UNIVERSITÉ DE TOURS

ÉCOLE DOCTORALE *SSBCV*

UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, INRAE Centre Val de Loire

Équipe Plasticité Génomique, Biodiversité, Antibiorésistance

THÈSE présentée par :

Marine C. PONS

Soutenue le : **23 Juin 2022**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Tours**

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

Rôle de la réponse SOS dans le transfert conjugatif et le maintien dans le génome de *Salmonella* Genomic Island 1

THÈSE dirigée par :

Dr. DOUBLET Benoît	Directeur de Recherche, INRAE (Tours, France)

Co-dirigée par :

Dr. CLOECKAERT Axel	Directeur de Recherche, INRAE (Tours, France)

RAPPORTEURS :

Dr. BAHAROGLU Zeynep	Chargée de Recherche, HDR, Institut Pasteur (Paris, France)
Pr. BURRUS Vincent	Professeur, Université de Sherbrooke (Sherbrooke, Canada)

JURY :

Dr. BAHAROGLU Zeynep	Chargée de Recherche, HDR, Institut Pasteur (Paris, France)
Pr. BURRUS Vincent	Professeur, Université de Sherbrooke (Sherbrooke, Canada)
Dr. CLOECKAERT Axel	Directeur de Recherche, INRAE (Tours, France)
Dr. DOUBLET Benoît	Directeur de Recherche, INRAE (Tours, France)
Dr. HERNIOU Elisabeth	Directrice de Recherche CNRS (Tours, France)
Dr. LAABERKI Maria-Halima	Enseignante-Chercheuse, HDR, Vetagro Sup (Lyon, France)

Remerciements

Ce travail de thèse a pu être réalisé grâce au soutien financier du département MICA de INRAE et de la région Centre Val de Loire au sein de l'équipe Plasticité Génomique, Biodiversité et Antibiorésistance (PGBA) du centre INRAE de Tours sous la direction de ***Benoît Doublet*** *et* ***Axel Cloeckaert.***

Je voudrais tout d'abord remercier mes encadrants de thèse ***Benoît Doublet*** *et* ***Axel Cloeckaert*** *sans qui ce travail n'aurait pas été possible. Je tiens à t'exprimer,* ***Benoît****, toute ma gratitude pour ta confiance, ton encadrement, ta disponibilité et surtout ta positivité au cours de ces années de thèse. Merci* ***Axel*** *pour ta culture et ton exigence scientifique ainsi que pour le partage de tes prouesses photographiques pour le moins insolites.*

Je voudrais ensuite remercier la Dr. ***Zeynep Baharoglu*** *et le Pr.* ***Vincent Burrus*** *pour avoir accepté d'être rapporteur de ce travail. Je remercie également la Dr.* ***Maria-Halima Laaberki*** *d'avoir accepté d'être examinatrice de ces travaux et la Dr.* ***Elisabeth Herniou*** *pour avoir accepté de présider mon jury.*

Je remercie tout particulièrement ***Karine Praud*** *pour ton aide sur les différentes expériences, ta gentillesse et la bonne humeur que tu as toujours apporté au laboratoire, cela a été un plaisir de travailler avec toi ! Je remercie également* ***Isabelle Foubert****,* ***Sébastien Leclercq****,* ***Cyril Conde,*** ***Thierry Cochard, Franck Biet*** *et* ***Michel Zygmunt*** *pour toutes les discutions (scientifiques et non scientifiques) qu'on a pu échanger au cours de ces années de thèse et pour la bonne ambiance de l'équipe. Merci* ***Sébastien*** *de m'avoir supportée pendant toutes ces années dans le bureau !* ***Cyril****, cela a été un plaisir d'avoir enfin l'arrivée dans l'équipe d'un thésard intéressé par la science ! Merci pour nos projets de décorations de bureaux, expériences scientifiques et autres (avec la participation de* ***Thierry****) !* ***Karine*** *et* ***Thierry****, merci pour la relecture ce manuscrit et la chasse aux fautes. Je remercie également les autres doctorants (et pas que) de mon laboratoire pour tous les bons moments qu'on a passé ensemble, les séances d'escalades et le soutien moral :* ***Aurélien Chuard*** *(président)* ***Adeline Ribeiro E Silva*** *(vice-présidente de cœur),* ***Tiffany Pézier****,* ***Guillaume Sadrin****,* ***Florian Tomal****,* ***Morgane Miclon****,* ***Nicolas Lamassiaude****,* ***Elise Courtot****,* ***Michel Boisseau****,* ***Marianne Nicolas*** *et* ***Michaël Kozercka****. Je remercie également les personnes du service d'appui à la recherche pour leur disponibilité, leur aide et leur bienveillance :* ***Brigitte Lambert****,* ***Véronique Legros****,* ***Lydie Bego****,* ***Stéphanie Salmon*** *et* ***Céline Musset****.*

*Je voudrais remercier **Sandra Da Re** de m'avoir accueillie à Limoges et de m'avoir formée pour les expériences d'EMSA. Je remercie **Yves Le Vern** et **Alix Sausset** de la plateforme Imagerie et Infectiologie pour les expériences de cytométrie. Je remercie également **Pierre Germon**, **David Pasdeloup** et **Olivier Grépinet** pour leurs formations au Fluidigm, au Zeiss et à la quantification de l'activité β-galactosidase respectivement.*

*Je remercie **François Cornet** de m'avoir accueillie dans son équipe pour mes stages de Master au cours desquels je souhaite remercier **Philippe Rousseau**, **Florian Fournès** et **Caroline Schiavon** pour leurs encadrements. J'ai également beaucoup apprécié mon expérience professionnelle à TWB et pour cela je tiens à remercier **Hélène Cordier** de m'avoir fait confiance. De ces années, je souhaite remercier **Lucie Crépin**, **Emilie Amillastré**, **Amélie Briane** et encore une fois **Caroline Schiavon**.*

*J'ai également de nombreux autres amis à remercier de la région Toulousaine. Merci à la team Saint Mich'Hell **Alexandre**, **Clémence**, **Coralie** et **Mathieu**, pour tous les bons moments qu'on a pu passer ensemble (notamment culinaire et vidéoludique). Je n'oublie pas non plus les **MABS** : **Noémie**, **Ben**, **Hugo**, **Thomas (Sapir)**, **Claire**, **Paul L.**, **Paul G.**, **JM**, **Julien** et tous les autres… Merci **Marie**, **Aurélie**, **Emilie** et **Laury** c'est toujours un plaisir de vous voir lorsque je suis de passage à Toulouse.*

*En fin, je voudrais profondément remercier mes parents **Patrick et Christine Pons** qui m'ont soutenue dans mes choix et donnée les moyens de réaliser de longues études.*

A la mémoire de mon grand-père Raymond Pons.

Résumé

Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) est un élément intégratif mobilisable porteur de gènes de résistance aux antibiotiques et spécifiquement mobilisé en trans par les plasmides conjugatifs des familles IncC et IncA. SGI1 détourne le système de conjugaison des plasmides pour sa mobilisation malgré l'incompatibilité observée lorsque SGI1 et les plasmides IncC sont présents dans la même cellule. Cette incompatibilité est causée par la réplication transitoire de SGI1 impliquant des facteurs issus des plasmides IncC mais également des activateurs transcriptionnels SgaDC de SGI1. SgaDC sont des homologues fonctionnels d'AcaDC, activateurs transcriptionnels centraux des plasmides IncC. Contrairement à *acaDC*, la régulation de l'expression de *sgaDC* n'a pas été caractérisée à ce jour.

Nous avons identifié la présence de plusieurs sites potentiels de fixation de la protéine LexA sur SGI1 et notamment dans la région promotrice putative de *sgaDC* suggérant une possible régulation de l'expression de *sgaDC* par la réponse SOS. L'objectif de ces travaux de thèse était d'étudier le rôle de la réponse SOS dans les interactions moléculaires entre SGI1 et les plasmides IncC.

En premier lieu, l'activation de la réponse SOS dans les cellules receveuses a été mise en évidence lors de l'entrée par conjugaison des plasmides IncC. Après avoir confirmé la fonctionnalité du site de fixation de LexA dans la région promotrice de *sgaDC*, nous avons démontré que l'induction de la réponse SOS active la transcription de *sgaDC* et par conséquent du régulon de gènes sous son contrôle. Finalement, via une méthode originale de conjugaison tripartite, l'implication de la réponse SOS a été démontrée dans la chronologie du transfert conjugatif de SGI1 et du détournement du système de conjugaison des plasmides IncC.

Mots-clés : SGI1, plasmides IncC, réponse SOS, IME, EGM

Abstract

Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) is a multidrug resistance integrative mobilizable element specifically mobilized in trans by IncC and IncA conjugative plasmids. SGI1 hijacks the IncC conjugation apparatus to be mobilized. However, these mobile elements are incompatible in bacterial population. This incompatibility is caused by SGI1 transient replication that involves, besides IncC/IncA factors, the SGI1 transcriptional activators SgaDC. SgaDC are functional homologues of the IncC master activator AcaDC proteins. Unlike *acaDC*, the regulation of *sgaCD* expression has not yet been characterized.

The identification of LexA binding motifs on SGI1, especially in the putative promoter region of *sgaDC*, suggested it may constitute a SOS response-regulated operon. Moreover, plasmid entry by conjugation as single-strand DNA in recipient bacteria is known to transiently activates the SOS response. The objective of the present work is to study the role of the SOS response in the molecular interactions between SGI1 and IncC plasmids.

We demonstrated that conjugative entry of IncC/IncA plasmids activates the SOS response in recipient cells. Through different molecular experiments, we confirmed that the LexA binding site in the *sgaDC* promoter region is functional, resulting in the control of its expression by the SOS response. Subsequently, several SGI1 genes implicated in its transfer and maintenance are induced in a SgaDC-dependent manner. Finally, we developed an original tripartite conjugation assay to decipher the role of the SOS response in the chronology of the SGI1 conjugative transfer and hijacking of the IncC conjugation system.

Keywords: SGI1, IncC plasmids, SOS response, IME, MGE

Table des matières

REMERCIEMENTS **3**

RESUME **9**

ABSTRACT **11**

TABLE DES MATIERES **13**

LISTE DES FIGURES **17**

LISTE DES TABLEAUX **21**

LISTE DES ANNEXES **21**

LISTE DES ABREVIATIONS **23**

INTRODUCTION **25**

I. PREAMBULE : LES RESISTANCES AUX ANTIBIOTIQUES 27

II. LES ELEMENTS GENETIQUES MOBILES 31

A. Diversité *31*

1. Mobilité intra-cellulaire 31

a. Cassette de gène / Intégron 31

b. IS / Transposon / IS*CR* 35

2. Mobilité inter-cellulaire 37

a. Les phages 37

b. ICE / IME 37

c. Les plasmides 43

B. Les plasmides : classification, stabilité et transfert *43*

1. Classification des plasmides 43

a. Historique 43

b. Classification des plasmides par PBRT et pMLST 45

c. Classification des plasmides par les relaxases : MOB 45

d. Classification des plasmides par les systèmes de partition : PAR-T 47

e. Classification des plasmides par PTU 47

2. Stabilité 47

a. Réplication 49

b. Partition 55

c. Résolution des dimères 61

d. Systèmes Toxine Antitoxine 63

e. Les systèmes de restriction-modification 69

3. Transfert 69

a. Généralités et principes 69

b. Les systèmes de conjugaison 71
4. Incompatibilité entre réplicons 73
III. LES EGMS D'INTERET : SGI1 ET LES PLASMIDES INCA & INCC 77
A. Les plasmides IncC & IncA 77
B. Salmonella Genomic Island 1 81
1. Historique et découverte 81
2. Diversité des SGI1 et éléments apparentés 83
3. SGI1 et plasmides IncC / IncA 87
a. Mobilisation 87
b. Incompatibilité, réplication et régulations croisées 89
IV. LA REPONSE SOS BACTERIENNE 91
A. Induction et régulation de la réponse SOS 93
1. Facteurs d'induction 93
2. Acteurs de la réponse SOS 95
a. RecA 95
b. LexA 97
3. Le régulon SOS 99
4. Universalité et exceptions de la réponse SOS 101
B. Détournement de la réponse SOS 103
1. Acquisition et expression de gènes de résistance aux antibiotiques 103
2. Régulation des systèmes toxine antitoxine et de la production des colicines 105
a. Régulation des systèmes toxine antitoxine 105
b. Régulation de la production des colicines 105
3. Détournement de la réponse SOS par des EGM 107
a. Passage de cycle lysogène à lytique de phages 107
b. Famille d'ICE SXT/R391 109

ETUDE EXPERIMENTALE 113

I. PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS DE TRAVAIL 115
II. MATERIELS ET METHODES 121
A. Procédures générales 121
1. Bactériologie générale 121
2. Biologie moléculaire et analyses bioinformatiques 121
a. Amplification d'ADN par PCR 121
b. Extraction, purification, digestion, ligation d'ADN 123
c. Outils bioinformatiques 125
B. Activation de la réponse SOS par l'entrée conjugative de plasmides 125
C. Régulation de régions promotrices par la réponse SOS 129
1. Activités promotrices 129
2. Retard de migration sur gel (EMSA) 131
3. Quantification des expressions transcriptionnelles (RT-qPCR) 133

4. Quantification de l'excision et du nombre de copies de SGI1 135
D. Conjugaison tripartite 137
E. Microscopie et cytométrie en flux 139
1. Construction des vecteurs exprimant les protéines fluorescentes 139
2. Microscopie 141
3. Cytométrie 143
III. RESULTATS 145
A. Activation de la réponse SOS par l'entrée conjugative des plasmides IncC et IncA 145
B. Régulation de sgaDC et sgiAT par la réponse SOS 149
1. Régulation des activités promotrices de P_{sgaDC} et P_{sgiAT} par la réponse SOS 149
a. Région promotrice de *sgaDC* 151
b. Région promotrice de *sgiAT* 151
2. Fixation de LexA dans la région promotrice de s*gaDC* mais pas de *sgiAT* 153
a. Fixation de LexA dans la région promotrice de *sgaDC* 153
b. La protéine LexA ne se fixe pas dans la région promotrice de *sgiAT* 155
3. Régulation transcriptionnelle de *sgaDC* et de son régulon par la réponse SOS 155
a. Chez *S.* Agona 47SA97 155
b. Chez *E. coli* 157
C. Chronologie des transferts du plasmide IncC et de SGI1 161
D. Exploration étendue de l'influence de la réponse SOS sur SGI1 163
E. Développement d'outils pour le suivi d'EGM au sein de populations bactériennes mixtes. 165
1. Design et construction des vecteurs modulables pAON-Fluo 165
2. Test des promoteurs auto-inductibles et constitutifs 167
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 169
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 196
ANNEXES 241

Liste des figures

Figure 1 : Chronologie des découvertes de nouveaux antibiotiques et d'identification de bactéries résistantes. 26
Figure 2 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques. 28
Figure 3 : Transferts horizontaux chez les bactéries. 28
Figure 4: Principe des poupées russes des éléments génétiques mobiles 30
Figure 5 : Organisation et fonctionnement d'un intégron 32
Figure 6 : Organisation des différents Eléments Transposables (TE) 34
Figure 7 : Organisation des intégrons complexes de classe 1 34
Figure 8 : Classification des phages selon la morphologie et le type du génome. 36
Figure 9 : Cycle de vie d'un ICE. 38
Figure 10 : Stratégies de mobilisation d'IME 40
Figure 11 : Evolution des tailles et caractéristiques des réplicons circulaires bactériens. 42
Figure 12 : Relations et caractéristiques des différentes familles de relaxases MOB. 44
Figure 13 : Cycle cellulaire bactérien et partition des réplicons. 46
Figure 14 : Représentation schématique des réplications Thêta 46
Figure 15 : Initiation de la réplication thêta de classe A (plasmide RK2) 48
Figure 16 : Organisation du réplisome bactérien. 50
Figure 17 : Terminaison de la réplication *Thêta* de classe A 50
Figure 18 : Réplication en cercle roulant (rolling circle replication) 52
Figure 19 : Modèles du mécanisme moléculaire du système de partition de type I ParABS. 56
Figure 20 : Modèle du mécanisme moléculaire du système de partition de type II ParMRC 58
Figure 21 : Modèle du mécanisme moléculaire du système de partition de type III TubZRC 58
Figure 22 : Illustration du devenir de dimères chromosomiques et plasmidiques au cours d'une génération bactérienne. 60
Figure 23 : Mécanisme de la recombinaison spécifique de site permettant la résolution des dimères chromosomiques. 60
Figure 24 : Systèmes TA présents sur le chromosome de *E. coli* MG1655. 62
Figure 25 : Systèmes Toxine Antitoxine de type I, II, III, IV, V et VI. 64
Figure 26 : Représentation de l'effet PSK des systèmes toxine antitoxine. 66
Figure 27 : Distribution des plasmides conjugatifs, mobilisables et non-transmissibles en fonction de la taille des plasmides. 68

Figure 28 : Systèmes de sécrétion de type IV impliqués la conjugaison. 70
Figure 29 : Historique de la classification des plasmides IncC et IncA. 78
Figure 30 : Réplication des plasmides IncA et IncC. 80
Figure 31 : Organisation génétique de l'intégron complexe de classe 1 du clone épidémique *Salmonella* Typhimurium DT104 ACSSuT 80
Figure 32 : Organisation génétique du backbone de SGI1. 82
Figure 33 : Arbres phylogénétiques des alignements des séquences en acides aminés des activateurs transcriptionnels SgaDC, AcaDC et SetCD. 82
Figure 34 : Alignements de pourcentages d'identités nucléotidiques des AGI1, PGI1 et PGI2 par rapport à SGI1. 84
Figure 35 : Régulation transcriptionnelle du régulon AcaDC. 86
Figure 36 : Activations directes et indirectes de la réponse SOS. 92
Figure 37 : Structure de la protéine RecA. 94
Figure 38 : Séquence et structure de la protéine LexA. 96
Figure 39 : Architecture conformationnelle de la dimérisation et de la fixation à l'ADN de la protéine LexA. 96
Figure 40 : Distribution des homologues du gènes *lexA* parmi les domaines bactériens. 100
Figure 41 : Distribution des séquences de fixation de la protéine LexA parmi les différents domaines bactériens. 102
Figure 42 : Répression transcriptionnelle par CI des gènes lytiques du phage λ 106
Figure 43 : Régulation transcriptionnelle des gènes de SXT via l'induction de dommages à l'ADN. 108
Figure 44 : Localisation des potentiels sites de fixation de la protéine LexA sur SGI1. 116
Figure 45 : Hypothèses du rôle de la réponse SOS sur le transfert et le maintien de SGI1. 116
Figure 46: Principe de la technique de la PCR overlap pour l'introduction de mutation ponctuelle. 136
Figure 47 : Efficacité de transfert des plasmides Rsa (IncW), R55 (IncC) et RA1 (IncA). 146
Figure 48 : Induction de la réponse SOS dans les transconjugants. 146
Figure 49 : Activités du promoteur P_{recN} et P_{acaDC} chez *S. enterica* et *E. coli*. 148
Figure 50 : Activités du promoteur P_{sgaDC} et P_{sgiAT} chez *S. enterica* et *E. coli*. 150
Figure 51 : Alignement des séquences en acides aminés des protéines LexA d'*E. coli* et de *S. enterica*. 152
Figure 52 : Retards sur gel des sondes P_{sgaDC} et P_{sgaDC}* avec les protéines LexA de *S. enterica* et *E. coli* 152

Figure 53 : Retards sur gel des sondes P_{sgiAT} et P_{sgiAT}* avec les protéines LexA de *S. enterica* et *E. coli*. 154
Figure 54 : Impact de la réponse SOS sur la transcription de *sgaDC* et des gènes du régulon de SgaDC chez *S.* Agona 47SA97. 154
Figure 55 : Impact de la réponse SOS sur la transcription de *sgaDC* et des gènes du régulon de SgaDC chez *E. coli*. 156
Figure 56 : Cinétique des fréquences de transfert du plasmide IncC (R16a) et SGI1 dans différents fonds génétiques. 160
Figure 57 : Fréquence de transfert de R16a et SGI1 après 1h45 de contact en conjugaison tripartite. 160
Figure 58 : Impact de la réponse SOS sur la transcription de *mpsA*, *mpsB* et S023 chez *S.* Agona 47SA97. 162
Figure 59 : Représentation schématique de la région de mobilisation de SGI1 (mob_{SGI1}). 162
Figure 60 : Retards sur gel des sondes P_{mpsB} et P_{mpsB}* avec les protéines LexA d'*E. coli* et *S. enterica*. 162
Figure 61 : Design des plasmides modulables pAON. 164
Figure 62 : Tests en microscopie et cytométrie des plasmides pAON-EGFP-Kan et pAON-mCherry-Kan. 166
Figure 63 : Tests en microscopie des plasmides pAON-PgapA-ECFP-Kan et pAON-PgapA-EBFP2-Kan. 166
Figure 64 : Synthèse des résultats obtenus sur l'implication de la réponse SOS dans la mobilisation de SGI1. 170
Figure 65 : Modèle chronologique de l'expression précoce des gènes de SGI1 suite à l'activation de la réponse SOS par l'entrée conjugative des plasmides IncC. 182
Figure 66 : Analyses du %GC du backbone de SGI1 et localisation des potentiels sites de fixation H-NS. 192

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Liste des pathogènes résistants (11 espèces et une famille) pour lesquels le développement de nouveaux antibiotiques est devenu urgent (OMS). 26
Tableau 2 : Tableau récapitulatif des types de systèmes de partition. 54
Tableau 3 : Nomenclature des acteurs moléculaires des systèmes ParABS. 54
Tableau 4 : Gènes chromosomiques directement régulés par LexA (*E. coli* K12) 98
Tableau 5 : Localisation et séquences des sites potentiels de fixation de la protéine LexA sur SGI1. 116
Tableau 6 : Souches utilisées dans cette étude. 122
Tableau 7 : Plasmides utilisés dans cette étude. 124
Tableau 8 : Amorces utilisées dans cette étude. 128
Tableau 9 : Excision et réplication de SGI1 dans la souche *S.* Agona induite ou non à la mitomycine C. 156
Tableau 10 : Excision et réplication de SGI1 dans les souches *E. coli* induites ou non à la mitomycine C. 158
Tableau 11 : Origine des éléments biologiques utilisés pour la construction des plasmides pAON. 164

Liste des annexes

Annexe 1 : Activités des promoteurs P_{recN} et P_{acaDC} chez *S. enterica* et *E. coli* en présence ou non de SGI1. 241
Annexe 2 : Activités des plasmides pQF50-Chl chez *S. enterica* et pQF50-Amp chez E. coli. 242
Annexe 3 : Activités des promoteurs P_{sgaDC} et P_{sgiAT} chez S. enterica et E. coli en présence ou non de SGI1. 243
Annexe 4 : Article. 244

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNdb : ADN double brin

ADNsb : ADN simple brin

ARN : Acide RiboNucléique

ESBL / BLSE : Extended-Spectrum Beta-Lactamase/ Béta-Lactamase à Spectre Etendu

CIP : Ciprofloxacine

DR : Direct Repeat / répétition directe

ICE : Integrative and Conjugative Element / Elément Intégratif et conjugatif

IME : Integrative Mobilizable Element / Elément Intégratif Mobilisable

Inc : Incompatibility group / groupe d'Incompatibilité

IS : Insertion Sequence / Séquence d'Insertion

IS*CR* : Insertion Sequence Commun Region

IR : Inverted Repeat / sequence inversée répétée

Kb : Kilo base

MGE / EGM : Mobile Genetic Element / Elément Génétique Mobile

MMC : Mitomycine C

PAR-T : Plasmid Partition Gene Typing

pb : pair base / paire de base

PBRT : PCR Based Replicon Typing /

pMLST : plasmid Multilocus Sequence Typing

PCR : Polymerase Chain Reaction / Réaction de Polymérisation en Chaine

RBS : Ribosome Binding Site / Site de fixation des Ribosomes

SGI1 : *Salmonella* Genomic Island 1

SSB : Single Strand Binding protein / Protéine fixant l'ADN simple brin

T4SS : Type IV Secretion System / Système de secretion de type IV

TA : Toxin – Antitoxin / Toxine-Antitoxine

TE : Transposable Element / Elément transposable

Tn : Transposon

WT : Wild-Type / Souche sauvage

Introduction

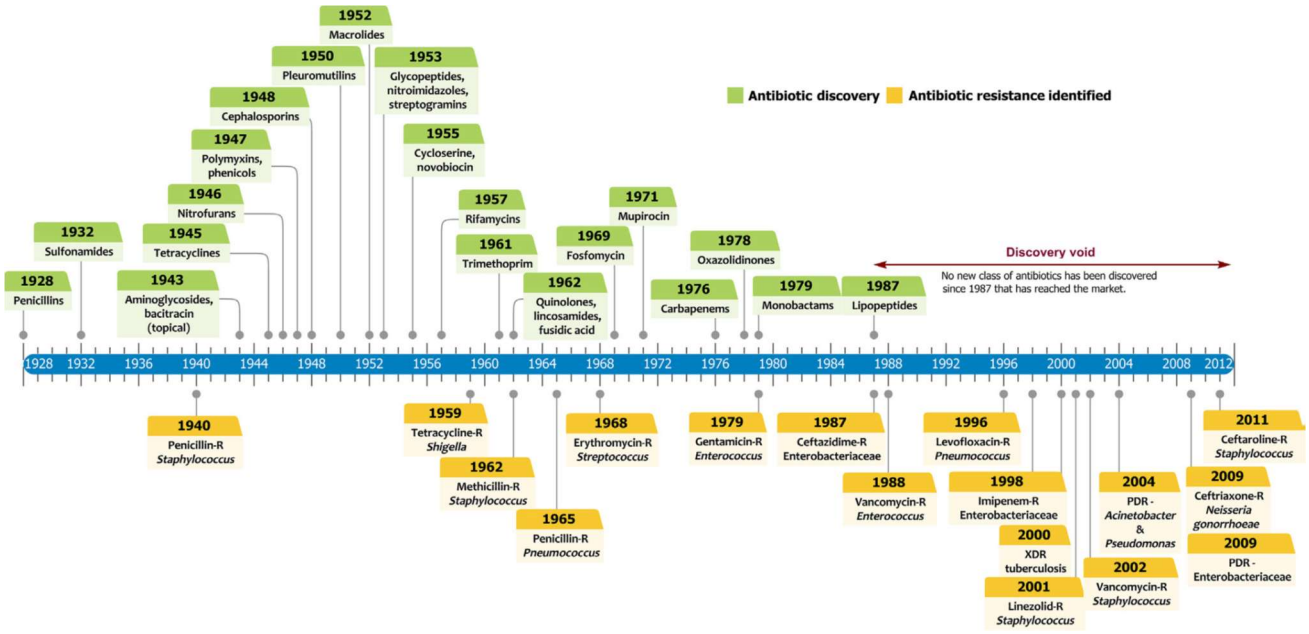


Figure 1 : Chronologie des découvertes de nouveaux antibiotiques et d'identification de bactéries résistantes.
Issue de (Singh et al., 2020)

Tableau 1 : Liste des pathogènes résistants (11 espèces et une famille) pour lesquels le développement de nouveaux antibiotiques est devenu urgent (OMS).

Priorité	Espèce ou famille bactérienne	Résistance
Priorité 1 Critique	*Acinetobacter baumannii*	Carbapénèmes
	Pseudomonas aeruginosa	Carbapénèmes
	Enterobacteriaceae	Carbapénèmes Productrice de β-lactamases à spectre élargi (BLSE)
Priorité 2 Haute	*Enterococcus faecium*	Vancomycine
	Staphylococcus aureus	Méticilline Vancomycine (intermédiaire/résistant)
	Helicobacter pylori	Clarithromycine
	Campylobacter spp.	Fluoroquinolones
	Salmonellae	Fluoroquinolones
	Neisseria gonorrhoeae	Cephalosporines Fluoroquinolones
Priorité 3 Moyenne	*Streptococcus pneumoniae*	Non sensible aux pénicillines
	Haemophilus influenzae	Ampicilline
	Shigella spp.	Fluoroquinolones

https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed

I. Préambule : Les résistances aux antibiotiques

L'histoire humaine a été marquée par de nombreuses épidémies bactériennes ayant causé plusieurs centaines de millions de morts (peste, cholera, tuberculose, syphilis…). En plus de ces épidémies, la moindre blessure ouverte ou infection bactérienne sévère (pneumonie, péritonite…) pouvait devenir mortelle. Le rapport entre l'humanité et les infections bactériennes s'est radicalement transformé au cours du XX^{ème} siècle principalement suite au développement de molécules bactéricides (entrainant la mort des bactéries) ou bactériostatiques (inhibant la croissance des bactéries) : les antibiotiques. Le début des antibiotiques est associé classiquement avec la découverte de la pénicilline (antibiotique de la famille des β-lactamines) par Alexander Fleming (Fleming, 1929). Alexander Fleming a observé la lyse de *Staphylococcus* sur milieux gélosés en boite de pétri contaminés par un champignon, *Penicillium chrysogenum* (anciennement *Penicillium notatum*). Il en a conclu que le champignon excrète dans le milieu de culture une molécule bactéricide qu'il a nommé pénicilline (Fleming, 1929). Par la suite, à partir de l'année 1939, les travaux de Howard Florey et Ernest Chain ont permis de développer une technique de purification de la pénicilline (Florey and Abraham, 1954). Ces travaux ont permis l'utilisation de la pénicilline au cours de la Seconde Guerre mondiale sauvant de nombreuse vies humaines (Lyons, 1946). Fleming, Florey et Chain ont obtenu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1945 pour la découverte de la pénicilline et son application contre les maladies infectieuses. Les années 1940-1960, considérées comme l'âge d'or des antibiotiques, ont permis de découvrir de nombreuses molécules antibiotiques mais à chaque fois rapidement suivi de l'identification de souches bactériennes résistantes (figure 1) (Nicolaou and Rigol, 2018; Singh et al., 2020). Alexander Fleming a alerté dès 1945 lors de son discours pour le prix Nobel sur la facilité de générer des souches bactériennes résistantes à la pénicilline par des traitements trop courts ou avec des concentrations sous-dosées de l'antibiotique (Fleming, 1945). Si le XXème siècle a vu le développement des antibiotiques, le XXIème siècle a vu la multiplication de pathogènes résistants ou multirésistants aux antibiotiques et la propagation mondiale des gènes de résistance aux antibiotiques. Plusieurs niveaux de résistance aux antibiotiques peuvent être observés pour un pathogène : multi-résistance ou multidrug resistance : MDR (résistance à 1 molécule parmi 3 classes d'antibiotiques), ultra-résistance ou extensive drug resistance : XDR (résistance à la plupart des classes d'antibiotiques sauf une ou deux) et résistance totale ou total drug resistance : TDR (résistance à toutes les classes d'antibiotiques) (Magiorakos et al., 2011; Nadeem et al., 2020). Le tableau 1 présente la liste publiée en 2017 par l'Organisation Mondiale de la Santé des pathogènes résistants à certains antibiotiques considérés comme des menaces sanitaires et pour lesquels le développement de nouveaux antibiotiques

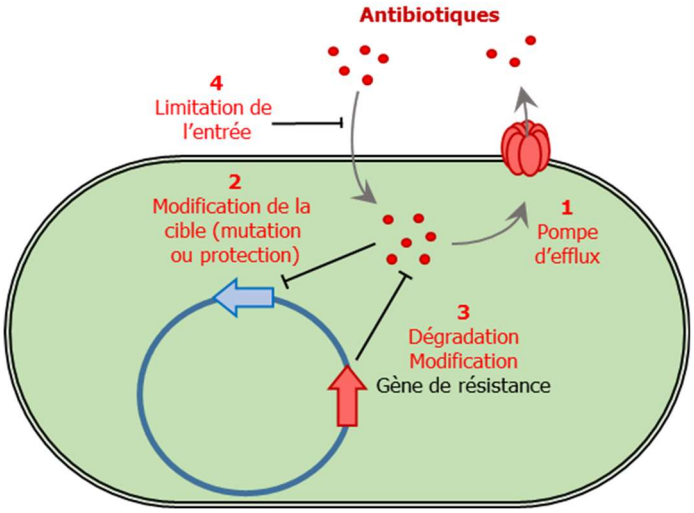


Figure 2 : Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.
La figure représente synthétiquement les 4 principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques au sein d'une cellule bactérienne (en vert). Les gènes sont représentés par des flèches (bleu pour un gène chromosomique et rouge pour les gènes de résistance à un antibiotique). La molécule d'ADN encodant les gènes cibles ou de résistance est représentée par un cercle bleu. **1)** Les pompes d'efflux : c'est un mécanisme de transport actif qui permet de rejeter des molécules toxiques (antibiotiques) à l'extérieur des bactéries. **2)** Modification de la cible : mutation du gène encodant la cible de l'antibiotique ou protection de la cible via la production de molécule empêchant l'antibiotique d'interagir avec sa cible. **3)** Dégradation/modification des antibiotiques : des gènes codent pour des protéines qui peuvent dégrader ou modifier les antibiotiques et les rendre inactifs. **4)** Limiter l'entrée des antibiotiques dans la cellule : pour les bactéries Gram négatif la présence de la membrane externe limite le passage de molécules hydrophiles. Ces molécules empruntent généralement des porines spécifiques pour rentrer dans les cellules. Les pertes ou les mutations de certaines porines les rendant non fonctionnelles sont associées avec l'acquisition de résistance aux antibiotiques.

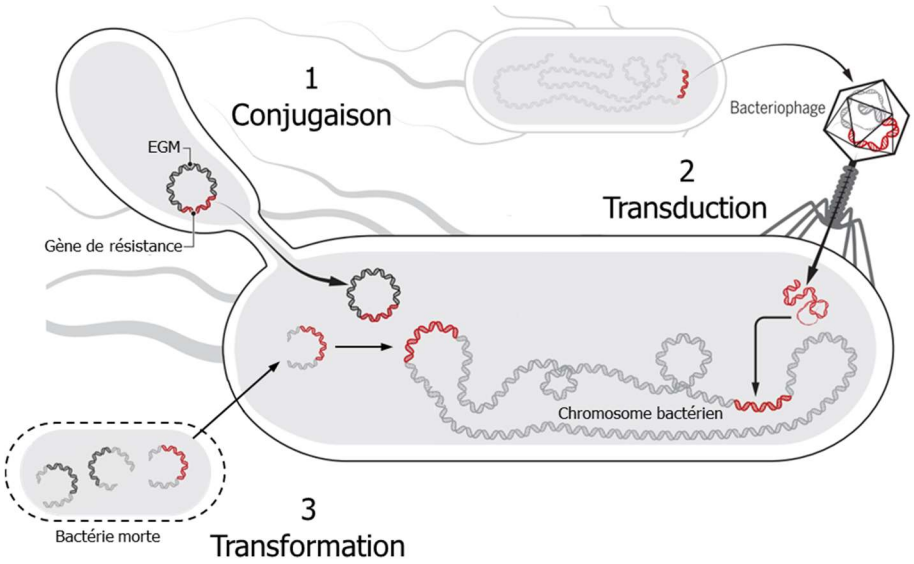


Figure 3 : Transferts horizontaux chez les bactéries.
Les trois grands mécanismes d'acquisition de gènes par transfert horizontal chez les bactéries sont : I) la conjugaison, II) la transduction et III) la transformation. La conjugaison nécessite un contact entre une bactérie receveuse et une bactérie donneuse porteuse d'un élément génétique mobile (EGM) mais également la mise en place d'un système moléculaire actif de transport d'ADN : le système de conjugaison. La transduction est un mécanisme médié par les phages injectant l'ADN encapsidé dans la bactérie, cet ADN peut par la suite s'intégrer au chromosome de la bactérie. La transformation est un mécanisme permettant d'internaliser de l'ADN exogène du milieu extracellulaire (par exemple issu d'une bactérie lysée). Adapté de (MacLean and Millan, 2019)

est devenu urgent (https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed). Un rapport du gouvernement britannique prédit que les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques deviendraient la première cause de mortalité en 2050 avec 10 millions de morts chaque année dans le monde si l'on ne fait rien pour lutter contre l'antibiorésistance (O'neill, 2016). Pour l'année 2015 en Europe, l'estimation de 33 100 morts serait attribuée à des infections bactériennes résistantes aux antibiotiques (Cassini et al., 2019). Pour cette même année 2015, le coût économique de l'antibiorésistance en France a été évalué à 109,3 millions d'euros pour les cas identifiés et estimé à 287,1 millions d'euros si tous les cas avaient été identifiés (Touat et al., 2019). Aux USA pour l'année 2014, le coût économique de l'antibiorésistance a été estimé à 2,2 milliards de dollars (Thorpe et al., 2018). Récement, une analyse systématique a permis d'attribuer 1,27 millions de morts à l'antibiorésistance et d'associer 4,95 millions de morts à l'antibiorésistance en 2019 dans le monde (Murray et al., 2022).

Plusieurs mécanismes peuvent être à l'origine des résistances aux antibiotiques observées. Les quatre principaux mécanismes présentés en figure 2 sont : le rejet de l'antibiotique dans le milieu extracellulaire via les pompes d'efflux, la modification de la cible de l'antibiotique, la dégradation/modification de l'antibiotique et la limitation de l'entrée de l'antibiotique dans le milieu intracellulaire (Blair et al., 2015; Nadeem et al., 2020). Les bactéries peuvent être naturellement résistantes aux antibiotiques mais elles peuvent également acquérir des résistances via des mutations ou par transfert horizontal de gènes de résistance (Davies and Davies, 2010; Nadeem et al., 2020). Les différents mécanismes de transferts horizontaux de gènes chez les bactéries sont présentés en figure 3. La capture, l'accumulation et la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques sont majoritairement dues aux éléments génétiques mobiles (EGM, cf partie II. Les éléments génétiques mobiles) (Partridge et al., 2018). De nombreuses études ou rapports gouvernementaux ont mis en évidence les pratiques humaines d'utilisation des antibiotiques (utilisation à outrance ou inappropriée en santé humaine, utilisation en facteurs de croissance ou en traitement préventif dans l'agriculture...) comme ayant engendré le problème actuel de l'antibiorésistance (Bengtsson-Palme et al., 2018; Nadeem et al., 2020; O'neill, 2016; Wellington et al., 2013). Certains environnements (effluents d'hôpitaux, égouts, eaux usées issues de l'agriculture et de l'élevage…) sont considérés comme des points chauds de transferts horizontaux de gènes de par leurs fortes densités en bactéries et EGM (Bengtsson-Palme et al., 2018; Graham et al., 2011; Pärnänen et al., 2019; Subirats et al., 2016; Wellington et al., 2013). De plus, la présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques et de métaux lourds dans ces environnements via l'activité humaine exercent des pressions de sélection favorisant l'acquisition d'EGM porteurs de multiples gènes de résistance

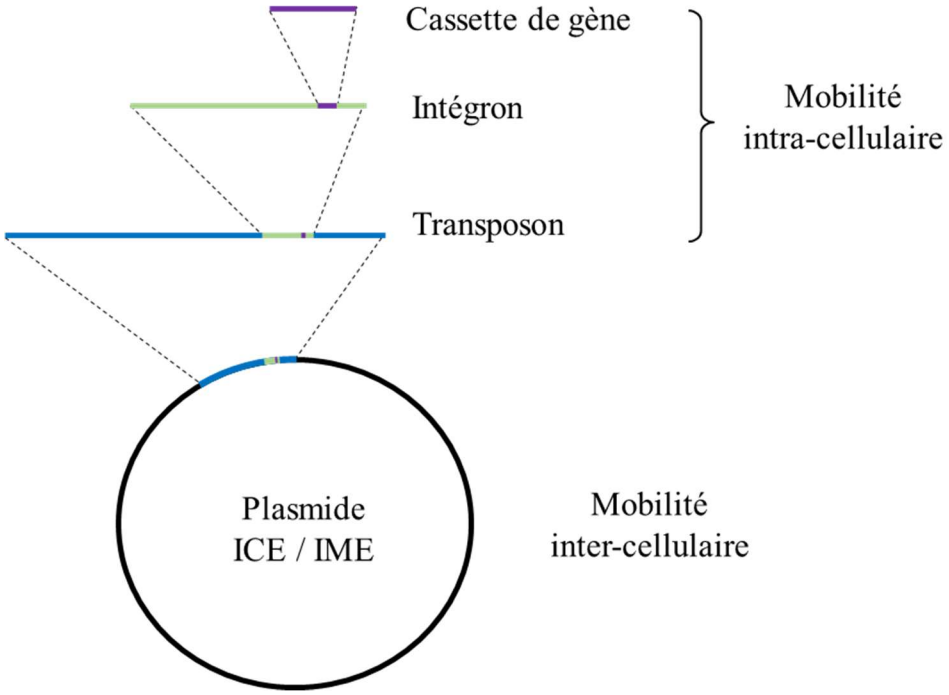


Figure 4: Principe des poupées russes des éléments génétiques mobiles
Cette figure représente de manière schématique les imbrications possibles d'EGM. Dans l'ordre, une cassette de gène se trouve au sein d'un intégron, lui-même au sein d'un transposon et lui-même intégré dans un plasmide, ICE ou IME.

(Gullberg et al., 2011, 2014; Wellington et al., 2013). La littérature scientifique foisonne d'exemples de diffusion de gènes de résistance aux antibiotiques par les EGM (Kopotsa et al., 2019; Partridge et al., 2018; Rozwandowicz et al., 2018; Zhao and Hu, 2015) et dont quelques-uns sont succinctement présentés ci-après. Les transposons de la famille Tn*552* portés par des plasmides ont permis l'acquisition des gènes de résistance aux β-lactamines (gène de β-lactamase) chez les *staphylococci* (Lewis et al., 1999; Partridge et al., 2018). Les plasmides IncI2 ont été les premiers plasmides identifiés comme disséminant un mécanisme de résistance à la colistine, un des antibiotiques de dernier recours en médecine humaine, via le gène *mcr-1* localisé en aval de la séquence d'insertion IS*Apll* (Liu et al., 2016). Une des lignées de pathogènes la plus prédominante et préoccupante, *Escherichia coli* ST131 clade C2/*H*30Rx, est associée avec la présence d'un plasmide IncFII-like encodant un gène de β-lactamase à spectre étendu (BLSE) *bla*$_{\text{CTX-M-15}}$ en plus d'une résistance chromosomique aux fluoroquinolones (Stoesser et al., 2016). Les plasmides IncC diffusent les gènes de résistance critiques de BLSE (*bla*$_{\text{TEM}}$, *bla*$_{\text{SHV}}$, *bla*$_{\text{CTX-M}}$) et carbapenémases (*bla*$_{\text{OXA}}$, *bla*$_{\text{NDM}}$, *bla*$_{\text{IMP}}$) associés en plus à divers autres gènes de résistance aux antibiotiques (résistances aux sulfamides, aminosides, tétracyclines, chloramphénicol et triméthoprime) (Call et al., 2010; Carattoli et al., 2012; Ho et al., 2014; Poirel et al., 2007). De nombreux plasmides IncHI1 et IncHI2 sont associés à des phénotypes de multirésistance (sulfamides, aminosides, tétracyclines) en plus d'encoder des gènes de BLSE (Rozwandowicz et al., 2018).

II. Les éléments génétiques mobiles

A. Diversité

Dans le monde bactérien, il existe une grande diversité EGM pouvant avoir une mobilité au sein de la cellule hôte (intra-cellulaire) ou entre différentes cellules bactériennes (inter-cellulaire). Les EGM peuvent être imbriqués les uns dans les autres suivant le concept des poupées russes (figure 4) (Amábile-Cuevas and Chicurel, 1992).

1. Mobilité intra-cellulaire

a. Cassette de gène / Intégron

Les intégrons sont composés d'une plateforme fonctionnelle suivie d'un réseau de cassettes de gènes mobiles variables (figure 5A). La plateforme fonctionnelle contient le gène codant l'intégrase (*intI*), un site de recombinaison pour l'intégration de cassette (*attI*) et le promoteur P$_C$ (dans le gène *intI* ou entre *intI* et le site *attI*) permettant l'expression des cassettes

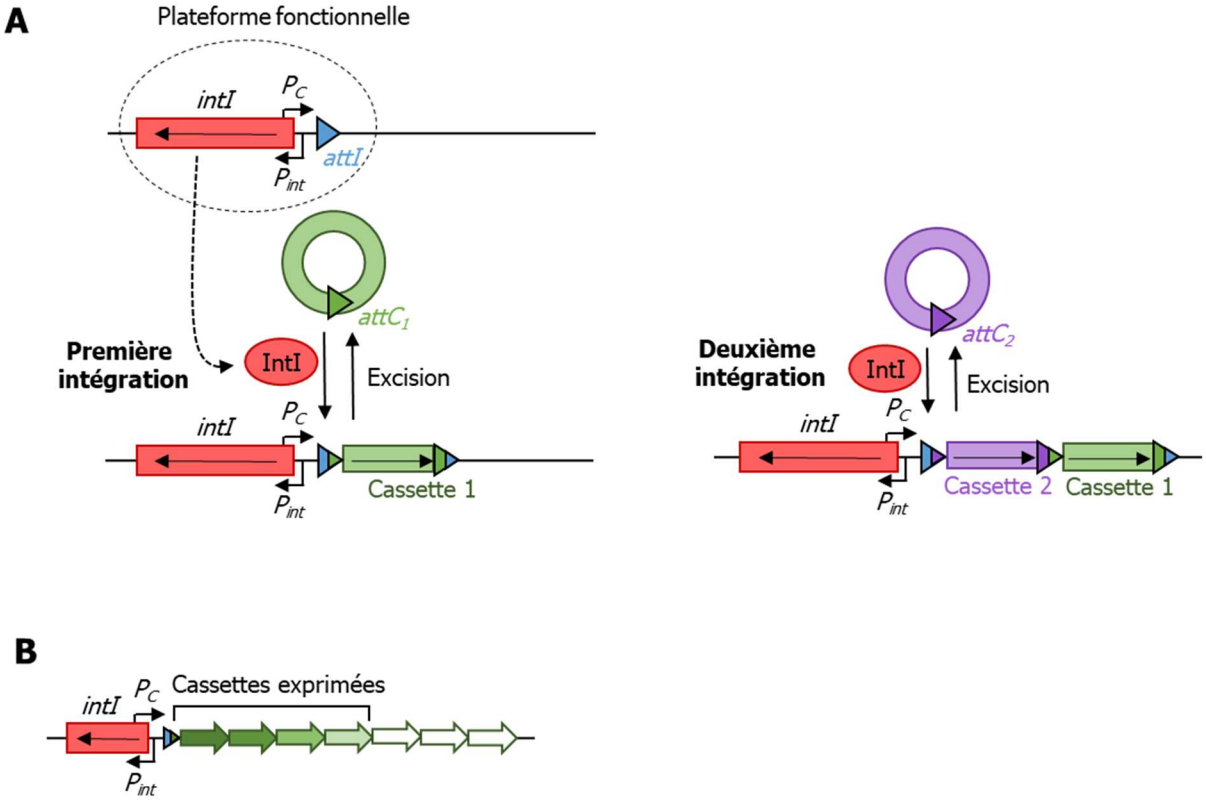


Figure 5 : Organisation et fonctionnement d'un intégron

A) Insertion et excision de cassettes. La plateforme fonctionnelle est composée du gène de l'intégrase (*intI*) en rouge sous le contrôle du promoteur P_{int}, le site de recombinaison *attI* (triangle bleu) et le promoteur P_C. L'intégration de cassettes de gènes circulaires (cercles vert et violet) se fait par recombinaison site spécifique catalysée par la recombinase à tyrosine IntI (intégrase) entre un site *attI* et un site *attC* (*attC*$_1$ ou *attC*$_2$). Les sites *attI* et *attC* hybrides issus de la recombinaison pour l'intégration de la cassette sont représentés par les triangles bicolores. L'excision de cassette est également catalysée par IntI entre deux sites hybrides *attI*-*attC* issus de l'intégration. Les flèches dans les gènes de l'intégrase et des cassettes indiquent l'orientation de la séquence codante.

B) Expression des cassettes d'un intégron. Plus une cassette est proche du promoteur P_C, plus elle sera exprimée (représenté par l'intensité de vert de la cassette). Les cassettes les plus éloignées (en blanc) ne sont pas exprimées mais elles peuvent être considérées comme un réservoir dans lequel l'intégron peut récupérer des cassettes et se réorganiser.
Adapté de (Escudero et al., 2014).

(Collis and Hall, 1995; Lévesque et al., 1994). Les cassettes sont des éléments circulaires non réplicatifs généralement composés de la séquence codante d'un gène sans promoteur et d'un site de recombinaison (*attC*) (Collis and Hall, 1992; Escudero et al., 2014). L'intégration des cassettes se fait par un événement de recombinaison site spécifique entre *attI* et *attC* catalysé par l'intégrase IntI de l'intégron. Plusieurs événements d'intégration ou d'excision de cassettes entrainent la formation d'un réseau de cassettes les unes à la suite des autres pouvant être réorganisé (figure 5B). Plus une cassette est proche du promoteur P_C et plus son niveau d'expression est élevé (Collis and Hall, 1995). Les intégrons chromosomiques, également appelés super-intégrons, sont présents dans 17% des espèces bactériennes dont les séquences des génomes sont disponibles (Cambray, et al., 2010; Cury et al., 2016). Ces intégrons chromosomiques sont des structures anciennes ayant évoluées avec les bactéries depuis plusieurs centaines de millions d'années (Rowe-Magnus et al., 2001). La phylogénie des intégrases des intégrons chromosomiques est cohérente avec la phylogénie des organismes démontrant l'ascendance et la stabilité de ces intégrons (Cambray, et al., 2010; Rowe-Magnus et al., 2001). Ces intégrons chromosomiques peuvent atteindre de grandes tailles et peuvent stocker plus de 200 cassettes comme dans le cas des super-intégrons retrouvés chez les *Vibrio* (Mazel et al., 1998). Les intégrons d'intérêt clinique (porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques) sont nommés intégrons mobiles car ils peuvent être retrouvés au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes via les transferts horizontaux des EGM. Il existe 5 classes d'intégrons mobiles selon l'homologie de séquences des gènes des intégrases (Mazel, 2006). Les classes 1, 2 et 3 sont généralement issues de contextes cliniques et impliquées dans la diffusion de multirésistance aux antibiotiques chez les *Enterobacteriales* (Kaushik et al., 2018; Partridge, 2011). Les classes 4 et 5 ont été identifiées sur des EGM de la famille des *Vibrionaceae* : la classe 4 sur l'élément intégratif et conjugatif SXT^{ET} (renommé ICEVchInd5) de *Vibrio cholerae* (Hochhut et al., 2001) et la classe 5 sur le plasmide pRSV d'*Aliivibrio salmonicida* (Sorum et al., 1992). La plupart des intégrons de classe 1 ont la particularité de présenter une région 3' conservée (3'-CS : 3' Conserved Segment) composée des gènes *qacEΔ* (gène tronqué de résistance aux ammoniums), *sul1* (résistance aux sulfamides) et *orf5* (fonction inconnue) (Gillings, 2014). Les intégrons mobiles n'accumulent pas beaucoup de cassettes (avec un maximum observé de 8 cassettes (Naas et al., 2001)) probablement car les cassettes trop éloignées du promoteur P_C ne sont pas exprimées (Collis and Hall, 1995; Gillings, 2014). Ces intégrons mobiles expriment diverses cassettes de gènes dont la grande majorité encode des résistances aux antibiotiques (plus de 130 gènes différents caractérisés) (Gillings, 2017; Vandecraen et al., 2017; Zhang et al., 2020). Les intégrons mobiles de résistance aux antibiotiques semblent être le résultat d'une évolution récente imposée par l'usage humain des antibiotiques (Davies and Davies, 2010; Gillings, 2014).

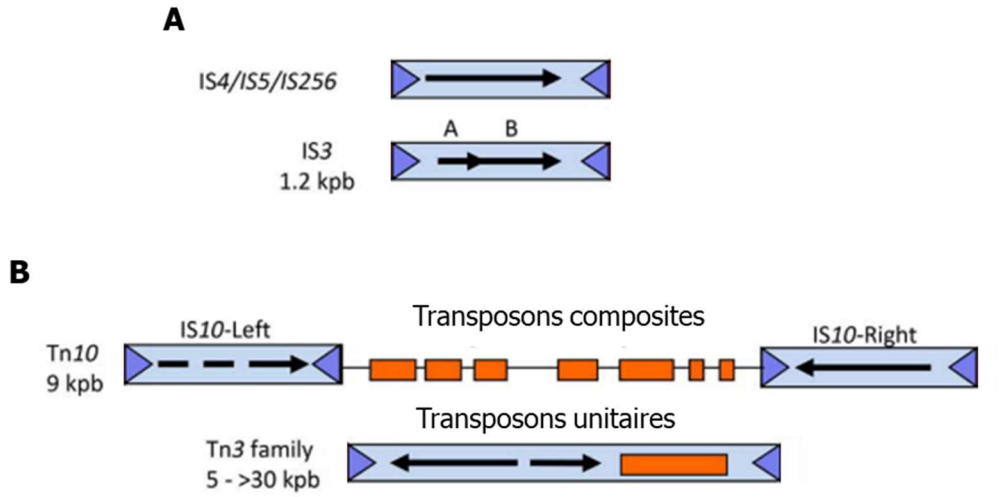


Figure 6 : Organisation des différents Eléments Transposables (TE)
Les éléments transposables, représentés par des rectangles bleus sont flanqués par des IR (inverted repeat) représentées par des triangles bleus. Les gènes des transposases sont symbolisés par les flèches noires horizontales. Les gènes passagers sont représentés par des rectangles orange. **A) Organisation des IS.** De haut en bas : une IS classique avec le gène de la transposase encadré des IR et une IS où la transposase est codée sur deux phases de lecture. **B) Organisation des transposons.** Le transposon composite est composé de gènes passagers encadrés de deux IS pouvant mobiliser l'ensemble (le gène de la transposase de l'IS*10* gauche est sous forme de tirets car cette IS n'est pas capable de s'auto-transposer). Le transposon unitaire de la famille Tn*3* comprenant les gènes passagers et impliqués dans la transposition sont encadrés par les IR.
Issu de (Siguier et al., 2015).

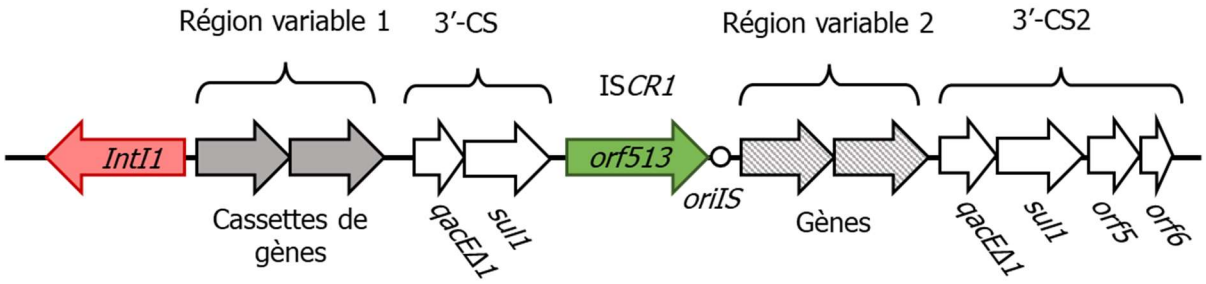


Figure 7 : Organisation des intégrons complexes de classe 1
L'alignement de plusieurs intégrons complexes de classe 1 a permis d'identifier la structure générale de ces EGM (Quiroga et al., 2013). De l'extrémité 5' vers 3' : l'intégrase *intI1* des intégrons de classe 1 (flèche rouge), une région variable de cassettes de gènes (flèches grises), une première copie du segment 3' conservé (3'-CS), l'*orf513* étant le gène de l'intégrase de l'IS*CR1* (flèche verte), l'origine de réplication putative de l'IS*CR1* (*oriIS*, rond blanc), la deuxième région variable codant généralement des gènes de résistance aux antibiotiques (flèches rayées grises) et la deuxième copie du 3'-CS.

b. IS / Transposon / IS*CR*

Les Séquences d'Insertion (IS) et les transposons (Tn) sont des éléments transposables (TE : transposable element) (figure 6) capables de se déplacer sur la même ou entre différentes molécules d'ADN au sein d'une même cellule grâce à leur transposase (Partridge et al., 2018; Siguier et al., 2006). Ces éléments peuvent être présents en plusieurs copies à différents endroits du génome pouvant faciliter les événements de recombinaison homologue (Partridge et al., 2018). La transposition des TE peut se faire sous forme d'un coupé-collé (relocalisation de l'élément entrainant la perte de l'élément au site d'intégration initial) ou d'un copié-collé (l'élément reste à la place initiale et une copie s'intégre à un autre site) (Siguier et al., 2015). Les IS sont définies comme de petits éléments génétiques mobiles (<3Kb) composés d'un ou deux gènes impliqués dans leur mobilité et encadrés de courtes régions inversées répétées (IR : inverted repeat) (Mahillon and Chandler, 1998; Siguier et al., 2006, 2015). Ils encodent toujours une transposase reconnaissant spécifiquement les IR pour la transposition de l'EGM (Siguier et al., 2015, 2017) et dans quelques cas une protéine régulatrice (Siguier et al., 2015). Deux copies d'une même IS peuvent encadrer et mobiliser des gènes dits passagers formant un transposon composite (Siguier et al., 2015). La famille de transposons Tn*3* est atypique car en plus des gènes passagers, ces transposons portent une plateforme de recombinaison d'intégron leur permettant de capturer diverses cassettes de gènes (Mazel, 2006). Les transposons de la familles Tn*3* encodent une longue transposase (950 à 1025aa) et une résolvase (recombinase à site spécifique) nécessaire à la résolution d'intermédiaires co-intégrés lors de la synthèse de nouvelles copies (Nicolas et al., 2015).

Les IS*CR* (IS common région) sont des éléments transposables reliées à la famille des IS*91* (Toleman et al., 2006a). Les IS*CR* sont caractérisées par une transposition impliquant une réplication par rolling-circle et par l'absence d'IR (Toleman et al., 2006a). Les extrémités des IS*CR*, appelées l'*ori*IS et le *ter*IS, sont associées avec les fonctions respectives d'origine et de terminaison de réplication (Tavakoli et al., 2000). L'étape de réplication en cercle roulant peut entrainer le déplacement des séquences ADN adjacentes avec seulement une copie de l'IS*CR* (Tavakoli et al., 2000). Les IS*CR* sont connues pour être associées avec divers gènes de résistance aux antibiotiques : β-lactamines (BLSE, métallo-β-lactamases, carbapenemases, enzyme de modification d'aminoglycosides), quinolones (*qnr*), triméthoprime, chloramphénicol (*catAII*), florfénicol (*floR*), macrolide (*ereB*) et tétracycline (Toleman et al., 2006a; Zhao and Hu, 2015). Les IS*CR* sont classées en 13 familles (IS*CR1* à IS*CR13*) par homologie des transposases et des séquences adjacentes (Toleman et al., 2006a). Les intégrons complexes de classe 1 présentés en figure 7, sont issus de l'association d'un intégron de classe 1 avec une IS*CR1* sans extrémité *ter*IS (Cheng et al., 2016; Mazel, 2006; Quiroga et al., 2013; Toleman et al., 2006b).

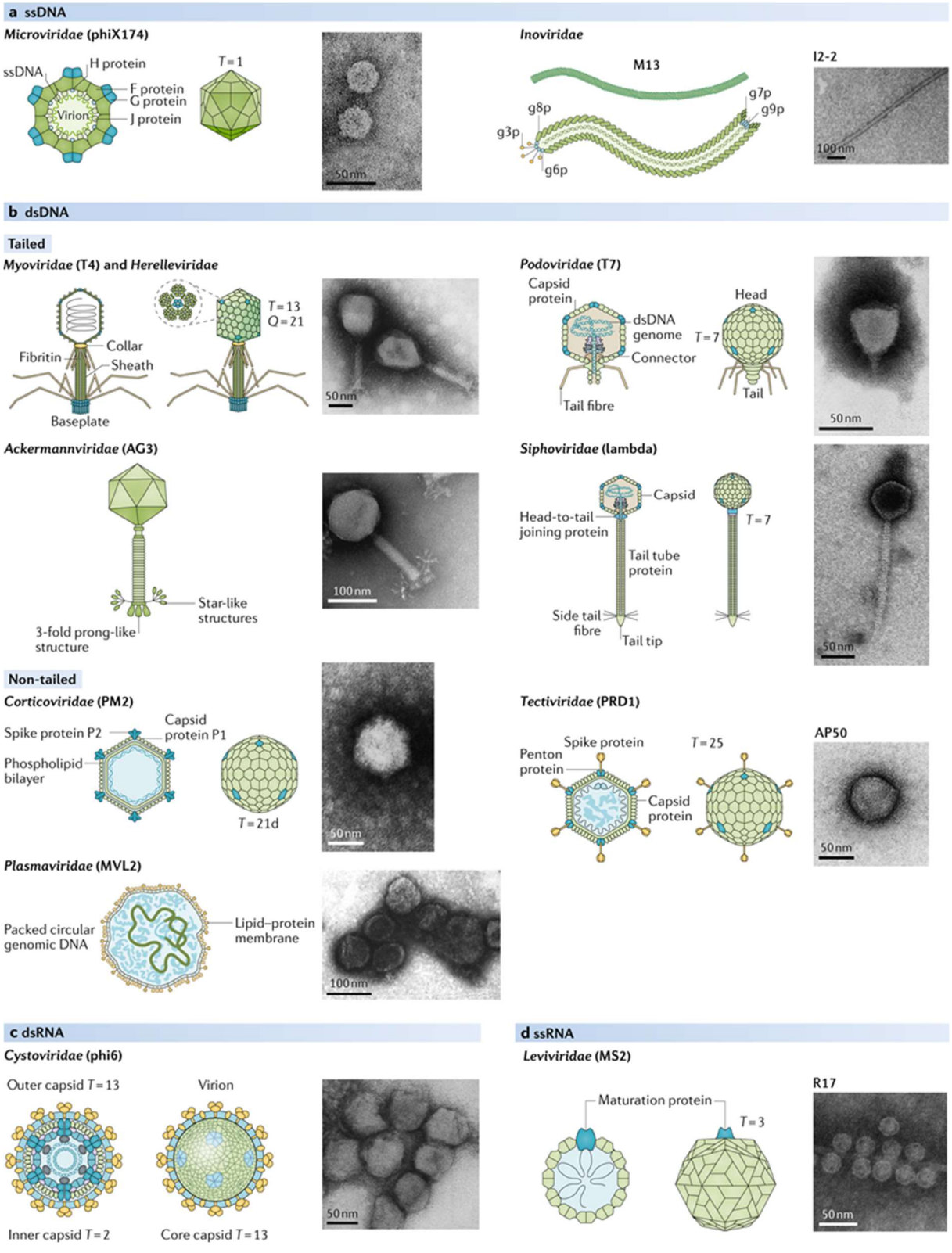


Figure 8 : Classification des phages selon la morphologie et le type du génome.
Représentation schématique et image de microscopie à transmission électronique de chaque type de phages.
Issue de (Dion et al., 2020)

2. Mobilité inter-cellulaire

a. Les phages

Les phages sont des virus infectant les bactéries et dont les génomes peuvent être composés d'ADN ou d'ARN, sous forme double ou simple brin (pour revue (Dion et al., 2020)). Historiquement, les phages sont classés selon leur morphologie, leur type de génome et leur spectre d'hôte (figure 8) (Dion et al., 2020). Cependant, la classification des phages connait actuellement une refonte majeure via l'utilisation des méthodes de génomique actuelle (Dion et al., 2020). Historiquement, les phages sont définis selon leur capacité à pouvoir entrer ou non en cycle lysogène simplifié par la classification courante « lytique ou lysogène » (Hobbs and Abedon, 2016). Lors d'un cycle lysogène, le matériel génétique du phage est présent dans la cellule (appelé prophage) avec inhibition des gènes de virulence et peut être intégré au chromosome ou sous forme extracellulaire. Lors d'un cycle lytique, les gènes viraux du phage sont exprimés détournant la machinerie de l'hôte pour la production de virions jusqu'à lyse de la cellule. La diversité des phages a amené Hobbs et Abedon à proposer une nouvelle nomenclature des stratégies infectieuses : 1-lytique et non-tempéré (phages T1 à T7), 2-chronique et non tempéré (phage M13), 3-lytique et tempéré (Lambda), 4-chronique et tempéré (CTXΦ) (Hobbs and Abedon, 2016). En effet certains phages vont entrainer la lyse des cellules pour la libération des virions (infection lytique) alors que d'autres non (infection chronique) et certains phages vont pouvoir entrer en cycle lysogène (tempéré) ou non (non tempéré). Les phages sont impliqués dans des mécanismes de transferts horizontaux de gènes soit directement par transduction (Chiang et al., 2019; Thierauf et al., 2009) ou soit en relarguant des EGM dans l'environnement après la lyse cellulaire, ces EGM pouvant être récupérés ensuite par d'autres bactéries par transformation (Keen et al., 2017). La transduction permet l'encapsidation de fragments d'ADN non phagique qui seront injectés dans une bactérie nouvellement infectée. La transduction généralisée correspond à l'encapsidation de fragments d'ADN chromosomique ou plasmidique au lieu de l'ADN viral (Thierauf et al., 2009). La transduction spécialisée correspond au transfert d'ADN non viral dû à un défaut de l'excision d'un phage intégratif encapsidant avec lui de l'ADN adjacent à son site d'intégration (Thierauf et al., 2009).

b. ICE / IME

Historiquement, tout cluster de gènes chromosomiques atypiques du reste du chromosome est défini comme un îlot génomique probablement acquit par transfert horizontal (Langille et al., 2010). Ces différences peuvent être des biais de composition en nucléotides (% GC, codons rares, répétitions directes), la présence de gènes de mobilisation, d'IS, de gènes issus de phages ou d'une haute prévalence de gènes de fonctions inconnues (Dobrindt et al., 2004). Ces îlots génomiques ont été

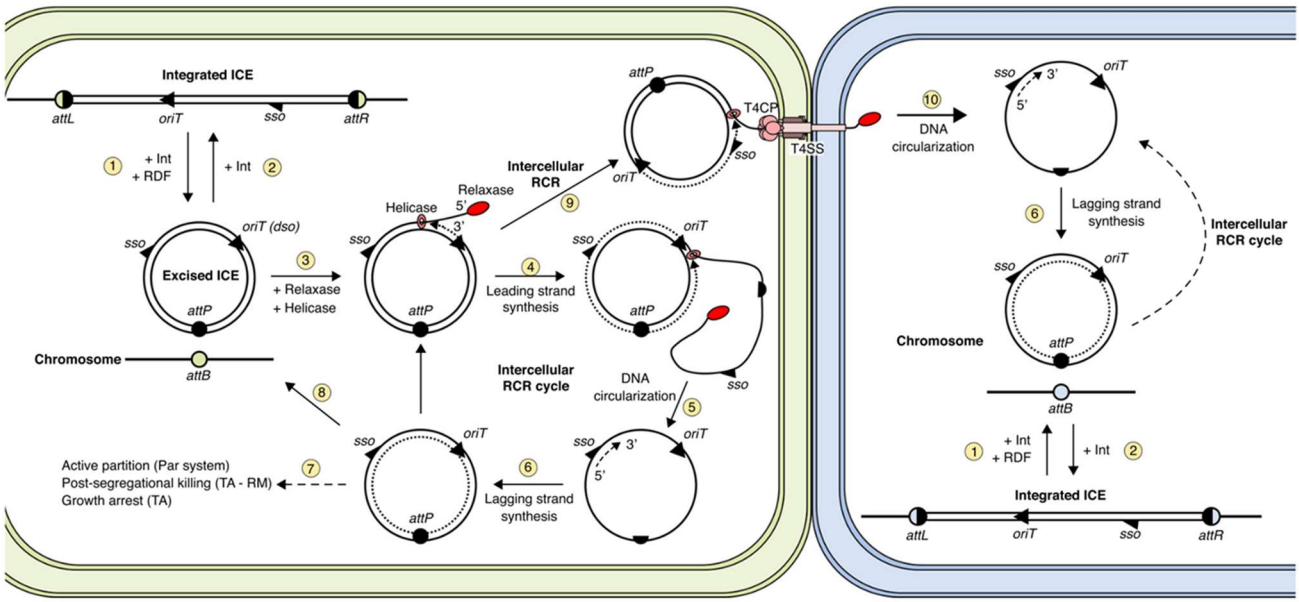


Figure 9 : Cycle de vie d'un ICE.
Les différentes étapes du cycle de vie des ICE sont représentées sur le schéma. Les étapes d'excision (1) et intégration (2) sont catalysées par l'intégrase et des facteurs de directionnalisation de recombinaison (RDF : recombination directionality factor). La forme excisée de l'ICE est répliquée par une réplication en cercle roulant (cf partie II.B.2. Réplication) initiée par une coupure simple brin catalysée par la relaxase au site *dso* de l'*oriT* (3). Après la coupure, la relaxase reste attachée à l'extrémité 5' de l'ADN simple brin coupé. La synthèse du brin leading (4) est initié pendant qu'une hélicase déroule l'ADN. L'ADN simple brin complexé à la relaxase peut soit être recircularisé (5) et la synthèse du brin lagging démarre au site *sso* dans la cellule (6), soit transloqué dans une cellule receveuse par le port de conjugaison (9). Une fois dans la cellule receveuse, l'ADN simple brin est recircularisé (10) et le brin lagging est synthétisé (6). Les formes circulaires des ICE peuvent être stabilisées dans les cellules via des systèmes de partition et des systèmes TA (7) ou réintégrées dans les chromosomes. Issu de (Burrus, 2017).

classés selon les fonctions biologiques associées (da Silva Filho et al., 2018). Parmi ces différentes classes, on retrouve : les îlots de pathogénicité impliqués dans la pathogénicité/virulence, les îlots métaboliques associés à des fonctions métaboliques, les îlots de résistance porteurs des gènes de résistance aux antibiotiques et les îlots symbiotiques en particulier pour les symbioses *Rhizobia* - Legumineuses (Bertelli et al., 2019; da Silva Filho et al., 2018). Cette classification phénotypique a eu pour conséquence le regroupement de divers EGM distants phylogénétiquement (intégrons, transposons, ICE, IME, prophages) sous le terme passe-partout d'îlot génomique (Langille et al., 2010). Les EGM suivants sont classiquement introduits comme des îlots génomiques alors qu'ils présentent des caractéristiques et mécanismes moléculaires différents.

Eléments Intégratifs et Conjugatifs (ICE)

Les éléments intégratifs et conjugatifs (ICE : integrative and conjugative element), anciennement appelés transposons conjugatifs, sont des éléments génétiques mobiles retrouvés intégrés au chromosome et capable de se transférer via leur propre système de conjugaison (Burrus and Waldor, 2004). Une analyse des séquences des génomes disponibles a pu mettre en évidence que les ICE sont fortement présents chez les bactéries, surpassant en nombre les plasmides conjugatifs (Guglielmini et al., 2011). Les ICE identifiés présentent des tailles très variables allant de 18 à 600 Kb et transportent des gènes adaptatifs bénéfiques à l'hôte : résistances aux antibiotiques ou métaux lourds, symbiose avec les légumineuses, facteurs de virulence ou d'invasion (Burrus, 2017; Burrus and Waldor, 2004; Chuzeville et al., 2015; Sullivan et al., 2002).

Les différentes étapes du cycle de vie d'un ICE sont présentées en Figure 9. Un ICE intégré au chromosome est répliqué par la machinerie de réplication chromosomique et hérité par les cellules filles après division cellulaire (Burrus, 2017). L'intégration d'un ICE est catalysée par son intégrase appartenant à la famille des recombinases à tyrosine (pour certaines familles il s'agit d'une recombinase à sérine ou DDE qui vont présenter des spécificités d'intégration moindres) (Bellanger et al., 2014; Johnson and Grossman, 2015). L'étape d'intégration correspond à un événement de recombinaison site spécifique entre le site *attP* (ou *attI*) présent sur la forme circulaire de l'ICE et son site d'attachement chromosomique (*attB*) (Bellanger et al., 2014; Burrus, 2017). Les ICE intégrés sont délimités par des extrémités nommées *attL* et *attR* issues de l'événement de recombinaison ayant permis l'intégration (Bellanger et al., 2014; Burrus, 2017). L'intégrase est également essentielle pour l'excision de l'ICE, des protéines auxiliaires vont permettre d'orienter la réaction vers un événement d'intégration ou d'excision de l'ICE (excisionase, facteurs directionnels de recombinaison ou facteurs d'intégration de l'hôte) (Burrus, 2017; Delavat et al., 2017; McLeod et al., 2006). L'excision de l'ICE correspond à un événement de recombinaison site spécifique entre les sites *attL* et *attR* entrainant la

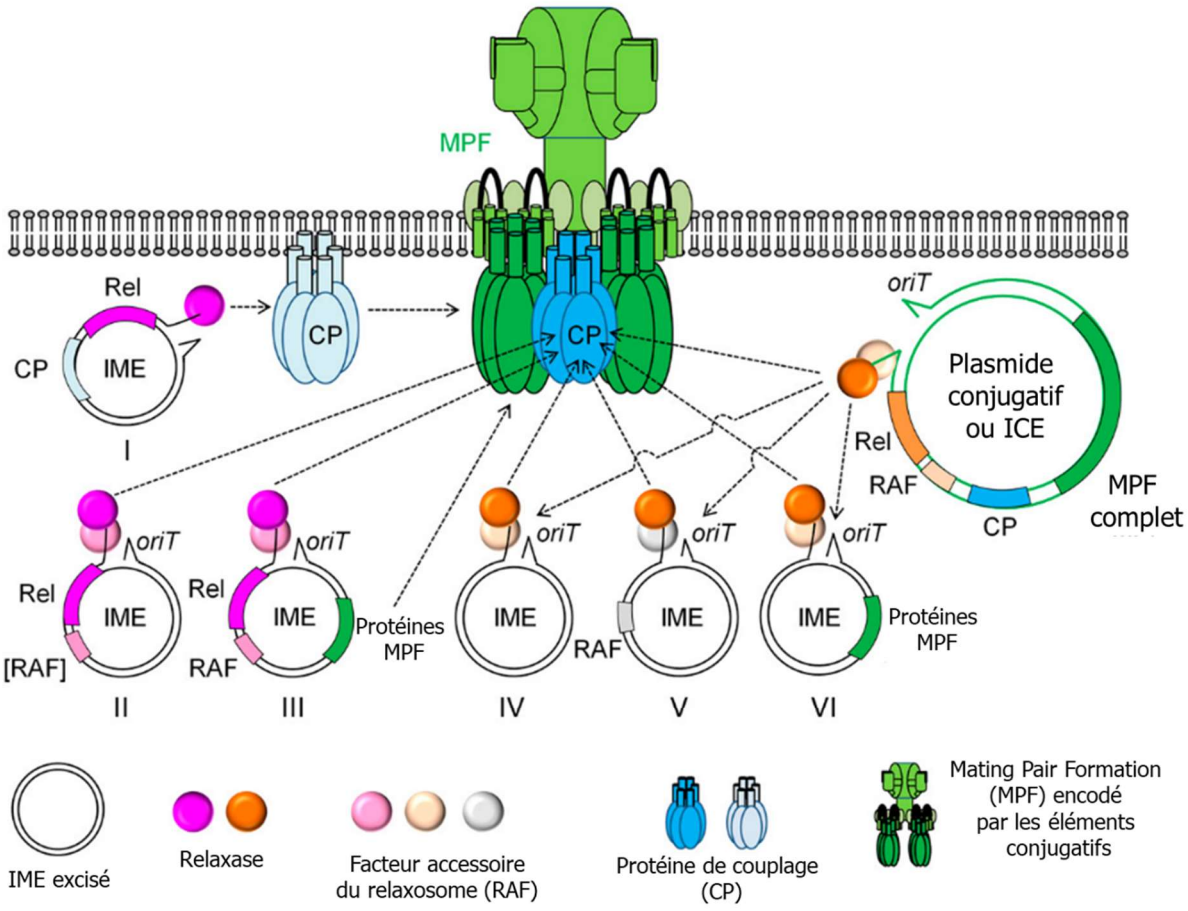


Figure 10 : Stratégies de mobilisation d'IME
Les différentes stratégies de mobilisation des IME sont représentées. Les relaxases et les facteurs accessoires du relaxosome (RAF) sont représentés par des cercles rose, rose clairs et blancs lorsqu'ils sont encodés par les IME et orange et orange clairs lorsqu'ils sont encodés par les ICE ou plasmides. Les protéines de couplage (CP) sont représentées sous forme hexamèrique bleue. Le MPF est représenté sous forme d'un complexe multiprotéique vert. Les IME peuvent encoder leur propre relaxase et CP (I), leur propre relaxase et parfois leurs propres RAF (II), leur propre relaxase, RAF et certaines protéines du MPF (III). Les IME peuvent ne pas encoder de relaxase mais avoir seulement une *oriT* (IV), une *oriT* et des RAF (V) ou une *oriT* et des protéines du MPF (VI).
Issu de (Guédon et al., 2017)

formation du site *attP* (ou *attI*) au niveau de la circularisation de l'ICE et restaurant le site *attB* vide chromosomique (Bellanger et al., 2014; Burrus, 2017). La forme circulaire de l'ICE va pouvoir être transférée par son propre système de conjugaison vers une nouvelle cellule bactérienne dans laquelle il pourra se réintégrer au chromosome (Burrus, 2017). Lorsqu'un ICE n'est plus intégré au chromosome mais présent sous forme circulaire, il peut être perdu au cours du cycle cellulaire. Les ICE présentent des mécanismes de stabilisation similaires à ceux présents sur les plasmides (Burrus, 2017). Les ICE portent souvent des systèmes Toxine-Antitoxine (TA) ou de Restriction-Modification (RM) permettant d'arrêter la croissance ou de tuer les cellules bactériennes ayant perdu l'ICE (Burrus, 2017; Carraro et al., 2015). Des études récentes ont mis en évidence la réplication de la forme circulaire de certaines familles d'ICE : SXT/R391 (Carraro et al., 2015), ICE*Bs*1 (Lee et al., 2010; Wright et al., 2015), *Tn916* (Wright and Grossman, 2016), ICE*St3* (Carraro et al., 2016), TnGBS1 et TnGBS2 (Guérillot et al., 2013). En plus de se répliquer, l'ICE SXT a un système de partition actif de type II fonctionnel (*srpMRC*) proche phylogénétiquement du système putatif de partition de type II des plasmides IncC (Carraro et al., 2015).

Eléments Intégratifs Mobilisables (IME)

Contrairement aux ICE, les éléments intégratifs mobilisables (IME : integrative and mobilizable element), anciennement appelé transposon mobilisable, ne sont pas capables de se transférer de manière autonome mais ils sont transférés par le système de conjugaison d'un autre EGM conjugatif (plasmide ou ICE) dit « helper » (Bellanger et al., 2014). L'intégration et l'excision des IME sont pour une grande majorité médiées par leur propre intégrase de la famille des recombinases à tyrosine site-spécifique (Guédon et al., 2017). Ils encodent généralement d'autres facteurs pouvant interagir avec l'intégrase pour l'intégration et l'excision (Guédon et al., 2017). Les gènes impliqués dans l'intégration et l'excision des IME sont souvent regroupés ensemble au niveau d'une des extrémités de l'IME (Guédon et al., 2017). Pour leur transfert, les premiers IME décrits (et considérés comme canoniques) vont posséder leur propre origine de transfert (*oriT*), généralement encoder une relaxase et parfois d'autres protéines du relaxosome mais pas de protéine composant le pore de conjugaison (Guédon et al., 2017). Cependant depuis 2010, plusieurs IME atypiques ont été décrits : encodant des protéines du T4SS (type 4 secretion system), encodant des relaxases non canoniques ou n'encodant pas leur propre relaxase (Carraro et al., 2017a; Coluzzi et al., 2017). Les IME présentent différentes stratégies de mobilisation qui peuvent être spécifiques ou non à certaines classes de l'élément conjugatif helper (figure 10) (Guédon et al., 2017).

Salmonella Genomic Island 1 (SGI1), est un IME atypique mobilisé uniquement par les plasmides IncC et IncA. SGI1 étant au cœur de ma thèse, une partie détaillée lui est consacrée.

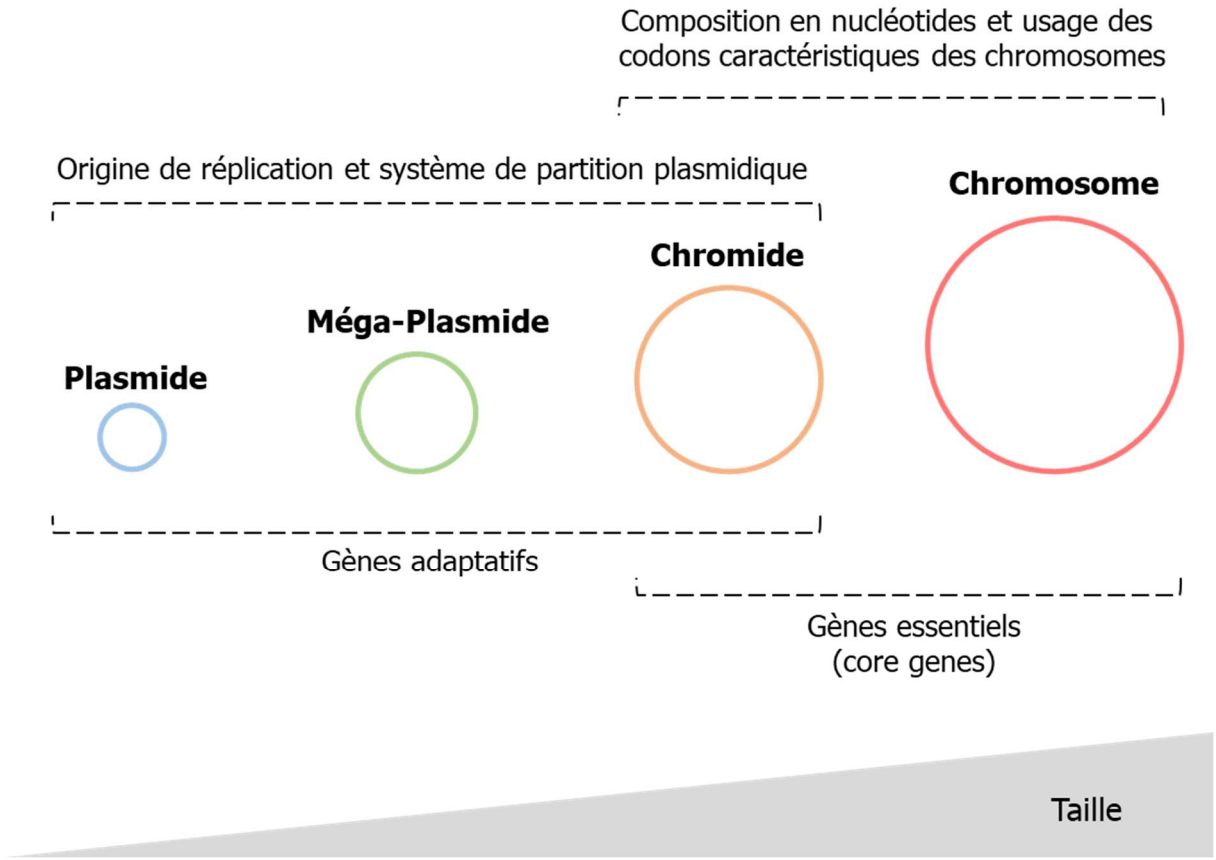


Figure 11 : Evolution des tailles et caractéristiques des réplicons circulaires bactériens.
Les différents réplicons bactériens sont présentés par ordre croissant de taille : plasmide, méga-plasmide, chromide (aussi appelé chromosome secondaire) et chromosome (aussi appelé chromosome primaire). Le terme de méga-plasmide a été introduit en 1982 après la découverte de plasmides de grande taille chez *Rhizobium meliloti* et *Pseudomonas solanacerarum* (Rosenberg et al., 1982). Cependant la distinction entre plasmide et méga-plasmide n'est pas définie par des caractéristiques précises hormis la différence de taille. Récemment, Dicenzo et Finan proposent de placer arbitrairement la limite de taille entre plasmides et méga-plasmides à 350 Kb (DiCenzo and Finan, 2017). Plasmides et méga-plasmides portent des gènes non essentiels (adaptatifs) à la viabilité des cellules. Harrison et al en 2010 ont proposé 3 critères permettant de caractériser les chromides : présence de systèmes de réplication et de partition d'origine plasmidique, composition nucléotidique et usage des codons proches de ceux du chromosome associé, portage de gènes essentiels retrouvés sur les chromosomes d'autres espèces bactériennes (Harrison et al., 2010). Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer la genèse des chromides : l'hypothèse du schisme et l'hypothèse plasmidique. La première hypothèse propose une division du chromosome ancestral en deux réplicons dont un des réplicons aurait fusionné avec un plasmide acquérant son système de réplication (Harrison et al., 2010). La seconde hypothèse suggère que les chromides seraient issus de méga-plasmides qui auraient co-évolué avec le chromosome transformant leur signature génétique (%GC, usage de codon) couplé à des acquisitions de gènes essentiels (Harrison et al., 2010).

c. Les plasmides

Les plasmides sont des unités réplicatives (réplicons) présents majoritairement dans les bactéries sous forme d'ADN circulaire. Cependant, il existe de rares cas de plasmides linéaires chez les *Streptomyces*, genre bactérien présentant la particularité de posséder un chromosome linéaire. Historiquement, les plasmides, considérés comme porteurs de gènes non essentiels et de petites tailles, ont été opposés aux chromosomes porteurs des gènes essentiels et de grandes tailles. Cependant, cette dichotomie est de plus en plus nuancée et les termes de chromosomes primaires/chromosomes secondaires (remplacés de plus en plus par les appellations chromosomes/chromides) et méga-plasmides ont dû être introduits (figure 11) (Harrison et al., 2010). Les plasmides sont des EGM présentant des tailles allant de quelques Kb à plusieurs centaines de Kb (méga-plasmides) et jusqu'à 4 Mb pour certains chromides (Harrison et al., 2010; Smillie et al., 2010). Certains plasmides sont transférables entre souches, espèces ou genres bactériens différents par conjugaison. Les plasmides assurant leur transfert conjugatif de manière autonome sont dits conjugatifs et les plasmides utilisant les systèmes de conjugaison d'autres EGM sont dits mobilisables.

B. Les plasmides : classification, stabilité et transfert

1. Classification des plasmides

Différentes méthodes de caractérisation et de classification des plasmides ont été proposées et sont basées sur les mécanismes essentiels à leur stabilité (réplication, partition) et leur transfert.

a. Historique

La classification des plasmides par groupes d'incompatibilité (Inc) proposée dans les années 70 est encore utilisée aujourd'hui (Chabbert et al., 1972; Novick et al., 1976). Cette classification se base sur l'observation de plasmides incapables de coexister de manière stable dans une population bactérienne en croissance. Si des plasmides ne sont pas capables de coexister, ils sont dits incompatibles. Cette incompatibilité peut être due au partage de systèmes de réplication, de partition ou d'exclusion d'entrée/de surface (cf partie II.B.4. Incompatibilité entre réplicons). Le groupe d'incompatibilité d'un plasmide était défini par des expériences de conjugaison et de cohabitation avec plasmides de groupe Inc connus (Chabbert et al., 1972). Ces techniques ne permettant pas de réaliser des études rapides et à grande échelle, de nouvelles techniques ont été développées permettant d'identifier le groupe d'un plasmide via des amplifications PCR ou alignements de séquences.

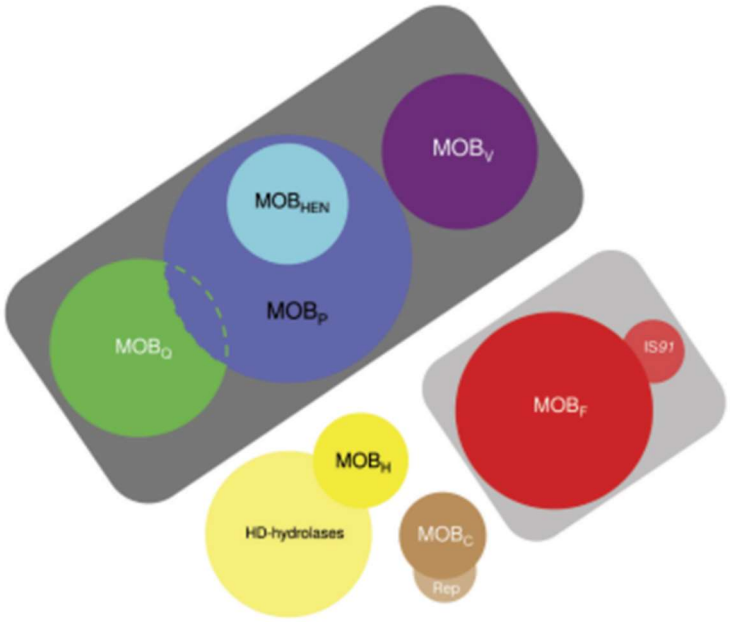


Figure 12 : Relations et caractéristiques des différentes familles de relaxases MOB.
Les relaxases du premier groupe de MOB dans le rectangle gris foncé présentent la caractéristique de n'avoir qu'une tyrosine active dans leur site catalytique. Le second groupe en gris clair contient les relaxases présentant deux tyrosines actives dans leur site catalytique. Pour les autres groupes MOB_H et MOB_C, les études n'ont pas encore permis de caractériser leurs sites catalytiques. Certaines familles de relaxases présentent des homologies avec d'autres familles de protéines : MOB_C avec les protéines Rep, MOB_H avec les HD hydrolases et MOB_F avec la transposase des transposons de la famille IS*91*.
Les relaxases MOB_F sont associées avec les familles de plasmides IncF, IncN, IncP9 et IncW. Les relaxases MOB_H sont associées avec les familles de plasmides IncH, IncJ, IncT, IncP7, IncA et IncC ainsi que des ICE (SXT) ou îlots génomiques dérivant des plasmides susnommés. Les relaxases MOB_C concernent des plasmides conjugatifs ou mobilisables ainsi que des ICE isolés parmi des Gammaprotéobactéries, Firmicutes et Tenecutes. Les relaxases MOB_Q sont associées aux plasmides uniquement mobilisables reliés à la famille IncQ ainsi que des plasmides conjugatifs de Rhizobiaceae et Firmicutes. Les relaxases MOB_P (proche des MOB_{Q1}) sont associées aux familles de plasmides IncP, IncI (comprenant les IncI1, IncB, IncK, IncZ), IncQ2/IncG/IncP6, IncX, IncU, IncI2. Les relaxases MOB_V (proches des MOB_P) sont associées à des plasmides conjugatifs et mobilisables mais également ICE et IME de Firmicutes et Bacteroidetes.
Issu de (Garcillán-Barcia et al., 2009).

b. Classification des plasmides par PBRT et pMLST

La classification « PCR Based Replicon Typing » (PBRT) permet d'identifier le groupe d'incompatibilité d'un plasmide par PCR grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques (Carattoli et al., 2005). Les couples d'amorces PCR vont cibler des gènes caractéristiques des groupes de plasmides (plus de la moitié ciblent le gène *repA*). En 2005, cette technique permettait de caractériser 18 groupes de plasmides majoritairement présents chez les entérobactéries via 8 réactions de PCR multiplex. Aujourd'hui, après plusieurs améliorations, cette technique permet de caractériser 28 groupes de plasmides (Carloni et al., 2017). Cependant, cette technique ne peut identifier un plasmide seulement s'il appartient à un des 28 groupes ciblés (Carloni et al., 2017). Ceci exclut donc la caractérisation de plasmides rares ou nouveaux (Carloni et al., 2017). Par la suite, la technique « plasmid Multilocus Sequence Typing » (pMLST) a été développée afin d'affiner la classification des plasmides de la famille IncI1 (García-Fernández et al., 2008). La pMLST permet de classer les plasmides IncI en 9 sous-groupes de séquence type (ST) via les différents allèles des gènes *repI1*, *ardA*, *trbA-pndC*, *sogS* et *pilL* (García-Fernández et al., 2008). Par la suite, l'identification par pMLST a été étendue à d'autres familles de plasmides (IncHI1, IncHI2, IncF, IncN et IncA/C) et couplée avec PlasmidFinder permettant une identification rapide des plasmides issus de données de génomique à grande échelle (http://genomicepidemiology.org/services/) (Carattoli and Hasman, 2020; Carattoli et al., 2014).

c. Classification des plasmides par les relaxases : MOB

Cette classification propose de classer les plasmides en fonction de la séquence protéique de leur relaxase (Garcillán-Barcia et al., 2009). Cette classification ne concerne donc que les plasmides conjugatifs et les plasmides mobilisables encodant leur relaxase (cf partie II.B.3. Transfert). Garcillán-Barcia *et al.* en comparant les séquences et propriétés des relaxases (gene *mob*), ont classé ces systèmes en six familles MOB : MOB_F, MOB_H, MOB_Q, MOB_C, MOB_P, MOB_V. Au sein de ces 6 familles MOB plus d'une trentaine de sous-clades ont été définis (Garcillán-Barcia et al., 2009). Les relations et caractéristiques des différentes familles MOB sont présentées en figure 12. Les auteurs proposent ce système de classification basé uniquement sur la relaxase en remplacement de la classification PBRT. D'après Garcillán-Barcia *et al.* la classification PBRT n'est pas optimale pour certains grands plasmides issus de fusion entre différents réplicons et possédant plusieurs origines de réplication ou systèmes de partition issus de différents groupes d'incompatibilité (Boyd et al., 1996; Gabant et al., 1993; Zheng et al., 2013). Quelques années après, la méthode « Plasmid Relaxase gene Typing » (PRaseT) basée sur des PCR multiplex ciblant les relaxases de plasmides d'entérobactéries pour déterminer le groupe MOB a été développée (Compain et al., 2014).

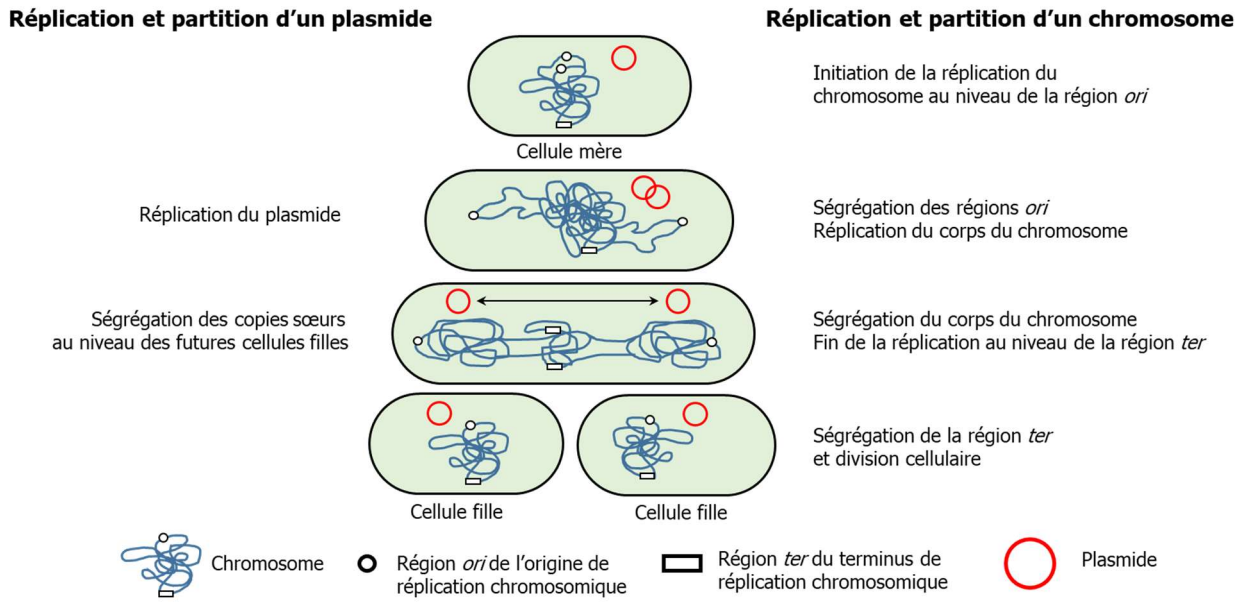


Figure 13 : Cycle cellulaire bactérien et partition des réplicons.
La réplication et la partition des réplicons permettent la transmission de la totalité de l'information génétique de la cellule mère aux cellules filles au cours du cycle cellulaire bactérien. La figure représente de manière simplifiée les étapes de réplication et de partition d'un plasmide et du chromosome d'*E. coli*. Un plasmide va réaliser ces deux étapes distinctement alors que dans le cas du chromosome ces deux étapes s'imbriquent et nécessitent la synchronisation de systèmes complexes et de nombreux acteurs moléculaires (Xindan et al., 2008).

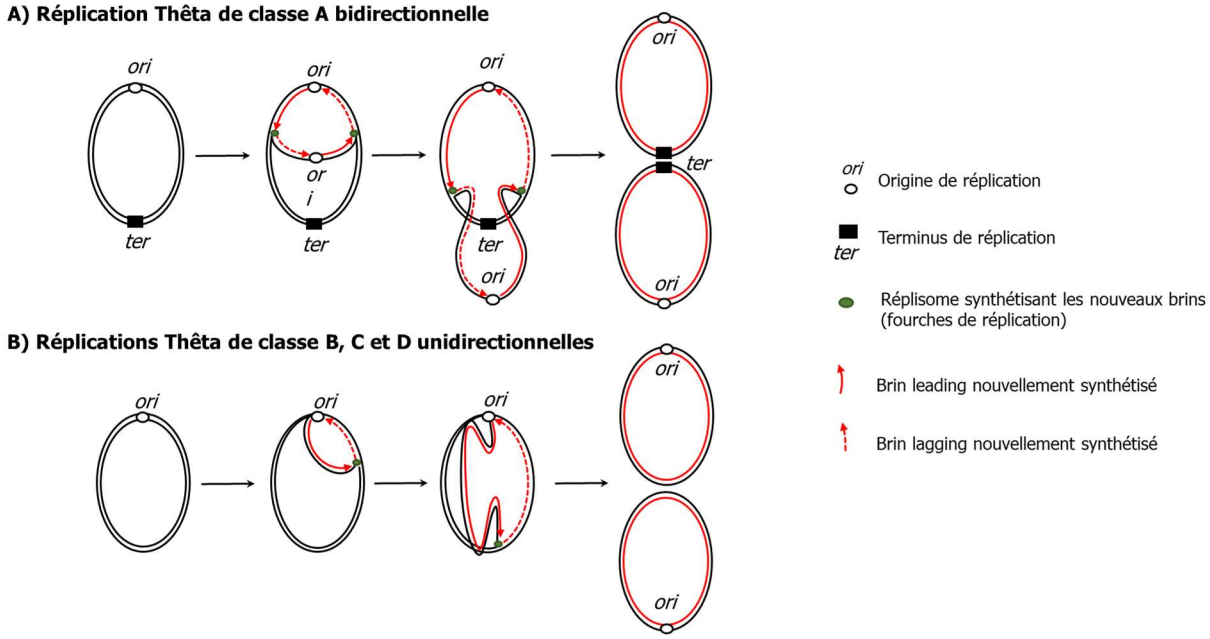


Figure 14 : Représentation schématique des réplications Thêta
Les brins ADN matrice de la réplication thêta sont en noir et les brins nouvellement synthétisés en rouge. Les brins lagging avec les fragments d'Okazaki sont représentés par les tirets et les brins leading par un trait plein. L'origine de réplication (*ori*) est représentée par un rond blanc. **A)** La réplication thêta de classe A commence au niveau d'*ori* de manière bidirectionnelle avec la présence de deux fourches de réplication (rond vert). La réplication se termine à l'opposé d'*ori* dans la région du terminus de réplication (rectangle noir, *ter*). **B)** Les réplications thêta de classe B, C et D commencent au niveau d'*ori* de manière unidirectionnelle avec la présence d'une fourche de réplication (rond vert) et se terminent dans la région d'*ori*.

d. Classification des plasmides par les systèmes de partition : PAR-T

La classification « plasmid partition gene typing » (PAR-T) propose de classer les plasmides d'entérobactéries (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Salmonella enterica ssp*) selon les loci des systèmes de partition de type I (Bousquet et al., 2015). Cette classification ne concerne donc que les plasmides encodant un système de partition de type I (cf partie II.B.2.b. Partition). Les auteurs ont développé un set d'amorces permettant de discriminer par PCR (six multiplex et une simplex) les plasmides appartenant aux groupes IncA/C, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncFIIK, IncFII, IncHI1, IncHI2, IncI1, IncL/M, IncN et IncX. La comparaison des résultats obtenus par PAR-T avec ceux obtenus par une classification de relaxase et/ou PBRT a permis aux auteurs de définir une spécificité de plus de 90% du système de classification PAR-T (Bousquet et al., 2015).

e. Classification des plasmides par PTU

Contrairement aux précédentes méthodes de classification des plasmides, la classification Plasmid Taxonomic Unit (PTU) utilise l'ensemble des séquences nucléotidiques des plasmides (Redondo-Salvo et al., 2020). L'alignement deux à deux de plus de 10 000 séquences de plasmides de référence a montré une organisation en clusters de haute identité de séquences que les auteurs ont appelé Plasmid Taxonomic Unit (PTU) (Redondo-Salvo et al., 2020). Cette technique prend en compte deux scores pour l'alignement des séquences : l'identité nucléotidique moyenne (ANI : average nucelotide identity) et la fraction d'alignement (AF : alignement fraction) correspondant au pourcentage du génome du plasmide s'alignant. Le score d'AF permet d'exclure les régions composées d'EGM (transposon, IS …) pouvant être partagées par des plasmides non reliés. En effet, une région composée d'EGM donnera un haut score d'ANI mais un faible score d'AF. Les PTU composés de plasmides présentant de hauts scores d'ANI et d'AF correspondent au partage d'un backbone conservé. La classification PTU corrèle avec les classifications MOB et Inc (Redondo-Salvo et al., 2020). Par la suite, le laboratoire dont est issue la classification PTU a également développé une application en ligne permettant d'identifier le PTU des séquences de plasmides soumis *in silico* (https://castillo.dicom.unican.es/copla_about/) (Redondo-Salvo et al., 2021).

2. Stabilité

La stabilité d'un EGM correspond à sa capacité de se maintenir de manière stable dans une population bactérienne en croissance. Deux mécanismes sont essentiels à la stabilité des plasmides qui doivent s'intégrer au cours du cycle cellulaire : la réplication et la partition (Figure 13). En plus de ces mécanismes, les plasmides peuvent porter des systèmes de résolution de multimères ou des systèmes Toxine-Antitoxine et/ou de restriction-modification contre-sélectionnant les cellules sans plasmide.

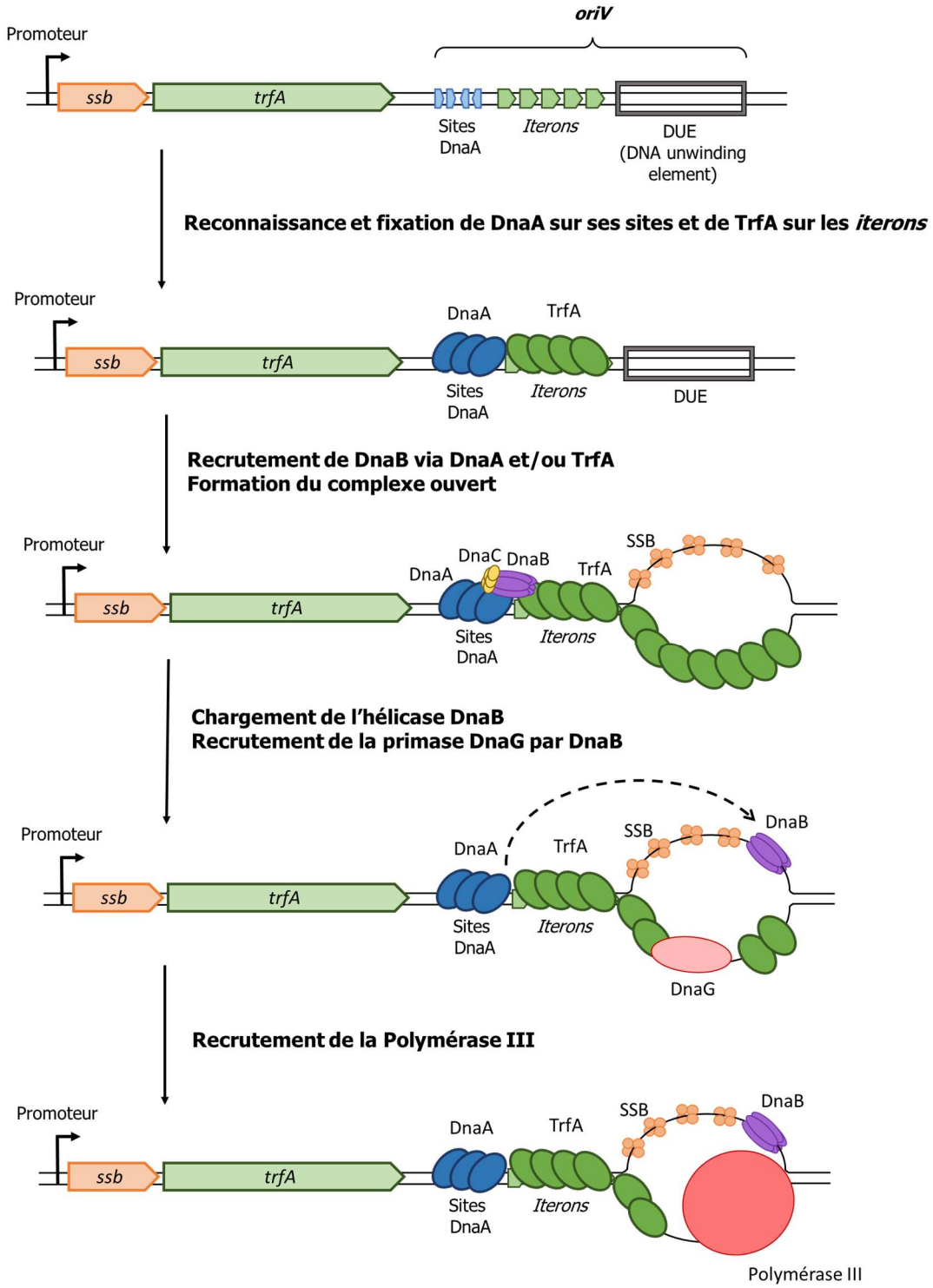


Figure 15 : Initiation de la réplication thêta de classe A (plasmide RK2)
L'origine de réplication du plasmide RK2 (IncP) est représentée schématiquement. La grande flèche orange *ssb* représente le CDS de la protéine SSB (Single Strain Binding protein) et la grande flèche verte *trfA* représente le CDS de la protéine Rep TrfA. Les sites de fixation de la protéine DnaA sont représentés par des petites flèches bleues. Les *itérons* sont représentés par des petites flèches vertes. Le rectangle gris encadre la zone riche en AT d'ouverture de l'ADN (DUE).
La fixation de DnaA sur ses sites et de TrfA sur les *itérons* vont entrainer l'ouverture de l'ADN au niveau de la région DUE (DUE : DNA unwinding element) (Kim et al., 2020; Lilly and Camps, 2015). TrfA va s'étaler sur un des brins de l'ADN et les protéines SSB sur l'autre brin. Les protéines DnaA et TrfA vont recruter l'hélicase DnaB et le facteur de chargement DnaC. Le complexe DnaBC permet de recruter la primase DnaG, puis l'hélicase DnaB est chargée au niveau de la fourche de réplication. Les dernières étapes permettent le recrutement l'ADN polymérase III et la formation du réplisome pour la synthèse des brins (présentés dans la figure suivante).

a. Réplication

L'initiation de la réplication d'un plasmide se fait au niveau d'une région appelée origine de réplication (*ori*). Certains plasmides de grandes tailles possèdent plusieurs origines de réplication fonctionnelles différentes : les IncF (RepFII, RepFIA, RepFIB) (Rozwandowicz et al., 2018) et les IncHI1 (RepHI1A, RepHI1B et RepFIA) (Gabant et al., 1993; Tassinari et al., 2016). Quatre systèmes de réplication ont été décrits chez les plasmides : la réplication thêta, la réplication en cercle roulant, la réplication repABS et la réplication par déplacement de brin.

- *Réplication Thêta θ*

La réplication Thêta permet la réplication simultanée des deux brins d'ADN entrainant la formation d'un intermédiaire ressemblant à la lettre grec θ (thêta) dont est issu le nom de cette réplication (figure 14). A ce jour, quatre classes de réplication thêta ont été caractérisées : la classe A dépendante de DnaA (similaire à l'initiation de la réplication du chromosome) et les classes B, C et D dépendantes de Pri-A (pour revue (Kim et al., 2020; Lilly and Camps, 2015)).

Réplication Thêta de classe A, DnaA dépendante

L'initiation de la réplication Thêta de classe A (figure 15) commence par la fixation des protéines Rep plasmidiques sur des séquences répétées directes appelées *itérons* présentes dans la région *ori* (Lilly and Camps, 2015). La reconnaissance spécifique des *itérons* par les protéines Rep dépend de leurs séquences mais également de leurs espacements en correspondance avec la périodicité de la double hélice de l'ADN (Giraldo and Fernández-Tresguerres, 2004). L'initiation de la réplication Thêta de classe A nécessite en plus des complexes Rep-*iterons*, la fixation de DnaA sur ses sites de fixation avant ou après les *itérons* (Kim et al., 2020). Par la suite, plusieurs autres protéines (SSB, DnaB, DnaC, DnaG, ADN polymérase III) vont être recrutées jusqu'à la formation du réplisome (figure 16) (Kim et al., 2020). La réplication Thêta de classe A étant bidirectionnelle, sa terminaison (rencontre des deux fourches de réplication) a lieu dans une région appelée région du terminus de réplication (figure 17) (Crosa et al., 1976; Lovett et al., 1975) possédant plusieurs sites *Ter* polaires de 20 pb (Bastia et al., 1981; Crosa et al., 1976; Horiuchi and Hidaka, 1988; Lovett et al., 1975) reconnus par les protéines Tus (Hill et al., 1989). Les protéines Tus complexées aux sites *Ter* permettent à la fourche de réplication de passer dans le sens permissif mais la bloquent plus ou moins selon les sites *Ter* dans le sens non permissif (Moreau and Schaeffer, 2012). Le système de Tus/*Ter* pourrait être d'origine plasmidique et aurait été domestiqué juste avant l'origine des *Enterobacterales* car il est retrouvé uniquement sur les chromosomes des *Enterobacterales* et *Aeromonadales*, sur les chromides (origine plasmidique) des *Pseudoalteromonas*, sur des éléments génétiques mobiles (plasmides) ou semble être

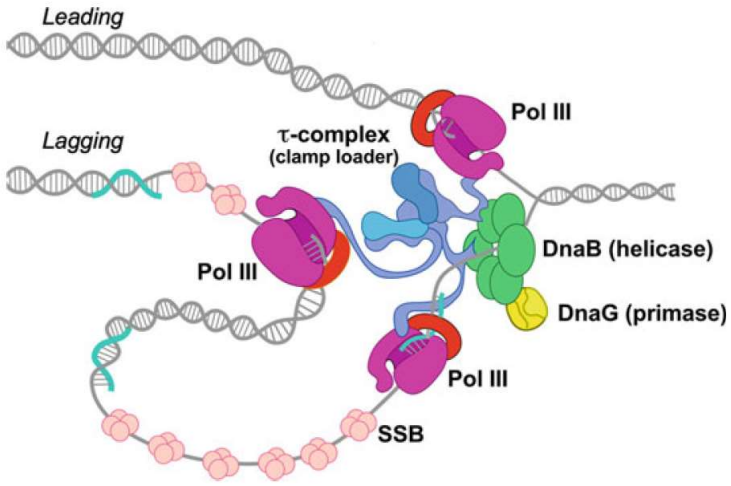


Figure 16 : Organisation du réplisome bactérien.
Les brins d'ADN sont tenus par les pinces beta (cercle rouge) des ADN polymérases III (violet). Deux ADN polymérase III sont sur le brin lagging et une sur le brin leading. Le complexe τ (bleu) connecte les ADN polymérase III et l'hélicase DnaB (vert) encerclant le brin lagging. La primase DnaG (jaune) se fixe temporairement sur l'hélicase DnaB pour initier la synthèse d'une amorce RNA nécessaire à la réplication du brin lagging. L'extension des amorces ARN des brins lagging entraine la formation des fragments d'Okazaki (1-2 Kb). Des tétramères de SSB (rose saumon) se fixent sur les portions d'ADN simple brin du brin lagging pour le protéger des nucléases et empêcher la formation de structures secondaires pouvant bloquer l'ADN polymérase III.
Issus de (Yao and O'Donnell, 2021)

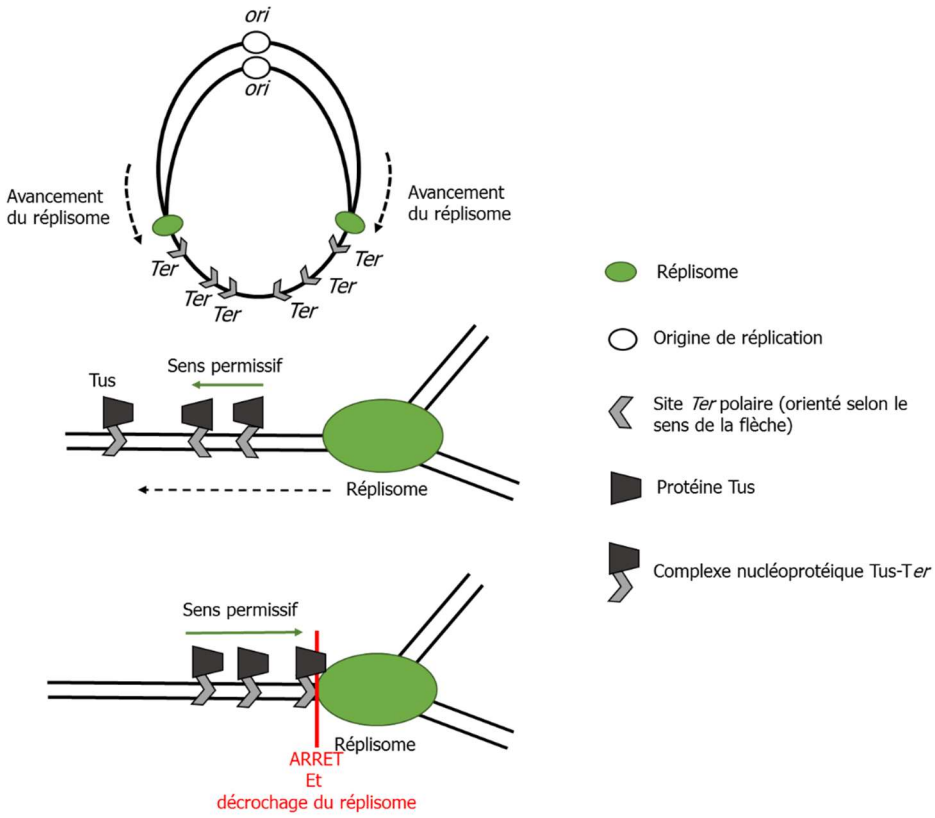


Figure 17 : Terminaison de la réplication *Thêta* de classe A
Les sites *Ter* (flèches grises) polaires convergent à l'opposé de la région *ori*. La fixation des protéines Tus (quadrilatères noirs) est orientée selon le sens des sites *Ter* permettant le passage du réplisome dans le sens permissif et le blocage de ce dernier lorsque le sens d'avancement du réplisome ne correspond pas au sens permissif du complexe Tus-*Ter*.

distribué ponctuellement ne suivant pas la phylogénie des espèces (Galli et al., 2019).

Réplication Thêta de classe B, C et D, PriA dépendante

La protéine PriA peut être recrutée via la formation de complexes d'acides nucléiques à 3 brins pouvant se former lors de la réplication, de la transcription ou d'évènements de recombinaison (Windgassen et al., 2018). Ces complexes sont nommés R-loop lorsque que le 3ème brin est de l'ARN et D-loop lorsque le 3ème brin est de l'ADN. Les classes B, C et D de réplication Thêta recrutent la protéine PriA via la formation de R-loop et divergent par les mécanismes d'assemblage du réplisome : classe B (plasmides ColE1), classe C (plasmides ColE2 et ColE3) et classe D (plasmide pAMβ1) (Kim et al., 2020; Lilly and Camps, 2015). Les plasmides de la classe B encodent un transcrit ARN de 600pb (RNAII) permettant l'ouverture de l'ADN générant un R-loop recrutant PriA (Lilly and Camps, 2015). La fixation de PriA va permettre le recrutement des protéines DnaT et PriB ou PriC (Windgassen et al., 2018). Le complexe PriA-DnaT-PriB-ADN va permettre le recrutement et le chargement de l'hélicase DnaB et de la polymérase III pour assurer la réplication (Windgassen et al., 2018). Les plasmides possédant une réplication Thêta de classe C et D encodent en plus une protéine Rep nécessaire à l'initiation de la réplication PriA-dépendante en amont de la région *ori* (Kim et al., 2020; Lilly and Camps, 2015). Les réplications thêta des classes C, B et D sont unidirectionnelles commençant et se terminant au niveau de la région *ori* (Lilly and Camps, 2015; Nakasu and Tomizawa, 1992; Takechi and Itoh, 1995)

Régulation du nombre de copies des plasmides à réplication thêta

La régulation de l'initiation de la réplication dépend majoritairement du nombre de copies du plasmide dans la cellule (Brantl, 2014; Chattoraj, 2000; Konieczny et al., 2015). Dans le cas des plasmides de classe A, l'augmentation de production de protéines Rep liée à l'augmentation du nombre de copies du plasmide va favoriser la formation de dimères de Rep ne pouvant pas se fixer sur les *itérons* (Konieczny et al., 2015). D'autres acteurs peuvent intervenir dans la balance entre monomères et dimères de Rep, telles que des protéases (ClpAP) pouvant transformer les dimères de Rep en monomères (Bury et al., 2017). L'expression de *rep* peut être régulée par les protéines Rep elles-mêmes fixées sur des *itérons* présents dans le promoteur (Filutowicz et al., 1985; Ingmer et al., 1995; Komori et al., 1999) ou via des répresseurs transcriptionnels encodés par les plasmides (Kim et al., 2020; Thomas and Hussain, 1984). Les plasmides à haut nombre de copies à réplication Thêta de classe A présentent également un phénomène de menottage (handcuffing) via la formation de ponts entre les origines de réplication des différentes copies de plasmide empêchant l'initiation de la réplication (Konieczny et al., 2015). La production d'ARNi (ARN interférant ou ARN antisens) encodés par certains plasmides de classe A (IncI, IncK, IncBO, IncL), augmentant avec l'augmentation du nombre

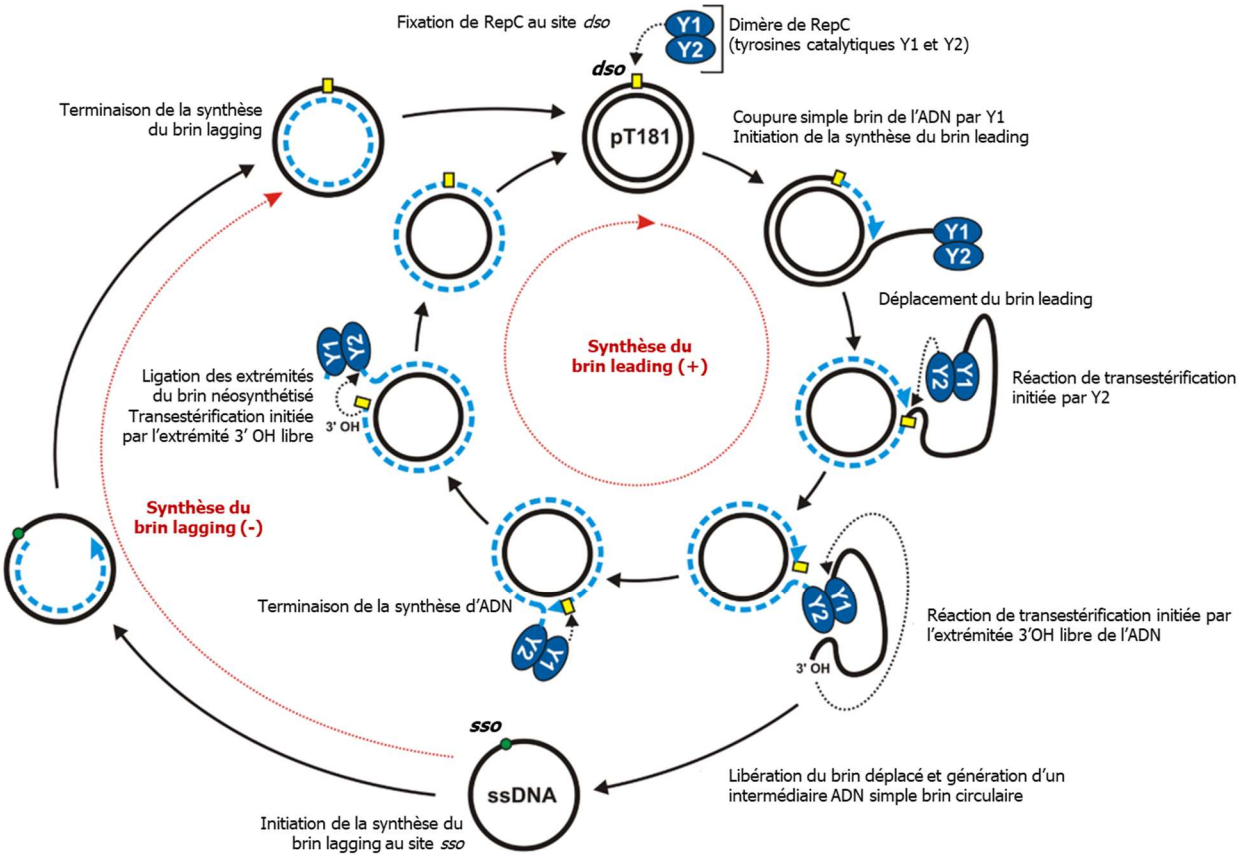


Figure 18 : Réplication en cercle roulant (rolling circle replication).
Le modèle des différentes étapes de la réplication en cercle roulant pour la réplication du plasmide pT181 est représenté sur ce schéma. Les origines de réplication *dso* et *sso* sont représentées respectivement par un rectangle jaune et un rond vert. Les protéines RepC sont représentées par des ovales bleus. L'initiation de la réplication se fait par la coupure d'un des deux brins d'ADN par l'endonucléase plasmidique RepC au niveau du site *dso* (*double strand origin*) (Ruiz-Masó et al., 2015). Le site *dso* est divisé en deux régions : une région de fixation d'un dimère de protéines RepC (*bind*) et un site où la tyrosine catalytique d'une des protéines RepC coupe l'ADN (*nick*) (Ruiz-Masó et al., 2015; Wawrzyniak et al., 2017). L'extrémité 3'OH libérée par la coupure joue le rôle d'amorce à l'ADN polymérase de l'hôte pour la synthèse du nouveau brin d'ADN (Ruiz-Masó et al., 2015; Wawrzyniak et al., 2017). Le dimère de RepC reste lié de manière covalente à l'extrémité 5' du brin coupé jusqu'à la terminaison de la synthèse du brin leading (Wawrzyniak et al., 2017). La terminaison de la synthèse du brin leading nécessite un nouvel événement de coupure par la protéine RepC au niveau du site *nick* reconstitué entrainant la formation d'un intermédiaire d'ADN simple brin circulaire (Ruiz-Masó et al., 2015). La conversion de cet intermédiaire simple brin en double brin se fait par la synthèse du brin lagging initiée au site *sso* (*single-strand origin*) (Wawrzyniak et al., 2017). La synthèse du brin lagging par la machinerie de l'hôte nécessite la synthèse d'une amorce ARN au site *sso* par l'ARN polymérase (Wawrzyniak et al., 2017).
Adapté de (Wawrzyniak et al., 2017).

de copies du plasmide, bloquent la traduction du peptide leader nécessaire à la traduction de ARNm *rep* (Athanasopoulos et al., 1999; Hama et al., 1990; Wilson et al., 1993). Les plasmides à réplication Thêta de classe B et C utilisent également des ARNi dont l'accumulation inhibe l'initiation de la réplication en bloquant la formation du R-loop pour la classe B (Brantl, 2014; Polisky, 1988) ou la traduction de *rep* en s'hybridant sur son ARNm pour la classe C (Hiraga et al., 1994).

- *Réplication en cercle roulant « rolling circle »*

La réplication en cercle roulant (RCR : rolling circle replication) présentée en figure 18 concerne majoritairement la réplication des plasmides de petite taille inférieure à 30 Kb (Ruiz-Masó et al., 2015). La RCR dissocie la réplication du brin leading et du brin lagging à partir d'origines de réplication distinctes (Wawrzyniak et al., 2017). Les plasmides utilisant la RCR contrôlent l'initiation de la RCR via un ARN antisens ou via la combinaison d'un ARN antisens et d'un répresseur transcriptionnel inhibant la transcription et la traduction de *rep* (Pluta and Espinosa, 2018; Ruiz-Masó et al., 2015). La RCR est également impliquée dans les mécanismes de transfert conjugatif des plasmides et ICE (Llosa et al., 2002) et dans la réplication de certains transposons et phages (Chandler et al., 2013; Mendiola et al., 1994).

- *Réplication repABS*

La majorité des plasmides d'Alphaproteobactéries (particulièrement les plasmides de grande taille et tous les chromides) portent au moins un opéron *repABS* impliqué dans la réplication et la partition de ces réplicons (Pinto et al., 2012). Les protéines RepA et RepB sont homologues aux protéines ParA et ParB des systèmes de partition de type I et présentent les mêmes propriétés (Pinto et al., 2012). La protéine RepC est impliquée dans la réplication de ces réplicons et ne présente pas d'homologie avec d'autre protéines initiatrices de réplication (Pinto et al., 2012). Les protéines RepC initieraient la réplication en se fixant dans une région riche en AT proche de *repC* qui correspondrait à l'*oriV* de ces plasmides (Cervantes-Rivera et al., 2011; Pinto et al., 2011). La transcription de l'opéron *repABC* est réprimée par les protéines RepA et RepB (Pérez-Oseguera and Cevallos, 2013). La région intergénique entre *repB* et *repC* encode un ARN antisens inhibant la traduction de *repC* en ciblant son ARNm (Rivera-Urbalejo et al., 2015).

- *Réplication par déplacement de brin*

La réplication par déplacement de brin semble propre aux plasmides de la famille IncQ et partage des similarités avec la réplication *Thêta* de classe A (Lilly and Camps, 2015; Loftie-Eaton and Rawlings, 2012). Ce mode de réplication fait intervenir 3 acteurs protéiques : RepB, RepA et RepC étant respectivement une primase, une hélicase et une protéine se fixant sur les *itérons*

Tableau 2 : Tableau récapitulatif des types de systèmes de partition.

Type de système	Protéine motrice	Protéine adaptatrice	Centromère	Type de NTPase	Exemple
Type I	ParA ATPase	ParB	*parS*	Walker A cytoskeletal ATPase proteins (WACA)	F, P1
Type II	ParM ATPase	ParR	*parC*	Actin-like	R1
Type III	TubZ GTPase	TubR	*tubC*	Tubulin-like	pBToxis

Tableau 3 : Nomenclature des acteurs moléculaires des systèmes ParABS.

Type de réplicon	Réplicon	ParA	ParB	parS
Plasmide	Plasmide P1	ParA	ParB	*parS*
	Plasmide F	SopA	SopB	*sopC*
	Plasmide pTAR	ParA	ParB	*parS*
Chromosome secondaire / Chromide	Chromosome II *Vibrio cholerae*	ParA2	ParB2	*parS2*
Chromosome	Chromosome I *Vibrio cholerae*	ParA1	ParB1	*parS1*
	Chromosome *Bacilius subtilis*	Soj	Spo0J	*parS*
	Chromosome *Caulobacter cresentus*	ParA	ParB	*parS*
	Chromosome *Streptomyces coelicolor*	ParA	ParB	*parS*

(Loftie-Eaton and Rawlings, 2012). L'origine de réplication (*oriV*) des plasmides IncQ est composée de trois *itérons* de 22 pb suivis d'une région riche en AT et de deux répétitions inverses correspondant aux sites d'initiation simple brin (ssiA/ssiB : single-strand initiation sites A/B) (Loftie-Eaton and Rawlings, 2012). La première étape de la réplication par déplacement de brin correspond à la fixation de RepC sur les *itérons* créant une courbure de l'ADN permettant la séparation des brin dans la région riche en AT (Lilly and Camps, 2015; Miao et al., 1995). Cette séparation des brins stimule l'assemblage des monomères de RepA (hélicase) autour de l'ADN simple brin (ADNsb) ouvrant l'ADN et révélant les structures tiges-boucles des sites *ssiA* et *ssiB* reconnues par la primase RepB (Kim and Meyer, 1991; Loftie-Eaton and Rawlings, 2012; Miao et al., 1993). Une fois les amorces synthétisées par RepB, l'ADN polymérase III est recrutée pour assurer la réplication du brin leading alors que le brin lagging est déplacé sans réplication (Loftie-Eaton and Rawlings, 2012). Cette réplication libère des intermédiaires d'ADNsb jusqu'à la réplication complète des deux brins terminée au site de l'origine de réplication (Kok et al., 1989; Loftie-Eaton and Rawlings, 2012).

b. Partition

Il existe deux grands types de partition selon le nombre de copies des réplicons : la partition passive (plasmides de petite taille et à haut nombre de copies) et la partition active (plasmides à bas nombre de copies). La ségrégation passive est un phénomène de diffusion aléatoire dans la cellule des copies du plasmide permettant l'obtention de cellules filles avec au moins une copie (Reyes-Lamothe et al., 2014). La réussite de ce type de ségrégation est dépendante du nombre de copies du plasmide par cellule selon la formule : Probabilité de perte = $(1/2)^{\text{nombre de copie}}$ (Nordstrom, K & Austin, S J, 1989). Lorsqu'un plasmide est présent à 15 copies par cellule, il a une probabilité d'être perdu de 0,003% à chaque génération. Pour un plasmide présent à 4 copies par cellule, la probabilité de perte augmente à 6,25% à chaque génération. Dans le cas du plasmide à 15 copies par cellule, après 100 générations bactériennes, 0,3% des cellules n'auront plus le plasmide. Pour un plasmide à 4 copies par cellule, après 100 générations bactériennes, 62,5% des cellules n'auront plus le plasmide. Les plasmides à bas nombre de copies utilisent des systèmes de ségrégation actifs permettant de positionner les copies du plasmide au niveau des futures cellules filles au cours du cycle cellulaire. Ces systèmes sont composés d'une séquence ADN appelée centromère présente en nombre variable de copies (Bouet and Funnell, 2019). Sur ces séquences centromériques se fixe un dimère de la protéine dite adaptatrice ou centromere binding protein (CBP). Le complexe nucléoprotéique centromères + CBP est appelé complexe de partition. Ce complexe de partition interagit avec une protéine motrice pour la ségrégation des copies sœurs. Les systèmes de partition sont divisés en 3 types selon les caractéristiques de la protéine motrice et présentés dans le tableau 2 (Ebersbach and Gerdes, 2005; Salje, 2010). Les gènes

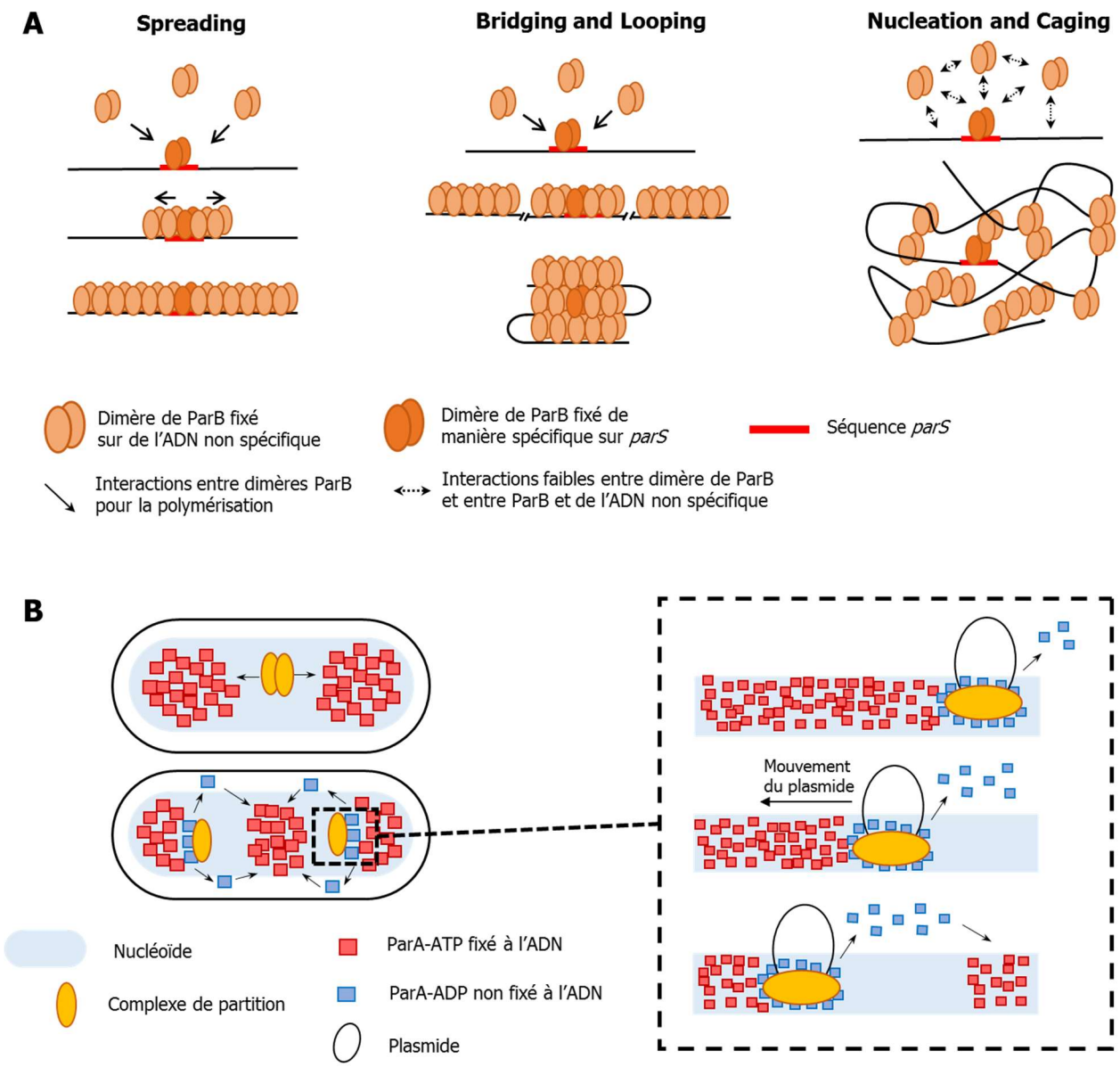


Figure 19 : Modèles du mécanisme moléculaire du système de partition de type I ParABS.
A) Les trois modèles d'assemblage du complexe de partition. Le « Spreading » correspond à un étalement sur une dimension par polymérisation de dimères de ParB. Le « Bridging and looping » correspond à l'étalement sur une dimension de ParB avec la formation de boucles d'ADN et de ponts protéiques (Graham et al., 2014). Pour le modèle « nucleation and caging » Sanchez *et al.* ont mis en évidence qu'environ 90 % des protéines ParB du plasmide F présentes dans les cellules se situent dans une zone de confinement autour des centromères (Sanchez et al., 2015). Le centromère jouerait le rôle de centre de nucléation attirant la majorité des protéines ParB présentes dans la cellule dans un réseau de faibles interactions ParB-ParB et ParB-ADN non spécifique jusqu'à un effet d'enfermement (« caging ») autour de parS (Sanchez et al., 2015). **B)** Modèle du positionnement du complexe de partition par les protéines ParA.

de la protéine adaptatrice et de la protéine motrice des trois types de systèmes de partition forment l'opéron *par*. Au sein de chaque type, il existe une grande variabilité des séquences centromériques entrainant la spécificité des systèmes de partition pour leur réplicon.

- *Les systèmes de partition de type I : ParABS*

Les systèmes de partition ParABS ont été étudiés chez différents plasmides et chromosomes ayant pour conséquence une nomenclature hétérogène des acteurs moléculaires (quelques exemples sont présentés dans le tableau 3). Le système de partition ParABS est le plus représenté chez les plasmides à bas nombre de copies et il est systématiquement présent sur les plasmides ayant des tailles supérieures à 180kb (Planchenault et al., 2020). La présence des systèmes de partition ParAB sur les réplicons de grande taille ne serait pas uniquement due à une pression de sélection pour une ségrégation correcte mais également afin de localiser ces réplicons au cœur du nucléoïde (Planchenault et al., 2020). Les larges molécules d'ADN circulaires ont tendance à être exclues du nucléoïde et se localisent au niveau de pôles de la bactérie (Planchenault et al., 2020). Les systèmes ParABS permettent de contrecarrer ce phénomène et de localiser ces molécules d'ADN dans le nucléoïde (Planchenault et al., 2020). Le système ParABS est le seul système de partition retrouvé sur les chromosomes bactériens (Gerdes et al., 2000; Livny et al., 2007). La séquence palindromique de 16pb consensus des sites *parS* chromosomiques (tGTTTCACGTGAAACa), initialement identifiée chez *Bacillus subtilis*, a été retrouvée sur 17 autres génomes bactériens (Lin and Grossman, 1998). En 2007, 69% des génomes bactériens complets disponibles possèdent ces séquences *parS* chromosomiques et 92% de ces sites *parS* se situent dans les 15% du chromosome autour de l'*oriC* (Livny et al., 2007). Bien que les systèmes de partition de type I soient étudiés depuis de nombreuses années, les mécanismes d'assemblage et de relocalisation des réplicons ne sont pas clairement élucidés. Les trois modèles de formation du complexe de partition ParB-*parS* sont présentés en figure 19A. Le premier modèle historique, le « spreading », propose un étalement unidimensionnel des protéines ParB sur de l'ADN non spécifique adjacent à *parS* (Lynch and Wang, 1995). Le modèle « bridging and looping » correspond à des étalements des protéines ParB sur des distances limitées autour des sites *parS* ou sur de l'ADN non spécifique et interagissant entre elles pour former des ponts protéiques entrainant la formation de boucles d'ADN permettant la compaction de plusieurs Kb d'ADN (Graham et al., 2014). Le modèle « nucleation and caging » correspond à l'attirement des protéines ParB autour du centromère dans un réseau de faibles interactions ParB-ParB et ParB-ADN non spécifique jusqu'à un effet d'enfermement (« caging ») autour de *parS* (Sanchez et al., 2015). Une fois le complexe de partition formé, il va interagir avec les protéines motrices ParA (figure 19B). Les protéines ParA

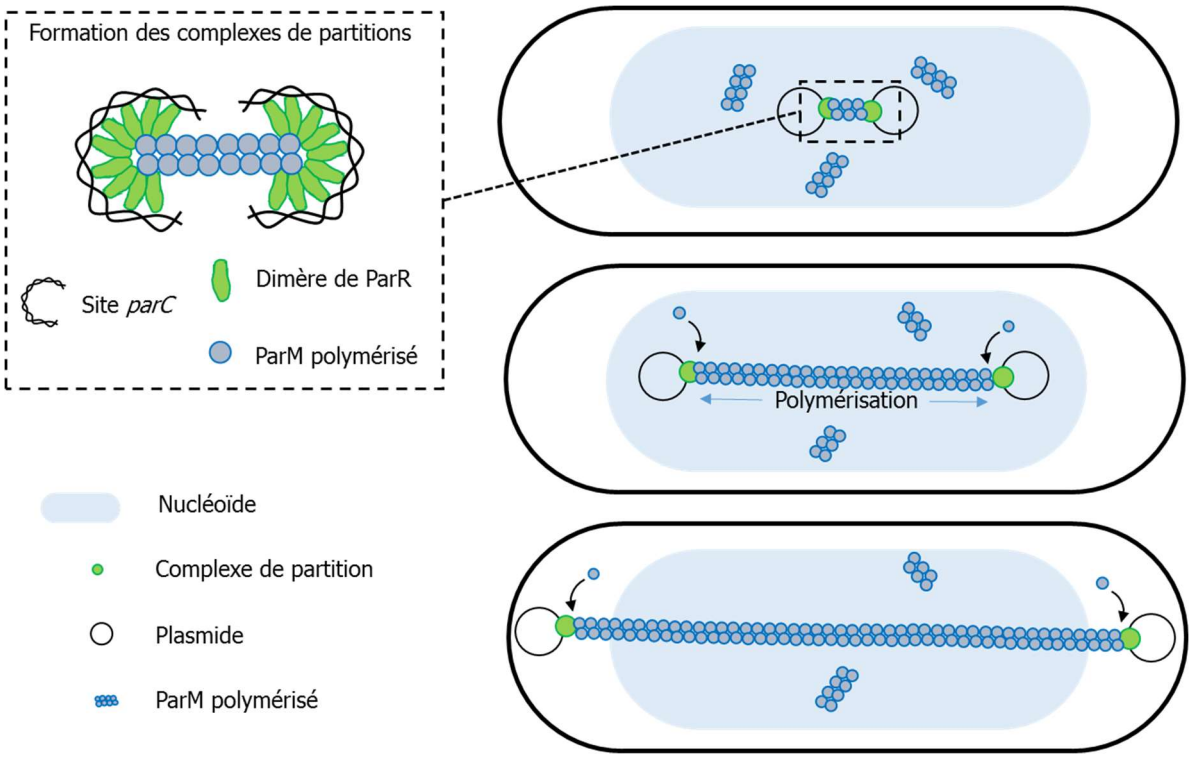


Figure 20 : Modèle du mécanisme moléculaire du système de partition de type II ParMRC

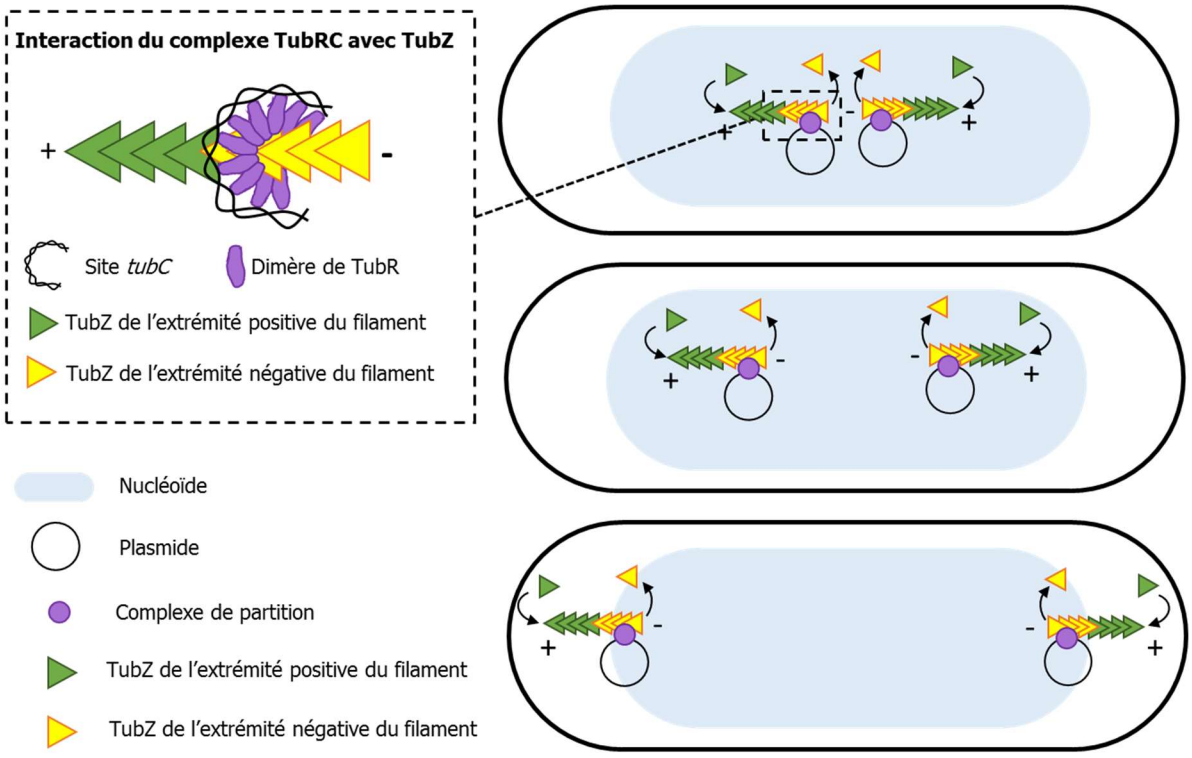


Figure 21 : Modèle du mécanisme moléculaire du système de partition de type III TubZRC

forment un gradient co-localisant avec le nucléoïde (Le Gall et al., 2016; Vecchiarelli et al., 2010, 2012). Le complexe de partition, via des interactions ParB-ParA, suivrait le gradient de ParA sur le nucléoïde. Il existe plusieurs modèles de ce mécanisme, tous basés sur le « Brownian ratchet » et comparés par Hu *et al.* (Hu et al., 2017). ParA se fixe sur de l'ADN non spécifique de manière ATP dépendante (Ah-Seng et al., 2009). ParB et l'ADN stimulent l'activité ATPase de ParA entrainant la libération des ParA dans le cytoplasme (Ah-Seng et al., 2009). Comme la re-fixation de ParA sur l'ADN n'est pas immédiate (Vecchiarelli et al., 2010), il y a formation d'un espace sans ParA sur le nucléoïde en aval du complexe de partition. Cette asymétrie de ParA autour du complexe de partition entraine son déplacement vers les zones de ParA les plus concentrées et donc empêche tout retour en arrière (Bouet and Funnell, 2019).

- *Les systèmes de partition de type II et III : ParMRC et TubZRC*

Le système de partition de type II (ParMRC) est le système de partition le mieux caractérisé et présenté en figure 20. Ce système de partition a été étudié chez divers plasmides : R1 et pB171 d'*E. coli* et pSK41 de *Staphylococcus aureus* (Møller-Jensen et al., 2007; Popp et al., 2010; Schumacher et al., 2007). La formation du complexe de partition se fait via la fixation de dimères de ParR (CBP) sur les sites centromériques *parC* en formant une structure hélicoïdale (Møller-Jensen et al., 2007). Ces complexes de partition vont interagir avec les ATPases ParM (van den Ent et al., 2002). Les protéines ParM polymérisent spontanément sous forme de courts filaments instables qui rechercheraient de manière aléatoire les complexes de partition dans les cellules (Garner et al., 2007). L'attachement d'un complexe de partition ParR-*parC* aux deux extrémités d'un filament ParM permet de le stabiliser et d'empêcher son désassemblage (Garner et al., 2004). Le filament ParM va s'allonger en polymérisant au niveau des extrémités pour séparer et pousser les plasmides frères au niveau des pôles cellulaires bactériens (Garner et al., 2007; Møller-Jensen et al., 2003; Salje et al., 2010).

Le système de partition de type III (TubZRC) présenté en figure 21 est retrouvé principalement sur des plasmides présents dans des espèces de *Bacillus* (Larsen et al., 2007; Tang et al., 2006) et chez des bactériophages de *Pseudomonas* (Kraemer et al., 2012). La formation du complexe de partition se fait par la fixation de dimères de TubR (CBP) sur les sites centromériques *tubC* en formant une structure hélicoïdale (Aylett and Löwe, 2012; Martín-García et al., 2018). Le complexe de partition ainsi formé va interagir avec les GTPases TubZ pour la ségrégation des plasmides frères (Aylett et al., 2010). Contrairement au système ParRMC poussant les plasmides aux pôles cellulaires, le système TubZRC va tirer les plasmides vers les pôles cellulaires. Les filaments de TubZ sont polaires avec une extrémité positive où a lieu la polymérisation et une extrémité négative où le filament se désassemble et tracte le complexe de partition (Fink and Löwe, 2015; Larsen et al., 2007).

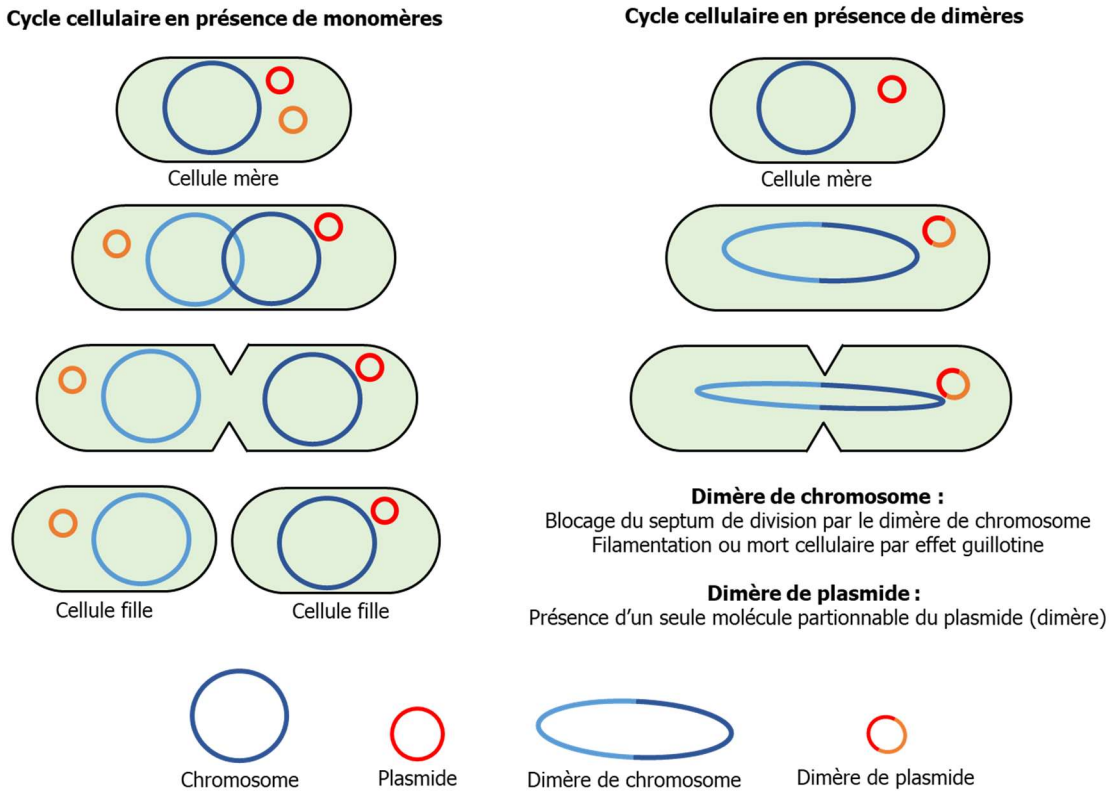


Figure 22 : Illustration du devenir de dimères chromosomiques et plasmidiques au cours d'une génération bactérienne.

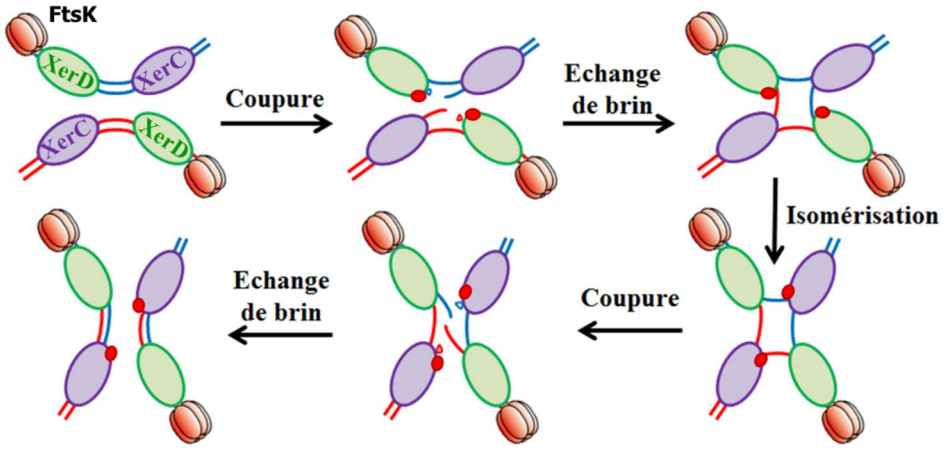


Figure 23 : Mécanisme de la recombinaison spécifique de site permettant la résolution des dimères chromosomiques. Les recombinases sont représentées par des ovales verts (XerD) et violets (XerC), FtsK est représenté par un hexamère orange et les tyrosines catalytiques actives par un ovale rouge. FtsK (filamenting temperature sensitive mutant K) est une translocase à ADN présente sous forme hexamèrique au septum de division couplant la ségrégation des régions *ter* chromosomique et la division cellulaire (Bigot et al., 2007; Grainge et al., 2011). La recombinaison site spécifique des recombinases XerC et XerD se déroule en plusieurs étapes : fixation des recombinases sur le site *dif* chromosomique avec formation de la synapse de recombinaison, activation de XerD par FtsK, première coupure de brin, échange de brin entraînant la formation de la jonction de Holliday, isomérisation de la jonction de Holliday entraînant l'activation de XerC, deuxième coupure puis le deuxième échange de brin aboutissant à la résolution de la jonction de Holliday et du dimère de chromosome.

- *Un système de partition atypique : StbA*

Le système de partition StbA a été décrit chez le plasmide R388 (IncW) (Guynet et al., 2011). Des homologues à ce système de partition ont été retrouvés chez d'autres familles de plasmides tels que les IncN (R46 et pKM101), IncP (RP4, pWW0) et IncI (R721) (Guynet et al., 2011; Planchenault et al., 2020). Contrairement aux autres systèmes de partition, seule la protéine StbA assure la stabilité du plasmide R388 (Guynet et al., 2011). Le gène *stbA* fait partie d'un opéron avec les gènes *stbB* et *stbC* qui ne sont pas nécessaires à la partition mais impliqués dans la conjugaison du plasmide (Guynet et al., 2011). L'opéron *stbABC* fait parti d'une région conservée de 17 990 pb directement adjacente à l'origine de transfert (*oriT*) impliquée dans le transfert conjugatif des plasmides (Fernández-López et al., 2006). StbA se fixe sur une région composée de 5 répétitions directes de 9pb espacées de 2pb (*stbDR*) en amont de StbA (Fernández-López et al., 2006; Guynet et al., 2011).

c. Résolution des dimères

Un dimère (ou multimère) est une molécule d'ADN unique issue de la fusion covalente de deux (ou plus) molécules d'ADN sœurs. Ces dimères (ou multimères) doivent être résolus avant la division cellulaire afin d'éviter des problèmes de ségrégation (figure 22). La formation de dimères ou multimères affecte la stabilité des plasmides car cela diminue le nombre de molécules d'ADN partitionnables sans modifier le nombre de copies de ces plasmides (comptabilisés via le nombre d'origine de réplication) (Field and Summers, 2011). De plus l'initiation de la réplication étant aléatoire parmi les *ori* disponibles, un dimère a deux fois plus de chance qu'un monomère de se répliquer et donc de former un nouveau dimère (Field and Summers, 2011). Le phénomène appelé « dimer catastrophe » décrit le processus rapide d'accumulation de dimères dans une lignée cellulaire à la suite de la génération d'un unique dimère se répliquant plus fréquemment que les monomères (Field and Summers, 2011). La résolution de dimères est assurée par un événement de recombinaison spécifique de site catalysé par une ou plusieurs recombinases (pour revue (Crozat et al., 2014)). L'exemple de la réaction de recombinaison permettant de résoudre un dimère de chromosome est présentée en figure 23. La résolution des dimères chromosomiques est assurée par les recombinases à tyrosine XerC et XerD catalysant la recombinaison spécifique de site au niveau d'un locus ADN nommé *dif* (*deletion induced filamentation*) situé dans la région *ter* à l'opposé de l'origine de réplication (Blakely and Sherratt, 1994). Certaines familles de plasmides exploitent les recombinases XerC et XerD chromosomiques pour résoudre leurs multimères : les plasmides ColE1 et ColE2 au niveau du site *cer* (Summers and Sherratt, 1984) et le plasmide pSC101 au niveau du site *psi* (Cornet et al., 1994). En plus de XerC et XerD, la résolution de multimères aux sites *cer* et *psi* nécessite les présences respectives des protéines accessoires PepA/ArgR et PepA/ArcA (Colloms, 2013). Ces

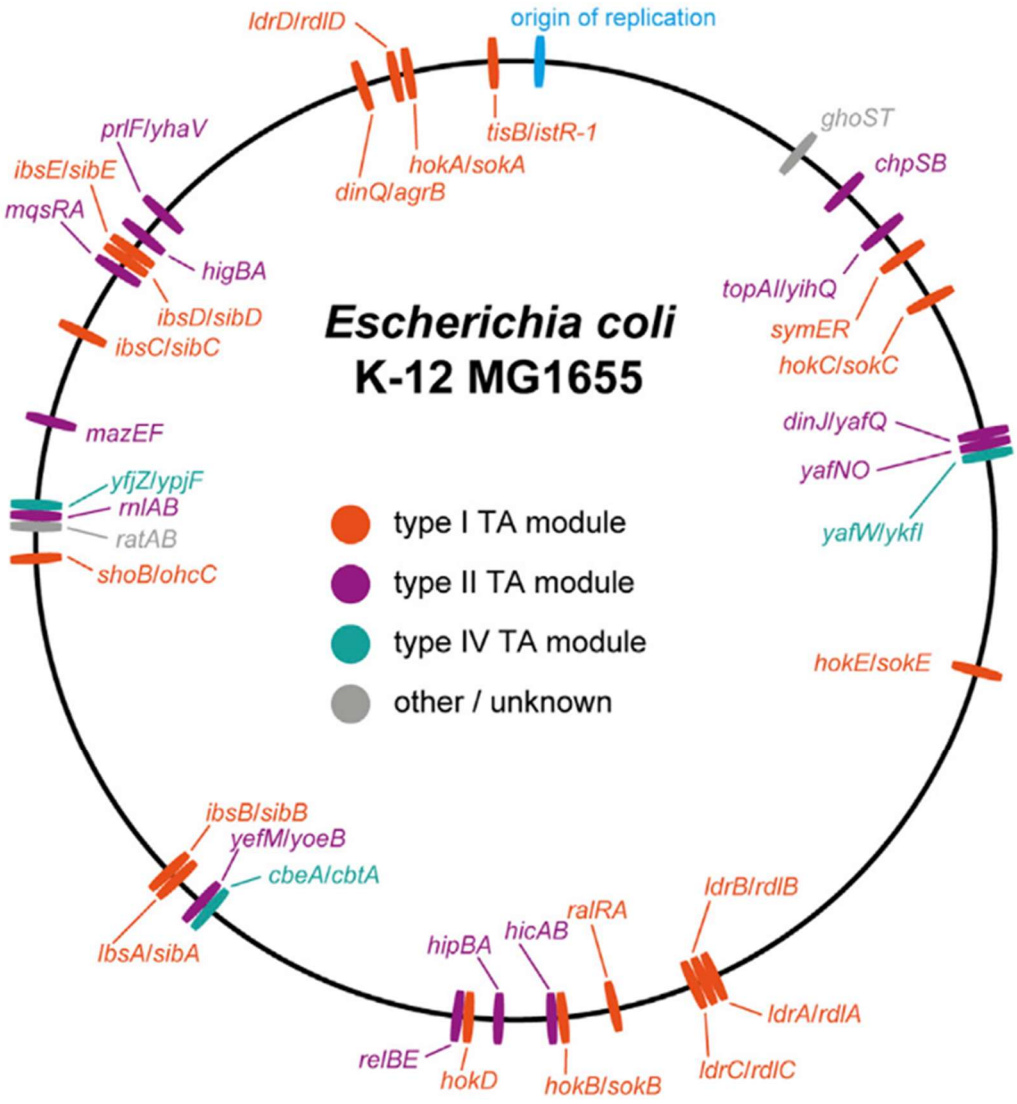


Figure 24 : Systèmes TA présents sur le chromosome de *E. coli* MG1655.
Les systèmes TA chromosomiques connus de E. coli MG1655 sont représentés : 19 de type I (orange), 13 de type II (violet), 3 de type IV (bleu) et 2 d'autre type ou inconnus (gris).
Issus de (Harms et al., 2018).

protéines accessoires fixées sur leurs sites proches du site de résolution de multimères ont le rôle de filtre topologique permettant à la réaction de recombinaison de résoudre des multimères en monomères et non l'inverse (Colloms, 2013). La recombinase *resD* de résolution de multimères des plasmides F est co-transcrite avec les gènes du système toxine antitoxine *ccdB* et *ccdA* (Crozat et al., 2014). Le site de résolution des mutlimères *rfs* est localisé en amont de *ccdB* chevauchant l'origine de réplication *oriV1* au niveau de la région de réplication RepFIA (Crozat et al., 2014). Le plasmide Rk2 (IncP-1α) encode une recombinase à sérine ParA résolvant ses multimères au niveau du site de recombinaison *res* (Sobecky et al., 1996). La recombinase à tyrosine Cre catalyse la réaction de recombinaison au niveau du site *loxP* résolvant les multimères du phage P1 circulaire (Abremski et al., 1983).

d. Systèmes Toxine Antitoxine

Les systèmes toxine antitoxine (systèmes TA) sont retrouvés abondamment sur les chromosomes bactériens (Coray et al., 2017; Fozo et al., 2010; Goeders et al., 2016; Leplae et al., 2011; Pandey and Gerdes, 2005). A titre d'exemple, les 37 systèmes TA chromosomique d'*E. coli* MG1655 sont représentés en figure 24. Le nombre et la composition en systèmes TA chromosomiques varient considérablement entre les organismes et même entre organismes proches phylogénétiquement (Harms et al., 2018). L'absence de lien avec la phylogénie des espèces et la présence de système TA sur les EGM ont amené les chercheurs à supposer une transmission horizontale de ces systèmes entre les génomes bactériens (Leplae et al., 2011; Pandey and Gerdes, 2005). Les systèmes TA sont classiquement composés d'une toxine protéique stable et d'une antitoxine labile pouvant être une protéine ou un ARN (Hayes, 2003). Les toxines vont interférer avec certaines fonctions nécessaires au cycle cellulaire bactérien inhibant la croissance et les antitoxines vont contrecarrer les effets des toxines (Harms et al., 2018; Page and Peti, 2016; Unterholzner et al., 2013). Actuellement, six types de systèmes TA (I à VI) ont été identifiés dont les interactions toxine-antitoxine sont illustrées en figure 25 et succinctement décrites ci-après.

• Le premier système TA de type I découvert est le système *hok-sok* (Gerdes et al., 1986). L'ARN de l'antitoxine *sok* est un petit ARN non codant antisens s'appariant à l'extrémité 3' de l'ARNm de la toxine *hok* inhibant sa traduction (Thisted et al., 1994). En condition normale de croissance, ce duplex d'ARN est rapidement dégradé par la RNase III (Gerdes et al., 1992). En condition de stress, la quantité d'ARN de *sok* diminue par rapport à celle de l'ARNm de *hok* permettant la traduction de la toxine pouvant aboutir à une mort cellulaire par perturbation de la membrane (Brantl and Jahn, 2015).

• Les systèmes TA de type II sont les plus représentés et caractérisés avec des milliers de *loci* identifiés dans la plupart des bactéries extra-cellulaires (Pandey and Gerdes, 2005). La toxine et l'antitoxine des systèmes TA de type II font partie d'un opéron dont la transcription est inhibée par l'antitoxine avec

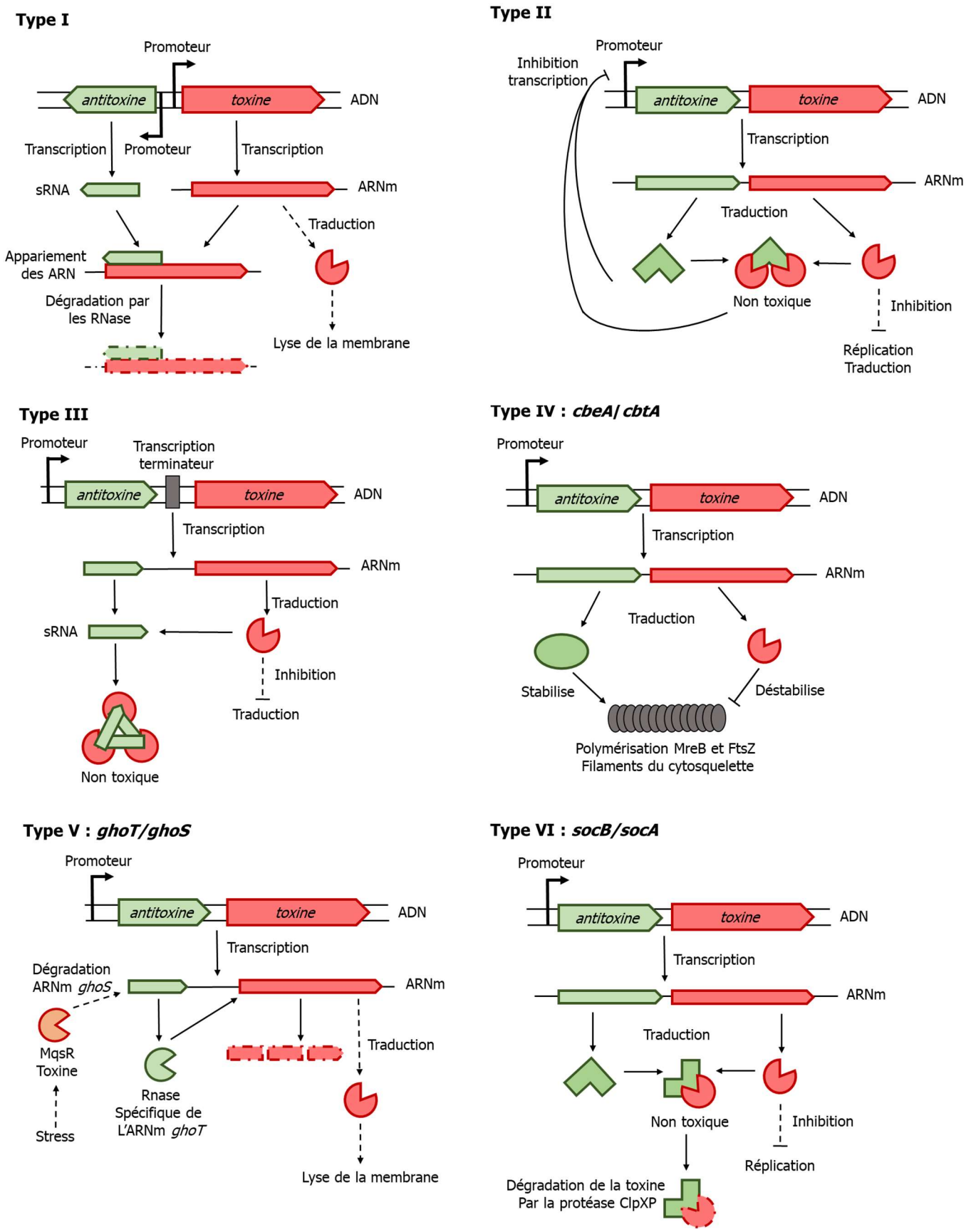


Figure 25 : Systèmes Toxine Antitoxine de type I, II, III, IV, V et VI.
Les traits pleins représentent la cascade biologie en condition non toxique et les traits en pointillés représentent les cascades biologiques en condition d'activité de la toxine.

le plus souvent la toxine assurant une fonction de corépresseur (Afif et al., 2001; Gotfredsen and Gerdes, 1998; Leplae et al., 2011; Magnuson et al., 1996; Ruiz-Echevarria. et al., 1991; Tam and Kline, 1989; Tsuchimoto and Ohtsubo, 1993). L'antitoxine est hautement sensible à la protéolyse et dégradée rapidement alors que la toxine est en comparaison stable (Page and Peti, 2016). En condition de stress, l'activation des protéases Lon et ClpXP entraine la dégradation de l'antitoxine libérant les toxines (Page and Peti, 2016). Les systèmes TA de type II sont divisés en 10 familles (*relBE*, *parDE*, *vapBC*, *mazEF*, *phd-doc*, *higAB*, *hipBA*, *omega-epsilon-zeta*, *ccd*, *vapXD*) selon l'homologie des toxines (Leplae et al., 2011; Pandey and Gerdes, 2005).

• Le premier système TA de type III *(toxIN*) identifié est composé d'une antitoxine sous forme d'un petit ARN et d'une toxine endoribonucléase (Fineran et al., 2009). La formation d'un complexe ARN-protéine composé d'un trimère d'ARN *toxI* et d'un trimère de ToxN inhibe l'activité de la toxine (Brantl and Jahn, 2015; Page and Peti, 2016).

• Le système TA de type IV, *yeeV-yeeU,* a été identifié en 2003 (Brown and Shaw, 2003) puis classé comme un nouveau type de système TA et renommé *cbtA-cbeA* en 2012 (Masuda et al., 2012). Dès sa découverte, les auteurs ont relevé l'absence d'interactions observables *in vivo* entre la toxine et de l'antitoxine (Brown and Shaw, 2003). En effet, la toxine CbtA agit sur la division cellulaire en inhibant la polymérisation des protéines cytosquelettiques FtsZ et MreB (Heller et al., 2017; Tan et al., 2011). MreB contrôle la morphologie et l'élongation des cellules (Shi et al., 2018). FtsZ détermine la localisation du septum de division via sa polymérisation formant le Z-ring, recrute et régule environ une douzaine de protéines impliquées dans la division cellulaire (pour revue (Barrows and Goley, 2021)). L'antitoxine CbeA est un antagoniste de la toxine CbtA, interagissant directement avec FtsZ et MreB en favorisant leur polymérisation (Masuda et al., 2012).

• A ce jour, un seul système TA de type V a été caractérisé : *ghoT-ghoS* (Wang et al., 2012a). L'antitoxine GhoS est une RNase clivant spécifiquement l'ARNm de la toxine *ghoT* (Wang et al., 2012b). La particularité de ce système TA est l'intervention de la toxine MqsR (système TA de type II) dégradant les ARNm de *ghoS* en condition de stress, permettant la traduction de la toxine GhoT (Wang et al., 2013).

• Le seul système TA de type VI caractérisé est le système *socB-socA* (Aakre et al., 2013). La toxine SocB interagit avec la sous-unité β (β-clamp) de l'ADN polymérase entrainant le désassemblement de la fourche de réplication et donc l'arrêt de la réplication (Aakre et al., 2013). L'antitoxine SocA est un adaptateur protéolytique délivrant SocB à la protéase ClpXP entrainant sa dégradation (Aakre et al., 2013).

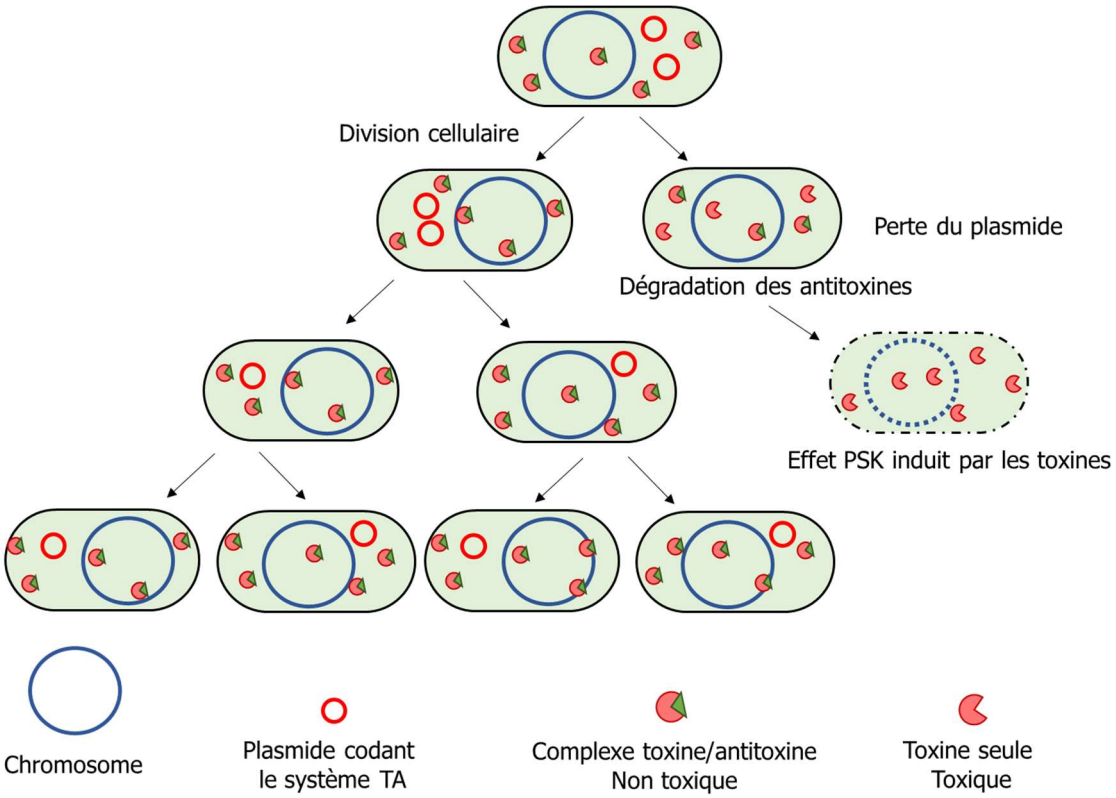


Figure 26 : Représentation de l'effet PSK des systèmes toxine antitoxine.

Trois fonctions majeures ont été décrites pour les systèmes TA : rôle dans les infections avortées (Abi : abortive infection) de phage (Dy et al., 2014a), rôle dans la formation de cellules persistantes (Harms et al., 2016) et effet de mort post-ségrégationnelle (PSK : post-segregationnal killing). Les infections avortées de phages sont un mécanisme de défense permettant de bloquer la propagation d'un phage au sein d'une population bactérienne. Les cellules infectées par un phage vont adopter une stratégie de suicide cellulaire prévenant la réplication du phage et préservant le reste de la population bactérienne. Ce suicide cellulaire peut être déclenché par divers mécanismes en réponse à l'infection phagique dont certains systèmes TA chromosomiques (Dy et al., 2014a). Les bactéries persistantes sont des cellules en dormance ayant une croissance et un métabolisme extrêmement réduits et sont générées stochastiquement dans les populations bactériennes (pour revue (Lewis, 2010)). La persistance favorise la survie des populations bactériennes à des stress environnementaux et permet notamment une tolérance aux antibiotiques sans acquisition de gènes de résistance (Balaban, 2011; Dörr et al., 2010; Lewis, 2010). Les systèmes TA (et particulièrement les systèmes de type II) sont impliqués dans le phénomène de dormance et la formation de bactéries persistantes (Keren et al., 2004; Lewis, 2010; Page and Peti, 2016; Shah et al., 2006). A titre d'exemple, des expériences de microarray chez *E. coli* ont montré la surexpression de multiples toxines de systèmes TA de type II (particulièrement les RNases) dans les cellules persistantes (Keren et al., 2004; Shah et al., 2006). Une étude récente a également mis en évidence l'activation de 14 systèmes TA de type II d'une souche de *Salmonella enterica* sérotype Typhimurium internalisée dans les macrophages et leur rôle dans la formation de cellules persistantes (Helaine et al., 2014). L'effet PSK concerne plutôt les systèmes TA portés par des EGM permettant de les maintenir dans une population bactérienne (figure 26). Ces systèmes TA n'impactent pas directement les mécanismes moléculaires assurant la stabilité d'un EGM au cours des générations : si l'EGM est instable, il sera perdu par une partie des cellules. Cependant, ces systèmes TA entrainent la mort des cellules ayant perdu l'EGM via l'effet PSK (Gerdes et al., 1986). Cet effet PSK résulte en la formation d'une population bactérienne composée uniquement de cellules ayant conservées l'EGM et donne l'illusion de la stabilité de cet EGM. Des systèmes TA de différents types ont été retrouvés et caractérisés sur les EGM : *hok/sok* (type I) sur le plasmide R1 (Gerdes et al., 1986), *ccdAB* (type II) plasmide F (Ogura and Hiraga, 1983), *toxIN* (type III) sur le plasmide pECA1039 (Fineran et al., 2009), *abiEi/ii* (type IV) sur ICE*Sa2603rplL* et le plasmide pNP40 (Dy et al., 2014b). Les systèmes TA de type II et III sont fréquemment retrouvés sur les EGM (Blower et al., 2012; Goeders et al., 2016; Leplae et al., 2011).

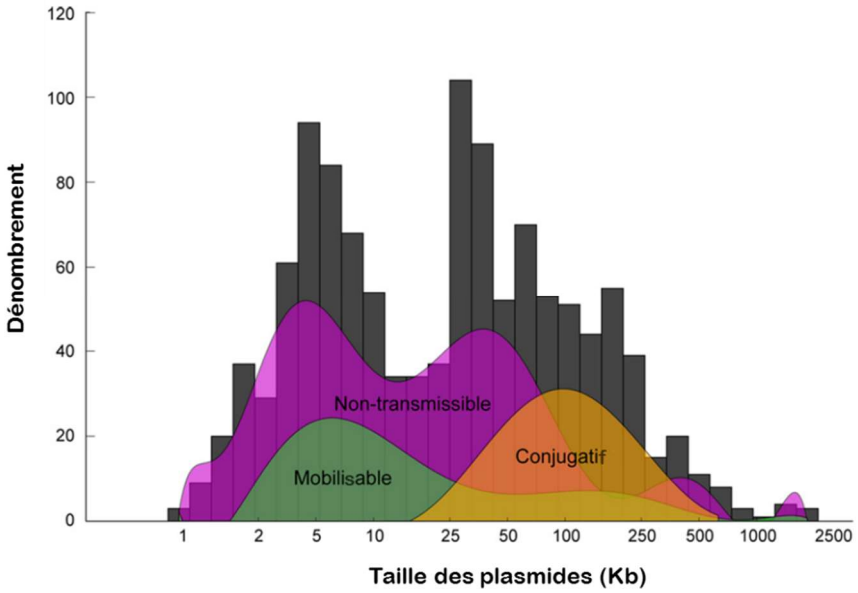


Figure 27 : Distribution des plasmides conjugatifs, mobilisables et non-transmissibles en fonction de la taille des plasmides.
Distribution des plasmides selon la présence ou l'absence d'éléments impliqués dans la conjugaison. Les plasmides conjugatifs (en jaune) présentent les éléments suivants : ils encodent une relaxase, une protéine de couplage au système de sécrétion de type IV (T4SS), un système de sécrétion de type IV et ont une origine de transfert (*oriT*). Les plasmides mobilisables (vert) ont une *oriT*, encodent une relaxase et peuvent ou non encoder une protéine de couplage au T4SS. Les plasmides non-transmissibles (violet) ne présentent pas les caractéristiques décrites précédemment.
Issus de (Smillie et al., 2010)

e. Les systèmes de restriction-modification

Les systèmes de restriction-modification (RM) sont des systèmes d'immunité ciblant de l'ADN identifié comme étranger et divisés en 4 types (I, II, III et IV) selon leurs propriétés mécanistiques (Dimitriu et al., 2020; Roberts et al., 2010). Les endonucléases des systèmes RM de type I, II et III reconnaissent et causent des cassures double brin au niveau de séquences spécifiques sur de l'ADN étranger alors que ces mêmes séquences méthylées sur le génome de l'hôte sont protégées des cassures (Dimitriu et al., 2020). Au contraire, les systèmes RM de types IV ciblent de l'ADN étranger modifié, par exemple, la méthylation de sites ADN de certains phages (Loenen and Raleigh, 2014). Comme pour les systèmes TA, plusieurs exemples de systèmes RM de type II portés par des plasmides participent à la stabilisation de ces EGM par effet PSK (Ichige and Kobayashi, 2005; Kulakauskas et al., 1995; Mruk and Kobayashi, 2014; Ohno et al., 2008).

3. Transfert

a. Généralités et principes

Les plasmides capables de se transférer de manière autonome sont dits conjugatifs et ceux pouvant être transférés en *trans* (par le système de conjugaison d'un autre EGM) sont dits mobilisables. Smillie *et al.* ont réalisé une étude comparative par analyse bio-informatique des séquences plasmidiques disponibles sur GenBank pour identifier les plasmides conjugatifs, mobilisables et non transmissibles présentés en figure 27 (Smillie et al., 2010). Selon leur analyse, parmi les plasmides retrouvés chez les procaryotes, 15% sont conjugatifs, 24% sont mobilisables et 49% sont non transmissibles (Smillie et al., 2010). Chez les protéobactéries, pour lesquelles leur analyse est plus précise, les plasmides sont pour 28% conjugatifs, 23% mobilisables et 49% non-transmissibles (Smillie et al., 2010). Plus récemment, l'étude portant sur la classification des plasmides en PTU a regardé le degré de diffusion des plasmides conjugatifs et mobilisables au sein de la classification bactérienne (Redondo-Salvo et al., 2020). Parmi les plasmides retrouvés chez les *Enterobacterales*, la diffusion des plasmides non mobilisables se limite au niveau de l'espèce ou du genre bactérien (84% des plasmides) alors que les plasmides conjugatifs ou mobilisables vont présenter une limite de diffusion au sein de la famille (60% des plasmides), de l'ordre (9% des plasmides), de la classe (4% des plasmides) ou du phylum (2% des plasmides) (Redondo-Salvo et al., 2020).

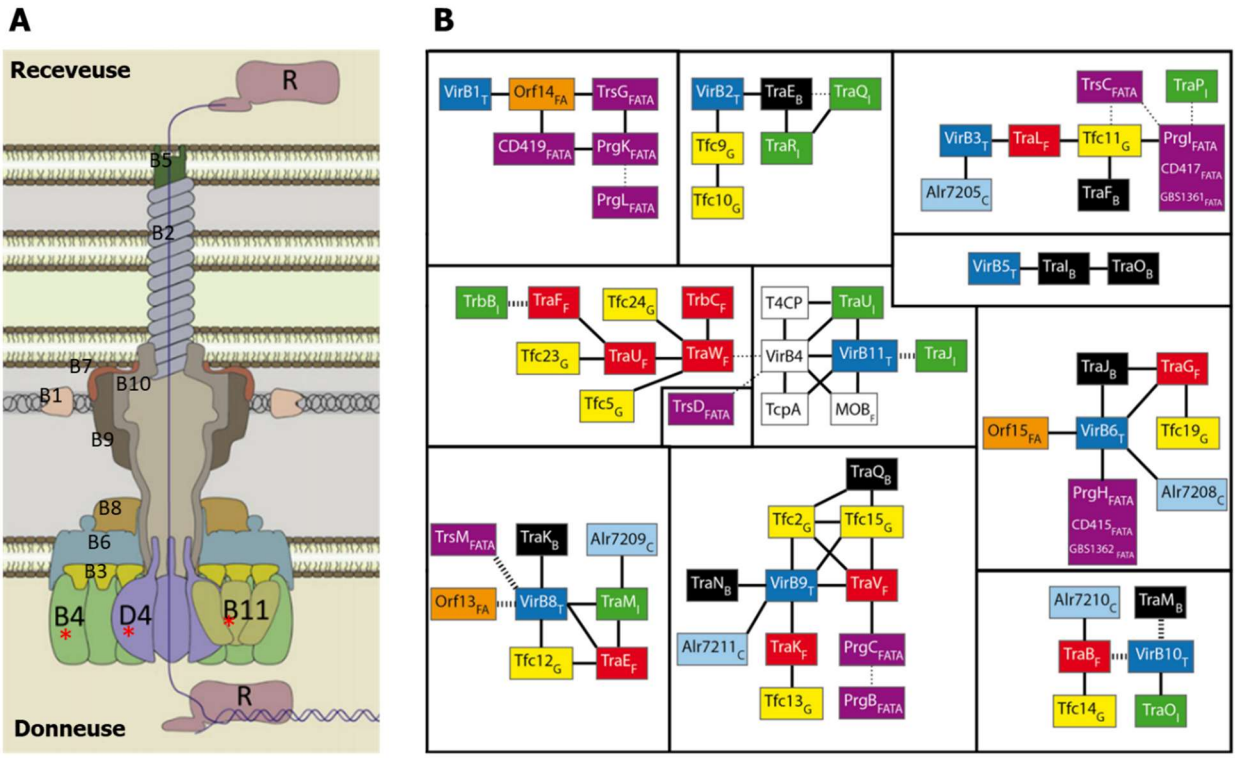


Figure 28 : Systèmes de sécrétion de type IV impliqués la conjugaison.
A) Représentation schématique du T4SS (MPF_T) du plasmide Ti, adaptée de (Ilangovan et al., 2015). Les protéines VirB3, 6, 7, 8, 9 et 10 constituent le canal de translocation. Les protéines VirB4, VirB11 et VirD4 (protéine de couplage) sont les ATPase apportant l'énergie du système. VirB2 et VirB5 sont les protéines composant le pilus et VirB1 serait impliqué dans la synthèse du pilus. La relaxase est en rose sur le schéma et indiquée par la lettre R. **B)** Relation d'homologie entre les protéines des différents MPF (mating-pair formation), issue de (Guglielmini et al., 2014). Les lettres en indice I, C, G, T, F, B, FA et FATA correspondent aux différentes classes de MPF basées sur la phylogénie des protéines homologues à VirB4 (Guglielmini et al., 2013). Les MPF_T correspondent aux systèmes homologues du plasmide Ti, les MPF_F à ceux homologues au plasmide F, MPF_I à ceux homologues au plasmide R64 (IncI), MPF_G à ceux homologues à l'ICEHin1056 et uniquement retrouvés chez des ICE, MPF_C est uniquement présent chez les cyanobactéries, MPF_B est uniquement présent chez les Bactéroidetes, MPF_{FA} est uniquement retrouvé chez les Firmicutes et Actinobacteria et MPF_{FATA} est spécifique des Tenericutes et Archées (Guglielmini et al., 2014). Les lignes pleines correspondent aux liens directs entre les protéines. Les lignes hachurées correspondent à des similarités de séquences ou de structures entre les protéines. Les lignes en pointillées correspondent à des homologies de séquences lointaines.

b. Les systèmes de conjugaison

Le mécanisme de conjugaison le plus fréquent correspond au passage d'ADNsb (appelé le T-strand) d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse via la formation d'un complexe nucléo-protéique appelé le relaxosome, d'une protéine de couplage (CP) et d'un système de sécrétion de type IV (T4SS) (Guglielmini et al., 2014). La structure du T4SS du plasmide Ti présentée en figure 28A est l'une des premieres caractérisées. En fonction de leurs homologies, les T4SS sont classés en différents types de MPF (pour mating-pair formation). N'existant pas de nomenclature standardisée, les protéines des MPFs ne portant pas les mêmes noms peuvent être homologues d'un système à l'autre et *vice versa* (illustré en figure 28B). La première étape de la conjugaison est la formation du relaxosome par la reconnaissance de l'origine de transfert (*oriT*) par la relaxase (MOB) aidée d'autres protéines ou facteurs accessoires (De La Cruz et al., 2010). La reconnaissance et la coupure catalysée par la relaxase au site *nic* sont hautement séquence spécifique et plasmide spécifique (Harley and Schildbach, 2003). Les relaxases sont généralement composées d'un domaine N-terminal relaxase ou transesterase et d'un domaine C-terminal hélicase/primase (Ilangovan et al., 2015). Le domaine N-terminal est impliqué dans la reconnaissance et la fixation à l'*oriT*, la coupure de l'ADNsb au site *nic* et dans la fixation covalente à l'extrémité 5' du T-strand pour le transfert conjugatif (Draper et al., 2005; Ilangovan et al., 2015; Pansegrau et al., 1990). Dans le cas du plasmide R388, la protéine accessoire TrwA augmente l'activité de la relaxase TrwC et régule négativement l'expression de son propre promoteur (Moncalián et al., 1997). En plus de la protéine TraM homologue à TrwA, la formation du relaxosome des plasmides F/R1 nécessite la protéine accessoire TraY (Ilangovan et al., 2015; Luo et al., 1994). Les protéines accessoires du plasmide F sont aussi des régulateurs transcriptionnels : TraY régule positivement l'opéron *tra* (Silverman and Sholl, 1996) et TraM négativement ses propres promoteurs (Penfold et al., 1996). En plus des protéines accessoires encodées par les plasmides, des facteurs chromosomiques IHF (integration host factor), sont impliqués dans la conformation de la région *oriT* des plasmides F (De La Cruz et al., 2010). Le relaxosome est adressé via la protéine de couplage (VirD4 pour Ti, TrwB pour R388, TraD pour F) au T4SS pour la translocation du T-strand dans la cellule receveuse (Ilangovan et al., 2015). Les protéines de couplage appartiennent à la grande famille des translocases à ADN FtsK/SpoIIIE (Frost et al., 2005). Les T4SS présentent deux modes de fonctionnement : synthèse du pilus ou transfert (Ilangovan et al., 2015). Les pili sont des structures tubulaires extracellulaires associées aux T4SS, pouvant être longues (2 à 20µm) et flexibles (IncF, IncH, IncT et les ICE de la famille SXT/R391 anciennement nommés IncJ) ou courtes (0,2 à 1 µm) et rigides (IncP, IncN, IncW et IncI) (Lawley et al., 2003). Les pili sont composés des protéines VirB2 et VirB5 pour le plasmide Ti, TrbC pour le plasmide RP4 (IncP) et TraA pour les plasmides F. Les pili

des plasmides F semblent être les seuls capables d'extension et de rétractation (Costa et al., 2021). Ces pili se déploient dans le milieu extra-cellulaire jusqu'à entrer en contact avec une potentielle bactérie receveuse entrainant la rétractation du pilus permettant le contact direct entre les cellules (Arutyunov and Frost, 2013). Par la suite, VirB11 interagit avec VirD4 induisant le transfert conjugatif (Ilangovan et al., 2015). La translocation de l'ADNsb lié à la relaxase se fait via la reconnaissance de signaux de translocation (TS : translocation signal) sur la relaxase (Alperi et al., 2013; Ilangovan et al., 2017; Redzej et al., 2013). Dans le cas du plasmide F, en plus des TS de la relaxase, l'interaction entre la protéine accessoire TraM du relaxosome et la protéine de couplage TraD est essentielle au transfert du plasmide (Lu et al., 2008). D'autres signaux, probablement liés aux contacts entre les cellules et transmis via les pili ou T4SS, sont impliqués dans le passage de la relaxase en mode translocation (De La Cruz et al., 2010). Les différentes étapes du transfert du T-strand sont similaires à la réplication en cercle roulant, la relaxase coupant et reliant l'ADN par les mêmes mécanismes que les protéines Rep (Dostál et al., 2011). Dans le cas du plasmide F, la relaxase TraI liée au T-strand traverse le port de conjugaison pendant qu'une autre TraI est recrutée pour dérouler l'ADN plasmidique via son activité hélicase (Dostál et al., 2011). Le brin complémentaire de l'ADN plasmidique simple brin resté dans la cellule donneuse peut être selon les modèles synthétisé via l'ADN polymérase III ou laissé en simple brin (Dostál et al., 2011). Dans la cellule receveuse TraI, attaché à l'extrémité 5' du T-strand se transloque à l'extrémité 3' et la synthèse du brin complémentaire est initiée par l'ADN polymérase III (Dostál et al., 2011). Pour la re-circularisation du plasmide dans la cellule receveuse, TraI pourrait agir de manière similaire aux protéines Rep (Dostál et al., 2011) mais cela n'a pas été démontré.

4. Incompatibilité entre réplicons

L'incompatibilité entre réplicons est définie par leur incapacité à coexister de manière stable dans une population bactérienne en croissance. Au cours des générations bactériennes, l'incompatibilité entrainera la formation d'une population hétérogène de cellules ayant l'un ou l'autre ou les deux réplicons. Le partage entre deux réplicons d'un même mécanisme essentiel à leur stabilité, réplication ou partition, entraine à terme la perte d'un des deux éléments. Un autre type d'incompatibilité peut s'exercer avant la cohabitation des réplicons : l'exclusion de surface et d'entrée. Les phénomènes d'exclusion de surface ou d'exclusion d'entrée sont dus à l'expression de facteurs par un réplicon résidant empêchant l'entrée dans les cellules d'un autre réplicon par conjugaison.

Incompatibilité médiée par la réplication

Des phénomènes d'incompatibilité ont pu être observés entre plasmides partageant une origine de réplication identique, tels que les IncHI1 et IncF partageant l'origine de réplication repFIA

(Gabant et al., 1993). La grande majorité des études mécanistiques portant sur l'incompatibilité médiée par les systèmes de réplication est antérieure aux années 2000. Dans le cas des plasmides à réplication Thêta de classe A ou par déplacement de brin, l'augmentation du nombre d'*itérons* dans la cellule par un autre plasmide va entrainer une titration des protéines Rep et par conséquent limiter la réplication de ces plasmides (Novick, 1987). Pour les plasmides possédant une réplication Thêta de classe B ne possédant pas d'*itérons* (ColE1 et dérivés), le partage de l'ARNi (RNAI) est le facteur majeur responsable des phénomènes d'incompatibilité observés (Polisky, 1988). Dans le cas des plasmides ayant une réplication en cercle roulant, l'incompatibilité serait plutôt dépendante des facteurs impliqués au niveau de la régulation de la synthèse de la protéine Rep. La déstabilisation du plasmide pLS1 a été caractérisée : l'expression de l'ARNi inhibant la traduction de la protéine Rep par un autre plasmide est la cause majeure d'incompatibilité (del Solar and Espinosa, 1992). De plus, la combinaison de l'ARNi et de CopG (represseur de rep_{pLS1}) entraine une réduction du nombre de copies de pLS1 plus importante que les inhibiteurs seuls (Del Solar et al., 1995). Enfin, pour les plasmides à réplication *repABC*, le facteur majeur d'incompatibilité est le partage de l'ARNi inhibant la transcription/traduction de la protéine initiatrice de réplication RepC (Rivera-Urbalejo et al., 2015).

Incompatibilité médiée par la partition

Pour les systèmes de partition de type I, l'incompatibilité peut être médiée par le partage de protéines ParB ou de centromères similaires. L'incompatibilité médiée par ParB dépend du niveau d'expression de la protéine pouvant être lié au nombre de copies des plasmides mais également de plusieurs autres mécanismes pouvant agir simultanément (Bouet and Funnell, 2019). La surexpression de ParB du plasmide P1 par un vecteur à haut nombre de copies déstabilise les plasmides similaires à P1 partageant une même séquence centromérique *parS* (Funnell, 1988). La forte surexpression de ParB entraine des pertes plus sévères que celles attendues par diffusion passive de ces plasmides sans système de partition (Funnell, 1988). Plusieurs mécanismes expliquant ces déstabilisations ont été proposés. Les sites *parS* plasmidiques pourraient être séquestrés ensemble par la surexpression des protéines ParB, diminuant ainsi le nombre de plasmides libres pouvant se ségréger par diffusion passive (Bouet and Funnell, 2019). Pour les plasmides partageant un site *parS* identique, il pourrait y avoir la formation d'appariement mixte entre ces plasmides résultant en une partition aléatoire dans la cellule (Bouet et al., 2007). Cependant ces mésappariements n'ont pas pu être observés par microscopie (Ebersbach et al., 2005). Les deux plasmides utilisés portant un même site *parS* étaient séparés de manière relativement uniforme les uns par rapport aux autres le long de la cellule mais distribués aléatoirement (Bouet and Funnell, 2019; Ebersbach et al., 2005). Le partage de sites *parC* plus ou moins distants des systèmes de partition de type II entraine également une instabilité des plasmides à haut et moyen

nombre de copies pouvant être expliquée par une titration des protéines ParR et/ou des mésappariements entre les plasmides (Dam and Gerdes, 1994; Hyland et al., 2014). ParR pourrait présenter une spécificité moindre que ParB dans la reconnaissance du centromère ou pourrait impliquer d'autres facteurs (Hyland et al., 2014).

Incompatibilité médiée par l'exclusion de surface et d'entrée

L'exclusion de surface (Sfx : surface exclusion) prévient les contacts entre cellules possédant un même EGM et l'exclusion d'entrée (Eex : entry exclusion) empêche le transport du complexe T-strand/relaxase entre la cellule donneuse et la cellule receveuse (Arutyunov and Frost, 2013). Si tous les plasmides conjugatifs encodent au moins une protéine Eex (Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2008), les protéines Sfx semblent exclusives au système de conjugaison MPF_F (Arutyunov and Frost, 2013). Les plasmides F et dérivés portent les gènes *traS* et *traT* encodant respectivement des protéines Eex et Sfx (Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2008). Plusieurs mécanismes d'exclusion de surface médiés par TraT ont été proposés mais non démontrés : via une interaction avec l'extrémité du pilus l'empêchant d'interagir avec son potentiel récepteur à la surface des cellules réceptrices, via une dissimulation du récepteur du pilus ou via une interaction avec TraN (Achtman et al., 1977; Klimke and Frost, 1998; Minkley and Willetts, 1984). L'exclusion d'entrée est médiée par une interaction entre la protéine TraS et la protéine TraG stabilisant le MPF de la cellule donneuse (Audette et al., 2007). Il a été proposé que TraS pourrait empêcher la translocation de TraG dans l'espace périplasmique bloquant l'initiation du transfert (Audette et al., 2007). Différentes protéines Eex ont été identifiées : TrbK pour les plasmides IncP (Haase et al., 1996), Eex pour les plasmides IncN et IncW (Bolland et al., 1990; Winans and Walker, 1985), ExcA pour les plasmides IncI (Hartskeerl and Hoekstra, 1985), EexA et EexB pour les plasmides IncH (Gunton et al., 2008), EexC pour les plasmides IncA et IncC (Humbert et al., 2019) et EexS ou EexR pour les ICE de la famille SXT/R391 (Marrero and Waldor, 2007).

III. Les EGMs d'intérêt : SGI1 et les plasmides IncA & IncC

A. Les plasmides IncC & IncA

Au début des années 70, les premiers plasmides IncC découverts (R40a et R57b) étaient compatibles avec des plasmides de tous les autres groupes d'incompatibilité connus et ont été classés dans un nouveau groupe d'incompatibilité : IncC (Datta and Hedges, 1972). A la même période le plasmide RA1 a été découvert et démontré comme étant compatible avec des plasmides de tous les autres groupes d'incompatibilité (dont les IncC) et a été classé dans un nouveau groupe : IncA

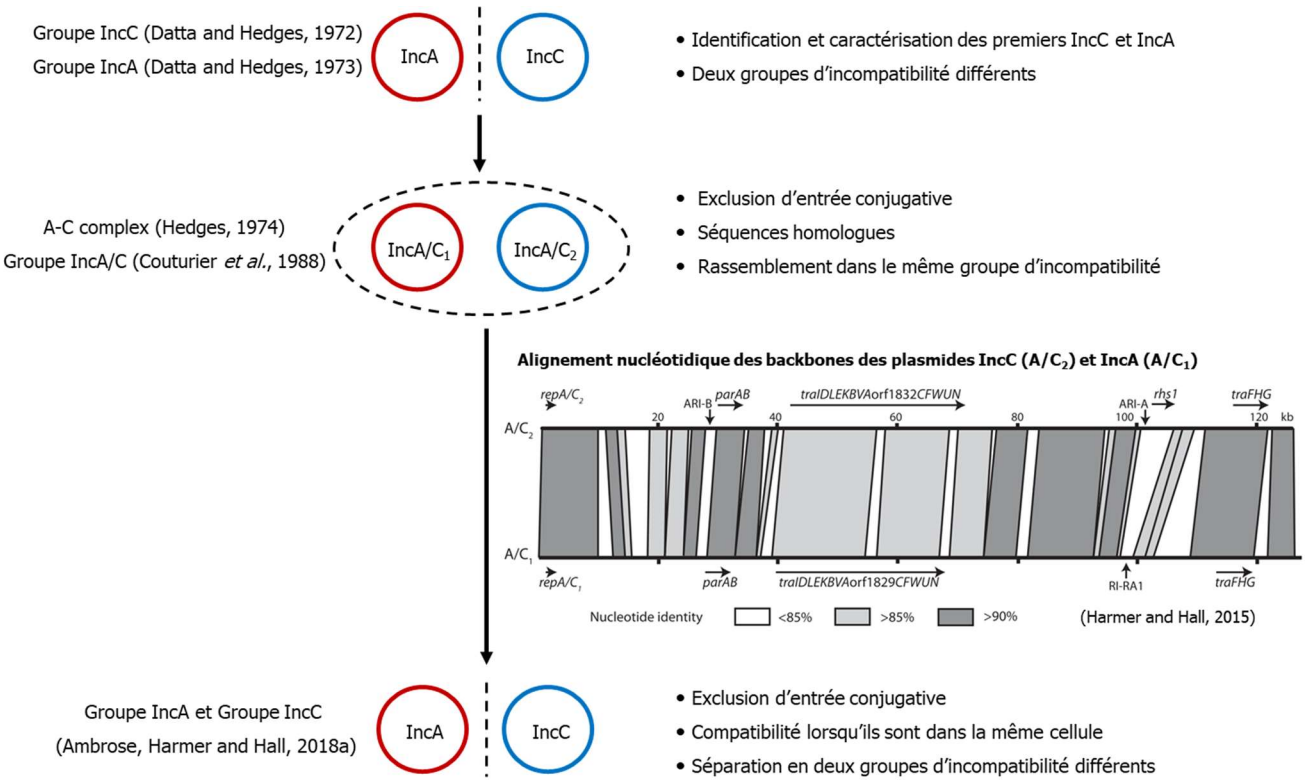
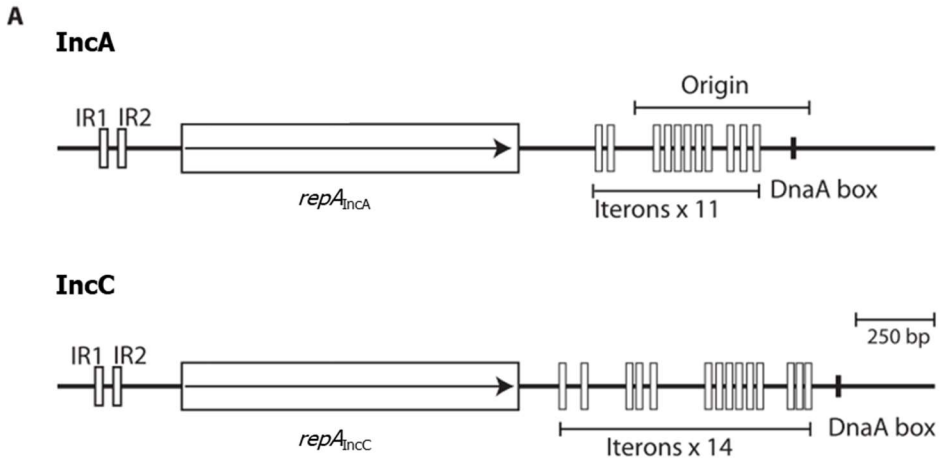


Figure 29 : Historique de la classification des plasmides IncC et IncA.
Les changements de nomenclature et de classification des plasmides IncC et IncA sont représentés succinctement et chronologiquement. L'alignement de séquences est issu de (Harmer and Hall, 2015).

(Datta and Hedges, 1973). Peu de temps après ces premières études sur les plasmides IncC et IncA, l'observation du phénomène d'exclusion d'entrée ainsi qu'une haute homologie de séquences entre ces plasmides a entrainé leur regroupement dans un même groupe sous le terme de « A-C complex » (Hedges, 1974). Par la suite, le groupe a été renommé devenant le groupe d'incompatibilité IncA/C (Couturier et al., 1988) et divisé en 2 sous-groupes : IncA/C_1 (pour les IncA) et IncA/C_2 (pour les IncC). La nomenclature IncA/C a perduré jusqu'en 2018 date à laquelle Ambrose et al. ont proposé de dissocier de nouveau ces plasmides en groupe IncC et IncA (Ambrose et al., 2018a). Sans contester les phénomènes d'exclusion d'entrée entre ces plasmides, ils ont montré que les plasmides IncA et IncC une fois présents dans la même cellule cohabitent de manière stable et devraient être classés dans des groupes d'incompatibilité distincts (Ambrose et al., 2018a). L'historique de la classification des plasmides IncC et IncA est résumé dans la figure 29. Le phénomène d'exclusion entrée des plasmides IncA et IncC est médié par une interaction entre la protéine TraG dans la donneuse et la protéine EexC dans la receveuse (Humbert et al., 2019).

Les plasmides IncC ont été retrouvés dans un large spectre de bactéries Gram négatif et sont largement impliqués dans la diffusion de gènes de résistance aux antibiotiques d'importance clinique (β-lactamases à spectre étendu et de carbapénémases) (Ambrose et al., 2018b; Carattoli, 2013; Carattoli et al., 2012). En plus de circuler dans plusieurs espèces d'*Enterobacteriaceae*, les plasmides IncC sont également présents dans la souche de *Vibrio cholerae* El Tor, agent responsable de la septième pandémie de cholera et d'autres *Vibrionaceae* (Rozwandowicz et al., 2018; Weill et al., 2017). Les plasmides IncA sont beaucoup moins prévalants que les plasmides IncC, mais ont été identifiés en 2019 dans un hôpital italien comme vecteur de diffusion d'un gène encodant une carbapénémase (*bla*$_{VIM-1}$) dans des souches de *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, et *Enterobacter cloacae* (Arcari et al., 2020). Les plasmides IncA et IncC sont des plasmides conjugatifs et l'expression des gènes du système de conjugaison des plasmides IncC a été caractérisée sous le contrôle en *cis* des activateurs transcriptionnels AcaDC (pour IncA/C activator subunits C and D) (Carraro et al., 2014). L'expression de l'opéron *acr1-vcr147-acaDC* est régulée négativement par les répresseurs transcriptionnels Acr1 et Acr2 (pour IncA/C repressors 1 et 2) (Carraro et al., 2014) et est régulée positivement par l'activateur transcriptionnel AcaB (Hancock et al., 2020). L'expression de l'activateur transcriptionnel AcaB est également régulée par AcaDC (Hancock et al., 2020). Les gènes *tra* impliqués dans le transfert conjugatif des plasmides IncA et IncC partagent pour la majorité une homologie en acides nucléiques supérieure à 85% d'identité, seule l'homologie des TraN diminue à 63% d'identité (Harmer and Hall, 2015). Les plasmides IncA et IncC encodent une relaxase (*traI*) appartenant au groupe MOB_{H12} (Garcillán-Barcia et al., 2009), une



B

IncA		IncC	
Iteron	Sequence	Iteron	Sequence
2	TATGTGGGAGCGTTGCACG	1	CATATGGGGGAGCTGCACG
3	TATGTGGGAAACCTGCACG	2	TATATGGGAACGTTGCACG
4	TATGTGGGTACGCTGCACG	3	GATGTGGGGGACCTGCACG
5	CATATGGGTACGCTGCACG	4	TATGTGGGTACGTTGCACG
6	TATGTGGGAACGTTGCACG	5	TATATGGGAACTCTGCACG
7	TATATGGGGCAACTGCACG	6	TATGTGGGAGCGCTGCACG
8	CATATGGGAATGCTGCACG	7	CATGTGGGTACGCTGCACG
9	TATGTGGGAACGCTGCACG	8	TATATGGGAACGTTGCACG
11	GATGTGGGAACGCTGCACG	9	TATATGGGCTGACTGCACG
12	CCTATGGGAACGCTGCACG	10	GATGTGGGAACACTGCACG
13	TATATGGGTTTGCTGCACG	11	TATGTGGGAACGCTGCACG
Consensus	**yaTRTGGG---gcTGCACG**	12	TATGTGGGGGCGTTGCACG
		13	CCTATGGGTTCGCTGCACG
		14	CCTATGGGTTCGTTGCACG
		Consensus	**yaTRTGGG--cgcTGCACG**

Figure 30 : Réplication des plasmides IncA et IncC.
A. Régions des origines de réplication des plasmides IncA et IncC. Le large rectangle indique le gène *repA* et la flèche la direction de transcription. Les répétitions inverses conservées et les *itérons* sont représentés par des petits rectangles blancs. La ligne noire verticale représente le site de fixation de DnaA conservé. **B.** Alignement des séquences des *itérons* des plasmides IncA et IncC. Sur fond noir sont représentées les bases variables entre les séquences des *itérons*.
Issue de (Harmer and Hall, 2015).

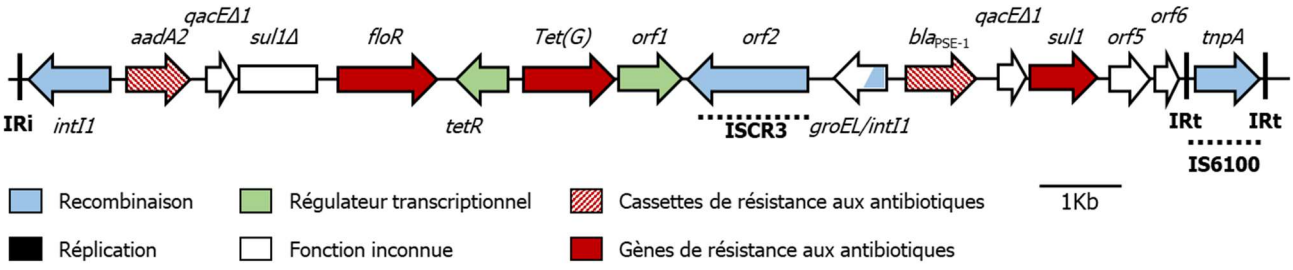


Figure 31 : Organisation génétique de l'intégron complexe de classe 1 du clone épidémique *Salmonella* Typhimurium DT104 ACSSuT.
L'intégron complexe de classe 1 In104 est encadré de séquences répétées inversées annotées IRi et IRt. Les gènes ou cassettes de gènes responsablent du profil de résistance sont *aadA2* (streptomycine), *floR* (chloramphénicol), *tet(G)* (tétracycline) *bla*$_{PSE-1}$ (ampicilline) et *sul1* (sulfamide). Les éléments génétiques mobiles ISCR3 et IS6100 sont également indiqués.

protéine de couplage (*traD*) et deux protéines stabilisatrices du MPF (*traNG*) (Harmer and Hall, 2015). Les gènes *traLEKBVACWUFHG* sont impliqués dans la formation d'un système de sécrétion de type IV appartenant au groupe MPF_F (Guglielmini et al., 2013). Les régions des origines de réplication des plasmides IncA et IncC sont assez proches (figure 30A), avec une protéine RepA partageant 98% d'identité en acides aminés et des *itérons* relativement proches (figure 30B), mais ne causant pas d'incompatibilité (Ambrose et al., 2018a; Hancock et al., 2017; Harmer and Hall, 2015). Les plasmides IncA et IncC encodent une protéine Ter avec un site de fixation au terminus de réplication conservé (Harmer and Hall, 2015). Les plasmides IncA et IncC encodent un système de partition de type I *parAB* homologue au système de partition des plasmides IncP (Hancock et al., 2017). En aval des gènes *parAB* est toujours retrouvé un gène, *053,* codant une protéine de 90 acides aminés contenant un domaine de fixation à l'ADN helix-turn-helix impliqué dans la stabilité des plasmides IncA et IncC (Hancock et al., 2017). Ces plasmides portent également un potentiel système de partition de type II homologue au système de partition fonctionnel *srpMRC* de l'ICE SXT (Carraro et al., 2015). Les plasmides IncA et IncC possèdent le gène *stbA* en amont de *repA* et encodant une protéine partageant 30,5% d'identité en aa avec la protéine ParM (système de partition de type II) du plasmide NR1 (IncFII) (Harmer and Hall, 2015).

B. *Salmonella* Genomic Island 1

1. Historique et découverte

Salmonella Genomic Island 1 est un élément intégratif mobilisable initialement identifié dans un clone épidémique multirésistant aux antibiotiques de *Salmonella* Typhimurium DT104 (Boyd et al., 2001). Ce clone a été responsable d'une épidémie de salmonelloses au Royaume Uni à la fin des années 1980 et se diffusa rapidement mondialement dans les années 1990 jusqu'à devenir un clone majoritaire dans les cas de salmonelloses humaines (Helms et al., 2005; Threlfall, 2000). Contrairement aux isolats antérieurs de *Salmonella* Typhimurium DT104, la caractéristique principale de ce clone épidémique est son profil de penta-résistance ACSSuT (ampicilline, chloramphénicol-florfénicol, streptomycine-spectinomycine, sulfamides et tétracycline) (Threlfall, 2000). Les premières études portant sur la localisation de ces résistances ont permis de révéler qu'elles se situent toutes sur un intégron complexe de classe 1 nommé In104 composé de 16 ORF et représenté en figure 31 (Arcangioli et al., 1999; Briggs and Fratamico, 1999; Sandvang et al., 1997). Au début des années 2000, Boyd *et al.* ont montré que cet intégron est intégré au sein d'un îlot génomique qu'ils ont dénommé *Salmonella* Genomic Island 1, abrégé SGI1 (Boyd et al., 2001, 2000) composé de 44 ORF (dont les 16 ORF de l'intégron)

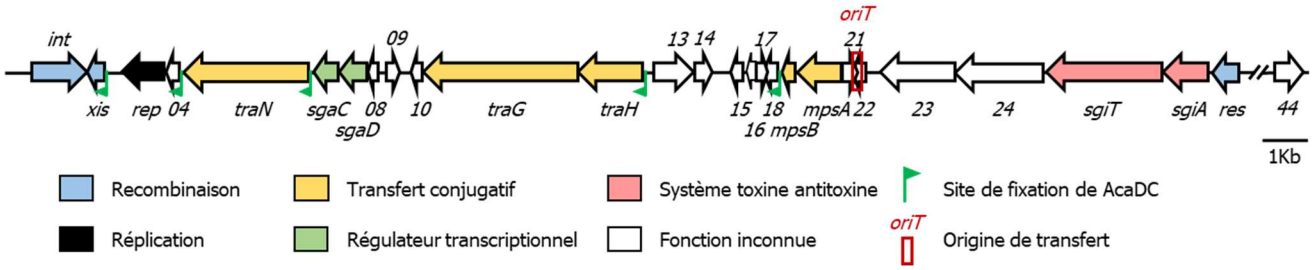


Figure 32 : Organisation génétique du backbone de SGI1.
Les positions et orientations des ORF sont indiquées par des flèches de différentes couleurs relatives aux fonctions associées. Les sites de fixation des activateurs de transcription AcaDC et SgaDC sont représentés par des drapeaux verts et l'origine de transfert est indiquée en rouge (*oriT*). L'intégron complexe de classe 1 (In104) n'est pas indiqué mais se situe au niveau de l'extrémité 3' de SGI1 entre les gènes *res* et *S044*.

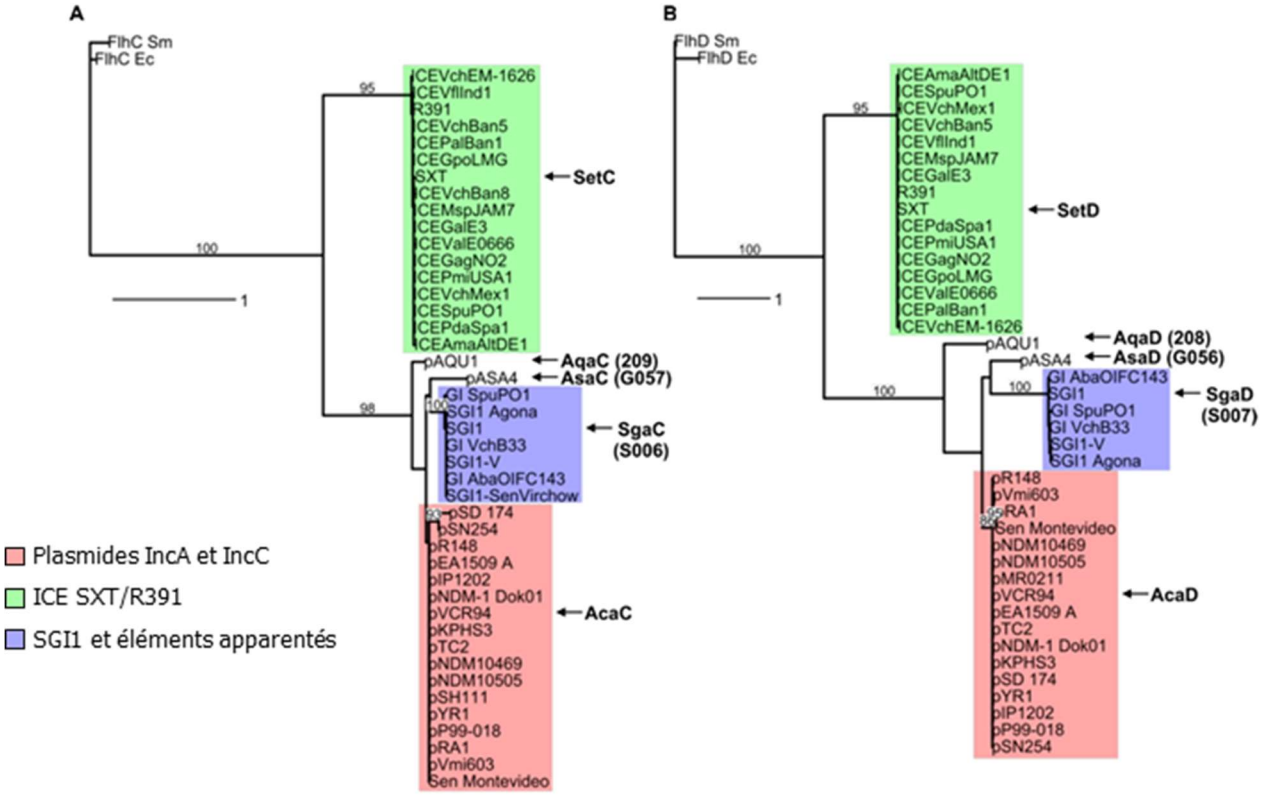


Figure 33 : Arbres phylogénétiques des alignements des séquences en acides aminés des activateurs transcriptionnels SgaDC, AcaDC et SetCD.
A) Arbre phylogénétique des protéines AcaC/SgaC/SetC. **B)** Arbre phylogénétique des protéines AcaD/sgaD/SetD. Les activateurs transcriptionnels FlhC et FlhD d'*E. coli* et de *Serratia marcenscens* ont été utilisés comme groupes externes pour les analyses phylogénétiques. Les valeurs des bootstraps supérieurs à 80% sont indiquées et la longueur des branches correspond à la distance génétique.
Issue de (Poulin-Laprade et al., 2015a)

présenté en figure 32. Par la suite, notre équipe de recherche a mis en évidence que SGI1 est un IME spécifiquement mobilisé par les plasmides IncA et IncC (Douard et al., 2010; Doublet et al., 2005).

Les gènes constituant le backbone (27 ORFs de *xis* à *res* et *S044*) de SGI1 sont conservés parmi les variants de SGI1. SGI1 est encadré des régions de répétitions directes imparfaites de 18pb : initialement nommées DR-L et DR-R (Boyd et al., 2001) et aujourd'hui plutôt nommées *attL* et *attR*. Le premier gène, *int*, encode une intégrase (recombinase à tyrosine) catalysant l'événement de recombinaison au site d'attachement *attB* (au niveau de l'extrémité 3' du gène chromosomique *trmE*) permettant l'intégration site-spécifique de SGI1 au chromosome (Doublet et al., 2005). Le gène *xis* encode une excisionase orientant la réaction de recombinaison catalysée par Int vers un événement d'excision de SGI1 se retrouvant sous forme circulaire extra chromosomique (Doublet et al., 2005). La région de l'origine de réplication (*oriV*) est composée des sites de fixation des protéines Rep (ou $RepA_{SGI1}$) et DnaA ainsi que de l'opéron S004-*rep* (ou S004-$repA_{SGI1}$) (Huguet et al., 2020; Szabó et al., 2021). Les gènes *traN*, *traG* et *traH* sont homologues aux mêmes gènes des plasmides IncC et jouent un rôle dans le détournement du système de conjugaison de ces plasmides en faveur du transfert de SGI1 (Carraro et al., 2017b). L'opéron S008-*sgaDC* encode des activateurs transcriptionnels SgaDC homologues aux activateurs transcriptionnels AcaDC des plasmides IncC (Durand et al., 2021a; Murányi et al., 2016) et SetCD de l'ICE SXT (Poulin-Laprade et al., 2015a) (figure 33). SgaDC et AcaDC activent l'expression des gènes *xis*, S004-*rep*, *traN*, *traHG* et S018 sur SGI1 ainsi que le régulon AcaDC sur les plasmides IncC via la présence de sites de fixation AcaDC dans les promoteurs de ces gènes (Durand et al., 2021a; Murányi et al., 2016). L'opéron *mpsAB* (pour mobilisation proteins of SGI1) encode une recombinase à tyrosine (MpsA) et une protéine présentant un site de fixation à l'ADN (MpsB) permettant la mobilisation de SGI1 (Kiss et al., 2019). L'origine de transfert de SGI1 (*oriT*) a été identifiée dans la région proximale de *mpsAB* (Kiss et al., 2019). L'opéron *sgiAT* encode un système toxine antitoxine composé de la toxine *sgiT* (homologue aux protéases à sérine subtilisine) et de l'antitoxine *sgiA* (homologue aux AAA-ATPase) (Huguet et al., 2016). Les gènes putatifs S013 à S018, S021, S022 et S044 ne présentent pas de similarités avec des protéines connues. S023 et S024 n'ont pas de fonction caractérisée mais présentent des similarités avec respectivement des hélicases et des exonucléases (Boyd et al., 2001).

2. Diversité des SGI1 et éléments apparentés

Depuis l'identification de SGI1, plus d'une trentaine de variants de cet îlot ont été décrits (SGI1-A à SGI1-Z) (de Curraize et al., 2021; Hall, 2010; Mulvey et al., 2006). La plupart de ces variants diffèrent par la composition de l'intégron complexe via des pertes ou acquisitions d'IS, de transposons et/ou de

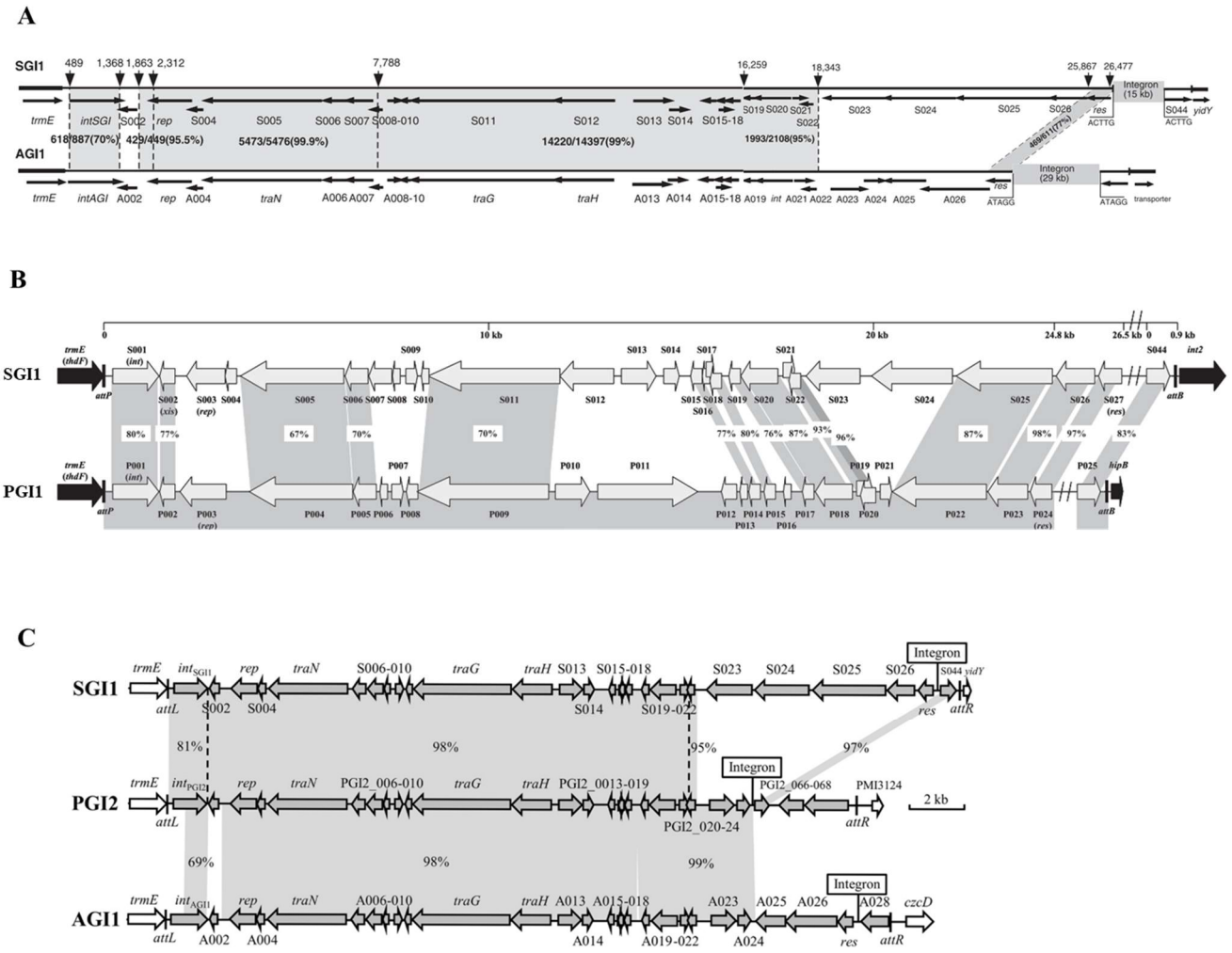


Figure 34 : Alignements de pourcentages d'identités nucléotidiques des AGI1, PGI1 et PGI2 par rapport à SGI1.
A) Alignement de AGI1 par rapport à SGI1. Issue de (Hamidian et al., 2015). B) Alignement de PGI1 par rapport à SGI1. Issue de (Siebor and Neuwirth, 2014). C) Alignement de PGI2 par rapport à SGI1 et AGI1. Issue de (Lei et al., 2018).

cassettes de résistance (de Curraize et al., 2021; Hall, 2010). Une minorité de variants possèdent des délétions ou interruptions de gènes dans le backbone dues à des mouvements d'éléments transposables. Les variants du groupe SGI1-HKL ; SGI1-H, SGI1-K (et dérivés SGI1-P, Q et O) et SGI1-L ; présentent la particularité d'avoir l'intégration d'une IS*1359* (IS*Vch4*) dans le backbone délétant 2,8 Kb comprenant l'opéron S008-*sgaDC* et une partie des gènes S009 et *traN* (de Curraize et al., 2020; Doublet et al., 2008). L'insertion de l'IS*1359* dans le variant SGI1-LK1 a délété une plus grande région (8,57 Kb) comprenant en plus les gènes *traG* et *traH* (de Curraize et al., 2020). Les variants SGI1-L1, SGI1-L2 et SGI1-B2 ont subi un événement d'insertion d'un transposon composite IS*26* dans les gènes respectifs *res*, S024 et S021 (Doublet et al., 2009; Lei et al., 2015). Les variants SGI1-J ont la particularité d'avoir l'intégron complexe intégré dans S023 au lieu d'être entre S027 et S044 (Le Hello et al., 2012; Levings et al., 2008). Cette localisation atypique de l'intégron complexe a poussé certains scientifiques à proposer de renommer ces variants SGI2 (Levings et al., 2008). Il existe également d'autres EGM apparentés à SGI1 et portant des noms associés aux espèces bactériennes dans lesquelles ils ont été identifiés. *Acinetobacter* Genomic Island 1 (AGI1, figure 34A) présente des divergences de séquences avec SGI1 notament au niveau de l'intégrase *int* , *xis* et dans la région 3' du backbone (Hamidian et al., 2015). *Proteus* Genomic Island 1 (PGI1, figure 34B) est encore plus divergent de SGI1 mais la synténie des 14 gènes homologues reste conservée indiquant une origine apparentée (Siebor and Neuwirth, 2014). Contrairement à ce que pourrait laisser penser le nom de *Proteus* Genomic Island 2 (PGI2, figure 34C), cet élément est plus proche de AGI1 et de SGI1 que de PGI1 (Lei et al., 2018). Un variant potentiellement ancestral nommé VGI présentant 99,97% d'identité de séquence avec le backbone de SGI1 mais ne possédant pas l'intégron complexe a été retrouvé dans une souche de *Vibrio cholerae* isolée en chine en 1986 (Cummins et al., 2020). L'élément KGI1 retrouvé dans une souche de *Klebsiella pneumoniae* pourrait être une structure mosaïque issue de recombinaison entre plusieurs variants et éléments reliés à SGI1 (Cummins et al., 2020). En effet, de *int* à S004 il présente 97% d'homologie avec PGI2, puis au milieu *traN* une région de 985 pb sans homologie suivie d'une grande région jusqu'à l'intégron complexe partageant 99,25% d'identité avec SGI1-PmCA11 et enfin S044 partageant 99% d'identité avec PGI1 (Cummins et al., 2020). Une analyse récente des génomes disponibles dans la banque de données NCBI montre que les variants de SGI1 et les éléments apparentés sont largement repandus parmi les Gammaproteobactéries (Cummins et al., 2020). Ils ont notamment été retrouvé chez des pathogènes d'humains et d'animaux : plus de 25 sérovars de *Salmonella enterica*, *Proteus* (Wang et al., 2019), *Acinetobacter* (Hamidian et al., 2015), *Klebsiella* (Cummins et al., 2020), *Vibrio* (Cummins et al., 2020), *Morganella* (Schultz et al., 2017), *Providencia* (Soliman et al., 2019), *Enterobacter* (Siebor et al., 2019), et *Escherichia* (Cummins et al., 2019). Les variants de SGI1 et des éléments apparentés posent un problème de santé publique

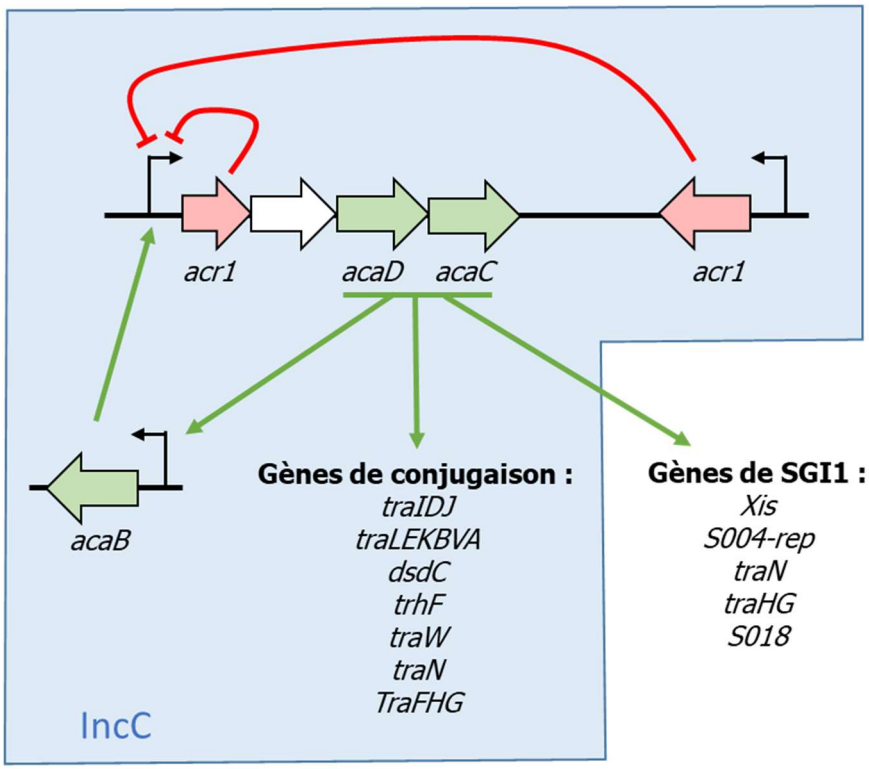


Figure 35 : Régulation transcriptionnelle du régulon AcaDC.
Le régulon AcaDC est représenté schématiquement. Les grandes flèches colorées indiquant les CDS des gènes (vertes claires pour les activateurs de transcription, rouges claires pour les répresseurs de transcription et blanches pour les fonctions inconnues) et les flèches noires fines les promoteurs. Les flèches vertes indiquent une activation de transcription par des activateurs de transcription (AcaDC ou AcaB). Les flèches arrêtées rouges indiquent une répression de la transcription par des répresseurs transcriptionnels (Acr1 et Acr2). Seuls AcaB et les gènes de conjugaison activés par AcaDC sur les plasmides IncC (parmi les 18 promoteurs induits du régulon) sont représentés dans la forme bleue. Les gènes dont l'expression est activée par AcaDC sur SGI1 (5 promoteurs induits) sont indiqués en bas à droite.

majeure car ils disséminent parmi ces pathogènes de multiples gènes de résistance aux antibiotiques dont certains sont critiques. Le variant SGI1-S porte le gène *rmtC* de résistance aux aminosides (Wilson and Hall, 2010). Les variants SGI1-X et SGI1-PmSC1111 portent les gènes respectivement *qnrB2* et *aac(6')-Ib-cr* de résistance aux fluoroquinolones (Lei et al., 2014; Wang et al., 2019). Les variants SGI1-K7 et SGI1-PmJN48 portent respectivement les gènes $bla_{\text{CTX-M-15}}$ and $bla_{\text{CTX-M-65}}$ encodant des BLSE (Bie et al., 2018; de Curraize et al., 2018). Le variant SGI1-V porte le gène $bla_{\text{VEB-6}}$ encodant une BLSE et le gène *qnrA1* de résistance aux fluoroquinolones (Siebor and Neuwirth, 2011). L'élément PGI1-*Pm*PEL porte le gène $bla_{\text{NDM-1}}$ encodant une carbapénémase (Girlich et al., 2015). Récement, les éléments SGI1-1NDM et SGI1-2NDM ont été identifiés dans des souches nosocomiales de *Proteus mirabilis* et encodent repectivement une et deux copies du gène $bla_{\text{NDM-1}}$ (Yang et al., 2022).

3. SGI1 et plasmides IncC / IncA

Hormis la démonstration de mobilisation de SGI1 par les plasmides IncA, toutes les études mécanistiques entre SGI1 et les plasmides le mobilisant ont été réalisées avec des plasmides IncC.

a. Mobilisation

Plusieurs travaux au cours de la dernière décennie ont permis d'approfondir les connaissances des mécanismes moléculaires impliqués dans la mobilisation de SGI1. L'expression des activateurs AcaDC des plasmides IncC activent l'excision et le transfert conjugatif de SGI1 (Carraro et al., 2014). Cette étude a également permis d'identifier les promoteurs composant le régulon AcaDC (figure 35) sur les plasmides IncC (18 promoteurs) et SGI1 (5 promoteurs : *xis*, S004-*rep*, *traN*, *traHG* et S018) (Carraro et al., 2014). Peu de temps après, le rôle des régulateurs AcaDC dans l'activation de l'expression de *xis* et leur rôle dans le transfert conjugatif de SGI1 ont été confirmés (Kiss et al., 2015) ainsi que l'induction des mêmes 5 promoteurs par AcaDC sur SGI1 (Murányi et al., 2016). La complémentation de la délétion *ΔacaDC* par la surexpression de *sgaDC* ($flhDC_{\text{SGI1}}$) a également été démontrée (Murányi et al., 2016) mettant en évidence pour la première fois l'homologie fonctionnelle entre ces activateurs transcriptionnels. En concomitance de ces travaux, le rôle des gènes *tra* de SGI1 appartenant au régulon AcaDC/SgaDC a été étudié. Les protéines TraN, TraH et TraG de SGI1 présentent respectivement 78 %, 64% et 37% d'identité (88%, 78% et 57% de similarité) avec celles des plasmides IncC (Carraro et al., 2017b). Les gènes *traN*, *traH* et *traG* sont essentiels au transfert conjugatif des plasmides IncC et leurs délétions sont en partie complémentées par leurs homologues encodés sur SGI1 (Carraro et al., 2017b). Les protéines $TraG_{\text{SGI1}}$ et $TraH_{\text{SGI1}}$ sont essentielles pour le transfert optimal de SGI1 (Carraro et al., 2017b). La protéine $TraG_{\text{SGI1}}$ permettrait le transfert

conjugatif de SGI1 dans une bactérie contenant un plasmide IncC désactivant les mécanismes d'exclusion d'entrée du plasmide (Carraro et al., 2017b). Par ces observations, les auteurs ont proposé que les protéines Tra de SGI1 lui permettraient de remodeler à son avantage le système de conjugaison des plasmides IncC (Carraro et al., 2017b). L'origine de transfert de SGI1 (*oriT*) a été caractérisée ainsi que l'implication de l'opéron *mpsAB* dans la mobilisation de SGI1 (Kiss et al., 2019). La mobilisation de SGI1 n'est pas dépendante de la relaxase des plasmides IncC (TraI) mais serait assurée par MpsA jouant le rôle d'une relaxase atypique (famille des tyrosines recombinases) nécessitant la présence de MpsB (présentant un domaine de fixation à l'ADN) (Kiss et al., 2019). L'expression du gène *mpsB* a été déterminée à partir du promoteur de l'opéron *mpsAB* mais également via un promoteur situé dans la région terminale de *mpsA* (Kiss et al., 2019). En plus des protéines MpsA et MpsB, la production d'un ARN (sgm-sRNA) au niveau de la région de l'*oriT* de SGI1 est nésessaire à la mobilisation de SGI1 (Nagy et al., 2021). Le rôle de sgm-sRNA dans la mobilisation de SGI1 n'a pas été élucidé à ce jour (Nagy et al., 2021).

b. Incompatibilité, réplication et régulations croisées

Malgré le fait que SGI1 ait besoin de la présence des plasmides IncC pour son transfert, ces deux EGM semblent avoir des difficultés à cohabiter dans une même cellule. Ils n'ont jamais été retrouvé ensemble dans les bactéries porteuses de gènes de résistance aux antibiotiques isolées de différentes origines (humain, animal, environnement) (Ktari et al., 2015; Lindsey et al., 2009). Notre équipe de recherche a démontré en 2016 une incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncC contrebalancée en faveur de SGI1 par la présence d'un système toxine antitoxine (*sgiAT*) encodé par SGI1 (Huguet et al., 2016). De récents travaux sur l'incompatibilité entre ces EGM ont mis en évidence la réplication de la forme circulaire de SGI1 en présence d'un plasmide IncC à environ 12 copies par chromosome (Huguet et al., 2020). En plus de facteurs encodés par le plasmide IncC, la réplication de SGI1 est dépendante de la présence des gènes *int*, *xis*, *rep* et d'une origine de réplication putative en amont du gène *rep* contenant des itérons : *oriV* (Huguet et al., 2020). La suppression de la réplication de SGI1 abolit l'incompatibilité observée avec les plasmides IncC (Huguet et al., 2020). Peu de temps après, la réplication (à environ 6 copies par chromosome) de la forme circulaire de SGI1 a été confirmée en présence d'un plasmide IncC (Szabó et al., 2021). Les auteurs ont identifié et caractérisé la région de l'origine de réplication de SGI1 : $oriV_{SGI1}$. Cette région de 260 pb contient 4 répétitions directes de 16 pb sur lesquelles se fixent les protéines $RepA_{SGI1}$ (ou Rep) ainsi que 6 sites de fixation putatifs de la protéine DnaA, essentielle à la réplication de SGI1 (Szabó et al., 2021). Les auteurs ont démontré la capacité de cette région en présence de $RepA_{SGI1}$ et de DnaA à assurer la réplication d'un plasmide à réplication conditionnelle dérivé de R6K (Szabó et al., 2021). Curieusement, ils ont également mis en

évidence la compatibilité entre le plasmide se répliquant à partir de *oriV*$_{SGI1}$ et un plasmide IncC (R16a) (Szabó et al., 2021). La traduction en *cis* de l'ORF S004 est essentielle pour la synthèse de RepA$_{SGI1}$ à partir de l'opéron S004-*RepA*$_{SGI1}$ agissant en tant que « peptide leader » (Szabó et al., 2021). Récemment, le rôle central de SgaDC dans le parasitisme des plasmides IncC a été démontré (Durand et al., 2021a). Cette étude a confirmé l'activation des 23 promoteurs du régulon AcaDC par SgaDC (18 sur IncC et 5 sur SGI1) en combinant des approches de ChIP-exo, Cappable-seq et RNA-seq (Durand et al., 2021a). Les régulateurs transcriptionnels SgaDC semblent avoir un impact plus important sur la biologie de SGI1 que les régulateurs AcaDC (Durand et al., 2021a). En effet, la délétion de *sgaDC* diminue de 3000 fois le taux d'excision de SGI1 alors que la délétion de *acaDC* entraine une diminution non significative (Durand et al., 2021a). La délétion de *sgaDC* abolit totalement la réplication de SGI1 alors que la délétion de *acaDC* diminue le nombre de copies de SGI1 d'un facteur 2,7 (passant de ~7 copies à ~2 copies par chromosome) (Durand et al., 2021a). De plus la délétion de *sgaDC*, abolissant le phénomène d'incompatibilité observé entre SGI1 et les plasmides IncC, n'est pas totalement complémentée par la surexpression de AcaDC (Durand et al., 2021a). Toutes ces observations ont permis aux auteurs de conclure que SgaDC, et non pas AcaDC, contrôlent l'excision et la réplication de SGI1 et dans une plus forte mesure la déstabilisation des plasmides IncC (Durand et al., 2021a).

IV. La réponse SOS bactérienne

En 1967, Evelyn Witkin émit l'hypothèse de l'existence d'un répresseur transcriptionnel inactivé par la formation de dommages à l'ADN après traitement aux UV ou à la mitomycine C (Witkin, 1967). L'inactivation de ce répresseur entrainerait l'arrêt de la division cellulaire et la filamentation des cellules mais également l'induction de prophage (Witkin, 1967). Quelques années après, Miroslav Radman propose l'existence d'un système de réparation de l'ADN en réponse à des traitements causant des dommages à l'ADN qu'il nomme initialement « SOS repair / réparation SOS » (Radman, 1975). Par la suite, le terme de « SOS response / réponse SOS » sera utilisé et ce mécanisme sera principalement caractérisé chez *E. coli*. L'activation de la réponse SOS peut être causée par divers stress entrainant la formation d'ADN simple brin (UV, antibiotiques, nutritifs, physiques…). Dès 1975, les deux acteurs protéiques principaux de la réponse SOS ont été identifiés : LexA et RecA (Radman, 1975). LexA (locus for X-ray sensitivity A) est le répresseur transcriptionnel central de la réponse SOS inhibant l'expression des gènes appartenant au régulon SOS (composé de plusieurs

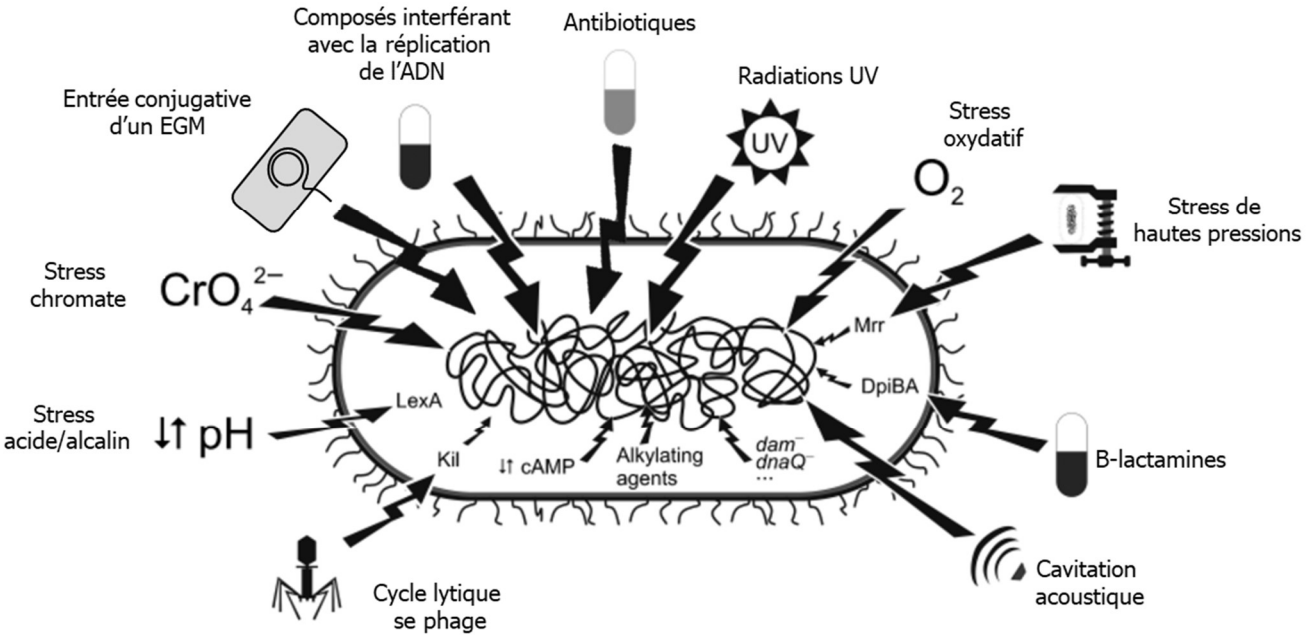


Figure 36 : Activations directes et indirectes de la réponse SOS.
Représentation de différents stress activant la réponse SOS. Les stress sont indiqués à l'extérieur de la cellule. Les mécanismes d'activation de la réponse SOS endogènes sont indiqués par le nom de la molécule ou le nom de la mutation à l'intérieur de la cellule.
Adapté de (Erill et al., 2007)

dizaines de gènes). RecA (recombinase A) est une protéine polymérisant sur de l'ADNsb entrainant la formation de filaments nucléoprotéiques RecA-ADNsb causant l'auto-protéolyse de LexA.

A. Induction et régulation de la réponse SOS

1. Facteurs d'induction

De nombreux stress entrainant des dommages à l'ADN et la formation d'ADNsb peuvent activer la réponse SOS (figure 36). La première association entre dommages induits à l'ADN et activation de la réponse SOS a été faite pour les traitements aux UV chez *E. coli* (Radman, 1975). Par la suite, l'activation de la réponse SOS a été associée à des molécules endommageant l'ADN : les agents alkylants endogènes ou exogènes tels que la mitomycine C (MMC) (Costa de Oliveira et al., 1987; Drabløs et al., 2004; Volkert et al., 1989) ou des antibiotiques. L'induction de la réponse SOS par les antibiotiques dépend de la classe d'antibiotiques utilisée mais également de l'espèce bactérienne. Par exemple, les aminosides, la tétracycline et le chloramphénicol activent la réponse SOS chez *Vibrio cholerae* mais pas chez *E. coli* alors que la ciprofloxacine (fluoroquinolone) et le triméthoprime activent la réponse SOS chez ces deux espèces (Baharoglu and Mazel, 2011). Les aminosides activent également la réponse SOS chez d'autres bactéries Gram négatif tels que *Klebsiella pneumoniae* et *Photorhabdus luminescens* (Baharoglu et al., 2013). Certains antibiotiques activent la réponse SOS en interférant avec la réplication : arrêt de la réplication par les fluoroquinolones (Pohlhaus and Kreuzer, 2005), perturbation de la réplication en affectant la synthèse des purines et pyrimidines par le triméthoprime (Baharoglu and Mazel, 2014; Lewin and Amyes, 1991) ou en inhibant l'initiation de la réplication via les protéines DpiBA par les β-lactamines (Miller et al., 2003, 2004). D'autres antibiotiques activent la réponse SOS via la production d'espèces réactives à l'oxygène (ROS : reactive oxygen species) : les aminosides (Baharoglu et al., 2013, 2014), les fluoroquinolones (Dwyer et al., 2007; Shaw et al., 2003) et les β-lactamines (Hocquet et al., 2012; Kohanski et al., 2010). De nombreux facteurs environnementaux externes peuvent activer la réponse SOS classiquement via des dommages à l'ADN : des stress oxydatifs (Imlay and Linn, 1987), à l'exposition aux chromates (Ackerley et al., 2006) ou à des cavitations acoustiques (Vollmer et al., 1998). Mais d'autres facteurs environnementaux activent la réponse SOS sans dommage à l'ADN ou via l'induction de facteurs intracellulaires responsables de dommages à l'ADN : des pH élevés (alcalins) vont entrainer l'auto-protéolyse de LexA (Little, 1984; Slilaty et al., 1986), des pH faibles (acides) vont favoriser la fixation de LexA sur de l'ADN non spécifique diminuant la présence de LexA sur ses boites de fixation (Sousa et al., 2006), l'accumulation d'AMPc intracellulaire notamment en condition de manque nutritif

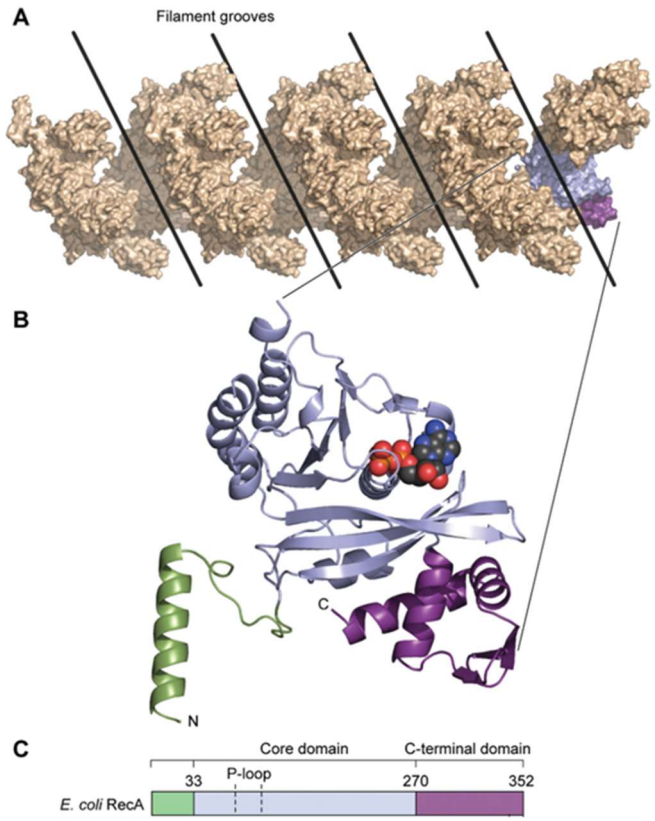


Figure 37 : Structure de la protéine RecA.
A) Représentation d'un filament de 24 monomères de RecA fixés à de l'ADNsb (4 tours de filament). Un tour d'hélice correspond à 18 pb sur lesquelles sont fixées 6 monomères de RecA. **B)** Représentation structurale d'un monomère de RecA avec le domaine N-terminal en vert, le domaine C-terminal en violet et la région centrale en bleu avec la fixation d'ADP. **C)** Délimitation des domaines de la protéine RecA. Issue de (Cox, 2007)

(Taddei et al., 1995), les hautes pressions vont induire l'expression de l'endonucléase Mrr causant des cassures double brin de l'ADN (Aertsen and Michiels, 2005). L'entrée de plusieurs familles de plasmides par conjugaison sous forme d'ADNsb active la réponse SOS dans la cellule receveuse (Baharoglu et al., 2010). La présence du facteurs anti-SOS *psiB* (plasmidic SOS inhibition) sur certains plasmides permet de diminuer l'induction de la réponse SOS par leur entrée conjugative dans les cellules chez *E. coli* mais pas chez *Vibrio cholerae* (Baharoglu et al., 2010). La protéine PsiB inhiberait la formation du nucléofilament ADNsb-RecA via une interaction avec la protéine RecA (Bagdasarian et al., 1992; Baharoglu et al., 2010; Petrova et al., 2009).

Les protéines SSB (single strand binding protein) chromosomiques sont essentielles aux fonctions de réplication, recombinaison et réparation de l'ADN (Lohman and Ferrari, 1994; Meyer and Laine, 1990). Il a été démontré que la fixation des protéines SSB sur de l'ADNsb entre en compétition avec la fixation des protéines RecA sur ces mêmes molécules d'ADN (Kowalczykowski et al., 1987; Umezu et al., 1993). De nombreux plasmides encodent des homologues aux protéines SSB chromosomiques (Chase et al., 1983; Golub and Low, 1985; Howland et al., 1989; Ruvolo et al., 1991). Si les effets anti-SOS des protéines PsiB sont caractérisés, peu d'études se sont intéressées aux interactions entre les protéines SSB plasmidiques et la réponse SOS. En 1989, des travaux ont permis d'observer un effet anti-SOS de protéines SSB plasmidiques similaire à l'effet des protéines PsiB via la délétion du gène *ssb* mais les auteurs ont attribué l'observation à un probable dérèglement de la région promotrice du gène *psi* (Howland et al., 1989). A la fin des années 1990, plusieurs études ont mis en évidence la transcription de *ssb* et *psiB* sur des plasmides via un promoteur d'ADN simple brin permettant aux gènes d'être exprimés précocement directement à partir du T-strand au cours de la conjugaison (Bates et al., 1999; Masai and Arai, 1997). En plus de leurs expressions à partir du T-strand, les protéines PsiB et SSB issues d'un plasmide IncF sont transloquées de la cellule donneuse vers la cellule receveuse par le système de conjugaison (Al Mamun et al., 2021). Les protéines PsiB et SSB transloquées dans le transconjugant inhibent l'activation de la réponse SOS suite à l'entrée du plasmide sous forme d'ADNsb (Al Mamun et al., 2021).

2. Acteurs de la réponse SOS

a. RecA

La protéine RecA (figure 37) est une recombinase de 352 acides aminés constituée de 3 domaines : le domaine N-terminal (résidus 1 à 33), le domaine central (résidus 34 à 269) contenant le site de liaison à l'ATP et le domaine C-terminal (résidus 270 à 352) auto-régulant l'activité de RecA (Cox, 2007; Story and Steitz, 1992; Story et al., 1992). La protéine RecA est impliquée dans la réparation de

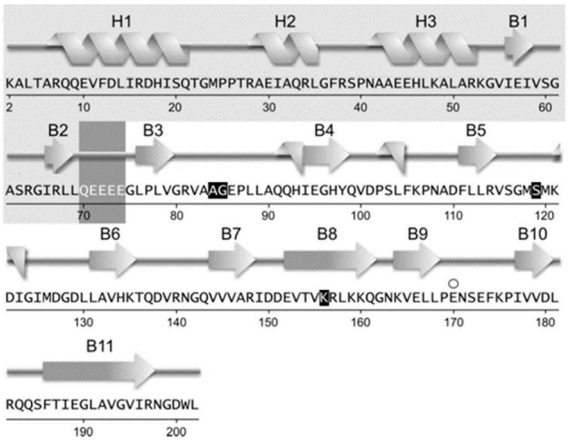


Figure 38 : Séquence et structure de la protéine LexA.
Le domaine N-terminal correspond à la partie en gris clair de la protéine, la région charnière en gris foncé et le domaine C-terminal en blanc. Le domaine N-terminal est composé de 3 hélices α (H1 à H3) et de 2 feuillets β (B1 et B2). Le domaine C-terminal est composé de 9 feuillets β (B3 à B11). La dyade catalytique composée des résidus Ser-119 et Lys-156 ainsi que les résidus encadrant le site de clivage Ala-84 et Gly 85 sont indiqués en noir sur la séquence.
Issue de (Butala et al., 2009).

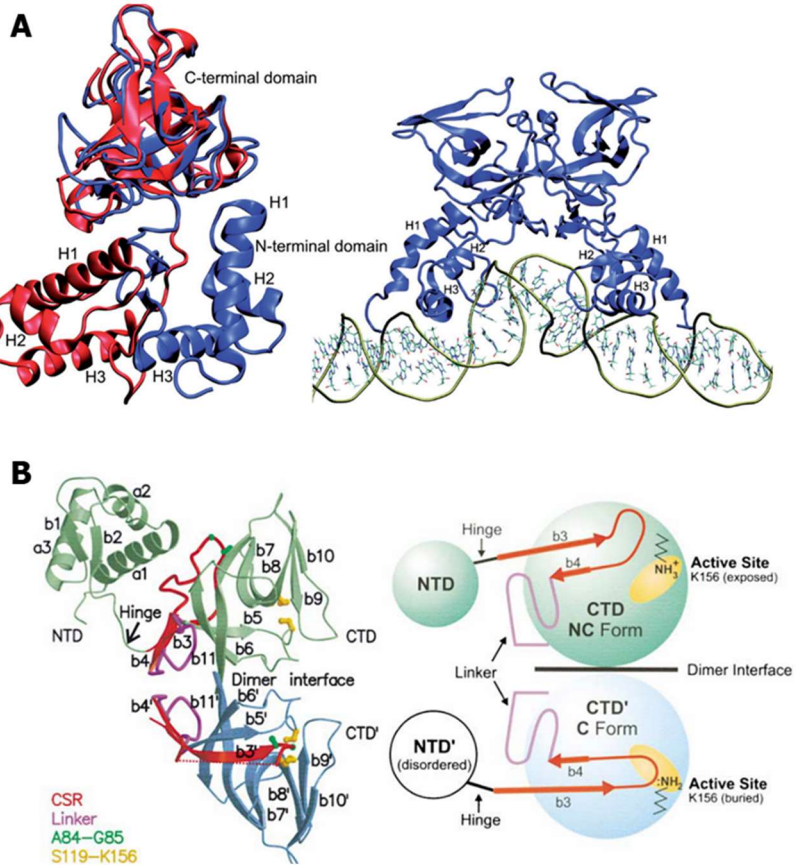


Figure 39 : Architecture conformationnelle de la dimérisation et de la fixation à l'ADN de la protéine LexA.
A) Modèle proposé de changement conformationnel entrainé par la fixation à l'ADN d'un dimère de LexA. A gauche de l'illustration est représentée la structure cristallisée d'un monomère de LexA (en rouge) modélisée en formation dimérisée avec un autre monomère (en bleu). Sur la gauche de l'illustration est proposé un modèle de fixation d'un dimère de LexA au niveau de la région régulatrice du gène *cka* d'*E. coli*. **B)** Conformation d'un dimère de LexA. Les monomères de LexA sont représentés en bleu et vert avec les domaines N-terminal (NTD) et C-terminal (CTD) distincts. La région du site de clivage (CSR : cleavage site region) composée des feuillets β est représentée en rouge. La région charnière intermédiaire entre le CSR et le cœur catalytique est représentée par le linker violet. La dyade catalytique Ser-119/Lys-156 est en orange et le site de clivage Ala-84/Gly-85 en vert.
Issue de (Butala et al., 2009; Luo et al., 2001)

cassures ADN simple et double brin par recombinaison homologue (Kowalczykowski, 2000; Lusetti and Cox, 2002), dans l'activité de réparation de l'ADN polymérase V induisant des mutations (Jaszczur et al., 2016; Robinson et al., 2015) et dans l'induction de la réponse SOS en stimulant l'auto-protéolyse de LexA (Little, 1984). Pour stimuler l'auto-protéolyse de LexA, les protéines RecA doivent être en présence d'ATP, d'ions Mg^{2+}, d'un nucléoside triphosphate et d'ADNsb (Chen et al., 2008; Craig and Roberts, 1980). La formation du filament nucléoprotéique RecA-ADNsb *in vitro* nécessite une première étape de nucléation d'un dimère de RecA sur de l'ADNsb puis une seconde étape d'élongation du filament par ajout de monomères de RecA (Bell et al., 2012). L'élongation du filament *in vitro* est bidirectionnelle mais semble plus rapide dans la direction 5'→ 3' (Bell et al., 2012). Le nombre de protéines RecA par cellule est estimé entre 8 000 et 15 000 et augmente jusqu'à 100 000 lorsque la réponse SOS est activée (Boudsocq et al., 1997; Stohl et al., 2003).

b. LexA

La protéine LexA (figure 38) est un répresseur transcriptionnel de 202 acides aminés se fixant sur des séquences spécifiques d'ADN sous forme dimérique (Mohana-Borges et al., 2000). L'auto-protéolyse de LexA est stimulée par le complexe RecA-ADNsb empêchant la fixation de LexA sur ses cibles ADN et donc l'inhibition de son régulon (Little, 1984). Un monomère de LexA est composé d'un domaine N-terminal (Met-1 à Leu-69) de liaison à l'ADN et d'un domaine C-terminal catalytique et impliqué dans la dimérisation (Gly-75 à Asn-198) (Luo et al., 2001). Les domaines N-terminal et C-terminal sont reliés par une région charnière hautement hydrophile (Gln-70 à Glu-74) (Luo et al., 2001). Le domaine C-terminal (figure 38 et 39A) est composé de structures en feuillets β et contient la région du site de clivage (CSR : cleavage site region) (Gly-75 à Tyr-98), une région charnière intermédiaire (Gln-99 à Asp-110) et le noyau catalytique (Phe-111 à Asn-198) avec la dyade catalytique, Ser-119/Lys-156, catalysant l'auto-clivage de la protéine entre les résidus Ala-84 et Gly-85 (Luo et al., 2001). La structure du domaine C-terminal est conservée parmi les homologues de la protéine LexA, notamment le répresseur transcriptionnel CI du phage λ et UmuD' (Luo et al., 2001). Les hélices α H2 et H3 (figure 38 et 39B) du domaine N-terminal de LexA forment le motif de liaison à l'ADN helix-turn-helix (HTH) impliqué dans la fixation de la protéine à l'ADN (Fogh et al., 1994). La séquence consensus des sites de fixation de la protéine LexA pour *E. coli* est 5'-**CTG**-$(TA)_5$-**CAG**-3' (Erill et al., 2007) et pouvant être étendue à 5'-TA**CTGT-**$(AT)_4$**-ACAG**TA-3' (Wade et al., 2005). La reconnaissance des motifs CTGT et ACAG séparés de 8 nucléotides (préférentiellement mais pas exclusivement des répétitions AT) est critique à la fixation du dimère de LexA sur son site ADN (Zhang et al., 2010). La reconnaissance et la fixation spécifique de LexA sur ses cibles ADN seraient dues à un changement conformationnel correspondant à une rotation de 180° des domaines

Tableau 4 : Gènes chromosomiques directement régulés par LexA (*E. coli* K12).
D'après (Courcelle et al., 2001; Wade et al., 2005) et vérifications avec Uniprot et EcoCyc.

	Genes	***Fonction***
Réplication et réparation	*umuC*	ADN polymérase V non fidèle
	umuD	Complexe avec l'ADN polymérase V
	dinB	ADN polymérase IV non fidèle (opéron *dinB-yafNOP*)
	polB	ADN polymérase II, réparation ADN
	recA	Senseur réponse SOS, Réparation ADN par recombinaison homologue
	recN	Réparation ADN
	oraA/recX	Inhibition activité recombinase et co-protéase de RecA, opéron *recAX*
	dinI	Inhibe activité co-protéase et stabilise les filament RecA-ADNsb
	dinD	Inhibition de l'activité recombinase de RecA
	uvrB	Réparation ADN par excision de nucléotide
	uvrA	Réparation ADN par excision de nucléotide
	uvrD	Hélicase, réparation par excision de nucléotide
	ydjQ/cho	Nucléase, réparation par excision de nucléotide
	ruvA	Hélicase, résolution de jonction de Holliday
	ruvB	Hélicase, résolution de jonction de Holliday
	yigN/rmuC	Inhibiteur de recombinaison d'ADN
	yoaA	Hélicase impliquée dans la réparation d'ADN post-réplication
	dinG	Hélicase, résolution des D-loop et R-loop
	sbmC	Inhibiteur de la gyrase
	ssb	Single strand binding protein,
Transcription	*lexA*	Répresseur transcriptionnel de la réponse SOS
Division	*sulA/sfiA*	Inhibition de la division
	ftsK	Translocation de la région *ter*, résolution des dimères chromosomiques
Transport	*dinF*	Transporteurs transmembranaire (export de ROS), opéron *LexA-dinF*
Système TA	*yafNO*	Système TA (opéron *dinB-yafNOP*)
	yjiW/SymE	Toxine, système TA *symE*/*symR*
	hokE	Toxine, système TA *hokE*/*sokE*
	tisB	Toxine, système TA *tisB/istR1*
	dinQ	Toxine, système TA *dinQ*/*agrB*
	dinJ–yafQ	Système TA *dinJ*/*yafQ*
Inconnu	*yebG*	Fonction inconnue
	yafP	Putative N-acetyltransferase , fonction inconnue (opéron *dinB-yafNOP*)
	ydjM	Protéine de la membrane interne, fonction inconnue
	ybfE	Protéine avec un domaine RHH, fonction inconnue

N-terminaux par rapport à la forme libre et n'altérant pas les structures des domaines C-terminaux (Butala et al., 2007). Le nombre de protéines LexA par cellule est estimé entre 600 et 1 300 monomères (Sassanfar and Roberts, 1990; Schmidt et al., 2016) majoritairement présents sous forme dimérique (Butala et al., 2011; Giese et al., 2008; Mohana-Borges et al., 2000). Les protéines LexA sont présentes sous forme fixée à l'ADN non clivable et sous forme libre clivable ou non clivable dans les cellules (Jones and Uphoff, 2021). Environ 14-31 dimères de LexA sont sous forme fixées à l'ADN en cohérence avec le nombre de dimères nécessaires pour réprimer la quarantaine de gènes du régulon SOS (Jones and Uphoff, 2021). La chronologie d'induction des gènes du régulon SOS est basée sur la protection à l'auto-clivage des dimères fixés sur l'ADN et des vitesses de dissociation de ces LexA des promoteurs (Butala et al., 2011; Jones and Uphoff, 2021). Le passage de la forme libre non-clivable à la forme libre clivable correspondant à un changement conformationnel de la région CSR rapprochant les résidus Ala-84 et Gly-85 de la dyade catalytique dans la forme clivable (Luo et al., 2001). Le complexe RecA-ADNsb pourrait stabiliser les protéines LexA dans la conformation clivable (Giese et al., 2008; Luo et al., 2001). L'auto-clivage de LexA se produit sur chaque monomère séparément (Butala et al., 2011; Giese et al., 2008). Le clivage de la protéine expose sur les fragments de LexA des motifs de dégradation reconnus par les protéases Lon et ClpXP entrainant leurs dégradation (Little and Gellert, 1983; Neher et al., 2003).

3. Le régulon SOS

Le régulon SOS comprend de nombreux gènes dont l'induction peut varier selon les traitements utilisés, la durée d'exposition, les espèces et souches bactériennes ainsi que d'autres facteurs environnementaux. Au début des années 2000, plusieurs études ont analysé l'impact des traitements induisant la réponse SOS (UV et la mitomycine C : MMC) sur le profil d'expression de souches sauvages et de mutants *lexA* par macroarray (Courcelle et al., 2001; Khil and Camerini-Otero, 2002; Quillardet et al., 2003). Les résultats obtenus sont plutôt variables d'une étude à l'autre. Les stress utilisés (UV et MMC) activent probablement d'autres voies de régulation dépendantes ou indépendantes de l'activation de la réponse SOS (induction d'autres régulateurs transcriptionnels, réponse stringente, AMPc…). Globalement, ces études ont mis en évidence l'induction de la transcription de plus d'une centaine de gènes via l'induction de la réponse SOS mais également la répression de certains gènes. Cependant, la régulation par la réponse SOS de seulement une trentaine de gènes chromosomiques d'*E.coli* a été caractérisée expérimentalement (tableau 4). Parmi ces gènes, on retrouve en grande majorité des gènes impliqués dans la réparation et la réplication de l'ADN lésé (dont des polymérases non fidèles induisant des mutations mais permettant de répliquer de l'ADN altéré). Tous les gènes de la réponse SOS ne sont pas induits en même temps (dépendant de l'affinité

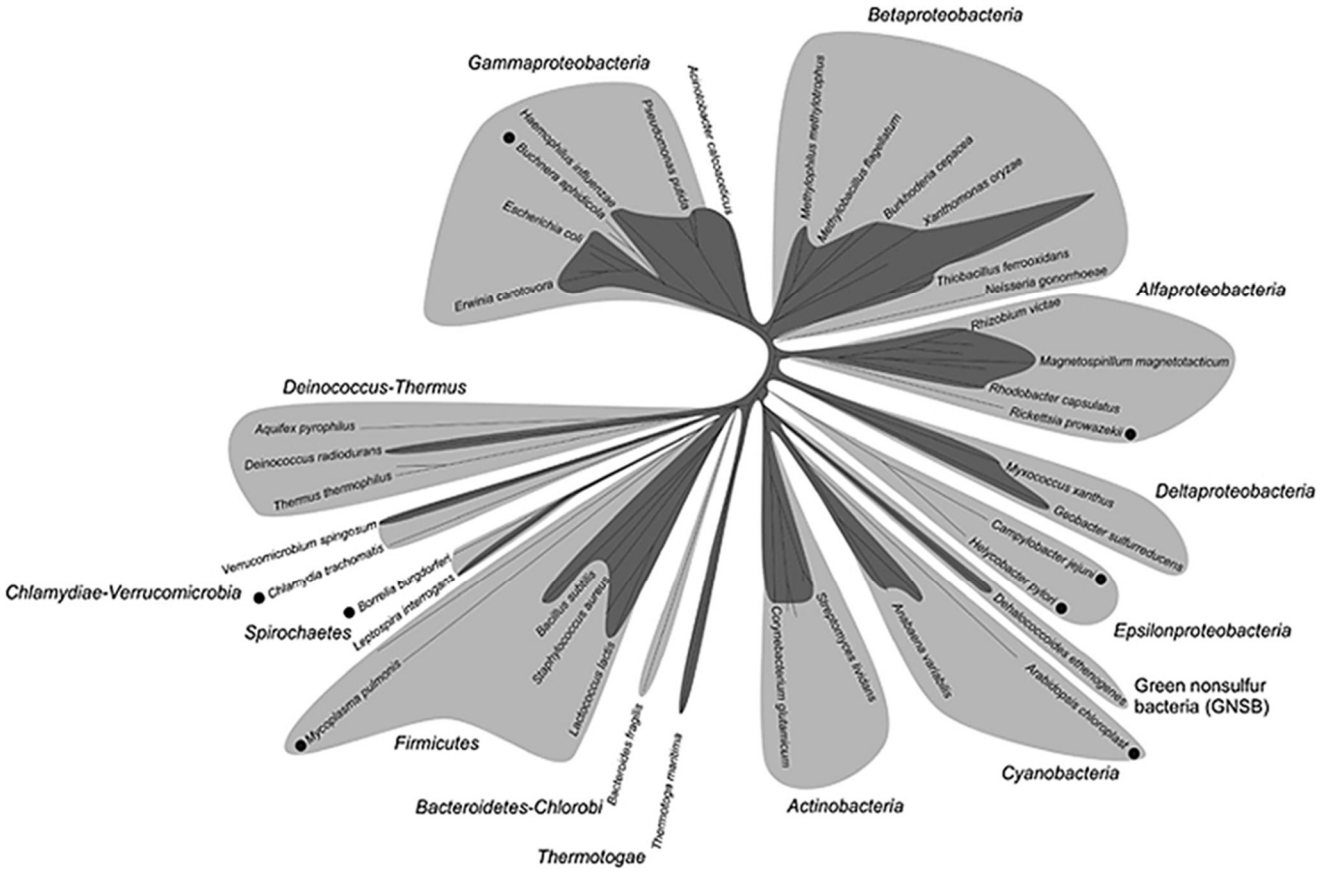


Figure 40 : Distribution des homologues du gènes *lexA* parmi les domaines bactériens.
La distribution phylogénétique des espèces a été faite à partir de la séquence protéique de RecA. Les groupes phylogénétiques sont représentés par les aires en gris clair. La présence d'homologues au gène *lexA* est représentée par les aires gris foncé. Les cercles noirs indiquent les espèces ayant subi une réduction génomique.
Issu de (Erill et al., 2007).

de LexA pour ses sites) ni à des mêmes niveaux d'expression (dépendant de l'activité promotrice de chaque gène et possiblement d'autres régulateurs transcriptionnel) (Courcelle et al., 2001; Friedman et al., 2005; Maslowska et al., 2019). Les gènes *lexA*, *recA*, *recN*, *sulA*/*sfiA* sont fortement induits dans les 5 min suivant le traitement aux UV alors que *umuDC* sont également fortement induits mais avec un pic d'expression atteint 20 min après l'exposition aux UV (Courcelle et al., 2001). Cette régulation temporelle permet dans un premier temps d'essayer de réparer les dommages ADN fidèlement (recombinaison homologue, excision des nucléotides endommagés, redémarrage des fourches de réplication…) et puis si ces dommages persistent, les mécanismes de réparation non fidèle avec les ADN polymérases II et IV puis la V sont mis en place (Maslowska et al., 2019). A l'échelle de la cellule unique, le patern d'activité promotrice du régulon SOS semble même plus complexe permettant d'observer une cinétique de plusieurs pics après traitement aux UV (Friedman et al., 2005). La périodicité de ces pics d'expression promotrice est dépendante de UmuDC (Friedman et al., 2005). La transcription de *lexA* durant la réponse SOS (LexA régulant son propre promoteur) permet, une fois la réparation des dommages à l'ADN et donc la disparition de l'ADNss, de restaurer l'inhibition transcriptionnelle du régulon SOS (Walker, 1984).

4. Universalité et exceptions de la réponse SOS

La réponse SOS semble être une réponse au stress conservée car des homologues de LexA régulant des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ont été caractérisés chez de nombreuses espèces bactériennes : *Mycobacterium tuberculosis* (Movahedzadeh et al., 1997), *Thermotoga naepolitana* (Zverlov and Schwarz, 1999), *Rhodobacter sphaeroides* (Fernández De Henestrosa et al., 1998) et *Cyanobacterium Anabaena* sp. (Mazón et al., 2004). De plus, des séquences homologues au gène *lexA* sont retrouvées dans de nombreux phyla (figure 40) suggérant une large distribution ainsi qu'une origine ancienne de la réponse SOS (Erill et al., 2007). On observe cependant des consensus différents des séquences des sites de fixation de la protéine LexA selon les phyla ou classes bactériennes (figure 41) (Erill et al., 2007). Ces analyses ont également permis de révéler l'absence d'homologue du gène *lexA* au sein de classes ou phylum (Erill et al., 2007). Plusieurs parasites intracellulaires (*Coxiella burnetii*, *Wolbachia*, *Rickettsiae, Mycoplasmataceae*) ont perdu *lexA* mais également d'autres gènes du régulon SOS impliqués dans la réparation de l'ADN probablement à cause des pressions évolutives qui ont conduit à la réduction de leur génome (Erill et al., 2007; Fallon, 2021; Mertens et al., 2005; Renesto et al., 2005). Enfin, l'absence de réponse SOS chez le pathogène humain *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae)* est suspectée depuis le début des années 80 (Gasc et al., 1980). En effet, il semblerait que ce pathogène ne possède pas d'homologue au gène *lexA* dans son génome (Claverys et al., 2006). Cependant, l'utilisation de la MMC, causant des dommages à l'ADN, induit la

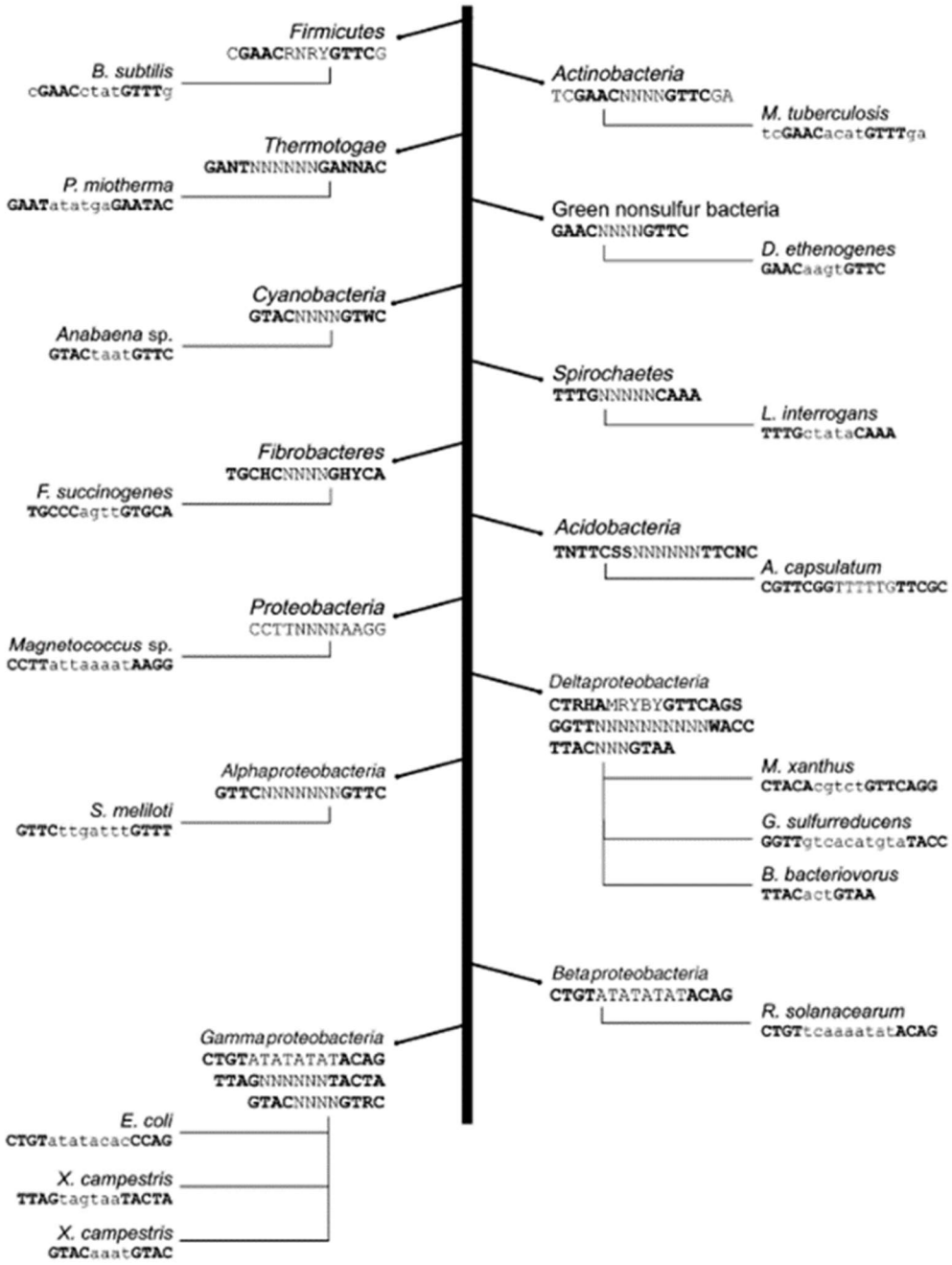


Figure 41 : Distribution des séquences de fixation de la protéine LexA parmi les différents domaines bactériens.
La séquence consensus des sites de fixation de la protéine LexA est représentée associée à la classe ou au phylum bactérien. La séquence du site de fixation de la protéine LexA dans le promoteur de *lexA* (sauf pour *L. interrogans* qui est le site de fixation de la protéine LexA dans le promoteur de *recA*) est représentée associée avec l'espèce représentative des classes/phyla. Les nucléotides en gras sont les bases conservées des différents sites de fixation de la protéine LexA.
Issu de (Erill et al., 2007).

compétence à la transformation de *S. pneumoniae* via l'induction du régulon *com* (Prudhomme et al., 2006). *S. pneumoniae*, ne possédant pas de système réponse SOS, utiliserait à la place son régulon de compétence en réponse à des dommages ADN (Claverys et al., 2006; Prudhomme et al., 2006).

B. Détournement de la réponse SOS

1. Acquisition et expression de gènes de résistance aux antibiotiques

Le régulon de la réponse SOS comprend trois ADN polymérases (II, IV, V) capable de répliquer de l'ADN lésé par un mécanisme appelé synthèse translésionnelle (TLS : translesion synthesis) (Fuchs, 2016; Fuchs and Fujii, 2013; Goodman and Woodgate, 2013; Henrikus et al., 2018). Ces ADN polymérases TLS augmentent le taux de mutation chromosomique ; particulièrement la IV et V dû à l'absence d'activité « proof-reading » de celles-ci (Henrikus et al., 2018; Napolitano et al., 2000; Yeiser et al., 2002). D'autre part, plusieurs études ont mis en évidence l'induction de la réponse SOS par certains antibiotiques (CF partie facteurs d'induction de la réponse SOS). Partant de ces observations, Crane et *al.* ont montré *in vivo* en modèle rabique que les traitements antibiotiques induisant la réponse SOS (ciprofloxacine et zidoduvine) augmentent la fréquence d'obtention de souches *E.coli* EPEC résistantes à la rifampine, la minocycline et la fosfomycine (Crane et al., 2021). Les résistances aux quinolones et fluoroquinolones, connues pour activer la réponse SOS, peuvent être acquises par mutations chromosomiques des gènes de la gyrase et de la topoïsomérase IV (Heisig, 1996; Piddock et al., 1991) mais également au niveau des gènes de certaines pompes d'efflux ou de leurs régulateurs (Alekshun and Levy, 1997; Jacoby, 2005; Wang et al., 2001). Les résistances aux quinolones et fluoroquinolones peuvent être également dues à l'acquisition de gènes (souvent plasmidiques) tels que les gènes *qnr* protégeant la gyrase ou les pompes d'efflux *qepA* et *oqxAB* (Hansen et al., 2004; Périchon et al., 2007). Parmi les gènes *qnr*, l'expression des gènes *qnrB2*, *qnrB1* et *qnrD* est directement régulée par la réponse SOS via la présence d'un site de fixation de la protéine LexA dans leurs régions promotrices (Briales et al., 2012a; Da Re et al., 2009). La réponse SOS est également impliquée dans la régulation de l'expression du gène de l'intégrase (*intI1*) des intégrons de classe 1 via la présence d'un site de fixation de la protéine LexA dans la région promotrice du gène (Guerin et al., 2009). Les intégrons mobiles dont font partie les intégrons de classe 1, portent et expriment en grande majorité des cassettes de gènes de résistance aux antibiotiques (Escudero et al., 2014; Gillings, 2014). L'induction de la réponse SOS entrainant l'expression de *intI1* permet un réarrangement et/ou acquisition de cassettes de gènes de résistance par l'intégron (Guerin et al., 2009).

2. Régulation des systèmes toxine antitoxine et de la production des colicines

a. Régulation des systèmes toxine antitoxine

L'expression des systèmes TA, bien que s'autorégulant principalement, ont été décrit en grande majorité activable par des stress via la réponse SOS ou la réponse stringente. La réponse stringente est une réponse à des stress nutritifs médiée par l'alarmone (p)ppGpp (guanosine penta-/tétra-phosphate) (pour revue (Irving et al., 2021)). L'accumulation de (p)ppGpp produite par les protéines SpoT et RelA (et protéines homologues) va entrainer une réorientation transcriptionnelle majeure favorisant principalement l'expression des gènes de réponse aux stress, de production/recyclage d'acides aminés mais également d'inhibition de la réplication et de la synthèse de la paroi (Irving et al., 2021). En plus d'impacter son propre régulon, la réponse stringente active également la réponse SOS entrainant l'expression des gènes du régulon SOS (Durfee et al., 2008; Strugeon et al., 2016). L'action de certaines toxines, provoquant des stress ou directement des lésions à l'ADN, active également la réponse SOS (Guo et al., 2014). Plusieurs études ont mis en évidence une régulation directe de l'expression de systèmes TA plasmidiques ou chromosomiques par la réponse SOS (Christensen-Dalsgaard et al., 2010; Dörr et al., 2010; Kawano et al., 2007; Ronneau and Helaine, 2019). Un système TA de type II (homologue au système *higBA*) régulé par la réponse SOS est associé aux plasmides IncC (Qi et al., 2021). Chez *E. coli*, certains systèmes TA chromosomiques de type I (*tisB/istR1, dinQ/agrB, symE/symR*) et de type II (dinJ/yafQ et yafNO) sont régulés par la réponse SOS (Dörr et al., 2010; Kawano et al., 2007; Prysak et al., 2009; Singletary et al., 2009; Vogel et al., 2004; Weel-Sneve et al., 2013). Il a été proposé que ces systèmes TA chromosomiques régulés par la réponse SOS joueraient un rôle dans l'entrée des cellules bactériennes en dormance et donc dans la formation de cellules persistantes. En effet, l'induction de l'expression du système TA *tisB/istR1* (aussi nommé *tisAB/itsR*) via l'activation de la réponse SOS entraine la formation de cellules persistantes tolérantes à de multiples antibiotiques (Dörr et al., 2010; Gurnev et al., 2012; H. Wagner and Unoson, 2012). Cependant, des travaux récents remettent en question les conclusions sur l'entrée en dormance des bactéries via l'induction des systèmes TA chromosomiques par des stress (LeRoux et al., 2020). Ils ont mis en évidence chez *E. coli* que l'induction transcriptionnelle de plusieurs systèmes TA chromosomiques via différents stress ne permet pas pour autant d'observer une augmentation de l'activité des toxines (LeRoux et al., 2020).

b. Régulation de la production des colicines

Les colicines sont des bactériocines identifiées chez *E. coli* principalement encodées par des plasmides colicinogéniques : pCol, dont le plus célèbre est probablement pColE1 (pour revue

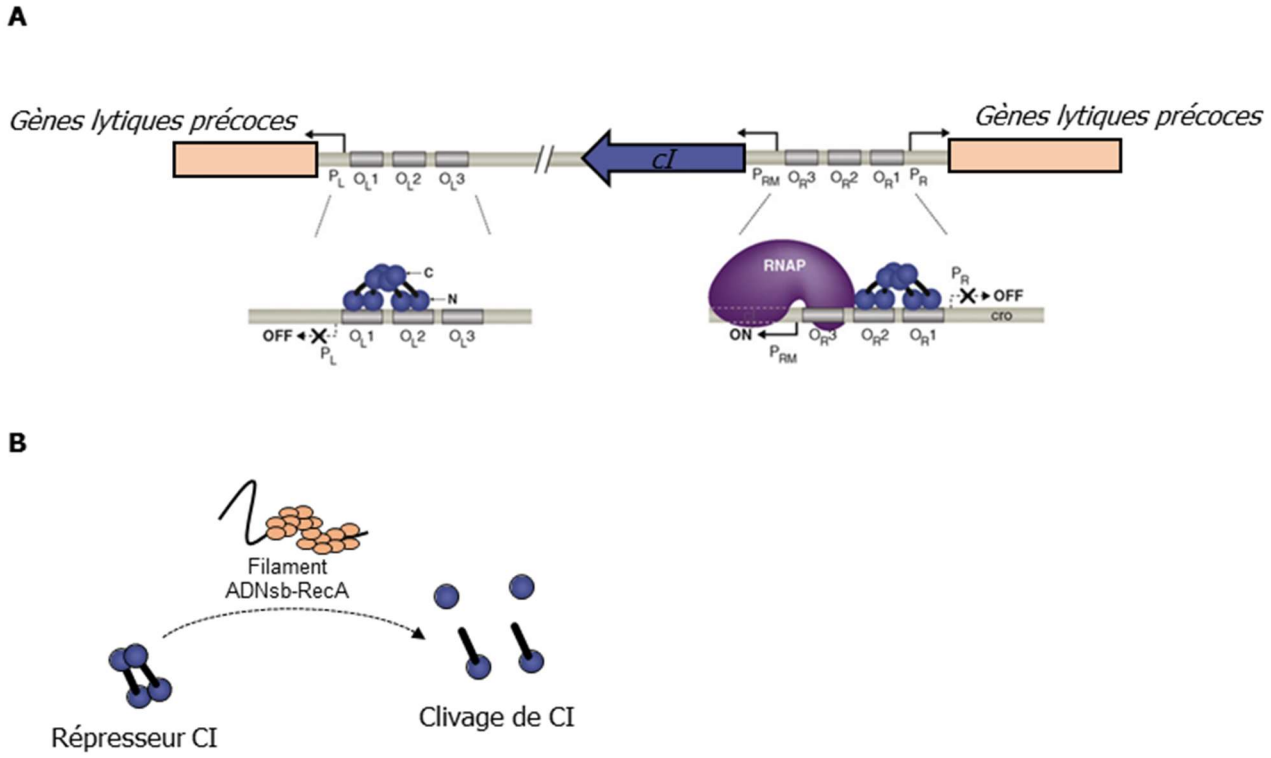


Figure 42 : Répression transcriptionnelle par CI des gènes lytiques du phage λ.
A) Répression des gènes lytiques précoces du phage λ au niveau des promoteurs P_L et P_R. Le CDS du répresseur *cI* est représenté par une flèche violette et les CDS des gènes lytiques précoces sont représentés par un rectangle beige. Les sites opérateurs de CI sont représentés par des rectangles gris. Les deux sphères bleues de la protéine CI correspondent aux domaines N-terminal et C-terminal du répresseur. Les répresseurs CI se fixent au niveau des opérateurs O_L1 et O_L2 du promoteur P_L et des opérateurs O_R1 et O_R2 du promoteur PR réprimant l'expression des gènes lytiques précoces. Le promoteur P_{RM} permet la transcription du répresseur *cI.* En condition de concentration élevée en répresseurs CI, ces derniers se fixent sur les opérateurs O_L3 et O_R3 réprimant partiellement l'expression de *cI* à partir du promoteur P_{RM}. **B)** L'auto-protéolyse de CI est induite par la formation de filaments RecA-ADNsb. Le clivage des répresseurs CI permet l'expression des gènes lytiques précoces via la levée de la répression des promoteurs P_L et P_R.
Adapté de (Hochschild and Lewis, 2009).

(Cascales et al., 2007)). Des homologues aux colicines sont retrouvés chez différentes espèces bactériennes et nommés selon l'espèce associée : pyocines (*Pseudomonas pyogenes*), cloacines (*Enterobacter cloacae*), pesticines (*Yersinia pestis*), klebicines ou klebocines (*Klebsiella*), lumicines (*Photorhabdus luminescens*) et megacines (*Bacillus megaterium*) (Cascales et al., 2007). Les bactéries productrices de colicines sont protégées de leurs actions toxiques par l'expression constante de protéines spécifiques appelées protéines immunitaires (Cascales et al., 2007). Les colicines vont être produites et accumulées dans les bactéries puis relarguées dans le milieu extracellulaire par la lyse des bactéries productrices. Une fois relarguées, les bactériocines vont entrainer la mort des bactéries sensibles non-productrices apportant un avantage aux populations productrices en compétition au sein de communautés naturelles (Majeed et al., 2011). La réponse SOS régule l'expression des colicines via la présence de deux boites de fixation de LexA dans les promoteurs des colicines (Cascales et al., 2007; Ebina et al., 1982; Gillor et al., 2008; Lloubes et al., 1991). En plus de la régulation par LexA, la production et le relargage des colicines sont régulés par d'autres signaux environnementaux, répresseurs ou activateurs transcriptionnels (Cavard, 1995, 1997, 2002; Ebina and Nakazawa, 1983; Eraso and Weinstock, 1992; Eraso et al., 1996; Götz et al., 2018; Kuhar and Žgur-Bertok, 1999; Pugsley, 1984; Weiß et al., 2020).

3. Détournement de la réponse SOS par des EGM

a. Passage de cycle lysogène à lytique de phages

Le passage des cycles lysogènes (phage intégré au chromosome) aux cycles lytiques (production de nouveaux phages pouvant entrainer la lyse des cellules) de plusieurs familles de phages est régulé par la réponse SOS. Le répresseur transcriptionnel CI du phage λ contrôle le cycle lysogène par la répression de l'expression de gènes lytiques précoces (figure 42) (Hochschild and Lewis, 2009). Le répresseur CI est un homologue de LexA présentant une haute conservation du domaine C-terminal (Luo et al., 2001). A l'instar de LexA, en condition d'activation de la réponse SOS, les filaments d'ADNsb-RecA entrainent l'auto-protéolyse du répresseur CI (Bell et al., 2000; Roberts and Roberts, 1975; Roberts et al., 1978). La dégradation du répresseur CI va entrainer l'expression des gènes du phage λ et son passage en phase lytique (Hochschild and Lewis, 2009; Little, 1984). D'autres phages vont directement être sous le contrôle transcriptionnel de LexA pour passer du cycle lysogène à lytique. Le coliphage 186 et le phage de *Salmonella* SPC32H encodent une protéine anti-répresseur dont l'expression est directement sous le contrôle de LexA permettant de contrecarrer l'activité de leur propre répresseur transcriptionnel empêchant l'expression des gènes de la phase lytique (Kim and Ryu, 2013; Mardanov and Ravin, 2007; Shearwin et al., 1998). Le phage CTXΦ de *V. cholerae* encode un

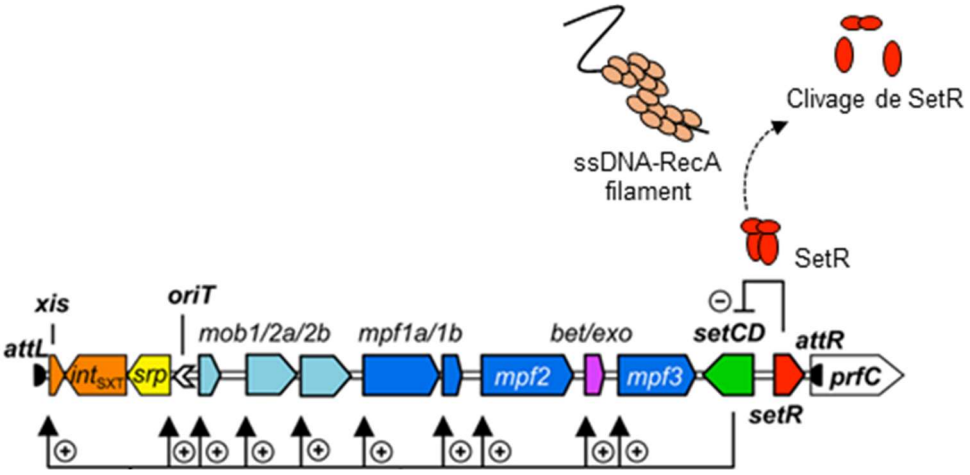


Figure 43 : Régulation transcriptionnelle des gènes de SXT via l'induction de dommages à l'ADN.
Les régions impliquées dans le transfert conjugatif sont indiquées en bleu : bleu clair pour les modules impliqués dans le traitement de l'ADN (*mob*) et en bleu foncé pour ceux impliqués dans la formation du système de sécrétion de type IV (*mpf*). Les gènes de l'intégrase (int_{SXT}) et de l'excisionase (*xis*) sont indiqués en orange. Le système de partition de type II *sprMRC* est indiqué en jaune. Les régulations transcriptionnelles sont représentées par des flèches associées aux signes (+) pour une activation et (–) pour une répression. Les activateurs transcriptionnels *setCD* sont indiqués en vert et le répresseur transcriptionnel *setR* en rouge. La formation de filaments RecA-ADN simple brin (notamment via des dommages à l'ADN) entraine le clivage du répresseur SetR permettant l'expression des gènes *setCD*. SetCD étant des activateurs transcriptionnels, leurs expressions conduisent à l'expression des gènes de SXT impliqués dans ses fonctions d'excision/intégration et de transfert conjugatif.
Adapté de (Poulin-Laprade et al., 2015a).

répresseur transcriptionnel RstR des gènes impliqués dans la phase lytique dont l'expression est directement régulée par LexA (Kimsey and Waldor, 2009; Quinones et al., 2005). Contrairement aux gènes du régulon SOS, la fixation conjointe de LexA et de RstR dans la région promotrice de RstR est nécessaire à l'expression de RstR (Kimsey and Waldor, 2009). Lorsque la réponse SOS est activée, LexA libère son site de fixation dans la région promotrice de RstR, ne permettant plus son expression et conduisant au passage du phage en phase lytique (Kimsey and Waldor, 2009). Enfin, le passage du cycle lysogène au cycle lytique du phage GIL01 est directement régulé par la protéine LexA (Fornelos et al., 2011). Le phage GIL01 infecte des *Bacillus* et est présent dans les cellules sous forme d'ADN linéaire non intégré au chromosome en phase lysogène (Verheust et al., 2003). Les promoteurs en tandem P1 et P2 de GIL01 régulent l'expression de gènes (ORF1 à 8) impliqués dans l'immunité et la réplication alors que le promoteur P3 régule l'expression des gènes impliqués dans la phase lytique (Fornelos et al., 2011). Le promoteur P1 est régulé par LexA via la présence de deux boites de fixation de LexA dont une ne contenant que la moitié d'un site LexA (Fornelos et al., 2011, 2015). Parmi les gènes régulés par le promoteur P1, le gène *gp7* (ORF7) encode une petite protéine (<90 acides aminés) interagissant directement avec LexA augmentant son activité de fixation à l'ADN et inhibant son auto-protéolyse (Fornelos et al., 2015). Gp7 est nécessaire à la fixation *in vitro* de LexA sur la boite incomplète dans le promoteur P1 (Fornelos et al., 2015). Gp7 impacte également l'expression des promoteurs de gènes appartenant au régulon SOS (*lexA* et *recA*) et semble retarder ou diminuer l'activation de la réponse SOS au niveau cellulaire (Fornelos et al., 2015).

b. Famille d'ICE SXT/R391

Les fonctions biologiques principales de l'ICE SXT sont régulées par les activateurs transcriptionnels SetCD homologues aux activateurs AcaDC des plasmides IncC (figure 43) (Poulin-Laprade et al., 2015a, 2015b). L'expression de l'opéron *setCD* est réprimée par le répresseur transcriptionnel SetR, homologue du répresseur LexA et du répresseur CI du phage lambda (Beaber and Waldor, 2004; Poulin-Laprade et al., 2015a). La première étape d'activation de la réponse SOS via la formation de complexes RecA-ADNsb inactive SetR par auto-protéolyse (Beaber et al., 2004; Poulin-Laprade and Burrus, 2015). La levée de la répression de l'expression de *setCD* permet l'excision, le transfert conjugatif et l'intégration dans la cellule receveuse de SXT (Beaber and Waldor, 2004; Beaber et al., 2004; Poulin-Laprade and Burrus, 2015). En effet, SetCD active l'expression de l'excisionase *xis* et des gènes de conjugaison de SXT permettant l'excision et le transfert conjugatif de l'ICE (Burrus and Waldor, 2003; Poulin-Laprade et al., 2015b). L'intégrase *int* de SXT fait partie d'un opéron avec le système de partition *sprMRC* régulé par l'activateur transcriptionnel SetCD (Carraro et al., 2015). Les expressions de *setCD* et *int* dans la cellule receveuse sont nécessaires à l'intégration de l'ICE

(Poulin-Laprade et al., 2015b). L'activation de la réponse SOS dans la cellule receveuse par l'entrée conjugative de SXT permettrait d'inhiber la répression transcriptionnelle de *setR* permettant l'expression des gènes *setCD* et *int* (Poulin-Laprade et al., 2015b). De plus la famille d'ICE SXT/R391 présente un phénotype de sensibilité cellulaire après irradiation aux UV correspondant à une forte diminution du taux de survie des bactéries (Armshaw and Pembroke, 2013b, 2013a; Pembroke and Stevens, 1984). Les études réalisées avec l'ICE R391 ont montré l'implication du gène *orf43* (homologue à *traV*) dont l'expression est régulée par les régulateurs transcriptionnels *orfs90/91* (homologues à *setCD*) (Armshaw and Pembroke, 2013b, 2013a). Les délétions du gène *orf43* ou des régulateurs transcriptionnels *orfs90/91* nécessaires à l'expression de *orf43* sont suffisantes pour retrouver un taux de survie après irradiation aux UV similaire à la souche n'hébergeant pas R391 (Armshaw and Pembroke, 2013a). L'expression des régulateurs transcriptionnels *orfs90/91* est régulée par le répresseur Orf96 (homologue à SetR et CI) dont l'activation de la réponse SOS entraine l'autoprotéolyse et permet de lever sa répression (Armshaw and Pembroke, 2013b). Orf43/TraV est une protéine essentielle à la fonctionnalité de la machinerie de conjugaison de R391 et prédite par homologie comme localisée au niveau de la membrane externe des bactéries (Armshaw and Pembroke, 2013a). La surexpression *orf43* (*traV*) entraine la mort des cellules par perméabilisation de la membrane (Armshaw and Pembroke, 2015). L'effet cytotoxique de l'expression de *orf43* (*traV*) concomitante avec l'excision et la circularisation de l'ICE par l'induction de la réponse SOS a été proposé comme un mécanisme de survie de l'EGM (Ryan et al., 2016). En effet, chez des mutants de R391 déficients du transfert conjugatif l'expression de *orf43* (*traV*) permet de restaurer partiellement le taux de transfert de l'EGM (Armshaw and Pembroke, 2015).

Etude expérimentale

I. Problématique et objectifs de travail

Les variants de SGI1 et éléments apparentés disséminent mondialement des gènes de résistance aux antibiotiques parmi des pathogènes humains et animaux posant un problème majeur de santé publique. Mieux comprendre les mécanismes moléculaires permettant le transfert et le maintien de SGI1 permettrait d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de limiter sa diffusion au sein de pathogènes bactériens. Depuis le commencement de mes travaux de thèse en 2018, de nombreuses études ont permis d'approfondir les connaissances sur la biologie de SGI1 et ses interactions avec les plasmides IncC. L'origine de transfert de SGI1 (*oriT*) a été caractérisée ainsi que l'implication des protéines MpsA et MpsB dans le transfert conjugatif de SGI1 (Kiss et al., 2019). La réplication de la forme circulaire de SGI1 à 6-12 copies par chromosome a été mise en évidence en présence des plasmides IncC par deux études différentes (Huguet et al., 2020; Szabó et al., 2021). Cette réplication est dépendante de la présence des régulateurs transcriptionnels SgaDC de SGI1 et AcaDC des plasmides IncC (Durand et al., 2021a; Huguet et al., 2020; Szabó et al., 2021). En plus des régulateurs transcriptionnels, la réplication de SGI1 necessite les protéines Int, Xis et Rep de SGI1 ainsi que la région de l'origine de réplication $oriV_{SGI1}$ au niveau de laquelle se fixent les protéines Rep de SGI1 et DnaA encodée par le chromosome (Huguet et al., 2020; Szabó et al., 2021). L'implication de la réplication de la forme circulaire de SGI1 a été démontrée dans les phénomènes d'imcompatibilité observés entre SGI1 et les plasmides IncC (Huguet et al., 2020). Même si les activateurs transcriptionnels SgaDC et AcaDC sont des homologues fonctionnels activant l'expression des mêmes gènes sur SGI1 et sur les plasmides IncC (régulon SgaDC/AcaDC), il semblerait que les régulateurs SgaDC (et non pas AcaDC) jouent un rôle crucial dans l'excision et la réplication de SGI1 mais également dans la déstabilisation des plasmides IncC (Durand et al., 2021a). Bien que les connaissances sur les mécanismes moléculaires entre SGI1 et les plasmides IncC se soient considérablement enrichies ces dernières années, des zones d'ombre persistent notamment au niveau de l'interaction fine entre SGI1 et les plasmides IncC ou sur la chronologie d'induction et d'expression des gènes des différents éléments.

Des travaux préliminaires avaient permis l'identification de sites potentiels de fixation de la protéine LexA au niveau des régions promotrices du système TA de SGI1 (*sgiAT*) et des régulateurs transcriptionnels *sgaDC*. Par la suite, l'utilisation de l'outil de recherche de séquences de régulation RSAT matrix-scan (http://embnet.ccg.unam.mx/rsat/matrix-scan_form.cgi) (Turatsinze et al., 2008) sur la séquence complète de SGI1 a permis de rechercher des sites homologues aux sites de fixation de la protéine LexA issus de la base de données RegulonDB (Santos-Zavaleta et al., 2019). Cette analyse a révélé la présence ~80 sites potentiels de fixation de LexA sur SGI1. Cette analyse utilisant

Tableau 5 : Localisation et séquences des sites potentiels de fixation de la protéine LexA sur SGI1.
L'outil d'analyse de séquence de régulation RSAT-matrix-scan attribut un poids (Weight) aux sites identifiés : plus une valeur positive est élevée et plus la séquence identifiée est similaire au site recherché. Une *P*-value est associée au poids de chaque site identifié. La localisation des sites sur la séquence de SGI1 (AF261825.2) sont indiquées. Les gènes ou ORF proches des sites potentiels de fixation de LexA ainsi que leurs distances du codon Start sont indiqués.

Séquence	Weight	*P*-value	Localisation sur AF261825.2	Gènes/ORF proches	Distance Start
TACTGTAAAAAAACACAGTA	15.8	8.2e-09	7946-7927	S008-*sgaDC*	-77
GACTGTACAAAAAAACAGTC	12.7	3.5e-07	27882-27863	*intI1*	-10
TGCTGGAGCAAACAACAGTA	8.6	1.5e-05	12632-12613	*traH*	+788
CACTGTTCCGATCACCAGTG	5.7	1.2e-04	17125-17106	*mpsA*/*mpsB*	+587/-362
TCCTGCCTCTACGGCCAGCG	4.4	2.8e-04	19311-19292	S023	+1017
TGCTGGCGAACATGCCAGGA	3.9	3.8e-04	20422-20403	S024/S023	+1849/-74
GTCTGTGTAGTATGACAGGG	3.8	4.0e-04	25952-25971	*sgiAT*	-49

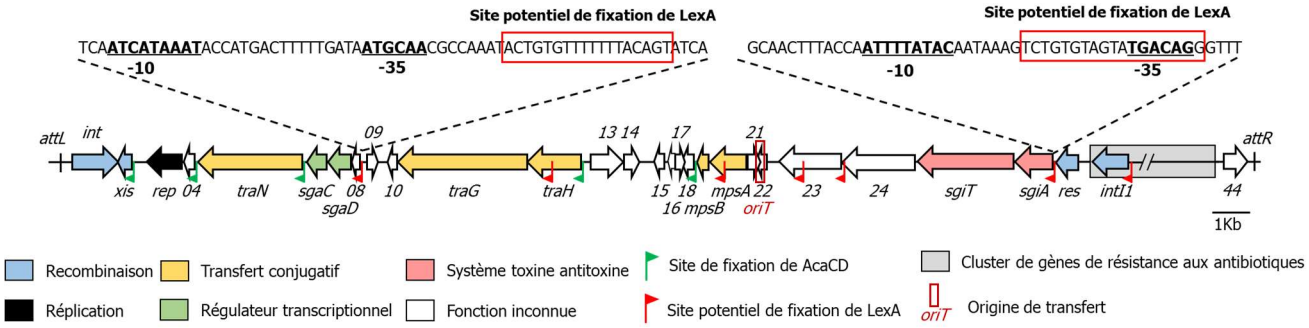


Figure 44 : Localisation des potentiels sites de fixation de la protéine LexA sur SGI1.
Les sites potentiels de fixation de la protéine LexA au niveau du backbone de SGI1 sont représentés par un drapeau rouge.

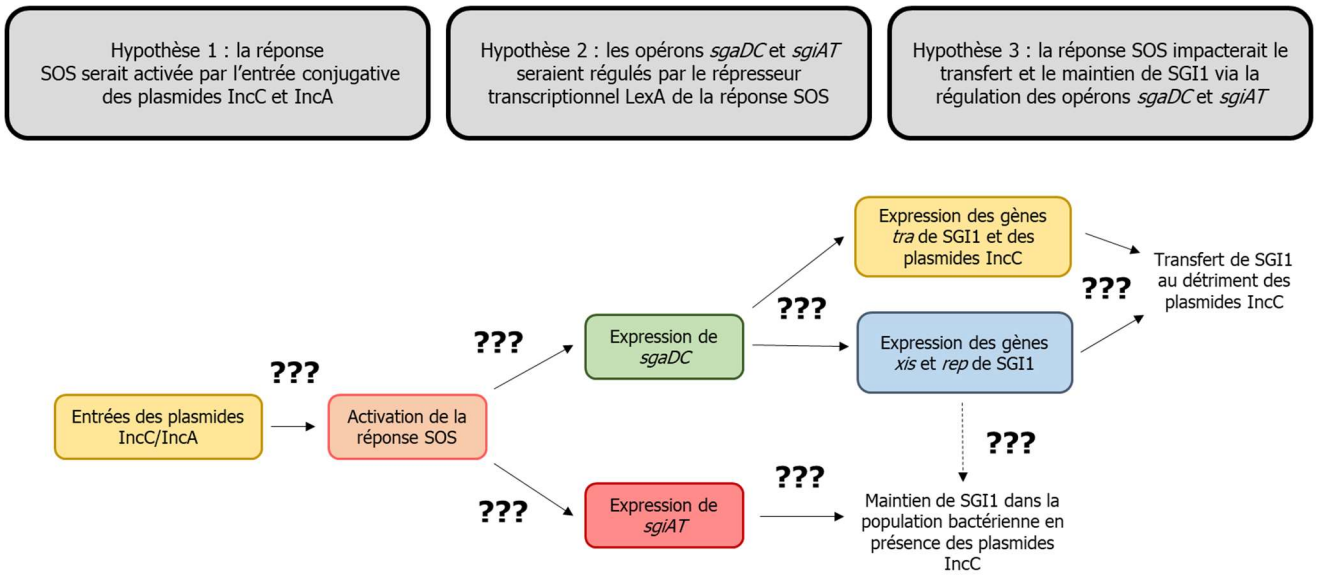


Figure 45 : Hypothèses du rôle de la réponse SOS sur le transfert et le maintien de SGI1.

uniquement l'homologie des séquences a dû être affinée manuellement afin d'exclure les sites en doublon (sur les brins codants et non codants) et ne présentant pas l'organisation CTG-10N-CAG. Les motifs CTG et CAG distants de 10 nucléotides sont essentiels pour la fixation de LexA car la mutation d'un de ces deux motifs abolit la fixation de la protéine LexA (Da Re et al., 2009). Au final subsistent 6 sites potentiels de fixation de la protéine LexA dans le backbone de SGI1 (tableau 5 et figure 44) : 3 sites sont dans les séquences codantes de gènes (*traH*, *mpsA*, S023), 1 site dans la région terminale d'un gène (S024) et 2 sites dans des régions promotrices d'opérons (S008-*sgaDC* et *sgiAT*). En plus de ces sites dans le backbone, l'analyse a également identifié le site de fixation LexA déjà caractérisé dans les promoteurs des intégrases *intI1* (Guerin et al., 2009). Plusieurs études ont mis en évidence le détournement de la réponse SOS par différents éléments génétiques mobiles dans la régulation de fonctions biologiques dont le transfert conjugatif (cf partie Introduction IV.B.3. Détournement de la réponse SOS par les EGM). De plus, l'activation de la réponse SOS par l'entrée conjugative de plasmides sous forme d'ADN simple brin a été démontrée pour plusieurs familles de plasmides mais les plasmides IncC et IncA n'ont pas été utilisés lors de cette étude (Baharoglu et al., 2010).

Partant de ces observations, nous nous sommes demandés si la réponse SOS ne pourrait pas être un élément clef dans l'interaction entre SGI1 et les plasmides IncC, en particulier au niveau de la régulation transcriptionnelle de *sgaDC* et *sgiAT*. Les 3 hypothèses initiales de ce travail sont synthétisées en figure 45 et les questions biologiques sont détaillées ci-après. Est-ce que l'entrée conjugative des plasmides IncC (ou IncA) dans les bactéries pourrait activer la réponse SOS ? Est-ce que les sites potentiels de fixation de LexA dans les régions promotrices de *sgaDC* et *sgiAT* sont fonctionnels ? Si oui, dans le cas de bactéries hébergeant SGI1, est ce que l'activation de la réponse SOS par l'entrée des plasmides IncC permettrait de lever l'ihibition transcriptionnelle de LexA sur les régions promotrices de *sgaDC* et *sgiAT* et conduirait à l'augmentation de la transcription de ces opérons ? Est-ce que l'augmentation de l'expression de *sgaDC* via l'activation de la réponse SOS permettrait l'expression des gènes du régulon SgaDC/AcaDC sur SGI1 et sur le plasmide IncC et impacterait le détournement de la machinerie de conjugaison des plasmides IncC en faveur du transfert de SGI1 ? Et en parallèle, est-ce que l'expression de *sgiAT* via l'induction de la réponse SOS pourrait assurer le maintien de SGI1 dans la population bactérienne en contexte d'incompatibilité avec les plasmides IncC nouvellement entrés dans les cellules ?

Ces travaux de thèse avaient pour objectifs de confirmer ou infirmer ces hypothèses via les différentes approches expérimentales succintement présentées ci-après. Dans un premier temps, l'utilisation d'un système rapporteur d'activité β-galactosidase basé sur la méthodologie expérimentale de Baharoglu *et*

al. a permis de quantifier l'activation de la réponse SOS dans les transconjugants suite à l'entrée conjugative de plasmides IncC et IncA. Par la suite, la combinaison de différentes approches a permis de caractériser la régulation des opérons *sgaDC* et *sgiAT* par la réponse SOS. Les activités des régions promotrices de *sgaDC* et *sgiAT* ont été quantifiées via l'utilisation d'un système rapporteur d'activité β-galactosidase dans différentes conditions (induction ou non de la réponse SOS) et dans différents fonds génétiques (souches de *Salmonella enterica* de terrain, souches d'*E. coli* de laboratoire sauvages et mutées *lexA*). La fixation *in vitro* de LexA sur ses sites potentiels de fixation dans les régions promotrices de *sgaDC* et *sgiAT* a été testée par la technique de retard sur gel (ou EMSA : electrophoretic mobility shift assay). L'impact de la réponse SOS sur la transcription de *sgiAT*, *sgaDC* et des gènes du régulon SgaDC sur SGI1 a été déterminé par RT-qPCR dans différents fonds génétiques. Enfin, le développent d'une méthode originale de conjugaison tripartite a permis de caractériser la chronologie des transferts conjugatifs des plasmides IncC et de SGI1 mais également de l'implication de la réponse SOS dans le détournement du système de conjugaison des plasmides IncC en faveur du transfert de SGI1.

II. Matériels et méthodes

A. Procédures générales

1. Bactériologie générale

Les souches bactériennes utilisées durant ces travaux de thèse sont présentées en tableau 6 et les plasmides utilisés en tableau 7. Les cultures bactériennes ont été faites classiquement en milieu liquide LB (lysogeny broth) sous agitation (180 rpm) à 37°C ou 30°C. L'isolement ou la sélection des souches bactériennes ont été réalisés sur milieu LB ou SS (*Salmonella-Shigella*) gélosés mis en culture statique à 37°C ou 30°C. Le milieu SS a été utilisé dans le cas de certaines conjugaisons entre *E. coli* et *Salmonella* car il permet de différencier les *E. coli* (colonies rouges) des *Salmonella* (colonies blanches à centre noir). Selon les expériences, une sélection par antibiotiques a été utilisée dans ces milieux de culture liquides et solides. Les antibiotiques ont été utilisés aux concentrations suivantes : ampicilline 100 µg/mL, chloramphénicol 30 µg/mL, kanamycine 50 µg/mL, streptomycine 50 µg/mL, tétracycline 10 µg/mL, rifampicine 250 µg/mL et gentamicine 20 µg/mL. L'induction des gènes du plasmide pKD46 nécessaire à la mutagenèse dirigée par recombinaison homologue de Datsenko et Wanner a nécessité une culture liquide à 30°C en LB en présence de 1 mM de L-arabinose.

Les transformations de plasmides, de produits de ligation ou de produits PCR (méthode Datsenko et Wanner) dans les souches bactériennes ont été faites dans des cellules rendues électro-compétentes ou chimio-compétentes (RbCl). Pour ces deux méthodes de transformation, après le choc électrique ou thermique, les cellules ont été reprises dans du milieu SOC (tryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 10 mM, $MgCl_2$ 2,5 mM, $MgSO_4$ 10 mM, glucose 20 mM).

Toutes les souches utilisées et/ou construites durant cette thèse sont conservées dans notre laboratoire à -80°C en milieu de culture glycérolé à 20%.

2. Biologie moléculaire et analyses bioinformatiques

a. Amplification d'ADN par PCR

Les amplifications d'ADN ont été faites par PCR en utilisant la GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) ou la Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs) avec les amorces présentées dans le tableau 8 suivant les recommandations des fournisseurs respectifs. Le programme de la GoTaq est le suivant : une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min suivie de 30 cycles (ou 35 cycles pour les PCR à partir de colonies bactériennes) identiques comprenant une dénaturation à 95°C pendant 1 minute, une hybridation des amorces à température variable (Tm_{amorce} – 4°C) durant 1 minute et une élongation à 72°C variable (1 minute par Kb) puis pour finir une élongation finale de 7 minutes

Tableau 6 : Souches utilisées dans cette étude.

Souches	Génotypes pertinants, profiles de résistance[a] ou caractéristiques	Références ou sources
S. enterica		
Agona 47SA97	SGI1-C; Str, Sul	(Boyd et al., 2002)
Agona 959SA97ΔSGI1	Dérivé de 959SA97, curée de SGI1; Amp, Str	(Huguet et al., 2016)
Agona 47SA97 SGI1-CΔ*sgaDC*	SGI1-CΔ*sgaDC*::*kan*; Kan, Str, Sul	Ce travail
Kentucky ST198 11-0799	SGI1^{-}; Nal, Cip	Ce travail
Kentucky ST198 11-0799-SGI1-C	SGI1-C; Nal, Cip, Str, Sul	Ce travail
E. coli		
MG1655	Souche de laboratoire K-12	Laboratoire de Van Melderen
MG1655 *lexA3*	MG1655 *lexA3 molB*::Tn*9*, SOS^{OFF}; Chl	Laboratoire de Van Melderen
MG1655 *lexA51*	MG1655 *lexA51 molB*::Tn*9 ΔsulA*, SOS^{ON}; Chl	Laboratoire de Van Melderen
TOP10	F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 nupG recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL*(Str^{R}) *endA1* λ-	Invitrogen
J5-3	Dérivée de K-12 *pro met*, sans plasmide ; Rif	Institut Pasteur
Stellar	F-, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA1*, *relA1*, *gyrA96*, *phoA*, *Φ80dlacZΔ*M15, Δ(*lacZYA-argF*) U169, Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*), *ΔmcrA*, λ-	Takara
BL21(DE3) pLysS	F– *ompT gal dcm lon hsdSB*(rB–mB–) λ(DE3 [*lacI lacUV5*-T7p07 *ind1 sam7 nin5*]) [*malB*+]K-12(λS) ; gène de l' ARN polymerase T7 sous contrôle du promoteur *lac* UV5 et hébergeant le plasmide pLysS	Invitrogen
MG1655 SGI1-C	Dérivée de MG1655 hébergeant SGI1-C de 47SA97; Str, Sul	Ce travail
MG1655 *lexA3* SGI1-C	Dérivée de MG1655 *lexA3* hébergeant SGI1-C de 47SA97; Chl, Str, Sul	Ce travail
MG1655 *lexA51* SGI1-C	Dérivée de MG1655 *lexA51* hébergeant SGI1-C de 47SA97; Chl, Str, Sul	Ce travail
MG1655 SGI1-C*ΔsgaDC*	Dérivée de MG1655 hébergeant SGI1-CΔ*sgaDC*::*kan*; Kan, Str, Sul	Ce travail

[a] abbréviations des antibiotiques: Amp, ampicilline; Chl, chloramphenicol; Kan, kanamycine;Str, streptomycine; Sul, sulphamides; Nal, acide nalidixique; Cip, ciprofloxacine; Rif, rifampicine

à 72°C. Le programme de la Phusion est le suivant : une dénaturation initiale à 98°C pendant 30 secondes suivie de 30 cycles identiques comprenant une dénaturation à 98°C pendant 10 secondes, une hybridation des amorces à température variable (calculé en fonction du Tm des amorces avec l'outil web Tm Calculator du fournisseur https://tmcalculator.neb.com/) durant 30 secondes et une élongation à 72°C variable (30 secondes par Kb) puis pour finir une élongation finale de 10 minutes à 72°C. La Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase a été utilisée pour les amplifications PCR nécessitant une haute fidélité (principalement pour le clonage, la mutagénèse dirigée ou le séquençage). Les produits PCR de vérification de toutes les constructions de vecteurs ou de mutations sur les souches bactériennes ont été séquencés par l'entreprise Genewiz. La GoTaq® Flexi DNA Polymerase a été utilisée pour les vérifications de routine des tailles de fragments PCR ou de présence/absence d'amplification.

b. Extraction, purification, digestion, ligation d'ADN

Les extractions et purifications de plasmides ont été faites avec les kits NucleoSpin® Plasmid et NucleoBond® Xtra Midi de Macherey-Nagel en suivant les conditions recommandées par le fournisseur. Les purifications de produits PCR et les purifications d'ADN sur gel d'agarose 0,8% ont été faites respectivement avec le kit QIAquick PCR Purification et QIAquick Gel Extraction de Qiagen en suivant les conditions recommandées par le fournisseur. Les extractions d'ADN totaux ont été réalisées avec le kit NucleoSpin Tissue Mini kit (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Les extractions d'ARN ont été réalisées avec le kit Direct-zol RNA MiniPrep Plus (Zymo Research) en suivant les conditions recommandées par le fournisseur.

Les visualisations d'ADN (extraction d'ADN ou produits PCR) ont été réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 – 2%) dissout dans du Tris-Acetate-EDTA 0,5X supplémenté par 0,5µg/mL de bromure d'éthidium. La concentration et la pureté des échantillons ADN ou ARN ont été déterminées par spectrophotométrie sur le Nonodrop™ One (Thermo Scientific).

Les digestions de fragments PCR ou de vecteurs de clonage ont été réalisées avec des enzymes de restriction de la gamme HF de New England Biolabs ou avec les enzymes de restriction classiques de Promega selon les recommandations des fournisseurs respectifs. Les ligations ont été réalisées avec la T4 DNA Ligase (New England Biolabs) en suivant les recommandations du fournisseur.

Tableau 7 : Plasmides utilisés dans cette étude.

Plasmides/vecteurs	Caractéristiques pertinants et profiles de résistance[a]	Références ou sources
Plasmides		
R55	IncC plasmid, *tra*$^+$, 170 kb; Amp, Chl, Gen, Kan, Sul	NC_016976
R16a	IncC plasmid, *tra*$^+$, 173 kb; Amp, Kan, Sul	KX156773
RA1	IncA plasmid, *tra*$^+$, 144 kb; Sul, Tet	FJ705807
Rsa	IncW plasmid, *tra*$^+$, 39 kb; Chl, Kan, Str, Sul	Collection du laboratoire
Vecteurs		
pQF50-Amp	Dérivé de pBR322 contenant le gène *lacZ* sans promoteur; Amp	(Farinha and Kropinski, 1990)
pQF50-Chl	Dérivé de pQF50 avec une insertion suplémentaire du gène *cat*; Amp Chl	(Robbe-Saule et al., 1997)
pMP002	Dérivé pQF50-Chl contenant la région promotrice $P_{recN\text{-}Ec}$; Chl	This study
pMP003	Dérivé de pQF50-Chl contenant la région promotrice P_{sgaDC}; Chl	Ce travail
pMP004	Dérivé de pQF50-Chl contenant la région promotrice P_{sgiAT}; Chl	Ce travail
pMP007	Dérivé de pQF50-Chl contenant la région promotrice $P_{recN\text{-}Sal}$; Chl	Ce travail
pMP008	Dérivé de pQF50-Chl contenant la région promotrice P_{acaDC}; Chl	Ce travail
pMP010	Dérivé de pQF50-Amp contenant la région promotrice $P_{recN\text{-}Ec}$; Amp	Ce travail
pMP011	Dérivé de pQF50-Amp contenant la région promotrice P_{sgaDC}; Amp	Ce travail
pMP012	Dérivé de pQF50-Amp contenant la région promotrice P_{sgiAT}; Amp	Ce travail
pMP016	Dérivé de pQF50-Amp contenant la région promotrice P_{acaDC}; Amp	Ce travail
pKD4	Dérivé de pANTSγ, contenant la cassette de résistance à la kanamycine (*kan*) flanquée des sites FRT ; Amp, Kan	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD3	Dérivé de pANTSγ, contenant la cassette de résistance au chloramphénicol (*cat*) flanquée des sites FRT ; Amp, Kan	(Datsenko and Wanner, 2000)
pKD46	Dérivé de pINT-ts, recombinase λ Red sous contrôle du promoteur inductible P*araB* ; Amp	(Datsenko and Wanner, 2000)
pET15b	Dérivé de pBR322 pour l'expression sous contrôle du promoteur inductible P_{araB} de protéines avec un tag His en N-terminal; Amp	Novagen
pUA1170	Dérivé de pET15b portant le CDS de *lexA* d'*E. coli* MG1655 sous contrôle du promoteur T7, Amp	(Da Re et al., 2009)
pET15b-$lexA_{Salmonella}$	Dérivé de pET15b portant le CDS de *lexA* de *Salmonella* Agona 47SA97 sous contrôle du promoteur T7, Amp	Ce travail
pLYS-M1	Origine de réplication p15a; Chl	Addgene #109386 (Ceroni et al., 2018)
pMB-Spect-PthrC3_8-EGFP	Plasmide portant le gène de la EGFP sous contrôle du promoteur PthrC3_8 ; Spt	Addgene #107411 (Anilionyte et al., 2018)
pJL1-mCherry	Plasmide portant le gène de la mCherry ; Kan	Addgene #102629 (Stark et al., 2018)
pJL1-EBFP2	Plasmide portant le gène de la EBFP2 ; Kan	Addgene #102640 (Stark et al., 2018)
pUC18T-miniTn7T-Gm-ECFP	Plasmide portant le gène de la ECFP ; Amp, Gem	Addgene #65030 (Choi and Schweizer, 2006)

Le tableau continue sur la page de gauche suivante

c. Outils bioinformatiques

L'analyse des séquençages de l'entreprise Genewiz a été réalisée par alignement de séquences sur le logiciel Geneious® 10.2.6. Les designs d'amorces pour les diverses réactions de PCR, qPCR et RT-qPCR ont été effectués également avec le logiciel Geneious® 10.2.6 en utilisant les séquences ADN de nos souches bactériennes ou les séquences de plasmides. Les recherches de promoteurs putatifs avec détermination des boites -10 et -35 ont été réalisées à l'aide du programme BPROM (http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb). La recherche des sites potentiels de fixation de la protéine LexA sur la séquence de SGI1 a été réalisée à l'aide de l'outil de recherche de séquences de régulation RSAT-matrix-scan (http://rsat.sb-roscoff.fr/matrix-scan_form.cgi) (Turatsinze et al., 2008). Nous avons utilisé la banque de donnée RegulonDB (Santos-Zavaleta et al., 2019) en choisissant la matrice LexA pour rechercher les sites de fixation potentiels de la protéine LexA sur la séquence de SGI1. Nous avons utilisé tous les réglages automatiques du programme sauf pour la limite de la *P*-Value (nous avons utilisé une limite fixée à 4.10^{-4} au lieu de 1.10^{-4}).

B. Activation de la réponse SOS par l'entrée conjugative de plasmides

L'activation de la réponse SOS après l'entrée conjugative de plasmides dans les cellules receveuses a été déterminée pour les plasmides Rsa (IncW, contrôle positif), R55 (IncC) et RA1 (IncA) en utilisant la méthodologie de Baharoglu *et al.* avec des adaptations mineures (Baharoglu et al., 2010). Lors de nos expériences de conjugaison, la souche d'*E. coli* Top10 (*recA*$^-$ and Δ*lacZ*) portant les plasmides conjugatifs a été utilisée comme bactérie donneuse et la souche d'*E. coli* MG1655 portant les plasmides rapporteurs pMP002 ou pMP010 (permettant l'expression de *lacZ* sous le contrôle du promoteur P_{recN} ; cf Etude expérimentale II.C.1. Activités promotrices) a été utilisée comme bactérie réceptrice. Après pré-culture de nuit à 37°C sous agitation en LB avec les antibiotiques permettant la sélection des plasmides conjugatifs et rapporteurs, les cultures donneuses et receveuses ont été diluées au centième dans 10 mL de LB sans antibiotique et remises en culture à 37°C sous agitation. Lorsque les cultures ont atteint une valeur de $DO_{600\ nm}$ ~0,8, les populations de donneuses et receveuses ont été mélangées à un ratio 1:1 dans un volume final de 2 mL. Le mix de conjugaison a été concentré dans un volume final de 200µL par une centrifugation de 3 min à 765 g. Le mix de conjugaison concentré a été déposé sur un filtre de conjugaison (0,045µm) sur milieu gélosé de LB préchauffé à 37°C et incubé à 37°C. Après le temps de contact voulu, les filtres ont été resupendus dans 1 mL de LB et les dilutions en série de facteur 10 ont été étalées sur milieu LB ou SS gélosé avec les antibiotiques appropriés pour

Constructions pAON		
pAON-EGFP-Kan	Dérivé de pLYS-M1 contenant le gène de la EGFP (pMB-Spect-PthrC3_8-EGFP) sous contrôle du promoteur PthrC3_8 (pMB-Spect-PthrC3_8-EGFP) et du RBS n°13 (Chen et al., 2014) suivit de la cassette de résistance à la kanamycine (*kan*) flanquée des sites FRT de pKD4 ; Chl, Kan	Ce travail
pAON-EGFP-Chl	Dérivé de pAON-EGFP-Kan, remplacement du module FRT-Kan-FRT par le module FRT-Chl-FRT issu de pKD3, Chl	Ce travail
pAON-mCherry-Kan	Dérivé de pAON-EGFP-Kan, remplacement du CDS de la EGFP par le CDS de la mCherry issu de pJL1-mCherry, Chl, Kan	Ce travail
pAON-mCherry-Chl	Dérivé de pAON-mCherry-Kan, remplacement du module FRT-Kan-FRT par le module FRT-Chl-FRT issu de pKD3, Chl	Ce travail
pAON-ECFP-Kan	Dérivé de pAON-EGFP-Kan, remplacement du CDS de la EGFP par le CDS de la ECFP issu de pUC18T-miniTn7T-Gm-ECFP, Chl, Kan	Ce travail
pAON-RBS28-ECFP-Kan	Dérivé de pAON-ECFP-Kan, remplacement du RBS n°13 par le RBS n°28 (Chen et al., 2014), Chl, Kan	Ce travail
pAON-RBS29-ECFP-Kan	Dérivé de pAON-ECFP-Kan, remplacement du RBS n°13 par le RBS n°29 (Chen et al., 2014), Chl, Kan	Ce travail
pAON-P_{gapA}-ECFP-Kan	Dérivé de pAON-ECFP-Kan, remplacement du promoteur PthrC3_8 par le promoteur P_{gapA} d'*E. coli*, Chl, Kan	Ce travail
pAON-EBFP2-Kan	Dérivé de pAON-EGFP-Kan, remplacement du CDS de la EGFP par le CDS de la mCherry issu de pJL1-EBFP2, Chl, Kan	Ce travail
pAON-RBS28-EBFP2-Kan	Dérivé de pAON-EBFP2-Kan, remplacement du RBS n°13 par le RBS n°28 (Chen et al., 2014), Chl, Kan	Ce travail
pAON-RBS29-EBFP2-Kan	Dérivé de pAON-EBFP2-Kan, remplacement du RBS n°13 par le RBS n°28 (Chen et al., 2014), Chl, Kan	Ce travail
pAON- P_{gapA} -EBFP2-Kan	Dérivé de pAON-EBFP2-Kan, remplacement du promoteur PthrC3_8 par le promoteur P_{gapA} d'*E. coli*, Chl, Kan	Ce travail
pAON-*sgaDC*	Dérivé de pAON-EGFP-Kan, remplacement des modules promoteur PthrC3_8 et CDS de EGFP par l'opéron S008-*sgaDC* sous contrôle de sa propre région promotrice	Ce travail

[a] abbréviations des antibiotiques: Amp, ampicilline; Chl, chloramphenicol; Kan, kanamycine; Gen, gentamicine, Str, streptomycine; Spt, spectinomycine ; Sul, sulphamides; Tet, tetracyclines. *tra*+, autonome pour sa conjugaison

sélectionner les transconjugants MG1655 pMP002 ou MG1655 pMP010 ayant acquis les plasmides conjugatifs (Rsa, R55 ou RA1), les donneurs Top10 portant les plasmides conjugatifs (Rsa, R55 ou RA1) et les receveurs MG1655 pMP002 ou MG1655 pMP010. Les fréquences de transfert déterminées pour chaque plasmide conjugatif après les différents temps de contact (1h, 2h et 4h) correspondent aux ratios transconjugants/donneurs.

En parallèle des étalements pour les dénombrements bactériens, l'activité β-galactosidase des mix de conjugaison a été mesurée selon la méthode de Miller (Miller, 1972) en plaque 96 puits. 500 µL des mix de conjugaison resupendus ont été lysés pour la détermination de l'activité β-galactosidase des échantillons. L'activité β-galactosidase a été mesurée en triplicat technique sur deux dilutions de chaque échantillon (dilutions finales de facteurs 12,5 et 25). La première étape de la méthodologie de Baharoglu *et al* est de déterminer l'activité β-galactosidase basale par cellule receveuse. Baharoglu *et al.* ont associé l'activité β-galactosidase des mélanges de conjugaison du temps 0 min (T0h) au dénombrement des bactéries receveuses à T0h pour déterminer l'activité β-galactosidase basale par cellule receveuse. Nous avons modifié la technique en déterminant l'activité β-galactosidase basale par cellule receveuse lors de contacts reproduisant les conditions des expériences de conjugaison entre les souches Top10 sans plasmide conjugatif et les souches MG1655 pMP002 ou MG1655 pMP010 après 1h ou 2h de contact selon la formule suivante :

$$\textit{Activité basale par receveuse à tx} = \frac{\textit{unités β-gal mesurées à tx}}{\textit{nombre de receveuses à tx}}$$

Nous avons par la suite mesuré l'activité β-galactosidase d'échantillons issus d'expériences de conjugaison avec un plasmide conjugatif dans les mêmes conditions. L'activité β-galactosidase spécifique par transconjugant a été obtenue par attribution aux transconjugants de l'activité β-galactosidase restante de l'échantillon après retrait de l'activité basale des receveuses selon la formule suivante :

$$\textit{Activité spécifique par transconjugant à tx} = \frac{\textit{(unités β-gal mesurées à tx) - (activité basale par receveuse à tx X nombre de receveuses à tx)}}{\textit{nombre de transconjugants à tx}}$$

Les ratios d'induction de chaque plasmide correspondent à l'activité β-galactosidase spécifique par transconjugant divisée par l'activité β-galactosidase basale par receveuse aux temps correspondants.

Tableau 8 : Amorces utilisées dans cette étude.

Nom amorce	Sequence 5'-3'[a]	Gène ou region cible	Autres caractéristiques
Promoter activity			
Ec-PrecN-SphI-F	TCATGCATGCAAATCAGTTGCGACAGCCAG	Promoteur P_{recN} d'*E. coli*	Clonage de P_{recN} issu de *E. coli* dans pQF50
Ec-PrecN-HindIII-R	TGTAAAGCTTATGAAAAACCATTACTGTTATTGTGT	Promoteur P_{recN} d'*E. coli*	Clonage de P_{recN} dans pQF50
SGI1-PsgaDC-SphI-F	TCATGCATGCCCAAGAAGTTTGTACGAATAGAAC	Promoteur P_{sgaDC} de SGI1	Clonage de P_{sgaDC} dans pQF50
SGI1-PsgaDC-HindIII-R	TGTAAAGCTTTTTATTCACTGATTAACTTTGTCATCA	Promoteur P_{sgaDC} de SGI1	Clonage de P_{sgaDC} dans pQF50
SGI1-PsgiAT-SphI-F	TCATGCATGCTTAGCGAACGTACCAAGGCG	Promoteur P_{sgiAT} de SGI1	Clonage de P_{sgiAT} dans pQF50
SGI1-PsgiAT-HindIII-R	TGTAAAGCTTATAAGACGGGGCAACTTTAC	Promoteur P_{sgiAT} de SGI1	Clonage de P_{sgiAT} dans pQF50
Salm-PrecN-SphI-F	TCATGCATGCAGATAGCGCTGCCTATTCAG	Promoteur P_{recN} de *Salmonella*	Clonage de P_{recN} issu de 47SA97 dans pQF50
Salm-PrecN-HindIII-R	TGTAAAGCTTGTATGAAAAACCATGACTGTAAT	Promoteur P_{recN} de *Salmonella*	Clonage de P_{recN} issu de 47SA97 dans pQF50
R55-PacaDC-SphI-F	TCATGCATGCTACTCTTTACCTCCAGTTTACCA	Promoteur P_{acaDC} du plasmide IncC R55	Clonage de P_{acaDC} dans pQF50
R55-PacaDC-HindIII-R	TGTAAAGCTTTTAAACTGCGTTGTTAGCCAT	Promoteur P_{acaDC} du plasmide IncC R55	Clonage de P_{acaDC} dans pQF50
EMSA			
EMSA-LexASalm-p15b-NdeI-F	TAGCCATATGATGAAAGCGTTAACGGCCAGGC	CDS *lexA* de *Salmonella*	Clonage du CDS de *lexA* issu de *S.* Agona 47SA97 dans pET15b
EMSA-LexASalm-p15b-XhoI-R	TCGACTCGAGCTACAACCATTCCCCGTTGCGA	CDS *lexA* de *Salmonella*	Clonage du CDS de *lexA* issu de *S.* Agona 47SA97 dans pET15b
EMSA-sgaDCbox_F	ACGCCTCCTGATTAATATGTAACC	Fragment de la region promotrice de *sgaDC* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA	Sonde P_{sgaDC} pour les retards de migration sur gel
EMSA-sgaDCbox_R	ACACACCTGATTTATTCACTGA	Fragment de la region promotrice de *sgaDC* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA	Sonde P_{sgaDC} pour les retards de migration sur gel
EMSA-sgiATbox_F	TGTTGCTAGGCGATATGGTGT	Fragment de la region promotrice de *sgiAT* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA	Sonde P_{sgiAT} pour les retards de migration sur gel
EMSA-sgiATbox_R	AGTTGTTCCGCAGTAGCCAT	Fragment de la region promotrice de *sgiAT* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA	Sonde P_{sgiAT} pour les retards de migration sur gel
EMSA-mut-sgaDCbox_F	TAAAAAAACA**ACT**TATTTGGCGTTGCATTATCAAAAAGTCA	Fragment de la region promotrice de *sgaDC* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA muté	Sonde P_{sgaDC}* pour les retards de migration sur gel
EMSA-mut-sgaDCbox_R	AAT**AGT**GTGTTTTTTTACAGTATCATTTTATGGTGCTATGAAGA	Fragment de la region promotrice de *sgaDC* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA muté	Sonde P_{sgaDC}* pour les retards de migration sur gel
EMSA-mut-sgiATbox_F	ACTACAA**CT**ACTTTATTGTATAAAATTGGTAAAGTTGCCCCGTC	Fragment de la region promotrice de *sgiAT* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA muté	Sonde P_{sgiAT}* pour les retards de migration sur gel
EMSA-mut-sgiATbox_R	AATAAAGT**AGT**TGTAGTATGACAGGGTTTAAGCACTTAATCC	Fragment de la region promotrice de *sgiAT* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA muté	Sonde P_{sgiAT}* pour les retards de migration sur gel
EMSA-mpsBboxA_F	GCAGCCAGAGCACTAAGAGA	Fragment de *mpsA* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA	Sonde P_{mpsB} pour les retards de migration sur gel
EMSA-mpsBboxA_R	CTTCTTGCCGAAACTCACGAT	Fragment de *mpsA* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA	Sonde P_{mpsB} pour les retards de migration sur gel
EMSA-mut-mpsBboxA_F	TCCGATCAC**ACT**TGATGCTCAAATTACGGCACTCCAGCGA	Fragment de *mpsA* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA muté	Sonde P_{mpsB}* pour les retards de migration sur gel

Le tableau continue sur la page de gauche suivante

C. Régulation de régions promotrices par la réponse SOS

1. Activités promotrices

Les plasmides rapporteurs d'activités promotrices ont été construits à partir des plasmides pQF50-Amp (Farinha and Kropinski, 1990) et pQF50-Chl (Robbe-Saule et al., 1997). La région promotrice du gène *recN* de *E. coli* ($P_{recN\text{-}Ec}$) a été amplifiée par PCR sur une extraction d'ADN totaux de la souche MG1655 avec le couple d'amorces Ec-PrecN-SphI-F /Ec-PrecN-HindIII-R. Les régions promotrices des gènes *recN* de *S.* Agona ($P_{recN\text{-}Sal}$), *sgiAT* (P_{sgiAT}), *sgaDC* (P_{sgaDC}) ont été amplifiées par PCR sur une extraction d'ADN totaux de la souche *S.* Agona 47SA97 avec les couples d'amorces respectifs Salm-recN-SphI-F / Salm-recN-HindIII-R, SGI1-PsgiAT-SphI-F / SGI1-PsgiAT-HindIII-R et SGI1-PsgaDC-SphI-F / SGI1-PsgaDC-HindIII-R. La région promotrice des gènes *acaDC* (P_{acaDC}) a été amplifiée par PCR sur une extraction d'ADN totaux de la souche d'*E. coli* TOP10-R55 avec le couple d'amorces R55-PacaDC-SphI-F / R55-PacaDC-HindIII-R. Les produits PCR ont par la suite été digérés avec les enzymes de restriction *Sph*I et *Hind*III (Promega) et clonés dans les vecteurs pQF50-Chl et pQF50-Amp permettant l'obtention des plasmides pMPs (tableau 7). Les plasmides pQF50-Chl, pMP003 (pQF50-Chl-P*sgaDC*), pMP004 (pQF50-Chl-P*sgiAT*), pMP007 (pQF50-Chl-P*recN-Sal*) et pMP008 (pQF50-Chl-P*acaDC*) ont été introduits par transformation dans les souches *S. enterica* sérotype Kentucky ST198 11-799, *S. enterica* sérotype Kentucky ST198 11-799 SGI1-C, *S. enterica* sérotype 959SA97ΔSGI1 et *S. enterica* sérotype 47SA97. Les plasmides pQF50-Amp, pMP010 (pQF50-Amp-P*recN-Ec*), pMP011 (pQF50-Amp-P*sgaDC*), pMP012 (pQF50-Amp-P*sgiAT*) et pMP016 (pQF50-Amp-P*acaDC*) ont été introduits par transformation dans les souches MG1655, MG1655 SGI1-C, MG1655 lexA3, MG1655 lexA3 SGI1-C, MG1655 lexA51 et MG1655 lexA51 SGI1-C.

Après une pré-culture de nuit des différentes souches à 37°C sous agitation en LB avec les antibiotiques permettant la sélection des plasmides rapporteurs (ampicilline 100 µg/mL ou chloramphénicol 30 µg/mL), les cultures ont été diluées au centième dans 10 mL de LB sans induction de la réponse SOS ou avec induction de la réponse SOS par la mitomycine C (0,2 µg/mL) ou la ciprofloxacine (7 µg/mL pour *S.* Kentuky, 10 ng/mL pour *S.* Agona et 6 ng/mL pour *E. coli*). Les souches *S.* Kentuky, *S.* Agona et *E. coli* présentant des profils de résistances différents aux fluoroquinolones (dont la ciprofloxacine fait partie), les concentrations de ciprofloxacine ont été déterminées préalablement avec les souches portant les plasmides rapporteurs pMP007 ou pMP010 pour induire la réponse SOS sans entrainer de perturbations majeures au niveau des vitesses de croissance. Les activités promotrices des différentes souches ont été quantifiées à $DO_{600\ nm}$ comprise

EMSA-mut-mpsBboxA_R	GTAATTTGAGCATCAA**AGT**GTGATC GGAACAGTGCGCGC	Fragment de *mpsA* contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA muté	Sonde P_{mpsB}* pour les retards de migration sur gel
***sgaCD* mutants**			
Rec-delsgaDC_F	TTAGCATCGCTATTTGCCCTTTTGC GGCATACGCGGATGTATTCAGGCA GGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	*sgaDC*	Délétion de *sgaDC* dans *S.* Agona 47SA97
Rec-delsgaDC_R	TAGTTTCAATCAATCTGGGCCGCA GAAAAAAAGGTAAGGAGGACTAC TGACATATGAATATCCTCCTTAG	*sgaDC*	Délétion de *sgaDC* dans *S.* Agona 47SA97
Clon-sgaDC-pAON_F	TAAACTCTAGAAGCGGCCGCTGGA TAATGCTATGTCGCTCTCTCA	Opéron S008-*sgaDC* avec sa region promotrice native	Clonage de l'opéron S008-*sgaDC* dans pAON-EGFP-Kan
Clon-sgaDC-pAON_R	AATTCGTGAGCTCAGATATCCGTTC AGAAATGCAAATCTTCA	Opéron S008-*sgaDC* avec sa region promotrice native	Clonage de l'opéron S008-*sgaDC* dans pAON-EGFP-Kan
qPCR			
RT_SgaD_F	ACTGAGGAAGCAAGACCAGAAG	*sgaD*	Efficacité=105,2%, r^2=0,994
RT_SgaD_R	GACGCAGCGTACTGGCTAT	*sgaD*	Efficacité=105,2%, r^2=0,994
RT_SgaC_F	GTACAGCCTGCGAACTTGC	*sgaC*	Efficacité=96,9%, r^2=0,995
RT_SgaC_R	TGGTTCGTTATCTCGCTGGG	*sgaC*	Efficacité=96,9%, r^2=0,995
RT_SgiA_F	GTGCACCTCGTTGAGTTCCTA	*sgiA*	Efficacité=96,8%, r^2=0,998
RT_SgiA_R	GGGAGAGACTGCTGCAAAGT	*sgiA*	Efficacité=96,8%, r^2=0,998
RT_SgiT_F	GGGATCATTGTTGCCTTGCG	*sgiT*	Efficacité=104,1%, r^2=0,996
RT_SgiT_R	AGGACTTGCAGCATTTGGGA	*sgiT*	Efficacité=104,1%, r^2=0,996
RT_IntSGI1_F	GCCGTCAAGCTTATGGGAGA	int_{SGI1}	Efficacité=98,2%, r^2=0,997
RT_IntSGI1_R	GCCCAGTGTAGCAAAGCAAC	int_{SGI1}	Efficacité=98,2%, r^2=0,997
RT_RepSGI1_F	ACCACAACGCCTCTCAAACT	rep_{SGI1}	Efficacité=100,3%, r^2=0,994
RT_RepSGI1_R	ACCCTCGCCCAATGATTTCA	rep_{SGI1}	Efficacité=100,3%, r^2=0,994
RT_Xis_F	CGCCTCATCGACGGTAAGAT	*Xis*	Efficacité=100,9%, r^2=0,997
RT_Xis_R	ACTGGCTCAGGTCGTTGAAA	*Xis*	Efficacité=100,9%, r^2=0,997
RT_TraN_F	GCGCGCATCACCAAAGTTAA	*traN*	Efficacité=95,7%, r^2=0,995
RT_TraN_R	CGAGGAGCGAGAGTCCTATTG	*traN*	Efficacité=95,7%, r^2=0,995
RT_TraH1_F	ACGGCGTTGTGTCTCATGAA	*traH*	Efficacité=99%, r^2=0,994
RT_TraH1_R	CTTCTCTGTCGTCGCCACTC	*traH*	Efficacité=99%, r^2=0,994
RT_S018b_F	GCCATCAACCTAGAGTCTCCG	S018	Efficacité=107,7%, r^2=0,996
RT_S018b_R	GGAACCTATTACAGCGCGTTC	S018	Efficacité=107,7%, r^2=0,996
RT_TraG_F	TGAACAAACTCAGCCGCCTT	*traG*	Efficacité=99,2%, r^2=0,998
RT_TraG_R	TCTTTCAGAGGCAGCACAGG	*traG*	Efficacité=99,2%, r^2=0,998
RT_IntI1_F	GCCAAGCTCTCGGGTAACAT	*IntI1*	Efficacité=100,8%, r^2=0,992
RT_IntI1_R	CAACTGCGGGTCAAGGATCT	*IntI1*	Efficacité=100,8%, r^2=0,992
RT_RecNEc_F	CAGCCCGGAGAGTTTGAACA	*recN* d'*E. coli*	Efficacité=97%, r^2=0,995
RT_RecNEc_R	GTCTTCACCGTCGGCCATTA	*recN* d'*E. coli*	Efficacité=97%, r^2=0,995
RT_LexAEc_F	CGCGGCTGAAGAACATCTGA	*lexA* d'*E. coli*	Efficacité=101,8%, r^2=0,995
RT_LexAEc_R	GCAACCCTTCTTCCTCTTCCT	*lexA* d'*E. coli*	Efficacité=101,8%, r^2=0,995
RT_RecAEc_F	AATCGGCGACTCTCACATGG	*recA* d'*E. coli*	Efficacité=101,8%, r^2=0,998
RT_RecAEc_R	AAGATCAGCAGCGTGTTGGA	*recA* d'*E. coli*	Efficacité=101,8%, r^2=0,998
RT_MdHEc_F	CGGTTATTGGCGGTCACTCT	*mdH* d'*E. coli*	Efficacité=103,5%, r^2=0,999
RT_MdHEc_R	CGTTCTGGATGCGTTTGGTC	*mdH* d'*E. coli*	Efficacité=103,5%, r^2=0,999
RT_RecNSalm_F	ATCTCGCCCATCACCAACAA	*recN* de *Salmonella*	Efficacité=103,7%, r^2=0,994
RT_RecNSalm_R	CCGGCCTGCGGATTAAAGT	*recN* de *Salmonella*	Efficacité=103,7%, r^2=0,994
RT_LexASalm_F	CGCGAGGTATCCGTCTGTTA	*lexA* de *Salmonella*	Efficacité=103,4%, r^2=0,996
RT_LexASalm_R	CGACCTGGTAATGGCCTTCA	*lexA* de *Salmonella*	Efficacité=103,4%, r^2=0,996
RT_RecASalm_F	TTAAGCAGGCCGAGTTCCAG	*recA* de *Salmonella*	Efficacité=103,2%, r^2=0,999
RT_RecASalm_R	CCCGCTTTCTCGATCAGCTT	*recA* de *Salmonella*	Efficacité=103,2%, r^2=0,999
RT_MdHSalm_F	CTGCTGGTGGTATCGGTCAG	*mdH* de *Salmonella*	Efficacité=99,2%, r^2=0,99
RT_MdHSalm_R	GGAGTCACTGGAGCGATGTC	*mdH* de *Salmonella*	Efficacité=99,2%, r^2=0,99
RT_RpoA_F	GGAAGAAGATGAGCGCCCAA	*rpoA* d'*E. coli* et *Salmonella*	*E. coli*: Efficacité=97,2%, r^2= 0,998 / *Salmonella*: Efficacité=97,2%, r^2=0,996
RT_RpoA_R	CGCGCTGCTTCAACATTGTA	*rpoA* d'*E. coli* et *Salmonella*	*E. coli*: Efficacité=97,2%, r^2= 0,998 / *Salmonella*: Efficacité=97,2%, r^2=0,996
qAttBvide-Ec_F	GCGAAATCACCGGGGAATTT	*attB* d'*E. coli*	Efficacité=82,4%, r^2=0,998

Le tableau continue sur la page de gauche suivante

entre 1 et 1,5 par la mesure des activités β-galactosidase de 1 mL de culture selon la technique de Miller (Miller, 1972) en plaque 96 puits. L'activité β-galactosidase a été mesurée en triplicat technique sur deux dilutions de chaque échantillon (dilutions finales de facteurs 40 et 100).

2. Retard de migration sur gel (EMSA)

La souche BL21(DE3)-pLysS-pET15b-lexA$_{Salmonella}$ a été construite pour la surexpression et la purification de la protéine LexA issue de *S.* Agona. Le CDS du gène *lexA* de *S.* Agona a été amplifié à partir d'une extraction d'ADN totaux de la souche *S.* Agona 47SA97 avec les amorces EMSA-LexAS-p15b_F et EMSA-LexAS-p15b_R. Le produit PCR a été digéré par les enzymes de restriction *Nde*I et *Xho*I (Promega) puis cloné dans le vecteur pET15b (Novagen) digéré *Nde*I et *Xho*I (Promega) avec la T4 DNA ligase (New England Biolabs). Le vecteur pET15b-lexA$_{Salmonella}$ ainsi obtenu a été transformé dans la souche BL21(DE3)-pLysS (Invitrogen). La souche BL21(DE3)-pLysS- pUA1170 est issue du laboratoire RESINFIT de Limoges et nous a été fournie par Sandra Da Re. Le plasmide pUA1170 est issu d'un plasmide pET15b dans lequel a été cloné le CDS du gènes lexA d'*E. coli* (Da Re et al., 2009). Les souches BL21(DE3)-pLysS-pET15b-lexA$_{Salmonella}$ et BL21(DE3)-pLysS-pUA1170 ont été mises en culture dans 200 mL de milieu LB avec de l'ampicilline (100 µg/mL) et du chloramphénicol (30 µg/mL) à 37°C sous agitation. La surexpression des protéines LexA a été induite à $DO_{600\ nm}$ ~0,5 par l'ajout de 5 mM IPTG puis les cultures bactériennes ont été laissées en culture 4h à 37°C sous agitation. Les cultures ont par la suite été distribuées dans 4 tubes de 50 mL, centrifugées 15 min à 6500 rpm à 4°C puis le surnageant a été enlevé et les culots bactériens ont été congelés à -20°C. Les purifications des protéines LexA ont été faites avec la résine TALON® Metal Affinity Resin from (Clontech Laboratories) et les réactifs HisTALON™ Buffer Set (Clontech Laboratories) selon les recommandations du fournisseur. Les fractions d'élution contenant les protéines LexA ont été rassemblées, nettoyées par rinçage au tampon de dialyse (20mM Tris-HCl pH8, 50mM KCl, 1mM EDTA) et concentrées avec les colonnes Vivaspin Turbo 15 RC, 10,000 MWCO (Sartorius) selon les recommandations du fournisseur.

Les sondes ADN P$_{sgaDC}$ et P$_{sgaAT}$ ont été amplifiées par PCR sur une extraction d'ADN totaux de la souche *S.* Agona 47SA97 en utilisant les amorces EMSA-sgaCDbox_F / EMSA-sgaCDbox_R et EMSA-sgiATbox_F / EMSA-sgiATbox_R respectivement. Les changements de nucléotides CTG→AGT dans les sites potentiels de fixation de la protéine LexA pour créer les sondes P$_{sgaDC}$* et P$_{sgaAT}$* ont été faits par la technique de la PCR overlap (figure 46) (Heckman and Pease, 2007a). Pour la sonde P$_{sgaDC}$* la production des deux premiers fragments PCR a été réalisée en utilisant les amorces EMSA-sgaCDbox_F / EMSA-mut-sgaCDbox_R et EMSA-mut-sgaCDbox_F / EMSA-sgaCDbox_R sur une extraction d'ADN totaux de la souche *S.* Agona 47SA97. Une deuxième étape de PCR a été

qAttBvide-Ec_R	GGTTGAGGAATAACAGGAGTGGT	*attB* d'*E. coli*	Efficacité=82,4%, r^2=0,998
qAttPcir_F	TGTGATTGGTAAGTTTTACTCCACA	SGI1 *attP*	Efficacité=90,4%, r^2=0,994
qAttPcir_R	GCAAAACGGAGCAAAATCGTG	SGI1 *attP*	Efficacité=90,4%, r^2=0,994
RT_MpsA1_F	GATTCCTCGAACCGCAGACC	*mpsA*	Efficacité=100,8%, r^2=0,990
RT_MpsA1_R	AGCTTCCCATAATGCCGCAA	*mpsA*	Efficacité=100,8%, r^2=0,990
RT_MpsBb_F	GCTCTAAACGATATTGCCGCC	*mpsB*	Efficacité=94,6%, r^2=0,994
RT_MpsBb_R	GCCTTGTGTAATACCGGTGGA	*mpsB*	Efficacité=94,6%, r^2=0,994
RT_S023_F	ACTCATAGTCGGGCGAGAGA	S023	Efficacité=95,6%, r^2=0,997
RT_S023_R	CCATGACCGAGCTGTTGGAT	S023	Efficacité=95,6%, r^2=0,997
Construction pAON			
IF1-PthrC3_8-F	TAAACTCTAGAAGCGGCCGCCATA TGCTGGATCCTTCCCT	Promoteur PthrC3_8	Clonage du promoteur PthrC3_8 dans les vecteurs pAON
IF2-PthrC3_8-R	GCTTTGTCTCCTGACTAGTGTTAAA CAAAATTATTTCTAGGTTG	Promoteur PthrC3_8	Clonage du promoteur PthrC3_8 dans les vecteurs pAON
IF3-EGFP-F	ACTAGTCAGGAGACAAAGCATGAG CAAGGGCGAGGAG	CDS de *EGFP*	Clonage du CDS de *EGFP* dans les vecteurs pAON
IF4-EGFP-R	AATTCGTGAGCTCAGATATCCTCTC GCAGCGCCAGTAA	CDS de *EGFP*	Clonage du CDS de *EGFP* dans les vecteurs pAON
IF5v2-FRT-F	GATATCTGAGCTCACGAATTGTGT AGGCTGGAGCTGCTTC	FRT-Kan-FRT et FRT-Chl-FRT	Clonage du CDS des fragments FRT-Kan-FRT et FRT-Chl-FRT dans les vecteurs pAON
IF6v2-FRT-R	AGCTTATCATCGATAAGCTTCATAT GAATATCCTCCTTAG	FRT-Kan-FRT et FRT-Chl-FRT	Clonage du CDS des fragments FRT-Kan-FRT et FRT-Chl-FRT dans les vecteurs pAON
IF3-mCherry-F	ACTAGTCAGGAGACAAAGCATGGT GAGCAAGGGCGAG	CDS de *mCherry*	Clonage du CDS de *mCherry* dans les vecteurs pAON
IF4-mCherry-R	AATTCGTGAGCTCAGATATCGCAG TTTCATTTGATGCCGA	CDS de *mCherry*	Clonage du CDS de *mCherry* dans les vecteurs pAON
Clonage-ECFP_F	TAGCACTAGTCAGGAGACAAAGCA TGCTGAGCAAGGGCGAG	CDS de *ECFP*	Clonage du CDS de *ECFP* dans les vecteurs pAON
Clonage-ECFP_R	AATTCGTGAGCTCAGATATCCACT CATCGCAGTCTAGCTT	CDS de *ECFP*	Clonage du CDS de *ECFP* dans les vecteurs pAON
Clonage-EBFP2_F	TAGCACTAGTCAGGAGACAAAGCA TGGTGAGCAAGGGCGAG	CDS de *EBFP2*	Clonage du CDS de *EBFP2*dans les vecteurs pAON
Clonage-EBFP2_R	AATTCGTGAGCTCAGATATCTCAG AATTGGCTTTCAGCAAA	CDS de *EBFP2*	Clonage du CDS de *EBFP2*dans les vecteurs pAON
Clon-RBS29-ECFP_F	TAGCACTAGTCAGGAGAACCCAAA TGCTGAGCAAGGGCGAG	CDS de *ECFP* avec le RBS n°29	Clonage du CDS de *ECFP* avec le RBS n°29 dans les vecteurs pAON
Clon-RBS28-ECFP_F	TAGCACTAGTCAGGAGGAGAGAGA TGCTGAGCAAGGGCGAG	CDS de *ECFP* avec le RBS n°28	Clonage du CDS de *ECFP* avec le RBS n°28 dans les vecteurs pAON
Clon-RBS29-EBFP2_F	TAGCACTAGTCAGGAGAACCCAAA TGGTGAGCAAGGGCGAG	CDS de *EBFP2* avec le RBS n°29	Clonage du CDS de *EBFP2* avec le RBS n°29 dans les vecteurs pAON
Clon-RBS28-EBFP2_F	TAGCACTAGTCAGGAGGAGAGAGA TGGTGAGCAAGGGCGAG	CDS de *EBFP2* avec le RBS n°28	Clonage du CDS de *EBFP2* avec le RBS n°28 dans les vecteurs pAON
Clon-PgapA-Ec_F	TAAACTCTAGAAGCGGCCGCGCCA TTTGCTCACATCTCACTT	Région promotrice de *gapA* d'*E. coli*	Clonage de la Région promotrice de *gapA* d'*E. coli* dans les vecteurs pAON
Clon-PgapA-Ec_R	GCTTTGTCTCCTGACTAGTGCTATT TGTTAGTGAATAAAAGGTTGC	Région promotrice de *gapA* d'*E. coli*	Clonage de la Région promotrice de *gapA* d'*E. coli* dans les vecteurs pAON
Rec_SGI1_F	ATACAAGTATTTTAACATGTATATA GATTAAATTCCAATCAACTTGTGTC CCGGAAGCAGTGTGACCGTGT	Intégron de SGI1	Remplacement de l'intégron de SGI1-C par les constructions fluorescentes issues des pAON
Rec_SGI1C_R	TTTCTTGTTCAACAAACCACCATTT TCTTAACAGTTCATAACTTAGCAA GTGTAGCACCTGAAGTCAGCCC	Région promotrice de *gapA* d'*E. coli*	Remplacement de l'intégron de SGI1-C par les constructions fluorescentes issues des pAON

[a] Les sites de restriction sont indiqués en rouge avec les sequences adjacentes suplémentaires en bleu. Les nucleotides en gras dorrespondent aux mutations des potentiels sites de fixation de la protéine LexA (CAG →ACT). Les nucléotides soulignés correspondent aux régions homologues pour la mutagenèse dirigée utilisant la méthode de Datsenko et Wanner (Datsenko and Wanner, 2000). Les nucleotides en vert correspondent aux RBS ajoutés sur les queues flottantes des amorces pour la construction des plasmides pAON.

réalisée sur les fragments PCR précédents en utilisant les amorces EMSA-sgaCDbox_F / EMSA-sgaCDbox_R pour créer la sonde P_{sgaDC}*. Pour la sonde P_{sgiAT}* la production des deux premiers fragments PCR a été réalisée en utilisant les amorces EMSA-sgiATbox_F / EMSA-mut-sgiATbox_R et EMSA-mut-sgiATbox_F / EMSA-sgiATbox_R sur une extraction d'ADN totaux de la souche *S.* Agona 47SA97. Une deuxième étape de PCR a été réalisée sur les fragments PCR précédents en utilisant les amorces EMSA-sgiATbox_F / EMSA-sgiATbox_R pour créer la sonde P_{sgiAT}*. Les sondes P_{mpsB} et P_{mpsB}* ont été utilisées pour tester le site potentiel de fixation de LexA en amont du gène *mpsB*. La sonde P_{mpsB} a été amplifiées par PCR sur une extraction d'ADN totaux de la souche *S.* Agona 47SA97 en utilisant les amorces EMSA-mpsBboxA_F et EMSA-mpsBboxA_R. Les changements de nucléotides CTG→AGT dans le site potentiel de fixation de la protéine LexA pour créer la sonde P_{mpsB}* ont été fait par PCR overlap. La production des deux premiers fragments PCR a été réalisée en utilisant les amorces EMSA-mpsBboxA_F / EMSA-mut-mpsBboxA_R et EMSA-mut-mpsBboxA_F / EMSA-mpsBboxA_R à partir d'une extraction d'ADN totaux de la souche *S.* Agona 47SA97. Une deuxième étape de PCR a été réalisée sur les fragments PCR précédents en utilisant les amorces EMSA-mpsBboxA_F et EMSA-mpsBboxA_R pour créer la sonde P_{mpsB}*. Les expériences de retard de migration sur gel ont été réalisées avec le kit Electrophoretic Mobility-Shift Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur en utilisant différentes quantités de protéines LexA (0 ng à 600 ng) mélangées avec 40 ng de sonde. Les échantillons ont par la suite été déposés sur gel non dénaturant Tris-glycine polyacrylamide 6% et visualisés avec le SYBR® Green.

3. Quantification des expressions transcriptionnelles (RT-qPCR)

Les souches de *S.* Agona 47SA97 et *E. coli* MG1655 SGI1-C, MG1655 SGI1-CΔsgaDC et MG1655 SGI1-CΔsgaDC pAON-*sgaDC* ont été mises en culture avec et sans mitomycine C (0,2 µg/mL) en LB (10 mL) à 37° sous agitation. Des triplicats biologiques de chaque condition ont été réalisés. A $DO_{600\ nm}$ ~1, les extractions d'ARN avec le kit Direct-zol RNA MiniPrep Plus (Zymo Research) ont été réalisées à partir de 1 mL de culture bactérienne. Les ARN extraits ont subi une étape de transcriptase inverse permettant d'obtenir des cDNA avec le kit iScript™ cDNA Synthesis (BioRad) selon les recommandations du fournisseur. Les réactions de qPCR ont été réalisées avec le Biomark™ HD system (Fluidigm) et les amorces présentées dans le tableau 8. Selon les recommandations du constructeur, des échantillons de cDNA ont été dilués 10 fois et utilisés dans une réaction de pré-amplification utilisant un mix de toutes les amorces avec le Pre-Amp master Mix (Fluidigm) en suivant le programme suivant : 2 min à 95 °C, suivi de 14 cycles de 15 sec à 95 °C et 4 min à 60 °C, puis un stockage final à 4 °C. Les échantillons pré-amplifiés ont été traités à l'exonucléase I (New England

Biolabs) pour enlever les amorces et dilués 20 fois dans du Tris-EDTA. Les échantillons pré-amplifiés et les couples d'amorces ont été chargés sur les plaques 96.96 (*S.* Agona) ou 48.48 (*E. coli*) Dynamic Array™ IFC (Fluidigm) puis utilisés sur le Biomark™ HD (Fluidigm) pour la réaction de qPCR selon le programme suivant : 40 min à 70 °C, 30 sec à 60 °C, 60 sec à 95°C, 30 cycles de 5 sec à 96 °C, 20 sec à 60 °C, puis pour finir la réalisation d'une courbe de fusion pour vérifier la qualité des réactions d'amplification. Les analyses des courbes d'amplification et de fusion pour la détermination des valeurs de Ct (cycle threshold) de chaque échantillon ont été réalisées sur le logiciel Fluidigm Real-Time. Pour chaque échantillon, les expressions des gènes ont été normalisées sur la moyenne géométrique des Ct des gènes de ménages *rpoA* et *mdH* pour obtenir la valeur du ΔCt. Ces deux gènes de ménage ont été précédemment utilisés pour la normalisation de RT-qPCR lors d'induction de la réponse SOS car leurs transcriptions ne sont pas affectées par l'induction de la réponse SOS (Briales et al., 2012b; Valat et al., 2020). Les facteurs d'augmentation de transcription (fold change) de la condition réponse SOS induite (via la mitomycine C) par rapport à la condition non induite correspond au $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Le $2^{-\Delta\Delta Ct}$ correspond à la moyenne du ratio des $2^{-\Delta Ct}$ de chaque gène des conditions d'induction de la réponse SOS divisée par la moyenne du $2^{-\Delta Ct}$ des gènes correspondants issus des conditions de réponse SOS non induite.

4. Quantification de l'excision et du nombre de copies de SGI1

Dans le cas des souches MG1655 SGI1-C, MG1655 SGI1-CΔsgaDC et MG1655 SGI1-CΔsgaDC pAON-*sgaDC* avec et sans traitement à la mitomycine C, les extractions d'ADN totaux pour la quantification du nombre de copies et de l'excision de SGI1 ont été réalisées sur les mêmes cultures bactériennes que pour les extractions d'ARN. Dans le cas des souches de *S.* Agona 47SA97, les extractions d'ADN totaux pour la quantification du nombre de copies et de l'excision de SGI1 ont été réalisées sur les cultures bactériennes différentes de celles des extractions d'ARN, mais selon les mêmes conditions de culture. Les souches de *S.* Agona 47SA97 et *E.coli* MG1655 SGI1-C, MG1655 SGI1-CΔsgaDC et MG1655 SGI1-CΔsgaDC pAON-*sgaDC* ont été mises en culture avec et sans mitomycine C (0,2 µg/mL) en LB (10 mL) à 37° sous agitation. Des triplicats biologiques de chaque condition ont été réalisés. A $DO_{600\ nm}$ ~1, les extractions d'ADN totaux avec le kit NucleoSpin Tissue Mini kit (Macherey Nagel) ont été réalisées à partir de 1 mL de culture bactérienne. Les amorces utilisées pour détecter le chromosome et les différentes formes de SGI1 sont listées dans le tableau 8. Les réactions de qPCR ont été réalisées en triplicats techniques sur le thermocycleur Bio-Rad® CFX96 Touch™ en utilisant le mix iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) selon les recommandations du fournisseur et avec le programme suivant : 5 min à 95 °C, 42 cycles de 15 sec à 95 °C et 1 min à 60 °C suivi d'une courbe de fusion. Les analyses des courbes d'amplification et de fusion pour la

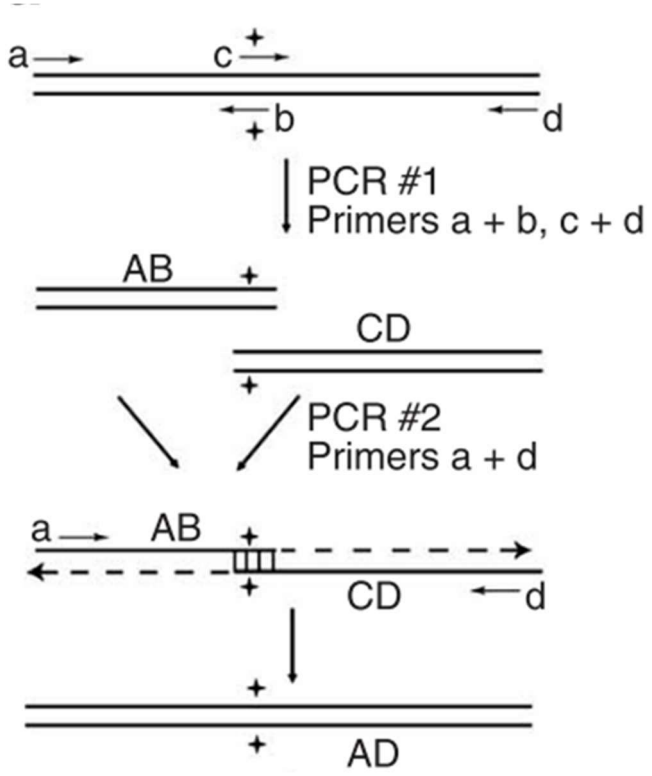


Figure 46: Principe de la technique de la PCR overlap pour l'introduction de mutation ponctuelle.
Les amorces PCR a, b, c et d sont représentées par des flèches. Les amorces c et b portent la mutation ponctuelle à insérer (soit direcement sur les amorces entrainant un mesapariement avec la matrice ou rajoutée sur une queue flottante). La première étape de la PCR overlap est l'obtention des fragments PCR AB (avec les amorces a et b) et CD (avec les amorces c et d). La deuxième étape consiste en une réaction PCR avec les amorces a et d et les produits PCR obtenus à l'étape 1 AB et CD comme matrice. Cette étape permet l'obtention du fragment PCR AD portant la mutation d'intérêt.
Issu de (Heckman and Pease, 2007b).

détermination des valeurs de Ct (cycle threshold) de chaque échantillon ont été réalisées sur le logiciel BioRad CFX manager 3.1. Les valeurs de Ct supérieures à 35 ont été exclues. Dans un premier temps, le Ct moyen issu des réplicats techniques de chaque cible d'une même extraction a été déterminé. Nous avons par la suite déterminé par échantillon la quantité relative ($2^{-\Delta Ct}_{\text{cible/chromosome}}$) des cibles *xis*, *attP* et *attB* par le nombre de cibles *rpoA* et *mdH* (représentant le chromosome) selon la formule : $2^{-\Delta Ct_{\text{cible/chromosome}}} = \frac{2^{-\text{Ctmoyen}_{cibles\ xis\ \ attP\ ou\ attB}}}{2^{-\text{Ctmoyen}_{cibles\ rpoA\ ou\ mdH}}}$. Par exemple, pour déterminer la quantité de SGI1 (*xis*) par chromosome (*rpoA* et *mdH*) d'une extraction, les calculs suivants ont été réalisés : $2^{-\Delta Ct_{xis/rpoA}} = \frac{2^{-\text{Ctmoyen}\ xis,}}{2^{-\text{Ctmoyen}_{rpoA}}}$ et $2^{-\Delta Ct_{xis/mdH}} = \frac{2^{-\text{Ctmoyen}\ xis,}}{2^{-\text{Ctmoyen}_{mdH}}}$. Le nombre de copies de SGI1 par chromosome correspond à la moyenne des $2^{-\Delta Ct}_{xis/rpoA}$ et des $2^{-\Delta Ct}_{xis/mdH}$ issue des triplicats biologiques. Le nombre formes circulaires de SGI1 par chromosome correspond à la moyenne des $2^{-\Delta Ct}_{attP/rpoA}$ et $2^{-\Delta Ct}_{attP/mdH}$ issue des triplicats biologiques. Le nombre de sites d'attachement vide *attB* par chromosome correspond à la moyenne des $2^{-\Delta Ct}_{attB/rpoA}$ et $2^{-\Delta Ct}_{attB/mdH}$ issus des triplicats biologiques.

D. Conjugaison tripartite

Pour les expériences de conjugaison tripartite, les souches donneuses 1 (donneur #1) portant le plasmide IncC R16a, les souches donneuses 2 (donneur #2) portant SGI1-C et les souches receveuses (receveur) sans EGM ont été mises en contact sur filtre de conjugaison. Le donneur #1 (*E. coli* MG1655 R16a) et le receveur (*E. coli* J5-3) ont toujours été les mêmes souches. Différentes souches d'*E. coli* ont été utilisées en donneur #2 : MG1655 SGI1-C, MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC*, MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}) SGI1-C et MG1655 *lexA3* (SOS^{OFF}) SGI1-C. Après pré-culture de nuit à 37°C sous agitation en LB avec les antibiotiques permettant la sélection des donneur #1 (sélection R16a, kanamycine 50 µg/mL), donneur #2 (sélection SGI1-C, streptomycine 50 µg/mL) et receveur (rifampicine 250 µg/mL), les cultures des donneur #1, donneur #2 et receveur, ont été diluées au centième dans 10 mL de LB sans antibiotique et remises en culture à 37°C sous agitation. Lorsque les cultures ont atteint une valeur de $DO_{600\ nm}$ ~0,8, les populations donneur #1, donneur #2 et receveur ont été mélangées à un ratio 1:1:1 dans un volume final de 3 mL. Le mix de conjugaison a été concentré dans un volume final de 200µL par une centrifugation de 3 min à 765 g. Le mix de conjugaison concentré a été déposé sur un filtre de conjugaison (0,045µm) sur milieu gélosé de LB préchauffé à 37°C et incubé à 37°C. Après le temps de contact voulu, les filtres ont été resupendus dans 1 mL de LB et les dilutions en série de facteur 10 ont été étalées sur milieu LB gélosé avec les antibiotiques appropriés pour sélectionner :

- Les donneurs R16a (sélection de la présence du plasmide par la kanamycine)
- Les donneurs de SGI1, correspondant aux bactéries donneur #2 avec SGI1-C ou SGI1-CΔ*sgaDC* ayant acquis le plasmide R16a (sélection du plasmide par la kanamycine et SGI1 par la streptomycine)
- Les transconjugants R16a correspondant aux receveurs ayant acquis le plasmide R16a (sélection de la souche receveur par la rifampicine et le plasmide par la kanamycine)
- Les transconjugants SGI1 correspondant aux receveurs ayant acquis SGI1 (sélection de la souche receveur par la rifampicine et SGI1 par la streptomycine)

Les fréquences de transfert déterminées pour R16a après les différents temps de contact correspondent aux ratios transconjugants R16a/donneurs R16a. Les fréquences de transfert déterminées pour SGI1 après les différents temps de contact correspondent aux ratios transconjugants SGI1/donneurs SGI1.

E. Microscopie et cytométrie en flux

1. Construction des vecteurs exprimant les protéines fluorescentes

Les constructions des vecteurs pAON exprimant diverses protéines fluorescentes sous contrôle de différents promoteurs ont été réalisées à partir des éléments biologiques présentés dans le tableau 11 et les amorces utilisées dans le tableau 8. La première construction réalisée a été celle du pAON-EGFP-Kan. Dans un premier temps, le fragment PthrC3_8 a été obtenu par PCR à partir du plasmide pMB-Spect-PthrC3_8-EGFP avec les amorces IF1-PthrC3_8-F / IF2-PthrC3_8-R, le fragment EGFP à partir du plasmide pMB-Spect-PthrC3_8-EGFP avec les amorces IF3-EGFP-F / IF4-EGFP-R et le fragment FRT-Kan-FRT à partir du plasmide pKD4 avec les amorces IF5v2-FRT-F / IF6v2-FRT-R. Le fragment EGFP-FRT-Kan-FRT a été obtenu par PCR overlap avec les purifications des PCR précédentes EGFP et FRT-Kan-FRT en utilisant les amorces IF3-EGFP-F / IF6v2-FRT-R. Les purifications PCR des fragments PthrC3_8 et EGFP-FRT-Kan-FRT ont été digérées respectivement par les couples d'enzymes de restriction *Not*I-HF / *Spe*I-HF et *Spe*I-HF / *Hind*III-HF (New England Biolabs). Les deux produits PCR digérés ont été clonés simultanément avec la T4 DNA Ligase (New England Biolabs) dans le vecteur pLYS-M1 backbone digéré *Not*I-HF / *Hind*III-HF permettant d'obtenir le vecteur pAON-EGFP-Kan. Par la suite, les vecteurs pAON-mCherry-Kan, pAON-ECFP-Kan et pAON-EBFP2-Kan ont été construits. Les CDS des protéines fluorescentes ont été obtenus par PCR avec les amorces IF3-mCherry-F / IF4-mCherry-R à partir du plasmide pJL1-mCherry pour la mCherry, Clonage-EBFP2_F / Clonage-EBFP2_R à partir du plasmide pJL1-EBFP2 pour la EBFP2 et Clonage-ECFP_F / Clonage-ECFP_R à partir du plasmide pUC18T-miniTn7T-Gm-ECFP pour la

ECFP. Les produits PCR ont été digérés par les enzymes de restriction *SpeI*-HF / *SacI*-HF (New England Biolabs) et clonés dans le vecteur pAON-EGFP-Kan digéré *Spe*I-HF / *Sac*I-HF (New England Biolabs). Par la suite, le module FRT-Kan-FRT des plasmides pAON-EGFP-Kan et pAON-mCherry-Kan a été changé par le module FRT-Cm-FRT. Pour cela, le fragment FRT-Cm-FRT a été amplifié à partir du plasmide pKD3 avec les amorces IF5v2-FRT-F / IF6v2-FRT-R. Le fragment PCR a été digéré par les enzymes de restriction *Sac*I-HF / *Hind*III-HF (New England Biolabs) et cloné dans les vecteurs pAON-EGFP-Kan et pAON-mCherry-Kan digérés par les mêmes enzymes de restriction permettant l'obtention des vecteurs pAON-EGFP-Chl et pAON-mCherry-Chl. Les RBS devant les CDS des protéines fluorescentes EBFP2 et ECFP ont également été modifiés. Les CDS des protéines fluorescentes avec les RBS n°28 et 29 ont été obtenus par PCR avec les amorces Clon-RBS28-EBFP2_F / Clonage-EBFP2_R (RBS n°28) et Clon-RBS29-EBFP2_F / Clonage-EBFP2_R (RBS n°29) à partir du plasmide pJL1-EBFP2 pour la EBFP2 et Clon-RBS28-ECFP_F / Clonage-ECFP_R (RBS n°28) et Clon-RBS29-ECFP_F / Clonage-ECFP_R (RBS n°29) à partir du plasmide pUC18T-miniTn7T-Gm-ECFP pour la ECFP. Les produits PCR ont été digérés par les enzymes de restriction *Spe*I-HF / *Sac*I-HF (New England Biolabs) et clonés dans le vecteur pAON-EGFP-Kan digéré *Spe*I-HF / *Sac*I-HF (New England Biolabs) permettant l'obtention des vecteurs pAON-RBS28-ECFP-Kan, pAON-RBS29-ECFP-Kan, pAON-RBS28-EBFP2-Kan et pAON-RBS29-EBFP2-Kan. Les plasmides pAON-P_{gapA}-ECFP-Kan et pAON-P_{gapA}-EBFP2-Kan ont été obtenus en changeant le module promoteur des plasmides pAON-ECFP-Kan et pAON-EBFP2-Kan. Le promoteur PgapA a été amplifié à partir d'une extraction d'ADN total de la souche MG1655 en utilisant les amorces Clon-PgapA-Ec_F / Clon-PgapA-Ec_R. Le produit PCR a été digéré par les enzymes *Not*I-HF / *Spe*I-HF et cloné dans les vecteurs pAON-ECFP-Kan et pAON-EBFP2-Kan digérés par les enzymes *Not*I-HF / *Spe*I-HF. L'intégrations de la construction PthrC3_8-mCherry-Kan sur SGI1 a été réalisée suivant le protocole de Datsenko et Wanner dans la souches MG1655 SGI1 pKD46 (Datsenko and Wanner, 2000). Le produit PCR contenant la construction fluorescente et les 50 pb supplémentaires aux extrémités pour la recombinaison homologue a été amplifié avec les amorces Rec_SGI1_F / Rec_SGI1C_R.

2. Microscopie

Les souches pour la microscopie ont été mises en culture à 37°C en milieu LB en présence de chloramphénicol (30µg/mL) jusqu'à attendre une $DO_{600\ nm}$ comprise entre 0,5 et 1. Un échantillon d'environ 5 µL de culture a été déposé entre lame et lamelle en verre (préalablement nettoyées à l'éthanol 70%) pour visualisation au microscope. Les échantillons ont été observés à l'immersion dans de l'huile grâce à un microscope inversé Zeiss AxioVert 200M (Zeiss) possédant une platine motorisée

et un objectif 63x plan apochromatique dont l'ouverture numérique est de 1,40. La source lumineuse provient de 3 LED (Colibri 5, Zeiss) aux longueurs d'ondes 365 nm, 488 nm et 555 nm dont l'intensité est réglable. Les échantillons ont été excités aux alentours de 500 ms en contraste de phase et entre 500 ms et 1 sec pour la fluorescence. Le filtre Zeiss n°44 (excitation 475/40 nm ; émission : 530/50 nm) a été utilisé pour la protéine EGFP et la protéine ECFP, le filtre Zeiss n°49 (excitation 365 nm ; émission : 445/50 nm) a été utilisé pour la protéine EBFP2 et le filtre Zeiss n°64 (excitation 587/25 nm ; émission : 647/70 nm) a été utilisé pour la protéine mCherry. Les images ont été acquises par une caméra AxioCam MRm (Zeiss) grâce au logiciel d'imagerie Axiovision v4, 4.8.2.0 (Zeiss).

3. Cytométrie

Les souches pour la cytométrie ont été mises en culture à 37°C en milieu LB en présence de chloramphénicol (30 µg/mL) jusqu'à atteindre une $DO_{600\ nm}$ d'environ 0,8. Les cellules ont été lavées via une centrifugation de 3 minutes à 8000 g de 1 mL de culture avec reprise du culot dans 1 mL de PBS 1X. Des dilutions en série de facteur 10 ont été réalisées dans du PBS 1X pour obtenir environ 2.10^6 cellules / mL (dans la majorité des cas, les dilutions 10^{-3} ont été utilisées). Les échantillons ont été filtrés sur tissus de filtration 60 µm en nylon (Blutex ®) avant le passage en cytométrie en flux. L'utilisation des échantillons en cytométrie et les analyses des résultats ont été réalisés par la plateforme « Imagerie et Infectiologie » de mon unité de recherche sur le trieur de cellules / cytomètre en flux MoFlo Astrios (Beckmancoulter). Les combinaisons de laser et filtres qui ont été utilisé (filtre/bande passante) sont les suivantes : le laser 561 nm avec le filtre 610/20 nm pour la protéine mCherry, le laser 405 nm avec filtre 524/50 nm pour la protéine ECFP, le laser 488 nm avec filtre 525/50 nm pour la protéine EGFP et le laser 405 nm avec filtre 450/40 nm pour la protéine EBFP2. Les analyses de cytométrie ont été réalisées directement avec le logiciel de pilotage du trieur de cellules / cytomètre en flux MoFlo Astrios (Beckmancoulter).

III. Résultats

A. Activation de la réponse SOS par l'entrée conjugative des plasmides IncC et IncA

L'activation de la réponse SOS par l'entrée conjugative de plasmide dans les cellules a été démontrée pour plusieurs familles de plasmides (IncP, IncX, IncW, IncI1, IncFII, IncN, IncW) (Baharoglu et al., 2010). La méthodologie utilisée par les auteurs est basée sur la mesure d'activité β-galactosidase lors d'expériences de conjugaison entre des bactéries receveuses portant un système rapporteur composé du CDS du gène *lacZ* sous contrôle d'un promoteur régulé par la réponse SOS et des bactéries donneuses incapables d'activer la réponse SOS (*recA*-), ne présentant pas d'activité β-galactosidase (Δ*lacZ*) et porteuses du plasmide conjugatif d'intérêt. La mesure de l'activité β-galactosidase en présence de son substrat (ONPG : 2-nitrophényl-β-D-galactopyrannoside) reflète l'activité des promoteurs étudiés (Miller, 1972). Dans le cas d'un promoteur régulé par la réponse SOS, une augmentation de l'activité β-galactosidase correspond à une activation de la réponse SOS. La formule initiale de Miller estime la population bactérienne avec la mesure de la densité optique des cultures à 600 nm ($DO_{600\ nm}$). Au lieu de faire cette estimation, Baharoglu *et. al* ont dénombré les CFU (colony-forming unit) correspondants aux bactéries donneuses, aux bactéries réceptrices et aux transconjugants (bactéries réceptrices ayant acquis le plasmide conjugatif). Ces dénombrements couplés à la mesure de l'activité β-galactosidase des mélanges de conjugaison ont permis de définir l'activité β-galactosidase basale par bactérie receveuse et de calculer l'activité β-galactosidase spécifique par transconjugant.

Les plasmides des familles IncC et IncA n'ont pas été testés lors de ces travaux démontrant l'activation de la réponse SOS pas l'entrée conjugative de plasmides. Ces premiers travaux de thèse ont permis de quantifier l'activation de la réponse SOS dans les transconjugants pour les plasmides R55 (IncC), RA1 (IncA) et Rsa (IncW). Le plasmide Rsa (IncW) a été choisi comme contrôle positif activant la réponse SOS dans les transconjugants chez *E. coli* (Baharoglu et al., 2010). Le plasmide R55 est un des plasmides modèles de la famille IncC et le plasmide RA1 est le prototype des rares plasmides IncA connus à ce jour. Contrairement aux plasmides IncA, les plasmides IncC encodent une protéine SSB (single-strand binding protein) pouvant avoir un effet anti-SOS en entrant en compétition avec RecA pour la liaison à l'ADNsb. D'après la littérature la présence de protéine PsiB (ou d'homologues aux protéines PsiB) n'a pas été décrite sur les plasmides IncA et IncC (Harmer and Hall, 2015). De plus, la recherche par homologie via l'outil d'alignement local BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ne permet pas de détecter d'homologues aux protéines PsiB

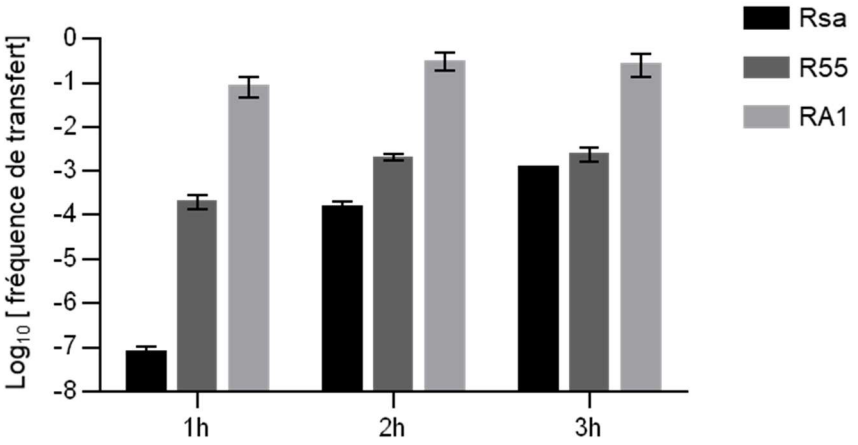


Figure 47 : Efficacité de transfert des plasmides Rsa (IncW), R55 (IncC) et RA1 (IncA).
Représentation graphique des fréquences de transfert issues d'expériences de conjugaison entre les souches donneuses TOP10 (*recA*-, Δ*lacZ*) portant les plasmides étudiés (R55, RA1 ou Rsa) et les receveuses MG1655 pMP002 (pQF50-Chl avec *lacZ* sous contrôle du promoteur du gène *recN*) ou pour la conjugaison avec Rsa, MG1655 pMP010 (pQF50-Amp avec *lacZ* sous contrôle du promoteur du gène *recN)*. La fréquence de transfert correspond au nombre de transconjugants divisé par le nombre de donneurs. Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'au moins un triplicat biologique pour les temps à 1h et 2h (entre 1 et 3 mesures à 3h).

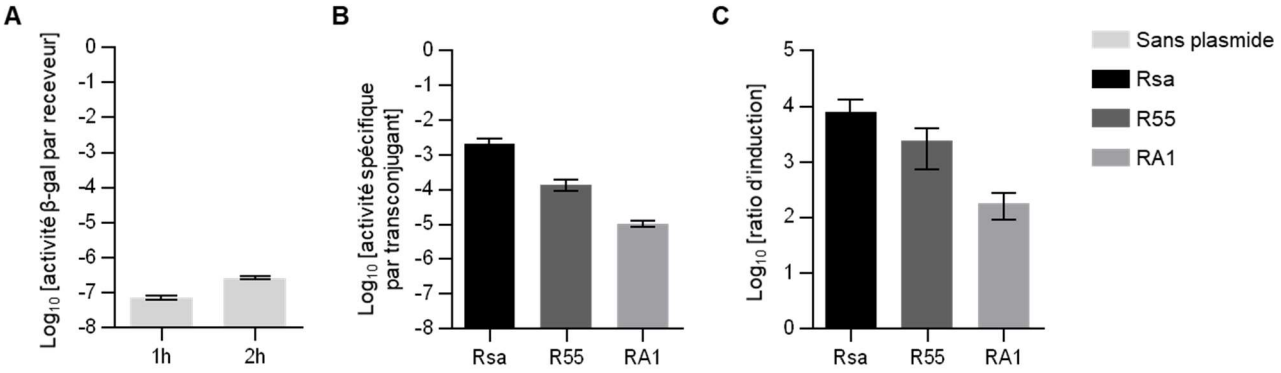


Figure 48 : Induction de la réponse SOS dans les transconjugants.
A) Activité β-galactosidase basale par cellule receveuse en unité Miller après 1h et 2h de contact. **B)** Activité β-galactosidase spécifique par transconjugant en unité Miller. **C)** Ratio de l'activité β-galactosidase spécifique par transconjugant par rapport à l'activité β-galactosidase basale par cellule receveuse.
Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'au moins un triplicat biologique.

des plasmides de la famille IncF (F et R6-5) sur les séquences de R55 et RA1. La réponse SOS étant une réponse transitoire, la détermination des fréquences de transfert des plasmides Rsa, R55 et RA1 a permis de définir le temps de contact necessaire à l'obtention d'une efficacité de transfert d'au moins 10^{-4} pour mesurer l'activation de la réponse SOS dans les transconjugants (figure 47). Dans le cas des plasmides R55 (IncC) et RA1 (IncA), les événements de transfert ont eu lieu pendant la première heure de contact alors que pour le plasmide Rsa (IncW), les transferts ont eu lieu entre la première et la deuxième heure de contact. Les temps de contact de conjugaison choisis pour la détermination des activités β-galactosidases ont été de 1 heure pour les plasmides R55 et RA1 et 2 heures pour le plasmide Rsa. Des expériences de conjugaison sur filtre ont été réalisées entre les souches d'*E. coli* TOP10 (*recA*-, ΔlacZ) portant les plasmides conjugatifs (population donneuse) et d'*E. coli* MG1655 portant des plasmides rapporteurs pMP002 ou pMP010 (population receveuse). Les plasmides pMP002 et pMP010 ont été construits à partir des plasmides pQF50-Amp (Farinha and Kropinski, 1990) et pQF50-Chl (Robbe-Saule et al., 1997) et permettent l'expression du gène rapporteur *lacZ* sous contrôle du promoteur du gène *recN* d'*E. coli* régulé par la réponse SOS. L'activité β-galactosidase basale par bactérie receveuse a été déterminée en mettant en contact sur filtre une population de TOP10 sans plasmide conjugatif avec une population de receveuses MG1655 pMP002 (ou pMP010) selon les conditions de mise en contact des expériences de conjugaison. Les activités β-galactosidase basales par cellule receveuse ont été déterminées après 1h de contact ($6{,}64.10^{-8}$ unités Miller) et 2h de contact ($2{,}72.10^{-7}$ unités Miller) (figure 48A). Par la suite, les expériences de conjugaison ont été réalisées entre la souche TOP10 portant les plasmides conjugatifs d'intérêt (R55, RA1 ou Rsa) et la souche receveuse portant le plasmide rapporteur de l'induction de la réponse SOS par la production de β-galactosidase. L'activité β-galactosidase des mélanges de conjugaison a été mesurée en parallèle des étalements bactériens pour le dénombrement des populations de donneurs, de receveurs et de transconjugants. L'activité β-galactosidase spécifique par transconjugant a été obtenue par attribution aux transconjugants de l'activité β-galactosidase de l'échantillon restante après retrait de l'activité basale des receveuses (figure 48B ; cf Etude expérimentale II.B. Activation de la réponse SOS par l'entrée conjugative de plasmides). Les activités β-galactosidases spécifiques par transconjugant étaient de $2{,}19.10^{-3}$ unités Miller pour Rsa, $1{,}42.10^{-4}$ unités Miller pour R55 et $1{,}08.10^{-5}$ unités Miller pour RA1. La figure 48C présente le ratio entre l'activité spécifique par transconjugant et l'activité basale par cellule receveuse. Les activités β-galactosidases par transconjugant par rapport aux activités basales par cellule receveuse ont augmenté d'un facteur 8050 pour Rsa, 2412 pour R55 et 183 pour RA1. Ces résultats ont mis en évidence une forte induction de la réponse SOS dans les transconjugants ayant acquis les plasmides Rsa et R55 ainsi qu'une induction un plus modérée pour les transconjugants ayant acquis le plasmide RA1. La présence du gène *ssb* sur les plasmides IncC ne semble pas inhiber

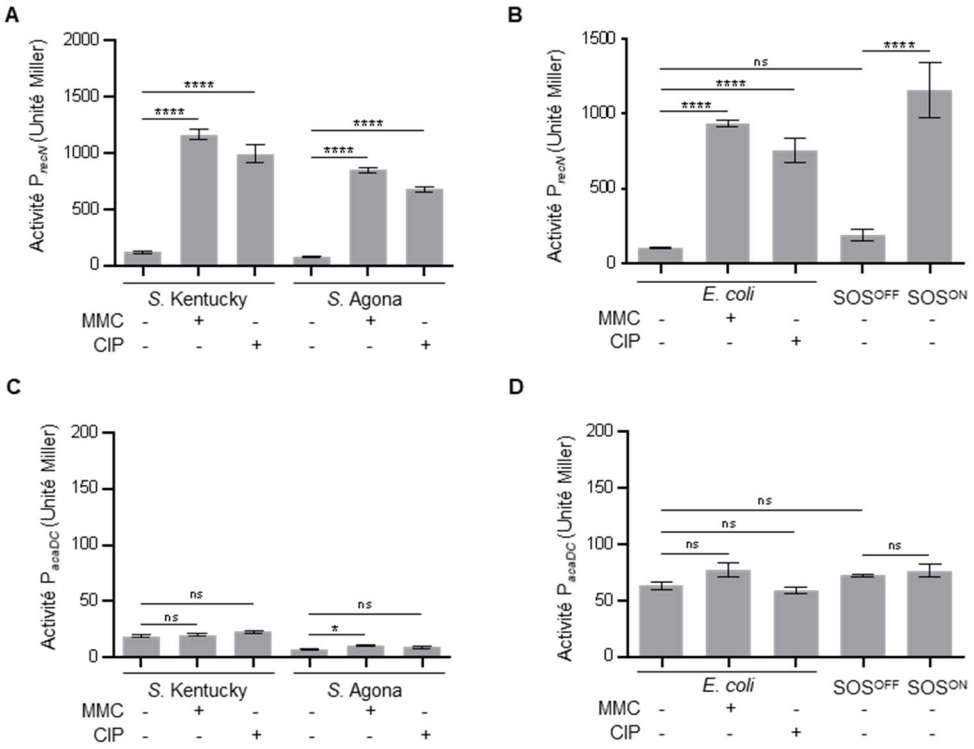


Figure 49 : Activités du promoteur P_{recN} et P_{acaDC} chez *S. enterica* et *E. coli*.
A) Activités promotrices de P_{recN} avec induction ou non de la réponse SOS par la mitomycine C (MMC) ou la ciprofloxacine (CIP) chez *S.* Kentucky ST198 et *S.* Agona sans SGI1 **B)** Activités promotrices de P_{recN} chez *E. coli* MG1655 avec induction ou non par la MMC et la CIP, MG1655 *lexA3* (SOS^{OFF}) et MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}) **C)** Activités promotrices de P_{acaDC} avec induction ou non de la réponse SOS par la mitomycine C (MMC) ou la ciprofloxacine (CIP) chez *S.* Kentucky ST198 et *S.* Agona sans SGI1 **D)** Activités promotrices de P_{acaDC} chez *E. coli* MG1655 avec induction ou non par la MMC et la CIP, MG1655 *lexA3* (SOS^{OFF}) et MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}).
Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'au moins un triplicat biologique couplé avec un duplicat technique. Le test statistique One-way ANOVA utilisant le test de comparaison multiple de Dunnett a été appliqué entre les conditions. La significativité statistique est représentée par : **** P<0,0001 ; ns non significative.

l'induction de la réponse SOS dans les transconjugants en comparaison avec le plasmide RA1.

B. Régulation de *sgaDC* et *sgiAT* par la réponse SOS

1. Régulation des activités promotrices de P_{sgaDC} et P_{sgiAT} par la réponse SOS

Les plasmides pQF50-Amp et pQF50-Chl ont également été utilisés pour étudier la régulation des régions promotrices de *sgaDC* (P_{sgaDC}) et *sgiAT* (P_{sgiAT}) par la réponse SOS. Différents plasmides pMPs (tableau 7) ont été construits avec la séquence codante du gène *lacZ* sous contrôle des régions promotrices P_{sgaDC}, P_{sgiAT}, P_{acaDC} (région promotrice des activateurs transcriptionnels *acaDC* des plasmides IncC) et P_{recN} (région promotrice du gène *recN* issue d'*E. coli* ou de *Salmonella enterica* régulée par la réponse SOS). Les souches *E. coli* MG1655 sauvages, *E. coli* MG1655 *lexA3*, *E. coli* MG1655 *lexA51* ont été utilisées pour quantifier les activités promotrices en contexte d'activation ou non de la réponse SOS. Lors de cette étude, des souches de deux sérotypes de *Salmonella enterica* (*S. enterica*) de terrain ont également été utilisées : *S. enterica* sérotype Agona 959SA97ΔSGI1, *S. enterica* sérotype Agona 47SA97 (avec SGI1-C) et *S. enterica* sérotype Kentucky ST198 11-0799 avec et sans SGI1-C. La souche de terrain *S.* Agona 959SA97 a été isolée initialement avec SGI1 puis l'élément a été délété (Huguet et al., 2016). La souche de *S.* Agona 47SA97 est une souche de terrain dans laquelle a été caractérisé le variant SGI1-C (Boyd et al., 2002). La souche de *S.* Kentucky ST198 11-0799 est également une souche de terrain ne possédant pas initialement de variant de SGI1. Le sérotype Kentucky ST198 présente la particularité de n'héberger que les variants de SGI1 avec une délétion des gènes S005 à S009, région comprenant donc les gènes des régulateurs transcriptionnels *sgaDC* : SGI1-K, SGI1-P et SGI1-Q (Hawkey et al., 2019). Dans le cas des souches d'*E. coli*, la mutation *lexA3* ne permet pas l'auto-protéolyse de LexA, entrainant une réponse SOS ne pouvant pas être activée (SOS^{OFF}) (Little et al., 1980; Mount et al., 1972). Au contraire, la mutation *lexA51* ne permet pas la fixation de LexA sur ses sites, entrainant une réponse SOS en permanence activée (SOS^{ON}) (Fernández De Henestrosa et al., 2000; Mount, 1977). Dans le cas des souches sauvages, l'utilisation de la mitomycine C (MMC) ou de la ciprofloxacine (CIP) permet d'activer la réponse SOS. L'utilisation des plasmides pMP007 et pMP010 (*lacZ* sous contrôle des promoteurs P_{recN}) ont confirmé l'activation de la réponse SOS par l'utilisation de la MMC et de la CIP dans les différentes souches sauvages ainsi que dans le cas des mutants d'*E. coli* de la réponse SOS (figure 49A, 49B et annexe 1A et 2B). L'activité promotrice du promoteur P_{acaDC} (pMP008 et pMP016), ne contenant pas de motif de fixation de la protéine LexA, est restée stable en contexte d'activation ou non de la réponse SOS (figure 49C, 49D et annexe 1C et 1D). Les activités β-galactosidases des plasmides pQF50-Amp

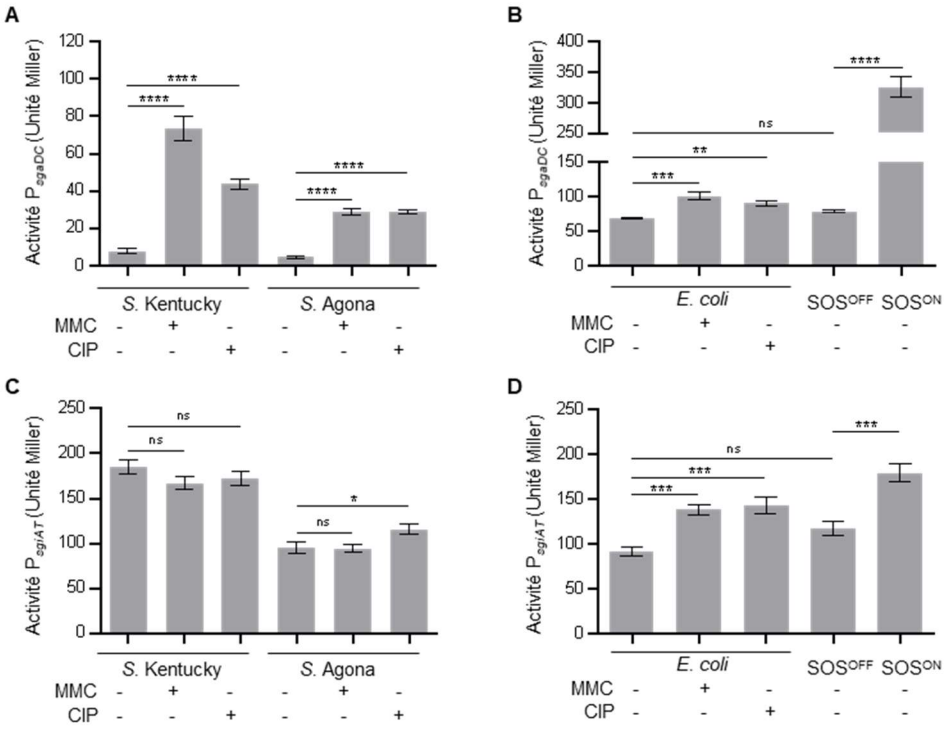


Figure 50 : Activités du promoteur P_{sgaDC} et P_{sgiAT} chez *S. enterica* et *E. coli*.
A) Activités promotrices de P_{sgaDC} avec l'induction ou non de la réponse SOS par la mitomycine C (MMC) ou la ciprofloxacine (CIP) chez *S.* Kentucky ST198 et *S.* Agona sans SGI1 **B)** Activités promotrices de P_{sgaDC} chez *E. coli* MG1655 avec l'induction ou non de la réponse SOS par la MMC ou la CIP, MG1655 *lexA3* (SOS^{OFF}) et MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}) **C)** Activités promotrices de P_{sgiAT} avec l'induction ou non de la réponse SOS par la mitomycine C (MMC) ou la ciprofloxacine (CIP) chez *S.* Kentucky ST198 et *S.* Agona sans SGI1 **D)** Activités promotrices de P_{sgiAT} chez *E. coli* MG1655 avec l'induction ou non de la réponse SOS par la MMC ou la CIP, MG1655 *lexA3* (SOS^{OFF}) et MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}).
Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'au moins un triplicat biologique couplé avec un duplicat technique. Le test statistique One-way ANOVA utilisant le test de comparaison multiple de Dunnett a été appliqué entre les conditions. La significativité statistique est représentée par : **** P<0,0001 ; *** P<0,001 ; ** P<0,01 ; * P<0,05 ; ns non significative.

et pQF50-Chl, contenant la séquence codante du gène lacZ sans promoteur, sont également restées stable dans les différents fonds génétiques utilisés (annexe 2).

a. Région promotrice de *sgaDC*

Les activités de la région promotrice des activateurs transcriptionnels *sgaDC* ont été quantifiées chez *S. enterica* (figure 50A) et chez *E. coli* (figure 50B) en contexte d'activation ou non de la réponse SOS. L'activation de la réponse SOS par les traitements à la MMC et à la CIP dans les deux sérotypes de *S. enterica* a entrainé de fortes augmentations de l'activité promotrice de P_{sgaDC}. Dans le cas de *S.* Kentucky l'activation de la réponse SOS a accru l'activité promotrice de P_{sgaDC} d'un facteur 9,25 avec la MMC et 5,51 avec la CIP. Pour *S.* Agona, les augmentations de l'activité promotrice de P_{sgaDC} ont été d'un facteur 6,13 avec la MMC et 6,14 avec la CIP. Concernant la souche sauvage d'*E. coli*, l'activation de la réponse SOS a entrainé une hausse modérée de l'activité promotrice de P_{sgaDC} (d'un facteur ~1,5). Néanmoins, dans la souche SOS^{ON} l'activité de la région promotrice de *sgaDC* a augmenté d'un facteur 4,16 par rapport à la souche SOS^{OFF}. La région promotrice de *sgaDC* semblerait donc être régulée par la réponse SOS chez les sérotypes Kentucky et Agona de *S. enterica* mais également, dans une moindre mesure, chez les souches d'*E. coli* utilisées. En condition sauvage, l'activation de la réponse SOS par les traitements à la MMC ou à la CIP sembleraient avoir un effet plus important sur l'activité promotrice de P_{sgaDC} chez *S. enterica* que chez *E. coli*. L'ajout de SGI1 dans les différentes souches sauvages n'a pas entrainé de modifications majeures de l'activité promotrice de P_{sgaDC} hormis dans le cas de la souche SOS^{ON} (annexe 3A et 3B).

b. Région promotrice de *sgiAT*

Les activités de la région promotrice du système TA *sgiAT* ont été quantifiées chez *S. enterica* (figure 50C) et chez *E. coli* (figure 50D) en contexte d'activation ou non de la réponse SOS. L'induction de la réponse SOS par l'utilisation de la MMC ou de la CIP n'a pas semblé impacter l'activité promotrice de P_{sgiAT} chez les sérotypes Kentucky et Agona de *S. enterica*. Néanmoins, chez *E. coli*, l'activité promotrice de P_{sgiAT} a augmenté suite à l'activation de la réponse SOS par l'utilisation de la MMC (x1,5) et de la CIP (x1,55). Cette observation a également été confirmée dans la souche SOS^{ON} par rapport à la souche SOS^{OFF}. Il semblerait que la région promotrice de P_{sgiAT} pourrait être régulée par la réponse SOS chez les souches d'*E. coli* utilisées, mais pas chez les sérotypes Kentucky et Agona de *S. enterica*. Comme avec la région promotrice précédente, l'ajout de SGI1 dans les différentes souches n'a pas entrainé de modifications majeures de l'activité promotrice de P_{sgaDC} hormis dans le mutant SOS^{ON} (anexe 3C et 3D).

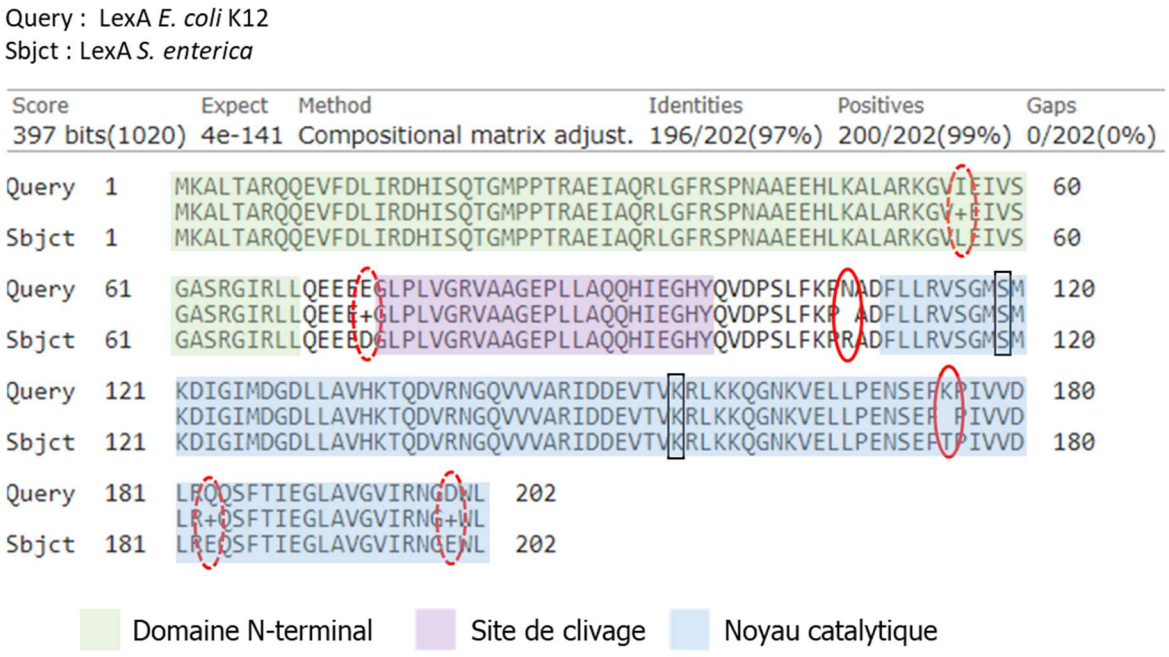


Figure 51 : Alignement des séquences en acides aminés des protéines LexA d'*E. coli* et de *S. enterica*.
Alignement des séquences en acides aminés des protéines LexA de *S. enterica* et *E. coli*. La région du domaine N-terminal (Met-1 à Leu-69) est indiquée en vert, la région du site de clivage (Gly-75 à Tyr-98) en violet et la région du noyau catalytique en bleu. La dyade catalytique Ser-119/Lys-156 est indiquée par les rectangles noirs. Les régions charnières sont laissées en fond blanc. Les mutations similaires sont indiquées par des cercles rouges en pointillés et les mutations non similaires par des cercles rouges en trait plein.

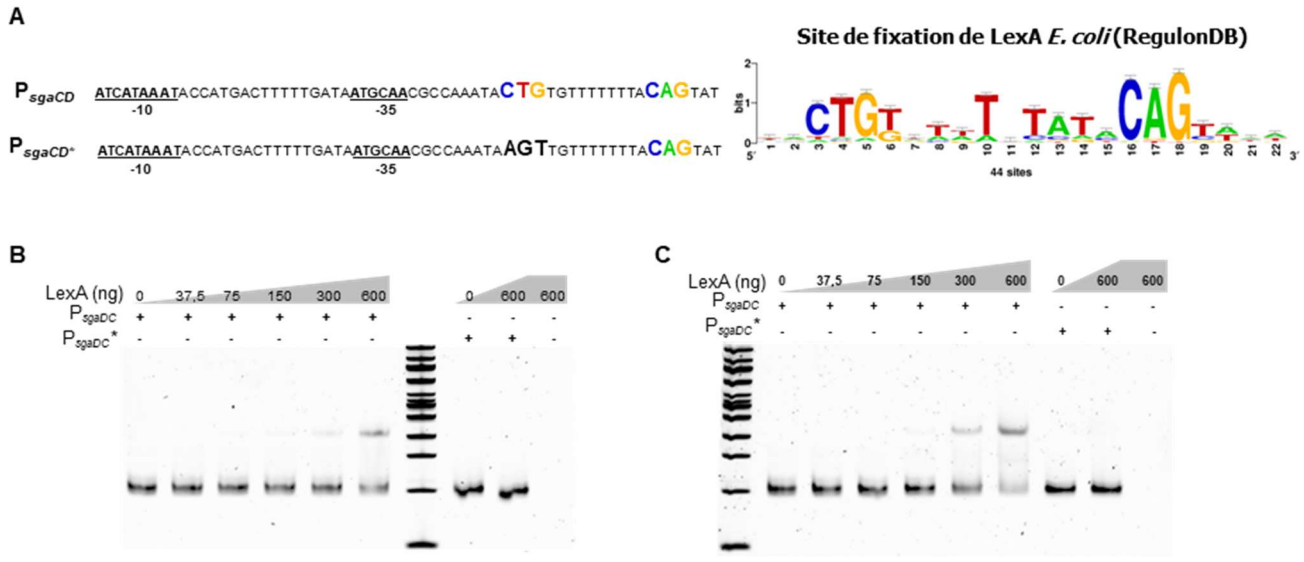


Figure 52 : Retards sur gel des sondes P_{sgaDC} et P_{sgaDC}* avec les protéines LexA de *S. enterica* et *E. coli*.
A) Séquence du potentiel site de fixation de la protéine LexA dans la région promotrice de *sgaDC* native de la sonde P_{sgaDC} et mutée pour la sonde P_{sgaDC}*. **B)** Retards sur gel de 40 ng des sondes P_{sgaDC} et P_{sgaDC}* en présence de différentes quantités de protéines LexA issues de *S. enterica*. **C)** Retards sur gel de 40 ng des sondes P_{sgaDC} et P_{sgaDC}* en présence de différentes quantités de protéines LexA issues d'*E. coli*.

2. Fixation de LexA dans la région promotrice de s*gaDC* mais pas de *sgiAT*

Ayant pu observer des différences entre les sérotypes de *S. enterica* et *E. coli*, en particulier sur la régulation du promoteur de *sgiAT*, nous avons recherché par alignement de séquences des différences entre les protéines LexA issues d'*E. coli* et de *S. enterica*. La comparaison des séquences en acides aminés des protéines LexA issues de différents sérotypes de *S. enterica* (plus de 3000 séquences comprenant les sérotypes Kentucky et Agona) via l'outil d'alignement de séquences BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) a montré une conservation stricte de la séquence (100% d'identité). La figure 51 présente l'alignement des séquences en acides aminés des protéines LexA d'*E. coli* K12 avec celle de *S. enterica* obtenu via l'outil d'alignement de séquences BLAST. Les séquences des protéines LexA présentent une conservation élevée entre ces deux espèces (97% d'identité) mais avec tout de même quelques différences : une mutation similaire dans le domaine N-terminal impliqué dans la fixation à l'ADN, 3 mutations (dont une non similaire) dans la région du noyau catalytique et 2 mutations (similaire et non similaire) dans les régions charnières. Bien que les différences soient faibles entre ces protéines, les fixations des protéines LexA issues d'*E. coli* et de *S. enterica* ont été testées dans les régions promotrices de *sgaDC* et *sgiAT* par la technique de retard sur gel (ou EMSA : electrophoretic mobility-shift assay). Cette technique permet de mettre en évidence des interactions physiques protéines-ADN et donc de confirmer ou non la fixation des protéines LexA sur ses sites potentiels.

a. Fixation de LexA dans la région promotrice de *sgaDC*

La sonde P_{sgaDC} comprend le site potentiel de fixation de la protéine LexA dans la région promotrice de *sgaDC* de SGI1 et la sonde P_{sgaDC}* présente une mutation au niveau du motif CTG du site potentiel de fixation de la protéine LexA (figure 52A). La mutation du motif CTG ne permet pas la fixation de la protéine LexA (Da Re et al., 2009). La figure 52B présente les retards sur gel avec la protéine LexA issue de *S. enterica* et la figure 52C présente les retards sur gels avec la protéine LexA issue de *E. coli*. Les protéines LexA issues de *S. enterica* ont retardé la sonde P_{sgaDC} à partir de 600 ng alors que celles issues d'*E. coli* ont retardé la sonde P_{sgaDC} à partir de 300 ng. L'utilisation de la sonde P_{sgaDC}* mutée n'a pas permis d'observer de retard de migration en présence de 600 ng de protéines LexA issues de *S. enterica* ou d'*E. coli* (quantité de protéines suffisante pour retarder la sonde native). Ces observations ont confirmé la fixation spécifique des protéines LexA issues de *S. enterica* et d'*E. coli* sur le site potentiel de fixation dans la région promotrice de *sgaDC*.

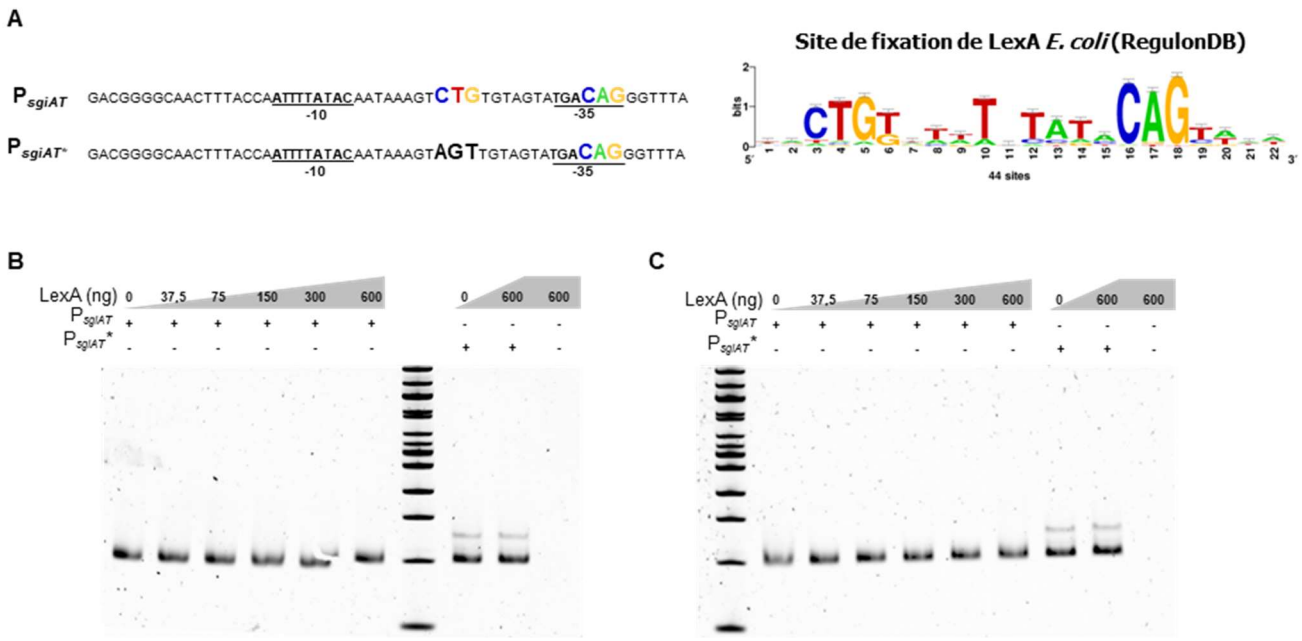


Figure 53 : Retards sur gel des sondes P*sgiAT* et P*sgiAT avec les protéines LexA de *S. enterica* et *E. coli*.**
A) Séquence du site potentiel de fixation de la protéine LexA dans la région promotrice de *sgiAT* native de la sonde P*sgiAT* et mutée pour la sonde P*sgiAT**. **B)** Retards sur gel de 40 ng des sondes P*sgiAT* et P*sgiAT** en présence de différentes quantités de protéines LexA issues de *S. enterica*. **C)** Retards sur gel de 40 ng des sondes P*sgiAT* et P*sgiAT** en présence de différentes quantités de protéines LexA issues de *E. coli*.

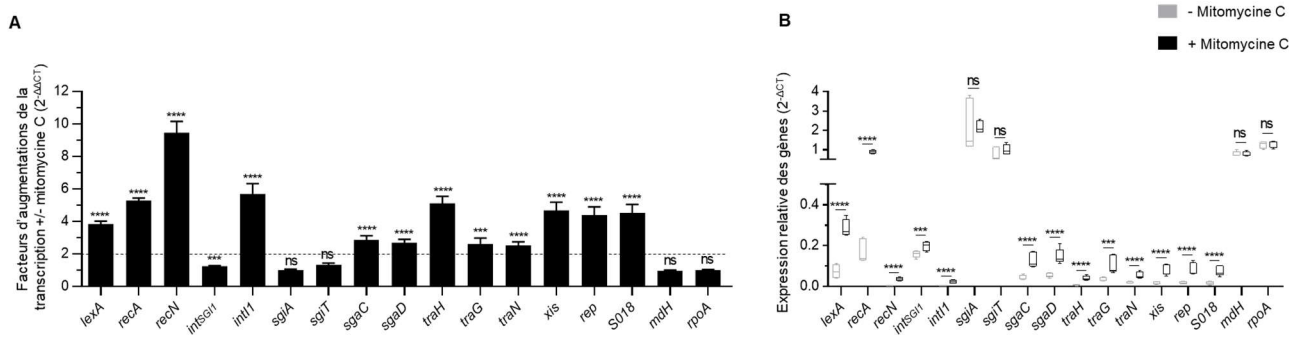


Figure 54 : Impact de la réponse SOS sur la transcription de *sgaDC* et des gènes du régulon de SgaDC chez *S.* Agona 47SA97.
A) Facteurs d'augmentation de la transcription des gènes de *S.* Agona 47SA97 (SGI1-C) induite à la MMC par rapport à la même souche non induite. Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'un triplicat biologique couplé à un triplicat technique. Le seuil limite d'augmentation d'au moins un facteur 2 est indiqué par le trait en pointillé. Le test de Student avec la méthode de Holm-Sidak a été appliqué sur les valeurs du $2^{-\Delta CT}$ de chaque gène avec et sans induction à la MMC (figure 54B). **B)** Boites à moustaches des valeurs du $2^{-\Delta CT}$ de chaque gène avec et sans induction à la MMC chez *S.* Agona 47SA97. La boite s'étend du 25ème au 75ème percentiles, la médiane est représentée par la ligne dans la boite et les moustaches s'étendent des valeurs minimales à maximales obtenues à partir d'un triplicat biologique couplé à un triplicat technique. Le test de Student avec la méthode de Holm-Sidak a été appliqué sur les valeurs du $2^{-\Delta CT}$ de chaque gène avec et sans induction à la MMC. La significativité statistique est représentée par : **** P<0,0001 ; *** P<0,001 ; ns non significative.

b. La protéine LexA ne se fixe pas dans la région promotrice de *sgiAT*

La sonde P_{sgiAT} comprend le site potentiel de fixation de la protéine LexA dans la région promotrice du système TA *sgiAT* de SGI1 et la sonde P_{sgiAT}* présente une mutation au niveau du motif CTG du site potentiel de fixation de la protéine LexA (figure 53A). La figure 53B présente les retards sur gel avec la protéine LexA issue de *S. enterica* et la figure 53C présente les retards sur gel avec la protéine LexA issue d'*E. coli*. La sonde P_{sgiAT} n'a pas semblé être retardée par les protéines LexA issues de *S. enterica* ou d'*E. coli* suggérant que ce site potentiel de fixation de LexA n'en est peut-être pas un. En effet, malgré la présence des motifs CTG et CAG séparés de 10 pb, la région centrale ne présente pas l'enrichissement en AT caractéritique des sites de fixation de la protéine LexA. De plus la recherche de séquences de régulation par l'outil RSAT (tableau 5) avait attribué à ce site potentiel de fixation de la protéine LexA un poids de 3,8 avec une *P*-value de 4.10^{-4}, valeurs bien plus faibles que celles du site LexA caractérisé dans le promoteur de *intI1* (poids de 12,7 et *P*-value de $3{,}5.10^{-7}$).

3. Régulation transcriptionnelle de *sgaDC* et de son régulon par la réponse SOS

a. Chez *S.* Agona 47SA97

Après la quantification de l'activité de la région promotrice de *sgaDC* en systèmes artificiels, l'effet de l'activation de la réponse SOS sur la transcription de *sgaDC* et des gènes du régulon de SgaDC a été mesuré (figure 54). Des expériences de RT-qPCR en microfluidique avec le Biomark HD de Fluidigm ont été réalisées en utilisant les amorces présentées en tableau 8 sur les ARN extraits des cultures de *S.* Agona 47SA97 (SGI1-C) en condition de réponse SOS induite et non induite. La figure 54A présente les facteurs d'augmentation de la transcription ($2^{-\Delta\Delta CT}$) correspondant au ratio des $2^{-\Delta CT}$ des gènes en condition d'induction de la réponse SOS par l'utilisation de la MMC par rapport au $2^{-\Delta CT}$ des gènes en condition non induite (figure 54B). L'induction de la réponse SOS par le traitement à la MMC a été confirmée par l'augmentation des expressions des gènes du régulon SOS : *lexA* (x3,85), *recA* (x5,30), *recN* (x9,46) et *intI1* (x5,70). Le traitement à la MMC n'a pas impacté l'expression du premier gène de SGI1 int_{SGI1} (augmentation d'un facteur 1,26) ne présentant pas de site potentiel de fixation de la protéine LexA dans sa région promotrice. L'induction de la réponse SOS n'a pas entrainé de modification dans l'expression des gènes du système TA de SGI1 *sgiAT* (augmentation d'un facteur 1,03 pour *sgiA* et 1,35 pour *sgiT*). Bien que non impactées par la réponse SOS, les valeurs des $2^{-\Delta CT}$ des gènes de l'opéron *sgiAT* se sont révélées très élevées, correspondant à une forte expression transcriptionnelle (figure 54B). L'induction de la réponse SOS a entrainé une hausse de la transcription d'un facteur 2,87 de *sgaC* et d'un facteur 2,7 de *sgaD*. L'activation de la réponse SOS a égalemement conduit à l'augmentation des expressions des gènes du régulon SgaDC : *traH*(x5,12), *traG* (x2,64),

Tableau 9 : Excision et réplication de SGI1 dans la souche *S.* Agona induite ou non à la mitomycine C.
Les valeurs correspondent à la moyenne +/- l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'un triplicat biologique couplé à un triplicat technique. Le nombre de copies de *xis*, *attP* et *attB* par chromosome a été obtenu à partir du ratio des moyennes des 2^{-Ct} des cibles *xis*, *attP* et *attB* et des moyennes des 2^{-Ct} des gènes *rpoA* et *mdH* chromosomiques.

Salmonella SGI1C	MMC	Nombre de copies de SGI1 (*xis*/chr)	% de SGI1 excisés (*attP*/chr)	% de site attB vide (*attB*/chr)
47SA97	-	1,38 ± 0,04	ND	ND
47SA97	+	1,27 ± 0,02	ND	ND

MMC : Mitomycine C, Chr : Chromosome, ND : non déterminé.

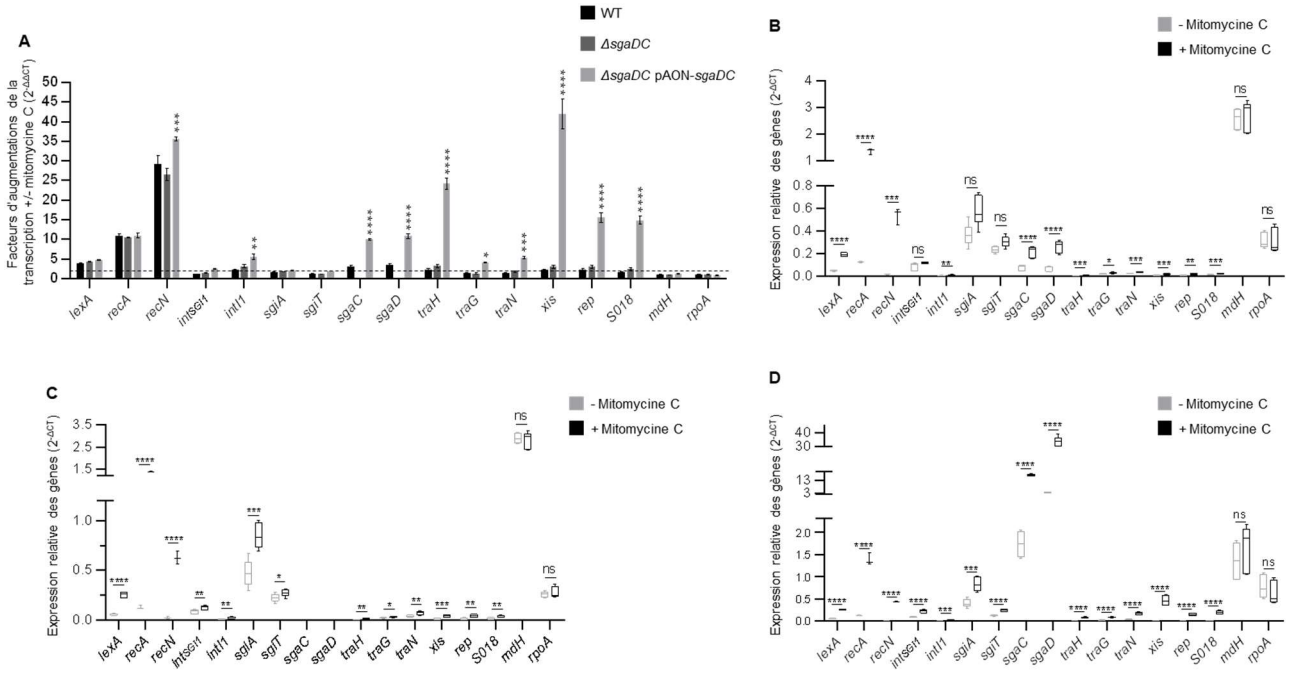


Figure 55 : Impact de la réponse SOS sur la transcription de *sgaDC* et des gènes du régulon de SgaDC chez *E. coli*.
A) Facteurs d'augmentation des transcriptions des gènes des souches d'*E. coli* MG1655 SGI1-C, MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* et MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* complémentée avec pAON-*sgaDC* induites à la MMC par rapport à la même souche non induite. Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'un triplicat biologique couplé à un duplicat technique (sauf pour *recA* et *recN* issue d'un tiplicat biologique sans répétition technique). Le seuil limite d'augmentation d'au moins un facteur 2 est indiqué par le trait en pointillé. Le test statistique two-way ANOVA utilisant le test de comparaison multiple de Dunnett a été appliqué sur les facteurs d'augmentation d'expression des gènes des souches MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* et MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* pAON-*sgaDC* par rapport à la condition sauvage MG1655 SGI1-C. La significativité statistique est représentée par : **** P<0,0001 ; *** P<0,001 ; ** P<0,01 ; * P<0,5 ; ns non significative. **B,C&D)** Boites à moustaches des valeurs du $2^{-\Delta CT}$ de chaque gène avec et sans induction à la MMC chez *E. coli* MG1655 SGI1-C (**B**), MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* (**C**) et MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* complémentée avec pAON-*sgaDC* (**D**). Les boites s'étendent du 25ème au 75ème percentiles, la médiane est représentée par la ligne dans les boites et les moustaches s'étendent des valeurs minimales à maximales obtenues à partir d'un triplicat biologique couplé à un duplicat technique (sauf pour *recA* et *recN* issue d'un tiplicat biologique sans répétition technique). Le test de Student avec la méthode de Holm-Sidak a été appliqué sur les valeurs du $2^{-\Delta CT}$ de chaque gène avec et sans induction à la MMC. La significativité statistique est représentée par : **** P<0,0001 ; *** P<0,001 ; ** P<0,01 ; * P<0,05 ; ns non significative.

traN (2,53), *xis* (x4,68), *rep* (4,41) et S018 (4,54).

L'induction de la réponse SOS ayant entrainée l'augmentation de la transcription des gènes *xis* et *rep*, les taux d'excision et le nombre de copies de SGI1 ont été mesurés par qPCR en condition d'induction ou non de la réponse SOS (tableau 9). Le nombre de copies de SGI1 par chromosome est resté stable (à ~1,3 copie par chromosome) avec induction ou non de la réponse. Le nombre de formes excisées de SGI1 a été déterminé via la quantification de sites *attP* par chromosome. Le site *attP* est formé lors de la circularisation de SGI1 et correspond à la jonction de ses extrémité 5' et 3'. Le nombre de sites vides d'attachement de SGI1 (*attB*) au niveau de l'extrémité 3' du gène *trmE* a également été quantifié par chromosome. L'excision de SGI1 du chromosome de la souche de *S.* Agona 47SA97 n'a pas pu être détectée en condition d'induction ou non de la réponse SOS (Ct des sites *attP* et *attB* supérieurs à 35 ou non déterminés). Ces données suggèrent que l'induction de la réponse SOS ne serait pas suffisante pour permettre l'excision et la réplication de SGI1 dans la souche *S.* Agona malgré l'augmentation de la transcription des gène *xis* et *rep*.

b. Chez *E. coli*

Après ces premiers résultats de RT-qPCR chez *S.* Agona suggérant l'augmentation de la transcription de *sgaDC* et des gènes du régulon de SgaDC par l'activation de la réponse SOS, les mêmes expériences ont été réalisées dans les souches d'*E. coli* MG1655 SGI1-C, MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* et MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* complémentée avec pAON-*sgaDC* (figure 55). Le plasmide pAON-*sgaDC* est un plasmide à bas nombre de copies (~10 par chromosome) portant l'opéron S008-*sgaCD* sous contrôle de sa région promotrice native (contenant le site potentiel de fixation de la protéine LexA). L'induction de la réponse SOS par le traitement à la MMC dans la souche sauvage MG1655 SGI1-C, a été confirmée par l'augmentation de l'expression des gènes du régulon SOS : *recA* (x3,84), *lexA* (x10,87), *recN* (x29,15) et *intI1* (x2,21). L'induction de la réponse SOS n'a pas impacté les expressions des gènes int_{SGI1} (x1,32), *sgiA* (x1,57) et *sgiT* (x1,31). Bien que l'induction de la réponse SOS ait entrainé une hausse de l'expression de *sgaC* d'un facteur 3,16 et de *sgaD* d'un facteur 3,48, les expressions des gènes du régulon SgaDC n'ont été que peu impactées. De ce fait, la délétion de *sgaDC* chez *E. coli* n'a pas permis de constater de différences majeures dans l'expression des gènes du régulon de SgaDC. Néanmoins, la présence de l'opéron S008-*sgaDC* en multicopies chez *E. coli*, via le plasmide pAON-*sgaDC*, a permis de constater une forte induction transcriptionnelle de *sgaC* (x10,02) et *sgaD* (10,83) suite à l'activation de la réponse SOS mais également des gènes du régulon de SgaDC : *traH* (x24,22), *traG* (x4,14), *traN* (x5,37), *xis* (x41,92), *rep* (x15,6) et S018 (x14,85). Les augmentations transcriptionnelles beaucoup plus élevées de *sgaDC* et des gènes de son régulon par l'activation de la

Tableau 10 : Excision et réplication de SGI1 dans les souches *E. coli* induites ou non à la mitomycine C.
Les valeurs correspondent à la moyenne +/- l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'un triplicat biologique couplé à un triplicat technique. Le nombre de copies de *xis*, *attP* et *attB* par chromosome a été obtenu à partir du ratio des moyennes des 2^{-Ct} des cibles *xis*, *attP* et *attB* et des moyennes des 2^{-Ct} des gènes *rpoA* et *mdH* chromosomiques.

E. coli SGI1C	MMC	Nombre de copies de SGI1 (*xis*/chr)	% de SGI1 excisés (*attP*/chr)	% de site attB vide (*attB*/chr)
WT	-	1,05 ± 0,04	ND	ND
WT	+	1,07 ± 0,03	ND	ND
Δ*sgaDC*	-	1,03 ± 0,02	ND	ND
Δ*sgaDC*	+	1,05 ± 0,02	ND	ND
Δ*sgaDC*-pAON*sgaDC*	-	1,06 ± 0,04	0,13% 0,0013 ± 6,2 10^{-5}	0,02% 0,0002 ± 8,9 10^{-6}
Δ*sgaDC*-pAON*sgaDC*	+	1,06 ± 0,03	13% 0,13 ± 0,004	6% 0,06 ± 0,002

MMC : Mitomycine C, Chr : Chromosome, WT : wild type (sauvage), ND : non déterminé.

réponse SOS dans la souche complémentée par rapport à la souche sauvage pourrait être dû à l'augmentation du nombre de copies de l'opéron S008-*sgaDC.* En effet le plasmide pAON-*sgaDC* est présent à environ 10 copies par chromosome (origine de réplication p15a) alors que SGI1 intégré au chromosome n'est présent qu'à une seule copie. L'augmentation du nombre de copies de l'opéron S008-*sgaDC* sous contrôle de sa propre région promotrice dans les cellules a pu permettre de décupler l'impact modéré de la réponse SOS constaté dans la souche d'*E. coli* sauvage. L'induction de la réponse SOS dans la souche complémentée a entrainé des augmentations de la transcription des gènes du régulon SOS (*lexA*, *recA*, *recN* et *intI1)* similaires à celles de la souche sauvage. Comme dans le cas de la souche sauvage, les expressions transcriptionnelles des gènes int_{SGI1}, *sgiA* et *sgiT* n'ont pas été impactées par l'activation de la réponse SOS.

Les taux d'excision et le nombre de copies de SGI1 ont été mesurés par qPCR sur des échantillons des cultures utilisées pour les RT-qPCR (tableau 10). L'induction de la réponse SOS n'a pas impacté le nombre de copies de SGI1 (environ 1 par chromosome) dans les 3 souches d'*E. coli* MG1655 SGI1-C, MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* et MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* pAON-*sgaDC*. L'excision de SGI1 a été indétectable dans les souches d'*E. coli* MG1655 SGI1-C et MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* induites ou non à la MMC. Une très faible quantité d'excision de SGI1 a été détectée dans la souche MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* pAON-*sgaDC* sans induction de la réponse SOS : 0,13% de sites *attP* par chromosome et 0,02% de sites *attB* par chromosome. Enfin, un taux d'excision de SGI1 aux alentours de 10% (13% avec *attP* et 6% avec *attB*) a été détecté dans la souche MG1655 SGI1-CΔ*sgaDC* pAON-*sgaDC* en condition d'induction de la réponse SOS.

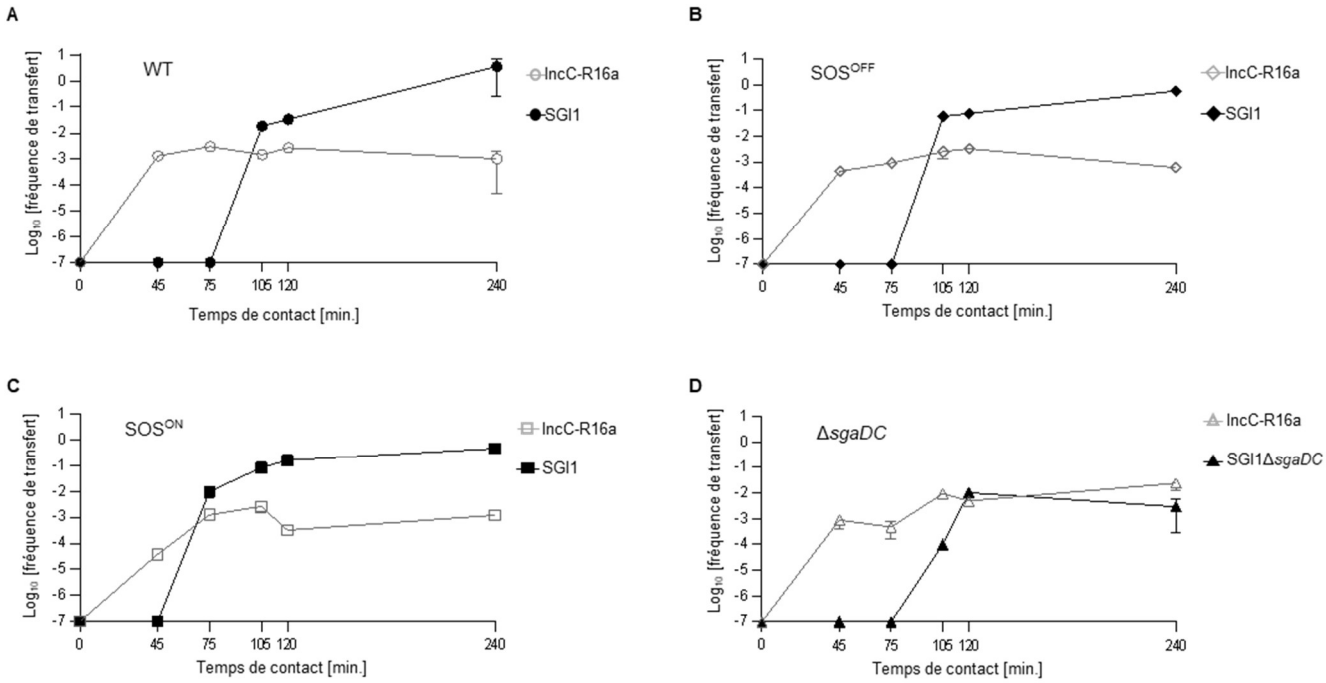


Figure 56 : Cinétique des fréquences de transfert du plasmide IncC (R16a) et SGI1 dans différents fonds génétiques.
Les fréquences de transfert du plasmide R16a (IncC) en gris et de SGI1 en noir sont représentées selon les différents temps de contact des conjugaisons tripartites. Deux populations d'*E. coli* portant le plasmide IncC (donneur #1) ou SGI1 (donneur #2) ont été mises en contact avec une population d'*E. coli* J5-3 (receveur) à ratio 1:1:1. Dans toutes les expérimentations, le plasmide R16a a été porté par la souche sauvage MG1655. Différents donneurs #2 portant SGI1 ont été utilisés : **A)** MG1655 SGI1, **B)** MG1655 *lexA3* (SOS^{OFF}) SGI1, **C)** MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}) SGI1 et **D)** MG1655 SGI1Δ*sgaDC*.

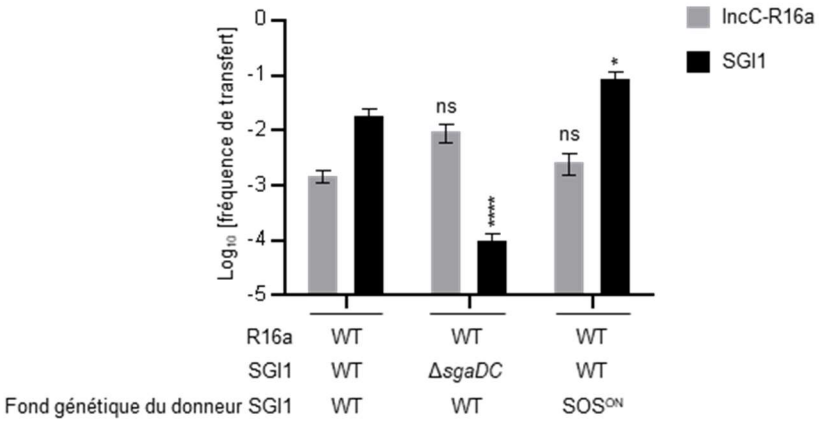


Figure 57 : Fréquence de transfert de R16a et SGI1 après 1h45 de contact en conjugaison tripartite.
Les fréquences de transfert du plasmide R16a (IncC) en gris et de SGI1 en noir sont représentées après 1h45 de contact en conjugaison tripartite. Deux populations d'*E. coli* portant le plasmide IncC (donneur #1) ou SGI1 (donneur #2) ont été mises en contact avec une population d'*E. coli* J5-3 (receveur) à ratio 1:1:1. Dans toutes les expérimentations, le plasmide R16a a été porté par la souche sauvage MG1655. Différents donneurs #2 portant SGI1 ont été utilisés : MG1655 SGI1, MG1655 SGI1Δ*sgaDC* et MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}). Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'au moins un triplicat biologique. Le test statistique One-way ANOVA utilisant le test de comparaison multiple de Dunnett a été appliqué sur les valeurs logarithmiques des conditions MG1655 SGI1Δ*sgaDC* et MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}) SGI1 par rapport à la condition sauvage MG1655 SGI1 (première barre). La significativité statistique est représentée par : ****, P<0,0001 ; *, P<0,05 ; ns, non significative.

C. Chronologie des transferts du plasmide IncC et de SGI1

Les phénomènes d'incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncC entrainant leur séparation rapide dans la population bactérienne complexifient la détermination des fréquences de transfert (déterminées selon le ratio transconjugants/donneurs) de ces éléments conjugatifs. Classiquement, les expériences de conjugaison déterminant les fréquences de transfert de SGI1 ont été réalisées à partir d'une population de bactéries donneuses portant SGI1 et un plasmide IncC, excluant l'effet que pourrait avoir l'entrée des plasmides IncC sur le transfert de SGI1. Nous avons donc développé une nouvelle approche basée sur des expériences de conjugaison tripartite pour étudier l'impact de l'entrée par conjugaison des plasmides IncC dans des bactéries hébergeant SGI1. La souche d'*E. coli* MG1655 portant un plasmide IncC (donneur #1 IncC^{+}) a été mise en contact avec une seconde souche d'*E.coli* portant SGI1 (donneur #2 SGI1^{+}) et une troisième souche d'*E. coli* J5-3 sans élément génétique mobile (receveur). Ces trois populations bactériennes ont été mises en contact à ratio 1:1:1 au cours d'expériences de conjugaison sur filtre. Après différents temps de contact, les fréquences de transfert du plasmide IncC (R16a) et de SGI1 ont été déterminées (figure 56). Les fréquences de transfert du plasmide IncC correpondent au ratio des transconjugants J5-3 R16a par rapport aux donneurs R16a (R16a^{+}) aux différents temps de contact. Les fréquences de transfert de SGI1 correspondent au ratio des transconjugants J5-3 SGI1 par rapport aux donneurs SGI1 (SGI1^{+} R16a^{+}). Le transfert de SGI1 nécessite la présence du plasmide R16a et donc préalablement de l'entrée du plasmide par conjugaison dans les bactéries hébergeant initialement SGI1. En contexte sauvage (figure 56A), l'efficacité de transfert du plasmide IncC a atteint rapidement une valeur de ~10^{-3} après 45 minutes de contact et reste stable au cours du temps. Dans ces mêmes conditions, la fréquence de transfert de SGI1 était inférieure à la limite de détection (10^{-7}) jusqu'à un pic de transfert après 1h45 de contact (fréquence de transfert de $1{,}9.10^{-2} \pm 5{,}21.10^{-3}$). La fréquence de transfert de SGI1 a augmenté au cours du temps jusqu'à atteindre une valeur de ~10^{0} après 4h de contact. Des résultats similaires à ceux de la condition sauvage ont été obtenus avec la souche *lexA3* (SOS^{OFF}) (figure 56B) ce qui est cohérent avec les résultats obtenus lors des expériences en système rapporteur d'activité β-galactosidase dans la souche *lexA3* (SOS^{OFF}). En contexte de réponse SOS activée dans la souche *lexA51* (SOS^{ON}) (figure 56C) les fréquences de transfert du plasmide IncC au cours du temps ont été similaires aux fréquences de transfert obtenues dans la souche sauvage. Cependant, le pic de transfert de SGI1 a été obtenu 30 min avant la condition sauvage (fréquence de transfert de $1{,}0.10^{-2} \pm 4{,}38.10^{-3}$). La fréquence de transfert de SGI1 a augmenté au cours du temps jusqu'à atteindre une valeur de $4{,}8.10^{-1}$ après 4h de contact. De plus, après 1h45 de contact, la fréquence de transfert de SGI1 de la condition SOS^{ON} a été 4,5 fois plus élevée que la fréquence de transfert de SGI1 en condition sauvage (figure 57). Ces résultats suggèrent

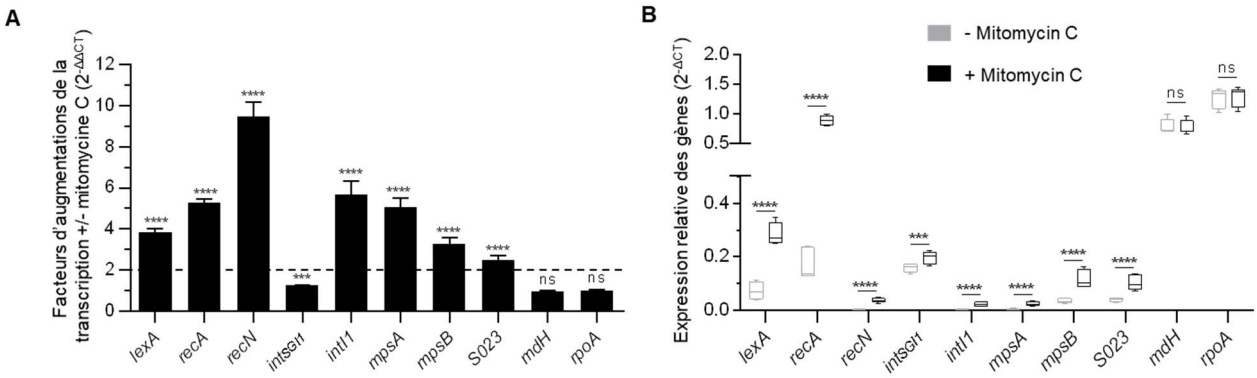


Figure 58 : Impact de la réponse SOS sur la transcription de *mpsA*, *mpsB* et S023 chez *S.* Agona 47SA97.
A) Facteurs d'augmentation des transcriptions des gènes de *S.* Agona 47SA97 induite à la MMC par rapport à la même souche non induite. Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'un triplicat biologique couplé à un triplicat technique. Le seuil limite d'augmentation d'au moins un facteur 2 est indiqué par le trait en pointillé. Le test de Student avec la méthode de Holm-Sidak a été appliqué sur les valeurs du $2^{-\Delta CT}$ de chaque gène avec et sans induction à la MMC (figure 58B). **B)** Boites à moustaches des valeurs du $2^{-\Delta CT}$ de chaque gène avec et sans induction à la MMC chez *S.* Agona 47SA97. La boite s'étend du 25ème au 75ème percentiles, la médiane est représentée par la ligne dans la boite et les moustaches s'étendent des valeurs minimales à maximales obtenues à partir d'un triplicat biologique couplé à un triplicat technique. Le test de Student avec la méthode de Holm-Sidak a été appliqué sur les valeurs du $2^{-\Delta CT}$ de chaque gène avec et sans induction à la MMC. La significativité statistique est représentée par : **** P<0,0001 ; *** P<0,001 ; ns non significative.



Figure 59 : Représentation schématique de la région de mobilisation de SGI1 (mob$_{SGI1}$).
Les promoteurs potentiels identifiés par (Kiss et al., 2019) en amont du gène *mpsB* et de l'opéron *mpsAB* sont représentés par des flèches bleues et jaunes. Les flèches bleues correspondent aux promoteurs identifiés via l'outil de recherche de régions promotrices BPROM et les flèches jaunes correspondent aux promoteurs identifiés manuellement par les auteurs. Le site potentiel de fixation de la protéine LexA dans le CDS de *mpsA* est représenté par le drapeau rouge avec sa séquence au-dessus. La sonde P_{mpsB} utilisée lors des expériences de retards de migration est représentée par un trait noir. Adapté de (Kiss et al., 2019)

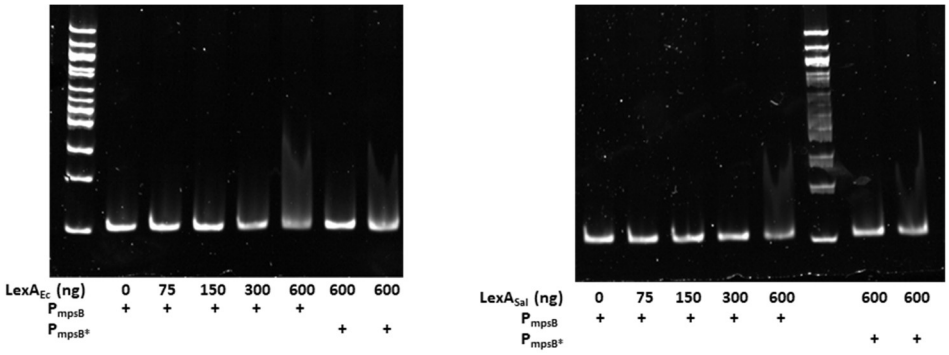


Figure 60 : Retards sur gel des sondes P_{mpsB} et P_{mpsB}* avec les protéines LexA d'*E. coli* et *S. enterica*.
Retards sur gel de 40 ng des sondes P_{mpsB} et P_{mpsB}* avec les protéines LexA issues d'*E. coli* (gauche) et de *S. enterica* (droite).

que l'activation permanente de la réponse SOS entrainerait un transfert précoce de SGI1 après l'acquision du plasmide IncC. Enfin, l'utilisation de SGI1Δ*sgaDC* (figure 56D) a confirmé l'importance de *sgaDC* pour le transfert de SGI1 en condition de conjugaison tripartite. Après 1h45 de contact, l'efficacité de transfert de SGI1Δ*sgaDC* a été mesurée 192 fois plus faible qu'en condition sauvage (figure 57). L'efficacité de transfert de SGI1Δ*sgaDC* a atteint une valeur maximale après 2h de contact (10^{-2}) mais contrairement aux autres conditions n'a pas augmenté après 4h de contact.

D. Exploration étendue de l'influence de la réponse SOS sur SGI1

L'expression des gènes de SGI1 avec un site potentiel de fixation de la protéine LexA dans leurs CDS (*mpsAB* et S023) a également été quantifiée par RT-qPCR en contexte d'activation ou non de la réponse SOS. Le site potentiel de fixation de la protéine LexA au niveau de l'opéron *mpsAB* se situe dans le dernier tiers du CDS de *mpsA* à 362 pb de l'ATG du gène *mpsB*. Le deuxième site potentiel de fixation de la protéine LexA se situe au niveau de l'extrémité 5' du gène S024 à 74 pb de l'ATG de l'ORF S023. La figure 58A représente les facteurs d'augmentation de la transcription (correspondant au $2^{-\Delta\Delta CT}$) des différents gènes issus du ratio des $2^{-\Delta CT}$ des gènes en condition d'induction à la MMC par rapport au $2^{-\Delta CT}$ des gènes en condition non induite (figure 58B). Les valeurs des gènes de contrôle (*lexA*, *recA*, *recN*, int_{SGI1}, *intI1*, *mdH* et *rpoA*) sont les mêmes que celles présentées en figure 54 étant issues de la même expérience. Ces contrôles ont permis de confirmer l'augmentation de l'expression des gènes régulés par la réponse SOS (*lexA*, *recA*, *recN* et *intI1*) mais pas des autres gènes (int_{SGI1}, *mdH* et *rpoA)* suite au traitement à la MMC. Concernant les gènes avec des sites potentiels de fixation de LexA dans les CDS, des augmentations de l'expression de *mpsA* (x5,01), *mpsB* (x3,29) et S023 (x2,51) ont été observées suite à l'induction de la réponse SOS par le traitement à la MMC. Le gène *mpsB* peut être exprimé via le promoteur de l'opéron *mpsAB* mais également via son propre promoteur localisé au niveau de l'extrémité 5' du gène *mpsA* (figure 59) (Kiss et al., 2019). Même si le site potentiel de fixation de la protéine LexA est relativement éloigné de l'ATG du gène *mpsB* (à 360 pb) il n'est pas exclu que d'autres promoteurs non identifiés pourraient être présents dans cette région.

La fixation de LexA sur le site potentiel en amont de *mpsB* a été testée par la technique de retard sur gel. Les retards sur gel des sondes P_{mpsB} et P_{mpsB}* (mutation au niveau du motif CTG du site potentiel de fixation de LexA) avec les protéines LexA d'*E. coli* et *S. enterica* sont présentés en figure 60. Aucun retard de migration n'a pu être observé suggérant que les protéines LexA d'*E. coli* et de *S. enterica* ne sembleraient pas être capables de se fixer sur le site potentiel de fixation identifié à 360 pb en amont de *mpsB*.

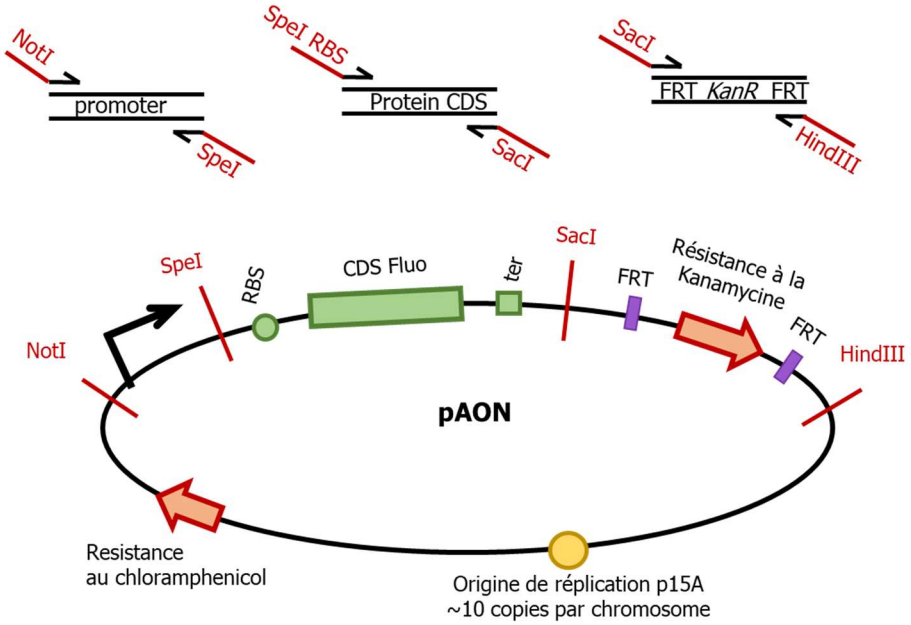


Figure 61 : Design des plasmides modulables pAON.

Tableau 11 : Origine des éléments biologiques utilisés pour la construction des plasmides pAON.

Elément biologique	Issue de	Références	Amorces PCR utilisées
Structure de base des pAON	pLYS-M1 backbone (p15A origine de réplication, résistance chloramphénicol)	Addgene 109386 / (Ceroni et al., 2018)	
PthrC3_8	pMB-Spect-PthrC3_8-EGFP	Addgene 107411 / (Anilionyte et al., 2018)	IF1-PthrC3_8-F / IF2-PthrC3_8-R
RBS n°13 EGFP			IF3-EGFP-F / IF4-EGFP-R
RBS n°13 mCherry	pJL1-mCherry	Addgene 102629 / (Stark et al., 2018)	IF3-mCherry-F / IF4-mCherry-R
RBS n°13 EBFP2	pJL1-EBFP2	Addgene 102640 / (Stark et al., 2018)	Clonage-EBFP2_F / Clonage-EBFP2_R
RBS n°28 EBFP2			Clon-RBS28-EBFP2_F / Clonage-EBFP2_R
RBS n°29 EBFP2			Clon-RBS29-EBFP2_F / Clonage-EBFP2_R
RBS n°13 ECFP	pUC18T-miniTn7T-Gm-ECFP	Addgene 65030 / (Choi and Schweizer, 2006)	Clonage-ECFP_F / Clonage-ECFP_R
RBS n°28 ECFP			Clon-RBS28-ECFP_F / Clonage-ECFP_R
RBS n°29 ECFP			Clon-RBS29-ECFP_F / Clonage-ECFP_R
FRT-Kan-FRT	pKD4	(Datsenko and Wanner, 2000)	IF5v2-FRT-F / IF6v2-FRT-R
FRT-Cm-FRT	pKD3	(Datsenko and Wanner, 2000)	IF5v2-FRT-F / IF6v2-FRT-R
P*gapA*	MG1655	/	Clon-PgapA-Ec_F /Clon-PgapA-Ec_R
RBS n°13	CAGGAGACAAAGC	(Chen et al., 2014)	
RBS n°28	CAGGAGGAGAGAG	(Chen et al., 2014)	
RBS n°29	CAGGAGAACCCAA	(Chen et al., 2014)	

E. Développement d'outils pour le suivi d'EGM au sein de populations bactériennes mixtes.

1. Design et construction des vecteurs modulables pAON-Fluo

Nous avons initié des travaux développant une approche par cytométrie en flux permettant de mesurer l'impact de la réponse SOS sur la stabilité de SGI1 et des plasmides IncC en population bactérienne simple (culture de laboratoire) et complexe (microbiote). La cytométrie en flux permet l'acquisition rapide de données sur un très grand nombre de bactéries et ce même dans le cas de cohabitation difficile entre les EGM. Un marquage spécifique de SGI1 par la protéine mCherry (florescence dans le rouge), du plasmide IncC par la protéine EGFP (enhanced green fluorescent protein, fluorescence dans le vert) et un marquage chromosomique par la protéine ECFP (enhanced cyan fluorescent protein, fluorescence dans le cyan) ou par la protéine EBFP2 (enhanced blue fluorescent protein 2, fluorescence dans le bleu) des bactéries portant initialement les EGM permettrait de suivre précisément les pertes de SGI1 et des plasmides IncC dans les populations bactériennes au cours du temps.

La première étape a été le design et la construction d'un plasmide modulable pAON-Fluo (figure 61) et le choix des différents éléments génétiques (promoteur, RBS, CDS des protéines fluorescentes, cassette de résistance pour la sélection). Les origines des différents éléments biologiques et les amorces utilisées pour les amplifier sont présentés dans les tableaux 8 et 11. Dans l'optique de pouvoir utiliser ces systèmes rapporteurs *in vivo*, les gènes des protéines fluorescentes doivent être sous contrôle d'un promoteur constitutif ne nécessitant pas d'induction ou de la présence d'autres facteurs. Le promoteur auto-inductible PthrC3_8 identifié dans la litérature est issu du promoteur PthrC modifié dans le but de permettre une expression élevée et régulière de la GFP dans divers conditions de culture (Anilionyte et al., 2018). Le promoteur endogène PthrC d'*E. coli* est suivi d'un « peptide leader » (thrL) régulant le promoteur PthrC, un terminateur de transcription (TthrL) puis des gènes impliqués dans la biosynthèse de la thréonine (Anilionyte et al., 2018). Le promoteur PthrC3_8 est constitué du promoteur PthrC, du peptide leader thrL et du terminateur TthrL muté au niveau de la structure tige boucle (Anilionyte et al., 2018). La construction *NotI*-PthrC3_8-*SpeI*-EGFP-*SacI*-FRT-Kan-FRT-*HindIII* a été obtenue par PCR Overlap avec ajout des sites de restriction sur les queues flottantes de chaque amorce. Ce fragment a été par la suite inséré dans le vecteur pLys-M1 backbone (à faible nombre de copie) aux sites de restriction *NotI-HindIII* pour obtenir le vecteur pAON-EGFP-Kan. Ce vecteur permet de modifier rapidement le promoteur, le RBS, le CDS de la protéine fluorescente ou la cassette de résistance par digestion et ligation de fragments PCR avec ajout des sites de restriction sur les queues flottantes. Les vecteurs pAON-mCherry-Kan, pAON-ECFP-Kan et pAON-EBFP2-Kan ont

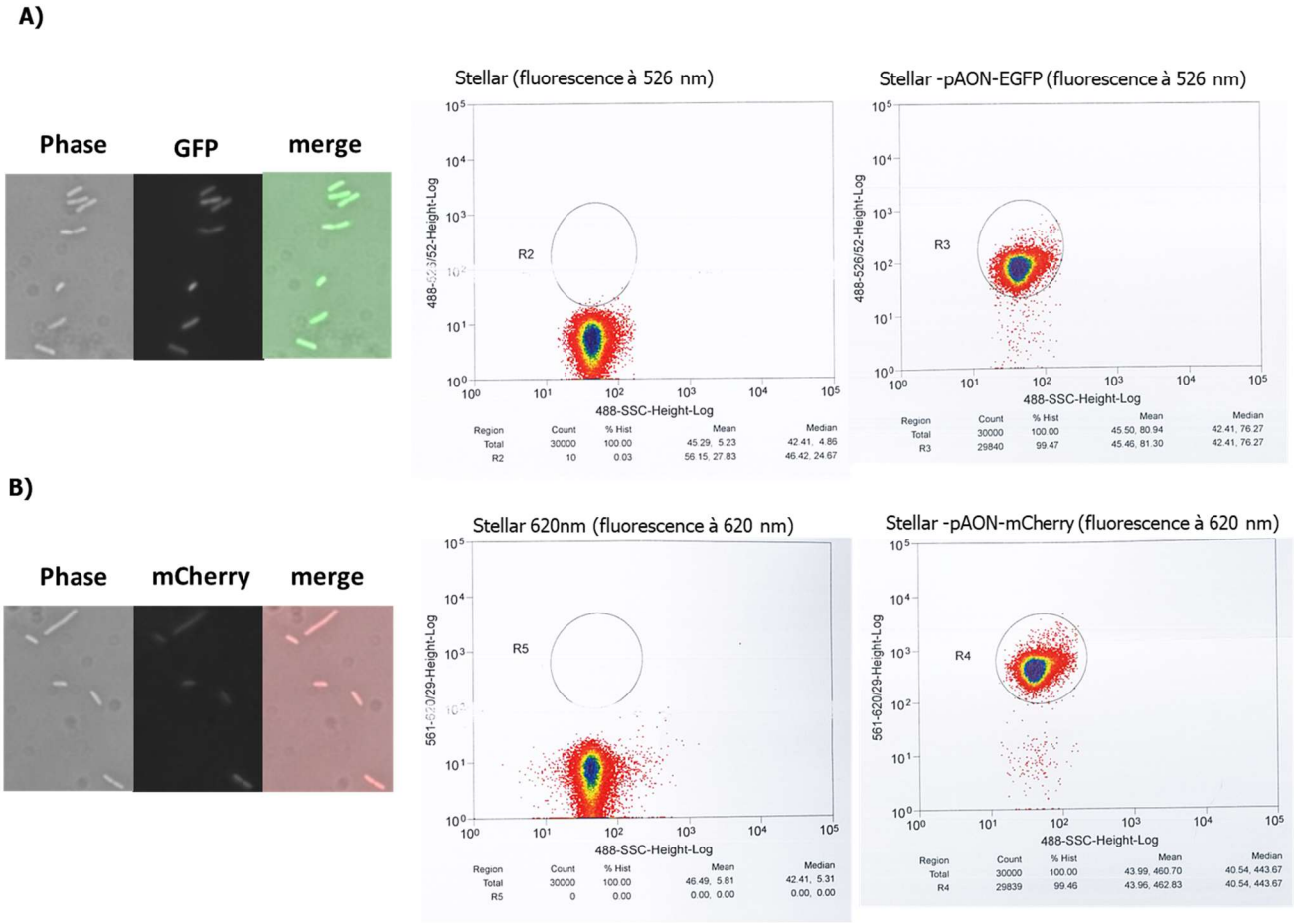


Figure 62 : Tests en microscopie et cytométrie des plasmides pAON-EGFP-Kan et pAON-mCherry-Kan.
A) Représentation des images acquises au microscope (droite) et des données de cytométrie en flux (gauche) des souches d'*E. coli* Stellar portant le plasmide pAON-EGFP. **B**) Représentation des images acquises au microscope (droite) et des données de cytométrie en flux (gauche) des souches d'*E. coli* Stellar portant le plasmide pAON-mCherry.

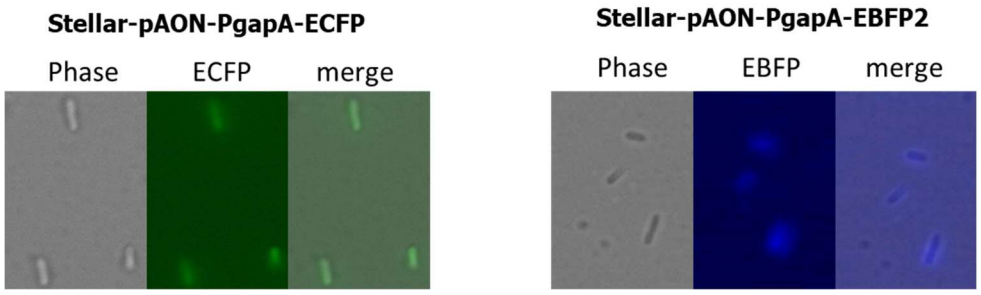


Figure 63 : Tests en microscopie des plasmides pAON-PgapA-ECFP-Kan et pAON-PgapA-EBFP2-Kan.
Représentation des images acquises au microscope des souches d'*E. coli* Stellar portant les plasmides pAON-PgapA-ECFP (à gauche) et pAON-PgapA-EBFP2 (à droite).

été construits à partir du pAON-EGFP-Kan en remplaçant le module EGFP par les CDS des protéines mCherry, ECFP et EBFP2. Le RBS de la protéine fluorescente peut également être modifié au niveau du design des queues flottantes des amorces pour l'amplification PCR des CDS des protéines fluorescentes. Ces premières constructions ont été faites avec le RBS n°13 (CAGGAGACAAAGC) issu de travaux ayant testé l'impact de différents RBS sur la transcription du gène *lacZ* (Chen et al., 2014). Les vecteurs pAON-EGFP-Chl et pAON-mCherry-Chl ont été construits à partir des vecteurs pAON-EGFP-Kan et pAON-mCherry-Kan en remplaçant la cassette de résistance à la kanamycine par la cassette de résistance au chloramphénicol du plasmide pKD3 (Datsenko and Wanner, 2000).

2. Test des promoteurs auto-inductibles et constitutifs

Les plasmides pAON avec le promoteur PthrC3_8 et les différentes protéines fluorescentes ont été testés en microscopie et cytométrie en flux. Les constructions EGFP et mCherry ont bien été détectées par microscopie et cytométrie en flux (figure 62A et 62B). La construction PthrC3_8-mCherry-FRT-Kan-FRT a été insérée en replacement de l'intégron de SGI1-C dans la souche MG1655 SGI1-C pKD46 par la technique de Datsenko et Wanner (Datsenko and Wanner, 2000) avec les amorces Rec_SGI1_F et Rec_SGI1-C_R. L'intégration de la construction sur SGI1 n'a pas permis de détecter la fluorescence des protéines mCherry en microscopie, potentiellement à cause du nombre de copies de SGI1. En effet, SGI1 est présent à 1 copie par chromosome alors que les plasmides pAON sont présents à une dizaine de copies par chromosome (origine de réplication p15A) ce qui a pu diminuer la production de protéines fluorescentes.

Les contructions avec les protéines ECFP et EBFP2 n'ont pas été détectées en microscopie ni en cytométrie en flux, même après changement du RBS par des RBS plus forts. Une dernière construction a été faite en changeant le promoteur PthrC3_8 par le promoteur du gène *gapA* dans les vecteurs pAON-ECFP-Kan et pAON-EBFP2-Kan. Le gène *gapA* est fortement exprimé lors des différentes conditions de croissance d'*E. coli* dû à la présence de 4 promoteurs en amont du gène (Charpentier and Branlant, 1994). Mais, ces constructions pourtant détectables en microscopie (figure 63) n'ont pas été détectées en cytométrie en flux.

Malheureusement, le développement de ce projet n'a pas pu être terminé au cours de ces travaux de thèse.

Discussion générale et perspectives

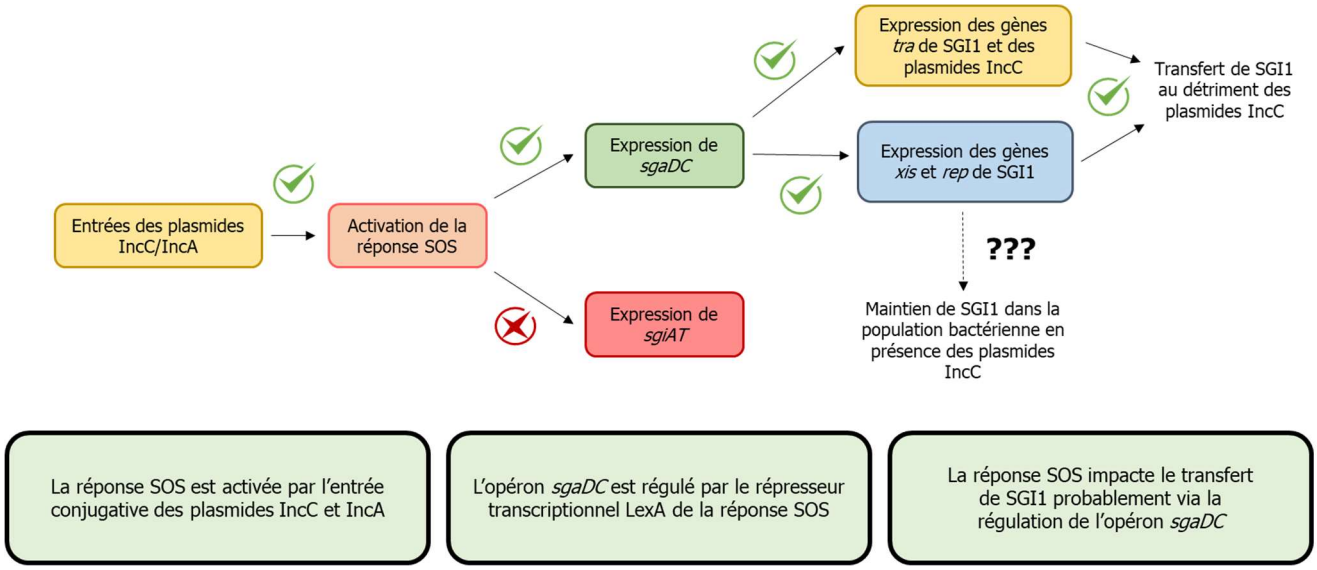


Figure 64 : Synthèse des résultats obtenus sur l'implication de la réponse SOS dans la mobilisation de SGI1.

Les éléments génétiques mobiles tels que les plasmides, les ICE ou les IME sont les principaux vecteurs de dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques parmi les espèces bactériennes. Comprendre les mécanismes de diffusion et de maintien de ces éléments est intrinsèquement lié à la lutte contre l'antibiorésistance. C'est dans ce contexte que les études portant sur les mécanismes moléculaires de SGI1 et des plasmides IncC ont été développées, tous deux disséminant de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques parmi des pathogènes humains et animaux. Ces dernières années, de nombreuses avancées ont permis d'approfondir les connaissances sur les mécanismes de mobilisation, de réplication et de maintien de SGI1 ainsi que sur les phénomènes d'incompatibilité avec les plasmides IncC. Néanmoins, de nombreuses zones d'ombres persistent, notamment au niveau des interactions fines entre SGI1 et les plasmides IncC. Si les régulateurs SgaDC et AcaDC sont des homologues fonctionnels, comment peuvent-ils jouer un rôle dans les phénomènes d'incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncC ? Ou bien, quels mécanismes seraient responsables du rôle crucial des régulateurs SgaDC dans le parasitisme des plasmides IncC en faveur de SGI1 ? Qu'elle est la chronologie d'expression génique entre SGI1 et les plasmides IncC ? Les phénomènes d'incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncC entrainent la séparation rapide de ces éléments mais quelle est la chronologie des événements de transfert des plasmides IncC et de SGI1 ? Les études mécanistiques se sont focalisées sur les facteurs encodés par SGI1 et les plasmides IncC mais en oubliant un troisième protagoniste : la bactérie hôte. Est-ce que le fond génétique de l'hôte ne pourrait pas jouer un rôle dans les interactions entre SGI1 et les plasmides IncC ? Les travaux présentés dans ce manuscrit ont essayé d'aborder ces questionnements et d'amener de nouvelles connaissances sur la mécanistique entre SGI1, les plasmides IncC et la bactérie hôte.

Des données préliminaires au cours de la caractérisation du système toxine antitoxine *sgiAT* de SGI1 avaient permis d'identifier la présence de sites potentiels de fixation de la protéine LexA dans la région promotrice de *sgiAT* et *sgaDC*. L'utilisation de systèmes rapporteurs exprimant le gène de la luciférase via la région promotrice de *sgiAT* avait permis d'observer une augmentation de la luminescence dans la souche *E. coli* MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}) permettant de soupçonner une régulation de cette région promotrice par la réponse SOS. Mes travaux de thèse avaient pour but d'approfondir ces résultats préliminaires en explorant l'impact de la réponse SOS sur l'expression des gènes de SGI1 (notamment *sgiAT* et *sgaDC*) et son rôle dans les interactions moléculaires entre SGI1 et les plasmides IncC (synthétisé en figure 64).

Activation de la réponse SOS par l'entrée conjugative des plasmide IncC et IncA

Au cours de ces travaux, l'activation de la réponse SOS a été démontrée dans les transconjugants suite à l'entrée par conjugaison des plasmides IncC et IncA chez *E. coli*. L'attribution de l'activation de la réponse SOS aux transconjugants a été faite à partir de mesures d'activité β-galactosidase de la population bactérienne totale. D'autres méthodes pourraient être développées afin d'affiner la détection et la quantification de l'activation de la réponse SOS suite à l'entrée par conjugaison de plasmides directement dans les transconjugants et non pas indirectement sur une population. Des expériences de cytométrie en flux montrant l'activation de la réponse SOS dans une partie de la population bactérienne au cours d'expériences de conjugaison ont été réalisées avec un plasmide rapporteur portant le gène de la *mCherry* sous contrôle du promoteur du gène *sulA* du régulon SOS (Al Mamun et al., 2021). De nouvelles expériences de conjugaison pourraient être envisagées en utilisant un système similaire couplé à un trieur de cellules afin de confirmer par PCR après culture la présence des plasmides conjugatifs dans les cellules receveuses présentant une activation de la réponse SOS. Cependant, le développement et l'utilisation de cette technique pourraient être limités par les efficacités de transfert des plasmides et la vitesse de tri du trieur de cellules. En effet, des études de microscopie et de cytométrie en flux ont montré une activation spontanée de la réponse SOS dans 0,3 à 0,9% des cellules issues de populations d'*E. coli* sauvages (McCool et al., 2004; Pennington and Rosenberg, 2007). Or, dans le cas d'un plasmide présentant une fréquence de transfert aux alentours de 10^{-4}, les transconjugants ne représenteraient que 0,01% de la population bactérienne, soit 30 à 90 fois moins que la proportion de bactéries activant spontanément la réponse SOS. Le développement d'expériences d'imagerie de cellules vivantes via la microscopie en plaque microfluidique pourrait être plus approprié. Les travaux de Nolivos *et al.* ont montré avec ces techniques le devenir d'un plasmide F conjugatif après son transfert dans une cellule receveuse (Nolivos et al., 2019). Le plasmide entre et reste dans les cellules sous forme d'ADN simple brin durant 5 min (observé via la détection des foci des protéines SSB-YFP se fixant sur de l'ADN simple brin). Puis dans les 5 à 10 min après l'entrée, le plasmide est converti en ADN double brin (détecté par l'apparition de foci ParB-mNEON se fixant sur les sites *parS* double brin présents sur le plasmide). Un système similaire pourrait être développé afin de détecter l'arrivée de plasmides conjugatifs dans les transconjugants (via le système *parS*/ParB-mNEON) couplé à un système rapporteur de l'activation de la réponse SOS dans les cellules receveuses. Les protéines ParB-mNEON produites constitutivement dans les cellules entrainent une fluorescecence diffuse dans le cytoplasme en l'absence du site de fixation *parS*. L'acquisition du plasmide conjugatif portant la séquence *parS* et sa conversion en ADN double brin permettent l'apparition de foci localisés de haute fluorescence au cours des 5 à 10 min après l'entrée du plasmide. L'utilisation d'un système rapporteur via la production de la protéine mCherry sous contrôle d'un

promoteur du régulon SOS permettrait de détecter une activation de la réponse SOS avec un délai d'environ 15 min. En effet la protéine mCherry necessite un temps de maturation de 15 min (https://www.fpbase.org/protein/mcherry/) entrainant un délai entre l'expression du gène (via l'activation de la réponse SOS) et la détection de la fluorescence. La réponse SOS étant activée au cours des 5 premières minutes après l'entrée du plasmide (lorsqu'il est sous forme d'ADN simple brin), le pic de la fluorescence des protéines mCherry serait théoriquement détecté environ 15 min après l'entrée du plasmide. L'apparition des foci ParB-mNEON suite à la converstion du plasmide en ADN double brin au cours des 10 minutes après l'entrée serait suivi quelques minutes après d'un pic de fluorescence des protéines mCherry permettrant de confirmer directement dans les transconjugants l'activation de la réponse SOS suite à l'entrée conjugative d'un plasmide.

Régulation de l'expression de sgaDC et son opéron par la réponse SOS

Différentes approches expérimentales ont permis de mettre en évidence la régulation de la région promotrice de S008-*sgaDC* par la réponse SOS directement via la protéine LexA et son site de fixation présent dans cette région. L'augmentation de l'activité de la région promotrice de S008-*sgaDC* par l'activation de la réponse SOS a été observée chez les sérotypes de *S. enterica* Kentucky et Agona mais également chez *E. coli* en systèmes rapporteurs. La fixation de la protéine LexA sur son site potentiel présent au niveau de la région promotrice de S008-*sgaDC* a été mise en évidence par la technique de retard sur gel. Enfin, les expériences de RT-qPCR ont permis de confirmer l'induction transcriptionnelle de *sgaDC* sur SGI1 via l'activation de la réponse SOS par la mitomycine C chez *S.* Agona. L'induction de la réponse SOS chez *S.* Agona a également entrainé l'augmentation de la transcription des gènes sur SGI1 appartenant au régulon SgaDC/AcaDC (*traH*, *traG, traN, xis*, *rep* et S018). Une hausse de l'expression de *sgaDC* et des gènes du régulon de SgaDC a également été confirmée suite à l'activation de la réponse SOS dans les souches d'*E. coli*. Au cours de ces travaux, certaines différences entre les souches de *S. enterica* et *E. coli* ont pu être observées. L'augmentation de l'activité promotrice de S008-*sgaDC* par l'induction de la réponse SOS était plus élevée dans les sérotypes de *S. enterica* que dans les souches d'*E. coli*. Les expériences de retard sur gel ont permis d'observer la fixation des protéines LexA issues d'*E. coli* à partir d'une concentration de 1,34 µM contre 2,38 µM pour les protéines LexA issues de *S. enterica* dans la région promotrice de S008-*sgaDC*. Ces observations pourraient indiquer une affinité plus élevée de la protéine LexA d'*E. coli* par rapport à celle de *S. enterica* pour le site de fixation dans la région promotrice de S008-*sgaDC*. Plus l'affinité de LexA pour un site est élevée et plus la vitesse de dissociation de LexA de ce site sera lente (Butala et al., 2011). En effet, les protéines LexA fixées sur l'ADN ne sont pas clivables par le complexe RecA-ADNss (Butala et al., 2011). La levée de l'inhibition de LexA nécessite à la fois la

libération du site (dépendante de l'affinité de LexA pour le site) et la dégradation des protéines LexA libres induites par les complexes RecA-ADNss (Butala et al., 2011; Jones and Uphoff, 2021). Ces variations entre *S. enterica* et *E. coli* ont également été observées au niveau de l'induction de la transcription de *sgaDC* et des gènes du régulon SgaDC suite à l'activation de la réponse SOS. En cohérence avec les résultats d'un effet moins impactant chez *E. coli* de l'activation de la réponse SOS sur la régulation de la région promotrice de *sgaDC*, l'induction de la réponse SOS dans les souches d'*E. coli* avec SGI1 et SGI1Δ*sgaDC* n'a pas permis d'observer de différence majeure. Néanmoins, la présence de l'opéron S008-*sgaDC* sous contrôle de sa région promotrice native (contenant le site de fixation de LexA) en multicopies chez *E. coli* (via le plasmide de complémentation) a permis de constater une forte hausse de la transcription de *sgaDC* et des gènes du régulon SgaDC suite à l'activation de la réponse SOS.

Impact de la réponse SOS sur l'efficacité de transfert de SGI1

Le développement d'une méthode de conjugaison tripartite entre souches d'*E. coli* a permis d'explorer finement le rôle de l'entrée des plasmides IncC et de l'activation de la réponse SOS sur l'efficacité de transfert de SGI1. Cette technique a permis également d'obtenir une chronologie précise des événements de conjugaison des plasmides IncC et de SGI1. Les expériences de conjugaison entre une souche $IncC^+$, une souche $SGI1^+$ et une souche receveuse a permis d'observer que la majorité des événements de transfert des plasmides IncC a eu lieu au cours des 45 premières minutes de contact. La fréquence de transfert des plasmides IncC était d'environ 10^{-3} après 45 min de contact et cette fréquence de transfert est restée stable jusqu'à 4h après la mise en contact. Le transfert des plasmides IncC a entraîné la formation d'une population bactérienne permettant la mobilisation de SGI1 ($IncC^+$ $SGI1^+$) issue des bactéries hébergeant initialement SGI1 et ayant acquis le plasmide IncC. Une heure après les transferts des plasmides IncC (soit 1h45 après la mise en contact), un pic de transfert de SGI1 a pu être observé vers la population de bactéries receveuses. La fréquence de transfert de SGI1 a été de 10^{-2} après 1h45 de contact puis a augmenté jusqu'à atteindre une valeur de 10^0 après 4h de contact. Cette méthode a permis de mettre en évidence pour la première fois la rapidité et la synchronicité du pic de transfert des plasmides IncC après 45 min de contact, suivi 1h plus tard par le pic de transfert de SGI1. Comme lors des expériences précédentes, l'utilisation du mutant d'*E. coli* SOS^{OFF} n'a pas permis de constater de variation majeure par rapport à l'utilisation d'une souche d'*E. coli* sauvage. L'utilisation de la souche SOS^{ON} portant SGI1 au cours d'expériences de conjugaison tripartite n'a pas entrainé de modification sur le transfert du plasmide IncC mais a permis le transfert de SGI1 30 min plus tôt qu'en condition sauvage. La souche SOS^{ON} simulant une réponse SOS en permanence activée ne permet pas l'inhibition des gènes régulés par la protéine LexA. Dans la souche SOS^{ON}, *sgaDC* et

les gènes du régulon SgaDC/AcaDC seraient donc exprimés comme lors d'une activation de la réponse SOS. Ces observations suggèrent l'implication de la réponse SOS sur l'efficacité de transfert de SGI1. La délétion de *sgaDC* a entrainé un retard sur les transferts de SGI1 avec un pic atteint après 2h de contact au lieu de 1h45. La fréquence de transfert du mutant SGI1Δ*sgaDC* a été similaire à la fréquence de transfert des plasmides IncC. En condition de conjugaison tripartite, la délétion de *sgaDC* ne permet plus de favoriser le transfert de SGI1 par rapport au transfert du plasmide IncC, comme cela a déjà pu être démontré lors d'expériences de conjugaison classique (Durand et al., 2021a), suggérant l'implication de *sgaDC* dans le détournement de la machinerie de conjugaison des plasmides IncC en faveur de SGI1. Pour résumer, l'activation constitutive de la réponse SOS a permis un transfert précoce de SGI1. En condition sauvage, SGI1 a présenté une fréquence de transfert 100 à 1000 fois plus élevée que celle des plasmides IncC alors que la délétion de *sgaDC* a entrainé des efficacités de transfert de SGI1 similaires à celles des plasmides IncC. Toutes ces observations suggèrent que l'expression précoce de *sgaDC* via l'activation de la réponse SOS par l'entrée des plasmides IncC serait impliquée dans le détournement de la machinerie de conjugaison des plasmides IncC en faveur du transfert de SGI1. L'adaptation de cette méthode de conjugaison tripartite avec des souches de *S. enterica* de terrain isolées avec des variants de SGI1 permettra d'affiner le rôle de la réponse SOS sur l'efficacité de transfert de SGI1. En effet, l'expression de *sgaDC* et des gènes du régulon SgaDC a semblé être plus impactée par l'activation de la réponse SOS dans les sérotypes de *S. enterica* que dans les souches d'*E. coli* utilisées au cours de ces travaux. De plus, l'utilisation de divers sérotypes de *S. enterica* et notament le sérotype *S.* Kentucky ST198 associé aux variants de SGI1 présentant une délétion de l'opéron *sgaDC* (et de gènes adjacents) pourraient permettre d'approfondir les connaissances sur le rôle de *sgaDC* et de comprendre pourquoi ce sérotype est associé à ces variants. Comparer les efficacités de transfert entre variants naturels de SGI1 avec et sans *sgaDC* dans différents fonds génétiques (sérotypes de *S. enterica* ou chez d'autres genres bactériens hébergeant SGI1 : *Proteus*, *Acinetobacter*, *Vibrio*…) pourrait permettre d'identifier de nouveaux facteurs encodés par la bactérie hôte. En effet, les variants SGI1-HKL ne possèdent pas l'opéron *sgaDC* mais semblent quand même avoir été capables de diffuser chez certaines espèces bactériennes (*S.* Kentucky, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*). Ces bactéries pourraient encoder des facteurs ayant favorisé la délétion de *sgaDC* et/ou permis de contrebalançer l'effet négatif de cette délétion sur le transfert conjugatif de SGI1.

Le système toxine antitoxine sgiAT de SGI1 ne serait pas régulé par la réponse SOS

Des travaux préliminaires ont permis de suspecter une régulation de l'expression du système toxine antitoxine (*sgiAT*) de SGI1 par la réponse SOS via la présence d'un site potentiel de fixation de la protéine LexA dans la région promotrice de *sgiAT*. Les premières expériences ont permis d'observer une induction modérée de l'activité de la région promotrice de *sgiAT* en système rapporteur par l'activation de la réponse SOS chez *E. coli* mais pas chez les deux sérotypes de *S. enterica* utilisés. Cependant, les fixations des protéines LexA issues d'*E. coli* et de *S. enterica* n'ont pas pu être démontrées sur le site potentiel présent dans la région promotrice de *sgiAT*. Enfin, les résultats de RT-qPCR chez *E. coli* et *S. enterica* ont montré que l'induction de la réponse SOS ne semblait pas augmenter la transcription de l'opéron *sgiAT*. Néanmoins, ces dernières expériences ont mis en évidence une forte transcription de l'opéron *sgiAT* sur SGI1 quelles que soient les conditions d'induction de la réponse SOS ou les fonds génétiques utilisés (*E. coli* et *S. enterica*), observations plutôt cohérentes avec les mécanismes classiques des systèmes TA stabilisateurs d'EGM. En effet, la présence d'une quantité suffisante de toxines dans les cellules est nécessaire pour entrainer un effet PSK après perte de l'EGM et dégradation des antitoxines (Harms et al., 2018).

Régulation transcriptionnelle de mpsB et mpsAB ?

Les résultats préliminaires de RT-PCR chez *S.* Agona semblaient indiquer une régulation de l'expression de l'opéron *mpsAB* par la réponse SOS. La recherche de sites de fixation de la protéine LexA a permis l'identification d'un site respectant le motif CTG-N10-CAG dans le CDS de *mpsA*, à 360 pb du gène *mpsB*. Le gène *mpsB* pouvant être transcrit à partir de sa propre région promotrice située dans l'extrémité 3' du gène *mpsA* (Kiss et al., 2019), la fixation de LexA sur ce potentiel site a été testée mais sans succès. Cependant, il existe un autre site similaire aux sites de fixation de la protéine LexA plus proche du codon start de *mpsB* (67 pb en amont) mais présentant une région de 11 pb au lieu de 10 pb riche en AT entre les motifs CTG et CAG. La fixation de LexA pourrait être testée sur ce site non canonique. De plus, d'autres potentiels régulateurs de *mpsB* ou *mpsAB* pourraient être régulés par la réponse SOS. L'activité des régions promotrices de *mpsB* et *mpsAB* pourrait être étudiée en système rapporteur avec activation ou non de la réponse SOS, en présence ou non de SGI1 ou des plasmides IncC afin d'identifier des potentiels régulateurs.

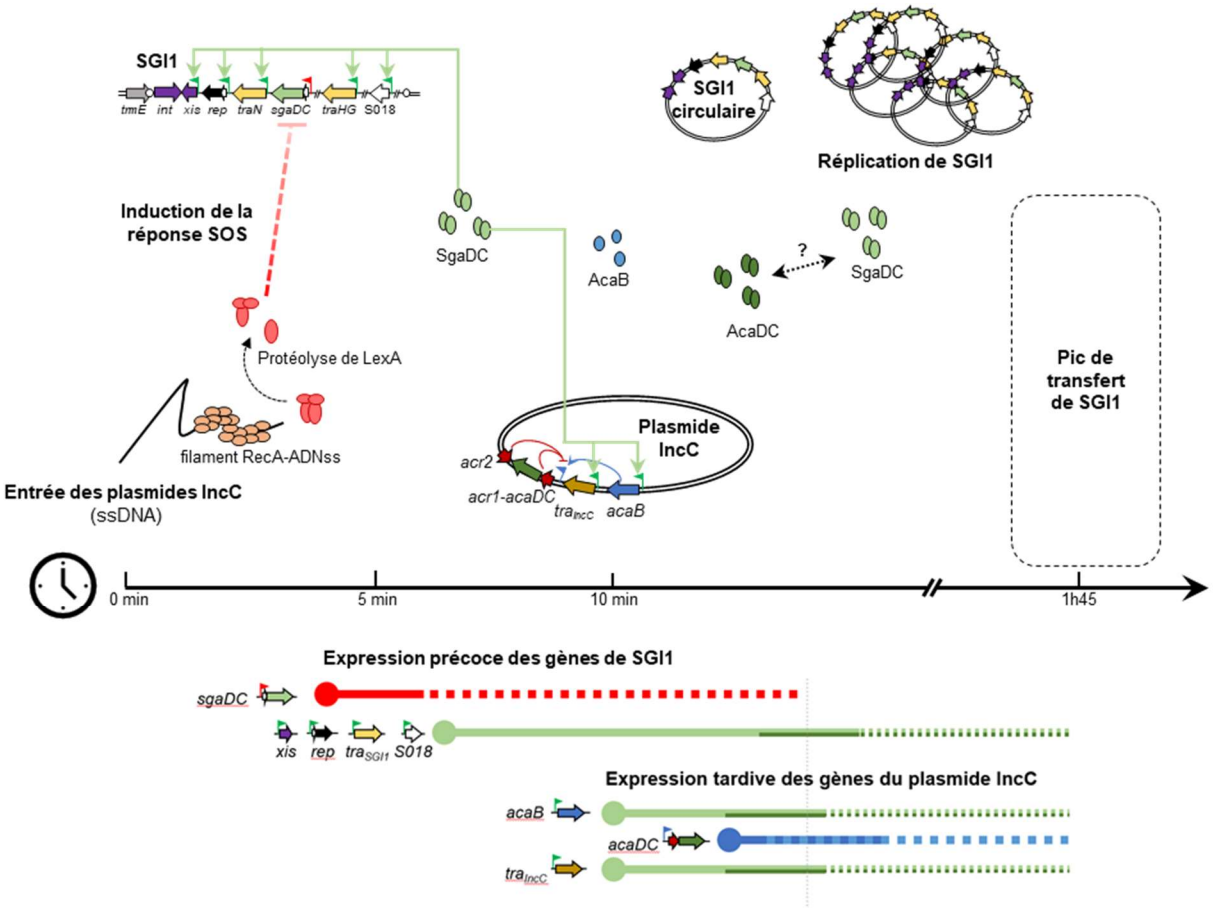


Figure 65 : Modèle chronologique de l'expression précoce des gènes de SGI1 suite à l'activation de la réponse SOS par l'entrée conjugative des plasmides IncC.
Les gènes d'intérêts sont représentés par des flèches de couleurs correpondantes à leurs fonctions : transfert en jaune/marron, activateurs transcriptionnels en bleu, vert clair et vert foncé, répresseurs en rouge et recombinaison en violet. Les promoteurs sont représentés par des drapeaux dont la couleur correspond aux activateurs/répresseurs des promoteurs suivant : LexA en rouge, AcaDC/SgaDC en vert, AcaB en bleu. La flèche arrêtée en pointillés rouges représente la levée de l'inhibition des protéines LexA sur le promoteur de *sgaDC*. Les flèches en vert clair représentent l'activation de l'expression médiée par SgaDC. La flèche en pointillés bidirectionnelle noire représente les potentielles intéractions entre SgaDC et AcaDC. Le modèle de régulation temporelle des gènes de SGI1 et du plasmide IncC présenté en bas de la figure est basé selon les résultats et les connaissances les plus récentes sur la biologie de SGI1 et des plasmides IncC (Durand et al., 2021a; Hancock et al., 2020; Huguet et al., 2020; Szabó et al., 2021). Les expressions des gènes de SGI1 et du plasmide IncC au cours du temps sont représentées par les lignes pleines et en pointillés codées selon les régulateurs transcriptionnels.

Modèle chronologique des transferts et des interactions entre SGI1 et les plasmides IncC

Les résultats obtenus ont permis de proposer un modèle chronologique des transferts et interactions entre SGI1 et les plasmides IncC basé sur la régulation précoce de l'expression des gènes de SGI1 via l'activation de la réponse SOS par l'entrée des plasmides IncC par conjugaison (figure 65). La chronologie des formes (ADN simple ou double brin) du plasmide IncC (~160 Kb) est basé sur les travaux de Nolivos *et al.* montrant suite à l'entrée par conjugaison d'un plasmide F (~100 Kb) sa persistance sous forme d'ADN simple brin lors des 5 premières minutes puis sa conversion en ADN double brin après 5 à 10 min (Nolivos et al., 2019). Les expériences de conjugaison tripartite (entre les souches *E. coli*-IncC, *E. coli* SGI1, *E. coli* réceptrice) ont permis de mettre en évidence le transfert des plasmides IncC (probablement sous forme d'ADN simple brin) au cours des 45 min après mise en contact des bactéries. Cette première étape de transfert permet l'obtention d'une nouvelle population bactérienne portant simultanément un plasmide IncC et SGI1 nécessaires pour le transfert conjugatif de SGI1. L'activation de la réponse SOS suite à l'entrée des plasmides IncC par conjugaison entrainerait la levée de l'inhibition de l'expression des activateurs transcriptionnels *sgaDC* dans les bactéries hébergeant SGI1. L'expression des régulateurs *sgaDC* suite à l'activation de la réponse SOS semble suffisante pour entrainer l'expression des gènes *tra*, *xis*, *rep* et S018 de SGI1 potentiellement avant la conversion en ADN double brin et l'expression des gènes du plasmide IncC. Une fois la conversion du plasmide IncC en ADN double brin, SgaDC pourrait activer l'expression d'*acaB* et des autres gènes du régulon SgaDC/AcaDC sur le plasmide IncC, notamment les gènes tra_{IncC} (Durand et al., 2021a). L'activateur transcriptionnel AcaB pourrait permettre par la suite l'expression des activateurs *acaDC* du plasmide IncC (Hancock et al., 2020). En plus des activateurs SgaDC présents dans les cellules, les activateurs AcaDC activeraient également l'expression des gènes du régulon SgaDC/AcaDC (Durand et al., 2021a; Murányi et al., 2016). De par la littérature (Durand et al., 2021a; Huguet et al., 2020; Szabó et al., 2021) et nos observations sur le nombre de copies et le taux d'excision de SGI1, la seule présence de SgaDC via l'induction de la réponse SOS ne parait pas suffisante pour permettre l'excision et la réplication de SGI1. Ces étapes nécessiteraient les présences de SgaDC et AcaCD (et/ou d'autres facteurs présents sur les plasmides IncC) dans les cellules qui pourraient être dues à un effet seuil nécessitant une quantité plus élevée des régulateurs homologues SgaDC et AcaDC dans les cellules, et/ou d'interactions AcaDC/SgaDC (ou avec d'autres co-facteurs) inconnues à ce jour et/ou à la formation potentielle de régulateurs hybrides AcaDC/SgaDC. De plus, cette régulation fine pourrait être un moyen pour SGI1 de confirmer la présence d'un plasmide IncC avant de s'exciser et de se retrouver sous forme circulaire pouvant être perdue par les cellules. Dans cette optique, la première étape d'activation de la réponse SOS serait le signal d'une potentielle entrée d'un plasmide conjugatif. Cependant de nombreux signaux peuvent activer la réponse SOS et un mécanisme

moléculaire supplémentaire devrait être nécessaire afin de confirmer une réelle opportunité de transfert pour SGI1. La régulation de l'opéron *sgaDC* par la réponse SOS pourrait permettre 1) d'exprimer précocement les gènes de SGI1 favorisant son transfert au détriment des plasmides IncC ; 2) d'activer la transcription des gènes plasmidiques *tra* et *acaB* sur le plasmide IncC forçant une mise en place rapide de la machinerie de conjugaison ; 3) confirmer l'arrivée d'un plasmide IncC via AcaDC (selon la cascade de régulation SgaDC → *acaB*/AcaB → *acaDC*/AcaDC) avant de permettre l'excision de SGI1. L'excision et la réplication de SGI1 dépendantes de la présence de SgaDC et des plasmides IncC (notamment de la présence de AcaDC) pourraient être un mécanisme supplémentaire assurant le maintien de SGI1 en restant intégré au chromosome dans le cas où la réponse SOS n'aurait pas été activée par l'arrivée d'un plasmide IncC. La rapidité de ce dialogue moléculaire pourrait permettre le transfert de SGI1 avant que les phénomènes d'incompatibilité entre les plasmides IncC et SGI1 n'entrainent la séparation des éléments.

Les phénomènes d'incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncC/IncA

Lorsque SGI1 et les plasmides IncC sont présents dans une même cellule, des pertes de ces éléments sont rapidement observables dans la population bactérienne : seulement 50% des bactéries portent encore ces deux élements après 18h de culture (Huguet et al., 2020). Ces phénomènes d'incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncC impliquent la présence concomitante des régulateurs SgaDC et AcaDC mais également la réplication de SGI1 dépendante de l'expression de la protéine Rep et de la présence de la région de l'origine de réplication de SGI1 *oriV* (Durand et al., 2021a; Huguet et al., 2020; Szabó et al., 2021). L'incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncC pourrait entrainer des biais dans la quantification de l'excision et de la réplication de SGI1 ou lors de calculs d'efficacité de transfert selon les méthodes utilisées. La plupart des méthodes utilisées sont réalisées sur des populations bactériennes et non en cellule unique. Les mesures par qPCR de l'excision et du nombre de copies de SGI1 étant déterminées par rapport au nombre de chromosomes totaux dans une population, les données concernant les bactéries ayant perdu SGI1 ne sont pas intégrées aux calculs et peuvent potentiellement fausser ces calculs. Par exemple, si SGI1 est présent à 10 copies par chromosome dans une population où 100% des bactéries possèdent SGI1, la qPCR permettra de détecter la présence de SGI1 à 10 copies par chromosome dans cette population. Or si seulement 50% des bactéries de la population possèdent SGI1, la qPCR permettra de détecter la présence de SGI1 à 5 copies par chromosome dans cette population alors que SGI1 serait bien présent à 10 copies par chromosome dans les bactéries l'hébergeant. Le même constat peut être appliqué à la quantification du nombre de copies des plasmides IncC par chromosome en contexte d'incompatibilité avec SGI1. Afin de palier à ce biais, il pourrait être envisagé de réaliser des expériences de qPCR en cellule unique

afin d'obtenir des quantifications d'excision et du nombre de copies par chromosome de SGI1 (et de plasmide IncC) plus précises. Par exemple, une technique a été récemment développée pour quantifier le nombre de copies de plasmides en cellule unique via l'utilisation de protéines fluorescentes par microscopie (Shao et al., 2021). D'autres techniques pourraient être adaptées afin de réaliser des réactions de qPCR en bactérie unique : les techniques d'epicPCR permettant de réaliser des réactions de PCR sur des bactéries isolées en billes d'acrylamide ou de la ddPCR permettant la réalisation de PCR sur des molécules d'ADN isolées dans des gouttelettes issues d'une réaction d'émulsion (Hindson et al., 2011; Spencer et al., 2016). D'un autre côté, la détermination de l'efficacité de transfert de SGI1 à partir du ratio du nombre de transconjugants divisé par le nombre de donneurs est strictement dépendante de la façon de dénombrer les donneurs et du temps de conjugaison. Avant la mise en évidence des phénomènes d'incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncC, les donneurs pouvaient être sélectionnés simplement par la présence de SGI1 après plusieurs heures de contact conjugatif (jusqu'à une nuit) et non par la co-présence de SGI1 et du plasmide IncC. Or, les phénomènes d'incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncC entrainent la séparation rapide des éléments dans la population bactérienne (Huguet et al., 2020). Déterminer le ratio transconjugants/donneurs après plusieurs heures de contact peut entrainer des biais dû à l'incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncC. En effet, les expériences de conjugaison tripartite ont permis de montrer que la majorité des événements de transfert de SGI1 a eu lieu dans l'heure suivant l'acquisition d'un plasmide IncC. Une fois la cohabitation établie et la croissance bactérienne permise (bien que ralentie sur filtre de conjugaison), les phénomènes d'incompatibilité entre SGI1 et les plasmides IncC entrainent des pertes et donc une diminution du nombre de bactéries donneuses (SGI1+IncC) quantifiables au cours du temps. Plus le temps de contact est long et plus la population donneuse de SGI1 (SGI1+IncC) diminue, ce qui engendre une augmentation artificielle de l'efficacité de transfert de SGI1 (le nombre de transconjugants n'étant pas impacté). De plus, comparer des efficacités de transfert entre des versions sauvages de SGI1 et des versions abolissant les phénomènes d'incompatibilité (Δ*sgaDC,* Δ*rep* ou Δ$oriV_{SGI1}$) après plusieurs heures de contact pourrait également entrainer des artéfacts. La détermination des pertes ou non de SGI1 et des plasmides IncC dans la population donneuse au cours du temps pourrait être intégrée aux calculs d'efficacité de transfert. Plusieurs études ont proposé de déterminer des taux de transfert de plasmides au lieu des fréquences de transfert basées uniquement sur le dénombrement des donneurs et transconjugants. Le calcul initial de détermination des taux de transfert intégrait le transfert vertical du plasmide via les vitesses de croissances des différentes populations bactériennes (donneurs, receveurs et transconjugants) et le transfert horizontal du plasmide via les événements de transfert des donneurs vers les receveurs mais également des transconjugants vers les receveurs (Levin et al., 1979). Par la suite, ce modèle a été affiné en intégrant également le

coût d'acquision du plasmide (diminution de la vitesse de croissance), le taux de perte du plasmide dans les populations bactériennes et les effets environementaux (température, milieu de culure liquide ou solide) (Mishra et al., 2021; Sheppard et al., 2021). L'adaptation de ces modèles de calcul des taux de transfert en intégrant la présence de deux éléments génétiques mobiles (SGI1 et les plasmides IncC) et les phénomènes d'incompatibilité dans les populations bactériennes les co-hébergeant permettrait de déterminer précisément leurs événements de transferts respectifs et de s'affranchir des biais de la détermination des fréquences de transfert.

La cohabitation stable dans une même cellule des plasmides IncC et IncA a été démontrée et l'incompatibilité précédemment observée entre ces plasmides a été attribuée à un phénomène d'exclusion d'entrée médié par la protéine TraG (Ambrose et al., 2018a; Humbert et al., 2019). Ceci sous-entendant donc que les systèmes de réplication et de partition de ces plasmides n'interfèrent pas entre eux et donc n'impactent pas la stabilité de ces éléments. Puisque les plasmides IncC et IncA sont compatibles mais que SGI1 et les plasmides IncC sont incompatibles (probablement via le système de réplication) ceci suggère que SGI1 devrait être compatible avec les plasmides IncA. Une expérience préliminaire a été réalisée avec une souche d'*E. coli* contenant SGI1 et un plasmide IncA (MG1655 SGI1-C RA1). Après culture de nuit sans antibiotique et étalement sur milieu non sélectif des bactéries, les présences de SGI1 et du plasmide RA1 dans les colonies ont été vérifiées par PCR : 100% des colonies possèdaient le plasmide RA1 (47 colonies positives / 47 colonies isolées) et 77,6% des colonies possèdaient SGI1 (36 colonies positives / 47 colonies isolées). La stabilité du plasmide RA1 ne semble pas être impactée par la présence de SGI1 mais les pertes de SGI1 sont toujours observables. Ces pertes pourraient être la conséquence d'un défaut de partition de la forme circulaire de SGI1 ne possédant pas de système de partition actif. Si la présence des plasmides IncA entraine comme les plasmides IncC l'excision et la réplication de SGI1, ce dernier sous forme circulaire ne serait présent qu'à une dizaine de copies par cellule, nombre insuffisant pour assurer la transmission de l'élément sous forme circulaire au cours des générations par diffusion passive. Selon la formule de probabilité de perte $(½)^{\text{nombre de copie}}$ et le nombre de copies de SGI1 (6-12 copies) en présence des plasmides IncC, SGI1 présenterait des probabilités de perte de 1,6% à 0,02% à chaque génération via la distribution aléatoire de ses copies. Etudier plus précisément la stabilité de SGI1 en présence des plasmides IncA et des plasmides IncC pourrait permettre d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la déstabilisation des plasmides IncC. Substituer la région de l'origine de réplication de plasmides IncA par celle des plasmides IncC et déterminer si cela entraine des pertes du plasmide IncA pourrait permettre de confirmer l'orientation de la déstabilisation vers le système de réplication du plasmide IncC. Le système par marquage fluorescent auto-inductible de SGI1, des plasmides et des bactéries

hégergeant ces éléments dont nous avons initier le développement pourrait permettre en plus d'étudier la stabilité de ces éléments dans des biofilms ou des microbiotes. Ce système couplé à la technique de l'epicPCR et du tri cellulaire pourrait permettre d'isoler et de réaliser le séquençage 16S des bactéries du microbiote ayant acquis SGI1 ou les plasmides IncC/IncA (détectées par la fluorescence de l'EGM et l'absence de la fluorescence associée aux bactéries donneuses). Le développement de ces techniques pourrait permettre de mieux comprendre la diffusion de SGI1 dans l'environnement et non dans les conditions de laboratoire bien éloignées de la réalité.

Choix des modèles expérimentaux

A cours de chacune des approches expérimentales utilisées lors de ces travaux, des variations ont pu être observées entre les souches de *S. enterica* et de *E. coli*. Les souches de *S. enterica* sont des souches de terrain avec des éléments génétiques mobiles déjà présents (SGI1, plasmides…) et leurs propres histoires évolutives alors que les souches *E. coli* sont des souches de laboratoire. Travailler avec des souches de terrain est plus contraignant qu'avec les souches issues d'*E. coli* K12 curées de la présence d'élément génétique mobile et surtout dérivants depuis 1922 de laboratoire en laboratoire. En plus de l'absence d'élément génétique mobile, les avantages non négligeables de ces souches de laboratoire sont la disponibilité de nombreux mutants (*lexA3*/*lexA51*, la collection Keio…), d'outils et de techniques (mutagenèse dirigée, systèmes rapporteurs…) mais également les connaissances et les caractérisations de nombreux mécanismes moléculaires. Cependant, il a été démontré pour plusieurs modèles bactériens (dont les modèles classiques d'*E. coli* K12 et MG1655 de laboratoire) que des souches supposées isogéniques issues de différents laboratoires ont accumulé des mutations, des adaptations aux conditions de culture et même l'acquisition d'éléments génétiques mobiles (Dorman and Thomson, 2020; Fux et al., 2005). Ces souches cultivées en milieu riche, à température optimale et sans compétition avec d'autres organismes, n'ont plus été en communauté bactérienne complexe depuis des dizaines d'années. Or, les études portant sur la transmission d'éléments génétiques mobiles cherchent à comprendre les échanges génétiques entre bactéries se produisant justement dans ces environnements. Toutes les études mécanistiques portant sur SGI1 et les plasmides IncC ont été réalisées dans des souches d'*E. coli* de laboratoire alors que SGI1 n'a été à ce jour identifié que dans une souche d'*E. coli* d'origine animale (Cummins et al., 2019). L'utilisation des souches d'*E. coli* a permis de caractériser plusieurs mécanismes biologiques entre SGI1 et les plasmides IncC mais de nombreuses questions sont encore sans réponse. Continuer ces études avec des souches de terrain hébergeants naturellement SGI1 dans des conditions plus proches de l'environement (biofilms, microbiotes) permettrait une compréhension plus fine de ces mécanismes moléculaires et potentiellement la découverte de nouvelles connaissances liées à l'hôte bactérien. Comme dans le cas

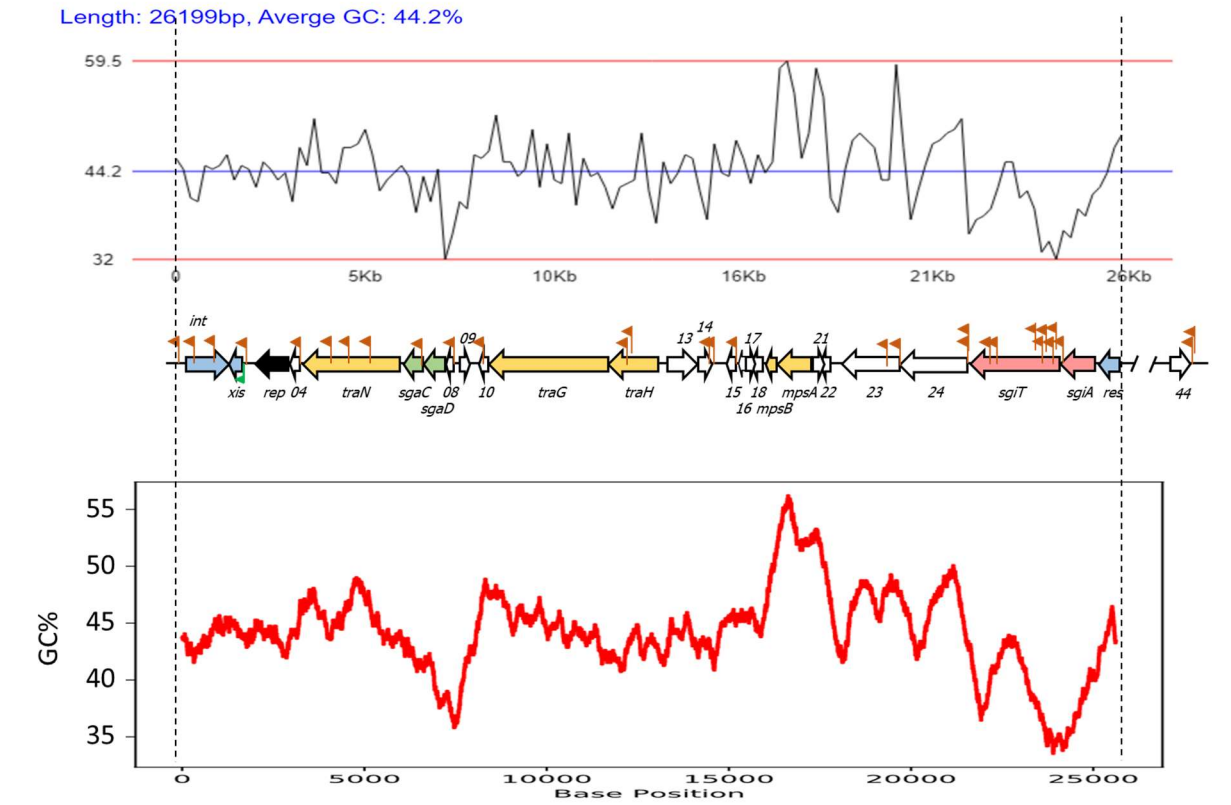


Figure 66 : Analyses du %GC du backbone de SGI1 et localisation des potentiels sites de fixation H-NS.
Analyse du taux de GC du backbone de SGI1 avec http://www.endmemo.com/bio/gcdraw.php (haut) et https://en.vectorbuilder.com/tool/gc-content-calculator/4bc9e3b7-668d-4a85-8b4a-2063f3cd04e3.html (bas). Pour la première analyse, nous n'avons pas accès aux paramètres de la taille de la fenêtre utilisée pour l'analyse. Pour la seconde analyse, nous avons défini une fenêtre de 750 pb. Les drapeaux orange sur la carte de SGI1 correspondent aux 50 premiers sites de fixation de la protéine H-NS d'*E. coli* (sans ceux présents dans l'intégron non représentés) prédit par une analyse RSAT utilisant le consensus des site H-NS de la base de donnée RegulonDB.

de la réponse SOS, le fond génétique des souches peut impacter la régulation génique d'éléments génétiques mobiles ou leur capacité à résider de manière stable dans les populations bactériennes au cours du temps. L'expression des gènes d'un élément génétique mobile présent dans une bactérie peut être affectée par de nombreux régulateurs encodés par l'hôte, notamment par les protéines H-NS. Les protéines H-NS entrainent la répression transcriptionnelle des gènes acquis par transferts horizontaux (via des éléments génétiques mobiles) en se fixant dans des régions d'ADN présentant un %GC plus faible que celui du chromosome (Baños et al., 2009; Navarre et al., 2006). La composition en GC du backbone de SGI1 à 44,2% est bien plus faible que celle d'*E. coli* K12 MG1655 à 50,8% (Hayashi et al., 2006) et des sérotypes *S.* Agona et *S.* Kentucky ST198 à 52,1 % et 52,2% respectivement (McCusker et al., 2014; Moon et al., 2021). L'analyse du taux de GC du backbone de SGI1 a révélé deux fortes chutes de ce taux à 32% au niveau de la région promotrice de *sgaDC* et en amont du gène de la toxine *sgiT* du système TA (figure 66). La recherche de sites de fixation de H-NS sur la séquence de SGI1 a révélé plusieurs sites potentiels dont un enrichissement de ces sites au niveau de *sgiT* (figure 66). La régulation de la transcription de *sgaDC*, de *sgiAT* et plus généralement des gènes de SGI1 ou des plasmides IncC pourrait impliquer d'autres facteurs de l'hôte en plus de la réponse SOS qu'il faudrait explorer. Le faible taux de GC du backbone de SGI1 pourrait également permettre d'identifier l'espèce d'origine dont serait issu SGI1. Les taux de GC des génomes de référence des espèces isolées avec SGI1 ou éléments apparentés sont les suivants : *Proteus mirabilis* 38,9%, *Acinetobacter baumanii* 39%, *Providencia stuartii* 40,3%, *Shewanella putrefaciens* 44,4%, *Vibrio cholerae* 47,7% (chromosome) et 46,9% (chromide), *Morganella morganii* 51%, *Enterobacter cloacae* 55%, *Klebsiella pneumoniae* 57,5%. Ces espèces appartiennent à la classe des Gammaprotéobactéries, principalement à l'ordre des *Enterobacterales* (sauf *A. baumanii*, *S. putrefaciens* et *V. cholerae*) et à la famille des *Enterobacteriaceae* (sauf *P. mirabilis, P. stuarti* et *M. morganii*). Les espèces dont le taux de GC est le plus proche de celui du backbone de SGI1 sont *P. stuartii*, *S. putrefaciens* et *V. cholerae*. En plus d'un taux de GC similiaire à celui de SGI1, des éléments apparentés à SGI1 sans le cluster de gènes de résistances aux antibiotiques ont été identifiés dans des bactéries issues des genres *Vibrio* et *Shewanella* pouvant orienter l'origne de SGI1 vers ces bactéries (Durand et al., 2021b; Siebor and Neuwirth, 2022).

Pour conclure, ces travaux de thèse ont permis de révéler le rôle de senseur de *sgaDC* via sa régulation par la réponse SOS dans les interactions entre SGI1 et les plasmides IncC. L'entrée des plasmides IncC par conjugaison active la réponse SOS des bactéries réceptrices. L'activation de la réponse SOS entraine l'expression précoce de l'activateur transcriptionnel central de SGI1 *sgaDC* et des gènes du régulon SgaDC/AcaDC sur SGI1 et probablement dans un second temps sur les plasmides IncC.

L'activation de la réponse SOS permettant la transcription de *sgaDC* avant les gènes des plasmides IncC nouvellement entrés dans les cellules favorise le transfert de SGI1. La réponse SOS semble donc être un élément clef dans le détournement des mécanismes plasmidiques au profit de SGI1. Néanmoins, plusieurs interactions biologiques entre SgaDC et AcaDC restent à être élucidées (durée de vie des ARNm, temps de la maturation et de la stabilité des complexes protéiques, formation potentielle de régulateurs chimériques…). L'induction de la réponse SOS au cours de la conjugaison pourrait avoir un impact sur le spectre d'hôte de SGI1 en plus de favoriser la dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques parmi de nombreux pathogènes bactériens. L'utilisation de certaines classes d'antibiotiques entraine une activation de la réponse SOS et favorise l'acquisition et le remaniement des gènes de résistance aux antibiotiques associés aux intégrons de classe 1 (présents au niveau du cluster de gènes de résistance aux antibiotiques de nombreux variants de SGI1). Cibler la réponse SOS lors de traitements antibiotiques pourrait permettre de limiter la dissémination et l'échange de gènes de résistance aux antibiotiques.

Références bibliographiques

Aakre, C.D., Phung, T.N., Huang, D., and Laub, M.T. (2013). A bacterial toxin inhibits DNA replication elongation through a direct interaction with the β sliding clamp. Mol. Cell *52*, 617–628.

Abremski, K., Hoess, R., and Sternberg, N. (1983). Studies on the properties of P1 site-specific recombination: Evidence for topologically unlinked products following recombination. Cell *32*, 1301–1311.

Achtman, M., Kennedy, N., and Skurray, R. (1977). Cell-cell interactions in conjugating Escherichia coli: Role of traT protein in surface exclusion. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *74*, 5104–5108.

Ackerley, D.F., Barak, Y., Lynch, S. V., Curtin, J., and Matin, A. (2006). Effect of chromate stress on Escherichia coli K-12. J. Bacteriol. *188*, 3371–3381.

Aertsen, A., and Michiels, C.W. (2005). Mrr instigates the SOS response after high pressure stress in Escherichia coli. Mol. Microbiol. *58*, 1381–1391.

Afif, H., Allali, N., Couturier, M., and Van Melderen, L. (2001). The ratio between CcdA and CcdB modulates the transcriptional repression of the ccd poison-antidote system. Mol. Microbiol. *41*, 73–82.

Ah-Seng, Y., Lopez, F., Pasta, F., Lane, D., and Bouet, J.-Y. (2009). Dual Role of DNA in Regulating ATP Hydrolysis by the SopA Partition Protein. J. Biol. Chem. *284*, 30067–30075.

Alekshun, M.N., and Levy, S.B. (1997). Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: The mar regulon. Antimicrob. Agents Chemother. *41*, 2067–2075.

Alperi, A., Larrea, D., Fernández-González, E., Dehio, C., Zechner, E.L., and Llosa, M. (2013). A translocation motif in relaxase trwc specifically affects recruitment by its conjugative type IV Secretion System. J. Bacteriol. *195*, 4999–5006.

Amábile-Cuevas, C.F., and Chicurel, M.E. (1992). Bacterial plasmids and gene flux. Cell *70*, 189–199.

Ambrose, S.J., Harmer, C.J., and Hall, R.M. (2018a). Compatibility and entry exclusion of IncA and IncC plasmids revisited: IncA and IncC plasmids are compatible. Plasmid *96–97*, 7–12.

Ambrose, S.J., Harmer, C.J., and Hall, R.M. (2018b). Evolution and typing of IncC plasmids contributing to antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Plasmid *99*, 40–55.

Anilionyte, O., Liang, H., Ma, X., Yang, L., and Zhou, K. (2018). Short, auto-inducible promoters for well-controlled protein expression in Escherichia coli. Appl. Genet. Mol. Biotechnol. *102*, 7007–7015.

Arcangioli, M.A., Leroy-Sétrin, S., Martel, J.L., and Chaslus-Dancla, E. (1999). A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in Salmonella typhimurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. *174*, 327–332.

Arcari, G., Di Lella, F.M., Bibbolino, G., Mengoni, F., Beccaccioli, M., Antonelli, G., Faino, L., and Carattoli, A. (2020). A multispecies cluster of VIM-1 carbapenemase-producing enterobacterales linked by a novel, highly conjugative, and broad-host-range IncA plasmid forebodes the reemergence of VIM-1. Antimicrob. Agents Chemother. *64*, 1–11.

Armshaw, P., and Pembroke, J.T. (2013a). Generation and analysis of an ICE R391 deletion library identifies genes involved in the element encoded UV-inducible cell-sensitising function. FEMS Microbiol. Lett. *342*, 45–53.

Armshaw, P., and Pembroke, J.T. (2013b). Control of expression of the ICE R391 encoded UV-inducible cell-sensitising function. BMC Microbiol. *13*, 2–9.

Armshaw, P., and Pembroke, J.T. (2015). Examination of the cell sensitizing gene orf43 of ICE R391 suggests a role in ICE transfer enhancement to recipient cells. FEMS Microbiol. Lett. *362*, 1–7.

Arutyunov, D., and Frost, L.S. (2013). F conjugation: Back to the beginning. Plasmid *70*, 18–32.

Athanasopoulos, V., Praszkier, J., and Pittard, A.J. (1999). Analysis of elements involved in pseudoknot-dependent expression and regulation of the repA gene of an IncL/M plasmid. J. Bacteriol. *181*, 1811–1819.

Audette, G.F., Manchak, J., Beatty, P., Klimke, W.A., and Frost, L.S. (2007). Entry exclusion in F-like plasmids requires intact TraG in the door that recognizes its cognate TraS in the recipient. Microbiology *153*, 442–451.

Aylett, C.H.S., and Löwe, J. (2012). Superstructure of the centromeric complex of TubZRC plasmid partitioning systems. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 16522–16527.

Aylett, C.H.S., Wang, Q., Michie, K.A., Amos, L.A., and Löwe, J. (2010). Filament structure of bacterial tubulin homologue TubZ. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *107*, 19766–19771.

Bagdasarian, M., Bailone, A., Angulo, J.F., Scholz, P., Bagdasarian, M., and Devoret, R. (1992). PsiB, an anti-SOS protein, is transiently expressed by the F sex factor during its transmission to an

Escherichia coli K-12 recipient. Mol. Microbiol. *6*, 885–893.

Baharoglu, Z., and Mazel, D. (2011). Vibrio cholerae Triggers SOS and Mutagenesis in Response to a Wide Range of Antibiotics: a Route towards Multiresistance. Antimicrob. Agents Chemother. *55*, 2438–2441.

Baharoglu, Z., and Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. FEMS Microbiol. Rev. *38*, 1126–1145.

Baharoglu, Z., Bikard, D., and Mazel, D. (2010). Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. PLoS Genet. *6*, 1–10.

Baharoglu, Z., Krin, E., and Mazel, D. (2013). RpoS Plays a Central Role in the SOS Induction by Sub-Lethal Aminoglycoside Concentrations in Vibrio cholerae. PLoS Genet. *9*, e1003421.

Baharoglu, Z., Babosan, A., and Mazel, D. (2014). Identification of genes involved in low aminoglycoside-induced SOS response in Vibrio cholerae: A role for transcription stalling and Mfd helicase. Nucleic Acids Res. *42*, 2366–2379.

Balaban, N.Q. (2011). Persistence: Mechanisms for triggering and enhancing phenotypic variability. Curr. Opin. Genet. Dev. *21*, 768–775.

Baños, R.C., Vivero, A., Aznar, S., García, J., Pons, M., Madrid, C., and Juárez, A. (2009). Differential regulation of horizontally acquired and core genome genes by the bacterial modulator H-NS. PLoS Genet. *5*, e1000513.

Barrows, J.M., and Goley, E.D. (2021). FtsZ dynamics in bacterial division: What, how, and why? Curr. Opin. Cell Biol. *68*, 163–172.

Bastia, D., Germino, J., Crosa, J.H., and Ram, J. (1981). The nucleotide sequence surrounding the replication terminus of R6K. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *78*, 2095–2099.

Bates, S., Roscoe, R.A., Althorpe, N.J., Brammar, W.J., and Wilkins, B.M. (1999). Expression of leading region genes on IncI1 plasmid ColIb-P9: Genetic evidence for single-stranded DNA transcription. Microbiology *145*, 2655–2662.

Beaber, J.W., and Waldor, M.K. (2004). Identification of operators and promoters that control SXT conjugative transfer. J. Bacteriol. *186*, 5945–5949.

Beaber, J.W., Hochhut, B., and Waldor, M.K. (2004). SOS response promotes horizontal

dissemination of antibiotic resistance genes. Nature *427*, 72–74.

Bell, C.E., Frescura, P., Hochschild, A., and Lewis, M. (2000). Crystal structure of the λ repressor C-terminal domain provides a model for cooperative operator binding. Cell *101*, 801–811.

Bell, J.C., Plank, J.L., Dombrowski, C.C., and Kowalczykowski, S.C. (2012). Direct imaging of RecA nucleation and growth on single molecules of SSB-coated ssDNA. Nature *491*, 274–278.

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

Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., and Larsson, D.G.J. (2018). Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. FEMS Microbiol. Rev. *42*, 68–80.

Bertelli, C., Tilley, K.E., and Brinkman, F.S.L. (2019). Microbial genomic island discovery, visualization and analysis. Brief. Bioinform. *20*, 1685–1698.

Bie, L., Fang, M., Li, Z., Wang, M., and Xu, H. (2018). Identification and Characterization of New Resistance-Conferring SGI1s (Salmonella Genomic Island 1) in Proteus mirabilis. Front. Microbiol. *9*, 1–9.

Bigot, S., Sivanathan, V., Possoz, C., Barre, F.-X., and Cornet, F. (2007). FtsK, a literate chromosome segregation machine. Mol. Microbiol. *64*, 1434–1441.

Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., and Piddock, L.J.V. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nat. Rev. Microbiol. *13*, 42–51.

Blakely, G.W., and Sherratt, D.J. (1994). Interactions of the site-specific recombinases XerC and XerD with the recombination site dif. Nucleic Acids Res. *22*, 5613–5620.

Blower, T.R., Short, F.L., Rao, F., Mizuguchi, K., Pei, X.Y., Fineran, P.C., Luisi, B.F., and Salmond, G.P.C. (2012). Identification and classification of bacterial Type III toxin-antitoxin systems encoded in chromosomal and plasmid genomes. Nucleic Acids Res. *40*, 6158–6173.

Bolland, S., Llosa, M., Avila, P., and De la Cruz, F. (1990). General organization of the conjugal transfer genes of the IncW plasmid R388 and interactions between R388 and IncN and IncP plasmids. J. Bacteriol. *172*, 5795–5802.

Boudsocq, F., Campbell, M., Devoret, R., and Bailone, A. (1997). Quantitation of the inhibition of Hfr x F- recombination by the mutagenesis complex UmuD'C. J. Mol. Biol. *270*, 201–211.

Bouet, J.-Y., and Funnell, B.E. (2019). Plasmid Localization and Partition in Enterobacteriaceae.

EcoSal Plus *8*.

Bouet, J.Y., Nordström, K., and Lane, D. (2007). Plasmid partition and incompatibility - The focus shifts. Mol. Microbiol. *65*, 1405–1414.

Bousquet, A., Henquet, S., Compain, F., Genel, N., Arlet, G., and Decré, D. (2015). Partition locus-based classification of selected plasmids in Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli and Salmonella enterica spp.: An additional tool. J. Microbiol. Methods *110*, 85–91.

Boyd, D., Peters, G.A., Cloeckaert, A., Boumedine, K.S., Chaslus-Dancla, E., Imberechts, H., and Mulvey, M.R. (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.

Boyd, D., Cloeckaert, A., Chaslus-Dancla, E., and Mulvey, M.R. (2002). Characterization of variant Salmonella genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars typhimurium DT104 and agona. Antimicrob. Agents Chemother. *46*, 1714–1722.

Boyd, D.A., Peters, G.A., Ng, L.K., and Mulvey, M.R. (2000). Partial characterization of a genomic island associated with the multidrug resistance region of Salmonella enterica Typhymurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. *189*, 285–291.

Boyd, E.F., Hill, C.W., Rich, S.M., and Hard, D.L. (1996). Mosaic structure of plasmids from natural populations of Escherichia coli. Genetics *143*, 1091–1100.

Brantl, S. (2014). Plasmid Replication Control by Antisense RNAs. Microbiol. Spec 83–103.

Brantl, S., and Jahn, N. (2015). SRNAs in bacterial type I and type III toxin-antitoxin systems. FEMS Microbiol. Rev. *39*, 413–427.

Briales, A., Rodriguez-Martinez, J.M., Velasco, C., Machuca, J., Díaz de alba, P., Blazquez, J., and Pascual, A. (2012a). Exposure to diverse antimicrobials induces the expression of qnrB1, qnrd and smaqnr genes by SOS-dependent regulation. J. Antimicrob. Chemother. *67*, 2854–2859.

Briales, A., Rodriguez-Martinez, J.M., Velasco, C., Machuca, J., Díaz de alba, P., Blazquez, J., and Pascual, A. (2012b). Exposure to diverse antimicrobials induces the expression of qnrB1, qnrd and smaqnr genes by SOS-dependent regulation. J. Antimicrob. Chemother. *67*, 2854–2859.

Briggs, C.E., and Fratamico, P.M. (1999). Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of Salmonella typhimurium DT104. Antimicrob. Agents Chemother. *43*, 846–849.

Brown, J.M., and Shaw, K.J. (2003). A Novel Family of Escherichia coli Toxin-Antitoxin Gene Pairs. J. Bacteriol. *185*, 6600–6608.

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

Burrus, V., and Waldor, M.K. (2003). Control of SXT integration and excision. J. Bacteriol. *185*, 5045–5054.

Burrus, V., and Waldor, M.K. (2004). Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements. Res. Microbiol. *155*, 376–386.

Bury, K., Wegrzyn, K., and Konieczny, I. (2017). Handcuffing reversal is facilitated by proteases and replication initiator monomers. Nucleic Acids Res. *45*, 3953–3966.

Butala, M., Hodošček, M., Anderluh, G., Podlesek, Z., and Žgur-Bertok, D. (2007). Intradomain LexA rotation is a prerequisite for DNA binding specificity. FEBS Lett. *581*, 4816–4820.

Butala, M., Žgur-Bertok, D., and Busby, S.J.W. (2009). The bacterial LexA transcriptional repressor. Cell. Mol. Life Sci. *66*, 82–93.

Butala, M., Klose, D., Hodnik, V., Rems, A., Podlesek, Z., Klare, J.P., Anderluh, G., Busby, S.J.W., Steinhoff, H.J., and Žgur-Bertok, D. (2011). Interconversion between bound and free conformations of LexA orchestrates the bacterial SOS response. Nucleic Acids Res. *39*, 6546–6557.

Call, D.R., Singer, R.S., Meng, D., Broschat, S.L., Orfe, L.H., Anderson, J.M., Herndon, D.R., Kappmeyer, L.S., Daniels, J.B., and Besser, T.E. (2010). blaCMY-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.

Cambray, G., Guerout, A.-M., and Mazel, D. (2010). Integrons. Annu. Rev. Genet. *44*, 141–166.

Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. Int. J. Med. Microbiol. *303*, 298–304.

Carattoli, A., and Hasman, H. (2020). PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). In Horizontal Gene Transfer: Methods and Protocols, F. de la Cruz, ed. (New York, NY: Springer US), pp. 285–294.

Carattoli, A., Bertini, A., Villa, L., Falbo, V., Hopkins, K.L., and Threlfall, E.J. (2005). Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J. Microbiol. Methods *63*, 219–228.

Carattoli, A., Villa, L., Poirel, L., Bonnin, R.A., and Nordmann, P. (2012). Evolution of IncA/C

blaCMY-2-carrying plasmids by acquisition of the blaNDM-1 carbapenemase gene. Antimicrob. Agents Chemother. *56*, 783–786.

Carattoli, A., Zankari, E., Garciá-Fernández, A., Larsen, M.V., Lund, O., Villa, L., Aarestrup, F.M., and Hasman, H. (2014). In Silico detection and typing of plasmids using plasmidfinder and plasmid multilocus sequence typing. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 3895–3903.

Carloni, E., Andreoni, F., Omiccioli, E., Villa, L., Magnani, M., and Carattoli, A. (2017). Comparative analysis of the standard PCR-Based Replicon Typing (PBRT) with the commercial PBRT-KIT. Plasmid *90*, 10–14.

Carraro, N., Matteau, D., Luo, P., Rodrigue, S., and Burrus, V. (2014). The Master Activator of IncA/C Conjugative Plasmids Stimulates Genomic Islands and Multidrug Resistance Dissemination. PLoS Genet. *10*, e1004714.

Carraro, N., Poulin, D., and Burrus, V. (2015). Replication and Active Partition of Integrative and Conjugative Elements (ICEs) of the SXT/R391 Family: The Line between ICEs and Conjugative Plasmids Is Getting Thinner. PLoS Genet.

Carraro, N., Libante, V., Morel, C., Charron-Bourgoin, F., Leblond, P., and Guédon, G. (2016). Plasmid-like replication of a minimal streptococcal integrative and conjugative element. Microbiology *162*, 622–632.

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

Carraro, N., Durand, R., Rivard, N., Anquetil, C., Barrette, C., Humbert, M., and Burrus, V. (2017b). Salmonella genomic island 1 (SGI1) reshapes the mating apparatus of IncC conjugative plasmids to promote self-propagation. PLoS Genet. *13*, 1–20.

Cascales, E., Buchanan, S.K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S., and Cavard, D. (2007). Colicin Biology. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *71*, 158–229.

Cassini, A., Högberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E., Devleesschauwer, B., Cecchini, M., et al. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. Lancet Infect. Dis. *19*, 56–66.

Cavard, D. (1995). Effects of temperature and of heat shock on the expression and action of the colicin A lysis protein. J. Bacteriol. *177*, 5189–5192.

Cavard, D. (1997). Role of the colicin A lysis protein in the expression of the colicin A operon. Microbiology *143*, 2295–2303.

Cavard, D. (2002). Assembly of colicin A in the outer membrane of producing Escherichia coli cells requires both phospholipase A and one porin, but phospholipase A is sufficient for secretion. J. Bacteriol. *184*, 3723–3733.

Ceroni, F., Boo, A., Furini, S., Gorochowski, T.E., Borkowski, O., Ladak, Y.N., Awan, A.R., Gilbert, C., Stan, G.B., and Ellis, T. (2018). Burden-driven feedback control of gene expression. Nat. Methods *15*, 387–393.

Cervantes-Rivera, R., Pedraza-Lápez, F., Pérez-Segura, G., and Cevallos, M.A. (2011). The replication origin of a repABC plasmid. BMC Microbiol. *11*, 158.

Chabbert, Y.A., Scavizzi, M.R., Witchitz, J.L., Gerbaud, G.R., and Bouanchaud, D.H. (1972). Incompatibility groups and the classification of fi - resistance factors. J. Bacteriol. *112*, 666–675.

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

Charpentier, B., and Branlant, C. (1994). The Escherichia coli gapA gene is transcribed by the vegetative RNA polymerase holoenzyme Eσ70 and by the heat shock RNA polymerase Eσ32. J. Bacteriol. *176*, 830–839.

Chase, J.W., Merrill, B.M., and Williams, K.R. (1983). F sex factor encodes a single-stranded DNA binding protein (SSB) with extensive sequence homology to Escherichia coli SSB. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *80*, 5480–5484.

Chattoraj, D.K. (2000). Control of plasmid DNA replication by iterons: No longer paradoxical. Mol. Microbiol. *37*, 467–476.

Chen, J., Zhu, X., Tan, Z., Xu, H., Tang, J., Xiao, D., and Zhang, X. (2014). Activating C4-dicarboxylate transporters DcuB and DcuC for improving succinate production. Appl. Microbiol. Biotechnol. *98*, 2197–2205.

Chen, Z., Yang, H., and Pavletich, N.P. (2008). Mechanism of homologous recombination from the

RecA-ssDNA/dsDNA structures. Nature *453*, 489–494.

Cheng, C., Sun, J., Zheng, F., Lu, W., Yang, Q., and Rui, Y. (2016). New structures simultaneously harboring class 1 integron and ISCR1-linked resistance genes in multidrug-resistant Gram-negative bacteria. BMC Microbiol. *16*, 1–7.

Chiang, Y.N., Penadés, J.R., and Chen, J. (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. PLoS Pathog. *15*, 1–7.

Choi, K.H., and Schweizer, H.P. (2006). mini-Tn7 insertion in bacteria with single attTn7 sites: Example Pseudomonas aeruginosa. Nat. Protoc. *1*, 153–161.

Christensen-Dalsgaard, M., Jørgensen, M.G., and Gerdes, K. (2010). Three new RelE-homologous mRNA interferases of Escherichia coli differentially induced by environmental stresses. Mol. Microbiol. *75*, 333–348.

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

Claverys, J.P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006). Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. Annu. Rev. Microbiol. *60*, 451–475.

Collis, C.M., and Hall, R.M. (1992). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. Mol. Microbiol. *6*, 2875–2885.

Collis, C.M., and Hall, R.M. (1995). Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. Antimicrob. Agents Chemother. *39*, 155–162.

Colloms, S.D. (2013). The topology of plasmid-monomerizing Xer site-specific recombination. Biochem. Soc. Trans. *41*, 589–594.

Coluzzi, C., Guédon, G., Devignes, M.D., Ambroset, C., Loux, V., Lacroix, T., Payot, S., and Leblond-Bourget, N. (2017). A glimpse into the world of integrative and mobilizable elements in Streptococci reveals an unexpected diversity and novel families of mobilization proteins. Front. Microbiol. *8*, 1–16.

Compain, F., Poisson, A., Le Hello, S., Branger, C., Weill, F.X., Arlet, G., and Decré, D. (2014). Targeting relaxase genes for classification of the predominant plasmids in Enterobacteriaceae. Int. J. Med. Microbiol. *304*, 236–242.

Coray, D.S., Wheeler, N.E., Heinemann, J.A., and Gardner, P.P. (2017). Why so narrow: Distribution

of anti-sense regulated, type I toxin-antitoxin systems compared with type II and type III systems. RNA Biol. *14*, 275–280.

Cornet, F., Mortier, I., Patte, J., and Louarn, J.M. (1994). Plasmid pSC101 harbors a recombination site, psi, which is able to resolve plasmid multimers and to substitute for the analogous chromosomal Escherichia coli site dif. J. Bacteriol. *176*, 3188–3195.

Costa, T.R.D., Harb, L., Khara, P., Zeng, L., Hu, B., and Christie, P.J. (2021). Type IV secretion systems: Advances in structure, function, and activation. Mol. Microbiol. *115*, 436–452.

Costa de Oliveira, R., Laval, J., and Boiteux, S. (1987). Induction of SOS and adaptive responses by alkylating agents in Escherichia coli mutants deficient in 3-methyladenine-DNA glycosylase activities. Mutat. Res. DNA Repair Reports *183*, 11–20.

Courcelle, J., Khodursky, A., Peter, B., Brown, P.O., and Hanawalt, P.C. (2001). Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient Escherichia coli. Genetics *158*, 41–64.

Couturier, M., Bex, F., Bergquist, P.L., and Maas, W.K. (1988). Identification and Classification of Bacterial Plasmids. Microbiol. Rev. *52*, 375–395.

Cox, M.M. (2007). Regulation of bacterial RecA protein function. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. *42*, 41–63.

Craig, N.L., and Roberts, J.W. (1980). E. coli recA protein-directed cleavage of phage A repressor requires polynucleotide. Nature *283*, 26–30.

Crane, J.K., Alvarado, C.L., and Sutton, M.D. (2021). Role of the SOS response in the generation of antibiotic resistance in vivo. Antimicrob. Agents Chemother. *65*.

Crosa, J.H., Luttropp, L.K., and Falkow, S. (1976). Mode of replication of the conjugative R plasmid RSF 1040 in Escherichia coli. J. Bacteriol. *126*, 454–466.

Crozat, E., Fournes, F., Cornet, F., Hallet, B., and Rousseau, P. (2014). Resolution of Multimeric Forms of Circular Plasmids and Chromosomes. Microbiol. Spectr. *2*, 1–16.

Cummins, M.L., Roy Chowdhury, P., Marenda, M.S., Browning, G.F., and Djordjevic, S.P. (2019). Salmonella Genomic Island 1B Variant Found in a Sequence Type 117 Avian Pathogenic Escherichia coli Isolate . MSphere *4*, 4–7.

Cummins, M.L., Hamidian, M., and Djordjevic, S.P. (2020). Salmonella genomic island 1 is broadly

disseminated within gammaproteobacteriaceae. Microorganisms *8*, 1–10.

de Curraize, C., Neuwirth, C., Bador, J., Chapuis, A., Amoureux, L., and Siebor, E. (2018). Two new Salmonella genomic islands 1 from Proteus mirabilis and description of bla CTX-M-15 on a variant (SGI1-K7). J. Antimicrob. Chemother. *73*, 1804–1807.

de Curraize, C., Siebor, E., Varin, V., Neuwirth, C., and Hall, R.M. (2020). Two New SGI1-LK Variants Found in Proteus mirabilis and Evolution of the SGI1-HKL Group of Salmonella Genomic Islands . MSphere *5*, 1–11.

de Curraize, C., Siebor, E., and Neuwirth, C. (2021). Genomic islands related to Salmonella genomic island 1; integrative mobilisable elements in trmE mobilised in trans by A/C plasmids. Plasmid *114*, 102565.

Cury, J., Jové, T., Touchon, M., Néron, B., and Rocha, E.P. (2016). Identification and analysis of integrons and cassette arrays in bacterial genomes. Nucleic Acids Res. *44*, 4539–4550.

Dam, M., and Gerdes, K. (1994). Partitioning of plasmid R1. Ten direct repeats flanking the parA promoter constitute a centromere-like partition site parC, that expresses incompatibility. J. Mol. Biol. *236*, 1289–1298.

Datsenko, K.A., and 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.

Datta, N., and Hedges, R.W. (1972). R factors identified in Paris, some conferring gentamicin resistance, constitute a new compatibility group. Ann Inst Pasteur *123*, 849–852.

Datta, N., and Hedges, R.W. (1973). R factors of compatibility group A. J. Gen. Microbiol. *74*, 335–337.

Davies, julian, and Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *74*, 417–433.

Delavat, F., Miyazaki, R., Carraro, N., Pradervand, N., and van der Meer, J.R. (2017). The hidden life of integrative and conjugative elements. FEMS Microbiol. Rev. *41*, 512–537.

DiCenzo, G.C., and Finan, T.M. (2017). The Divided Bacterial Genome: Structure, Function, and Evolution. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *81*, 1–37.

Dimitriu, T., Szczelkun, M.D., and Westra, E.R. (2020). Evolutionary Ecology and Interplay of Prokaryotic Innate and Adaptive Immune Systems. Curr. Biol. *30*, R1189–R1202.

Dion, M.B., Oechslin, F., and Moineau, S. (2020). Phage diversity, genomics and phylogeny. Nat. Rev. Microbiol. *18*, 125–138.

Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. Nat. Rev. Microbiol. *2*, 414–424.

Dorman, M.J., and Thomson, N.R. (2020). 'Community evolution' – laboratory strains and pedigrees in the age of genomics. Microbiol. (United Kingdom) *166*, 233–238.

Dörr, T., Vulić, M., and Lewis, K. (2010). Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in Escherichia coli. PLoS Biol. *8*, 29–35.

Dostál, L., Shao, S., and Schildbach, J.F. (2011). Tracking F plasmid TraI relaxase processing reactions provides insight into F plasmid transfer. Nucleic Acids Res. *39*, 2658–2670.

Douard, G., Praud, K., Cloeckaert, A., and Doublet, B. (2010). The Salmonella genomic island 1 is specifically mobilized in trans by the IncA/C multidrug resistance plasmid family. PLoS One *5*.

Doublet, B., Boyd, D., Mulvey, M.R., and Cloeckaert, A. (2005). The Salmonella genomic island 1 is an integrative mobilizable element. Mol. Microbiol. *55*, 1911–1924.

Doublet, B., Praud, K., Bertrand, S., Collard, J.M., Weill, F.X., and Cloeckaert, A. (2008). Novel insertion sequence- and transposon-mediated genetic rearrangements in genomic island SGI1 of Salmonella enterica serovar Kentucky. Antimicrob. Agents Chemother. *52*, 3745–3754.

Doublet, B., Praud, K., Weill, F.-X., and Cloeckaert, A. (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*, 282–289.

Drabløs, F., Feyzi, E., Aas, P.A., Vaagbø, C.B., Kavli, B., Bratlie, M.S., Peña-Diaz, J., Otterlei, M., Slupphaug, G., and Krokan, H.E. (2004). Alkylation damage in DNA and RNA - Repair mechanisms and medical significance. DNA Repair (Amst). *3*, 1389–1407.

Draper, O., César, C.E., Machón, C., De La Cruz, F., and Llosa, M. (2005). Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 16385–16390.

Durand, R., Huguet, T., Rivard, N., Burrus, V., and Carraro, N. (2021a). Crucial Role of Salmonella Genomic Island 1 Master Activator in Parasitism of IncC plasmids. Nucleic Acids Res. *49*, 7807–7824.

Durand, R., Deschênes, F., and Burrus, V. (2021b). Genomic islands targeting dusA in Vibrio species are distantly related to Salmonella Genomic Island 1 and mobilizable by IncC conjugative plasmids. PLoS Genet. *17*, 1–23.

Durfee, T., Hansen, A.M., Zhi, H., Blattner, F.R., and Ding, J.J. (2008). Transcription profiling of the stringent response in Escherichia coli. J. Bacteriol. *190*, 1084–1096.

Dwyer, D.J., Kohanski, M.A., Hayete, B., and Collins, J.J. (2007). Gyrase inhibitors induce an oxidative damage cellular death pathway in Escherichia coli. Mol. Syst. Biol. *3*.

Dy, R.L., Richter, C., Salmond, G.P.C., and Fineran, P.C. (2014a). Remarkable mechanisms in microbes to resist phage infections. Annu. Rev. Virol. *1*, 307–331.

Dy, R.L., Przybilski, R., Semeijn, K., Salmond, G.P.C., and Fineran, P.C. (2014b). A widespread bacteriophage abortive infection system functions through a Type IV toxin-antitoxin mechanism. Nucleic Acids Res. *42*, 4590–4605.

Ebersbach, G., and Gerdes, K. (2005). Plasmid Segregation Mechanisms. Annu. Rev. Genet. *39*, 453–479.

Ebersbach, G., Sherratt, D.J., and Gerdes, K. (2005). Partition-associated incompatibility caused by random assortment of pure plasmid clusters. Mol. Microbiol. *56*, 1430–1440.

Ebina, Y., and Nakazawa, A. (1983). Cyclic AMP-dependent initiation and rho-dependent termination of colicin E1 gene transcription. J. Biol. Chem. *258*, 7072–7078.

Ebina, Y., Kishi, F., and Nakazawa, A. (1982). Direct participation of lexA protein in repression of colicin E1 synthesis. J. Bacteriol. *150*, 1479–1481.

van den Ent, F., Møller-Jensen, J., Amos, L.A., Gerdes, K., and Löwe, J. (2002). F-actin-like filaments formed by plasmid segregation protein ParM. EMBO J. *21*, 6935–6943.

Eraso, J.M., and Weinstock, G.M. (1992). Anaerobic control of colicin E1 production. J. Bacteriol. *174*, 5101–5109.

Eraso, J.M., Chidambaram, M., and Weinstock, G.M. (1996). Increased production of colicin E1 in stationary phase. J. Bacteriol. *178*, 1928–1935.

Erill, I., Campoy, S., and Barbé, J. (2007). Aeons of distress: An evolutionary perspective on the bacterial SOS response. FEMS Microbiol. Rev. *31*, 637–656.

Escudero, J.A., Loot, C., Nivina, A., and Mazel, D. (2014). The Integron: Adaptation On Demand.

Microbiol. Spectr. *3*, 1–16.

Fallon, A.M. (2021). DNA recombination and repair in Wolbachia: RecA and related proteins. Mol. Genet. Genomics *296*, 437–456.

Farinha, M.A., and Kropinski, A.M. (1990). Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. J. Bacteriol. *172*, 3496–3499.

Fernández-López, R., Pilar Garcillán-Barcia, M., Revilla, C., Lázaro, M., Vielva, L., and De La Cruz, F. (2006). Dynamics of the IncW genetic backbone imply general trends in conjugative plasmid evolution. FEMS Microbiol. Rev. *30*, 942–966.

Fernández De Henestrosa, A.R., Rivera, E., Tapias, A., and Barbé, J. (1998). Identification of the Rhodobacter sphaeroides SOS box. Mol. Microbiol. *28*, 991–1003.

Fernández De Henestrosa, A.R., Ogi, T., Aoyagi, S., Chafin, D., Hayes, J.J., Ohmori, H., and Woodgate, R. (2000). Identification of additional genes belonging to the LexA regulon in Escherichia coli. Mol. Microbiol. *35*, 1560–1572.

Field, C.M., and Summers, D.K. (2011). Multicopy plasmid stability: Revisiting the dimer catastrophe. J. Theor. Biol. *291*, 119–127.

Filutowicz, M., Davis, G., Greener, A., and Helinski, D.R. (1985). Autorepressor properties of the vrinitiation protein encoded by plasmid R6K. Nucleic Acids Res. *13*, 103–114.

Fineran, P.C., Blower, T.R., Foulds, I.J., Humphreys, D.P., Lilley, K.S., and Salmond, G.P.C. (2009). The phage abortive infection system, ToxIN, functions as a protein-RNA toxin-antitoxin pair. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *106*, 894–899.

Fink, G., and Löwe, J. (2015). Reconstitution of a prokaryotic minus end-tracking system using TubRC centromeric complexes and tubulin-like protein TubZ filaments. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *112*, E1845–E1850.

Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a Penicillium with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. Br. J. Exp. Pathol. *10*, 226–236.

Fleming, A. (1945). Sir Alexander Fleming - Nobel Lecture: Penicillin.

Florey, H.W., and Abraham, E.P. (1954). The work on penicillin at Oxford. J. Hist. Med. Allied Sci. *9*, 302–317.

Fogh, R.H., Ottleben, G., Ruterjans, L., Schnarr, M., Boelens, R., and Kaptein, R. (1994). Solution

structure of the LexA repressor DNA binding domain determined by 1H NMR spectroscopy. EMBO J. *13*, 3936–3944.

Fornelos, N., Bamford, J.K.H., and Mahillon, J. (2011). Phage-borne factors and host LexA regulate the lytic switch in phage GIL01. J. Bacteriol. *193*, 6008–6019.

Fornelos, N., Butala, M., Hodnik, V., Anderluh, G., Bamford, J.K., and Salas, M. (2015). Bacteriophage GIL01 gp7 interacts with host LexA repressor to enhance DNA binding and inhibit RecA-mediated auto-cleavage. Nucleic Acids Res. *43*, 7315–7329.

Fozo, E.M., Makarova, K.S., Shabalina, S.A., Yutin, N., Koonin, E. V., and Storz, G. (2010). Abundance of type I toxin-antitoxin systems in bacteria: Searches for new candidates and discovery of novel families. Nucleic Acids Res. *38*, 3743–3759.

Friedman, N., Vardi, S., Ronen, M., Alon, U., and Stavans, J. (2005). Precise temporal modulation in the response of the SOS DNA repair network in individual bacteria. PLoS Biol. *3*, 1261–1268.

Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., and Toussaint, A. (2005). Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. Nat. Rev. Microbiol. *3*, 722–732.

Fuchs, R.P. (2016). Tolerance of lesions in E. coli: Chronological competition between Translesion Synthesis and Damage Avoidance. DNA Repair (Amst). *44*, 51–58.

Fuchs, R.P., and Fujii, S. (2013). Translesion DNA synthesis and mutagenesis in prokaryotes. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*, 1–22.

Funnell, B.E. (1988). Mini-P1 plasmid partitioning: excess ParB protein destabilizes plasmids containing the centromere parS. J. Bacteriol. *170*, 954–960.

Fux, C.A., Shirtliff, M., Stoodley, P., and Costerton, J.W. (2005). Can laboratory reference strains mirror “real-world” pathogenesis? Trends Microbiol. *13*, 58–63.

Gabant, P., Newnham, P., Taylor, D., and Couturier, M. (1993). Isolation and location on the R27 map of two replicons and an incompatibility determinant specific for IncHI1 plasmids. J. Bacteriol. *175*, 7697–7701.

Le Gall, A., Cattoni, D.I., Guilhas, B., Mathieu-Demazière, C., Oudjedi, L., Fiche, J.B., Rech, J., Abrahamsson, S., Murray, H., Bouet, J.Y., et al. (2016). Bacterial partition complexes segregate within the volume of the nucleoid. Nat. Commun. *7*, 1–10.

Galli, E., Ferat, J.L., Desfontaines, J.M., Val, M.E., Skovgaard, O., Barre, F.X., and Possoz, C. (2019).

Replication termination without a replication fork trap. Sci. Rep. *9*, 1–11.

García-Fernández, A., Chiaretto, G., Bertini, A., Villa, L., Fortini, D., Ricci, A., and Carattoli, A. (2008). Multilocus sequence typing of IncI1 plasmids carrying extended-spectrum β-lactamases in Escherichia coli and Salmonella of human and animal origin. J. Antimicrob. Chemother. *61*, 1229–1233.

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

Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., and De La Cruz, F. (2009). The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. FEMS Microbiol. Rev. *33*, 657–687.

Garner, E.C., Campbell, C.S., and Mullins, R.D. (2004). Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. Science *306*, 1021–1025.

Garner, E.C., Campbell, C.S., Weibel, D.B., and Mullins, R.D. (2007). Reconstitution of DNA segregation driven by assembly of a prokaryotic actin homolog. Science *315*, 1270–1274.

Gasc, A.M., Sicard, N., Claverys, J.P., and Sicard, A.M. (1980). Lack of SOS repair in Streptococcus pneumoniae. Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen. *70*, 157–165.

Gerdes, K., Rasmussen, P.B., and Molin, S. (1986). Unique type of plasmid maintenance function: Postsegregational killing of plasmid-free cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *83*, 3116–3120.

Gerdes, K., Nielsen, A., Thorsted, P., and Wagner, E.G.H. (1992). Mechanism of killer gene activation. Antisense RNA-dependent RNase III cleavage ensures rapid turn-over of the stable Hok, SrnB and PndA effector messenger RNAs. J. Mol. Biol. *226*, 637–649.

Gerdes, K., Møller-Jensen, J., and Bugge Jensen, R. (2000). Plasmid and chromosome partitioning: surprises from phylogeny. Mol. Microbiol. *37*, 455–466.

Giese, K.C., Michalowski, C.B., and Little, J.W. (2008). RecA-Dependent Cleavage of LexA Dimers. J. Mol. Biol. *377*, 148–161.

Gillings, M.R. (2014). Integrons: Past, Present, and Future. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *78*, 257–277.

Gillings, M.R. (2017). Class 1 integrons as invasive species. Curr. Opin. Microbiol. *38*, 10–15.

Gillor, O., Vriezen, J.A.C., and Riley, M.A. (2008). The role of SOS boxes in enteric bacteriocin regulation. Microbiology *154*, 1783–1792.

Giraldo, R., and Fernández-Tresguerres, M.E. (2004). Twenty years of the pPS10 replicon: Insights on the molecular mechanism for the activation of DNA replication in iteron-containing bacterial plasmids. Plasmid *52*, 69–83.

Girlich, D., Dortet, L., Poirel, L., and Nordmann, P. (2015). Integration of the blandm-1 carbapenemase gene into Proteus genomic island 1 (PGI1-PmPEL) in a Proteus mirabilis clinical isolate. J. Antimicrob. Chemother. *70*, 98–102.

Goeders, N., Chai, R., Chen, B., Day, A., and Salmond, G.P.C. (2016). Structure, evolution, and functions of bacterial type III toxin-antitoxin systems. Toxins (Basel). *8*, 282.

Golub, E.I., and Low, K.B. (1985). Conjugative plasmids of enteric bacteria from many different incompatibility groups have similar genes for single-stranded DNA-binding proteins. J. Bacteriol. *162*, 235–241.

Goodman, M.F., and Woodgate, R. (2013). Translesion DNA polymerases. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*, a010363.

Gotfredsen, M., and Gerdes, K. (1998). The Escherichia coli relBE genes belong to a new toxin-antitoxin gene family. Mol. Microbiol. *29*, 1065–1076.

Götz, A., Lechner, M., Mader, A., Von Bronk, B., Frey, E., and Opitz, M. (2018). CsrA and its regulators control the time-point of ColicinE2 release in Escherichia coli. Sci. Rep. *8*, 1–12.

Graham, D.W., Olivares-Rieumont, S., Knapp, C.W., Lima, L., Werner, D., and Bowen, E. (2011). Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharges to the Almendares river near Havana, Cuba. Environ. Sci. Technol. *45*, 418–424.

Graham, T.G.W., Wang, X., Song, D., Etson, C.M., Oijen, A.M. van, Rudner, D.Z., and Loparo, J.J. (2014). ParB spreading requires DNA bridging. Genes Dev. *28*, 1228–1238.

Grainge, I., Lesterlin, C., and Sherratt, D.J. (2011). Activation of XerCD-dif recombination by the FtsK DNA translocase. Nucleic Acids Res. *39*, 5140–5148.

Guédon, G., Libante, V., Coluzzi, C., Payot, S., and Leblond-Bourget, N. (2017). The obscure world of integrative and mobilizable elements, highly widespread elements that pirate bacterial conjugative systems. Genes (Basel). *8*, 337.

Guérillot, R., Cunha, V. Da, Sauvage, E., Bouchier, C., and Glaser, P. (2013). Modular evolution of TnGBSs, a new family of integrative and conjugative elements associating insertion sequence

transposition, plasmid replication, and conjugation for their spreading. J. Bacteriol. *195*, 1979–1990.

Guerin, É., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Re, S. Da, Gonzalez-Zorn, B., Barbé, J., Ploy, M.C., and Mazel, D. (2009). The SOS response controls integron recombination. Science (80-.). *324*, 1034.

Guglielmini, J., Quintais, L., Garcillán-Barcia, M.P., de la Cruz, F., and Rocha, E.P.C. (2011). The repertoire of ice in prokaryotes underscores the unity, diversity, and ubiquity of conjugation. PLoS Genet. *7*, e1002222.

Guglielmini, J., De La Cruz, F., and Rocha, E.P.C. (2013). Evolution of conjugation and type IV secretion systems. Mol. Biol. Evol. *30*, 315–331.

Guglielmini, J., Néron, B., Abby, S.S., Garcillán-Barcia, M.P., La Cruz, D.F., and Rocha, E.P.C. (2014). Key components of the eight classes of type IV secretion systems involved in bacterial conjugation or protein secretion. Nucleic Acids Res. *42*, 5715–5727.

Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D., and Andersson, D.I. (2011). Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. PLoS Pathog. *7*, e1002158.

Gullberg, E., Albrecht, L.M., Karlsson, C., Sandegren, L., and Andersson, D.I. (2014). Selection of a multidrug resistance plasmid by sublethal levels of antibiotics and heavy metals. MBio *5*, e01918-14.

Gunton, J.E., Ussher, J.E.R., Rooker, M.M., Wetsch, N.M., Alonso, G., and Taylor, D.E. (2008). Entry exclusion in the IncHI1 plasmid R27 is mediated by EexA and EexB. Plasmid *59*, 86–101.

Guo, Y., Quiroga, C., Chen, Q., McAnulty, M.J., Benedik, M.J., Wood, T.K., and Wang, X. (2014). RalR (a DNase) and RalA (a small RNA) form a type I toxin-antitoxin system in Escherichia coli. Nucleic Acids Res. *42*, 6448–6462.

Gurnev, P.A., Ortenberg, R., Dörr, T., Lewis, K., and Bezrukov, S.M. (2012). Persister-promoting bacterial toxin TisB produces anion-selective pores in planar lipid bilayers. FEBS Lett. *586*, 2529–2534.

Guynet, C., Cuevas, A., Moncalián, G., and de la Cruz, F. (2011). The stb operon balances the requirements for vegetative stability and conjugative transfer of plasmid R388. PLoS Genet. *7*, e1002073.

H. Wagner, E.G., and Unoson, C. (2012). The toxin-antitoxin system tisB-istR1: Expression, regulation and biological role in persister phenotypes. RNA Biol. *9*, 1513–1519.

Haase, J., Kalkum, M., and Lanka, E. (1996). TrbK, a small cytoplasmic membrane lipoprotein, functions in entry exclusion of the IncPα plasmid RP4. J. Bacteriol. *178*, 6720–6729.

Hall, R.M. (2010). Salmonella genomic islands and antibiotic resistance in Salmonella enterica. Future Microbiol. *5*, 1525–1538.

Hama, C., Takizawa, T., Moriwaki, H., and Mizobuchi, K. (1990). Role of leader peptide synthesis in repZ gene expression of the colIb-P9 plasmid. J. Biol. Chem. *265*, 10666–10673.

Hamidian, M., Holt, K.E., and Hall, R.M. (2015). Genomic resistance island AGI1 carrying a complex class 1 integron in a multiply antibiotic-resistant ST25 Acinetobacter baumannii isolate. J. Antimicrob. Chemother. *70*, 2519–2523.

Hancock, S.J., Phan, M.-D., Peters, K.M., Forde, B.M., Chong, T.M., Yin, W.-F., Chan, K.-G., Paterson, D.L., Walsh, T.R., Beatson, S.A., et al. (2017). Identification of IncA/C Plasmid Replication and Maintenance Genes and Development of a Plasmid Multilocus Sequence Typing Scheme. Antimicrob. Agents Chemother. *61*, e01740-16.

Hancock, S.J., Phan, M.D., Luo, Z., Lo, A.W., Peters, K.M., Nhu, N.T.K., Forde, B.M., Whitfield, J., Yang, J., Strugnell, R.A., et al. (2020). Comprehensive analysis of IncC plasmid conjugation identifies a crucial role for the transcriptional regulator AcaB. Nat. Microbiol. *5*, 1340–1348.

Hansen, L.H., Johannesen, E., Burmølle, M., Sørensen, A.H., and Sørensen, S.J. (2004). Plasmid-encoded multidrug efflux pump conferring resistance to olaquindox in Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. *48*, 3332–3337.

Harley, M.J., and Schildbach, J.F. (2003). Swapping single-stranded DNA sequence specificities of relaxases from conjugative plasmids F and R100. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 11243–11248.

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

Harms, A., Maisonneuve, E., and Gerdes, K. (2016). Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. Science (80-.). *354*, aaf4268.

Harms, A., Brodersen, D.E., Mitarai, N., and Gerdes, K. (2018). Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. Mol. Cell *70*, 768–784.

Harrison, P.W., Lower, R.P.J., Kim, N.K.D., and Young, J.P.W. (2010). Introducing the bacterial "chromid": not a chromosome, not a plasmid. Trends Microbiol. *18*, 141–148.

Hartskeerl, R.A., and Hoekstra, W.P.M. (1985). Exclusion by the IncI Plasmid Rl44 Determined by

Measuring DNA Transfer in Escherichia coli Conjugations. J. Gen. Microbiol. 2263–2267.

Hawkey, J., Le Hello, S., Doublet, B., Granier, S.A., Hendriksen, R.S., Fricke, W.F., Ceyssens, P.-J., Gomart, C., Billman-Jacobe, H., Holt, K.E., et al. (2019). Global phylogenomics of multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Kentucky ST198. Microb. Genomics *5*, e000269.

Hayashi, K., Morooka, N., Yamamoto, Y., Fujita, K., Isono, K., Choi, S., Ohtsubo, E., Baba, T., Wanner, B.L., Mori, H., et al. (2006). Highly accurate genome sequences of Escherichia coli K-12 strains MG1655 and W3110. Mol. Syst. Biol. *2*, 2006.0007.

Hayes, F. (2003). Toxins-antitoxins: Plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. Science (80-.). *301*, 1496–1499.

Heckman, K.L., and Pease, L.R. (2007a). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. Nat. Protoc. *2*, 924–932.

Heckman, K.L., and Pease, L.R. (2007b). Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. Nat. Protoc. *2*, 924–932.

Hedges, R.W. (1974). R factors from Providence. J. Gen. Microbiol. *81*, 171–181.

Heisig, P. (1996). Genetic evidence for a role of parC mutations in development of high-level fluoroquinolone resistance in Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. *40*, 879–885.

Helaine, S., Cheverton, A.M., Watson, K.G., Faure, L.M., Matthews, S.A., and Holden, D. (2014). Internalization of Salmonella by Macrophages Induces Formation of Nonreplicating Persisters. Science (80-.). *343*, 204–208.

Heller, D.M., Tavag, M., and Hochschild, A. (2017). CbtA toxin of Escherichia coli inhibits cell division and cell elongation via direct and independent interactions with FtsZ and MreB.

Le Hello, S., Weill, F.X., Guibert, V., Praud, K., Cloeckaert, A., and Doublet, B. (2012). Early strains of multidrug-resistant Salmonella enterica serovar Kentucky sequence type 198 from Southeast Asia harbor Salmonella genomic island 1-J variants with a novel insertion sequence. Antimicrob. Agents Chemother. *56*, 5096–5102.

Helms, M., Ethelberg, S., Mølbak, K., and Group, D.S. (2005). Typhimurium DT104 Infections, 1992–2001. Emerg. Infect. Dis. *11*, 859–867.

Henrikus, S.S., van Oijen, A.M., and Robinson, A. (2018). Specialised DNA polymerases in Escherichia coli: roles within multiple pathways. Curr. Genet. *64*, 1189–1196.

Hill, T.M., Tecklenburg, M.L., Pelletier, A.J., and Kuempel, P.L. (1989). tus, the trans-acting gene required for termination of DNA replication in Escherichia coli, encodes a DNA-binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *86*, 1593–1597.

Hindson, B.J., Ness, K.D., Masquelier, D.A., Belgrader, P., Heredia, N.J., Makarewicz, A.J., Bright, I.J., Lucero, M.Y., Hiddessen, A.L., Legler, T.C., et al. (2011). High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. Anal. Chem. *83*, 8604–8610.

Hiraga, S.I., Sugiyama, T., and Itoh, T. (1994). Comparative analysis of the replicon regions of eleven ColE2-related plasmids. J. Bacteriol. *176*, 7233–7243.

Ho, P.L., Lo, W.U., Chan, J., Cheung, Y.Y., Chow, K.H., Yam, W.C., Lin, C.H., and Que, T.L. (2014). pIMP-PH114 carrying blaIMP-4in a Klebsiella pneumoniae strain is closely related to other multidrug-resistant IncA/C2 plasmids. Curr. Microbiol. *68*, 227–232.

Hobbs, Z., and Abedon, S.T. (2016). Diversity of phage infection types and associated terminology: the problem with "Lytic or lysogenic." FEMS Microbiol. Lett. *363*, 1–8.

Hochhut, B., Lotfi, Y., Mazel, D., Faruque, S.M., Woodgate, R., and Waldor, M.K. (2001). Molecular Analysis of Antibiotic Resistance Gene Clusters in Vibrio cholerae O139 and Molecular Analysis of Antibiotic Resistance Gene Clusters in Vibrio cholerae O139 and O1 SXT Constins. Antimicrob. Agents Chemother. *45*, 2991–3000.

Hochschild, A., and Lewis, M. (2009). The bacteriophage λ CI protein finds an asymmetric solution. Curr. Opin. Struct. Biol. *19*, 79–86.

Hocquet, D., Llanes, C., Thouverez, M., Kulasekara, H.D., Bertrand, X., Plésiat, P., Mazel, D., and Miller, S.I. (2012). Evidence for induction of integron-based antibiotic resistance by the SOS response in a clinical setting. PLoS Pathog. *8*, e1002778.

Horiuchi, T., and Hidaka, M. (1988). Core sequence of two separable terminus sites of the R6K plasmid that exhibit polar inhibition of replication is a 20 bp inverted repeat. Cell *54*, 515–523.

Howland, C.J., Rees, C.E., Barth, P.T., and Wilkins, B.M. (1989). The ssb gene of plasmid ColIb-P9. J. Bacteriol. *171*, 2466–2473.

Hu, L., Vecchiarelli, A.G., Mizuuchi, K., Neuman, K.C., and Liu, J. (2017). Brownian ratchet mechanisms of ParA-mediated partitioning. Plasmid *92*, 12–16.

Huguet, K.T., Gonnet, M., Doublet, B., and Cloeckaert, A. (2016). A toxin antitoxin system promotes

the maintenance of the IncA/C-mobilizable Salmonella Genomic Island 1. Sci. Rep. *6*, 1–10.

Huguet, K.T., Rivard, N., Garneau, D., Palanee, J., and Burrus, V. (2020). Replication of the Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) triggered by helper IncC conjugative plasmids promotes incompatibility and plasmid loss. PLoS Genet. *16*, 1–22.

Humbert, M., Huguet, K.T., Coulombe, F., and Burrus, V. (2019). Entry exclusion of conjugative plasmids of the IncA, IncC, and related untyped incompatibility groups. J. Bacteriol. *209*, 1–16.

Hyland, E.M., Wallace, E.W.J., and Murraya, A.W. (2014). A model for the evolution of biological specificity: A cross-reacting DNA-binding protein causes plasmid incompatibility. J. Bacteriol. *196*, 3002–3011.

Ichige, A., and Kobayashi, I. (2005). Stability of EcoRI restriction-modification enzymes in vivo differentiates the EcoRI restriction-modification system from other postsegregational cell killing systems. J. Bacteriol. *187*, 6612–6621.

Ilangovan, A., Connery, S., and Waksman, G. (2015). Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. Trends Microbiol. *23*, 301–310.

Ilangovan, A., Kay, C.W.M., Roier, S., El Mkami, H., Salvadori, E., Zechner, E.L., Zanetti, G., and Waksman, G. (2017). Cryo-EM Structure of a Relaxase Reveals the Molecular Basis of DNA Unwinding during Bacterial Conjugation. Cell *169*, 708–721.

Imlay, J.A., and Linn, S. (1987). Mutagenesis and stress responses induced in Escherichia coli by hydrogen peroxide. J. Bacteriol. *169*, 2967–2976.

Ingmer, H., Fong, E.L., and Cohen, S.N. (1995). Monomer-dimer equilibrium of the pSC101 RepA protein. J. Mol. Biol. *250*, 309–314.

Irving, S.E., Choudhury, N.R., and Corrigan, R.M. (2021). The stringent response and physiological roles of (pp)pGpp in bacteria. Nat. Rev. Microbiol. *19*, 256–271.

Jacoby, G.A. (2005). Mechanisms of action and of resistance to quinolones. Clin. Infect. Dis. *41*, 120–126.

Jaszczur, M., Bertram, J.G., Robinson, A., Van Oijen, A.M., Woodgate, R., Cox, M.M., and Goodman, M.F. (2016). Mutations for Worse or Better: Low-Fidelity DNA Synthesis by SOS DNA Polymerase V Is a Tightly Regulated Double-Edged Sword. Biochemistry *55*, 2309–2318.

Johnson, C.M., and Grossman, A.D. (2015). Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They

Do and How They Work. Annu. Rev. Genet. *49*, 577–601.

Jones, E.C., and Uphoff, S. (2021). Single-molecule imaging of LexA degradation in Escherichia coli elucidates regulatory mechanisms and heterogeneity of the SOS response. Nat. Microbiol. *6*, 981–990.

Kaushik, M., Kumar, S., Kapoor, R.K., Virdi, J.S., and Gulati, P. (2018). Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. Int. J. Antimicrob. Agents *51*, 167–176.

Kawano, M., Aravind, L., and Storz, G. (2007). An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. Mol. Microbiol. *64*, 738–754.

Keen, E.C., Bliskovsky, V. V, Malagon, F., Baker, J.D., Prince, J.S., Klaus, J.S., and Adhya, S.L. (2017). Novel "Superspreader" Bacteriophages Promote Horizontal Gene Transfer by Transformation. MBio *8*, e02115-16.

Keren, I., Shah, D., Spoering, A., Kaldalu, N., and Lewis, K. (2004). Specialized persister cells and the mechanism of multidrug tolerance in Escherichia coli. J. Bacteriol. *186*, 8172–8180.

Khil, P.P., and Camerini-Otero, R.D. (2002). Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of Escherichia coli. Mol. Microbiol. *44*, 89–105.

Kim, M., and Ryu, S. (2013). Antirepression System Associated with the Life Cycle Switch in the Temperate Podoviridae Phage SPC32H. J. Virol. *87*, 11775–11786.

Kim, Y.J., and Meyer, R.J. (1991). An essential iteron-binding protein required for plasmid R1162 replication induces localized melting within the origin at a specific site in AT-rich DNA. J. Bacteriol. *173*, 5539–5545.

Kim, J.W., Bugata, V., Cortés-Cortés, G., Quevedo-martínez, G., and Camps, M. (2020). Mechanisms of Theta Plasmid Replication in Enterobacteria and Implications for Adaptation to Its Host. EcoSal Plus *9*, 1–35.

Kimsey, H.H., and Waldor, M.K. (2009). Vibrio cholerae LexA coordinates CTX prophage gene expression. J. Bacteriol. *191*, 6788–6795.

Kiss, J., Papp, P.P., Szabó, M., Farkas, T., Murányi, G., Szakállas, E., and Olasz, F. (2015). The master regulator of IncA/C plasmids is recognized by the Salmonella Genomic island SGI1 as a signal for excision and conjugal transfer. Nucleic Acids Res. *43*, 8735–8745.

Kiss, J., Szabó, M., Hegyi, A., Douard, G., Praud, K., Nagy, I., Olasz, F., Cloeckaert, A., and Doublet, B. (2019). Identification and characterization of orit and two mobilization genes required for

conjugative transfer of Salmonella genomic island 1. Front. Microbiol. *10*, 457.

Klimke, W.A., and Frost, L.S. (1998). Genetic analysis of the role of the transfer gene, traN, of the F and R100-1 plasmids in mating pair stabilization during conjugation. J. Bacteriol. *180*, 4036–4043.

Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., and Collins, J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria: From targets to networks. Nat. Rev. Microbiol. *8*, 423–435.

Kok, M., Arnberg, A.C., and Witholt, B. (1989). Single-stranded circular DNA generated from broad host range plasmid R1162 and its derivatives. Plasmid *21*, 238–241.

Komori, H., Matsunaga, F., Higuchi, Y., Ishiai, M., Wada, C., and Miki, K. (1999). Crystal structure of a prokaryotic replication initiator protein bound to DNA at 2.6 Å resolution. EMBO J. *18*, 4597–4607.

Konieczny, I., Bury, K., Wawrzycka, A., and Wegrzyn, K. (2015). Iteron Plasmids. Plasmids Biol. Impact Biotechnol. Discov. *2*, 13–32.

Kopotsa, K., Osei Sekyere, J., and Mbelle, N.M. (2019). Plasmid evolution in carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a review. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1457*, 61–91.

Kowalczykowski, S.C. (2000). Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. Trends Biochem. Sci. *25*, 156–165.

Kowalczykowski, S.C., Clow, J., Somani, R., and Varghese, A. (1987). Effects of the Escherichia coli SSB protein on the binding of Escherichia coli RecA protein to single-stranded DNA. Demonstration of competitive binding and the lack of a specific protein-protein interaction. J. Mol. Biol. *193*, 81–95.

Kraemer, J.A., Erb, M.L., Waddling, C.A., Montabana, E.A., Zehr, E.A., Wang, H., Nguyen, K., Pham, D.S.L., Agard, D.A., and Pogliano, J. (2012). A phage tubulin assembles dynamic filaments by an atypical mechanism to center viral DNA within the host cell. Cell *149*, 1488–1499.

Ktari, S., Le Hello, S., Ksibi, B., Courdavault, L., Mnif, B., Maalej, S., Fabre, L., Hammami, A., and Weill, F.X. (2015). Carbapenemase-producing Salmonella enterica serotype Kentucky ST198, North Africa. J. Antimicrob. Chemother. *70*, 3405–3407.

Kuhar, I., and Žgur-Bertok, D. (1999). Transcription regulation of the colicin K cka gene reveals induction of colicin synthesis by differential responses to environmental signals. J. Bacteriol. *181*, 7373–7380.

Kulakauskas, S., Lubys, A., and Ehrlich, S.D. (1995). DNA restriction-modification systems mediate

plasmid maintenance. J. Bacteriol. *177*, 3451–3454.

De La Cruz, F., Frost, L.S., Meyer, R.J., and Zechner, E.L. (2010). Conjugative DNA metabolism in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. *34*, 18–40.

Langille, M.G.I., Hsiao, W.W.L., and Brinkman, F.S.L. (2010). Detecting genomic islands using bioinformatics approaches. Nat. Rev. Microbiol. *8*, 373–382.

Larsen, R.A., Cusumano, C., Fujioka, A., Lim-Fong, G., Patterson, P., and Pogliano, J. (2007). Treadmilling of a prokaryotic tubulin-like protein, TubZ, required for plasmid stability in Bacillus thuringiensis. Genes Dev. *21*, 1340–1352.

Lawley, T.D., Klimke, W.A., Gubbins, M.J., and Frost, L.S. (2003). F factor conjugation is a true type IV secretion system. FEMS Microbiol. Lett. *224*, 1–15.

Lee, C.A., Babic, A., and Grossman, A.D. (2010). Autonomous plasmid-like replication of a conjugative transposon. Mol Microbiol. *75*, 268–279.

Lei, C.-W., Chen, Y.-P., Kong, L.-H., Zeng, J.-X., Wang, Y.-X., Zhang, A.-Y., and Wang, H.-N. (2018). PGI2 Is a Novel SGI1-Relative Multidrug-Resistant Genomic Island Characterized in Proteus mirabilis. Antimicrob. Agents Chemother. *62*, e00019-18.

Lei, C.W., Zhang, A.Y., Liu, B.H., Wang, H.N., Guan, Z. Bin, Xu, C.W., Xia, Q.Q., Cheng, H., and Zhang, D.D. (2014). Molecular characteristics of salmonella genomic island 1 in Proteus mirabilis isolates from poultry farms in China. Antimicrob. Agents Chemother. *58*, 7570–7572.

Lei, C.W., Zhang, A.Y., Liu, B.H., Wang, H.N., Yang, L.Q., Guan, Z. Bin, Xu, C.W., Zhang, D.D., and Yang, Y.Q. (2015). Two novel Salmonella genomic island 1 variants in Proteus mirabilis isolates from swine farms in China. Antimicrob. Agents Chemother. *59*, 4336–4338.

Leplae, R., Geeraerts, D., Hallez, R., Guglielmini, J., Drze, P., and Van Melderen, L. (2011). Diversity of bacterial type II toxin-antitoxin systems: A comprehensive search and functional analysis of novel families. Nucleic Acids Res. *39*, 5513–5525.

LeRoux, M., Culviner, P.H., Liu, Y.J., Littlehale, M.L., and Laub, M.T. (2020). Stress Can Induce Transcription of Toxin-Antitoxin Systems without Activating Toxin. Mol. Cell *79*, 280-292.e8.

Lévesque, C., Brassard, S., Lapointe, J., and Roy, P.H. (1994). Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integron. Gene *142*, 49–54.

Levin, B.R., Stewart, F.M., and Rice, V.A. (1979). The kinetics of conjugative plasmid transmission:

Fit of a simple mass action model. Plasmid *2*, 247–260.

Levings, R.S., Djordjevic, S.P., and Hall, R.M. (2008). SGI2, a relative of Salmonella genomic island SGI1 with an independent origin. Antimicrob. Agents Chemother. *52*, 2529–2537.

Lewin, C.S., and Amyes, S.G.B. (1991). The role of the SOS response in bacteria exposed to zidovudine or trimethoprim. J. Med. Microbiol. *34*, 329–332.

Lewis, K. (2010). Persister cells. Annu. Rev. Microbiol. *64*, 357–372.

Lewis, R.A., Curnock, S.P., and Dyke, K.G.H. (1999). Proteolytic cleavage of the repressor (BlaI) of β-lactamase synthesis in Staphylococcus aureus. FEMS Microbiol. Lett. *178*, 271–275.

Lilly, J., and Camps, M. (2015). Mechanisms of Theta Plasmid Replication. Plasmids *3*, 33–44.

Lin, D.C., and Grossman, A.D. (1998). Identification and characterization of a bacterial chromosome partitioning site. Cell *92*, 675–685.

Lindsey, R.L., Fedorka-Cray, P.J., Frye, J.G., and Meinersmann, R.J. (2009). Inc A/C plasmids are prevalent in multidrug-resistant Salmonella enterica isolates. Appl. Environ. Microbiol. *75*, 1908–1915.

Little, J.W. (1984). Autodigestion of lexA and phage λ repressors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *81*, 1375–1379.

Little, J.W., and Gellert, M. (1983). The SOS regulatory system: Control of its state by the level of RecA protease. J. Mol. Biol. *167*, 791–808.

Little, J.W., Edminston, S.H., Pacelli, L.Z., and Mount, D. (1980). Cleavage of the Escherichia coli lexA protein by the recA protease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *77*, 3225–3229.

Liu, Y.Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. Lancet Infect. Dis. *16*, 161–168.

Livny, J., Yamaichi, Y., and Waldor, M.K. (2007). Distribution of Centromere-Like parS Sites in Bacteria: Insights from Comparative Genomics. J. Bacteriol. *189*, 8693–8703.

Llosa, M., Gomis-Rüth, F.X., Coll, M., and De la Cruz, F. (2002). Bacterial conjugation: A two-step mechanism for DNA transport. Mol. Microbiol. *45*, 1–8.

Lloubes, R., Granger-Schnarr, M., Lazdunski, C., and Schnarr, M. (1991). Interaction of a regulatory protein with a DNA target containing two overlapping binding sites. J. Biol. Chem. *266*, 2303–2312.

Loenen, W.A.M., and Raleigh, E.A. (2014). The other face of restriction: Modification-dependent enzymes. Nucleic Acids Res. *42*, 56–69.

Loftie-Eaton, W., and Rawlings, D.E. (2012). Diversity, biology and evolution of IncQ-family plasmids. Plasmid *67*, 15–34.

Lohman, T.M., and Ferrari, M.E. (1994). ESCHERICHIA COLI SINGLE STRANDED DNA-BINDING PROTEIN : Multiple DNA-Binding Modes and Cooperativities. Proteins *63*, 527–570.

Lovett, M.A., Sparks, R.B., and Helinski, D.R. (1975). Bidirectional replication of plasmid R6K DNA in Escherichia coli; correspondence between origin of replication and position of single strand break in relaxed complex. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *72*, 2905–2909.

Lu, J., Wong, J.J.W., Edwards, R.A., Manchak, J., Frost, L.S., and Glover, J.N.M. (2008). Structural basis of specific TraD-TraM recognition during F plasmid-mediated bacterial conjugation. Mol. Microbiol. *70*, 89–99.

Luo, Y., Gao, Q., and Deonier, R.C. (1994). Mutational and physical analysis of F plasmid traY protein binding to oriT. Mol. Microbiol. *11*, 459–469.

Luo, Y., Pfuetzner, R.A., Mosimann, S., Paetzel, M., Frey, E.A., Cherney, M., Kim, B., Little, J.W., and Strynadka, N.C.J. (2001). Crystal structure of LexA: A conformational switch for regulation of self-cleavage. Cell *106*, 585–594.

Lusetti, S.L., and Cox, M.M. (2002). The bacterial RecA protein and the recombinational DNA repair of stalled replication forks. Annu. Rev. Biochem. *71*, 71–100.

Lynch, A.S., and Wang, J.C. (1995). SopB protein-mediated silencing of genes linked to the sopC locus of Escherichia coli F plasmid. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 1896–1900.

Lyons, C. (1946). Penicillin and its use in the war wounded. Am. J. Surg. *72*, 315–318.

MacLean, R.C., and Millan, A.S. (2019). The evolution of antibiotic resistance. Science (80-.). *365*, 1082–1083.

Magiorakos, A., Srinivasan, A., Carey, R.B., Carmeli, Y., Falagas, M.E., Giske, C.G., Harbarth, S., and Hindler, J.F. (2011). Bacteria : an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. Clin. Microbiol. Infect. *18*, 268–281.

Magnuson, R., Lehnherr, H., Mukhopadhyay, G., and Yarmolinsky, M.B. (1996). Autoregulation of the plasmid addiction operon of bacteriophage P1. J. Biol. Chem. *271*, 18705–18710.

Mahillon, J., and Chandler, M. (1998). Insertion sequences. Microbioliology Mol. Biol. Rev. *62*, 725-74.

Majeed, H., Gillor, O., Kerr, B., and Riley, M.A. (2011). Competitive interactions in Escherichia coli populations: The role of bacteriocins. ISME J. *5*, 71–81.

Al Mamun, A.A.M., Kishida, K., and Christie, P.J. (2021). Protein transfer through an f plasmid-encoded type iv secretion system suppresses the mating-induced sos response. MBio *12*, e01629-21.

Mardanov, A. V., and Ravin, N. V. (2007). The antirepressor needed for induction of linear plasmid-prophage N15 belongs to the SOS regulon. J. Bacteriol. *189*, 6333–6338.

Marrero, J., and Waldor, M.K. (2007). The SXT/R391 family of integrative conjugative elements is composed of two exclusion groups. J. Bacteriol. *189*, 3302–3305.

Martín-García, B., Martín-González, A., Carrasco, C., Hernández-Arriaga, A.M., Ruíz-Quero, R., Díaz-Orejas, R., Aicart-Ramos, C., Moreno-Herrero, F., and Oliva, M.A. (2018). The TubR-centromere complex adopts a double-ring segrosome structure in Type III partition systems. Nucleic Acids Res. *46*, 5704–5716.

Masai, H., and Arai, K.I. (1997). Frpo: A novel single-stranded DNA promoter for transcription and for primer RNA synthesis of DNA replication. Cell *89*, 897–907.

Maslowska, K.H., Makiela-Dzbenska, K., and Fijalkowska, I.J. (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. Environ. Mol. Mutagen. *60*, 368–384.

Masuda, H., Tan, Q., Awano, N., Wu, K.P., and Inouye, M. (2012). YeeU enhances the bundling of cytoskeletal polymers of MreB and FtsZ, antagonizing the CbtA (YeeV) toxicity in Escherichia coli. Mol. Microbiol. *84*, 979–989.

Mazel, D. (2006). Integrons: Agents of bacterial evolution. Nat. Rev. Microbiol. *4*, 608–620.

Mazel, D., Dychinco, B., Webb, V.A., and Davies, J. (1998). A distinctive class of integron in the Vibrio cholerae genome. Science (80-.). *280*, 605–608.

Mazón, G., Lucena, J.M., Campoy, S., Fernández De Henestrosa, A.R., Candau, P., and Barbé, J. (2004). LexA-binding sequences in Gram-positive and cyanobacteria are closely related. Mol. Genet. Genomics *271*, 40–49.

McCool, J.D., Long, E., Petrosino, J.F., Sandler, H.A., Rosenberg, S.M., and Sandler, S.J. (2004). Measurement of SOS expression in individual Escherichia coli K-12 cells using fluorescence microscopy. Mol. Microbiol. *53*, 1343–1357.

McCusker, M.P., Hokamp, K., Buckley, J.F., Wall, P.G., Martins, M., and Fanning, S. (2014). Complete Genome Sequence of Salmonella enterica Serovar Agona Pulsed-Field Type SAGOXB.0066, Cause of a 2008 Pan-European Outbreak. Genome Announc. *2*, e01219-13.

McLeod, S.M., Burrus, V., and Waldor, M.K. (2006). Requirement for Vibrio cholerae integration host factor in conjugative DNA transfer. J. Bacteriol. *188*, 5704–5711.

Mendiola, M.V., Bernales, I., and De La Cruz, F. (1994). Differential roles of the transposon termini in IS91 transposition. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *91*, 1922–1926.

Mertens, K., Lantsheer, L., and Samuel, J.E. (2005). A minimal set of DNA repair genes is sufficient for survival of Coxiella burnetii under oxidative stress. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1063*, 73–75.

Meyer, R.R., and Laine, P.S. (1990). The single-stranded DNA-binding protein of Escherichia coli. Microbiol. Rev. *54*, 342–380.

Miao, D. ming, Honda, Y., Tanaka, K., Higashi, A., Nakamura, T., Taguchi, Y., Sakai, H., Komano, T., and Bagdasarian, M. (1993). A base-paired hairpin structure essential for the functional priming signal for DNA replication of the broad host range plasmid RSF1010. Nucleic Acids Res. *21*, 4900–4903.

Miao, D. ming, Sakai, H., Okamoto, S., Tanaka, K., Okuda, M., Honda, Y., Komano, T., and Bagdasarian, M. (1995). The interaction of repC initiator with iterons in the replication of the broad host-range plasmid RSF1010. Nucleic Acids Res. *23*, 3295–3300.

Miller, J.H. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Miller, C., Ingmer, H., Thomsen, L.E., Skarstad, K., and Cohen, S.N. (2003). DpiA binding to the replication origin of Escherichia coli plasmids and chromosomes destabilizes plasmid inheritance and induces the bacterial SOS response. J. Bacteriol. *185*, 6025–6031.

Miller, C., Thomsen, L.E., Gaggero, C., Mosseri, R., Ingmer, H., and Cohen, S.N. (2004). SOS response induction by β-lactams and bacterial defense against antibiotic lethality. Science (80-.). *305*, 1629–1631.

Minkley, E.G., and Willetts, N.S. (1984). Overproduction, purification and characterization of the F tra T protein. *196*, 225–235.

Mishra, S., Klümper, U., Voolaid, V., Berendonk, T.U., and Kneis, D. (2021). Simultaneous estimation of parameters governing the vertical and horizontal transfer of antibiotic resistance genes. Sci. Total Environ. *798*, 149174.

Mohana-Borges, R., Pacheco, A.B.F., Sousa, F.J.R., Foguel, D., Almeida, D.F., and Silva, J.L. (2000). LexA repressor forms stable dimers in solution. The role of specific DNA in tightening protein-protein interactions. J. Biol. Chem. *275*, 4708–4712.

Møller-Jensen, J., Borch, J., Dam, M., Jensen, R.B., Roepstorff, P., and Gerdes, K. (2003). Bacterial Mitosis: ParM of Plasmid R1 Moves Plasmid DNA by an Actin-like Insertional Polymerization Mechanism. Mol. Cell *12*, 1477–1487.

Møller-Jensen, J., Ringgaard, S., Mercogliano, C.P., Gerdes, K., and Löwe, J. (2007). Structural analysis of the ParR/parC plasmid partition complex. EMBO J. *26*, 4413–4422.

Moncalián, G., Grandoso, G., Llosa, M., and De la Cruz, F. (1997). OriT-processing and regulatory roles of TrwA protein in plasmid R388 conjugation. J. Mol. Biol. *270*, 188–200.

Moon, D.C., Yoon, S.S., and Lim, S.K. (2021). Complete genome sequence of a ciprofloxacin-resistant Salmonella Kentucky ST198 strain from a chicken carcass in South Korea. J. Glob. Antimicrob. Resist. *24*, 373–375.

Moreau, M.J.J., and Schaeffer, P.M. (2012). Differential Tus-Ter binding and lock formation: Implications for DNA replication termination in Escherichia coli. Mol. Biosyst. *8*, 2783–2791.

Mount, D.W. (1977). A mutant of Escherichia coli showing constitutive expression of the lysogenic induction and error prone DNA repair pathways. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *74*, 300–304.

Mount, D.W., Low, K.B., and Edmiston, S.J. (1972). Dominant mutations (lex) in Escherichia coli K-12 which affect radiation sensitivity and frequency of ultraviolet lght-induced mutations. J. Bacteriol. *112*, 886–893.

Movahedzadeh, F., Colston, J.M., and Davis, E.O. (1997). Characterization of Mycobacterium tuberculosis LexA: recognition of a Cheo (Bacillus-type SOS) box. Microbiology *143*, 929–936.

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

Mulvey, M.R., Boyd, D.A., Olson, A.B., Doublet, B., and Cloeckaert, A. (2006). The genetics of Salmonella genomic island 1. Microbes Infect. *8*, 1915–1922.

Murányi, G., Szabó, M., Olasz, F., and Kiss, J. (2016). Determination and analysis of the putative AcaCD-responsive promoters of salmonella genomic island 1. PLoS One *11*, e0164561.

Murray, C.J., Ikuta, K.S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., et al. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. Lancet *399*, 629–655.

Naas, T., Mikami, Y., Imai, T., Poirel, L., and Nordmann, P. (2001). Characterization of In53, a Class 1 Plasmid- and Composite Transposon-Located Integron of. Society *183*, 235–249.

Nadeem, S.F., Gohar, U.F., Tahir, S.F., Mukhtar, H., Pornpukdeewattana, S., Nukthamna, P., Moula Ali, A.M., Bavisetty, S.C.B., and Massa, S. (2020). Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. Crit. Rev. Microbiol. *46*, 578–599.

Nagy, I., Szabó, M., Hegyi, A., and Kiss, J. (2021). Salmonella Genomic Island 1 requires a self-encoded small RNA for mobilization. Mol. Microbiol. *00*, 1–19.

Nakasu, S., and Tomizawa, J.I. (1992). Structure of the ColE1 DNA molecule before segregation to daughter molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *89*, 10139–10143.

Napolitano, R., Janel-bintz, R., Wagner, J., and Fuchs, R.P.P. (2000). All three SOS-inducible DNA polymerases (Pol II, Pol IV and Pol V) are involved in induced mutagenesis. EMBO J. *19*, 6259–6265.

Navarre, W.W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2006). Selective Silencing of Foreign DNA with Low GC Content by the H-NS Protein in Salmonella. Science (80-.). *313*, 236–238.

Neher, S.B., Flynn, J.M., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2003). Latent ClpX-recognition signals ensure LexA destruction after DNA damage. Genes Dev. *17*, 1084–1089.

Nicolaou, K.C., and Rigol, S. (2018). A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. J. Antibiot. (Tokyo). *71*, 153–184.

Nicolas, E., Lambin, M., Dandoy, D., Galloy, C., Nguyen, N., Oger, C.A., and Hallet, B. (2015). The Tn3-family of Replicative Transposons. Microbiol. Spectr. *3*, 1–32.

Nolivos, S., Cayron, J., Dedieu, A., Page, A., Delolme, F., and Lesterlin, C. (2019). Role of AcrAB-TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer. Science *364*, 778–782.

Nordstrom, K., and Austin, S.J. (1989). Mechanisms That Contribute To The Stable Segregation Of Plasmids. Annu. Rev. Genet. *23*, 37–69.

Novick, R.P. (1987). Plasmid incompatibility. Microbiol. Rev. *51*, 381–395.

Novick, R.P., Clowes, R.C., Cohen, S.N., Curtiss IIIrd, R., Datta, N., and Falkow, S. (1976). Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a proposal. Bacteriol. Rev. *40*, 168–189.

O'neill, J. (2016). Review on antimicrobial resistance. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. https://amr-review.org/Publications.html.

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

Ohno, S., Handa, N., Watanabe-Matsui, M., Takahashi, N., and Kobayashi, I. (2008). Maintenance forced by a restriction-modification system can be modulated by a region in its modification enzyme not essential for methyltransferase activity. J. Bacteriol. *190*, 2039–2049.

Page, R., and Peti, W. (2016). Toxin-antitoxin systems in bacterial growth arrest and persistence. Nat. Chem. Biol. *12*, 208–214.

Pandey, D.P., and Gerdes, K. (2005). Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. Nucleic Acids Res. *33*, 966–976.

Pansegrau, W., Ziegelin, G., and Lanka, E. (1990). Covalent association of the traI gene product of plasmid RP4 with the 5'-terminal nucleotide at the relaxation nick site. J. Biol. Chem. *265*, 10637–10644.

Pärnänen, K.M.M., Narciso-da-Rocha, C., Kneis, D., Berendonk, T.U., Cacace, D., Do, T.T., Elpers, C., Fatta-Kassinos, D., Henriques, I., Jaeger, T., et al. (2019). Antibiotic resistance in European wastewater treatment plants mirrors the pattern of clinical antibiotic resistance prevalence. Sci. Adv. *5*, eaau9124.

Partridge, S.R. (2011). Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol. Rev. *35*, 820–855.

Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., and Jensen, S.O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. Clin. Microbiol. Rev. *31*, 1–61.

Pembroke, J.T., and Stevens, E. (1984). The effect of plasmid R391 and other IncJ plasmids on the survival of Escherichia coli after UV irradiation. J. Gen. Microbiol. *130*, 1839–1844.

Penfold, S.S., Simon, J., and Frost, L.S. (1996). Regulation of the expression of the traM gene of the F sex factor of Escherichia coli. Mol. Microbiol. *20*, 549–558.

Pennington, J.M., and Rosenberg, S.M. (2007). Spontaneous DNA breakage in single living Escherichia coli cells. Nat. Genet. *39*, 797–802.

Pérez-Oseguera, Á., and Cevallos, M.A. (2013). RepA and RepB exert plasmid incompatibility repressing the transcription of the repABC operon. Plasmid *70*, 362–376.

Périchon, B., Courvalin, P., and Galimand, M. (2007). Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in Escherichia coli. Antimicrob. Agents Chemother. *51*, 2464–2469.

Petrova, V., Chitteni-Pattu, S., Drees, J.C., Inman, R.B., and Cox, M.M. (2009). An SOS Inhibitor that Binds to Free RecA Protein: The PsiB Protein. Mol. Cell *36*, 121–130.

Piddock, L.J.V., Hall, M.C., and Walters, R.N. (1991). Phenotypic characterization of quinolone-resistant mutants of enterobacteriaceae selected from wild type, gyra type and multiplyresistant (mara) type strains. J. Antimicrob. Chemother. *28*, 185–198.

Pinto, U.M., Flores-Mireles, A.L., Costa, E.D., and Winans, S.C. (2011). RepC protein of the octopine-type Ti plasmid binds to the probable origin of replication within repC and functions only in cis. Mol. Microbiol. *81*, 1593–1606.

Pinto, U.M., Pappas, K.M., and Winans, S.C. (2012). The ABCs of plasmid replication and segregation. Nat. Rev. Microbiol. *86*, 155–180.

Planchenault, C., Pons, M.C., Schiavon, C., Siguier, P., Rech, J., Guynet, C., Dauverd-Girault, J., Cury, J., Rocha, E.P.C., Junier, I., et al. (2020). Intracellular Positioning Systems Limit the Entropic Eviction of Secondary Replicons Toward the Nucleoid Edges in Bacterial Cells. J. Mol. Biol. *432*, 745–761.

Pluta, R., and Espinosa, M. (2018). Antisense and yet sensitive: Copy number control of rolling circle-replicating plasmids by small RNAs. Wiley Interdiscip. Rev. RNA e1500.

Pohlhaus, J.R., and Kreuzer, K.N. (2005). Norfloxacin-induced DNA gyrase cleavage complexes block Escherichia coli replication forks, causing double-stranded breaks in vivo. Mol. Microbiol. *56*, 1416–1429.

Poirel, L., Villa, L., Bertini, A., Pitout, J.D., Nordmann, P., and Carattoli, A. (2007). Expanded-spectrum β-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance [16]. Emerg. Infect. Dis. *13*, 803–

805.

Polisky, B. (1988). ColE1 replication control circuitry: Sense from antisense. Cell *55*, 929–932.

Popp, D., Xu, W., Narita, A., Brzoska, A.J., Skurray, R.A., Firth, N., Goshdastider, U., Maéda, Y., Robinson, R.C., and Schumacher, M.A. (2010). Structure and filament dynamics of the pSK41 actin-like ParM protein implications for plasmid DNA segregation. J. Biol. Chem. *285*, 10130–10140.

Poulin-Laprade, D., and Burrus, V. (2015). A γ Cro-like repressor is essential for the induction of conjugative transfer of SXT/R391 elements in response to DNA damage. J. Bacteriol. *197*, 3822–3833.

Poulin-Laprade, D., Carraro, N., and Burrus, V. (2015a). The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids. Front. Microbiol. *6*, 837.

Poulin-Laprade, D., Matteau, D., Jacques, P.E., Rodrigue, S., and Burrus, V. (2015b). Transfer activation of SXT/R391 integrative and conjugative elements: Unraveling the SetCD regulon. Nucleic Acids Res. *43*, 2045–2056.

Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., and Claverys, J.-P. (2006). Antibiotic Stress Induces Genetic Transformability in the Human Pathogen Streptococcus pneumoniae. Science (80-.). *313*, 89–92.

Prysak, M.H., Mozdzierz, C.J., Cook, A.M., Zhu, L., Zhang, Y., Inouye, M., and Woychik, N.A. (2009). Bacterial toxin YafQ is an endoribonuclease that associates with the ribosome and blocks translation elongation through sequence-specific and frame-dependent mRNA cleavage. Mol. Microbiol. *71*, 1071–1087.

Pugsley, A.P. (1984). Genetic analysis of ColN plasmid determinants for colicin production, release, and immunity. J. Bacteriol. *158*, 523–529.

Qi, Q., Kamruzzaman, M., and Iredell, J.R. (2021). The higBA- Type Toxin-Antitoxin System in IncC Plasmids Is a Mobilizable Ciprofloxacin-Inducible System. MSphere *6*, e00424-21.

Quillardet, P., Rouffaud, M.A., and Bouige, P. (2003). DNA array analysis of gene expression in response to UV irradiation in Escherichia coli. Res. Microbiol. *154*, 559–572.

Quinones, M., Kimsey, H.H., and Waldor, M.K. (2005). LexA cleavage is required for CTX prophage induction. Mol. Cell *17*, 291–300.

Quiroga, M.P., Arduino, S.M., Merkier, A.K., Quiroga, C., Petroni, A., Roy, P.H., and Centrón, D.

(2013). “Distribution and functional identification of complex class 1 integrons.” Infect. Genet. Evol. *19*, 88–96.

Radman, M. (1975). SOS repair hypothesis: phenomenology of an inducible DNA repair which is accompanied by mutagenesis. Mol. Mech. Repair DNA 355–367.

Da Re, S., Garnier, F., Guérin, E., Campoy, S., Denis, F., and Ploy, M.C. (2009). The SOS response promotes qnrB quinolone-resistance determinant expression. EMBO Rep. *10*, 929–933.

Redondo-Salvo, S., Fernández-López, R., Ruiz, R., Vielva, L., de Toro, M., Rocha, E.P.C., Garcillán-Barcia, M.P., and de la Cruz, F. (2020). Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. Nat. Commun. *11*, 3602.

Redondo-Salvo, S., Bartomeus-Peñalver, R., Vielva, L., Tagg, K.A., Webb, H.E., Fernández-López, R., and de la Cruz, F. (2021). COPLA, a taxonomic classifier of plasmids. BMC Bioinformatics *22*, 390.

Redzej, A., Ilangovan, A., Lang, S., Gruber, C.J., Topf, M., Zangger, K., Zechner, E.L., and Waksman, G. (2013). Structure of a translocation signal domain mediating conjugative transfer by type IV secretion systems. Mol. Microbiol. *89*, 324–333.

Renesto, P., Ogata, H., Audic, S., Claverie, J.M., and Raoult, D. (2005). Some lessons from Rickettsia genomics. FEMS Microbiol. Rev. *29*, 99–117.

Reyes-Lamothe, R., Tran, T., Meas, D., Lee, L., Li, A.M., Sherratt, D.J., and Tolmasky, M.E. (2014). High-copy bacterial plasmids diffuse in the nucleoid-free space, replicate stochastically and are randomly partitioned at cell division. Nucleic Acids Res. *42*, 1042–1051.

Rivera-Urbalejo, A., Pérez-Oseguera, Á., Carreón-Rodríguez, O.E., and Cevallos, M.A. (2015). Mutations in an antisense RNA, involved in the replication control of a repABC plasmid, that disrupt plasmid incompatibility and mediate plasmid speciation. Plasmid *78*, 48–58.

Robbe-Saule, V., Schaeffer, F., Kowarz, L., and Norel, F. (1997). Relationships between H-NS, σ(S), SpvR and growth phase in the control of spvR, the regulatory gene of the Salmonella plasmid virulence operon. Mol. Gen. Genet. *256*, 333–347.

Roberts, J.W., and Roberts, C.W. (1975). Proteolytic Cleavage of Bacteriophage Lambda Repressor in Induction. Proc. Natl. Acad. Sci. *72*, 147–151.

Roberts, J.W., Roberts, C.W., and Craig, N.L. (1978). Escherichia coli recA gene product inactivates

phage λ repressor. Proc. Natl. Acad. Sci. *75*, 4714–4718.

Roberts, R.J., Vincze, T., Posfai, J., and Macelis, D. (2010). REBASE-A database for DNA restriction and modification: Enzymes, genes and genomes. Nucleic Acids Res. *38*, 2009–2011.

Robinson, A., McDonald, J.P., Caldas, V.E.A., Patel, M., Wood, E.A., Punter, C.M., Ghodke, H., Cox, M.M., Woodgate, R., Goodman, M.F., et al. (2015). Regulation of Mutagenic DNA Polymerase V Activation in Space and Time. PLoS Genet. *11*, e1005482.

Ronneau, S., and Helaine, S. (2019). Clarifying the Link between Toxin–Antitoxin Modules and Bacterial Persistence. J. Mol. Biol. *431*, 3462–3471.

Rosenberg, C., Casse-Delbart, F., Dusha, I., David, M., and Boucher, C. (1982). Megaplasmids in the plant-associated bacteria Rhizobium meliloti and Pseudomonas solanacearum. J. Bacteriol. *150*, 402–406.

Rowe-Magnus, D.A., Guerout, A.M., Ploncard, P., Dychinco, B., Davies, J., and Mazel, D. (2001). The evolutionary history of chromosomal super-integrons provides an ancestry for multiresistant integrons. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *98*, 652–657.

Rozwandowicz, M., Brouwer, M.S.M., Fischer, J., Wagenaar, J.A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D.J., and Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. J. Antimicrob. Chemother. *73*, 1121–1137.

Ruiz-Masó, J.A., Machón, C., Espinosa, M., Coll, M., and Solar, G.D.E.L. (2015). Plasmid Rolling-Circle Replication. *3*, PLAS-0035-2014.

Ruiz-Echevarria., M.J., Berzal-Herranz, A., Gerdes, K., and Diaz-Orejas, R. (1991). The kis and kid genes of the parD maintenance system of plasmid R1 form an operon that is autoregulated at the level of transcription by the co-ordinated action of the Kis and Kid proteins. Mol. Microbiol. *5*, 2685–2693.

Ruvolo, P.P., Keating, K.M., Williams, K.R., and Chase, J.W. (1991). Single-stranded DNA binding proteins (SSBs) from prokaryotic transmissible plasmids. Proteins Struct. Funct. Bioinforma. *9*, 120–134.

Ryan, M.P., Armshaw, P., and Pembroke, J.T. (2016). SXT/R391 integrative and conjugative elements (ICEs) encode a novel “trap-door” strategy for mobile element escape. Front. Microbiol. *7*, 829.

Salje, J. (2010). Plasmid segregation: how to survive as an extra piece of DNA. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. *45*, 296–317.

Salje, J., Gayathri, P., and Löwe, J. (2010). The ParMRC system: molecular mechanisms of plasmid segregation by actin-like filaments. Nat. Rev. Microbiol. *8*, 683–692.

Sanchez, A., Cattoni, D., WALTER, J.-C., Rech, J., Parmeggiani, A., Nollmann, M., and Bouet, J. (2015). Stochastic Self-Assembly of ParB Proteins Builds the Bacterial DNA Segregation Apparatus. Cell Syst. *1*, 163–173.

Sandvang, D., Aarestrup, F.M., and Jensen, L.B. (1997). Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant Salmonella enterica Typhimurium DT104. FEMS Microbiol. Lett. *157*, 177–181.

Santos-Zavaleta, A., Salgado, H., Gama-Castro, S., Sánchez-Pérez, M., Gómez-Romero, L., Ledezma-Tejeida, D., García-Sotelo, J.S., Alquicira-Hernández, K., Muñiz-Rascado, L.J., Peña-Loredo, P., et al. (2019). RegulonDB v 10.5: Tackling challenges to unify classic and high throughput knowledge of gene regulation in E. coli K-12. Nucleic Acids Res. *47*, D212–D220.

Sassanfar, M., and Roberts, J.W. (1990). Nature of the SOS-inducing signal in Escherichia coli. J. Mol. Biol. *212*, 79–96.

Schmidt, A., Kochanowski, K., Vedelaar, S., Ahrné, E., Volkmer, B., Callipo, L., Knoops, K., Bauer, M., Aebersold, R., and Heinemann, M. (2016). The quantitative and condition-dependent Escherichia coli proteome. Nat. Biotechnol. *34*, 104–110.

Schultz, E., Barraud, O., Madec, J., Haenni, M., Cloeckaert, A., Ploy, M., and Doublet, B. (2017). Multidrug Resistance Salmonella Genomic Island 1 in a Morganella morganii subsp. morganii Human Clinical Isolate from France. MSphere *2*, e00118-17.

Schumacher, M.A., Glover, T.C., Brzoska, A.J., Jensen, S.O., Dunham, T.D., Skurray, R.A., and Firth, N. (2007). Segrosome structure revealed by a complex of ParR with centromere DNA. Nature *450*, 1268–1271.

Shah, D., Zhang, Z., Khodursky, A., Kaldalu, N., Kurg, K., and Lewis, K. (2006). Persisters: A distinct physiological state of E. coli. BMC Microbiol. *6*, 53.

Shao, B., Rammohan, J., Anderson, D.A., Alperovich, N., Ross, D., and Voigt, C.A. (2021). Single-cell measurement of plasmid copy number and promoter activity. Nat. Commun. *12*, 1475.

Shaw, K.J., Miller, N., Liu, X., Lerner, D., Wan, J., Bittner, A., and Morrow, B.J. (2003). Comparison of the changes in global gene expression of Escherichia coli induced by four bactericidal agents. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. *5*, 105–122.

Shearwin, K.E., Brumby, A.M., and Egan, J.B. (1998). The tum protein of coliphage 186 is an antirepressor. J. Biol. Chem. *273*, 5708–5715.

Sheppard, R.J., Barraclough, T.G., and Jansen, V.A.A. (2021). The evolution of plasmid transfer rate in bacteria and its effect on plasmid persistence. Am. Nat. *198*, 473–488.

Shi, H., Bratton, B.P., Gitai, Z., and Huang, K.C. (2018). How to Build a Bacterial Cell: MreB as the Foreman of E. coli Construction. Cell *172*, 1294–1305.

Siebor, E., and Neuwirth, C. (2011). The new variant of Salmonella genomic island 1 (SGI1-V) from a proteus mirabilis French clinical isolate harbours bla VEB-6 and qnrA1 in the multiple antibiotic resistance region. J. Antimicrob. Chemother. *66*, 2513–2520.

Siebor, E., and Neuwirth, C. (2014). Proteus genomic island 1 (PGI1), a new resistance genomic island from two Proteus mirabilis French clinical isolates. J. Antimicrob. Chemother. *69*, 3216–3220.

Siebor, E., and Neuwirth, C. (2022). Overview of Salmonella Genomic Island 1-Related Elements Among Gamma-Proteobacteria Reveals Their Wide Distribution Among Environmental Species. Front. Microbiol. *13*, 857492.

Siebor, E., De Curraize, C., and Neuwirth, C. (2019). Identification of AGI1-A, a variant of Acinetobacter genomic island 1 (AGI1), in a French clinical isolate belonging to the Enterobacter cloacae complex. J. Antimicrob. Chemother. *74*, 311–314.

Siguier, P., Filée, J., and Chandler, M. (2006). Insertion sequences in prokaryotic genomes. Curr. Opin. Microbiol. *9*, 526–531.

Siguier, P., Gourbeyre, E., Varani, A., Ton-Hoang, B., and Chandler, M. (2015). Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. Microbiol. Spectr. *3*, MDNA3-0030–2014.

Siguier, P., Gourbeyre, E., and Chandler, M. (2017). Known knowns, known unknowns and unknown unknowns in prokaryotic transposition. Curr. Opin. Microbiol. *38*, 171–180.

da Silva Filho, A.C., Raittz, R.T., Guizelini, D., De Pierri, C.R., Augusto, D.W., dos Santos-Weiss, I.C.R., and Marchaukoski, J.N. (2018). Comparative Analysis of Genomic Island Prediction Tools. Front. Genet. *9*, 619.

Silverman, P.M., and Sholl, A. (1996). Effect of traY amber mutations on F-plasmid traY promoter activity in vivo. J. Bacteriol. *178*, 5787–5789.

Singh, S.K., Mohammed, A., Alghamdi, O.A., and Husain, S.M. (2020). New approaches for targeting

drug resistance through drug combination. Comb. Ther. Against Multidrug Resist. 221–246.

Singletary, L.A., Gibson, J.L., Tanner, E.J., McKenzie, G.J., Lee, P.L., Gonzalez, C., and Rosenberg, S.M. (2009). An SOS-regulated type 2 toxin-antitoxin system. J. Bacteriol. *191*, 7456–7465.

Slilaty, S.N., Rupley, J.A., Little, J.W., and Little, J.W. (1986). Intramolecular Cleavage of LexA and Phage λ Repressors: Dependence of Kinetics on Repressor Concentration, pH, Temperature, and Solvent. Biochemistry *25*, 6866–6875.

Smillie, C., Garcillan-Barcia, M.P., Francia, M. V., Rocha, E.P.C., and de la Cruz, F. (2010). Mobility of Plasmids. Microbiol. Mol. Biol. Rev. *74*, 434–452.

Sobecky, P.A., Easter, C.L., Bear, P.D., and Helinski, D.R. (1996). Characterization of the stable maintenance properties of the par region of broad-host-range plasmid RK2. J. Bacteriol. *178*, 2086–2093.

del Solar, G., and Espinosa, M. (1992). The copy number of plasmid pLS1 is regulated by two trans-acting plasmid products: the antisense RNA II and the repressor protein, RepA. Mol. Microbiol. *6*, 83–94.

Del Solar, G., Acebo, P., and Espinosa, M. (1995). Replication control of plasmid pLS1: Efficient regulation of plasmid copy number is exerted by the combined action of two plasmid components, CopG and RNA II. Mol. Microbiol. *18*, 913–924.

Soliman, A.M., Shimamoto, T., Nariya, H., and Shimamoto, T. (2019). Emergence of salmonella genomic island 1 variant sgi1-w in a clinical isolate of providencia stuartii from Egypt. Antimicrob. Agents Chemother. *63*, 6–8.

Sorum, H., Roberts, M.C., and Crosa, J.H. (1992). Identification and cloning of a tetracycline resistance gene from the fish pathogen Vibrio salmonicida. Antimicrob. Agents Chemother. *36*, 611–615.

Sousa, F.J.R., Lima, L.M.T.R., Pacheco, A.B.F., Oliveira, C.L.P., Torriani, I., Almeida, D.F., Foguel, D., Silva, J.L., and Mohana-Borges, R. (2006). Tetramerization of the LexA Repressor in Solution: Implications for Gene Regulation of the E. coli SOS System at Acidic pH. J. Mol. Biol. *359*, 1059–1074.

Spencer, S.J., Tamminen, M. V., Preheim, S.P., Guo, M.T., Briggs, A.W., Brito, I.L., A Weitz, D., Pitkänen, L.K., Vigneault, F., Virta, M.P., et al. (2016). Massively parallel sequencing of single cells by epicPCR links functional genes with phylogenetic markers. ISME J. *10*, 427–436.

Stark, J.C., Huang, A., Nguyen, P.Q., Dubner, R.S., Hsu, K.J., Ferrante, T.C., Anderson, M., Kanapskyte, A., Mucha, Q., Packett, J.S., et al. (2018). BioBits^{TM} Bright: A fluorescent synthetic biology education kit. Sci. Adv. *4*, eaat5107.

Stoesser, N., Sheppard, A.E., Pankhurst, L., de Maio, N., Moore, C.E., Sebra, R., Turner, P., Anson, L.W., Kasarskis, A., Batty, E.M., et al. (2016). Evolutionary history of the global emergence of the Escherichia coli epidemic clone ST131. MBio *7*, e02162-15.

Stohl, E.A., Brockman, J.P., Burkle, K.L., Morimatsu, K., Kowalczykowski, S.C., and Seifert, H.S. (2003). Escherichia coli RecX inhibits RecA recombinase and coprotease activities in vitro and in vivo. J. Biol. Chem. *278*, 2278–2285.

Story, R.M., and Steitz, T.A. (1992). Structure of the recA protein-ADP complex. Nature *355*, 374–376.

Story, R.M., Weber, I.T., and Steitz, T.A. (1992). The structure of the E. coli recA protein monomer and polymer. Nature *355*, 318–325.

Strugeon, E., Tilloy, V., Ploy, M., and Da Re, S. (2016). The Stringent Response Promotes Antibiotic Resistance Dissemination by Regulating Integron Integrase Expression in Biofilms. MBio *7*, e00868-16.

Subirats, J., Sànchez-Melsió, A., Borrego, C.M., Balcázar, J.L., and Simonet, P. (2016). Metagenomic analysis reveals that bacteriophages are reservoirs of antibiotic resistance genes. Int. J. Antimicrob. Agents *48*, 163–167.

Sullivan, J.T., Trzebiatowski, J.R., Brown, S.D., Elliot, R.M., Fleetwood, D.J., Mccallum, N.G., Stuart, G.S., Weaver, J.E., Webby, R.J., Bruijn, F.J. De, et al. (2002). Comparative Sequence Analysis of the Symbiosis Island of Mesorhizobium loti Strain R7A. Society *184*, 3086–3095.

Summers, D.K., and Sherratt, D.J. (1984). Multimerization of high copy number plasmids causes instability: CoIE1 encodes a determinant essential for plasmid monomerization and stability. Cell *36*, 1097–1103.

Szabó, M., Murányi, G., and Kiss, J. (2021). IncC helper dependent plasmid-like replication of Salmonella Genomic Island 1. Nucleic Acids Res. *49*, 832–846.

Taddei, F., Matic, I., and Radman, M. (1995). cAMP-dependent SOS induction and mutagenesis in resting bacterial populations. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 11736–11740.

Takechi, S., and Itoh, T. (1995). Initiation of unidirectional CoIE2 DNA replication by a unique priming mechanism. Nucleic Acids Res. *23*, 4196–4201.

Tam, J.E., and Kline, B.C. (1989). The F plasmid ccd autorepressor is a complex of CcdA and CcdB proteins. MGG Mol. Gen. Genet. *219*, 26–32.

Tan, Q., Awano, N., and Inouye, M. (2011). YeeV is an Escherichia coli Toxin that Inhibits Cell Division by Targeting the Cytoskeleton Proteins, FtsZ and MreB. Mol Microbiol. *79*, 109–118.

Tang, M., Bideshi, D.K., Park, H.W., and Federici, B.A. (2006). Minireplicon from pBtoxis of Bacillus thuringiensis subsp. israelensis. Appl. Environ. Microbiol. *72*, 6948–6954.

Tassinari, E., Aznar, S., Urcola, I., Prieto, A., Hüttener, M., and Juárez, A. (2016). The incC sequence is required for R27 plasmid stability. Front. Microbiol. *7*, 629.

Tavakoli, N., Comanducci, A., Dodd, H.M., Lett, M.C., Albiger, B., and Bennett, P. (2000). IS1294, a DNA element that transposes by RC transposition. Plasmid *44*, 66–84.

Thierauf, A., Perez, G., and Maloy, S. (2009). Generalized Transduction. Bacteriophages Methods Protoc. Vol. 1 Isol. Charact. Interact. *501*, 267–286.

Thisted, T., Sorensen, N.S., Wagner, E.G.H., and Gerdes, K. (1994). Mechanism of post-segregational killing: Sok antisense RNA interacts with Hok mRNA via its 5'-end single-stranded leader and competes with the 3'-end of Hok mRNA for binding to the mok translational initiation region. EMBO J. *13*, 1960–1968.

Thomas, C.M., and Hussain, A.A. (1984). The korB gene of broad host range plasmid RK2 is a major copy number control element which may act together with trfB by limiting trfA expression. EMBO J. *3*, 1513–1519.

Thorpe, K.E., Joski, P., and Johnston, K.J. (2018). Antibiotic-resistant infection treatment costs have doubled since 2002, now exceeding $2 billion annually. Health Aff. *37*, 662–669.

Threlfall, E.J. (2000). Epidemic Salmonella typhimurium DT 104--a truly international multiresistant clone. J. Antimicrob. Chemother. *46*, 7–10.

Toleman, M.A., Bennett, P.M., and Walsh, T.R. (2006a). ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century? Microbiol. Mol. Biol. Rev. *70*, 296–316.

Toleman, M.A., Bennett, P.M., and Walsh, T.R. (2006b). Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. J. Antimicrob. Chemother. *58*, 1–

Touat, M., Opatowski, M., Brun-Buisson, C., Cosker, K., Guillemot, D., Salomon, J., Tuppin, P., de Lagasnerie, G., and Watier, L. (2019). A Payer Perspective of the Hospital Inpatient Additional Care Costs of Antimicrobial Resistance in France: A Matched Case–Control Study. Appl. Health Econ. Health Policy *17*, 381–389.

Tsuchimoto, S., and Ohtsubo, E. (1993). Autoregulatiou by cooperative binding of the PemI and PemK proteins to the promoter region of the pem operon. MGG Mol. Gen. Genet. *237*, 81–88.

Turatsinze, J.V., Thomas-Chollier, M., Defrance, M., and van Helden, J. (2008). Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. Nat. Protoc. *3*, 1578–1588.

Umezu, K., Chi, N.W., and Kolodner, R.D. (1993). Biochemical interaction of the Escherichia coli RecF, RecO, and RecR proteins with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *90*, 3875–3879.

Unterholzner, S.J., Poppenberger, B., and Rozhon, W. (2013). Toxin–antitoxin systems. Mob. Genet. Elements *3*, e26219.

Valat, C., Hirchaud, E., Drapeau, A., Touzain, F., de Boisseson, C., Haenni, M., Blanchard, Y., and Madec, J.Y. (2020). Overall changes in the transcriptome of Escherichia coli O26:H11 induced by a subinhibitory concentration of ciprofloxacin. J. Appl. Microbiol. *129*, 1577–1588.

Vandecraen, J., Chandler, M., Aertsen, A., and Van Houdt, R. (2017). The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. Crit. Rev. Microbiol. *43*, 709–730.

Vecchiarelli, A.G., Han, Y.-W., Tan, X., Mizuuchi, M., Ghirlando, R., Biertümpfel, C., Funnell, B.E., and Mizuuchi, K. (2010). ATP control of dynamic P1 ParA-DNA interactions: a key role for the nucleoid in plasmid partition. Mol. Microbiol. *78*, 78–91.

Vecchiarelli, A.G., Mizuuchi, K., and Funnell, B.E. (2012). Surfing biological surfaces: exploiting the nucleoid for partition and transport in bacteria. Mol. Microbiol. *86*, 513–523.

Verheust, C., Jensen, G., and Mahillon, J. (2003). pGIL01, a linear tectiviral plasmid prophage originating from Bacillus thuringiensis serovar israelensis. Microbiology *149*, 2083–2092.

Vogel, J., Argaman, L., Wagner, E.G.H., and Altuvia, S. (2004). The Small RNA IstR Inhibits Synthesis of an SOS-Induced Toxic Peptide. Curr. Biol. *14*, 2271–2276.

Volkert, M.R., Gately, F.H., and Hajec, L.I. (1989). Expression of DNA damage-inducible genes of Escherichia coli upon treatment with methylating, ethylating and propylating agents. Mutat. Res. Repair *217*, 109–115.

Vollmer, A.C., Kwakye, S., Halpern, M., and Everbach, E.C. (1998). Bacterial stress responses to 1-megahertz pulsed ultrasound in the presence of microbubbles. Appl. Environ. Microbiol. *64*, 3927–3931.

Wade, J.T., Reppas, N.B., Church, G.M., and Struhl, K. (2005). Genomic analysis of LexA binding reveals the permissive nature of the Escherichia coli genome and identifies unconventional target sites. Genes Dev. *19*, 2619–2630.

Walker, G.C. (1984). Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in Escherichia coli. Microbiol. Rev. *48*, 60–93.

Wang, H., Dzink-Fox, J.L., Chen, M., and Levy, S.B. (2001). Genetic characterization of highly fluoroquinolone-resistant clinical Escherichia coli strains from China: Role of acrR mutations. Antimicrob. Agents Chemother. *45*, 1515–1521.

Wang, X., Lord, D.M., Cheng, H.-Y., Osbourne, D.O., Hoon Hong, S., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., et al. (2012a). A Novel Type V TA System Where mRNA for Toxin GhoT is Cleaved by Antitoxin GhoS. Nat Chem Biol *8*, 855–861.

Wang, X., Lord, D.M., Cheng, H.Y., Osbourne, D.O., Hong, S.H., Sanchez-Torres, V., Quiroga, C., Zheng, K., Herrmann, T., Peti, W., et al. (2012b). A new type V toxin-antitoxin system where mRNA for toxin GhoT is cleaved by antitoxin GhoS. Nat. Chem. Biol. *8*, 855–861.

Wang, X., Lord, D.M., Hoon Hong, S., Peti, W., Benedik, M.J., Page, R., and Wood, T.K. (2013). Type II Toxin/Antitoxin MqsR/MqsA Controls Type V Toxin/ Antitoxin GhoT/GhoS. Env. Microbiol. *15*, 1734–1744.

Wang, X.C., Lei, C.W., Kang, Z.Z., Zhang, Y., and Wang, H.N. (2019). IS26-Mediated Genetic Rearrangements in Salmonella Genomic Island 1 of Proteus mirabilis. Front. Microbiol. *10*, 2245.

Wawrzyniak, P., Plucienniczak, G., and Bartosik, D. (2017). The different faces of rolling-circle replication and its multifunctional initiator proteins. Front. Microbiol. *8*, 1–13.

Weel-Sneve, R., Kristiansen, K.I., Odsbu, I., Dalhus, B., Booth, J., Rognes, T., Skarstad, K., and Bjørås, M. (2013). Single Transmembrane Peptide DinQ Modulates Membrane-Dependent Activities. PLoS Genet. *9*, e1003260.

Weill, F., Domman, D., Njamkepo, E., Tarr, C., Rauzier, J., Fawal, N., Keddy, K.H., Salje, H., Moore, S., Mukhopadhyay, A.K., et al. (2017). pandemic of cholera in Africa. Science (80-.). *358*, 785–789.

Weiß, A.S., Götz, A., and Opitz, M. (2020). Dynamics of ColicinE2 production and release determine the competitive success of a toxin-producing bacterial population. Sci. Rep. *10*, 4052.

Wellington, E.M.H., Boxall, A.B.A., Cross, P., Feil, E.J., Gaze, W.H., Hawkey, P.M., Johnson-Rollings, A.S., Jones, D.L., Lee, N.M., Otten, W., et al. (2013). The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. Lancet Infect. Dis. *13*, 155–165.

Wilson, N.L., and Hall, R.M. (2010). Unusual class 1 integron configuration found in Salmonella genomic island 2 from Salmonella enterica serovar Emek. Antimicrob. Agents Chemother. *54*, 513–516.

Wilson, I.W., Praszkier, J., and Pittard, A.J. (1993). Mutations affecting pseudoknot control of the replication of B group plasmids. J. Bacteriol. *175*, 6476–6483.

Winans, S.C., and Walker, G.C. (1985). Entry exclusion determinant(s) of IncN plasmid pKM101. J. Bacteriol. *161*, 411–416.

Windgassen, T.A., Wessel, S.R., Bhattacharyya, B., and Keck, J.L. (2018). Mechanisms of bacterial DNA replication restart. Nucleic Acids Res. *46*, 504–519.

Witkin, E.M. (1967). THE RADIATION SENSITIVITY OF ESCHERICHIA COLI B: A HYPOTHESIS RELATING FILAMENT FORMATION AND PROPHAGE INDUCTION. Proc. Natl. Acad. Sci. *57*, 1275–1279.

Wright, L.D., and Grossman, A.D. (2016). Autonomous replication of the conjugative transposon Tn916. J. Bacteriol. *198*, 3355–3366.

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

Xindan, W., Paula Montero, L., and David, Z.R. (2008). Organization and segregation of bacterial chromosomes. Nat Rev Genet *86*, 3279–3288.

Yang, L., He, H., Chen, Q., Wang, K., Lin, Y., Li, P., Li, J., Liu, X., Jia, L., Song, H., et al. (2022). Nosocomial Outbreak of Carbapenemase-Producing Proteus mirabilis With Two Novel Salmonella Genomic Island 1 Variants Carrying Different blaNDM–1 Gene Copies in China. Front. Microbiol.

12, 1–8.

Yao, N.Y., and O'Donnell, M.E. (2021). The DNA Replication Machine: Structure and Dynamic Function. In Macromolecular Protein Complexes III: Structure and Function, J.R. Harris, and J. Marles-Wright, eds. (Springer International Publishing), pp. 233–258.

Yeiser, B., Pepper, E.D., Goodman, M.F., and Finkel, S.E. (2002). SOS-induced DNA polymerases enhance long-term survival and evolutionary fitness. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *99*, 8737–8741.

Zhang, A.P.P., Pigli, Y.Z., and Rice, P.A. (2010). Structure of the LexA-DNA complex and implications for SOS box measurement. Nature *466*, 883–886.

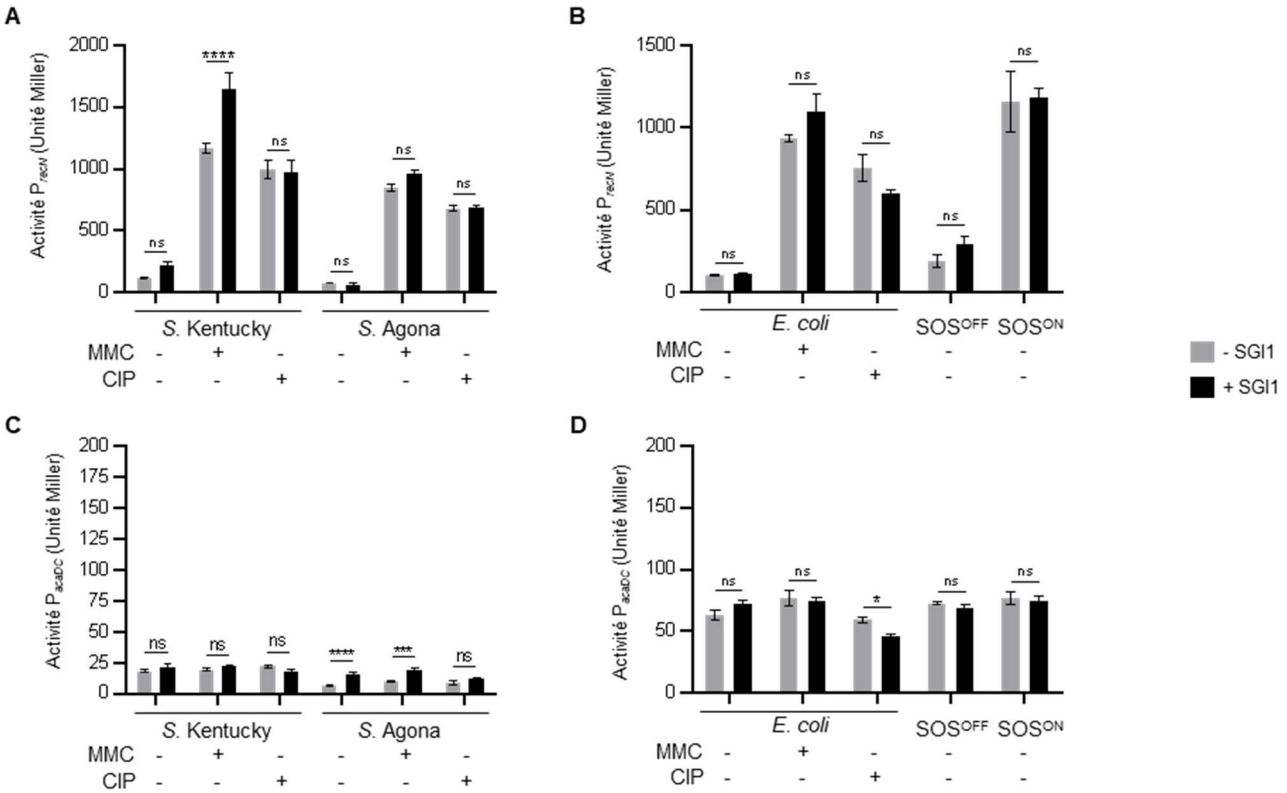
Zhang, S., Abbas, M., Rehman, M.U., Huang, Y., Zhou, R., Gong, S., Yang, H., Chen, S., Wang, M., and Cheng, A. (2020). Dissemination of antibiotic resistance genes (ARGs) via integrons in Escherichia coli: A risk to human health. Environ. Pollut. *266*, 115260.

Zhao, W.H., and Hu, Z.Q. (2015). Acquired metallo-β-lactamases and their genetic association with class 1 integrons and ISCR elements in Gram-negative bacteria. Future Microbiol. *10*, 873–887.

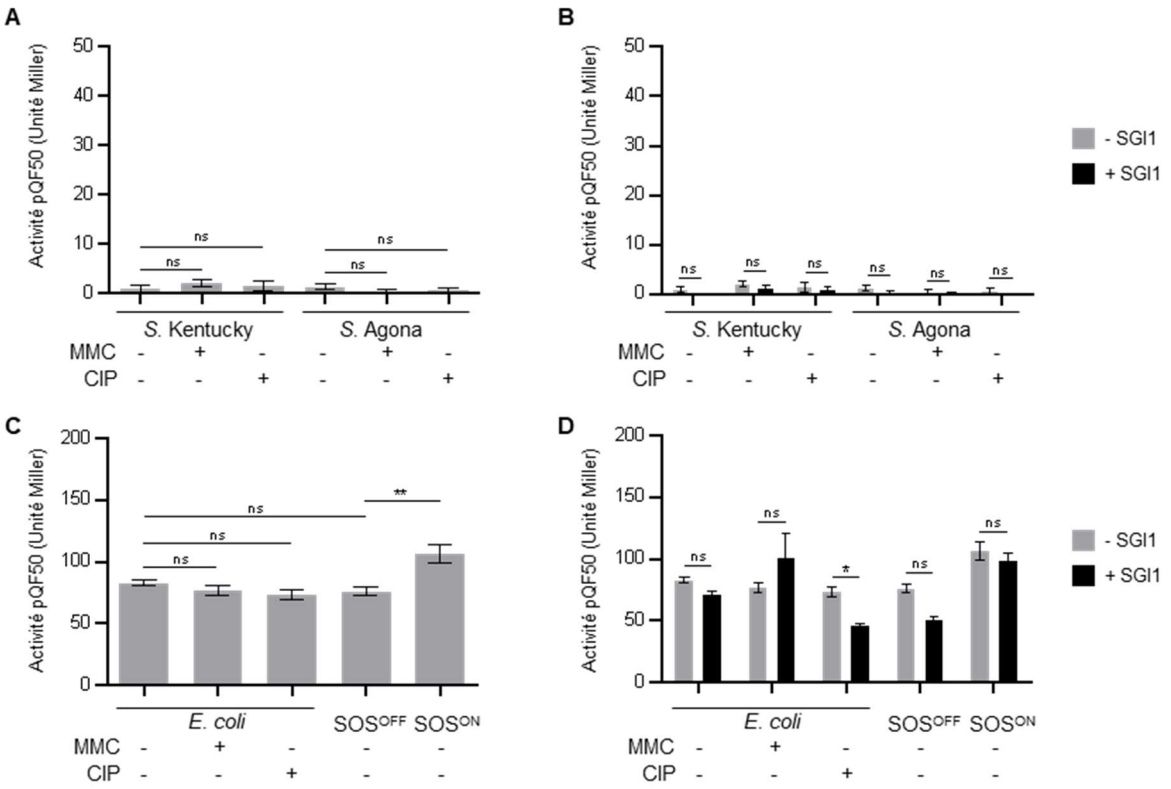
Zheng, J., Peng, D., Ruan, L., and Sun, M. (2013). Evolution and dynamics of megaplasmids with genome sizes larger than 100 kb in the Bacillus cereus group. BMC Evol. Biol. *13*, 262.

Zverlov, V. V., and Schwarz, W.H. (1999). Organization of the chromosomal region containing the genes lexA and topA in Thermotoga neapolitana. Primary structure of LexA reveals phylogenetic relevance. Syst. Appl. Microbiol. *22*, 174–178.

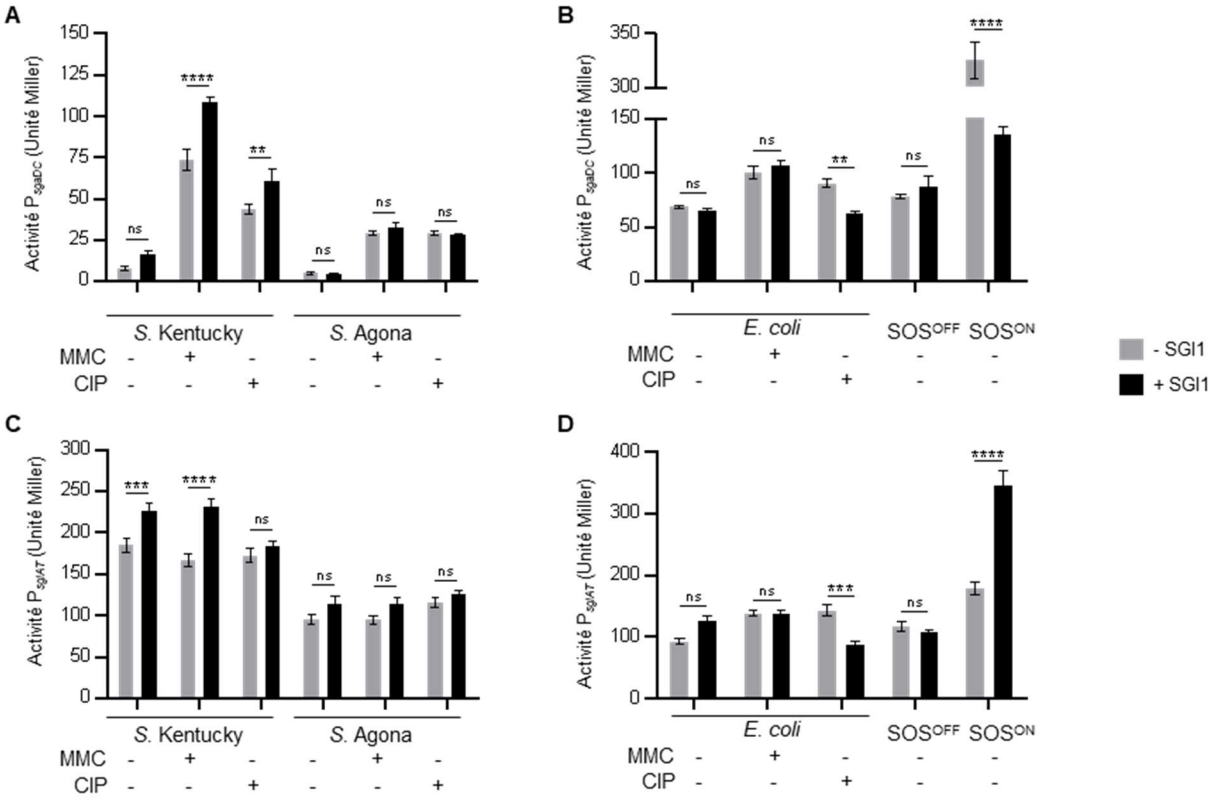
Annexes



Annexe 1 : Activités des promoteurs P_{recN} et P_{acaDC} chez *S. enterica* et *E. coli* en présence ou non de SGI1.
A) Activités promotrices de P_{recN} avec l'induction ou non de la réponse SOS par la mitomycine C (MMC) ou la ciprofloxacine (CIP) chez *S.* Kentucky ST198 et *S.* Agona en présence ou non de SGI1-C. **B)** Activités promotrices de P_{recN} chez *E. coli* MG1655 avec l'induction ou non de la réponse SOS par la MMC ou la CIP, MG1655 *lexA3* (SOS^{OFF}) et MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}), avec et sans SGI1-C. **C)** Activités promotrices de P_{acaDC} avec l'induction ou non de la réponse SOS par la mitomycine C (MMC) ou la ciprofloxacine (CIP) chez *S.* Kentucky ST198 et *S.* Agona en présence ou non de SGI1-C. **B)** Activités promotrices de P_{acaDC} chez *E. coli* MG1655 avec l'induction ou non de la réponse SOS par la MMC ou la CIP, MG1655 *lexA3* (SOS^{OFF}) et MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}), avec et sans SGI1-C.
Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'au moins un triplicat biologique couplé à un duplicat technique. Le test statistique two-way ANOVA utilisant le test de comparaison mutiple de Sidak a été appliqué entre les conditions avec et sans SGI1. La significativité statistique est représentée par : **** P<0,0001 ; *** P<0,001 ; * P<0,05 ; ns non significative.



Annexe 2 : Activités des plasmides pQF50-Chl chez *S. enterica* et pQF50-Amp chez *E. coli*.
Activités du plasmide pQF50-Chl avec l'induction ou non de la réponse SOS par la mitomycine C (MMC) ou la ciprofloxacine (CIP) chez **A)** *S.* Kentucky ST198 et *S.* Agona sans SGI1 et **B)** *S.* Kentucky ST198 et *S.* Agona en présence ou non de SGI1-C. **C&D)** Activités du plasmide pQF50-Amp chez *E. coli* MG1655 avec l'induction ou non de la réponse SOS par la MMC ou la CIP, MG1655 *lexA3* (SOS^{OFF}) et MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}), avec et sans SGI1-C. Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'au moins un triplicat biologique couplé à un duplicat technique. **A&C)** Le test statistique One-way ANOVA utilisant le test de comparaison multiple de Dunnett a été appliqué entre les conditions. **B&D)** Le test statistique two-way ANOVA utilisant le test de comparaison mutiple de Sidak a été appliqué entre les conditions avec et sans SGI1. La significativité statistique est représentée par : ** P<0,01 ; * P<0,05 ; ns non significative.



Annexe 3 : Activités des promoteurs P_{sgaDC} et P_{sgiAT} chez *S.* enterica et *E. coli* en présence ou non de SGI1.
A) Activités promotrices de P_{sgaDC} avec l'induction ou non de la réponse SOS par la mitomycine C (MMC) ou la ciprofloxacine (CIP) chez *S.* Kentucky ST198 et *S.* Agona en présence ou non de SGI1-C. **B)** Activités promotrices de P_{sgaDC} chez *E. coli* MG1655 avec l'induction ou non de la réponse SOS par la MMC ou la CIP, MG1655 *lexA3* (SOS^{OFF}) et MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}), avec et sans SGI1-C. **C)** Activités promotrices de P_{sgiAT} avec l'induction ou non de la réponse SOS par la mitomycine C (MMC) ou la ciprofloxacine (CIP) chez *S.* Kentucky ST198 et *S.* Agona en présence ou non de SGI1-C. **B)** Activités promotrices de P_{sgiAT} chez *E. coli* MG1655 avec l'induction ou non de la réponse SOS par la MMC ou la CIP, MG1655 *lexA3* (SOS^{OFF}) et MG1655 *lexA51* (SOS^{ON}), avec et sans SGI1-C.
Les barres représentent la moyenne et l'erreur standard de la moyenne obtenues à partir d'au moins un triplicat biologique couplé à un duplicat technique. Le test statistique two-way ANOVA utilisant le test de comparaison mutiple de Sidak a été appliqué entre les conditions avec et sans SGI1. La significativité statistique est représentée par : **** P<0,0001 ; *** P<0,001 ; ** P<0,01 ; ns non significative.

Annexe 4 :
Article

Conjugative IncC plasmid entry triggers the SOS response and promotes effective transfer of the integrative antibiotic resistance element SGI1

Marine C. Pons[1], Karine Praud[1], Sandra Da Re[2], Axel Cloeckaert[1], Benoît Doublet[1]

[1]INRAE, Université de Tours, ISP, F-37380, Nouzilly, France

[2]INSERM, Université de Limoges, CHU de Limoges, RESINFIT, F-87025, Limoges, France

Conjugative IncC plasmid entry triggers the SOS response and promotes effective transfer of the integrative antibiotic resistance element SGI1

Marine C. Pons[a], Karine Praud[a], Sandra Da Re[b], Axel Cloeckaert[a], Benoît Doublet[a]*

[a]INRAE, Université de Tours, ISP, F-37380, Nouzilly, France

[b]INSERM, Université de Limoges, CHU de Limoges, RESINFIT, F-87025, Limoges, France

*Corresponding author: UMR1282 Infectiologie et Santé Publique, Centre INRAE Val de Loire, Bât. 213, 37380 Nouzilly, France. Tel: +33 (0)2 47 42 72 95; E-mail: benoit.doublet@inrae.fr

Keywords: gene regulation, multidrug resistance, horizontal genetic transfer, conjugation, mobilization

Running title: IncC promotes SGI1 transfer through SOS induction

ABSTRACT

The broad host range IncC plasmid family and the integrative mobilizable *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) and its derivatives enable the spread of medically-important antibiotic resistance genes among Gram-negative pathogens. Although several aspects of the complex functional interactions between IncC plasmids and SGI1 have been recently deciphered regarding their conjugative transfer and incompatibility, the biological signal resulting in the hijacking of the conjugative plasmid by the integrative mobilizable element remains unknown. Here, we demonstrate that the conjugative entry of IncC/IncA plasmids is detected at an early stage by SGI1 through the transient activation of the SOS response, which induces the expression of the SGI1 master activators SgaDC, shown to play a crucial role in the complex biology between SGI1 and IncC plasmids. Besides, we developed an original tripartite conjugation approach to directly monitor SGI1 mobilization in a time-dependent manner following conjugative entry of IncC plasmids. Finally, we propose an updated biological model of the conjugative mobilization of the chromosomal resistance element SGI1 by IncC plasmids.

IMPORTANCE

Antimicrobial resistance has become a major public health issue, particularly with the increase in multidrug resistance (MDR) in both animal and human pathogenic bacteria, and with the emergence of resistance to medically important antibiotics. The spread between bacteria of successful mobile genetic elements such as conjugative plasmids and integrative elements conferring multidrug resistance is the main driving force in the dissemination of acquired antibiotic resistances among Gram-negative bacteria. Broad-host range IncC plasmids and their integrative mobilizable SGI1 counterparts contribute to the spread of critically-important resistance genes (e.g., ESBLs, and carbapenemases). A better knowledge

of the complex biology of these broad-host range mobile elements will help to understand the dissemination of antimicrobial resistance genes that occurred across *γ-proteobacteria* borders.

INTRODUCTION

Mobile genetic elements play an essential role in the emergence and dissemination of antibiotic resistance among bacteria (1, 2). Among them, self-transmissible IncC plasmids are broad-host-range conjugative plasmids ranging from 100 to 200 kb that contribute to the dissemination of numerous antibiotic resistance genes in the *γ-proteobacteria* (1-3). Moreover, IncC plasmids have been shown to serve as helper conjugative plasmids to drive transfer of diverse mobilizable genomic islands (also named integrative mobilizable element) that are integrated into the chromosome and that can carry also medically-important antibiotic resistance genes (3, 5-12). SGI1 is the prototype of a large family of multidrug resistance integrative mobilizable elements that are conjugally mobilized *in trans* by plasmids of the IncC/IncA family (7, 13, 14). SGI1 and IncC plasmids share a complex biology regarding their conjugative transfer and incompatibility (15-23). SGI1 encodes a few transfer proteins that reshape the IncC-encoded mating pore in order to promote its own dissemination in bacterial populations already harbouring an IncC plasmid (16). Besides, the SGI1 Toxin-Antitoxin system SgiAT and replication of excised SGI1 have been shown to participate in SGI1 stability and in the concomitant destabilization of the IncC plasmids (17, 19, 20). Moreover, IncC plasmids and SGI1 share a complex transcriptional regulatory network, each element having homologous master activators, i.e. AcaDC and SgaDC, respectively, which have been shown to activate the same regulons in both elements (15, 18, 19, 21). Durand et al. recently demonstrated that SgaDC and AcaDC activate the expression of AcaB, an IncC transcriptional regulator which in turn in cooperation with AcaDC have been shown to trigger

68 the expression of the conjugative IncC machinery through a positive feedback loop of mutual
69 expression (18, 24).
70 Conjugative circular plasmids are considered to horizontally transfer to plasmidless recipient
71 cells mainly as single-stranded DNA (ssDNA) (25). The transient occurrence of ssDNA in the
72 recipient cell during bacterial conjugation generally leads to the induction of the SOS
73 response (26). Numerous physical or chemical treatments (UV irradiation, antibiotics, i.e.
74 ciprofloxacin, trimethoprim, or DNA cross-linking agent such as mitomycin C) can trigger
75 the accumulation of ssDNA and subsequently the activation of the bacterial SOS response
76 (26-28). Beyond the host-encoded SOS-regulon mainly responding to DNA damage, several
77 genes carried by mobile genetic elements, such as phages and integrative elements, are also
78 regulated by the SOS response, either directly by the host-encoded LexA repressor or by their
79 own analogous repressors (28, 29). These SOS-regulated genes are involved in horizontal
80 gene transfer (e.g., antibiotic resistance), bacterial virulence, and evolution (28). To the best
81 of our knowledge, plasmids of the IncC/IncA family have not yet been reported to conjugally
82 transfer as ssDNA, nor to activate the SOS response following conjugative entry in recipient
83 cells (26, 30).
84 We report here that the conjugative entry of IncC/IncA plasmids is detected at an early stage
85 by SGI1 through the transient activation of the SOS response, which induces the expression
86 of the SGI1 master activators SgaDC and subsequently its SGI1-encoded regulon, both shown
87 to play a crucial role in the complex biology interplay between SGI1 and IncC plasmids. We
88 confirmed using a novel tripartite conjugation approach the role of the SOS induction in the
89 early timing of SGI1 transfer following the conjugative entry of IncC plasmid.
90
91 **RESULTS**

The SOS response is induced by conjugative entry of IncC plasmids in recipient cells. In order to test whether the conjugative transfer of IncC/IncA plasmids induces the SOS response, we performed a SOS β-galactosidase reporter assay during conjugation with the reference conjugative plasmids IncC-R55, IncA-RA1, and IncW-Rsa (positive control) in *Escherichia coli* used as recipient cells (26). SOS induction in the recipient *E. coli* population was measured using the P*recN*::*lacZ* transcriptional fusion as reporter in conjugation assays. Knowing that plasmids have different kinetics of transfer frequency, the conjugation frequencies were determined at different time points after donor and recipient contact to identify the earliest time point allowing transfer frequencies of at least ~10^{-4}-10^{-3} (arbitrary choice; Fig. 1A). We then studied the SOS induction through β-galactosidase activity in the recipient population at this earliest time, i.e. at 1h for IncC-R55 and IncA-RA1 plasmids and 2h for IncW-Rsa plasmid (Fig. 1A). The basal β-galactosidase activity was determined per recipient cell in absence of conjugative plasmid (empty donor, no SOS induction by ssDNA entry) (Fig. 1B) and the specific β-galactosidase activity per transconjugant for each plasmid (Fig. 1C). SOS induction (expressed as the induction ratio between specific β-galactosidase activity per transconjugant cell and basal β-galactosidase activity per recipient cell; see Methods) was observed in all mating assays with 8050-fold, 2412-fold and 183-fold induction ratio for IncW-Rsa, IncC-R55 and IncA-RA1 plasmids, respectively (Fig. 1D). The difference of SOS induction between these plasmids can be explained by asynchronous transfers, and different transfer rates (Fig. 1A), resulting in asynchronous SOS induction in the transconjugant population. Using a *recA*$^{-}$ recipient strain in the same conjugation assay, β-galactosidase activity in the recipient population remained at basal levels strongly suggesting that ssDNA entry of plasmids is responsible of the SOS induction through activation of LexA auto-proteolysis by RecA-ssDNA complex. Thus, as previously described for other plasmid

families, these results confirmed that the transfer of IncC/IncA plasmid families induces transiently the SOS response in the recipient cell following conjugative entry (26).

Expression of the SGI1 master activators *sgaDC* is activated by the SOS response. Using the regulatory sequence analysis tools (http://embnet.ccg.unam.mx/rsat/matrix-scan_form.cgi) with the RegulonDB database, we identified 6 putative LexA binding sites in the SGI1 backbone sequence of SGI1-C from *S.* Agona strain 47SA97 (considered as reference, and hereafter named SGI1 and used in all experiments), among which 2 putative sites were located in promoter regions of the master activator genes *sgaDC* and the toxin-antitoxin genes *sgiAT* (Table 1, Fig. 2) (31, 32). We therefore hypothesized that the induction of the SOS response could be detected by SGI1 as a signal for horizontal transfer, just after the conjugative entry of IncC plasmids in SGI1 bearing cells.

Assessment of the P*sgaDC* and P*sgiAT* promoter activities under SOS inducing conditions (presence of ciprofloxacin or mitomycin C) was performed using *lacZ* transcriptional fusions with these promoters in two *Salmonella enterica* serotypes, Agona and Kentucky ST198, and in *E. coli* through β-galactosidase assays. P*recN* and P*acaDC* were used as positive and negative controls, respectively (Fig. S1) (8, 32). The activity of P*sgaDC* was low in the absence of treatment and induced in the presence of ciprofloxacin and mitomycin C. It resulted respectively in 5.5-fold and 9.2-fold increase of P*sgaDC* activity in *S.* Kentucky ST198, and in 6.1-fold increase for both stress in *S.* Agona (Fig. 3A). A much lower but still significant, increase of P*sgaDC* activity was also observed in *E. coli* background after ciprofloxacin and mitomycin C treatments (Fig. 3B). To confirm these results suggesting that P*sgaDC* activity is induced by the SOS response, we performed the same β-galactosidase reporter assays in *E. coli* mutants for the SOS response (SOS^{OFF}: *lexA3* mutant coding for a non-cleavable LexA protein, and SOS^{ON}: *lexA51* mutant coding for LexA protein variant

unable to bind on its binding box). P*sgaDC* activity showed a 4.7-fold increase in the *E. coli* SOS^{ON} mutant compared to the wild-type *E. coli* strain MG1655 without chemical treatment (Fig. 3B). Similar results were obtained for P*sgaDC* β-galactosidase activity in the presence of SGI1 integrated in the chromosome suggesting that SGI1 does not provide regulatory factors stronger than LexA-mediated SOS regulation for the transcriptional expression of its master activators SgaDC (Fig. S1). To further confirm the SOS regulation of P*sgaDC*, we performed electrophoretic mobility shift assays with the P*sgaDC* region containing the wild-type and mutated putative LexA binding box (Fig. 2) with increasing concentrations of purified LexA proteins from *Salmonella* or *E. coli* (33). Mobility of the P*sgaDC* probe was delayed by the addition of 1.34 - 2.68 µM LexA from *Salmonella* or *E. coli* (Fig. 3C and Fig. S2B). Nucleotide Substitutions of the essential CTG motif in the P*sgaDC* putative LexA binding box (Fig. 2) completely abolished the binding of LexA (Fig. 3C and Fig. S2B). All these results suggested that the expression of the SGI1 master activator SgaDC is repressed by LexA and activated by the SOS response in both *Salmonella* and *E. coli*. Conversely, the toxin-antitoxin *sgiAT* promoter exhibited a pretty strong activity in the absence of treatment and showed no increase of activity upon SOS induction in both *Salmonella* strains (Fig. S1). A ~1.5-fold increase of P*sigAT* activity was observed in an *E. coli* background (chemical treatments or SOS^{ON} vs WT) (Fig. S1). Interestingly, the presence of SGI1 in the chromosome seemed to increase P*sgiAT* activity in *S.* Kentucky ST198 and in *E. coli* SOS^{ON} (Fig. S1). The later observations need to be further studied but are in accordance with important self-regulation of toxin-antitoxin systems (34). Confirming our above results and the low weight and associated *P*-value given by the regulatory sequence analysis tools of the P*sgiAT* putative LexA binding site, no mobility shift was detected for the P*sgiAT* probe with purified LexA proteins from *Salmonella* and *E. coli* (Fig. S2C and S2D).

All SGI1 genes of the AcaDC/SgaDC regulon are expressed under SOS induction of *sgaDC* expression. To estimate the impact of SOS induction on SGI1 gene expression, we determined the relative expression of the master activator *sgaDC* genes and its downstream regulon in *S.* Agona 47SA97 (carrying SGI1-C, Table S1) using RT-qPCR with or without mitomycin C treatment. As expected, mitomycin C treatment resulted in the induction of the expression of *sgaDC* (2.8-fold), of the SOS regulon genes *lexA, recA* and *recN* as well as the integrase gene *intI1* of the class 1 integron carried by SGI1 (Fig. 2), these later ones all known to be regulated by the SOS response and used here as positive controls (Fig. 3D, genes highlighted in red) (28, 33, 35). Furthermore, mitomycin C treatment resulted in the concomitant expression increase of the AcaDC/SgaDC regulon in SGI1 (*traGHN*, *xis*, *rep*, S018) ranging from 2.5- to 5.1-fold (Fig. 3D, genes highlighted in green). Whilst the toxin-antitoxin genes *sgiAT* showed the higher level of expression among SGI1-tested genes in *Salmonella* (Fig. S3A), we confirmed that their expression is not regulated by the SOS response in *Salmonella* (Fig. 3D). In addition, the SGI1 integrase gene int_{SGI1} remained constitutively expressed without any change under mitomycin C treatment. Gene expression was also assessed in the *E. coli* background MG1655::SGI1 (carrying SGI1-C from 47SA97; Table S1), as well as derivatives MG1655::SGI1Δ*sgaDC* with or without *trans*-complementation with pAON*sgaDC* vector (low copy plasmid containing *sgaDC* under the control of its native promoter; Table S2) (Fig. 3E). In the *E. coli* background, mitomycin C treatment in the artificial context of multi-copies of *sgaDC* (SGI1Δ*sgaDC*-pAON*sgaDC*) resulted in a 10-fold induction of *sgaDC* expression and a strong up-regulation of all genes of the AcaDC/SgaDC regulon in SGI1 (Fig. 3E, Fig. S3). Altogether, these results showed that induction of the SOS response results in expression activation of SGI1 master activator genes *sgaDC* that are actually repressed by the SOS master regulator LexA.

The excision and replication of SGI1 to ~6-12 extrachromosomal circular copies have been previously shown to be activated by SgaDC in the presence of helper IncC plasmid and to be actually responsible of the destabilization of the helper IncC plasmid (17-19). Although IncC plasmids were absent in these SOS induction experiments by mitomycin C, we decided to quantify SGI1 excision and determine its copy number using real-time quantitative PCR. Induction of the SOS response in *E. coli* strain MG1655::SGI1 did not allow to detect the excision or replication of SGI1 (Table 2). In the artificial context of *sgaDC* overexpression (SGI1Δ*sgaDC*-pAON*sgaDC*), although the SGI1 *xis* (excisionase) and *rep* genes were overexpressed 41- and 15-fold, respectively, SGI1 excision remained at a low level, occurring in 6% (empty *attB* site per chromosome) with mitomycin C treatment, and SGI1 did not seem to replicate (copy number remained at 1 copy per chromosome) (Table 2). SGI1 remaining at 1 copy per chromosome confirmed that SOS induction of expression of *sgaDC* and its SGI1 regulon is not due to increase of the SGI1 copy number in these conditions (Fig. 3E and Table 2). These results are in agreement with previously published ones (17-19).

SOS induction upon IncC plasmid acquisition promotes an early transfer of SGI1. The incompatibility phenotype between IncC plasmid and SGI1 is strongly related to SGI1 replication and requires to maintain antibiotic selection pressure on both elements before SGI1 mating assays to ensure the largest $SGI1^{+}$/$IncC^{+}$ donor populations (17, 18, 20). Here, we developed a novel approach based on tripartite conjugation assay to study the impact of IncC plasmid conjugative entry in SGI1 donor cells. Briefly, an *E. coli* strain MG1655 carrying the conjugative helper plasmid ($IncC^{+}$, donor #1) was mixed with a second *E. coli* strain harbouring SGI1 (MG1655::SGI1, donor #2) and a third *E. coli* strain, the rifampicin-resistant (Rif^{R}) J5-3 recipient (see Methods). The conjugation frequencies of the IncC plasmid and SGI1 were measured at various time points after initial contact between donors and

recipient. In each experiment, IncC plasmid transfer were similar towards SGI1^{+} donor or empty Rif^{R} recipient strains (Table S4; compare R16a transconjugants and SGI1^{+}/R16a^{+} donors). In a WT MG1655 *E. coli* background, IncC transfer frequency quickly reached ~10^{-3} (after 45 min contact) and remained stable along the experiment (Fig. 4A). SGI1 transfer frequency was below the detection limit (10^{-7}) until a burst of SGI1 transfer ($1.9\ 10^{-2} \pm 5.2\ 10^{-3}$; after 1 h 45 min mating) (Fig. 4A). At 4h mating, SGI1 transfer frequency has increased to ~10^{0} (Fig. 4A). The same results were obtained with *E. coli* MG1655::SGI1 *lexA3* (SGI1-C from 47SA97, SOS^{OFF}) as donor #2 (Table S4) that are in agreement with β-galactosidase reporter assays using SOS^{OFF} *E. coli* strain (Fig. 3B). Using *E. coli* MG1655::SGI1 *lexA51* (SGI1, SOS^{ON}) as donor #2, whilst the temporal curve of IncC transfer frequency was comparable to that in Fig. 3d, it is striking that the burst of SGI1 transfer occurred 30 min earlier compared to its transfer from *E. coli* WT background MG1655::SGI1 and reached more rapidly a plateau at ~10^{-1} (Fig. 4B). This resulted in a 4.5-fold increase of SGI1 transfer at 1 h 45 min in the SOS^{ON} context compared to its transfer from *E. coli* WT background MG1655::SGI1 (Fig. 4D). On the other hand, when using *E. coli* MG1655::SGI1Δ*sgaDC* as donor #2 in our tripartite conjugation assay (Fig. 4C), we observed a higher transfer frequency of IncC plasmid and a lower SGI1 transfer frequency at 1 h 45 min compared to *E. coli* WT background MG1655::SGI1 (Fig. 4D). These results clearly indicated that permanent SOS induction (SOS^{ON}) induces early transfer of SGI1 following IncC plasmid acquisition by MG1655::SGI1 donor cells. Altogether, these results confirmed the importance of *sgaDC* for SGI1 transfer and that deletion of *sgaDC* abolishes the incompatibility with IncC plasmid (17, 18, 22).

DISCUSSION

The recent characterization of the SgaDC regulon revealed the same binding pattern as AcaDC both on SGI1 and on the IncC plasmid resulting in the expression of the transfer genes (17). While AcaDC replacement by SgaDC appears fully functional for SGI1 and IncC plasmid transfers, SgaDC is essential for SGI1 replication and subsequently the destabilization of the IncC plasmid (17, 18, 22). Altogether, these recent findings and our study argued for an earlier crucial role of SgaDC in the complex regulatory interaction between SGI1 and IncC plasmid. We propose a model of early temporal regulation of SGI1 gene expression under the control of SgaDC due to the transient SOS induction following the conjugative entry of IncC plasmid in SGI1 bearing cells (Fig. 5). As shown in this study, we demonstrated that the conjugative entry of IncC plasmid activates the SOS response in recipient cells (Fig. 1) thus suppressing the repression of LexA on *sgaDC* in the recipient SGI1 cells (Fig. 3). This results in the expression of *sgaDC* and its SGI1-encoded regulon (*xis*, *rep*, *traNGH* and S018) (Fig. 3D and 3E). Moreover, in the absence of IncC plasmid, overexpression of *sgaDC,* although upregulating its SGI1 regulon, did not result in strong SGI1 excision nor replication (Fig. 3E and Table 2), confirming that Inc-encoded factors, *e.g.* AcaDC and probably others are needed (17). Thanks to the novel tripartite conjugation approach, we confirmed the role of the SOS induction in the early timing of SGI1 transfer following the conjugative entry of IncC plasmid (Fig. 4).

The proposed timing in Fig. 5 is based on: (i) conjugative DNA transfer rate of ~45 kb/min suggesting transfer of the ~160 kb IncC plasmid should be achieved in ~3 min, (ii) plasmidic-ssDNA has been shown to have a lifetime of ~5 min, before (iii) conversion to double strand DNA (dsDNA) circular form that arises between 5 to 10 min after conjugative entry in the recipient cells (36). After initiation of transfer, IncC plasmid should be in a dsDNA circular form within ~10-12 min. Thus, the transient SOS induction could occur during ~5 min after initiation of IncC entry, resulting in early expression of *sgaDC* and of its SGI1 regulon

(*traGHN*, *xis*, *rep*, S018) probably before IncC conversion to dsDNA and IncC gene expression. Soon after IncC dsDNA conversion, SgaDC could activate expression of *acaB* and the SgaDC/AcaDC regulon (e.g. tra_{IncC}) of IncC plasmids. Hence, expression of *acaDC* may happen later on *via* AcaB activation, as recently published (17). The low-level expression of SgaDC upon SOS induction (Fig. 3D) coupled to the presence of an IncC plasmid to achieve high level of SGI1 excision and replication (Table 2) could represent the two mandatory signals for SGI1 transfer. Thus, in the case of SOS response induction independently of IncC conjugative entry (e.g. ciprofloxacin), SGI1 probably remains integrated in the chromosome to ensure its maintenance.

Our study shed light on the role of the SGI1 master activator *sgaDC* acting as the sensor for IncC plasmid entry through the SOS regulation of its promoter as previously suggested (17). This regulation complies with the crucial role of the SGI1 master activator *sgaDC* for SGI1 excision, replication, conjugative mobilisation and incompatibility with plasmids of the IncC family(17-19). Besides their expression, several biological interactions between SgaDC and AcaDC master activators remain to be elucidated (mRNA half-life, translation, complex stability, potential chimeric complexes) that can play a role in the intimate cross-talk between SGI1 and its helper IncC plasmids. SOS induction during bacterial conjugation may likely impact a wide range of recipient genomes, thus promoting the dissemination of the SGI1 or related islands with the consecutive spread of antibiotic resistance genes in diverse bacterial pathogens (26, 28, 33, 35). The conjugative transfer as well as the SOS response may therefore constitute suitable targets for co-treatment with antibiotics in order to prevent dissemination and exchange of antibiotic resistance genes (26, 28, 37).

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. A list of strains used in this study is provided in Table S1. *Salmonella* and *E. coli* strains were routinely grown in lysogeny broth (LB) at 37°C (or 30°C for thermosensitive vectors) under agitation at 180 rpm. Cultures on solid media were realized using LB or *Salmonella-Shigella* (SS) media. Antibiotics were used at the following concentrations: ampicillin (100 µg/mL, Amp), chloramphenicol (30 µg/mL, Chl), kanamycin (50 µg/mL, Kan), streptomycin (50 µg/mL, Str), and tetracycline (10 µg/mL, Tet), and rifampicin (250 µg/mL, Rif).

Plasmids, primers and bacterial construction. All plasmids and primers used in this study are listed in Tables S2 and S3, respectively. To quantify promoter activities by β-galactosidase assays, different promoter regions were amplified using the Phusion® high-fidelity DNA polymerase (NEB) from purified genomic DNA. PCR products digested by *Sph*I and *Hin*dIII were cloned into pQF50-chl and/or pQF50-Amp plasmids using T4 DNA ligase (NEB) to generate the different pMP plasmids (38, 39). pMPs plasmids were transformed into *S.* Agona strains 959SA97ΔSGI1, 47SA97 harbouring SGI1-C, and the following strains harbouring or not SGI1-C (originating from 47SA97): *S.* Kentucky ST198 strain 11-0799, *E. coli* strains MG1655, MG1655 *lexA3*, and MG1655 *lexA51*. The *lexA* ORF of *S.* Agona strain 47SA97 was amplified using primers EMSA-LexAS-p15b_F and EMSA-LexAS-p15b_R. The PCR product was digested by *Nde*I and *Xho*I, ligated into *Nde*I/*Xho*I-digested pET15b expression vector and electroporated into competent *E. coli* strain BL21(DE3)-pLysS. SGI1-CΔ*sgaCD* was initially constructed in *S.* Agona strain 47SA97 using the one-step chromosomal gene inactivation method using primers Rec-delsgaCD_F and Rec-delsgaCD_R primers (40). SGI1-C and SGI1-CΔ*sgaCD* were further transferred in different strains by a two-step conjugation protocol. Briefly, the IncC plasmids R55 or R16a was first introduced by conjugation in the SGI1 host strain. In a second conjugation, SGI1 or derivatives were transferred to the required strain.

Tripartite conjugation assays. Conjugation experiments were carried out on filters using simultaneously two distinct donor *E. coli* strains, the first (MG1655; donor #1) harbouring the IncC plasmid R16a, the second one (MG1655::SGI1; donor #2) carrying SGI1 and a third recipient *E. coli* strain (J5-3 rifampicin-resistant). Briefly, the IncC plasmid R16a, SGI1-C or SGI1-CΔ*sgaDC* were previously introduced by conjugation in the different donor *E. coli* MG1655 derivatives (WT, *lexA3*, and *lexA51*). Following overnight cultures of donor and recipient strains at 37°C with the appropriate antibiotics, cultures were refreshed 1:100 in 10 mL LB medium without antibiotics and grown up to OD_{600} ~ 0.8 at 37°C under agitation. Donor and recipient cells were mixed in a 1:1:1 ratio in 3 mL final volume, and concentrated in 200 µL by smooth centrifugation for 3 min at 765 g. Mating mix were applied on 0.045µm mating filter on 37°C-prewarmed LB plates and then incubated at 37°C. At different time points of contact, up to 4h contact, filters were resuspended in 1 mL LB medium, and 10-fold serial dilutions were plated on LB media with the appropriated antibiotics to determine SGI1 and R16a transconjugants, SGI1 donors carrying R16a and SGI1, and recipients. Transfer frequencies correspond to the ratio of transconjugants/donors.

β-galactosidase tests in recipient population. The specific activation of the SOS response following plasmid entry in recipient cells was determined for conjugative plasmids Rsa (IncW, positive control), R55 (IncC) and RA1 (IncA) using the protocol previously described by Baharoglu et al. with minor adaptations. *E. coli* strain TOP10 (*recA*$^-$ and Δ*lacZ*; Table S1) harbouring one of the conjugative plasmids above and *E. coli* strain MG1655 carrying reporter vectors pMP002 or pMP010 (*lacZ* expression under the promoter P*recN*) were used as donor and recipient strain, respectively (26). The protocol of filter mating described above was applied with a 1:1 ratio of donor and recipient cells. Ten-fold serial dilutions of mating mixes were plated on LB media with the appropriated antibiotics to determine

transconjugants, donors, and recipients. Transfer frequencies correspond to the ratio of transconjugants/donors.

β-galactosidase activity tests were performed as described previously (see also section below) (26, 41). Briefly, the basal β-galactosidase activity per recipient cell was determined in mating assays with an empty donor strain (without conjugative plasmid) at different time points (1h and 2h; in absence of SOS response induction by ssDNA entry).

$$basal\ activity\ per\ recipient\ at\ time\ tx = \frac{measured\ \beta\text{-}gal\ units\ at\ tx}{number\ of\ recipients\ at\ tx}$$

For each plasmid, the β-galactosidase activity tests were performed at transfer frequencies ranging from 10^{-4}-10^{-3} (1h or 2h filter mating). To determine the specific β-galactosidase activity per transconjugant at a given time point, the basal activity of the recipient population (without plasmid) was removed from the β-galactosidase activity in mating assay with a conjugative plasmid to assign the remaining activity to the transconjugant population.

$$specific\ activity\ per\ transconjugant\ at\ time\ tx = \frac{(measured\ \beta\text{-}gal\ units\ at\ tx) - (basal\ activity\ per\ recipient\ at\ tx\ X\ number\ of\ recipient\ at\ tx)}{number\ of\ transconjugants\ at\ tx}$$

Finally, the results were represented as SOS induction ratios for each plasmid corresponding to

$$SOS\ induction\ ratio = \frac{specific\ activity\ per\ transconjugant\ at\ time\ tx}{basal\ activity\ per\ recipient\ at\ time\ tx}$$

β-galactosidase assays. The quantification of β-galactosidase activity in Miller units was realised as described by Miller adapted to 96 well plates as follow (41). For each sample, 2 dilutions of bacterial lysates were used in technical triplicate. To assess the induction of the SOS response during conjugation, 500 µL of the mating assay was lysed and used to quantify the β-galactosidase activity at 12.5- and 25-fold final dilutions. To quantify promoter activities, the pMP-carrying strains were grown with or without mitomycin C (200 ng/mL) or

ciprofloxacin (used at concentration 100-fold below MICs) up to OD_{600} ~ 1.5. One mL of bacterial culture was centrifuged and used to quantify the β-galactosidase activity at 40- and 100-fold final dilution.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Overproduction of LexA proteins of *E. coli* strain MG1655 or *S.* Agona were carried out in *E. coli* strain BL21(DE3)-pLysS using pUA1170 or pET15b-$lexA_{Salmonella}$, respectively. LexA production was induced with 5mM IPTG in 200 mL LB medium at OD_{600} ~ 0.5 during 4 hours at 37°C under shaking at 250 rpm. The purification was performed using TALON® Metal Affinity Resin from (Clontech Laboratories, Inc, 635501) with HisTALON™ Buffer Set (Clontech Laboratories, 635651) following manufacturer's instructions. The elution fractions containing LexA proteins were pulled, dialyzed with buffer (20mM Tris-HCl pH8, 50mM KCl, 1mM EDTA) and concentrated with Vivaspin Turbo 15 RC, 10,000 MWCO (Sartorius, VS15TR01). The DNA probes P_{sgaCD} and P_{sgiAT} were amplified on total DNA of *S.* Agona strain 47SA97 using primers EMSA-sgaCDbox_F/EMSA-sgaCDbox_R and EMSA-sgiATbox_F/EMSA-sgiATbox_R, respectively (Table S3). Nucleotide changes from CTG to AGT in the potential LexA binding boxes to produce mutated probes were performed by overlap PCR using primers above and primers EMSA-mut-sgaCDbox_F/EMSA-mut-sgaCDbox_R and EMSA-mut-sgiATbox_F/EMSA-mut-sgiATbox_R for DNA probes P_{sgaCD}* and P_{sgiAT}*, respectively (Table S3). EMSAs were realized using the Electrophoretic Mobility-Shift Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, E33075). Briefly, 40 ng of DNA probes were mixed with different amounts of LexA proteins ranging from 0 to 600 ng in binding buffer E in a final volume of 10 µl and incubated for 20 min on ice. Samples were separated in 6% non-denaturing Tris-glycine polyacrylamide gels and visualised with SYBR® Green following the manufacturer's protocol.

Quantification of gene expression by RT-qPCR. Bacterial strains were grown in triplicate cultures with or without mitomycin C at 200 ng/mL in 10 mL LB medium at 37°C under agitation until reaching OD_{600} ~ 1. RNA extractions were performed from 1 ml LB culture using the Direct-zol RNA MiniPrep Plus (Zymo Research, ZR2073). Total RNAs were reverse-transcribed into cDNAs using iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, 1708891). The qPCR assays were performed with a Biomark™ HD system (Fluidigm) and primers listed in Table S3. According to the manufacturer's instructions, cDNA samples were diluted 10-fold and pre-amplified with a mix of all primers using the Pre-Amp master Mix (Fluidigm, 100-5581) and amplification conditions: 2 min at 95 °C, followed by 14 cycles of 15 s at 95 °C and 4 min at 60 °C, and a final hold at 4 °C. Samples were treated with exonuclease I to removed primers (NEB, M0293L) and diluted 20-fold in Tris-EDTA. Pre-amplified cDNA samples and primer pairs were loaded on the Fluidigm 96.96 or 48.48 Dynamic Array™ IFC and run in the Biomark™ HD system using the following program: 70 °C for 40 min, 60 °C for 30 s, 95°C for 60 s, 30 cycles of 96 °C for 5 s, 60 °C for 20 s, followed by a melting curve. Data were analysed with Fluidigm Real-Time software to determine the cycle threshold values (Ct). For each sample, gene expression was normalized to the geometric mean of the housekeeping genes *rpoA* and *mdH* to obtain ΔCt value. Both of these housekeeping genes have previously been used in SOS induction studies and their expression is thus known to be unaffected (27, 42). Fold changes of gene expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$) correspond to the ratio of the $2^{-\Delta CT}$ means with and without mitomycin C treatment.

Determination of the SGI1 copy number and excision rate by qPCR. Total DNA extractions were realized simultaneously to RNA extractions for *E. coli* strains MG1655::SGI1, MG1655::SGI1-CΔ*sgaDC*, and MG1655::SGI1Δ*sgaDC*/pAON*sgaDC* using the NucleoSpin Tissue Mini kit (Macherey Nagel, 740952.50). Primers used to quantify the chromosome and different forms of SGI1 are listed in Table S3. qPCR was carried out with

the Bio-Rad® CFX96 Touch™ with the iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, #1708882) with the following amplification conditions: 5 min at 95 °C, 42 cycles of 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C followed by a melting curve. SGI1 copy number, percentage of excised SGI1 (*attP*) and empty chromosomal attachment site (*attB*) correspond to the ratio between the $2^{-\Delta Ct}$ means of targets, *xis* gene, *attP*, *attB*, respectively, and the $2^{-\Delta Ct}$ means of 2 housekeeping chromosomal genes (*mdh* and *rpoA*) for each DNA sample.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed with Prism 6.0 software (GraphPad). Analyses were performed on data from three to six independent experiments depending on the experiments. The different statistical tests used are indicated in figure legends. Significance is indicated by *P*-values: ns, non-significant; ∗, $P<0.05$; ∗∗, $P<0.01$, ∗∗∗, $P<0.001$; and ∗∗∗∗, $P<0.0001$.

Data availability. Raw read data and draft genome assemblies of *Salmonella* strains (11-0799 and 47SA97) used in this study have been deposited in the European Nucleotide Archive under bio-project PRJEB52018. Sanger sequencing data confirming all plasmid constructions and mutants as well as experimental source data are available from the authors upon reasonable request.

References

1. Cury J, Oliveira PH, de la Cruz F, Rocha EPC. 2018. Host range and genetic plasticity explain the coexistence of integrative and extrachromosomal mobile genetic elements. Mol Biol Evol 35:2230-2239.
2. Redondo-Salvo S, Fernández-López R, Ruiz R, Vielva L, de Toro M, Rocha EPC, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F. 2020. Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. Nat commun. 11:3602.
3. Harmer CJ, Hall RM. 2015. The A to Z of A/C plasmids. Plasmid 80:63-82.
4. Doublet B, Boyd D, Douard G, Praud K, Cloeckaert A, Mulvey MR. 2012. Complete nucleotide sequence of the multidrug resistance IncA/C plasmid pR55 from Klebsiella pneumoniae isolated in 1969. J Antimicrob Chemother 67:2354-2360.
5. Siebor E, Neuwirth C. 2011. The new variant of *Salmonella* genomic island 1 (SGI1-V) from a *Proteus mirabilis* French clinical isolate harbours $bla_{\text{VEB-6}}$ and *qnrA1* in the multiple antibiotic resistance region J Antimicrob Chemother 66:2513-2520.
6. Girlich D, Dortet L, Poirel L, Nordmann P. 2015. Integration of the $bla_{\text{NDM-1}}$ carbapenemase gene into *Proteus* genomic island 1 (PGI1-*Pm*PEL) in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. J Antimicrob Chemother 70:98-102.
7. de Curraize C, Siebor E, Neuwirth C. 2011. Genomic islands related to *Salmonella* genomic island 1; integrative mobilizable elements in *trmE* mobilised in trans by A/C plasmids. Plasmid 114:102565.
8. Hawkey J, Le Hello S, Doublet B, Granier SA, Hendriksen RS, Fricke WF, Ceyssens PJ, Gomart C, Billman-Jacobe H, Holt KE, Weill FX. 2019. Global phylogenomics of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype Kentucky ST198. Microb Genom 5:e000269.
9. Cummins ML, Hamidian M, Djordjevic SP. 2020. *Salmonella* genomic island 1 is

broadly disseminated within gammaproteobacteriaceae. Microorganisms 8:161.

10. Rivard N, Colwell RR, Burrus V. 2020. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: mechanistic insights from IncC plasmid-mediated dissemination of a novel family of genomic islands inserted at *trmE*. mSphere 5:e00748-20.
11. Carraro N, Rivard N, Ceccarelli D, Colwell RR, Burrus V. 2016. IncA/C conjugative plasmids mobilize a new family of multidrug resistance islands in clinical *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 isolates from Haiti. mBio 7:e00509-16.
12. Durand R, Deschênes F, Burrus V. 2021. Genomic islands targeting *dusA* in *Vibrio* species are distantly related to *Salmonella* Genomic Island 1 and mobilizable by IncC conjugative plasmids. PLoS Genet 17:e1009669.
13. Doublet B, Boyd D, Mulvey MR, Cloeckaert A. 2005. The *Salmonella* genomic island 1 is an integrative mobilizable element. Mol Microbiol 55:1911-1924.
14. 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:e15302.
15. Carraro N, Matteau D, Luo P, Rodrigue S, Burrus V. 2014. The master activator of IncA/C conjugative plasmids stimulates genomic islands and multidrug resistance dissemination. PLoS Genet 10:e1004714.
16. Carraro N, Durand R, Rivard N, Anquetil C, Barrette C, Humbert M, Burrus V. 2017. *Salmonella* genomic island 1 (SGI1) reshapes the mating apparatus of IncC conjugative plasmids to promote self-propagation. PLoS Genet 13:e1006705.
17. Huguet KT, Rivard N, Garneau D, Palanee J, Burrus V. 2020. Replication of the *Salmonella* Genomic Island 1 (SGI1) triggered by helper IncC conjugative plasmids promotes incompatibility and plasmid loss. PLoS Genet 16:e1008965.
18. Durand R, Huguet KT, Rivard N, Carraro N, Rodrigue S, Burrus V. 2021. Crucial role of

Salmonella genomic island 1 master activator in the parasitism of IncC plasmids. Nucleic Acids Res 49:7807-7824

19. Szabó M, Murányi G, Kiss J. 2021. IncC helper dependent plasmid-like replication of *Salmonella* Genomic Island 1. Nucleic Acids Res 49:832-846.
20. Huguet KT, Gonnet M, Doublet B, Cloeckaert A. 2016. A toxin antitoxin system promotes the maintenance of the IncA/C-mobilizable *Salmonella* Genomic Island 1. Sci Rep 6:32285.
21. Kiss J, Papp PP, Szabó M, Farkas T, Murányi G, Szakállas E, Olasz F. 2015. The master regulator of IncA/C plasmids is recognized by the *Salmonella* Genomic island SGI1 as a signal for excision and conjugal transfer. Nucleic Acids Res 43:8735-8745.
22. Harmer CJ, Hamidian M, Ambrose SJ, Hall RM. 2016. Destabilization of IncA and IncC plasmids by SGI1 and SGI2 type *Salmonella* genomic islands. Plasmid 87-88:51-57.
23. Kiss J, Szabó M, Hegyi A, Douard G, Praud K, Nagy I, Olasz F, Cloeckaert A, Doublet B. 2019. Identification and Characterization of *oriT* and Two Mobilization Genes Required for Conjugative transfer of *Salmonella* Genomic Island 1. Front Microbiol 10:457.
24. Hancock SJ, Phan MD, Luo Z, Lo AW, Peters KM, Nhu NTK, Forde BM, Whitfield J, Yang J, Strugnell RA, Paterson DL, Walsh TR, Kobe B, Beatson SA, Schembri MA. 2020. Comprehensive analysis of IncC plasmid conjugation identifies a crucial role for the transcriptional regulator AcaB. Nat Microbiol 5:1340-1348.
25. Frost LS. 2009. Conjugation, Bacterial. Encyclopedia of Microbiology (Third Edition). 517-531.
26. Baharoglu Z, Bikard D, Mazel D. 2010. Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. PLoS Genet. 6:1-10.

27. Briales A, Rodriguez-Martinez JM, Velasco C, Machuca J, Díaz de Alba P, Blazquez J, Pascual A. 2012. Exposure to diverse antimicrobials induces the expression of *qnrB1*, *qnrD* and *smaqnr* genes by SOS-dependent regulation. J Antimicrob Chemother 67/2854–2859.
28. Fornelos N, Browning DF, Butala M. 2016. The use and abuse of LexA by mobile genetic elements. Trends Microbiol 24:391-401.
29. Beaber JW, Hochhut B., & Waldor, M. K. 2004. SOS response promotes horizontal dissemination of antibiotic resistance genes. Nature 427:72-74.
30. Hegyi A, Szabo M, Olasz F, Kiss J. 2017. Identification of oriT and a recombination hot spot in the IncA/C plasmid backbone. Sci Rep 7:10595.
31. Turatsinze JV, Thomas-Chollier M, Defrance M, van Helden J. 2008. Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. Nat Protoc 3:1578-1588.
32. Boyd D, Cloeckaert A, Chaslus-Dancla E, Mulvey M.R. 2002. Characterization of variant *Salmonella* genomic island 1 multidrug resistance regions from serovars Typhimurium DT104 and Agona. Antimicrob Agents Chemother 46:1714-1722.
33. Da Re S, Garnier F, Guérin E, Campoy S, Denis F, Ploy MC. 2009. The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. EMBO Rep 10:929-933.
34. Jurenas D, Fraikin N, Goormaghtigh F, Van Melderen L. Biology and evolution of bacterial toxin-antitoxin systems. Nat Rev Microbiol ahead of print (2022) doi: 10.1038/s41579-021-00661-1.
35. Guerin E, Cambray G, Sanchez-Alberola N, Campoy S, Erill I, Da Re S, Gonzalez-Zorn B, Barbé J, Ploy MC, Mazel D. 2009. The SOS Response Controls Integron Recombination. Science 324:1034.
36. Nolivos S, Cayron J, Dedieu A, Page A, Delolme F, Lesterlin C. 2019. Role of AcrAB-

525 TolC multidrug efflux pump in drug-resistance acquisition by plasmid transfer. Science
526 364:778-782.
527 37. Getino M, de la Cruz F. 2018. Natural and Artificial Strategies to Control the
528 Conjugative Transmission of Plasmids. Microbiol Spectr 6, MTBP-0015-2016.
529 38. Farinha MA, Kropinski AM. 1990. Construction of broad-host-range plasmid vectors for
530 easy visible selection and analysis of promoters. J Bacteriol 172:3496-3499.
531 39. Robbe-Saule V, Schaeffer F, Kowarz L, Norel F. 1997. Relationships between H-NS,
532 σ(S), SpvR and growth phase in the control of *spvR*, the regulatory gene of the
533 *Salmonella* plasmid virulence operon. Mol Gen Genet 256:333-347.
534 40. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in
535 *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA **97**:6640-6645.
536 41. Miller JH. 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold
537 Spring Harbor Laboratory 352-355.
538 42. Valat C, Hirchaud E, Drapeau A, Touzain F, de Boisseson C, Haenni M, Blanchard Y,
539 Madec JY. 2020. Overall changes in the transcriptome of *Escherichia coli* O26:H11
540 induced by a subinhibitory concentration of ciprofloxacin. J Appl Microbiol 129:1577-
541 1588.
542
543

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to acknowledge Pr. Laurence Van Melderen (ULB, Brussels, Belgium) for providing *E. coli* strains, Dr. Pierre Germon (INRAE, Nouzilly, France) for expert technical assistance in Fluidigm experiments and analysis, Maxime Branger for genome assemblies and annotation, and Dr. Olivier Grépinet (INRAE, Nouzilly, France) for technical assistance in β-galactosidase reporter assays. This work was supported by funding from the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation programme under grant agreement No 773830: One Health European Joint Programme, joint research project FULLFORCE, and by public funds from the French National Research Institute for Agriculture, Food, and Environment (INRAE), and from Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (Inserm).

MCP is supported by a PhD fellowship from the microbiology and food chain division of INRAE and the French administrative region Centre-Val-de-Loire No 2018-00129424.

Author contributions

M.C.P., A.C., and B.D. conceived the study. M.C.P. performed all experiments and analysis with the assistance of K.P. and S.D.R. A.C., and B.D. supervised aspects of the study and provided essential expert analysis and funding. B.D. wrote the original draft of the manuscript with input from M.C.P. and corrections from all authors. All authors contributed to the interpretation of the results, read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

569 Funding

570 This work was supported by funding from the European Union's Horizon 2020 Research and
571 Innovation programme under grant agreement No 773830: One Health European Joint
572 Programme, joint research project FULLFORCE, Benoît Doublet.

573 This work was supported by funding from Centre-Val-de-Loire administrative region, PhD
574 fellowship number 2018-00129424, Marine Pons

575 The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to
576 submit the work for publication.

577

578 Author ORCIDs

579 Marine C. Pons https://orcid.org/000-0002-4570-084X

580 Sandra Da Re https://orcid.org/0000-0003-3579-9185

581 Axel Cloeckaert https://orcid.org/0000-0002-5887-7599

582 Benoît Doublet http://orcid.org/0000-0003-0531-0967

583

584 **SUPPLEMENTAL MATERIAL**

585 FIG S1.eps

586 FIG S2.eps

587 FIG S3.eps

588 TABLE S1.docx

589 TABLE S2.docx

590 TABLE S3.docx

591 TABLE S4.xlsx

592

Figure Legends

FIG 1 Conjugative entry of IncC/IncA plasmids activates the SOS response in the recipient cells. The specific activation of the SOS response following plasmid entry in recipient cells was determined in conjugation assays using donor *E. coli* strains TOP10 harbouring conjugative plasmids and recipient *E. coli* strain MG1655 carrying reporter vectors (*lacZ* expression under the promoter P*recN,* pMP002 or pMP010; see details in methods section) (**A**), Time-dependent transfer frequency of Rsa (IncW, positive control), R55 (IncC) and RA1 (IncA) plasmids. Transfer frequencies are expressed as the number of transconjugant per donor CFUs. (**B**), basal β-galactosidase activity per recipient without conjugative plasmid in the donor. (**C**), Specific β-galactosidase activity per transconjugant for each plasmid at the time point corresponding to a transfer frequency of at least 10^{-4} (R55 and RA1: 1h; Rsa: 2h). (**D**), SOS induction ratio correspond to the specific β-galactosidase activity per transconjugant divided by the basal β-galactosidase activity in recipient. In panels (**B**), (**C**) and (**D**), β-galactosidase activities and induction ratio were calculated as described in Materials and Methods. The bars represent the mean with standard error of the mean obtained from three independent experiments.

FIG 2 Linear schematic representation of conserved SGI1 backbone. Integrated SGI1 is flanked by *attL* and *attR* attachment sites. The position and orientation of open reading frames (ORFs) are indicated by arrows. ORF functions from predictions or previous functional analyses are color-coded. Putative LexA binding boxes are represented as red flags. Partial sequences of *sgaDC* and *sgiAT* promoters are indicated showing putative -10, -35 regions, and LexA binding box (red box). Stars indicate the 3 essential nucleotides (CTG) of LexA binding boxes that have been substituted in the mutated probes for electrophoretic mobility

shift assay (Figs. 3 & S2). SgaDC/AcaDC binding sites are indicated by green flags. *oriT* represents the SGI1 origin of transfer.

FIG 3 The SOS response controls the expression of the master regulator *sgaDC* and as a consequence the expression of SGI1 essential genes for transfer. (**A**) and (**B**), Promoter activity of P*sgaDC* measured by β-galactosidase activity tests in *S.* Kentucky ST198 strain 11-0799 and *S.* Agona strain 959SA97ΔSGI1 with or without mitomycin C (MMC) or ciprofloxacin (CIP) (**A**) and in *E. coli* WT strain MG1655 with and without MMC or CIP and in MG1655 mutants *lexA3* (SOS^{OFF}) and *lexA51* (SOS^{ON}) (**B**). The bars represent the mean and standard error of the mean obtained from at least 3 independent experiments, each one assorted of technical duplicates. For each condition, basal β-galactosidase activities were determined using the pQF50 reporter vectors without cloned promoter (data not shown, see source data). One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed between induced condition and non-induced. Statistical significance is indicated as followed: ****, $P<0.0001$; **, $P<0.01$. (**C**), Electrophoretic mobility shift assay of the *sgaDC* promoter fragment with increasing quantity (ng) of the *Salmonella* LexA protein from *S.* Agona strain 47SA97. P*sgaDC* and P*sgaDC** probes contain the native and mutated LexA binding sites, respectively. (**D**), RT-qPCR quantification of gene expression of main SGI1 genes in *Salmonella* (*S.* Agona 47SA97) after treatment or not with mitomycin C. Results are indicated as fold change upon mitomycin C treatment. Two-fold increase in gene expression is indicated with the dotted bar. The bars represent the mean and standard error of the mean obtained from 3 independent experiments, each one assorted of technical triplicates. Genes under the control of LexA and AcaDC/SgaDC are highlighted in red and green, respectively. Statistical significance was determined using multiple *t*-tests with the Holm-Sidak method from the $2^{-\Delta CT}$ values of each mRNA gene level with or without mitomycin C (Fig. S3).

642 Statistical significance is indicated as followed: ****, *P*<0.0001; ***, *P*<0.001; ns, not
643 significant. (**E**), RT-qPCR quantification of gene expression of main SGI1 genes in *E. coli*
644 after treatment or not with mitomycin C. Results are indicated as fold change upon mitomycin
645 treatment. Fold change of gene expression with or without mitomycin C is represented for *E.*
646 *coli* MG1655::SGI1 (WT), MG1655::SGI1Δ*sgaDC* (Δ*sgaDC*), and MG1655::SGI1Δ*sgaDC*
647 trans-complemented with pAON-*sgaDC* (Δ*sgaDC*-pAON*sgaDC*). Genes under the control of
648 LexA repressors and AcaDC/SgaDC activators are highlighted in red and green, respectively.
649 The bars represent the mean and standard error of the mean obtained from 3 independent
650 experiments, each one assorted with technical duplicates (Fig. S3). Statistical significance was
651 determined using Two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test between
652 Δ*sgaDC* or Δ*sgaDC*-pAON-*sgaDC* compared to WT gene fold-changes. Statistical
653 significance is indicated as followed: **** *P*<0.0001; *** *P*<0.001; ** *P*<0.01; * *P*<0.5; ns
654 not significant.
655
656 **FIG 4** Time-dependent conjugative transfer of SGI1 and IncC plasmid in tri-partite
657 conjugation assays. IncC-R16a and SGI1 transfer frequencies (empty and filed symbols,
658 respectively) as a function of mating time in tripartite conjugation assays. In all experiments,
659 IncC plasmid R16a and SGI1 were carried by two distinct *E. coli* MG1655 donor strains
660 (R16a in donor #1 and SGI1 or derivatives in donors #2). Donors #1 and #2 were mixed
661 together with a third *E. coli* recipient strain, the rifampicin-resistant J5-3 in a 1:1:1 ratio. In all
662 experiments, the IncC plasmid R16a was carried by WT *E. coli* strain MG1655 (donor #1).
663 (**A**), donor #2: WT *E. coli* strain MG1655::SGI1. (**B**), donor #2: *E. coli* MG1655::SGI1
664 *lexA51* mutant (SGI1, SOS^{ON}). (**C**), donor #2: WT *E. coli* strain MG1655::SGI1Δ*sgaDC*. (**D**),
665 IncC-R16a and SGI1 Transfer frequencies after 1 h 45 min of mating in tripartite conjugation
666 assays from panels (A), (B), and (C). The bars represent the mean and standard error of the

667 mean obtained from at least 3 independent experiments. Statistical significance was
668 determined using One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test on the
669 logarithm of the values between WT *E. coli* strain MG1655::SGI1Δ*sgaDC* (C) or
670 MG1655::SGI1 *lexA51* (B) compared to WT *E. coli* strain MG1655::SGI1 (A). Statistical
671 significance is indicated as followed: ****, $P<0.0001$; *, $P<0.5$; ns not significant.
672
673 **FIG 5** Proposed model of early timing of SGI1 gene expression for transfer upon IncC
674 plasmid entry. Genes of interest are represented by arrows in SGI1 (located in the
675 chromosome) and IncC plasmid. Gene and protein functions are color-coded as follow:
676 yellow/brown, transfer; blue, light and dark green, transcriptional activators; red, repressors;
677 and purple, recombination. Promoters are represented by color-coded flags according to the
678 corresponding repressor/activator: red, LexA repressed; green, AcaCD/SgaCD-activatable;
679 and blue, AcaB activatable. The red blocked dashed arrows represented the removal of the
680 inhibition of the *sgaDC* promoter by the LexA repressor. The light green arrows represent the
681 activation of gene expression mediated by SgaDC. A bidirectional black dashed arrow
682 indicates potential interactions between AcaDC and SgaDC. The proposed model of temporal
683 gene regulation depicted at the bottom of the figure is based on all the results obtained in this
684 study and other findings on the complex SGI1-IncC biology, recently published[10,24]. Gene
685 expression is shown as color-coded solid/dotted lines according to the corresponding
686 activators along the time scale (see text for timing explanation).
687
688 **FIG S1** Level of P*sgaDC*, P*sgiAT*, P*acaDC* and P*recN* activity in the presence or absence of
689 SGI1 in *Salmonella* and *E. coli* with or without mitomycin C (MMC) or ciprofloxacin (CIP).
690 Promoter activity of P*sgaDC* (**A**) and (**B**), P*sgiAT* (**C**) and (**D**), P*acaDC* (**E**) and (**F**), and
691 P*recN* (**G**) and (**H**) were assessed in absence (■) or presence (■) of SGI1 integrated in the

chromosome in wild-type *S.* Kentucky ST198 strain 11-0799, *S.* Agona strains 959SA97ΔSGI1 and 47SA97 SGI1-C (A), (C), (E), (G) and *E. coli* strains MG1655 and derivatives *lexA3* (SOS^{OFF}) and *lexA51* (SOS^{ON}) (B), (D), (F), (H) with or without mitomycin C (MMC) or ciprofloxacin (CIP) to induce SOS response as well as in *E. coli* mutants *lexA3* (SOS^{OFF}) and *lexA51* (SOS^{ON}) (B), (D), (F), (H). The bars represent the mean and standard error of the mean obtained from at least 3 independent experiments, each one assorted of with technical duplicates. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test was performed to compare the presence/absence of SGI1. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed between induced condition and non-induced and only shown if significant except for (A) and (B) (see Figs 3A and 3B, respectively). Statistical significance is indicated as follow: ****, $P<0.0001$; ***, $P<0.001$; **, $P<0.01$; *, $P<0.05$; ns, not significant.

FIG S2 Electrophoretic mobility shift assay of the P*sgaDC* and P*sgiAT* regions with *Salmonella* or *E. coli* LexA proteins. (**A**), Partial sequences of *sgaDC* and *sgiAT* promoters are indicated showing putative -10, -35 regions, and LexA binding box. The 3 essential nucleotides (CTG) of LexA binding boxes that have been substituted in the mutated probes are indicated by stars in Fig. 2. (**B**), Electrophoretic mobility shift assay of the *sgaDC* promoter fragment from *S.* Agona strain 47SA97 carrying SGI1-C and increasing quantities of the LexA protein from *E. coli* MG1655. P*sgaDC* and P*sgaDC** probes contain the native and mutated LexA binding sites, respectively. (C) and (D), Electrophoretic mobility shift assay of the *sgiAT* promoter fragment from *S.* Agona strain 47SA97 carrying SGI1-C and increasing quantities of LexA protein purified from (**C**) *S.* Agona strain 47SA97 or (**D**) *E. coli* strain MG1655. P*sgiAT* and P*sgiAT** probes contain the native and mutated LexA-binding sites, respectively.

FIG S3 Relative gene expression with or without mitomycin C treatment to induce the SOS response. Box plots of the $2^{-\Delta CT}$ values of mRNA gene level with or without mitomycin C in *S.* Agona strain 47SA97 harboring chromosomally-integrated SGI1 (**A**), in *E. coli* MG1655::SGI1 (**B**)*, E. coli* MG1655::SGI1Δ*sgaDC* (**C**), and in *E. coli* MG1655::SGI1-CΔ*sgaDC* trans-complemented with pAON*sgaDC* (**D**). The derivatives fold changes of gene expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$) are shown in Fig. 3D and E. Genes under the control of LexA repressors and AcaDC/SgaDC activators are highlighted in red and green, respectively. Boxes extend from the 25th to 75th percentile of each group's distribution; horizontal inner lines indicate median values; vertical extending lines denote the minimum and maximum values obtained from 3 biological independent experiments, assorted of technical triplicates for each. Statistical significance was determined using multiple *t*-tests with the Holm-Sidak method from the $2^{-\Delta CT}$ values of mRNA gene level to compare with and without mitomycin C treatment. Statistical significance is indicated as follow: ****, $P<0.0001$; ***, $P<0.001$; **, $P<0.01$; *, $P<0.05$; ns, not significant.

733 **TABLE 1** Putative LexA binding sites in SGI1 identified by the regulatory sequence analysis tools (http://embnet.ccg.unam.mx/rsat/matrix-

734 scan_form.cgi) using the RegulonDB database

LexA binding motif[a]	**Weight**	***P*-value**	**Position in AF261825.2**	**Gene/ORF at vicinity**	**Distance to start codon**
TACTGTAAAAAAACACAGTA	15.8	8.2e-09	7946-7927	S008-*sgaDC*	-77
GACTGTACAAAAAAACAGTC	12.7	3.5e-07	27882-27863	*intI1*	-10
TGCTGGAGCAAACAACAGTA	8.6	1.5e-05	12632-12613	*traH*	+788
CACTGTTCCGATCACCAGTG	5.7	1.2e-04	17125-17106	*mpsAB*	+587/-362
TCCTGCCTCTACGGCCAGCG	4.4	2.8e-04	19311-19292	S023	+1017
TGCTGGCGAACATGCCAGGA	3.9	3.8e-04	20422-20403	S024/S023	+1849/-74
GTCTGTGTAGTATGACAGGG	3.8	4.0e-04	25952-25971	*sgiAT*	-49

735 [a]Among the putative LexA binding motifs predicted by RSAT matrix-scan, duplicated motifs on non-coding strand were discarded as well as

736 motifs that do not respect the "CTG-10N-CAG" characteristic of the LexA-binding motif consensus.

737

738

739 **TABLE 2** SGI1 copy number and excision of SGI1 in *E. coli* MG1655::SGI1 (WT), MG1655::SGI1Δ*sgaDC* (Δ*sgaDC*), and
740 MG1655::SGI1Δ*sgaDC* trans-complemented with pAON-*sgaDC* (Δ*sgaDC*-pAON*sgaDC*) with or without mitomycin C induction

SGI1	MMC	SGI1 copy number[a] (*xis*/chr)	Excised SGI1[a] (*attP*/chr)	Empty *attB*[a] (*attB*/chr)	+/- MMC fold change of gene expression[b]	
					xis	*rep*
WT	-	1.05 ± 0.04	ND	ND	NA	NA
WT	+	1.07 ± 0.03	ND	ND	2.2 ± 0.2	2.4 ± 0.3
SGI1Δ*sgaDC*-pAON*sgaDC*	-	1.06 ± 0.04	$0.0013 \pm 6.2\ 10^{-5}$	$0.0002 \pm 8.9\ 10^{-6}$	NA	NA
SGI1Δ*sgaDC*-pAON*sgaDC*	+	1.06 ± 0.03	0.13 ± 0.004	0.06 ± 0.002	41.9 ± 3.8	15.6 ± 1.2

741 [a]The values represent the mean +/- the standard error of the mean obtained from 3 independent experiments, each one assorted of a technical
742 triplicate. ND and NA stand for non-detected and non-applicable, respectively. SGI1 copy number, excised SGI1 and empty chromosomal
743 attachment site (*attB*) correspond to the mean of ratio between the targets, *xis* gene, *attP*, *attB*, respectively, and 2 distinct chromosomal genes
744 (*mdh* and *rpoA*) as detailed in methods section.

745 [b]Fold changes of essential genes expression for excision (*xis*) and replication (*rep*) of SGI1 have been determined on mRNA extractions

746 performed at the same time of total DNA extractions from the same 3 independent cultures (see also in Fig. 3E**)**.

747

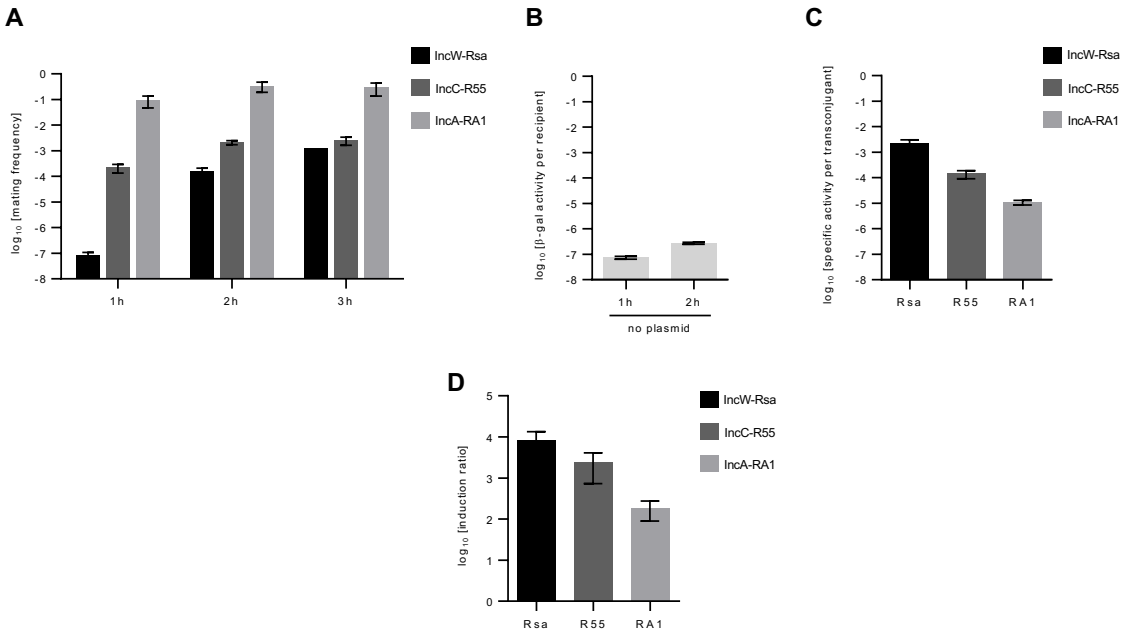


FIG 1 Conjugative entry of IncC/IncA plasmids activates the SOS response in the recipient cells. The specific activation of the SOS response following plasmid entry in recipient cells was determined in conjugation assays using donor *E. coli* strains TOP10 harbouring conjugative plasmids and recipient *E. coli* strain MG1655 carrying reporter vectors (*lacZ* expression under the promoter P*recN,* pMP002 or pMP010; see details in methods section)**,** (**A**) Time-dependent transfer frequency of Rsa (IncW, positive control), R55 (IncC) and RA1 (IncA) plasmids. Transfer frequencies are expressed as the number of transconjugant per donor CFUs. (**B**), basal β-galactosidase activity per recipient without conjugative plasmid in the donor. (**C**), Specific β-galactosidase activity per transconjugant for each plasmid at the time point corresponding to a transfer frequency of at least 10^{-4} (R55 and RA1: 1h; Rsa: 2h). (**C**), SOS induction ratio correspond to the specific β-galactosidase activity per transconjugant divided by the basal β-galactosidase activity in recipient. In panels (**B**), (**C**) and (**D**), β-galactosidase activities and induction ratio were calculated as described in Materials and Methods. The bars represent the mean with standard error of the mean obtained from three independent experiments.

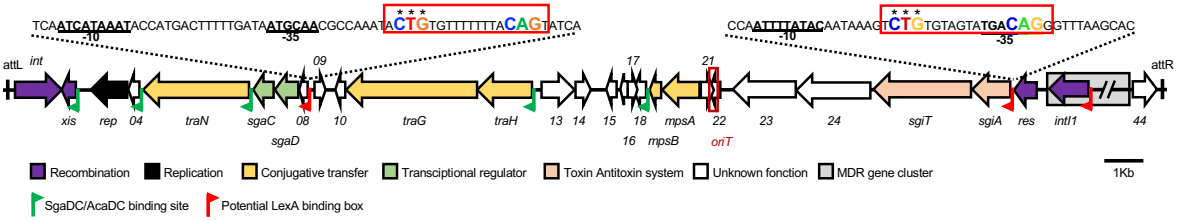


FIG 2 Linear schematic representation of conserved SGI1 backbone. Integrated SGI1 is flanked by *attL* and *attR* attachment sites. The position and orientation of open reading frames (ORFs) are indicated by arrows. ORF functions from predictions or previous functional analyses are color-coded. Putative LexA binding boxes are represented as red flags. Partial sequences of *sgaDC* and *sgiAT* promoters are indicated showing putative -10, -35 regions, and LexA binding box (red box). Stars indicate the 3 essential nucleotides (CTG) of LexA binding boxes that have been substituted in the mutated probes for electrophoretic mobility shift assay (Figs. 3 & S2). SgaDC/AcaDC binding sites are indicated by green flags. *oriT* represents the SGI1 origin of transfer.

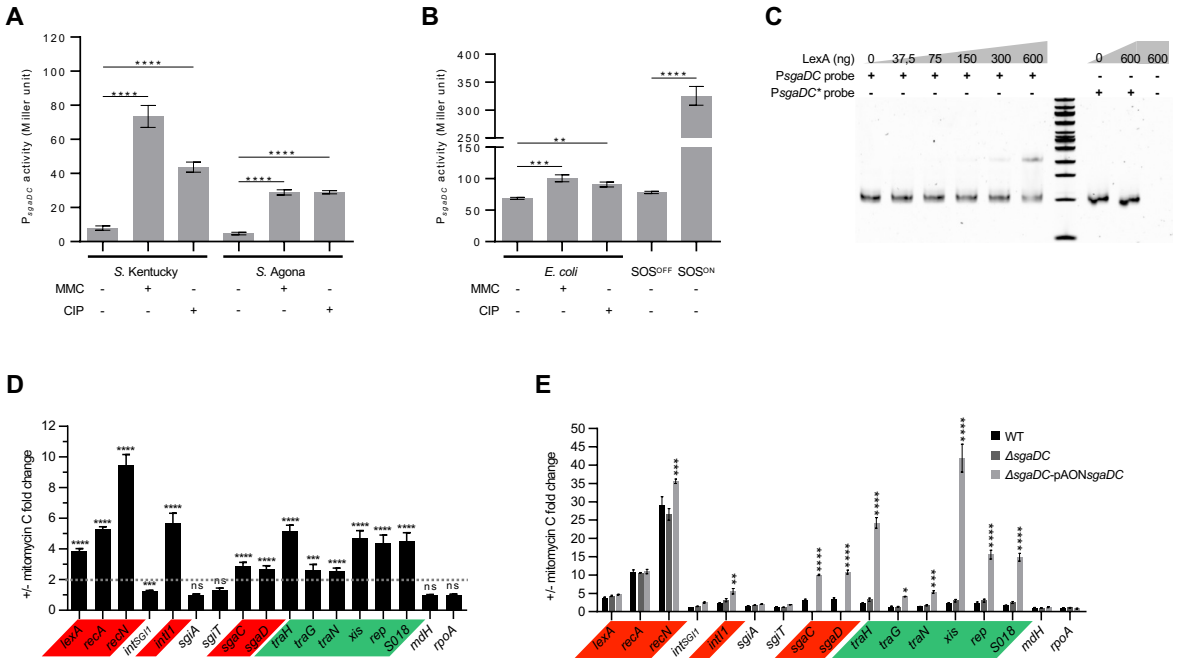


FIG 3 The SOS response controls the expression of the master regulator *sgaDC* and as a consequence the expression of SGI1 essential genes for transfer. (**A**) and (**B**), Promoter activity of P*sgaDC* measured by β-galactosidase activity tests in *S.* Kentucky ST198 strain 11-0799 and *S.* Agona strain 959SA97ΔSGI1 with or without mitomycin C (MMC) or ciprofloxacin (CIP) (**A**) and in *E. coli* WT strain MG1655 with and without MMC or CIP and in MG1655 mutants *lexA3* (SOS^{OFF}) and *lexA51* (SOS^{ON}) (**B**). The bars represent the mean and standard error of the mean obtained from at least 3 independent experiments, each one assorted of technical duplicates. For each condition, basal β-galactosidase activities were determined using the pQF50 reporter vectors without cloned promoter (data not shown, see source data). One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed between induced condition and non-induced. Statistical significance is indicated as followed: ****, $P<0.0001$; **, $P<0.01$. (**C**), Electrophoretic mobility shift assay of the *sgaDC* promoter fragment with increasing quantity (ng) of the *Salmonella* LexA protein from *S.* Agona strain 47SA97. P*sgaDC* and P*sgaDC** probes contain the native and mutated LexA binding sites, respectively. (**D**), RT-qPCR quantification of gene expression of main SGI1 genes in *Salmonella* (*S.* Agona 47SA97) after treatment or not with mitomycin C. Results are indicated as fold change upon mitomycin C treatment. Two-fold increase in gene expression is indicated with the dotted bar. The bars represent the mean and standard error of the mean obtained from 3 independent experiments, each one assorted of technical triplicates. Genes under the control of LexA and AcaDC/SgaDC are highlighted in red and green, respectively. Statistical significance was determined using multiple *t*-tests with the Holm-Sidak method from the $2^{-\Delta CT}$ values of each mRNA gene level with or without mitomycin C (Fig. S3). Statistical significance is indicated as followed: ****, $P<0.0001$; ***, $P<0.001$; ns, not significant. (**E**), RT-qPCR quantification of gene expression of main SGI1 genes in *E. coli* after treatment or not with mitomycin C. Results are indicated as fold change upon mitomycin treatment. Fold change of gene expression with or without mitomycin C is represented for *E. coli* MG1655::SGI1 (WT), MG1655::SGI1Δ*sgaDC* (Δ*sgaDC*), and MG1655::SGI1Δ*sgaDC* trans-complemented with pAON-*sgaDC* (Δ*sgaDC*-pAON*sgaDC*). Genes under the control of LexA repressors and AcaDC/SgaDC activators are highlighted in red and green, respectively. The bars represent the mean and standard error of the mean obtained from 3 independent experiments, each one assorted with technical duplicates (Fig. S3). Statistical significance was determined using Two-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test between Δ*sgaDC* or Δ*sgaDC*-pAON-*sgaDC* compared to WT gene fold-changes. Statistical significance is indicated as followed: **** $P<0.0001$; *** $P<0.001$; ** $P<0.01$; * $P<0.5$; ns not significant.

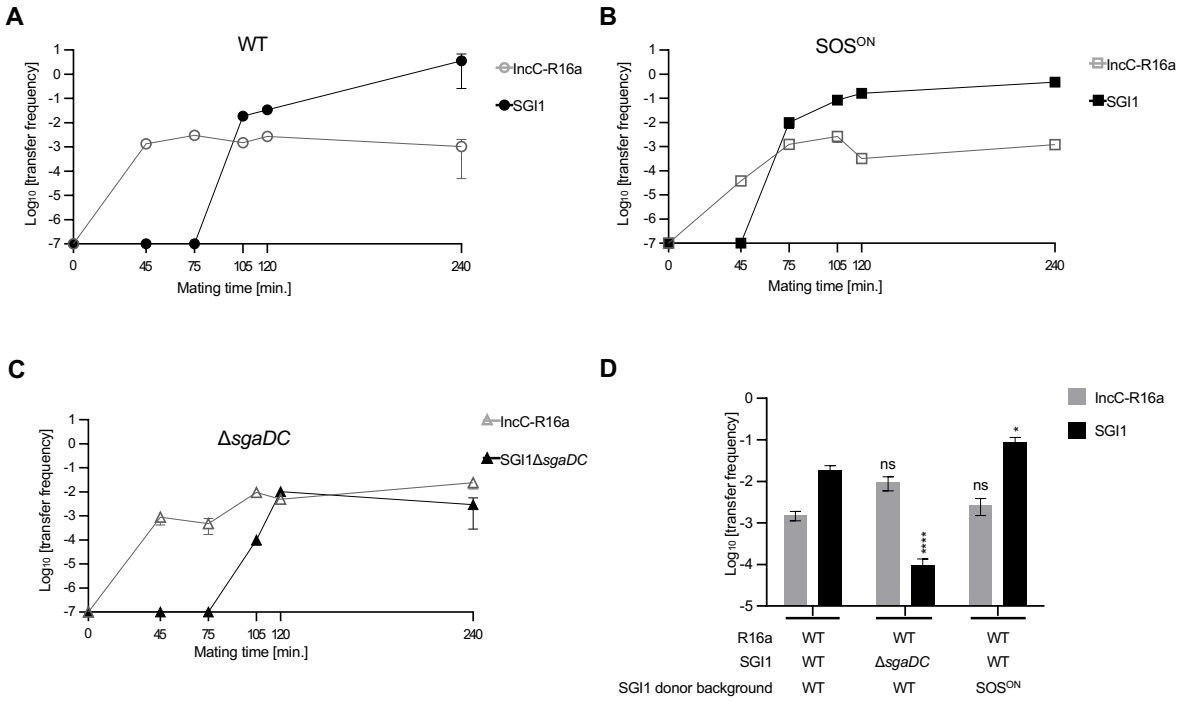


FIG 4 Time-dependent conjugative transfer of SGI1 and IncC plasmid in tri-partite conjugation assays. IncC-R16a and SGI1 transfer frequencies (empty and filed symbols, respectively) as a function of mating time in tripartite conjugation assays. In all experiments, IncC plasmid R16a and SGI1 were carried by two distinct *E. coli* MG1655 donor strains (R16a in donor #1 and SGI1 or derivatives in donors #2). Donors #1 and #2 were mixed together with a third *E. coli* recipient strain, the rifampicin-resistant J5-3 in a 1:1:1 ratio. In all experiments, the IncC plasmid R16a was carried by WT *E. coli* strain MG1655 (donor #1). (**A**), donor #2: WT *E. coli* strain MG1655::SGI1. (**B**), donor #2: *E. coli* MG1655::SGI1 *lexA51* mutant (SGI1, SOS^{ON}). (**C**), donor #2: WT *E. coli* strain MG1655::SGI1Δ*sgaDC*. (**D**), IncC-R16a and SGI1 Transfer frequencies after 1 h 45 min of mating in tripartite conjugation assays from panels (A), (B), and (C). The bars represent the mean and standard error of the mean obtained from at least 3 independent experiments. Statistical significance was determined using One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparisons test on the logarithm of the values between WT *E. coli* strain MG1655::SGI1Δ*sgaDC* (C) or MG1655::SGI1 *lexA51* (B) compared to WT *E. coli* strain MG1655::SGI1 (A). Statistical significance is indicated as followed: ****, $P<0.0001$; *, $P<0.5$; ns not significant.

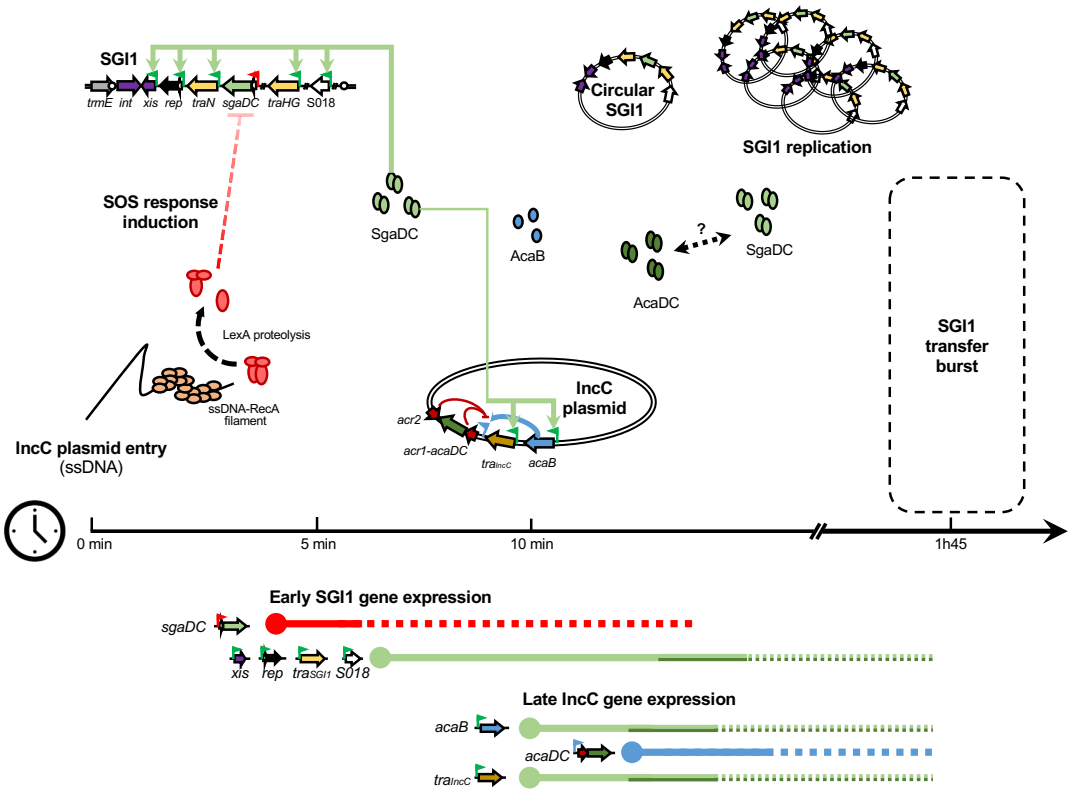


FIG 5 Proposed model of early timing of SGI1 gene expression for transfer upon IncC plasmid entry. Genes of interest are represented by arrows in SGI1 (located in the chromosome) and IncC plasmid. Gene and protein functions are color-coded as follow: yellow/brown, transfer; blue, light and dark green, transcriptional activators; red, repressors; and purple, recombination. Promoters are represented by color-coded flags according to the corresponding repressor/activator: red, LexA repressed; green, AcaCD/SgaCD-activatable; and blue, AcaB activatable. The red blocked dashed arrows represented the removal of the inhibition of the *sgaDC* promoter by the LexA repressor. The light green arrows represent the activation of gene expression mediated by SgaDC. A bidirectional black dashed arrow indicates potential interactions between AcaDC and SgaDC. The proposed model of temporal gene regulation depicted at the bottom of the figure is based on all the results obtained in this study and other findings on the complex SGI1-IncC biology, recently published[10,24]. Gene expression is shown as color-coded solid/dotted lines according to the corresponding activators along the time scale (see text for timing explanation).

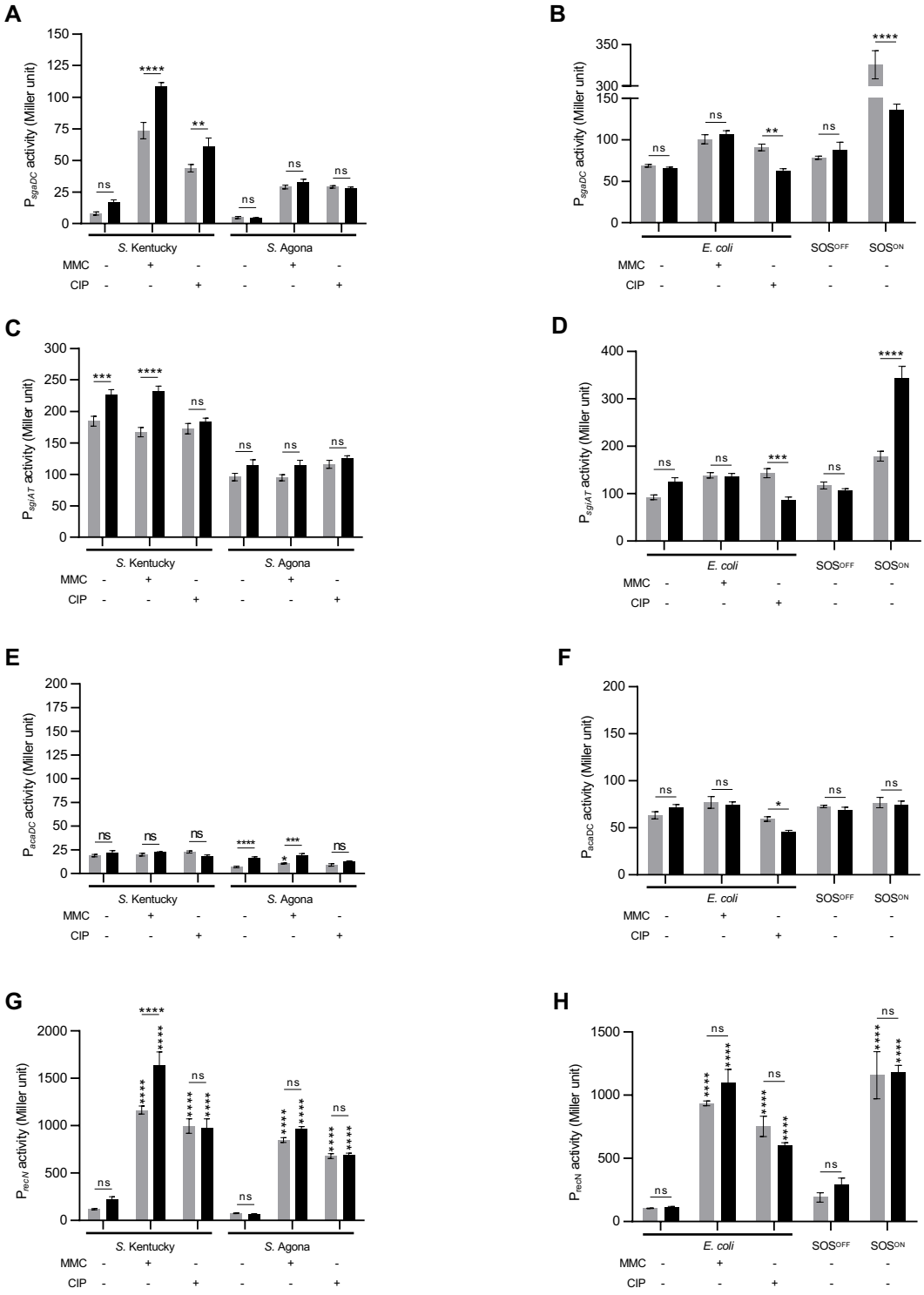


FIG S1 Level of P*sgaDC*, P*sgiAT*, P*acaDC* and P*recN* activity in the presence or absence of SGI1 in *Salmonella* and *E. coli* with or without mitomycin C (MMC) or ciprofloxacin (CIP). Promoter activity of P*sgaDC* (**A**) and (**B**), P*sgiAT* (**C**) and (**D**), P*acaDC* (**E**) and (**F**), and P*recN* (**G**) and (**H**) were assessed in absence (■) or presence (■) of SGI1 integrated in the chromosome in wild-type *S.* Kentucky ST198 strain 11-0799, *S.* Agona strains 959SA97ΔSGI1 and 47SA97 SGI1-C (A), (C), (E), (G) and *E. coli* strains MG1655 and derivatives *lexA3* (SOS^{OFF}) and *lexA51* (SOS^{ON}) (B), (D), (F), (H) with or without mitomycin C (MMC) or ciprofloxacin (CIP) to induce SOS response as well as in *E. coli* mutants *lexA3* (SOS^{OFF}) and *lexA51* (SOS^{ON}) (B), (D), (F), (H). The bars represent the mean and standard error of the mean obtained from at least 3 independent experiments, each one assorted of with technical duplicates. Two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test was performed to compare the presence/absence of SGI1. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed between induced condition and non-induced and only shown if significant except for (A) and (B) (see Figs 3A and 3B, respectively). Statistical significance is indicated as follow: ****, $P<0.0001$; ***, $P<0.001$; **, $P<0.01$; *, $P<0.05$; ns, not significant.

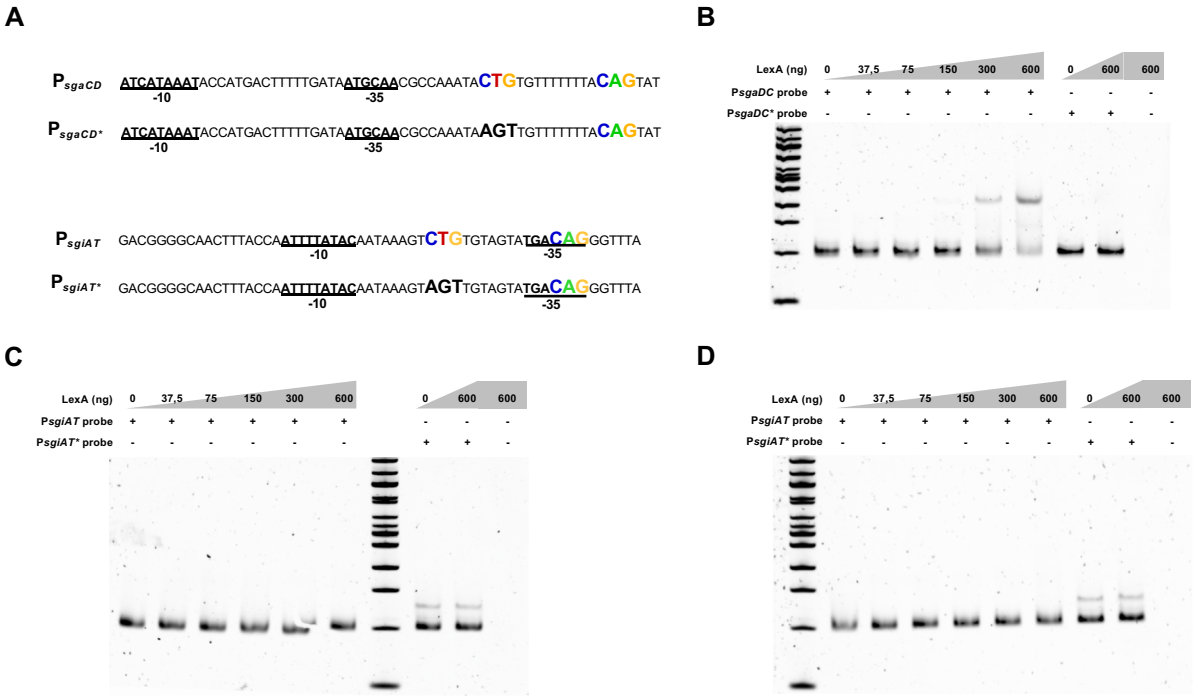


FIG S2 Electrophoretic mobility shift assay of the P*sgaDC* and P*sgiAT* regions with *Salmonella* or *E. coli* LexA proteins. (**A**), Partial sequences of *sgaDC* and *sgiAT* promoters are indicated showing putative -10, -35 regions, and LexA binding box. The 3 essential nucleotides (CTG) of LexA binding boxes that have been substituted in the mutated probes are indicated by stars in Fig. 2. (**B**), Electrophoretic mobility shift assay of the *sgaDC* promoter fragment from *S.* Agona strain 47SA97 carrying SGI1-C and increasing quantities of the LexA protein from *E. coli* MG1655. P*sgaDC* and P*sgaDC** probes contain the native and mutated LexA binding sites, respectively. (C) and (D), Electrophoretic mobility shift assay of the *sgiAT* promoter fragment from *S.* Agona strain 47SA97 carrying SGI1-C and increasing quantities of LexA protein purified from (**C**) *S.* Agona strain 47SA97 or (**D**) *E. coli* strain MG1655. P*sgiAT* and P*sgiAT** probes contain the native and mutated LexA-binding sites, respectively.

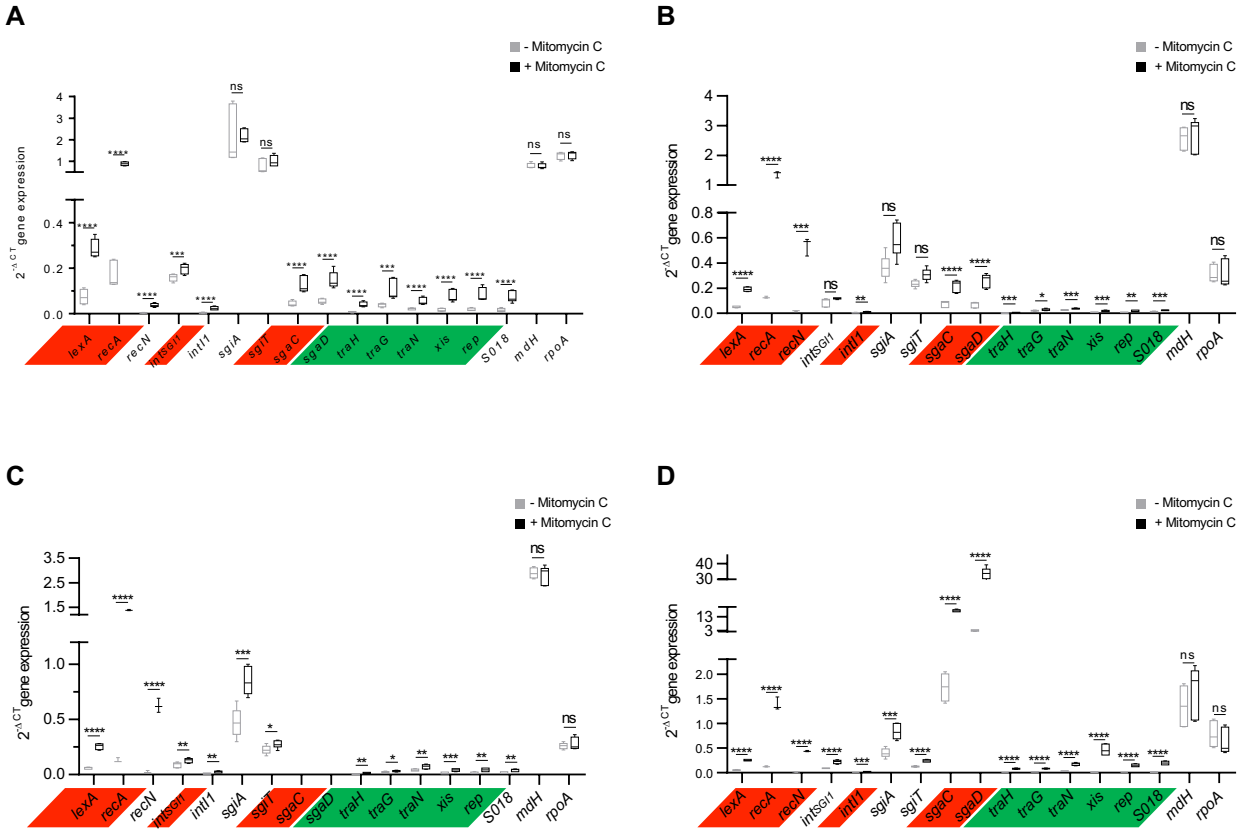


FIG S3 Relative gene expression with or without mitomycin C treatment to induce the SOS response. Box plots of the $2^{-\Delta CT}$ values of mRNA gene level with or without mitomycin C in *S.* Agona strain 47SA97 harboring chromosomally-integrated SGI1 (**A**), in *E. coli* MG1655::SGI1 (**B**), *E. coli* MG1655::SGI1Δ*sgaDC* (**C**), and in *E. coli* MG1655::SGI1-CΔ*sgaDC* trans-complemented with pAON*sgaDC* (**D**). The derivatives fold changes of gene expression ($2^{-\Delta\Delta CT}$) are shown in Fig. 3D and E. Genes under the control of LexA repressors and AcaDC/SgaDC activators are highlighted in red and green, respectively. Boxes extend from the 25th to 75th percentile of each group's distribution; horizontal inner lines indicate median values; vertical extending lines denote the minimum and maximum values obtained from 3 biological independent experiments, assorted of technical triplicates for each. Statistical significance was determined using multiple *t*-tests with the Holm-Sidak method from the $2^{-\Delta CT}$ values of mRNA gene level to compare with and without mitomycin C treatment. Statistical significance is indicated as follow: ****, P<0.0001; ***, P<0.001; **, P<0.01; *, P<0.05; ns, not significant.

TABLE S1. Strains used in this study

Strain ID	Relevant genotype, resistance profile or characteristics[a]	Reference or source
S. enterica		
Agona 47SA97	SGI1-C; Str, Sul	(1)
Agona 959SA97ΔSGI1	Derivative of 959SA97 cured of SGI1; Amp, Str	(2)
Agona 47SA97 SGI1-CΔ*sgaDC*	SGI1-CΔ*sgaDC*::*kan*; Kan, Str, Sul	This study
Kentucky ST198 11-0799	SGI1^{-}; Nal, Cip	This study
Kentucky ST198 11-0799 SGI1-C	SGI1-C; Nal, Cip, Str, Sul	This study
E. coli		
MG1655	Laboratory K-12 strain	Van Melderen Lab.
MG1655 *lexA3*	MG1655 *lexA3 molB*::Tn*9*, SOS^{OFF}; Chl	Van Melderen Lab.
MG1655 *lexA51*	MG1655 *lexA51 molB*::Tn*9 ΔsulA*, SOS^{ON}; Chl	Van Melderen Lab.
TOP10	F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 nupG recA1 araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *galE15 galK16 rpsL*(Str^{R}) *endA1* λ	Invitrogen
J5-3	K12 derivative *pro met*, plasmid less; Rif	Institut Pasteur
BL21(DE3) pLysS	F– *ompT gal dcm lon hsdSB*(rB–mB–) λ(DE3 [*lacI lacUV5*-T7p07 *ind1 sam7 nin5*]) [*malB*+]K-12(λS) harboring the plasmid pLysS	Invitrogen
MG1655 SGI1-C	MG1655 derivative harbouring SGI1-C from 47SA97; Str, Sul	This study
MG1655 *lexA3* SGI1-C	MG1655 *lexA3* derivative harbouring SGI1-C from 47SA97; Chl, Str, Sul	This study
MG1655 *lexA51* SGI1-C	MG1655 *lexA51* derivative harbouring SGI1-C from 47SA97; Chl, Str, Sul	This study
MG1655 SGI1-C*ΔsgaDC*	MG1655 derivative harbouring SGI1-CΔ*sgaDC*::*kan*; Kan, Str, Sul	This study

[a] antibiotic abbreviations: Amp, ampicillin; Chl, chloramphenicol; Kan, kanamycin;Str, streptomycin; Sul, sulphonamides; Nal, nalidixic acid; Cip, ciprofloxacin; Rif, rifampicin

1. 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.
2. Huguet KT, Gonnet M, Doublet B, Cloeckaert A. 2016. A toxin antitoxin system promotes the maintenance of the IncA/C-mobilizable *Salmonella* Genomic Island 1. Sci Rep 6: 32285.

TABLE S2. Plasmids and vectors used in this study

Plasmid name	Relevant characteristics and antibiotic resistances[a]	Reference[b] or source
Plasmids		
R55	IncC plasmid, *tra*$^+$, 170 kb; Amp, Chl, Gen, Kan, Sul	NC_016976
R16a	IncC plasmid, *tra*$^+$, 173 kb; Amp, Kan, Sul	KX156773
RA1	IncA plasmid, *tra*$^+$, 144 kb; Sul, Tet	FJ705807
Rsa	IncW plasmid, *tra*$^+$, 39 kb; Chl, Kan, Str, Sul	Lab collection
Vectors		
pQF50-Amp	pBR322 derivative containing the promoterless *lacZ* gene; Amp	(1)
pQF50-Chl	pQF50 derivative with the additional insertion of the *cat* gene; Amp Chl	(2)
pMP002	pQF50-Chl containing the promoter region $P_{recN\text{-}Ec}$; Chl	This study
pMP003	pQF50-Chl containing the promoter region P_{sgaDC}; Chl	This study
pMP004	pQF50-Chl containing the promoter region P_{sgiAT}; Chl	This study
pMP007	pQF50-Chl containing the promoter region $P_{recN\text{-}Sal}$; Chl	This study
pMP008	pQF50-Chl containing the promoter region P_{acaDC}; Chl	This study
pMP010	pQF50-Amp containing the promoter region $P_{recN\text{-}Ec}$; Amp	This study
pMP011	pQF50-Amp containing the promoter region P_{sgaDC}; Amp	This study
pMP012	pQF50-Amp containing the promoter region P_{sgiAT}; Amp	This study
pMP016	pQF50-Amp containing the promoter region P_{acaDC}; Amp	This study
pKD4	Derivative pANTSγ, containing an FRT-flanked kanamycin resistance (*kan*); Amp, Kan	(3)
pKD46	Derivative pINT-ts, λ Red recombinase under control of inducible P*araB* promoter; Amp	(3)
pLYS-M1	p15a replication origin; Chl	Addgene #109386 (4)
pAON	pLYS-M1 derivative containing the FRT-flanked kanamycin cassette of pKD4; Chl, Kan	Lab collection
pAON-sgaCD	pLYS-M1 containing the *sgaDC* operon under its native promoter region; Chl, Kan	This study
pET15b	pBR322 derivative for protein expression with N-term His tag; Amp	Novagen
pUA1170	pET15b carrying the *lexA* CDS of *E. coli* MG1655 under T7 promoter, Amp	(5)
pET15b-$lexA_{Salmonella}$	pET15b carrying the *lexA* CDS of *S.* Agona 47SA97 under T7 promoter, Amp	This study

[a] antibiotic abbreviations: Amp, ampicillin; Chl, chloramphenicol; Kan, kanamycin; Gen, gentamicin, Str, streptomycin; Sul, sulphonamides; Tet, tetracyclines. *tra*+, self-conjugative

[b] References:

1. Farinha MA, Kropinski AM. 1990. Construction of broad-host-range plasmid vectors for easy visible selection and analysis of promoters. J Bacteriol 172:3496-3499.
2. Robbe-Saule V, Schaeffer F, Kowarz L, Norel F. 1997. Relationships between H-NS, σ(S), SpvR and growth phase in the control of *spvR*, the regulatory gene of the *Salmonella* plasmid virulence operon. Mol Gen Genet 256:333-347.
3. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci USA. 97:6640-6645.
4. Ceroni F, Boo A, Furini S, Gorochowski TE, Borkowski O, Ladak YN, Awan AR, Gilbert C, Stan GB, Ellis T. 2018. Burden-driven feedback control of gene expression. Nat Methods 15:387-393.
5. Da Re S, Garnier F, Guerin E, Campoy S, Denis F, Ploy MC. 2009 The SOS response promotes *qnrB* quinolone-resistance determinant expression. EMBO Rep 10:929-933.

TABLE S3. Primers used in this study

Primer ID	Sequence 5'-3'[a]	Targeted gene or region	Other characteristics
Promoter activity			
Ec-PrecN-SphI_F	TCATGCATGCAAATCAGTTGCGACAGCCAG	*E. coli recN* promoter	P*recN* cloning into pQF50 vectors
Ec-PrecN-HindIII_R	TGTAAAGCTTATGAAAAACCATTACTGTTATTGTGT	*E. coli recN* promoter	P*recN* cloning into pQF50 vectors
SGI1-PsgaDC-SphI_F	TCATGCATGCCCAAGAAGTTTGTACGAATAGAAC	*sgaDC* promoter of SGI1	P*sgaDC* cloning into pQF50 vectors
SGI1-PsgaDC-HindIII_R	TGTAAAGCTTTTTATTCACTGATTAACTTTGTCATCA	*sgaDC* promoter of SGI1	P*sgaDC* cloning into pQF50 vectors
SGI1-PsgiAT-SphI_F	TCATGCATGCTTAGCGAACGTACCAAGGCG	*sgiAT* promoter of SGI1	P*sgiAT* cloning into pQF50 vectors
SGI1-PsgiAT-HindIII_R	TGTAAAGCTTATAAGACGGGGCAACTTTAC	*sgiAT* promoter of SGI1	P*sgiAT* cloning into pQF50 vectors
Salm-PrecN-SphI_F	TCATGCATGCAGATAGCGCTGCCTATTCAG	*Salmonella recN* promoter	Cloning of P*recN* from 47SA97 or 11-0799 into pQF50 vectors
Salm-PrecN HindIII_R	TGTAAAGCTTGTATGAAAAACCATGACTGTAAT	*Salmonella recN* promoter	Cloning of P*recN* from 47SA97 or 11-0799 into pQF50 vectors
R55-PacaDC-SphI_F	TCATGCATGCTACTCTTTACCTCCAGTTTACCA	*acaDC* promoter of IncC Plasmid	P*acaDC* cloning into pQF50 vectors
R55-PacaDC-HindIII_R	TGTAAAGCTTTTAAACTGCGTTGTTAGCCAT	*acaDC* promoter of IncC Plasmid	P*acaDC* cloning into pQF50 vectors
EMSA			
EMSA-LexASalm-p15b-NdeI_F	TAGCCATATGATGAAAGCGTTAACGGCCAGGC	*Salmonella lexA* ORF	Cloning of *lexA* ORF of *S.* Agona 47SA97 into pET15b
EMSA-LexASalm-p15b-XhoI_R	TCGACTCGAGCTACAACCATTCCCCGTTGCGA	*Salmonella lexA* ORF	Cloning of *lexA* ORF of *S.* Agona 47SA97 into pET15b

EMSA-sgaDCbox_F	ACGCCTCCTGATTAATATGTAACC	*sgaDC* promoter fragment containing the putative LexA binding box	P*sgaDC* probe for EMSA
EMSA-sgaDCbox_R	ACACACCTGATTTATTCACTGA	*sgaDC* promoter fragment containing the putative LexA binding box	P*sgaDC* probe for EMSA
EMSA-sgiATbox_F	TGTTGCTAGGCGATATGGTGT	*sgiAT* promoter fragment containing the putative LexA binding box	P*sgiAT* probe for EMSA
EMSA-sgiATbox_R	AGTTGTTCCGCAGTAGCCAT	*sgiAT* promoter fragment containing the putative LexA binding box	P*sgiAT* probe for EMSA
EMSA-mut-sgaDCbox_F	TAAAAAAACA**AC**T**T**ATTTGGCGTTG CATTATCAAAAAGTCA	*sgaDC* promoter fragment containing the mutated LexA binding box	P*sgaDC** probe for EMSA
EMSA-mut-sgaDCbox_R	AAT**AGT**GTGTTTTTTTACAGTATCAT TTTATGGTGCTATGAAGA	*sgaDC* promoter fragment containing mutated LexA binding box	P*sgaDC** probe for EMSA
EMSA-mut-sgiATbox_F	ACTACAA**ACT**ACTTTATTGTATAAAAT TGGTAAAGTTGCCCCGTC	*sgiAT* promoter fragment containing the mutated LexA binding box	P*sgiAT** probe for EMSA
EMSA-mut-sgiATbox_R	AATAAAGT**AGT**TGTAGTATGACAGG GTTTAAGCACTTAATCC	*sgiAT* promoter fragment containing the mutated LexA binding box	P*sgiAT** probe for EMSA
***sgaCD* mutants**			
Rec-delsgaDC_F	TTAGCATCGCTATTTGCCCTTTTGCG GCATACGCGGATGTATTCAGGCAGG TGTAGGCTGGAGCTGCTTC	*sgaDC*	Deletion of *sgaDC* in *S.* Agona 47SA97
Rec-delsgaDC_R	TAGTTTCAATCAATCTGGGCCGCAGA AAAAAAGGTAAGGAGGACTACTGAC ATATGAATATCCTCCTTAG	*sgaDC*	Deletion of *sgaDC* in *S.* Agona 47SA97

Clon-sgaDC-pAON_F	TAAACTCTAGAAGCGGCCGCTGGATAATGCTATGTCGCTCTCTCA	*sgaDC* operon with its native promoter region	Cloning of the *sgaDC* operon into pAON vector
Clon-sgaDC-pAON_R	AATTCGTGAGCTCAGATATCCGTTCAGAAATGCAAATCTTCA	*sgaDC* operon with its native promoter region	Cloning of the *sgaDC* operon into pAON vector
qPCR			
RT_SgaD_F	ACTGAGGAAGCAAGACCAGAAG	*sgaD*	Efficiency=105.2%, r^2=0.994
RT_SgaD_R	GACGCAGCGTACTGGCTAT	*sgaD*	Efficiency=105.2%, r^2=0.994
RT_SgaC_F	GTACAGCCTGCGAACTTGC	*sgaC*	Efficiency=96.9%, r^2=0.995
RT_SgaC_R	TGGTTCGTTATCTCGCTGGG	*sgaC*	Efficiency=96.9%, r^2=0.995
RT_SgiA_F	GTGCACCTCGTTGAGTTCCTA	*sgiA*	Efficiency=96.8%, r^2=0.998
RT_SgiA_R	GGGAGAGACTGCTGCAAAGT	*sgiA*	Efficiency=96.8%, r^2=0.998
RT_SgiT_F	GGGATCATTGTTGCCTTGCG	*sgiT*	Efficiency=104.1%, r^2=0.996
RT_SgiT_R	AGGACTTGCAGCATTTGGGA	*sgiT*	Efficiency=104.1%, r^2=0.996
RT_IntSGI1_F	GCCGTCAAGCTTATGGGAGA	int_{SGI1}	Efficiency=98.2%, r^2=0.997
RT_IntSGI1_R	GCCCAGTGTAGCAAAGCAAC	int_{SGI1}	Efficiency=98.2%, r^2=0.997
RT_RepSGI1_F	ACCACAACGCCTCTCAAACT	rep_{SGI1}	Efficiency=100.3%, r^2=0.994
RT_RepSGI1_R	ACCCTCGCCCAATGATTTCA	rep_{SGI1}	Efficiency=100.3%, r^2=0.994
RT_Xis_F	CGCCTCATCGACGGTAAGAT	*xis*	Efficiency=100.9%, r^2=0.997
RT_Xis_R	ACTGGCTCAGGTCGTTGAAA	*xis*	Efficiency=100.9%, r^2=0.997
RT_TraN_F	GCGCGCATCACCAAAGTTAA	*traN*	Efficiency=95.7%, r^2=0.995
RT_TraN_R	CGAGGAGCGAGAGTCCTATTG	*traN*	Efficiency=95.7%, r^2=0.995
RT_TraH1_F	ACGGCGTTGTGTCTCATGAA	*traH*	Efficiency=99%, r^2=0.994
RT_TraH1_R	CTTCTCTGTCGTCGCCACTC	*traH*	Efficiency=99%, r^2=0.994
RT_S018b_F	GCCATCAACCTAGAGTCTCCG	S018	Efficiency=107.7%, r^2=0.996
RT_S018b_R	GGAACCTATTACAGCGCGTTC	S018	Efficiency=107.7%, r^2=0.996
RT_TraG_F	TGAACAAACTCAGCCGCCTT	*traG*	Efficiency=99.2%, r^2=0.998
RT_TraG_R	TCTTTCAGAGGCAGCACAGG	*traG*	Efficiency=99.2%, r^2=0.998
RT_IntI1_F	GCCAAGCTCTCGGGTAACAT	*intI1*	Efficiency=100.8%, r^2=0.992
RT_IntI1_R	CAACTGCGGGTCAAGGATCT	*intI1*	Efficiency=100.8%, r^2=0.992
RT_RecNEc_F	CAGCCCGGAGAGTTTGAACA	*E. coli recN*	Efficiency=97%, r^2=0.995

RT_RecNEc_R	GTCTTCACCGTCGGCCATTA	*E. coli recN*	Efficiency=97%, r^2=0.995
RT_LexAEc_F	CGCGGCTGAAGAACATCTGA	*E. coli lexA*	Efficiency=101.8%, r^2=0.995
RT_LexAEc_R	GCAACCCTTCTTCCTCTTCCT	*E. coli lexA*	Efficiency=101.8%, r^2=0.995
RT_RecAEc_F	AATCGGCGACTCTCACATGG	*E. coli recA*	Efficiency=101.8%, r^2=0.998
RT_RecAEc_R	AAGATCAGCAGCGTGTTGGA	*E. coli recA*	Efficiency=101.8%, r^2=0.998
RT_MdHEc_F	CGGTTATTGGCGGTCACTCT	*E. coli mdH*	Efficiency=103.5%, r^2=0.999
RT_MdHEc_R	CGTTCTGGATGCGTTTGGTC	*E. coli mdH*	Efficiency=103.5%, r^2=0.999
RT_RecNSalm_F	ATCTCGCCCATCACCAACAA	*Salmonella recN*	Efficiency=103.7%, r^2=0.994
RT_RecNSalm_R	CCGGCCTGCGGATTAAAGT	*Salmonella recN*	Efficiency=103.7%, r^2=0.994
RT_LexASalm_F	CGCGAGGTATCCGTCTGTTA	*Salmonella lexA*	Efficiency=103.4%, r^2=0.996
RT_LexASalm_R	CGACCTGGTAATGGCCTTCA	*Salmonella lexA*	Efficiency=103.4%, r^2=0.996
RT_RecASalm_F	TTAAGCAGGCCGAGTTCCAG	*Salmonella recA*	Efficiency=103.2%, r^2=0.999
RT_RecASalm_R	CCCGCTTTCTCGATCAGCTT	*Salmonella recA*	Efficiency=103.2%, r^2=0.999
RT_MdHSalm_F	CTGCTGGTGGTATCGGTCAG	*Salmonella mdH*	Efficiency=99.2%, r^2=0.99
RT_MdHSalm_R	GGAGTCACTGGAGCGATGTC	*Salmonella mdH*	Efficiency=99.2%, r^2=0.99
RT_RpoA_F	GGAAGAAGATGAGCGCCCAA	*rpoA* of *E. coli* and *Salmonella*	*E. coli*: Efficiency=97.2%, r^2= 0.998 / *Salmonella*: Efficiency=97.2%, r^2=0.996
RT_RpoA_R	CGCGCTGCTTCAACATTGTA	*rpoA* of *E. coli* and *Salmonella*	*E. coli*: Efficiency=97.2%, r^2= 0.998 / *Salmonella*: Efficiency=97.2%, r^2=0.996
qAttBvide-Ec_F	GCGAAATCACCGGGGAATTT	*E. coli attB*	Efficiency=82.4%, r^2=0.998
qAttBvide-Ec_R	GGTTGAGGAATAACAGGAGTGGT	*E. coli attB*	Efficiency=82.4%, r^2=0.998
qAttPcir_F	TGTGATTGGTAAGTTTTACTCCACA	SGI1 *attP*	Efficiency=90.4%, r^2=0.994
qAttPcir_R	GCAAAACGGAGCAAAATCGTG	SGI1 *attP*	Efficiency=90.4%, r^2=0.994

[a] Restriction sites are indicated in red with adjacent sequences in blue. Bold nucleotides correspond to mutated sites (CTG to AGT) in LexA binding boxes (see FIG S2). Underlined nucleotides represent homologous regions for gene inactivation using the Datsenko and Wanner method.

Marine C. PONS

Rôle de la réponse SOS dans le transfert conjugatif et le maintien dans le génome de *Salmonella* Genomic Island 1

Résumé

Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) est un élément intégratif mobilisable porteur de gènes de résistance aux antibiotiques et spécifiquement mobilisé en trans par les plasmides conjugatifs des familles IncC et IncA. SGI1 détourne le système de conjugaison des plasmides pour sa mobilisation malgré l'incompatibilité observée lorsque SGI1 et les plasmides IncC sont présents dans la même cellule. Cette incompatibilité est causée par la réplication transitoire de SGI1 impliquant des facteurs issus des plasmides IncC mais également des activateurs transcriptionnels SgaDC de SGI1. SgaDC sont des homologues fonctionnels d'AcaDC, activateurs transcriptionnels centraux des plasmides IncC. Contrairement à *acaDC*, la régulation de l'expression de *sgaDC* n'a pas été caractérisée à ce jour.

Nous avons identifié la présence de plusieurs sites potentiels de fixation de la protéine LexA sur SGI1 et notamment dans la région promotrice putative de *sgaDC* suggérant une possible régulation de l'expression de *sgaDC* par la réponse SOS. L'objectif de ces travaux de thèse était d'étudier le rôle de la réponse SOS dans les interactions moléculaires entre SGI1 et les plasmides IncC.

En premier lieu, l'activation de la réponse SOS dans les cellules receveuses a été mise en évidence lors de l'entrée par conjugaison des plasmides IncC. Après avoir confirmé la fonctionnalité du site de fixation de LexA dans la région promotrice de *sgaDC*, nous avons démontré que l'induction de la réponse SOS active la transcription de *sgaDC* et par conséquent du régulon de gènes sous son contrôle. Finalement, via une méthode originale de conjugaison tripartite, l'implication de la réponse SOS a été démontrée dans la chronologie du transfert conjugatif de SGI1 et du détournement du système de conjugaison des plasmides IncC.

Mots-clés : SGI1, plasmides IncC, réponse SOS, IME, EGM

Abstract

Salmonella Genomic Island 1 (SGI1) is a multidrug resistance integrative mobilizable element specifically mobilized in trans by IncC and IncA conjugative plasmids. SGI1 hijacks the IncC conjugation apparatus to be mobilized. However, these mobile elements are incompatible in bacterial population. This incompatibility is caused by SGI1 transient replication that involves, besides IncC/IncA factors, the SGI1 transcriptional activators SgaDC. SgaDC are functional homologues of the IncC master activator AcaDC proteins. Unlike *acaDC*, the regulation of *sgaCD* expression has not yet been characterized.

The identification of LexA binding motifs on SGI1, especially in the putative promoter region of *sgaDC*, suggested it may constitute a SOS response-regulated operon. Moreover, plasmid entry by conjugation as single-strand DNA in recipient bacteria is known to transiently activates the SOS response. The objective of the present work is to study the role of the SOS response in the molecular interactions between SGI1 and IncC plasmids.

We demonstrated that conjugative entry of IncC/IncA plasmids activates the SOS response in recipient cells. Through different molecular experiments, we confirmed that the LexA binding site in the *sgaDC* promoter region is functional, resulting in the control of its expression by the SOS response. Subsequently, several SGI1 genes implicated in its transfer and maintenance are induced in a SgaDC-dependent manner. Finally, we developed an original tripartite conjugation assay to decipher the role of the SOS response in the chronology of the SGI1 conjugative transfer and hijacking of the IncC conjugation system.

Keywords: SGI1, IncC plasmids, SOS response, IME, MGE