGI1 mutant deleted for this putative *oriT* region confirmed the *oriT* location. The two SGI1 ORFs, S023 and S024 (coding for a putative endonuclease) were suspected to participate in the relaxosome formation of SGI1 but, however, deletion of these did not result in a lack of transfer of SGI1 and thus suggested that they are not required for mobilization of SGI1. Other experiments are underway to localize precisely the nick site into the SGI1 *oriT* and to find other element(s) of SGI1 required for its mobilization.

INTRODUCTION

The 43-kb *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) is an integrative mobilizable element (IME) that was initially described in epidemic multidrug-resistant (MDR) *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT104 strains (3). SGI1 contains an antibiotic resistance gene cluster conferring resistance to ampicillin, chloramphenicol/florfenicol, streptomycin/spectinomycin, sulfonamides and tetracycline. This 13-kb SGI1 antibiotic resistance gene cluster is located near the 3' end of SGI1 and constitutes a complex class 1 integron that belongs to the In4 group and which has been named In104 (13). Since the identification of SGI1, several variants of the In104 integron have been described with more or less antibiotic resistance genes, classified in SGI1-A to SGI1-S (2, 9, 10, 14, 15). The generation of SGI1 variant MDR regions mostly appears to be a result of events that could have occurred by homologous recombination between conserved segments or by resistance gene cassette exchange (14). These variants have been identified in a wide variety of *S. enterica* serovars and also in

Proteus mirabilis clinical and food isolates (1, 4). The identification of SGI1 in *P. mirabilis* clinical isolates is of great concern as the spread of the SGI1 MDR phenotype could have significant clinical implications in pathogenic bacteria other than *Salmonella* (4). The mobility of SGI1 has been shown by the identification of an extrachromosomal circular form of the genomic island and by its transfer by conjugation from *S. enterica* donor strains to non-SGI1 *S. enterica* and *Escherichia coli* recipient strains where it integrated into the recipient chromosome in a site-specific manner. After excision of SGI1 from the *Salmonella* chromosome, the conjugative mobilization *in trans* by the IncA/C helper plasmid R55 occurs between donor and recipient strains. In the recipient cell, the circular form of SGI1 integrates in a site-specific manner at the 3' end of the chromosomal *trmE* gene also named *thdF* (7). However, SGI1 was also shown, during *in vitro* conjugation experiments with a $\Delta thdF$ *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 recipient strain, to integrate specifically into a secondary specific attachment site, which is

located in the intergenic region between the chromosomal *sodB* and *purR* genes (8). SGI1 was thus classified within the group of site-specific IMEs that are related to integrative conjugative elements.

In conjugative systems, most of the proteins involved in conjugation are encoded by plasmid genes located in the *tra* (transfer) region. This region contains genes coding for proteins which participate in mating-pair formation and DNA processing and transport (11). The mating pair formation requires the formation of a pilus in the donor cell that is assembled by a type IV secretion system, named the transferosome. A nucleoprotein complex called the relaxosome is involved in processing the DNA and delivering it to the transferosome. The relaxosome is formed by the interaction between the relaxase and other auxiliary transfer proteins with the origin of transfer (*oriT*), a DNA fragment of several hundreds bp in length usually. Briefly, the relaxase cleaves the DNA in a site- and strand-specific manner at the nick site allowing the transfer of a single-stranded DNA (6, 11).

Mobilizable elements usually carry an *oriT* and some *mob* genes, essentially genes coding proteins involved in DNA processing, but the transfer of mobilizable elements requires a co-resident conjugative plasmid to supply other essential transfer functions like the pilus formation (12).

SGI1 like other mobilizable elements would contain an *oriT* and *mob* genes involved in relaxosome formation and/or recognition/cleavage of *oriT* for its conjugative transfer. Six SGI1 ORFs are potentially involved in conjugative transfer: putative *traN*, *traG*, *traH* and ATPase genes and S023 and S024 ORFs, coding for putative helicase and endonuclease proteins, respectively. The aim of this study was to identify and characterize the *oriT* of SGI1 and investigate the roles of S023 and S024, and other ORFs potentially involved in the transfer of SGI1.

MATERIAL AND METHODS

Cloning of SGI1 fragments into pACYC184

To find the location of the SGI1 *oriT*, 14 SGI1 fragments of 1 to 3 kb covering the entire genomic island except the multidrug resistance

region part were PCR amplified and cloned into the non mobilizable vector pACYC184 (tetracycline Tc, chloramphenicol Cm). These constructions were then introduced in the *S. Agona* 47SA97 strain carrying the SGI1-C variant (streptomycin Sm, sulfonamide Sul) and the IncA/C helper plasmid R55 (ampicillin Ap, Cm, florfenicol Ff, kanamycin Km, gentamicin Gm, Sul). These strains were used in mobilization assays described below. Further truncations of the fragment able to transfer pACYC184 were done by PCR amplification and then cloned into pACYC184. These constructions were also tested in mobilization assays and enabled to determine the minimal SGI1 *oriT* region.

Gene inactivation

To identify the potential role of SGI1 ORFs in the mobilization of the genomic island, the Datsenko and Wanner gene inactivation method (5) was used to replace these ORFs in *S. Agona* strain 47SA97 by a kanamycin resistance gene cassette. The cassette was then eliminated by the same method (5). In a first time, 4 SGI1 ORFs were particularly targeted because of their potential role in transfer of SGI1: S023 and S024 which code respectively for putative helicase and endonuclease proteins and, *traG* and *traH* genes which code for proteins involved in pilus formation. In the same manner, the putative SGI1 *oriT* identified by the pACYC184 mobilization experiments was deleted on the genomic island. These mutants were used in SGI1 mobilization assays described above.

Mobilization experiments

Mobilization assays were realized by mixing end-log-phase cultures of donor and recipient strains within a donor to recipient ratio of 4:1. After overnight mating, transconjugants and donors were numbered on *Salmonella-Shigella* (SS)-agar plates with appropriate antibiotics. The transfer frequency were estimated by the calculation of the ratio transconjugants/donors. To identify the SGI1 *oriT*, conjugation experiments were done between *S. Agona* 47SA97 donor strains containing the SGI1-C variant, the helper plasmid R55 and the different pACYC184 constructions, and sodium azide-resistant *E. coli* BM14 recipient strains. *Salmonella* donors were selected by

Sm (50µg/mL), Km (50µg/mL) and Tc (10µg/mL). pACYC184-containing *E. coli* transconjugants were selected by Tc and sodium azide (200µg/mL). Conjugation controls were realized with the same mating to ensure that conjugative transfer could occur at a measurable frequency between donor and recipient strains. These controls were done for the helper plasmid R55 and SGI1 *E. coli* transconjugants using Km and sodium azide, and Sm and sodium azide respectively.

Deletions in SGI1 were used in mobilization assays to confirm the location of the *oriT* region and to study the involvement of suspected ORFs. In the same manner, *S. Agona* 47SA97 wild type or mutant strains carrying the helper plasmid R55 were mixed with sodium azide-resistant *E. coli* BM14 recipient strains. Transconjugants and donors were selected on SS-agar plates containing Sm and sodium azide for the transconjugants or containing Sm and Km for the donors.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of the SGI1 *oriT*

Among the 14 SGI1 fragments cloned into pACYC184, only one of 2829 bp allowed to mobilize pACYC184 with a transfer frequency of 1.2×10^{-4} . The vector alone or with other SGI1 fragments was not mobilized (transfer frequency $< 10^{-7}$). This fragment contains the SGI1 region spanning from ORFs S020 to S023. To reduce the size of this *oriT*-containing region, this 2829-bp fragment was used to create further truncations in its 5' or 3' end to identify the minimal *oriT* region required for SGI1 mobilization. Gradually, by cloning 8 different truncated fragments into pACYC184, a 135-bp fragment was identified as the smallest region of SGI1 which allowed mobilization of pACYC184 at the same frequency as that observed with the larger region. This 135-bp region contains 3 inverted repeat sequences: two perfect 7 bp and 12 bp inverted repeat, and a 12 bp inverted repeats with one mismatch located into the central portion of the structure. These 3 inverted repeats could form a cruciform secondary structure constituting potential recognition sites for relaxosome proteins. The minimal 135-bp *oriT* region was confirmed by its deletion in SGI1-C of *S. Agona* strain 47SA97

resulting in a strong decrease of the conjugative transfer ability of SGI1.

Involvement of SGI1-encoded protein(s) in mobilization

The *oriT*-containing pACYC184 mobilization assay was also performed using a RecA- *E. coli* donor strain DH1. Mobilization of SGI1 or *oriT*-containing pACYC184 was also obtained at a similar frequency as using *S. enterica* donor strain. However, in the absence of SGI1 but with the helper plasmid R55, the SGI1 *oriT*-containing pACYC184 could not be mobilized (transfer frequency $< 10^{-7}$). This result suggested that SGI1-encoded protein(s) are involved in its mobilization. Among these, the two ORFs S023 and S024 located downstream of the *oriT*, coding for putative helicase and endonuclease proteins respectively, were studied. However, deletions of these ORFs in SGI1-C of *S. Agona* strain 47SA97 did not result, as it would have been expected, in the loss of transfer ability of SGI1. Deletions of the *traG* and *traH* genes in the same strain coding for putative pilus assembly proteins did also not have an effect on the SGI1 mobilization (same transfer frequency as parental strain). The study of two other SGI1 genes potentially involved in its mobilization, *traN*, which codes for a putative mating pair stabilization protein and S026 coding for a putative ATPase, are underway.

CONCLUSION

The SGI1 origin of transfer was located into a 135-bp region downstream of ORF S023. This region, shown to be essential for its mobilization, contains 3 inverted repeats which constitutes potential recognition sites for relaxosome proteins responsible for single strand specific cleavage at the *nic* site and for starting the conjugation mechanism. But neither SGI1 ORFs S023 and S024 nor *traG* and *traH* genes seemed to be essential for SGI1 mobilization. However, the presence of SGI1 was shown to be necessary for the mobilization of the SGI1 *oriT*-containing pACYC184 plasmid. Other experiments are underway to localize precisely the nick site into the SGI1 *oriT* and to find other element(s) of SGI1 required for its mobilization.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank Karine Praud and Isabelle Monchaux for their expert technical assistance.

REFERENCES

1. **Ahmed, A. M., A. I. Hussein, and T. Shimamoto.** 2007. *Proteus mirabilis* clinical isolate harbouring a new variant of *Salmonella* genomic island 1 containing the multiple antibiotic resistance region. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**:184-90.
2. **Boyd, D., A. Cloeckaert, E. Chaslus-Dancla, and M. R. Mulvey.** 2002. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**:1714-22.
3. **Boyd, D. A., G. A. Peters, L. Ng, and M. R. Mulvey.** 2000. Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters* **189**:285-91.
4. **Boyd, D. A., X. Shi, Q. H. Hu, L. K. Ng, B. Doublet, A. Cloeckaert, and M. R. Mulvey.** 2008. *Salmonella* genomic island 1 (SGI1), variant SGI1-I, and new variant SGI1-O in *proteus mirabilis* clinical and food isolates from China. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:340-4.
5. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:6640-5.
6. **De la Cruz, F., L. S. Frost, R. J. Meyer, and E. L. Zechner.** Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **34**:18-40.
7. **Doublet, B., D. Boyd, M. R. Mulvey, and A. Cloeckaert.** 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Molecular Microbiology* **55**:1911-24.
8. **Doublet, B., G. R. Golding, M. R. Mulvey, and A. Cloeckaert.** 2008. Secondary chromosomal attachment site and tandem integration of the mobilizable *Salmonella* genomic island 1. *PLoS One* **3**:e2060.
9. **Doublet, B., R. Lailier, D. Meunier, A. Brisabois, D. Boyd, M. R. Mulvey, E. Chaslus-Dancla, and A. Cloeckaert.** 2003. Variant *Salmonella* genomic island 1 antibiotic resistance gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Albany. *Emerging Infectious Diseases* **9**:585-91.
10. **Doublet, B., K. Praud, F. X. Weill, and A. Cloeckaert.** 2009. Association of IS26-composite transposons and complex In4-type integrons generates novel multidrug resistance loci in *Salmonella* genomic island 1. *J Antimicrob Chemother* **63**:282-9.
11. **Gomis-Ruth, F. X., and M. Coll.** 2006. Cut and move: protein machinery for DNA processing in bacterial conjugation. *Current Opinion in Structural Biology* **16**:744-52.
12. **Lanka, E., and B. M. Wilkins.** 1995. DNA processing reactions in bacterial conjugation. *Annual Review of Biochemistry* **64**:141-69.
13. **Levings, R. S., D. Lightfoot, S. R. Partridge, R. M. Hall, and S. P. Djordjevic.** 2005. The genomic island SGI1, containing the multiple antibiotic resistance region of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 or variants of it, is widely distributed in other *S. enterica* serovars. *Journal of Bacteriology* **187**:4401-9.
14. **Mulvey, M. R., D. A. Boyd, A. B. Olson, B. Doublet, and A. Cloeckaert.** 2006. The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes and Infection* **8**:1915-22.
15. **Vo, A. T., E. van Duijkeren, A. C. Fluit, and W. Gaastra.** 2007. A novel *Salmonella* genomic island 1 and rare integron types in *Salmonella* Typhimurium isolates from horses in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **59**:594-9.

Annexe 6 :

Communication orale 2

**Identification of specific functions for the conjugal transfer of the mobile genomic island
Salmonella Genomic Island 1 (SGI1)**

Douard G., Doublet B., and Cloeckaert A.

Forum des écoles doctorales, 30 juin 2010, Tours, France

Identification of specific functions for the conjugal transfer of the mobile genomic island *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1)

Grégory Douard*, Benoît Doublet, Axel Cloeckeaert

*INRA, UR1282, Infectiologie Animale et Santé Publique, IASP, Nouzilly, F-37380, France
gregory.douard@tours.inra.fr

Abstract

The *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) is an integrative mobilizable element (IME) of 43 Kb originally identified in the epidemic multidrug-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104 clone (Boyd *et al.*, 2000). The occurrence of SGI1 in several *S. enterica* serovars and recently in *Proteus mirabilis* has led to demonstrate its horizontal transfer potential by mobilization (Doublet *et al.*, 2005; Mulvey *et al.*, 2006). Mobilization in *trans* to *Escherichia coli* or *Salmonella* recipient strains required the presence of a conjugative helper plasmid in the SGI1 donor strain. SGI1 was further shown to integrate site-specifically into the chromosome at the 3' end of the *trmE* gene also named *thdF*. SGI1 was thus classified within the group of site-specific IMEs that are related to integrative conjugative elements (Doublet *et al.*, 2005).

In conjugative systems, most of the proteins involved in conjugation are encoded by plasmid genes located in the *tra* (transfer) region. This region contains genes coding for proteins which participate in mating-pair formation and DNA processing and transport. The mating pair formation requires the formation of a pilus in the donor cell that is assembled by a type IV secretion system, named the transferosome. A nucleoprotein complex called the relaxosome is involved in processing the DNA and delivering it to the transferosome. The relaxosome is formed by the interaction between the relaxase and other auxiliary transfer proteins with the origin of transfer (*oriT*), a DNA fragment of several hundreds bp in length usually. Briefly, the relaxase cleaves the DNA in a site- and strand-specific manner at the nick site allowing the transfer of a single-stranded DNA (De la cruz *et al.*, 2010).

Mobilizable elements usually carry an *oriT* and some *mob* genes, essentially genes coding proteins involved in DNA processing, but the transfer of mobilizable elements requires a coresident conjugative plasmid to supply other essential transfer functions like the pilus formation (De la cruz *et al.*, 2010).

SGI1 like other mobilizable elements would contain an *oriT* and *mob* genes involved in relaxosome formation and/or recognition/cleavage of *oriT* for its conjugative transfer. Six SGI1 ORFs are potentially involved in conjugative transfer: putative *traN*, *traG*, *traH* and ATPase genes and S023 and S024 ORFs, coding for putative helicase and endonuclease proteins, respectively. The aim of this study was to identify and characterize the *oriT* of SGI1 and investigate the roles of S023 and S024, and other ORFs potentially involved in the transfer of SGI1.

To find the location of the SGI1 *oriT*, 14 SGI1 fragments of 1 to 3 kb covering the entire genomic island except the multidrug resistance region part were PCR amplified and cloned into the non mobilizable vector pACYC184. These constructions were used in mobilization

assays from a *Salmonella* donor strain carrying the SGI1-C variant and the IncA/C helper plasmid R55. Among the 14 SGI1 fragments cloned into pACYC184, only one of 2829 bp allowed to mobilize pACYC184 with a transfer frequency of 1.2×10^{-4} . The vector alone or with other SGI1 fragments was not mobilized (transfer frequency $<10^{-7}$). This fragment contains the SGI1 region spanning from ORFs S020 to S023. To reduce the size of this *oriT*-containing region, this 2829-bp fragment was used to create further truncations in its 5' or 3' end to identify the minimal *oriT* region required for SGI1 mobilization. Gradually, by cloning 8 different truncated fragments into pACYC184, a 135-bp fragment was identified as the smallest region of SGI1 which allowed mobilization of pACYC184 at the same frequency as that observed with the larger region. The minimal 135-bp *oriT* region was confirmed by its deletion in SGI1-C of *S. Agona* strain 47SA97 resulting in a strong decrease of the conjugative transfer ability of SGI1.

The *oriT*-containing pACYC184 mobilization assay was also performed using a RecA- *E. coli* donor strain DH1. Mobilization of SGI1 or *oriT*-containing pACYC184 was also obtained at a similar frequency as using *S. enterica* donor strain. However, in the absence of SGI1 but with the helper plasmid R55, the SGI1 *oriT*-containing pACYC184 could not be mobilized (transfer frequency $<10^{-7}$). This result suggested that SGI1-encoded protein(s) are involved in its mobilization. Among these, the two ORFs S023 and S024 located downstream of the *oriT*, coding for putative helicase and endonuclease proteins respectively, were studied. However, deletions of these ORFs in SGI1-C of *S. Agona* strain 47SA97 did not result, as it would have been expected, in the loss of transfer ability of SGI1. Deletions of the *traG* and *traH* genes in the same strain coding for putative pilus assembly proteins did also not have an effect on the SGI1 mobilization (same transfer frequency as parental strain).

The study of two other SGI1 genes potentially involved in its mobilization, *traN*, which codes for a putative mating pair stabilization protein and S026 coding for a putative ATPase, are underway, as well as other experiments to localize precisely the nick site into the SGI1 *oriT*.

References

- Boyd, D. A., G. A. Peters, L. Ng, and M. R. Mulvey (2000). Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters*, 189:285-91.
- De la Cruz, F., L. S. Frost, R. J. Meyer, and E. L. Zechner (2010). Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 34:18-40.
- Doublet, B., D. Boyd, M. R. Mulvey, and A. Cloeckaert (2005). The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. *Molecular Microbiology*, 55:1911-24.
- Mulvey, M. R., D. A. Boyd, A. B. Olson, B. Doublet, and A. Cloeckaert (2006). The genetics of *Salmonella* genomic island 1. *Microbes and Infection*, 8:1915-22.

Annexe 7 :

Communication écrite

**Identification and characterization of the origin of transfer (*oriT*)
region required for the mobilization of the *Salmonella* genomic island 1**

Douard G., Doublet B., and Cloeckaert A.

Journées des microbiologistes de l'INRA, 5, 6 et 7 Mai 2010, Poitiers, France

The *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) is an integrative mobilizable element initially identified in epidemic multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. SGI1 contains a complex class 1 integron, which is able to confer various multidrug resistance phenotypes due to its genetic plasticity. SGI1 has been found in 14 *S. enterica* serovars and most recently also in *Proteus mirabilis*. The mobility of SGI1 has been shown to occur by conjugative mobilization *in trans*. Briefly, after excision from the chromosome, SGI1 transfers horizontally by conjugation in the presence of a conjugative helper plasmid in the donor cell and integrates site specifically into the chromosome of the recipient cell. The helper plasmid supplies *tra* genes necessary to conjugative transfer lacking on the SGI1 genomic island. As an *in trans* mobilizable element, SGI1 would possess, at least, an origin of transfer (*oriT*) and probably encode mobilization protein(s) interacting with it. The purpose of this study was to identify the *oriT* and SGI1-encoded genes required for its conjugative mobilization.

Methods:

- Fourteen fragments covering entire SGI1, except the integron part, were cloned into a non-mobilizable vector (pACYC184).
- These constructions were tested in mobilization assays in presence of SGI1 and the conjugative helper plasmid R55.
- The size of the putative *oriT* containing region was reduced up to the minimal region allowed for the conjugative transfer of pACYC184.
- The minimal *oriT* region was deleted in SGI1 to confirm its involvement in mobilization.
- Several SGI1-encoded ORFs potentially involved in mobilization were deleted and the resulting mutants were tested in SGI1 mobilization assays.

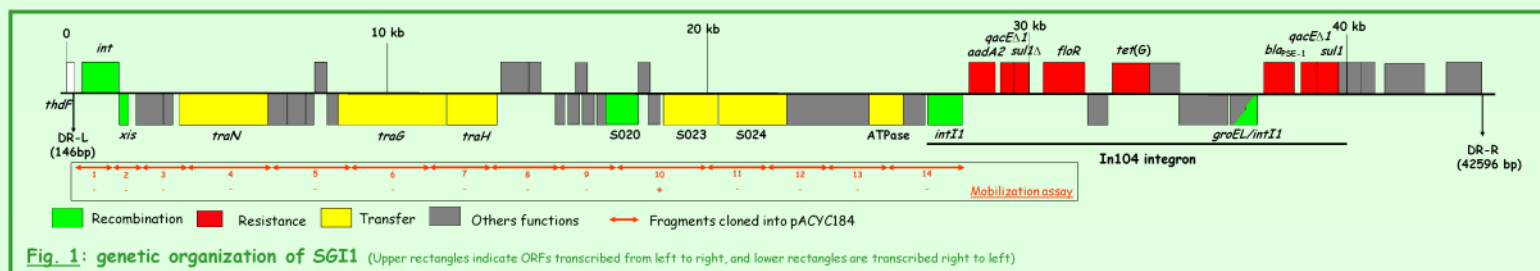


Fig. 1: genetic organization of SGI1 (Upper rectangles indicate ORFs transcribed from left to right, and lower rectangles are transcribed right to left)

Results:

1) Localization of the SGI1 *oriT*

Among the 14 SGI1 fragments cloned into pACYC184 (fig 1), only fragment 10 allowed to increase significantly the transfer frequency of pACYC184 when SGI1 and the helper plasmid R55 were present in the donor cell. Using this approach, a 135-bp fragment in the S020-S023 intergenic region was designated as the minimal SGI1 (fig 2). The 135-bp SGI1 *oriT* increased by around 1000 times of magnitude the transfer frequency of the vector pACYC184.

The deletion of this 135-bp region in SGI1 abolished its conjugative transfer despite of the presence of the helper plasmid R55 in the donor strain (fig 3b).

2) Involvement of SGI1-encoded protein(s) in mobilization

In the absence of SGI1, the SGI1 *oriT*-containing pACYC184 could not be mobilized (Fig 3a). This result suggested that SGI1-encoded protein(s) are likely involved in its mobilization. Among these, the two ORFs S023 and S024 located upstream of the *oriT* identified, coding for putative helicase and endonuclease proteins respectively, were studied. However, deletions of these ORFs in SGI1 did not abolish the SGI1 mobilization. Deletions of the *traG* and *traH* genes coding for putative pilus assembly proteins did also not have an effect on the SGI1 mobilization (fig 3b).

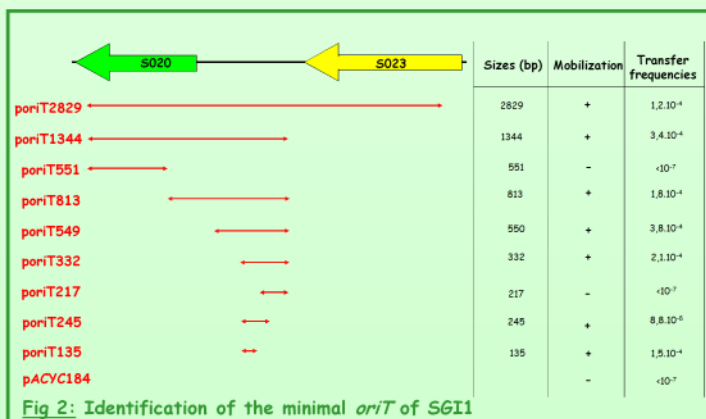


Fig 2: Identification of the minimal *oriT* of SGI1

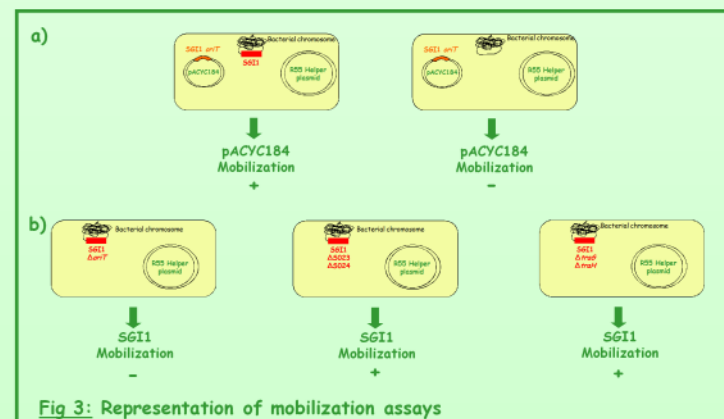


Fig 3: Representation of mobilization assays

Conclusions:

The SGI1 transfer origin was located into a 135-bp region in the intergenic region between ORFs S020 and S023. This region contains 3 inverted repeats (fig 4) which constitute potential recognition sites to relaxosome proteins responsible for starting the conjugation mechanism. But neither SGI1 ORFs S023 and S024 nor *traG* and *traH* genes seemed to be essential for SGI1 mobilization. However, the presence of SGI1 was shown to be necessary for the mobilization of the SGI1 *oriT*-containing pACYC184 plasmid. Other experiments are underway to localize precisely the nick site into the SGI1 *oriT* and to find other element(s) of SGI1 required for its mobilization.

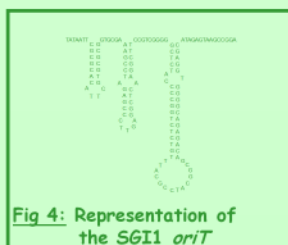


Fig 4: Representation of the SGI1 *oriT*



Grégory DOUARD

MÉCANISMES MOLÉCULAIRES IMPLIQUÉS DANS
LE TRANSFERT HORIZONTAL DE L'ÎLOT
GÉNOMIQUE DE MULTI-RÉSISTANCE AUX
ANTIBIOTIQUES *SALMONELLA* GENOMIC ISLAND 1



Résumé

L'îlot génomique SGI1 est un élément intégratif mobilisable identifié initialement chez le clone épidémique penta-résistant de *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. La présence de SGI1 chez différents sérotypes de *Salmonella* et chez *Proteus mirabilis* a conduit à démontrer son transfert conjugatif. SGI1 s'excise du chromosome pour former un intermédiaire circulaire capable d'être mobilisé *in trans* par un élément conjugatif corésident. Dans la bactérie réceptrice, SGI1 s'intègre de manière site-spécifique grâce à l'intégrase codée par l'îlot. L'objectif de ce travail était d'étudier les mécanismes impliqués dans la mobilisation de l'îlot génomique. Des expériences de mobilisation de SGI1 avec des plasmides de différents groupes d'incompatibilités ont montré que seuls les plasmides de résistance du groupe IncA/C étaient capables de mobiliser l'îlot génomique. L'origine de transfert (*oriT*) de SGI1 a été identifiée sur un fragment de 135 pb capable de rendre mobilisable un plasmide non mobile. La diminution du transfert de SGI1 dépourvu de ce fragment a permis de confirmer la localisation de l'*oriT*. L'implication de l'ORF S020 dans le transfert de l'îlot a aussi été démontrée. Une autre région comprise entre les ORF S013 et S019 contient un élément indispensable au transfert de l'îlot. L'identification des différents composants moléculaires impliqués dans la mobilisation de SGI1 est une étape importante pour comprendre la dissémination de l'îlot génomique.

Mots-clés : *Salmonella*, SGI1, mobilisation, relaxosome, protéines, origine de transfert

Abstract

The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element (IME) originally identified in epidemic multidrug-resistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. The occurrence of SGI1 in several *S. enterica* serovars and recently in *Proteus mirabilis* has led to demonstrate its horizontal transfer. SGI1 excises from the donor chromosome to form a circular extrachromosomal intermediate that can be mobilized *in trans* to the recipient. SGI1 integrates site-specifically into the chromosome at the 3' end of the *trmE* gene. Here, we have studied the mechanism of conjugative transfer of SGI1. First, we have shown by SGI1 mobilization assays with different plasmid incompatibility groups that only multidrug-resistance IncA/C plasmids were able to mobilize SGI1. The transfer origin of SGI1 has been located on a 135 bp DNA region by mobilization assays of a non mobile plasmid containing this region. The decrease in transfer frequency of a SGI1 lacking this putative *oriT* region confirmed this location. The involvement in the SGI1 transfer of the S020 ORF coding for a putative integrase was also demonstrated. One other region located between S013-S019 ORFs contained an element required for SGI1 mobilization. The identification of the different molecular components involved in SGI1 mobilization is an important step for understanding the dissemination of the genomic island.

Keywords: *Salmonella*, SGI1, mobilization, relaxosome, proteins, transfer origin