

DANIELLE DOUCET

**CARACTÉRISATION DES INTERACTIONS ENTRE L'INTÉGRASE *IntI4* DE
VIBRIO CHOLERAE ET LES SITES DE RECOMBINAISON *attI4* ET *attC*.**

**Mémoire
présenté
à la Faculté des études supérieures
de l'Université Laval
pour l'obtention
du grade de maître ès sciences (M.Sc.)**

**Département de biochimie et de microbiologie
FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE
UNIVERSITÉ LAVAL**

OCTOBRE 2000

©Danielle Doucet, 2000



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*

Our file *Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-55749-9

Canada

RÉSUMÉ

Les intégrons sont des éléments génétiques qui permettent aux bactéries de capturer des gènes par un système de recombinaison spécifique de site. Ce système comprend un gène d'intégrase et le site d'intégration *attI*.

Le but de cette étude est de caractériser les interactions entre l'intégrase IntI4 de *Vibrio cholerae* et les sites de recombinaison *attI4* et *attC*. Aussi, les interactions entre IntI1 et *attI4* sont étudiées.

IntI4 a été purifiée comme protéine de fusion avec la protéine liant le maltose. Cette protéine a été utilisée dans des expériences de gels de retardement. IntI4 forme sept complexes avec *attI4*, six avec *attI1* et sept ou plus avec un *attC* de *V. cholerae*. Quant aux interactions de IntI1 avec *attI4*, six complexes se forment. Ces résultats indiquent que IntI4 et IntI1 ont de multiples sites de liaison sur les sites de recombinaison testés. Des sites de liaison possibles sont proposés.

Danielle Doucet, étudiante.

Paul H. Roy, directeur.

AVANTS PROPOS

Je désire remercier toutes les personnes qui m'ont appuyé au long de mes travaux de maîtrise. Parmi ceux-ci:

- ◆ Le Dr Paul H. Roy pour m'avoir permis de poursuivre mes travaux de maîtrise dans son laboratoire et pour avoir partagé ses idées et ses conseils.
- ◆ Les Drs Sylvain Moineau, Barbara Papadopoulou et Lindsay Eltis, pour m'avoir conseillé dans mes travaux en tant que membres de mon comité aviseur.
- ◆ Les membres de l'équipe de recherche du Dr Paul H. Roy, plus particulièrement Nancy Messier, François Drouin, France Gagnon et Dominic Bernard, pour leurs conseils et leurs encouragements.
- ◆ Ma famille et mes amis, pour leurs encouragements, leur intérêt et leur compréhension.
- ◆ Le Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie pour son appui financier.

Un gros merci,
Danielle Doucet

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
AVANTS PROPOS.....	ii
LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
CHAPITRE I: INTRODUCTION.....	1
1.1. LE TRANSFERT HORIZONTAL DE GÈNES.....	1
1.2. L'INTÉGRON.....	3
1.2.1. L'HISTORIQUE DES INTÉGRONS.....	3
1.2.2. LES INTÉGRONS DE CLASSE 1.....	4
1.2.2.1. <i>Le segment 5'-conservé.</i>	7
1.2.2.2. <i>Le segment 3'-conservé.</i>	8
1.2.2.3. <i>La région variable.</i>	10
1.2.3. EXPRESSION DES CASSETTES.....	13
1.2.4. INTÉGRONS DE CLASSE 2.....	14
1.2.5. INTÉGRONS DE CLASSE 3.....	14
1.2.6. INTÉGRONS DE CLASSE 4.....	17
1.2.7. LES ÉLÉMENTS ATT ^C	21
1.2.8. LA MOBILITÉ DES CASSETTES.....	25
1.2.9. ORIGINES DES CASSETTES.....	28
1.2.10. ORIGINE DES INTÉGRONS.....	28
1.3. LA RECOMBINAISON.....	31
1.3.1. LA RECOMBINAISON SPÉCIFIQUE DE SITE CONSERVATIVE.....	31
1.3.2. LES RECOMBINASES SPÉCIFIQUES DE SITE CONSERVATIVES.....	32
1.3.2.1. <i>La famille de résolvasés/invertases.</i>	33
1.3.2.2. <i>La famille des intégrases (tyrosine recombinases).</i>	35
1.4. OBJECTIFS.....	51
CHAPITRE II: MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	52
2.1. SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES.....	52
2.2. MILIEUX DE CULTURE.....	52
2.3. CLONAGES.....	53
2.3.1. PURIFICATION D'ADN GÉNOMIQUE.....	53

2.3.2. CLONAGE DE LA PREMIÈRE CASSETTE DU SUPER INTÉGRON DE <i>V. CHOLERAE</i>	54
2.3.2.1. L'amplification de l'insert d'ADN.....	54
2.3.2.2. Digestions.....	57
2.3.2.3. Ligature et transformation.	58
2.3.3. CLONAGE DU GÈNE <i>INT14</i> DANS LE VECTEUR PMAL™-c2.....	58
2.3.3.1. Amplification de l'insert d'ADN.....	59
2.3.3.2. Digestions enzymatiques.....	59
2.3.3.3. Ligature et transformation.....	60
2.4. TEST D'EXCISION <i>IN VIVO</i> DE <i>INT14</i> ET LA MBP-<i>INT14</i>.....	61
2.5. SURPRODUCTION ET PURIFICATION DE LA MBP-<i>INT14</i>.....	62
2.5.1. SURPRODUCTION.....	62
2.5.2. PURIFICATION.....	63
2.6. ANALYSE DE LA SURPRODUCTION PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL SDS-PAGE.....	63
2.6.1. PRÉPARATION DU GEL.....	63
2.6.2. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS.....	64
2.6.3. ÉLECTROPHORÈSE ET COLORATION DU GEL.....	64
2.7. IMMUNOADSORPTION.....	65
2.8. GELS DE RETARDEMENT.....	66
2.8.1. PRÉPARATION DU GEL.....	66
2.8.2.1. Préparation de sondes d'ADN.....	67
2.8.3. PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS ET MIGRATION SUR GEL.....	68
2.9. INTERFÉRENCES PAR MÉTHYLATION.....	69
2.9.1. MODIFICATION AU DMS.....	71
2.9.2. GEL DE RETARDEMENT ET ÉLECTRO-ÉLUTION.....	71
2.9.3. COUPURE DE L'ADN PAR LA PIPÉRIDINE.....	74
2.9.4. GEL DE SÉQUENÇAGE.....	74
2.10. INTERFÉRENCES AU PERMANGANATE DE POTASSIUM.....	75
2.11. DÉTERMINATION DES SITES DE LIAISON D'<i>INT14</i> PAR GEL DE RETARDEMENT AVEC UNE POPULATION MIXTE DE FRAGMENTS <i>ATT14</i>..	76
CHAPITRE III: RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	79
3.1. LES CLONES PLQ661 ET PLQ641.....	79
3.2. PURIFICATION DE LA MBP-<i>INT14</i>.....	80
3.3. TESTS D'EXCISION <i>IN VIVO</i> DE <i>INT14</i> ET LA MBP-<i>INT14</i>.....	83
3.3.1. TESTS D'EXCISION <i>IN VIVO</i> DE <i>INT14</i>	83
3.3.2. TEST D'ACTIVITÉ <i>IN VIVO</i> DE LA MBP- <i>INT14</i>	86
3.4. GELS DE RETARDEMENT.....	88

3.4.1. INTERACTIONS ENTRE MBP-INTI4 ET LE SITE ATT4.....	88
3.4.2. INTERACTIONS ENTRE MBP-INTI4 ET LE SITE ATT C.....	97
3.4.3. INTERACTIONS ENTRE MBP-INTI1 ET LE SITE ATT4.....	101
3.5. AFFINITÉ RELATIVE D'INTI1 ET INTI4 POUR LES SITES DE RECOMBINAISON.....	103
3.6. INTERFÉRENCES.....	104
3.7. DÉTERMINATION DES SITES DE LIAISON D'INTI4 PAR GEL DE RETARDEMENT AVEC UNE POPULATION MIXTE DE FRAGMENTS ATT4.....	106
CHAPITRE IV: CONCLUSION.....	108
RÉFÉRENCES.....	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Éléments génétiques mobiles impliqués dans le transfert horizontal de gènes	2
Tableau 2. Les promoteurs d'intégrons P1 et P2.....	14
Tableau 3. Groupes d' <i>attC</i> apparentés	22
Tableau 4. Séquences d'ADN des sites de recombinaison Xer	43
Tableau 5. Caractéristiques de quelques-unes des intégrases.	46
Tableau 6. Identité et similarité des intégrases d'intégrons.	47
Tableau 7. La description des plasmides utilisés.....	53
Tableau 8. Séquences des oligos utilisés.....	56
Tableau 9. Les variables dans les PCR des différentes sondes.....	68
Tableau 10. La description des cassettes utilisées dans les tests d'excision et les longueurs possibles des amplicons avec les oligos pACYC184 5' et pACYC184 3'.....	84

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Structure d'un intégron de classe 1.	6
Figure 2. Les séquences voisines au segment 3'-conservé de quelques intégrons. .	9
Figure 3. Quelques intégrons de classe 1, dont la région variable varie en longueur et en composition.	11
Figure 4. Les intégrons de classe 2.	15
Figure 5. Un intégron de classe 3.	16
Figure 6. Le gène <i>IntI4</i> de <i>Vibrio cholerae</i> et quelques cassettes du super-intégron.	20
Figure 7. Alignement de séquences d' <i>attC</i>	24
Figure 8. Modèle de l'intégration et de l'excision d'une cassette dans un intégron.	27
Figure 9. Hypothèse de l'origine de l'intégron de classe 1.	30
Figure 10. Mécanisme de recombinaison des résolvases.	34
Figure 11. Modèle courant du mécanisme de recombinaison spécifique de site des tyrosines recombinases.	37
Figure 12. La séquence des sites de recombinaison <i>attP</i> et <i>attB</i> du système de recombinaison du bactériophage λ	40
Figure 13. Sites de liaison de l'intégrase du bactériophage λ et de ses protéines accessoires.	41
Figure 14. Le système de recombinaison FLP.	45
Figure 15. Les séquences d' <i>attI1</i> , <i>attI2</i> , <i>attI3</i> et <i>attI4</i>	50
Figure 16. Les plasmides pLQ641 et pLQ661.	55
Figure 17. Principe de l'interférence au DMS et au KMnO_4	70
Figure 18. Schéma de l'électo-élution de l'ADN du gel d'acrylamide.	73
Figure 19. Principe de l'usage d'une population de fragments <i>attI4</i> pour déterminer les sites de liaison d' <i>IntI4</i>	78

Figure 20. SDS-PAGE de la protéine de fusion MBP-IntI4 et immunoadsorption de la MBP sur les extraits purifiés et non-purifiés de la MBP-IntI4.	82
Figure 21. Électrophorèse des produits PCR obtenus avec les oligonucléotides pACYC184 5' et pACYC184 3' et d'une préparation d'ADN d'une culture avant et après l'induction d'IntI4.....	85
Figure 22. Électrophorèse des produits PCR obtenus avec les oligonucléotides pACYC184 5' et pACYC184 3'.	87
Figure 23. Fragments d'ADN couvrant les sites <i>attI4</i> et <i>VCR2</i>	89
Figure 24. Liaison de la MBP-IntI4 au fragment <i>attI4</i> -long.....	90
Figure 25. Liaison de la MBP-IntI4 aux fragments <i>attI4</i> -5' et <i>attI4</i> -3'.	92
Figure 26. Liaison de la MBP-IntI4 au fragment et <i>attI4</i> -3'(DdeI).....	93
Figure 27. Sites de liaison IntI4- <i>attI4</i> proposés.....	96
Figure 28. Liaison de la MBP-IntI4 aux fragments <i>VCR2</i> -5' et <i>VCR2</i> -3'.	99
Figure 29. Sites de liaison IntI4- <i>VCR2</i> proposés.	100
Figure 30. Liaison de la MBP-IntI1 aux fragments <i>attI4</i> -long et <i>attI4</i> -5'.....	102

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. LE TRANSFERT HORIZONTAL DE GÈNES.

La génération de la diversité par mutation est un processus très lent et limité. La capacité d'obtenir de nouveaux gènes d'une source externe est donc un moyen très efficace de diversification. Ce processus de transfert horizontal de gènes, qui peut avoir lieu de plusieurs façons, est critique pour l'adaptation et l'évolution de bactéries. En une seule étape, une bactérie peut acquérir de nouvelles capacités et ainsi profiter du succès d'évolution d'une autre bactérie.

Il est bien connu que le transfert horizontal de gènes chez les bactéries est le mécanisme responsable de la distribution répandue des gènes de résistance aux antibiotiques, des amas de gènes codant des voies de biodégradation ainsi que les déterminants de virulence (Tableau 1). Le fait qu'un bon nombre de déterminants de virulence sont sur des éléments mobiles ou sont fixés au chromosome mais démontrent des vestiges d'éléments mobiles suggèrent que les chromosomes sont des "nécropoles génétiques" de gènes qui étaient auparavant mobiles. Il a même été démontré qu'environ 17% des génomes d'*E. coli* et de *Salmonella* semblent avoir été acquis pendant les 100 millions dernières années (Lawrence et Ochman, 1998).

Tableau 1. Éléments génétiques mobiles impliqués dans le transfert horizontal de gènes. Les sources de transfert horizontal les plus connues sont les plasmides, les bactériophages, les transposons et les cassettes d'intégrons. (Adapté de: de la Cruz et Davies, 2000).

Éléments mobiles	Caractéristiques générales	Exemples
Cassette d'intégron	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Mobilité de gènes seuls. ◆ Expression constitutive. ◆ Étendue d'hôtes extrêmement diversifiée. 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Cassette <i>cmlA</i>: Résistance au chloramphénicol. ◆ Cassette <i>sto</i>: Production d'une entérotoxine thermostable.
Transposon	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Mobilité de gènes et d'opérons. ◆ Étendue d'hôtes très diversifiée. 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Tn21: Résistance aux antibiotiques. ◆ Tn4651: Dégradation du toluène.
Plasmide	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Mobilité d'opérons et de régulons. ◆ Expression réglée et immédiate. ◆ Étendue d'hôtes très diversifiée. 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ pNGR234a: Plasmide de nodulation chez <i>Rhizobium</i>. ◆ pCD1: Déterminants de virulence chez <i>Yersinia</i>. ◆ pNL1: Dégradation de composés aromatiques.
Bactériophage	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Mobilité de régulons. ◆ "Maturation" dans le chromosome (via lysogénie). ◆ Étendue d'hôtes peu diversifiée. 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ CTXϕ: Phage de virulence chez <i>Vibrio cholerae</i>.

L'émergence et la dissémination de la résistance aux antibiotiques se produisent, peu à peu, depuis l'introduction des antibiotiques comme agents thérapeutiques. Cette résistance est principalement le résultat de l'acquisition de nouveaux gènes plutôt que la mutation de gènes. Il a d'abord été démontré que les bactéries résistantes transportaient des plasmides qui pouvaient transmettre la résistance à des bactéries qui étaient auparavant sensibles à l'antibiotique. Ensuite, les transposons ont été découverts. Ces éléments mobiles permettent le transfert de gènes de résistance d'une molécule d'ADN (chromosome ou plasmide) à l'autre. Si le transfert se fait dans un plasmide et que celui-ci est conjugal ou mobilisable, les gènes de résistance peuvent être déplacés dans d'autres organismes. Les

plasmides et les transposons forment donc une puissante combinaison dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. Finalement, il a été déterminé qu'une très grande proportion des gènes de résistance aux antibiotiques dans les organismes Gram-négatifs forment des petits éléments génétiques mobiles qu'on appelle cassettes d'intégron.

1.2. L'INTÉGRON.

1.2.1. L'histoire des intégrons.

Au début des années 1980, des études de cartographie de restriction et des analyses d'hétéroduplexes ont démontrées que différents ensembles de gènes de résistance aux antibiotiques étaient parfois retrouvés à des sites de plasmides (Ward et Grinsted, 1982) ou de transposons (Meyer et al., 1983; Tanaka et al., 1983) qui étaient autrement apparentés. Au fur et à mesure que les séquences de gènes de résistance ont été déterminées, il a été remarqué que plusieurs d'entre eux étaient flanqués par des séquences identiques d'environ 59-pb (Cameron et al., 1986; Hall et Vockler, 1987; Ouellette et al., 1987). Il y avait quelque temps, l'hypothèse était que ces séquences flanquantes de 59-pb étaient des "points chauds" de recombinaison qui permettaient l'insertion de gènes de résistance (Cameron et al., 1986; Fling et al., 1985; Schmidt 1984; Schmitt et al., 1985). De plus, une comparaison des cartes de restrictions des régions pertinentes du transposon Tn21 et des plasmides R388 et R46 a permis de définir un élément d'ADN composé de deux segments conservés, séparés par un ou plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques (Stokes et Hall, 1989). L'existence de ces deux segments conservés dans trois lieux différents a soulevé la possibilité qu'ensemble, ils formaient un élément mobile (Hall et Vockler, 1987). Après le séquençage du

segment 5'-conservé, trois cadres de lecture ouverts (ORFs) ont été identifiés: *orf1* et *orf2* sur un brin et *orf3* sur le brin complémentaire (Hall et Vockler, 1987). Il a ensuite été démontré que le transposon Tn21, contenant cet élément, encodait un système de recombinaison spécifique de site indépendant de RecA (Martinez et de la Cruz, 1988). Le gène d'une enzyme devait donc se trouver dans cet élément afin de catalyser la réaction de recombinaison. Ouellette et Roy (1987) ont déterminé que le produit de l'*orf3* était apparenté aux enzymes de recombinaison spécifique de site de la famille des intégrases (Argos et al., 1986). Finalement, Stokes et Hall (1989) ont défini une nouvelle famille d'éléments d'ADN potentiellement mobile, nommés "intégrons", qui sont composés des deux segments conservés séparés par une région variable.

Toutefois, cette définition s'applique plutôt aux intégrons de classe 1. Suite à l'identification des autres classes d'intégrons, la définition d'un intégron a dû être élargie. On définit maintenant les intégrons comme des éléments qui contiennent les déterminants génétiques des composants d'un système de recombinaison spécifique de site qui reconnaît et capture des cassettes de gènes mobiles. Un intégron inclut donc un gène d'intégrase *int* et le site de recombinaison adjacent, *attI* (Hall et Collis, 1995).

1.2.2. Les intégrons de classe 1.

La plupart des intégrons connus et étudiés sont des intégrons de classe 1. Ceux-ci se retrouvent, dans la plupart des cas, chez les enterobacteriaceae, *Pseudomonas* et *Acinetobacter*. Il existe toutefois deux cas où des intégrons ont été identifiés chez des bactéries à Gram-positif : *Corynebacterium* (Nesvera et al., 1998) et *Enterococcus* (Kazama et al., 1998). La plupart des intégrons de classe 1 connus se trouvent dans le transposon Tn402 ou, dans la plupart des cas, dans un dérivé tronqué de ce dernier (Radström et al., 1994; Shapiro et al., 1977; Tolmasky, 1990; Tosini et al., 1998). Ceux-ci résident habituellement dans un plasmide ou à

l'intérieur d'un transposon du type Tn21 ou semblable (Grinsted et al., 1990). Dans quelques cas, des intégrons ont été identifiés dans des chromosomes bactériens (Arcangioli et al., 1999; Falbo et al., 1999; Poirel et al., 1999).

Une étude détaillée de plasmides à différents groupes d'incompatibilité a démontré que les intégrons de classe 1 se trouvent sur des éléments qui débutent et se terminent avec une séquence répétée inversée de 25-pb (Brown et al., 1986; Rådström et al., 1994). Étant donné que les intégrons se trouvent à une très grande variété d'endroits, on croit que les intégrons se trouvent ou se sont déjà trouvés sur des éléments mobiles.

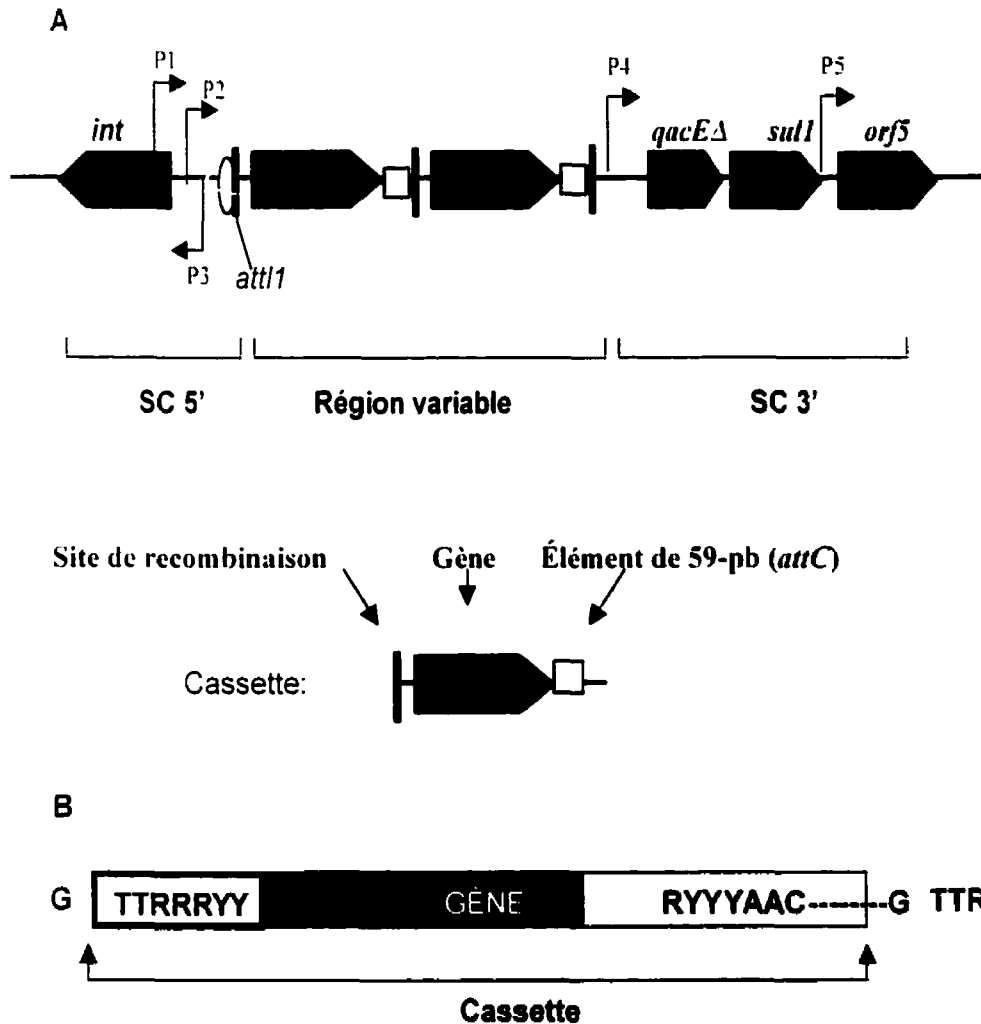


Figure 1. Structure d'un intégron de classe 1. **A.** Le segment 5'-conservé contient le gène d'intégrase d'intégron *intI1* et le site de recombinaison *attI1*. Le segment 3'-conservé contient, en général, les gènes *qacEΔ1*, *sull* et *orf5*. La région variable contient habituellement des cassettes. Les promoteurs (P) sont aussi indiqués. **B.** Une cassette d'intégron. Les flèches verticales indiquent la position des sites de recombinaison. L'élément de 59-pb (*attC*) de la cassette est en jaune. Les tirets représentent la région centrale de l'élément de 59-pb. Le G de la cassette (ou le site *attI*) en amont et le TTRRRY au début de la cassette (ou le segment 3'-conservé) en aval sont indiqués.

1.2.2.1. Le segment 5'-conservé.

Le segment 5'-conservé inclut le gène d'une recombinase spécifique de site (Ouellette et Roy, 1987), le promoteur du gène d'intégrase (P3), deux promoteurs (P1 et P2) pour les gènes de la région variable et un site de recombinaison (*attI1*) (Fig. 1A).

Le gène de la recombinase spécifique de site, *intI1*, code une protéine de 337 acides aminés (Hall et Vockler, 1987) qui est membre de la famille d'intégrases (Argos et al., 1986). Cette protéine, IntI1, est responsable de l'intégration et l'excision de cassettes par un mécanisme de recombinaison spécifique de site (Collis et Hall, 1992).

Le site *attI1* est le site d'intégration de nouvelles cassettes. Ce site est adjacent au gène *intI1* de l'intégron et délimite le segment 5'-conservé par le site de recombinaison proprement dit, GTTRRRY (Recchia et al., 1994). Contrairement aux sites *attC* (Section 1.2.7), le site *attI1* est non palindromique. En produisant des mutations ponctuelles dans le site *attI1*, le site d'enjambement a été identifié entre le G et le T du site de recombinaison (Hansson et al., 1997; Stokes et al., 1997). Afin de déterminer la longueur du site nécessaire à la recombinaison spécifique de site, Recchia et al. (1994) ont fait des études de délétion qui ont démontré que la séquence nécessaire à l'activité maximale correspondait aux 40 à 70 derniers nucléotides du segment 5'-conservé. Dans une étude plus récente, des délétions progressives ont démontré l'étendue du site *attI1* et deux régions importantes ont été identifiées. Une région de 27 à 36-pb en amont du site d'enjambement influence la recombinaison avec *attC* seulement, tandis que les 9 à 14-pb en amont du site d'enjambement sont importantes à la recombinaison avec un autre *attI1* ou un *attC* (Hansson et al., 1997). Lorsque le triplet GTT du site de recombinaison est supprimé de la séquence *attI1*, aucune recombinaison n'est possible (Hansson et al., 1997). Quant aux nucléotides en aval du site de recombinaison, il a été

déterminé que les dix premiers nucléotides sont essentiels à la recombinaison (Hansson et al., 1997).

1.2.2.2. Le segment 3'-conservé.

Le segment 3'-conservé se trouve dans la plupart des intégrons de classe 1. Il inclut un gène de résistance aux composés aminés quaternaires (*qacEΔ1*), un gène de résistance aux sulfamidés (*sul1*) ainsi qu'un cadre de lecture ouvert (*orf5*) (Bissonnette et Roy, 1992; Paulsen et al., 1993; Stokes et Hall, 1989) (Fig. 1A).

Le gène *qacEΔ1*, n'offrant qu'une résistance faible, est la version tronquée du gène *qacE*. La version complète a été trouvée dans Tn402, un intégron de classe 1 n'ayant pas de segment 3'-conservé comme les autres intégrons (Paulsen et al., 1993). La mutation du gène *qacE*, formant le gène *qacEΔ1*, a probablement eu lieu suite à l'insertion d'un segment d'ADN contenant les gènes *sul1* et *orf5* (Bissonnette et Roy, 1992). L'*orf5*, situé en aval du gène *sul1*, code un produit peptidique qui ressemble à une puromycine acétyltransférase de *Streptomyces alboniger* (Bissonnette et Roy, 1992).

La séquence en aval du segment 3'-conservé n'est pas bien conservée (Fig. 2). Généralement, on y retrouve des séquences d'insertion, des gènes de transposition (complets ou tronqués) ainsi que la même séquence répétée inversée de 25-pb qu'on retrouve en amont du segment 5'-conservé (Brown et al., 1996; Hall et al., 1994; Radstrom et al., 1994). Les gènes de transposition (*tniA*, *tniB*, *tniQ* et *tniR*) sont semblables à ceux du transposon Tn5053, qui nécessite le produit de ces gènes pour être compétent (Kholodii et al., 1995). On croit donc que la plupart des intégrons sont des transposons défectueux.

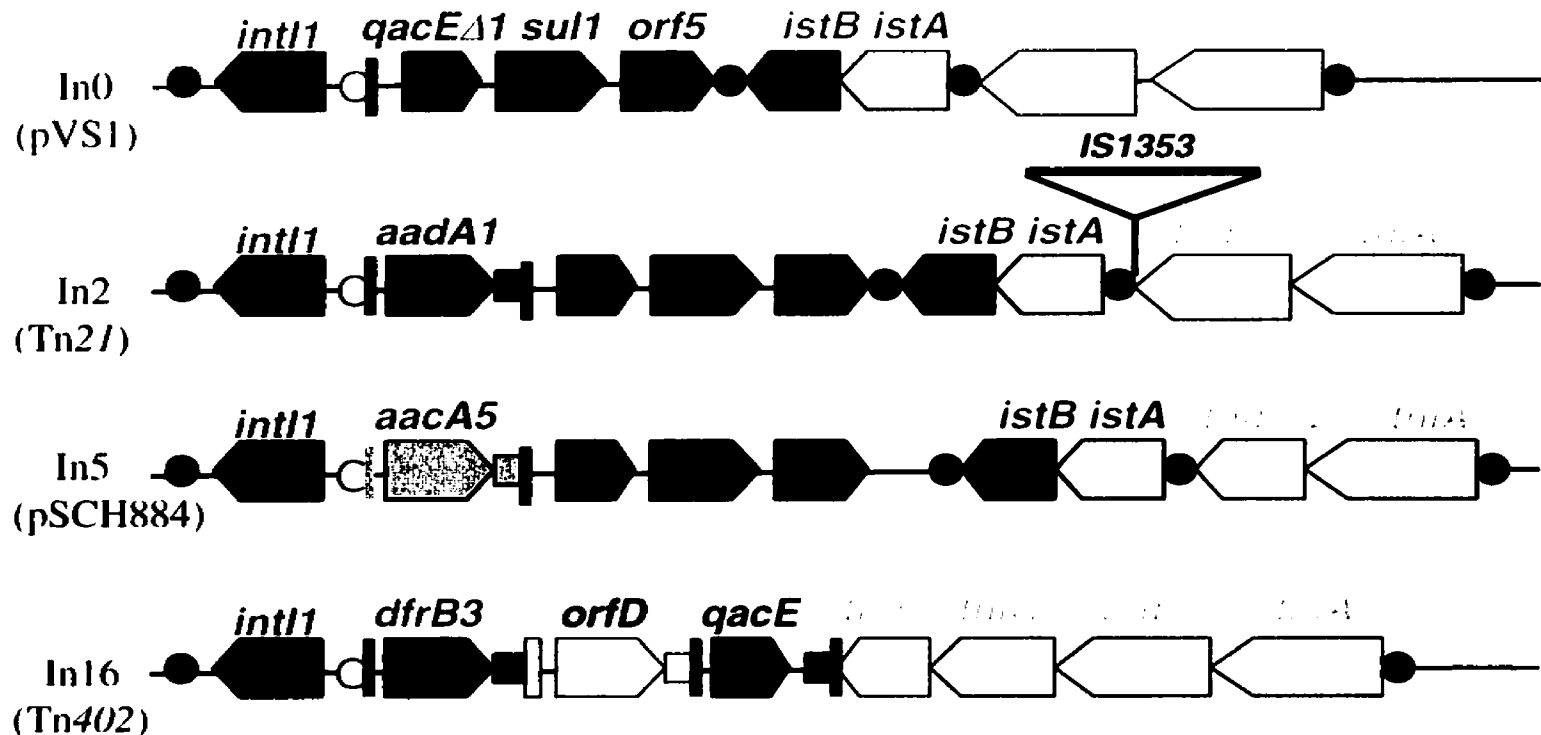


Figure 2. Les séquences voisines au segment 3'-conservé de quelques intégrons. Les gènes *istB* et *istA* et les séquences répétées inversées (ronds verts) forment l'élément IS1326. Les gènes *tniR*, *tniQ*, *tniB* et *tniA* sont des gènes de transposition. Les gènes *tniBΔ1* et *tniBΔ2* sont des versions tronquées du gène *tniB*. Les intégrons commencent et se terminent par une séquence répétée inversée de 25-pb (ronds bleus). Chaque cassette est composée d'un site de recombinaison (barre verticale), d'un gène (flèche) et d'un *attC* (carré). Le site *attI1* est représenté par un cercle jaune. (Adaptée de Brown et al., 1996)

1.2.2.3. La région variable.

La région variable, composée d'une ou de plusieurs cassettes insérées dans la même orientation, se trouve entre ces deux segments conservés (Fig. 1A). Chaque cassette inclut un (parfois deux) gène et une séquence répétée inversée qu'on appelle l'élément de 59 paires de bases (ou *attC*) (Fig. 1B). Les cassettes d'intégrons sont membres d'une famille d'éléments mobiles. Toutefois, elles diffèrent des autres membres par l'absence des fonctions requises pour leur mobilité. Leur mobilité dépend plutôt de l'intégrase codée par le segment 5'-conservé.

À date, près de 60 cassettes différentes ont été identifiées, dont la majorité encodent des gènes de résistance aux antibiotiques (Fig. 3). Toutefois, la prépondérance des gènes de résistance aux antibiotiques parmi ceux identifiés est probablement due au fait que la plupart des études se font chez des organismes résistants aux antibiotiques.

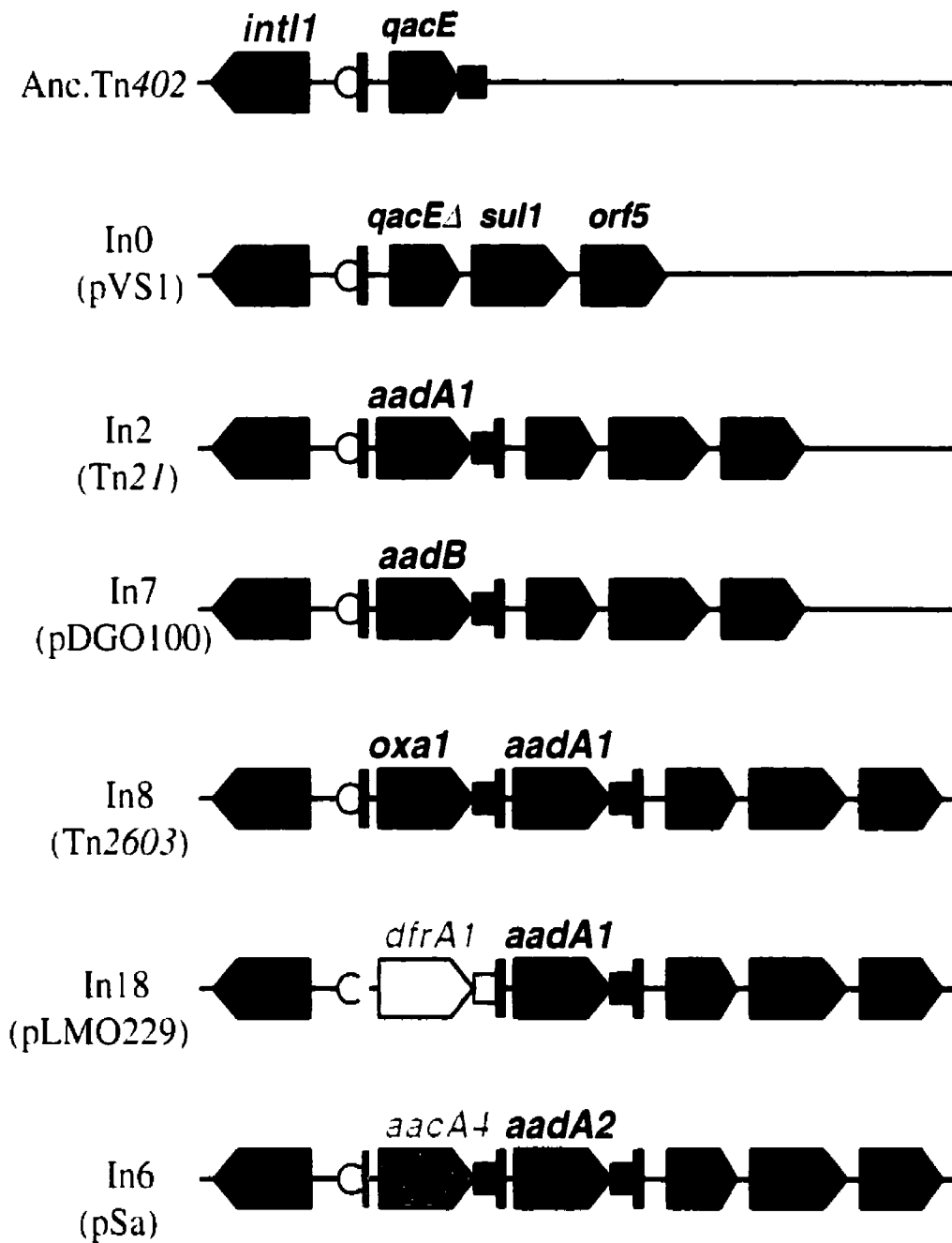
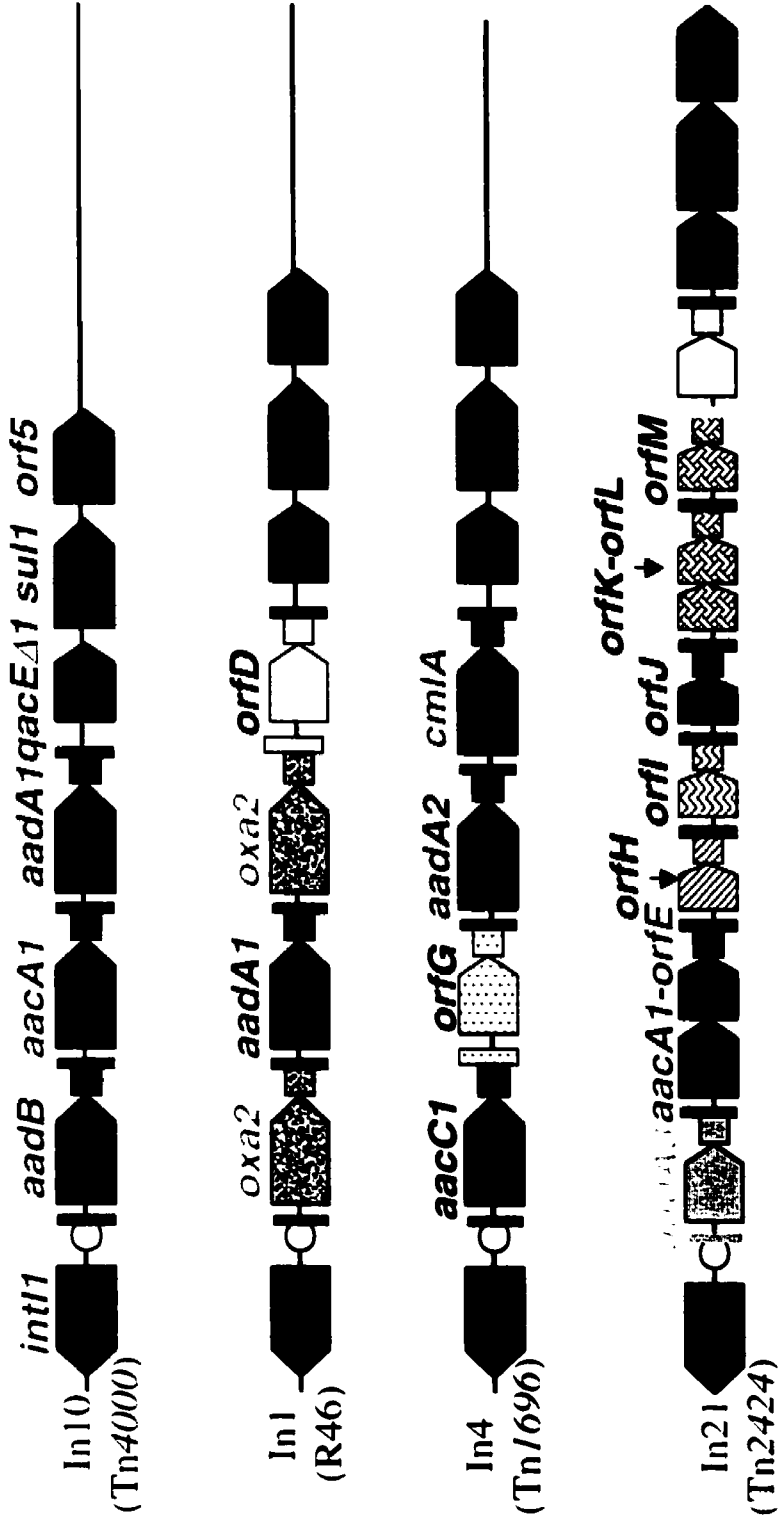


Figure 3. Quelques intégrons de classe 1, dont la région variable varie en longueur et en composition. Chaque cassette est composée d'un site de recombinaison (barre verticale), d'un gène (flèche) et d'un *attC* (carré). Le site *attI1* est représenté par un cercle jaune. (Adaptée de Recchia et Hall, 1995; Roy, 1999).



1.2.3. Expression des cassettes.

La plupart des gènes insérés dans la région variable des intégrons n'ont pas leur propre promoteur et sont exprimés grâce à la région promotrice du segment 5'-conservé (Collis et Hall, 1995; Stokes et Hall, 1989). Les intégrons jouent donc le rôle de vecteur de clonage et d'expression de gènes se trouvant dans des cassettes. Ils permettent ainsi le développement de souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques.

La région promotrice contient potentiellement deux promoteurs, appelés P1 et P2. Quatre versions du promoteur P1 et deux versions du promoteur P2 ont été décrites (Tableau 2) (Hall et al., 1989; Schmidt et al., 1988 et Tenover et al., 1988). Lévesque et al. (1994) ont déterminé la force de ces promoteurs par rapport au promoteur *tac* d'*E. coli*. La version forte du promoteur P1 est plus de six fois plus efficace que le promoteur *tac*, tandis que les promoteurs hybrides et faible sont plus faibles que le promoteur *tac*. La première version du promoteur P2, avec un espacement de seulement 14 nucléotides entre les boîtes -35 et -10, est probablement inactive car cet espacement n'est pas du tout favorable à l'expression. La seconde version du promoteur P2, ayant un espacement de 17 nucléotides entre les boîtes -35 et -10, est responsable de 90% de l'activité promotrice totale lorsqu'il est associé à la version faible du promoteur P1. Les versions hybrides et forte du promoteur P1 ont seulement été retrouvées en combinaison avec la forme inactive du promoteur P2, tandis que la version faible du promoteur P1 a été retrouvée en association avec la forme active de P2.

Lorsque plus d'une cassette est présente, les gènes de la région variable sont co-transcrits par le promoteur commun. Toutefois, l'expression des gènes plus éloignés est réduite dû à la présence des cassettes en amont (Collis et Hall, 1995). Cet effet semble être dû à la terminaison prématurée de la transcription près ou à la fin des cassettes (Collis et Hall, 1995).

Tableau 2. Les promoteurs d'intégrons P1 et P2.

Promoteur	Région -35	Espace (nucléotides)	Région -10	Force
P1	TTGACA	17	TAAACT	fort
	TGGACA	17	TAAGCT	faible
	TGGACA	17	TAAACT	hybride 1*
	TTGACA	17	TAAGCT	hybride 2**
P2	TTGTTA	14	TACAGT	inactif
	TTGTTA	17	TACAGT	fort

* Possède région -35 de P1 faible et région -10 de P1 fort.

** Possède région -35 de P1 fort et région -10 de P1 faible.

1.2.4. Intégrons de classe 2.

Les transposons de la famille Tn7 forment une seconde classe d'intégrons (Fig. 4). Des cassettes ont été retrouvées à un site unique près du bout gauche des transposons de la famille Tn7 (Sundström et al., 1991; Tietze et Brevet, 1991; Young et al., 1994). En amont de ces cassettes, on retrouve un gène défectueux d'intégrase, *intl2* (Pelletier et Roy, GenBank/EMBL no. accession AF047479). Le gène *intl2* contient une mutation non-sens dans le milieu du gène, mais l'activité d'*Intl2* peut être rétablie en changeant le codon de terminaison pour un codon glutamate (Hansson et al., résultats non-publiés). Certaines des cassettes retrouvées dans ces intégrons ont déjà été identifiées dans des intégrons de classe 1, ce qui indique que les cassettes sont libres de se déplacer entre les classes.

1.2.5. Intégrons de classe 3.

Une troisième classe d'intégrons a premièrement été identifiée chez *Serratia marcescens* AK9373 (Fig. 5) (Arakawa et al., 1995). On y retrouve le gène *intl3* en amont d'une cassette *bla_{imp}* qu'on a premièrement identifié dans un intégron de classe 1 (Osano et al., 1994).

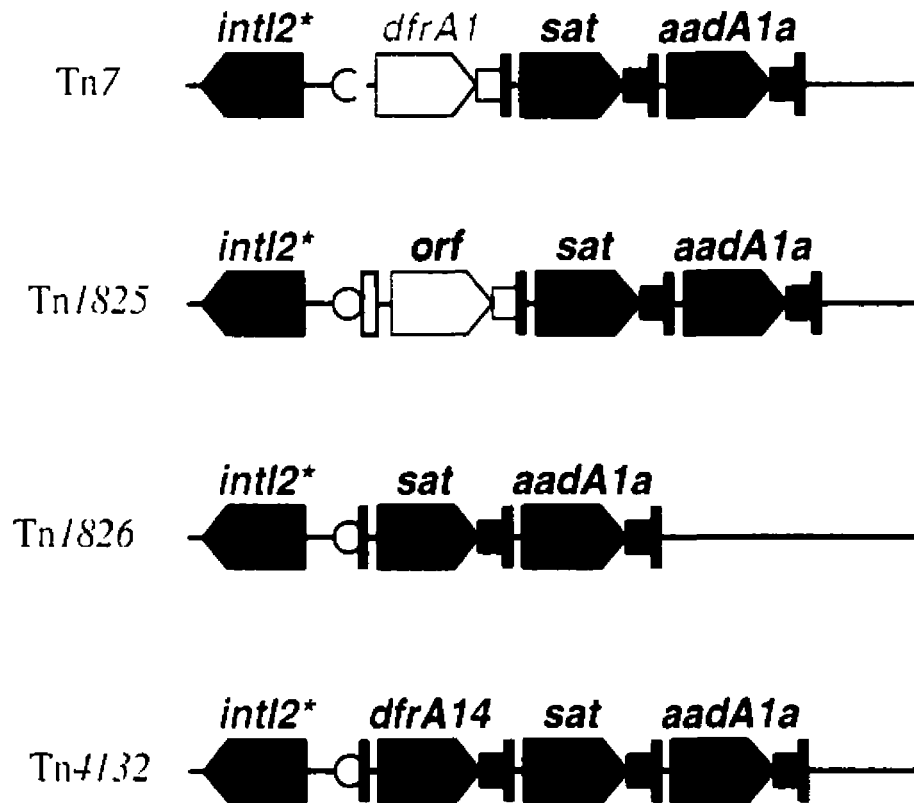


Figure 4. Les intégrons de classe 2. Le gène putatif d'intégase *intI2* est interrompu par un codon de terminaison. Chaque cassette est composée d'un site de recombinaison (barre verticale), d'un gène (flèche) et d'un *attC* (carré). Le site *attI2* est représenté par un cercle jaune. (Adaptée de Recchia et Hall., 1995).

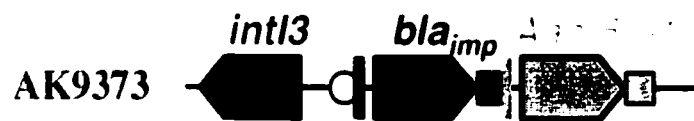


Figure 5. Un intégron de classe 3. Chaque cassette est composée d'un site de recombinaison (barre verticale), d'un gène (flèche) et d'un *attC* (carré). Le site *attI3* est représenté par un cercle jaune. (Shibata et al., 1999).

1.2.6. Intégrons de classe 4.

Plus récemment, une quatrième classe d'intégrons a été identifiée dans le petit chromosome (1,1Mb) de *Vibrio cholerae* (Fig. 6) (Mazel et al., 1998). Cet intégron est composé d'un nouveau gène d'intégrase, *intI4*, qui est associé avec une organisation "gène-VCR". Ce "super-intégron" est très semblable aux intégrons de résistance aux antibiotiques, mais beaucoup plus long. Il est composé de plus de 150 cassettes gène-VCR et représente environ 3% du génome de *Vibrio cholerae*.

L'élément VCR (séquence répétée de *Vibrio cholerae*) qu'on retrouve dans les cassettes du super-intégron est un élément répétitif mesurant aux alentours de 124-pb et, comme plusieurs autres éléments, est capable de former une structure cruciforme grâce à sa symétrie dyade imparfaite (Clark et al., 1997). Contrairement aux *attC* associés aux gènes de résistance aux antibiotiques, les VCRs varient très peu en séquence et en longueur (ils sont ~85% identiques) (Rowe-Magnus et Mazel, 1999), ce qui indique que les cassettes ont été formées à l'intérieur de la cellule. Ils forment donc leur propre classe d'*attC* et pourraient représenter un réservoir de cassettes pour les autres classes d'intégrons. L'élément VCR a premièrement été identifié près de deux gènes de virulence dans *V. cholerae* O:1 : le gène *mrhA* (codant l'hémagglutinine résistante au mannose et au fucose) et le gène *sto* (codant l'entérotoxine thermostable) (Barker et al., 1994; Ogawa et Takeda, 1993). Suite au séquençage du super-intégron, d'autres gènes ou homologues de gènes ont été identifiés. On y retrouve aussi un gène de lipoprotéine (*vlpA*), un gène de résistance à une bactériocine (*vcmccF*), un gène de résistance au chloramphénicol (*catB*) et un gène de méthylase (*mrhB*), mais la plupart des gènes sont des cadres de lecture ouverts (Manning et al., 1999).

Il est maintenant évident que le super-intégron est très semblable aux intégrons de résistance aux antibiotiques. Premièrement, les séquences des VCRs sont similaires à celles des autres *attC*; il existe même deux *attC* de gènes de résistance (*blaP3* et *dfrA6*) qui sont presque identiques aux VCRs (Mazel et al., 1998). Aussi,

les sites de recombinaison des VCRs sont les mêmes qu'on rencontre dans les autres *attC*, i.e. la plupart des VCRs sont flanqués par les séquences consensus RYYAAC et GTTRRY au bout 5' et 3', respectivement.

Toutefois, il existe des différences importantes. Il est possible que les VCRs contiennent un promoteur pour le gène en aval et un terminateur pour le gène en amont. Au lieu de produire un seul ARNm polycistronique comme c'est le cas dans la plupart des intégrons de résistance aux antibiotiques, le super-intégron produit une série de produits de transcription. Une autre grande différence entre les intégrons et le super-intégron est leurs localisations. Les intégrons se retrouvent habituellement sur des plasmides et transposons, ce qui leur permet une très grande mobilité. Contrairement, le super-intégron est chromosomique et sa fonction primaire est probablement d'être un système captant des gènes. C'est cette différence en localisation qui pourrait en parti être la raison pour laquelle on retrouve beaucoup plus de gènes dans le super-intégron que dans les autres intégrons connus.

Il est donc évident que le super-intégron est très semblable à un intégron de résistance aux antibiotiques. Tous les deux sembleraient impliqués dans l'acquisition et le transfert de gènes entre bactéries. Les principales différences sont la taille, la localisation et la fonction des gènes dans les cassettes.

Le contenu et l'ordre des cassettes varient d'une souche de *Vibrio cholerae* à l'autre, ce qui permet de facilement faire un profil épidémiologique des isolats de *Vibrio cholerae*. Il est aussi intéressant de noter que les VCRs ont été retrouvés dans différents sérotypes de *Vibrio cholerae* ainsi que chez certains isolats de *Vibrio anguillarum*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio parahaemolyticus* et *Vibrio mimicus* (Mazel et al., 1998). Des études plus détaillées chez *Vibrio metschnikovii* et *Vibrio mimicus* ont permis d'identifier une intégrase chez chacune d'elles (D Mazel et J Davies, résultats non-publiés). Ces souches de *Vibrio* datent de 1888 à 1982, ce

qui démontre que ce système d'acquisition de gènes est ancien et date d'avant l'ère des antibiotiques (Mazel et al., 1998).

Ce type de super-intégron joue tout probablement un rôle plus général dans l'évolution de génomes bactériens plutôt que dans la résistance ou la virulence. Il y a probablement des super-intégrons dans d'autres espèces bactériennes. Tout récemment, d'autres types d'intégrons ont été identifiés chez *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina* (Vaisvila et al., 1998) et *Xanthomonas campestris* pv. *badrii* (F Drouin et PH Roy, résultats non-publiés).

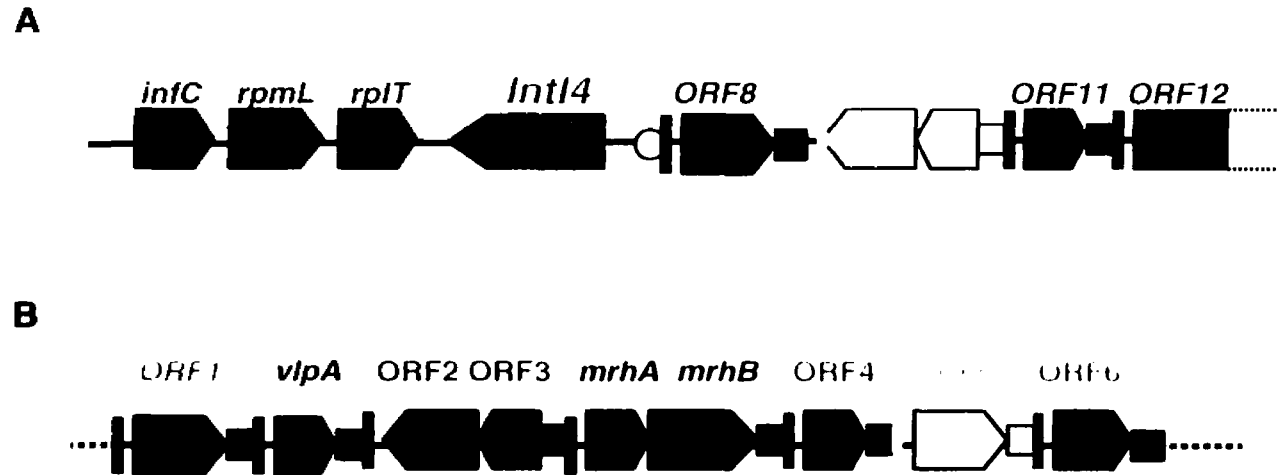


Figure 6. Le gène *IntI4* de *Vibrio cholerae* et quelques cassettes du super-intégron. (A) Le gène *IntI4* de *Vibrio cholerae* et les premières cassettes du super-intégron chez la souche 569/B. (B) Une série de cassettes à l'intérieur du super-intégron. Chaque cassette est composée d'un site de recombinaison (barre verticale), d'un ou deux gènes (flèches) et d'un *attC* (carré). Le site *attI4* est représenté par un cercle jaune. (Adaptée de Mazel et al., 1998).

1.2.7. Les éléments *attC*.

Les éléments de 59-pb et les VCRs, qu'on appelle aussi *attC*, sont membres d'une grande famille de séquences qui fonctionnent comme des sites de reconnaissance pour les recombinases spécifiques de site (Cameron et al., 1986; Hall et al., 1991). Bien qu'elles diffèrent beaucoup en longueur et en séquence, les éléments *attC* partagent certaines caractéristiques. On reconnaît toujours les *attC* par leur structure palindromique et par leurs séquences consensus à chaque extrémité (Stokes et al., 1997). Ces éléments sont composés d'un site inverse au site de recombinaison (RYYAAC), d'une séquence répétée inversée imparfaite et du site de recombinaison (GTTRRY), complémentaire au site inverse (Collis et Hall, 1992; Hall et al., 1991). Les éléments de 59-pb varient en longueur (de 57 à 141-pb) et la similarité dans leurs séquences est principalement limitée aux ~20-pb à chaque extrémité.

Bien que les séquences des *attC* sont très variables, on peut les classer en quatre groupes d'*attC* apparentés (Tableau 3). Les membres de chaque groupe sont de longueurs comparables et partagent une grande homologie de séquence. C'est le groupe 1 qui possède le plus de membres de gènes de résistance, dont plusieurs sont associés avec des gènes non-apparentés. La plupart des *attC* de ce groupe diffèrent très peu des 60-pb consensus du groupe (Hall et al., 1991). En ce qui concerne les autres *attC*, la plupart conforment à la séquence consensus à leurs extrémités mais diffèrent de tous les autres *attC* par leurs séquences internes. Malgré leur diversité, les *attC* sont membres d'une famille de sites de recombinaison fonctionnels reconnus par les intégrases d'intégrons.

Tableau 3. Groupes d'*attC* apparentés (Adapté de Recchia et Hall, 1997).

Groupes	Groupe 1 (57 à 60-pb)	Groupe 2 (70 à 72-pb)	Groupe 3 (127 à 141-pb)	Groupe 4 (123 à 126 pb)
Exemples	<i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> ,	<i>aacA4</i> , <i>aacA</i>	<i>bla_{IMP}</i> , <i>dfrA7</i> ,	cassettes de
de	<i>aadB</i> , <i>aacA(IIb)</i> ,	(<i>orfB</i>)	<i>qacE</i>	<i>Vibrio spp.</i>
cassettes	<i>sat</i> , <i>catB1</i> , <i>orfD</i>			

Les sites *attC* sont des séquences palindromiques qui ont la possibilité de former une structure cruciforme (Mizuuchi et al., 1982). Étant donné que la boucle est flanquée par le site inverse au site de recombinaison et le site de recombinaison c'est possible que cette structure secondaire joue un rôle dans la reconnaissance du site.

Il a été démontré que les séquences à chaque bout d'un *attC* sont nécessaires pour une recombinaison efficace (Martinez et de la Cruz, 1990). Quatre sites hypothétiques de liaison d'intégrase ont été proposés: 1L et 2L au bout gauche et 1R et 2R au bout droit de chaque *attC* (Fig. 7) (Stokes et al., 1997). Les deux paires de sites sont des séquences répétées inversées séparées par une région centrale de sept et sept ou huit paires de bases, respectivement. Il existe toutefois une imperfection dans la symétrie: un des sites de la moitié de gauche (le site 2L) contient une base additionnelle (un résidu C) (Stokes et al., 1997). On croyait que c'était cette différence qui assurait l'orientation correcte des cassettes intégrées, mais une étude récente a démontré que la délétion de ce résidu C dans le site 2L et/ou l'addition d'un résidu G à la position équivalente du site 2R diminuaient l'activité du site mais ne modifiaient pas l'orientation de la cassette intégrée (Hall et al., 1999).

Ces deux paires de site laissent l'impression qu'il y a quatre molécules d'intégrase qui se lient sur un *attC*, plutôt que deux molécules. Il se peut donc que la recombinaison par les intégrases d'intégrons diffère quelque peu de celle des

autres membres de recombinaisons spécifiques de site, qui n'utilisent que deux molécules d'intégrase par molécule d'ADN. Aussi, les séquences de la région centrale entre les sites 2R et 1R ne sont pas bien conservées. Il a été déterminé que la recombinaison entre des sites identiques n'est pas plus efficace que celle entre deux sites différant de cinq bases sur huit (Stokes et al., 1997). Ces résultats diffèrent de ceux des autres systèmes de recombinaison spécifique de site, où les séquences de la région centrale des deux sites recombinants sont critiques à l'efficacité de la recombinaison (Sadowski, 1993; Stark et al., 1992).

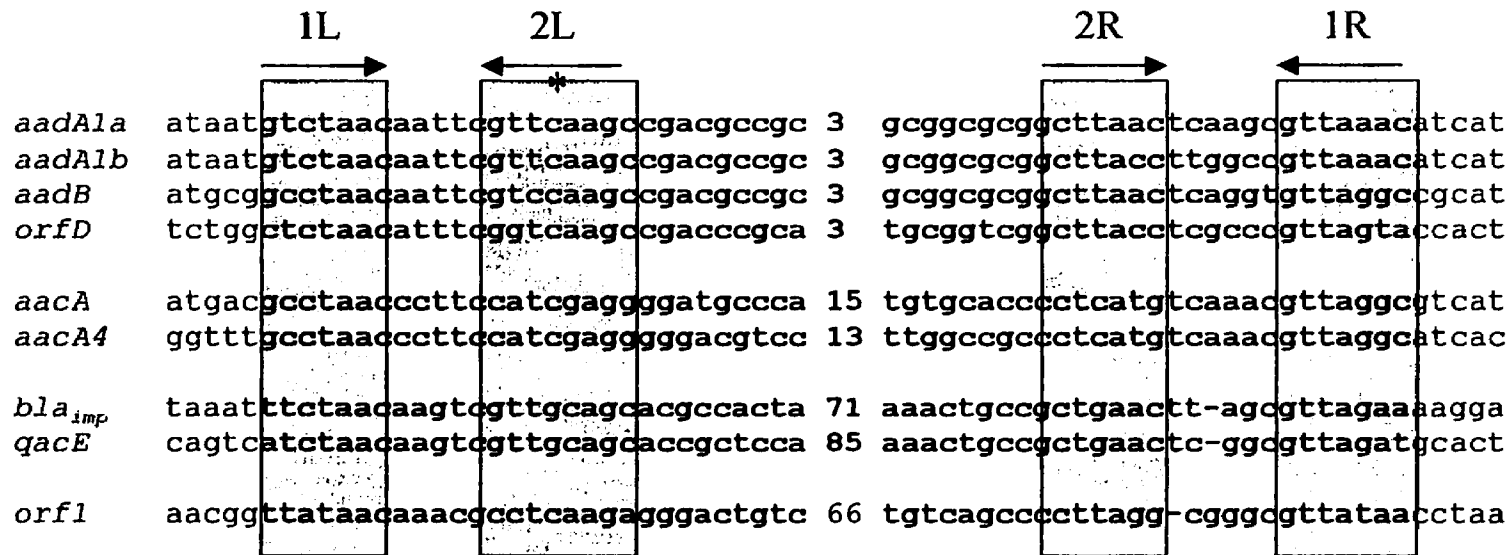


Figure 7. Alignement de séquences d'*attC*. Les *attC*s sont tels qu'on les retrouve dans les cassettes circulaires. Les domaines possibles de liaisons d'intégrase sont encadrés en gris et l'astérisque indique la base de surplus dans la région 2L. Les nombres indiquent le nombre de bases dans la région centrale de chaque *attC* (Adaptée de Stokes et al., 1997).

1.2.8. La mobilité des cassettes.

Les cassettes sont des unités discrètes et mobiles. Leur mobilité a premièrement été démontrée par la perte de gènes de résistance qui se trouvaient dans des intégrons de classe 1 (Collis et al., 1992a). Ces délétions de cassettes sont dépendantes de la présence de l'intégrase d'intégron. Collis et Hall (1992b) ont ensuite démontré que les cassettes d'intégrons peuvent exister sous forme circulaire suite à un événement d'excision par l'intégrase d'intégron (Fig. 8).

Les réactions de recombinaison d'excision et d'insertion catalysées par IntI1 peuvent se produire entre deux sites *attC*, deux sites *attI* ainsi qu'entre un site *attC* et un site *attI* (Collis et Hall, 1992a; Collis et al., 1993; Hall et al., 1991; Hansson et al., 1997; Martinez et de la Cruz, 1990; Recchia et al., 1994). Toutefois, c'est la recombinaison entre *attI1* et *attC* qui est la plus favorisée lors de l'insertion d'une cassette circulaire dans un intégron de classe 1 (Collis et al., 1993).

L'intégrase d'intégron est aussi capable de catalyser la recombinaison entre un *attC* et un site secondaire qui conforme à une séquence consensus (GNT) (Francia et al., 1993; Recchia et al., 1994) qui ressemble à la séquence consensus du site de recombinaison (GTTRRRY). Ces événements se produisent à une très faible fréquence, mais demeurent une façon efficace à propager les cassettes de gènes à une variété d'endroits.

Les cassettes circulaires libres sont des intermédiaires importants dans la dissémination de cassettes. Suite à un événement d'excision, une cassette a ensuite la possibilité de s'intégrer à nouveau dans le même intégron, dans un autre intégron ou dans un site secondaire. Si l'intégration a lieu dans un transposon actif ou un plasmide conjugatif ou mobilisable, le transfert horizontal du gène de résistance vers un autre organisme est hautement favorisé. Finalement, il est possible qu'une cassette circulaire soit suffisamment stable pour survivre la lyse cellulaire et qu'elle entre dans un autre hôte par transformation. S'il y a un intégron

dans ce nouvel hôte, il est possible que cette cassette soit intégrée dans cet intégron à l'aide de l'intégrase fournie en *trans*.

1.2.9. Origine des cassettes.

L'origine des cassettes d'intégrons demeure toujours spéculative. L'hypothèse la plus retenue est que les cassettes proviennent de transcrits convertis en ADN (Hall et al., 1991). Cette hypothèse sème du fait que la plupart des cassettes contiennent un seul gène avec très peu de séquences non-codantes et un *attC* unique. Si cette hypothèse est vraie, il y a tout probablement une transcriptase inverse (qui demeure encore inconnu) qui participe à la formation des cassettes.

Dans ce scénario, les *attCs* se trouvent soit dans le transcrit (ex.: terminateur de transcription), soit ajouté avant la conversion à l'ADN. Dans le contexte, il est intéressant de noter que certains résultats indiquent que les *attCs* peuvent agir comme terminateurs de transcription (Collis et Hall, 1995).

1.2.10. Origine des intégrons.

Bien qu'on connaît beaucoup sur les intégrons, leur origine reste encore un mystère. Il existe toutefois une hypothèse qui pourrait expliquer la formation des intégrons de classe 1 (Fig. 9) (Bissonnette et Roy, 1992). Premièrement, un gène d'intégrase (provenant probablement d'un phage cryptique) se serait placé à côté d'un transposon codant quatre gènes de transposition. Cette fusion se serait tout probablement produite quelques millions d'années passées puisque l'utilisation de codons de tous ces gènes est très semblable. Ensuite, le gène *qacE* est venu s'insérer entre l'intégrase et les gènes de transposition pour former l'ancêtre de Tn402. Cette insertion a probablement eu lieu au début des années 1900, lorsque l'acridine orange était utilisé pour traiter des infections de la peau. Par la suite, une partie de *qacE* et son *attC*, ainsi que les gènes *tniQ*, *tniR* et une partie de *tniB* ont été éliminés par un événement de délétion. De plus, les gènes *sul1* et *orf5* se sont insérés à un site de recombinaison secondaire en aval de *qacEΔ1*. Cette insertion

à tout probablement eu lieu suite à l'introduction des sulfamidés comme agent antimicrobien dans les années 1930. Finalement, une séquence d'insertion, IS1326, est venue s'insérer en aval de *orf5*.

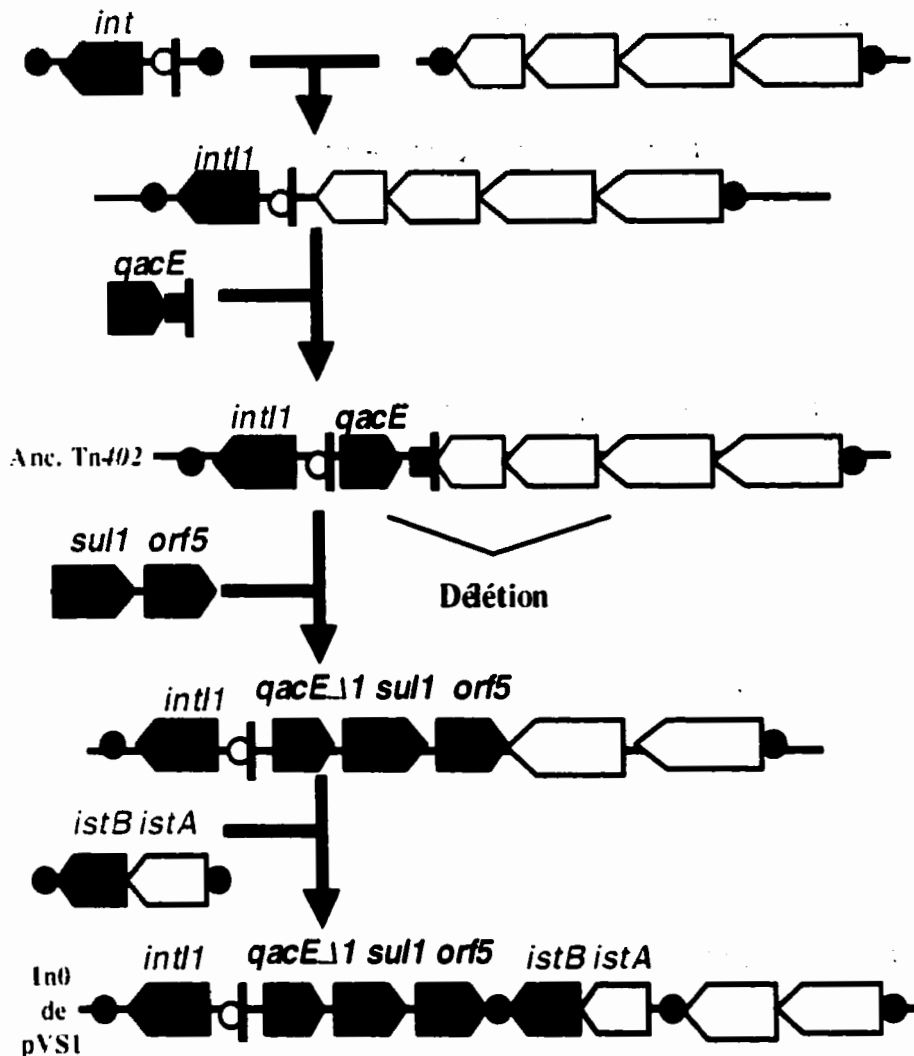


Figure 9. Hypothèse de l'origine de l'intégron de classe 1. Les gènes *istB* et *istA* et les séquences répétées inversées (ronds verts) forment l'élément IS1326. Les gènes *tniR*, *tniQ*, *tniB* et *tniA* sont des gènes de transposition. Le gène *tniB Δ 1* est une version tronquée du gène *tniB*. Les intégrons commencent et se terminent par une séquence répétée inversée de 25-pb (ronds bleus). Une cassette est composée d'un site de recombinaison (barre verticale), d'un gène (flèche) et d'un *attC* (carré). Le site *attI1* est représenté par un cercle jaune. (Adaptée de Bissonnette et Roy, 1992).

1.3. LA RECOMBINAISON.

La recombinaison est un processus qui permet le réarrangement de matériel génétique. Il existe deux types de recombinaison : la recombinaison homologue et la recombinaison spécifique de site. Dans le premier cas, la recombinaison est dépendante de régions d'homologie entre deux molécules d'ADN et elle nécessite des protéines spécifiques, tel que RecA chez *E. coli*. Dans le deuxième cas, l'échange d'ADN nécessite des sites d'ADN spécifiques ainsi que des enzymes qui reconnaissent ces sites spécifiques et permettent l'insertion du matériel génétique.

1.3.1. La recombinaison spécifique de site conservative.

Elle est responsable de l'intégration, l'excision, l'inversion et la résolution de fragments d'ADN. Quelques exemples de son utilité sont l'établissement de la lysogénie par des bactériophages, la monomérisation de chromosomes bactériens et plasmidiques, la résolution d'intermédiaires de transposition, l'acquisition de gènes de résistance aux agents antimicrobiens et l'altération de l'expression de gènes.

Un système de recombinaison spécifique de site simple est composé de deux sites de recombinaison de longueurs limitées et d'un gène codant une recombinase spécifique de site qui dirige la recombinaison entre les deux sites. Selon l'emplacement des deux sites de recombinaison, ces systèmes de recombinaison se classent dans l'un ou l'autre de deux types de recombinaison. Le premier type de recombinaison spécifique de site résulte en l'inversion d'un segment d'ADN suite à la recombinaison entre deux sites en orientations opposés sur la même molécule d'ADN. Par exemple, on rencontre ce type de recombinaison chez *Salmonella typhimurium* pendant la variation de phase, où l'invertase Hin permet de modifier

l'expression de gènes flagellaire suite à l'inversion d'un segment d'ADN (Zieg et al., 1977). Ensuite, le deuxième type de recombinaison est l'intégration ou l'excision de molécules d'ADN circulaires. L'intégration se produit lors de la recombinaison entre des sites spécifiques sur deux molécules d'ADN, tandis que l'excision se produit lors de la recombinaison entre deux sites spécifiques en orientation directe sur la même molécule d'ADN. L'intégration et l'excision se produisent souvent, par exemple, chez les phages tempérés tels que λ et HP1 (Landy, 1989; Waldman et al., 1986).

1.3.2. Les recombinases spécifiques de site conservatives.

Les recombinases spécifiques de site partagent quelques caractéristiques communes: elles effectuent la coupure et la ligation des brins via un intermédiaire covalent ADN-protéine et elles reconnaissent et se lient à des sites inversés de chaque côté du site de coupure et de ligation. Étant donné qu'il n'y a aucune synthèse ou perte d'ADN pendant cette recombinaison, on dit que la recombinaison est conservative (Campbell, 1981). De plus, aucun cofacteur énergétique est nécessaire à la recombinaison. L'énergie est conservée par la formation du lien covalent et cette énergie est réutilisée pour rejoindre les molécules d'ADN (Sadowski, 1986).

Les recombinases spécifiques de site conservatives peuvent se classer dans l'une ou l'autre de deux catégories : les résolvases/invertases ou les intégrases (tyrosines recombinases).

1.3.2.1. La famille de résolvasés/invertases.

Les recombinaisons de la famille des résolvasés/invertases permettent la résolution de co-intégrats de transposons du groupe Tn3 et l'inversion de segments d'ADN (Komano, 1999). Cette famille de résolvasés inclut la plupart des résolvasés de transposons ainsi que les invertases tels que Hin et Gin. Le mécanisme de recombinaison de ces résolvasés (Fig. 10) débute par un clivage simultané de chaque brin d'ADN. La coupure de l'ADN faite par l'enzyme est décalée de deux nucléotides. C'est une sérine de la résolvasé qui agit comme nucléophile et clive l'ADN pour ainsi former un lien phosphodiester avec le bout 5' du brin d'ADN recombinant (Grindley, 1997). Suivant le clivage, les brins d'ADN sont échangés et rejoints afin de former les produits recombinants. Les protéines accessoires ne semblent pas jouer de rôle dans la recombinaison par les membres de cette famille.

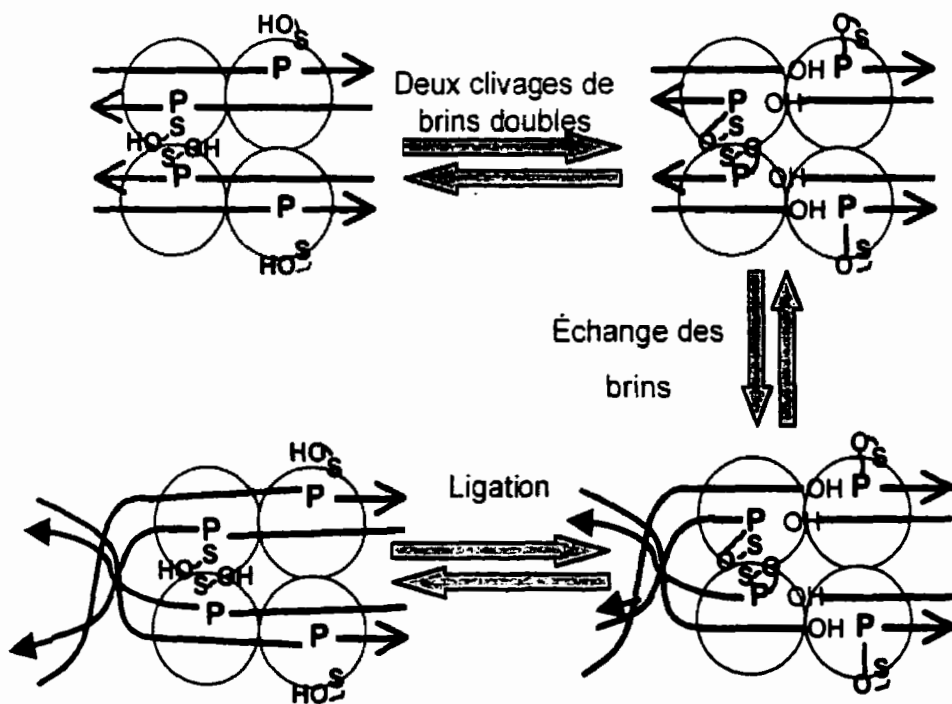


Figure 10. Mécanisme de recombinaison des résolvas. Les résolvas (cercles jaunes) effectuent un double clivage des deux partenaires de recombinaison. Un résidu sérine de chaque monomère agit comme nucléophile pour cliver un brin d'ADN et former un lien phosphosérine avec le bout 5' de l'ADN clivé. Ensuite, ils échangent les extrémités d'ADN et les rejoignent.

1.3.2.2. La famille des intégrases (tyrosine recombinases).

Quant aux recombinases de la famille des intégrases, celles-ci permettent l'intégration et l'excision de segments d'ADN. La famille des tyrosines recombinases inclus, entre autres, plusieurs intégrases de phages (λ Int, P1 Cre), de bactéries (XerC, XerD, IntI) et de levures (FLP). Ces recombinases effectuent la recombinaison quelque peu différemment des résolvases .

À date, la grande famille des tyrosines recombinases est composée de 221 membres, qui sont regroupés en 28 familles (<http://members.home.net/domespo/trhome.html>). La plupart des études biochimiques des tyrosines recombinases portent sur l'intégrase Int du bactériophage λ , la recombinase FLP de *Saccharomyces cerevisiae*, la recombinase Cre du bactériophage P1 et les recombinases XerC et XerD d'*Esherichia coli*.

Bien que l'homologie des séquences en acides aminés des membres de la famille d'intégrase est limitée, deux boîtes et trois bandes ("patch") ont été identifiés (Nunes-Düby et al., 1998). Un résidu arginine dans la boîte 1 et les résidus histidine, arginine et tyrosine dans la boîte 2 sont conservés parmi presque toutes les intégrases de la famille des recombinases spécifiques de site (Abremski et al., 1992; Argos et al., 1986). En fait, il semble que ce soit ces quatre résidus qui font partie du site actif des intégrases lors de la recombinaison spécifique de site. Malgré leurs divergences, les intégrases effectuent la recombinaison spécifique de site en utilisant un mécanisme commun (Craig, 1988).

Le mécanisme de recombinaison des intégrases est plus complexe que celui des résolvases. D'après plusieurs études sur les intégrases lambda et FLP, il a été démontré que la recombinaison par une intégrase se fait en plusieurs étapes (le modèle de clivage en *cis*, utilisé par l'intégrase lambda, est démontré à la Fig. 11). D'abord, les protéines se fixent sur les sites de reconnaissances sur un ou les deux

sites. Les deux sites qui sont destinés à être recombinaison se rencontrent ; ce contact est soit entre des protéines déjà fixées aux sites, soit entre la protéine fixée sur un site et l'ADN nu d'un autre site (Richet et al., 1988). Premièrement, il y a activation du lien phosphodiester par le triplet Arg-His-Arg de l'intégrase au site de recombinaison (Landy, 1993). Ensuite, la tyrosine du site actif de l'intégrase agit comme une nucléophile et coupe l'ADN, pour ainsi former un intermédiaire covalent ADN-protéine avec le phosphate du bout 3' de l'ADN clivé (Nunes-Düby et al., 1987; Pargellis et al., 1988). Les bouts 5'-hydroxytes libres agissent ensuite comme nucléophiles pour effectuer la première ligation et former une jonction de Holliday (Parsons et al., 1998; Stark et al., 1992). Dans plusieurs systèmes de recombinaison spécifique de site, une isomérisation de l'intermédiaire Holliday permet une désactivation des deux premiers monomères d'intégrase et une activation des deux autres (Gopaul et Van Duyne, 1999). Par la suite, les deux autres brins d'ADN sont coupés et rejoints par les deux autres monomères d'intégrases de la même façon. Bien qu'il n'y ait pas encore de preuve, il est supposé que l'intégrase de l'intégron agisse d'une façon semblable aux autres membres de la famille d'intégrases.

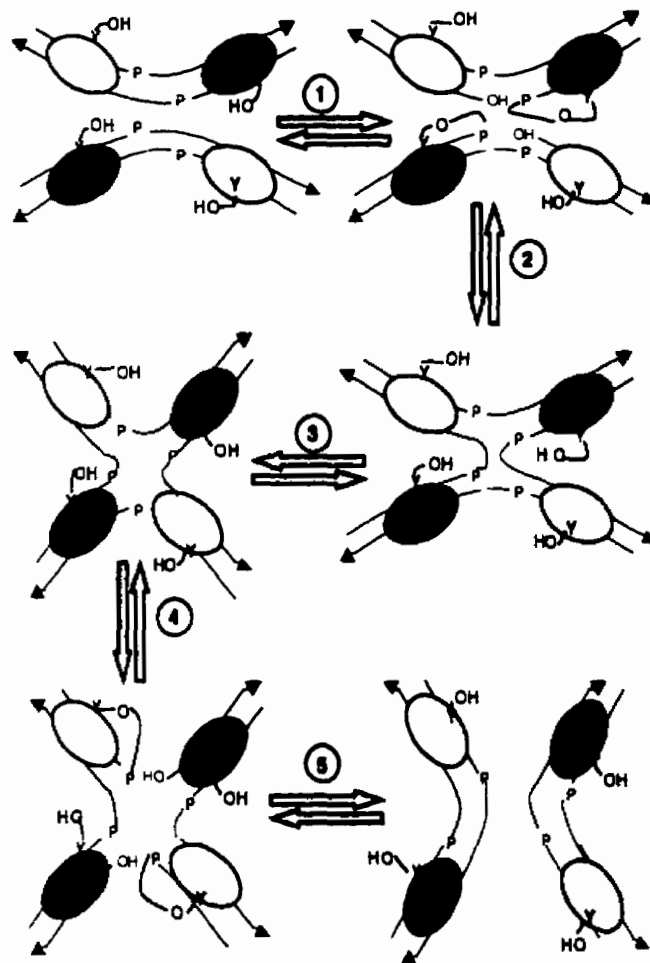


Figure 11. Modèle courant du mécanisme de recombinaison spécifique de site de tyrosines recombinases. Deux monomères (ovales jaunes et verts) se lient à chaque site de recombinaison et rejoignent les deux molécules d'ADN. Une protéine par substrat d'ADN clive l'ADN (1) avec la tyrosine du site actif pour ainsi former un intermédiaire covalent ADN-protéine avec le phosphate du bout 3' de l'ADN clivé. Les bouts 5' hydroxyles libres agissent ensuite comme nucléophiles pour effectuer la première ligature et former une jonction de Holliday (2). Une isomérisation de l'intermédiaire Holliday (3) permet une désactivation des deux premiers monomères et une activation des deux autres. Par la suite, les deux autres brins d'ADN sont coupés (4) et ligués (5) par les deux autres monomères d'intégrases de la même façon pour former les produits recombinants. (Adaptée de Gopaul et Van Duyne, 1999).

1.3.2.2.1. Le système de recombinaison λ .

Le système de recombinaison λ permet l'intégration de la forme circulaire du génome du phage λ dans le chromosome bactérien (Weisberg et Landy, 1983). Cette intégration nécessite la protéine Int du phage, la protéine de l'hôte IHF (facteur d'intégration de l'hôte) ainsi que deux sites de recombinaison; *attP* du phage et *attB* du chromosome bactérien (Landy, 1989, Fig. 12). L'intégrase Int du phage λ catalyse la réaction de recombinaison aux sites de recombinaison et possède aussi une activité de topoisomérase de type 1. La protéine Int est bifonctionnelle, i.e. elle reconnaît deux classes distinctes de séquences d'ADN dans le site d'attachement du phage (*attP*) (Moitoso de Vargas et al., 1988). Le domaine carboxy-terminal de Int se lie aux séquences "core" (C et C'), où la recombinaison a lieu. Le domaine amino-terminal de Int se lie avec une affinité encore plus forte aux séquences "arm-type" (P et P'), situées de part et d'autre des séquences de type "core". Dans le génome bactérien, la protéine Int reconnaît seulement le site "core" *attB* (B et B'). Les sites *attP* et *attB* sont tous les deux composés de deux séquences répétées inversées et séparées par une petite région centrale (Fig. 12). Bien que ces séquences soient essentielles à la recombinaison, elles sont liées beaucoup moins fortement par Int que le sont les séquences "arm-type" (Ross et Landy, 1982).

Pendant l'intégration, la recombinaison entre *attP* et *attB* génère les sites *attL* et *attR* (Fig. 13). Ces deux sites peuvent ensuite servir comme substrats de la réaction d'excision du génome de phage qui régénère les sites *attB* et *attP*. L'excision nécessite plus de protéines que l'intégration; les protéines Int, IHF ainsi que l'excisionase Xis et la protéine de l'hôte Fis (Landy, 1989). L'excisionase Xis est une protéine codée par le phage lui-même. Son rôle est d'introduire des courbures dans l'ADN (Landy, 1989). La protéine de l'hôte Fis est responsable d'une stimulation de l'excision en courbant l'ADN (Landy, 1989). Finalement, la protéine d'intégration de l'hôte (IHF) a comme fonction primaire de lier et courber l'ADN à des sites spécifiques (Landy, 1989).

La question de "quelle tyrosine coupe où?" est le sujet d'un grand débat. Selon une étude, le clivage par Int se fait en *trans*, i.e. la tyrosine nucléophile d'un monomère lié sur un demi-site coupe l'ADN à un autre demi-site (Han et al., 1993). Selon une étude subséquente, des expériences encore plus convaincantes ont démontré que le clivage se faisait en *cis*, i.e. chaque tyrosine nucléophile coupe l'ADN à son demi-site (tel qu'à la fig. 11) (Nunes-Düby et al., 1994). Des études cristallographiques du site actif de Int ont démontré que la tyrosine nucléophile se trouve dans une boucle flexible (Kwon et al., 1997). Il se peut donc que le clivage par Int puisse se faire en *cis* ou en *trans*, dépendamment des conditions.

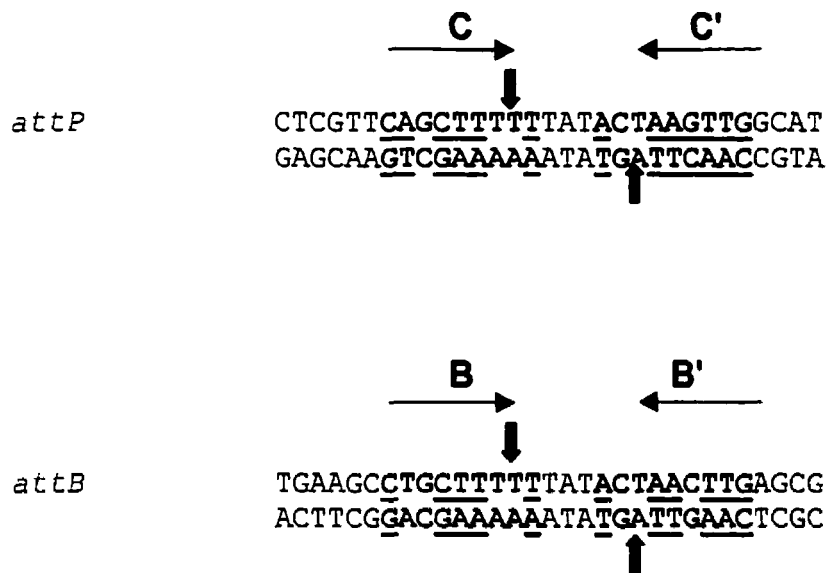


Figure 12. La séquence des sites de recombinaison *attP* et *attB* du système de recombinaison du bactériophage λ . Les sites de coupure sont décalés de 7-pb. Les flèches verticales indiquent les sites de coupure et les nucléotides soulignés correspondent aux séquences consensus. (Adaptée de Landy, 1989)

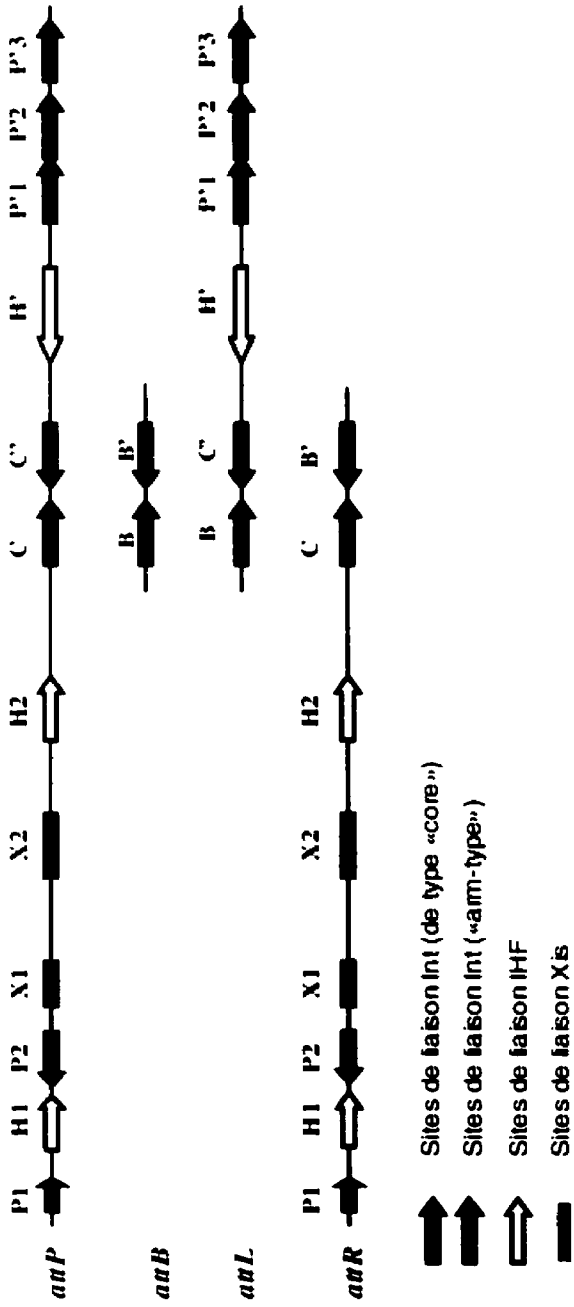


Figure 13. Sites de liaison de l'intégrase du bactériophage λ et de ses protéines accessoires. Les sites *attR* et *attL* sont formés suite à une recombinaison entre le site *attB* (du chromosome bactérien) et *attP* (du génome du phage) (Adaptée de Crisona et al. 1999).

1.3.2.2. Le système de recombinaison XerC-XerD.

La fonction primaire du système de recombinaison Xer est de convertir les dimères de chromosomes bactériens en monomères afin de permettre leur ségrégation lors de la division cellulaire. Aussi, la recombinaison Xer permet, suite à une recombinaison homologe, la résolution de formes multimériques d'une variété de plasmides naturels qui se forment (Sherratt et al., 1995).

La plupart des systèmes de recombinaison spécifique de site utilisent une seule sorte de protéine pour former le tétramère de recombinaison. Toutefois, la recombinaison spécifique de site effectuée par le système Xer d'*E. coli* nécessite deux protéines apparentées. Ces deux protéines, XerC et XerD, appartiennent à la grande famille des tyrosine recombinases spécifique de site (Blakely et al., 1993; Colloms et al., 1990).

Aux différents sites de recombinaison Xer, les protéines XerC et XerD se lient de façon coopérative à des séquences consensus spécifiques de 11-pb qui sont séparées par une région centrale de 6 à 8-pb (Tableau 4). C'est aux extrémités de cette région centrale où le clivage et l'échange des brins d'ADN a lieu. En ce qui concerne le site chromosomique *dif*, les 28-pb du site de recombinaison et la protéine accessoire FtsK suffisent aux recombinaisons Xer intra- et intermoléculaires (Blakely et al., 1991; Neilson et al., 1999; Recchia et al., 1999). Cependant, la recombinaison Xer aux sites de plasmides naturels, tels que *cer* (du plasmide ColE1) et *psi* (du plasmide pSC101), nécessite des protéines accessoires ainsi qu'environ 200-pb d'ADN adjacentes aux sites de recombinaison. Les protéines PepA et ArgR (Stirling et al., 1988; 1989) agissent en concert avec les séquences accessoires de *cer* afin d'assurer que seul la recombinaison intramoléculaire a lieu (Summers, 1989). La protéine ArgR est une protéine liant l'ADN qui agit comme répresseur transcriptionnel de l'opéron arginine (Alén et al., 1997). PepA est une aminopeptidase, mais son activité peptidase n'est pas nécessaire à la recombinaison (McCulloch et al., 1994). Pendant la recombinaison

Xer, ces deux protéines se lient spécifiquement à la séquence accessoire du site *cer* et coopèrent dans la formation d'un complexe ADN-protéine. Quant à la recombinaison au site *psi*, les protéines *PepA*, *ArcA* et *ArcB* sont essentielles à la recombinaison *in vivo* (Colloms et al., 1998). Le rôle des protéines et séquences accessoires dans la recombinaison *XerC/XerD* est d'assurer une recombinaison intramoléculaire (Colloms et al., 1996; 1998).

Tableau 4. Séquences d'ADN des sites de recombinaison Xer (Blake et al., 1997; Colloms et al., 1996).

Site	Site de liaison XerC	Région centrale	Site de liaison XerD
<i>cer</i>	GGTGC GTACAA	TTAAGGGA	TTATGGTAAAT
<i>dif</i>	GGTGC GCATAA	TGTATA	TTATGTTAAAT
<i>psi</i>	GGTGC GCGCAA	GATCCA	TTATGTTAAAC
<i>nmr</i>	GGTGC GCGTAA	TGAGACG	TTATGGTAAAT
<i>parB</i>	GGTACC GATAA	GGGATG	TTATGGTAAAT

Le clivage par *XerC* et *XerD* se fait en *cis* (Arciszewska et Sherratt, 1995). Le site de clivage du brin supérieur est situé entre le site de liaison *XerC* et la région centrale tandis que le site de clivage du brin inférieur est situé entre le site de liaison *XerD* et la région centrale. L'échange des brins au site *psi* est séquentiel: *XerC* catalyse premièrement l'échange des brins supérieurs pour former un intermédiaire de jonction de Holliday (Colloms et al., 1996). À cette étape, c'est la séquence des sites de recombinaison qui détermine si la réaction de recombinaison arrête à la jonction de Holliday ou si la réaction continue et l'échange des deux autres brins a lieu (Colloms et al., 1996). Si la séquence le permet, *XerD* catalyse le second échange de brins (inférieurs) (Colloms et al., 1996). Des changements dans la conformation de *XerC* suite au premier échange de brins pourraient jouer un rôle dans l'activation de *XerD* (Hallet et al., 1999).

1.3.2.2.3 . Le système de recombinaison FLP.

Le système de recombinaison spécifique de site FLP est un modèle très utile à l'étude des mécanismes moléculaires de la recombinaison. Ce système, encodé par le plasmide 2 micron (2- μ m) de *Saccharomyces cerevisiae*, joue un rôle important dans l'augmentation du nombre de copies du plasmide lorsqu'il est bas.

Ce plasmide circulaire est composé de deux régions uniques séparées par deux séquences répétées inversées (IR) de 599-pb (Fig. 14A) (Hartley et Donelson, 1980). Le gène *flp* du plasmide 2 micron code une recombinase spécifique de site qui agit sur deux sites spécifiques (FRT) situés près du centre des IRs. Chaque site FRT est composé de trois éléments symétriques de 13-pb ("a", "b" et "c") (Senecoff et al., 1985). Les éléments "c" et "b" sont identiques et adjacents tandis que l'élément "a" est en orientation inverse des deux autres et il est séparé de l'élément "b" par une région de 8-pb (Fig. 14B).

Lors de la recombinaison, FLP se lie de façon séquentielle aux éléments "b", "a" et "c", et coupe les brins d'ADN aux extrémités de la région centrale (Beatty et Sadowski, 1988) par le mécanisme habituel de la recombinaison spécifique de site. Lors de la recombinaison intramoléculaire *in vivo*, un minimum de 34-pb du site FRT (la région centrale et les éléments "a" et "b") est essentiel (Andrews et al., 1985; Jayaram, 1985; Senecoff et al., 1985). Le clivage par la recombinase FLP se fait en *trans* (Lee et al., 1999) et aucune protéine accessoire est nécessaire.

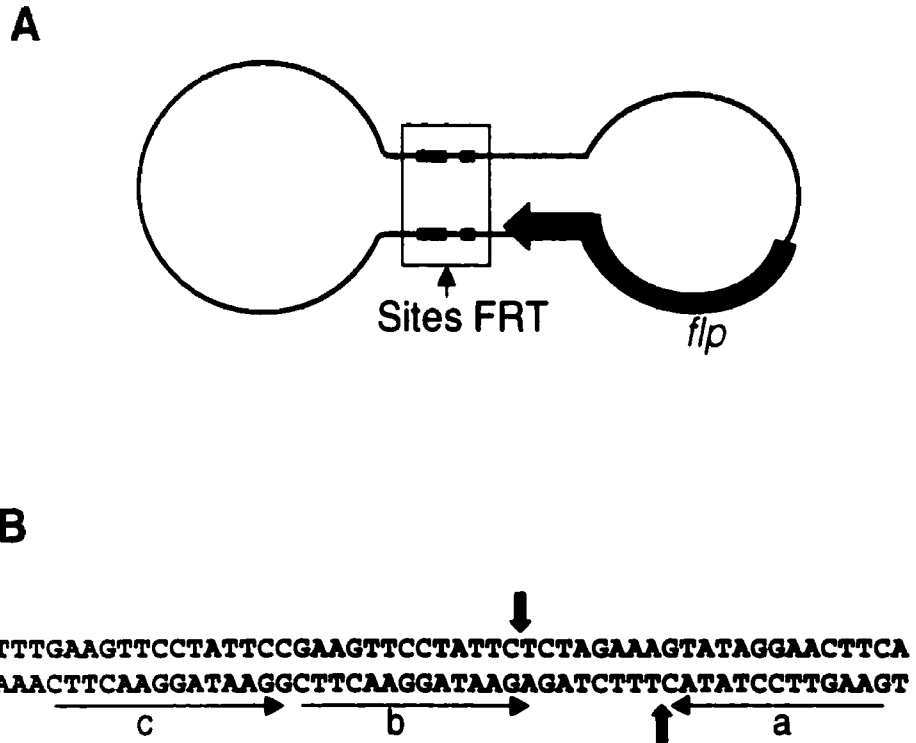


Figure 14. Le système de recombinaison FLP. **A.** Le plasmide 2 micron de *Saccharomyces cerevisiae* est composé de deux régions uniques séparées par deux séquences répétées inversées (IR) de 599-pb. Le gène *flp* du plasmide 2 micron code une recombinaise spécifique de site qui agit sur deux sites spécifiques (FRT) situés près du centre des IRs. **B.** Le site de recombinaison de la recombinaise FLP (FRT). Le site FRT est composé de trois éléments symétriques (a,b et c) de 13-pb et d'une région centrale de 8-pb (nucléotides en bleu). Les flèches rouges indiquent les sites de coupures (Panigrahi et al., 1992).

Tableau 5. Caractéristiques de quelques-unes des tyrosines recombinases.

Enzymes	Nombre de sous-unités d'intégrases	Sites de recombinaison	Distance entre les sites clivés (pb)	Autres protéines nécessaires
λ Int	4	<i>attP</i> (240-pb) <i>attB</i> (25-pb)	7	IHF, Fis Xis
FLP	4	<i>FRT</i> (47-pb)	8	-
XerC XerD	4 (2 de chaque)	<i>cer</i> (230-pb) <i>psi</i> (230-pb) <i>dif</i> (33-pb)	8 (<i>cer</i>) 6 (<i>psi</i>) 6 (<i>dif</i>)	ArgR (<i>cer</i>) PepA (<i>cer</i> , <i>psi</i>) ArcA/B (<i>psi</i>) FtsK (<i>dif</i>)

1.3.2.2.4. Les intégrases d'intégrons.

Les intégrases d'intégrons sont apparentées entre elles, mais pas suffisamment pour prédire qu'elles reconnaîtraient les mêmes sites. L'identité varie de 45 à 60% (Tableau 6) et, en plus des deux boîtes et trois bandes conservés chez les intégrases (Nunes-Düby et al., 1998), elles possèdent une région conservée qui est absente chez les autres intégrases. Des études de mutagenèse ont démontré que les acides aminés de cette région propre aux intégrases d'intégrons sont nécessaires à la recombinaison (N Messier et PH Roy, résultats non-publiés). Il se peut donc que la recombinaison spécifique de site par les intégrases d'intégrons est un peu différente des autres membres de la famille des intégrases.

Tableau 6. Identité et similarité des intégrase d'intégrons (Adapté de Hall et al., 1999).

Identité (rouge) et similarité (bleu) des séquences d'acides aminés (%)				
Intégrases	Int1	Int2*	Int3	Int4
Int1	100	46,5	59,6	45,5
Int2	63,0	100	46,3	49,2
Int3	72,8	59,7	100	44,8
Int4	64,3	64,3	62,1	100

*Lorsque Int2 est mutée afin de produire une intégrase fonctionnelle de 318 acides aminés.

Pendant les deux dernières années, les interactions entre l'intégrase Int1 et ses sites de recombinaison ont été décrites. Premièrement, Gravel et al. (1998) ont pu identifier, par modifications chimiques, les sites de liaison d'Int1 sur *att1*. Quatre régions ont été identifiées, dont trois des quatre régions ont la séquence consensus GTTA (Fig.15A). Ensemble, les régions I (position 0 à +11) et II (position -12 à -3) ont un arrangement similaire au patron de reconnaissance XerC/XerD (tAA-N₆₋₈-TTA), où le clivage de l'ADN se produit à chaque extrémité de la région centrale (N₆₋₈) (Blake et al., 1997). De plus, la liaison aux régions I et II n'est pas nécessaire à la liaison aux régions III (position -33 à -24) et IV (position -52 à -47), et vice versa. Toutefois, le rôle des intégrases liées à ces régions n'est pas encore connu.

Un autre groupe a aussi étudié les interactions entre Int1 et *att1* (Collis et al., 1998). Ceux-ci ont identifié deux sites de liaison. Le premier site, qui correspond à la région -37 à -24, a été identifié par modification chimique et par protection à la DNase I. La liaison au deuxième site était trop faible et ils n'ont pas été capables de le caractériser.

Gravel et al. (1998) ont aussi tenté de caractériser les interactions entre IntI1 et l'*attC* dans In2 par gel de retardement. Ils ont pu démontrer que IntI1 peut former deux complexes faibles avec la moitié gauche du *attC*, mais les résultats avec la moitié droite étaient peu concluants. Collis et al. (1998) ont détecté deux complexes faibles entre IntI1 et un *attC* de *aadB*. Ni l'un ni l'autre de ces groupes n'ont été capables de caractériser les sites de liaison par protection à la DNase I ou par modification chimique.

Finalement, Francia et al. (1999) ont démontré que IntI1 se lie fortement et spécifiquement à l'ADN simple brin d'*attC*. Cette liaison se faisait spécifiquement sur le brin inférieur d'*attC*. De plus, leurs expériences de protection à la DNase I ont permis de démontrer qu'IntI1 protège environ 40 bases (incluant le site de recombinaison) de l'*attC* de *aadA1* contre la DNase I. Ils ont aussi démontré qu'IntI1 était capable de se lier spécifiquement sur le brin inférieur d'*attI1*. Ces résultats suggèrent qu'une structure cruciforme puisse être impliquée dans le mécanisme d'intégration et d'excision de cassettes.

Bien que les différents sites *attI* ne se ressemblent pas significativement (Fig. 15B), IntI1 reconnaît et est capable d'exciser les cassettes en aval des sites *attI1*, *attI2* et *attI3* (F Gagnon et PH Roy, résultats non-publiés). Le taux d'excision est plus élevé avec le site *attI1* et il dépend aussi de la cassette située en aval du site *attI*. Quant aux intégrases IntI2 (mutée) et IntI3, celles-ci sont spécifiques à leurs propre site de recombinaison (*attI2* et *attI3*, respectivement) (F Gagnon et PH Roy, résultats non-publiés). Les trois premières intégrases d'intégrons reconnaissent tous les *attC* testés et excisent les cassettes centrales (F Gagnon et PH Roy, résultats non-publiés). Aussi, il a été démontré qu'IntI1 peut intégrer une cassette de *V. cholerae* dans un intégron de classe 1 (Mazel et al., 1998).

Selon certaines études (Hansson et al., 1997; Stokes et al., 1997), la réaction de recombinaison semble se produire entre le G et le T du site de recombinaison GTTRRRY et la coupure semble être franche (i.e. sans aucun décalage entre le

site de coupure de chaque brin). Par contre, chez les autres tyrosines recombinases, la coupure des deux brins d'ADN est décalée par une région centrale de six à huit nucléotides. Afin de permettre ce décalage, les régions centrales des deux sites qui se recombinent ont une identité parfaite. Ceci n'est pas le cas chez les sites de recombinaison d'intégrons, mais on y retrouve habituellement la séquence TAA-N₇-TTA. Si la recombinaison est effectuée tel que les autres tyrosine recombinases, la coupure des brins serait probablement décalée de sept nucléotides (Fig. 15). Toutefois, comme la région "centrale" (N₇) des sites *attI* et *attC* n'est pas conservée, la synthèse et la dégradation d'ADN pourrait avoir lieu, ce qui donnerait l'impression que la coupure est franche. Quel que soit le mécanisme exact de recombinaison des intégrases d'intégrons, c'est certain qu'il est distinct du mécanisme de recombinaison des autres tyrosine recombinases.

1.4. OBJECTIFS.

La dissémination de la résistance aux antibiotiques par les intégrons de classe 1 est devenue un véritable problème cette dernière décennie. L'identification d'une nouvelle classe d'intégron dans *V. cholerae* qui est associé à des gènes de virulence est aussi inquiétante. La nature de cet intégron nous indique qu'il existe depuis très longtemps. Il pourrait donc nous servir comme modèle pour l'évolution des intégrons. Cet intégron a la propriété de capturer des gènes, permettant ainsi une évolution et une adaptation très rapide chez *V. cholerae*. Si ces nouveaux gènes permettent un avantage biochimique ou une plus grande virulence, ils seront probablement retenus et ils auront le potentiel d'être transmis de la même façon que les gènes de résistance sont transmis. Il est donc devenu essentiel de bien connaître les intégrons.

Ce projet a comme objectif de caractériser les interactions entre l'intégrase IntI4 de *V. cholerae* et les sites de recombinaison *attI4*, le site d'insertion de nouvelles cassettes dans l'intégron, et *attC*, la séquence palindrome retrouvée à l'extrémité de chaque cassette. Il nous sera ainsi possible de mieux comprendre ce qui différencie IntI4 des autres intégrases d'intégron, en ce qui concerne les sites de recombinaisons reconnus.

Une étude semblable a déjà été entreprise afin de caractériser les interactions entre l'intégrase de classe 1 (IntI1) et son site d'intégration *attI1*. Dans cette étude, quatre sites de liaison d'IntI1 ont été identifiés sur *attI1*: les régions -50, -30, -10 et 0 par rapport au site d'enjambement. Des résultats semblables sont attendus dans l'étude ici. Pour atteindre ce but, l'intégrase IntI4 est d'abord purifiée comme protéine de fusion avec la protéine liant le maltose (MBP-IntI4). La mise au point de la technique de gel de retardement pour cette protéine est ensuite effectuée. Des expériences permettant de localiser les sites de liaison de monomères d'IntI4 sont aussi réalisées.

CHAPITRE II

MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1. SOUCHES BACTÉRIENNES ET PLASMIDES.

La souche TB1 d'*E. coli* [F^- *ara* Δ (*lacproAB*) *rpsL*(Φ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR*] a été utilisée comme hôte pour surproduire la protéine de fusion MBP-Int14. Les souches JM109 [F' (*el4*) *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1* Δ (*lacproAB*) *traD36 proAB*⁺ *lacI*^qZ Δ M15] et HB101 [F^- *supE44ara-14 galK2 lacY1* Δ (*gpt-proA*)62 *rpsL20 xyl-5 mtl-1 recA12* Δ (*mcrC-mrr*) *hsdS20*] ont aussi été utilisées à d'autres fins.

2.2. MILIEUX DE CULTURE.

Le milieu de culture utilisé est le milieu Luria-Bertani (LB) (2% bacto-tryptone, 1% extrait de levure, 1% NaCl et 1,5% agar, si le milieu est solide) en présence ou non d'antibiotiques. Les antibiotiques pouvant être utilisés sont l'ampicilline (100 μ g/ml) (Sigma, Oakville, Ontario) et le chloramphénicol (25 μ g/ml) (Sigma). Dans certains cas, de l'IPTG (Isopropyl β -D-thiogalactopyranoside) (0,3mM) (Sigma) et du XGal (5 bromo- 4 chloro- 3 indolyl β -D-galactopyranoside) (40 μ g/ml) (Boehringer Mannheim, Laval, Quebec) ont été ajoutés aux milieux de culture afin de faire une sélection. Parfois, le LB est enrichi de glucose (0,2%).

Tableau 7. La description des plasmides utilisés.

Plasmides	Description
pACYC184	Vecteur de clonage d' <i>E. coli</i> (New England BioLabs, Mississauga, Ontario).
pMAL TM -c2	Vecteur de clonage d' <i>E. coli</i> utilisé pour la surproduction de protéines de fusion avec la protéine liant le maltose (MBP) (New England BioLabs).
pLQ423	La cassette <i>aadA1</i> de Tn21 insérée dans le vecteur pACYC184 (Labo. PH Roy).
pLQ426	La cassette <i>aadA1</i> de <i>S. marcescens</i> 909 insérée dans le vecteur pACYC184 (Labo. PH Roy).
pLQ428	Les cassettes <i>aacA1-orfG</i> et <i>orfH</i> de Tn2424 insérées dans le vecteur pACYC184 (Labo. PH Roy).
pVC3	Le gène <i>intI4</i> de <i>Vibrio cholerae</i> 569/B inséré dans un plasmide quelconque (Labo. D. Mazel).
pLQ369	Le gène <i>intI1</i> de pVS1 inséré dans le vecteur de surproduction pMal-c2 (Gravel et al., 1998).
pSU38:: <i>orf1-cat</i>	Un fragment incluant <i>VCR1</i> , <i>orf1</i> et <i>VCR2</i> de <i>V. cholerae</i> 569/B inséré dans le vecteur pSU38. Le fragment interne <i>C1a1</i> de l' <i>orf1</i> est remplacé par le gène <i>cat</i> de Tn9 (Mazel et al., 1998).

2.3. CLONAGES.

2.3.1. Purification d'ADN génomique.

L'ADN génomique de *Vibrio cholerae* (Type Inaba, 569/B) a été extrait et purifié selon le protocole de "Current Protocols in Molecular Biology" (1994; Chapitre 2.4). Cet ADN a été resuspendu dans du TE (EDTA 1mM et Tris-HCl 10mM, pH 8).

2.3.2. Clonage de la première cassette du super intégron de *V. cholerae*.

La première cassette (incluant le site *attI4*) du super-intégron de *V. cholerae* 569/B a été insérée dans le plasmide pACYC184 (Fig. 16). Le plasmide pACYC184 est un petit vecteur de clonage portant les gènes de résistances à la tétracycline et au chloramphénicol. Cette insertion inactive le gène conférant la résistance à la tétracycline. Ce nouveau plasmide, pLQ641, a servi comme matrice pour la synthèse des sondes *attI4* utilisées dans les gels de retardement.

2.3.2.1. L'amplification de l'insert d'ADN.

Premièrement, un fragment de 760-pb a été amplifié par une réaction en chaîne de la polymérase (PCR). Trois cycles de réactions entrent en jeu lors de l'amplification d'un segment d'ADN: on dénature l'ADN double brin par chauffage (1), puis on refroidit (2) en présence d'un grand excès de deux oligonucléotides qui correspondent aux séquences flanquant la région à amplifier. Ce refroidissement se fait jusqu'à la température qui permet l'hybridation des amorces sur l'ADN cible. L'ADN polymérase thermostable catalyse l'élongation de ces amorces et copie chacun des brins d'ADN (3). Les séquences des oligonucléotides utilisés sont indiquées dans le tableau 8.

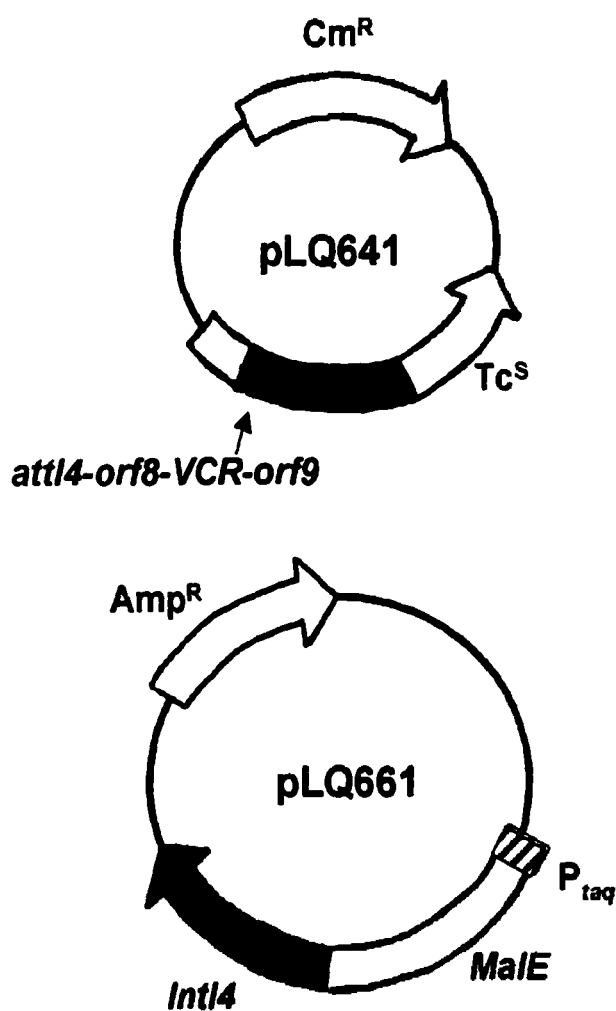


Figure 16. Les plasmides pLQ641 et pLQ661. Le plasmide pLQ641 est le résultat de l'insertion de la première cassette (incluant le site *attI4*) du super-intégron de *V. cholerae* dans le plasmide pACYC184. Cette insertion inactive le gène de résistance à la tétracycline. Le plasmide pLQ661 est le résultat de l'insertion du gène *intI4* du super-intégron de *V. cholerae* en aval du gène *maIE* dans le plasmide pMALTM-c2. Cette insertion inactive le gène *lacZ_{uv}*.

Tableau 8. Séquences des oligonucléotides utilisés.

Nom de l'oligo	Séquence
VC attI4-92	AGAAGGTTGTTATGGTAGTATG
VC orf9-Bg/II	CTGTGAAGATCTTTACCAAATG
IntI4L	ATGAAATCCCAGTTTTTGTAA
IntI4R	AATCTCATCAATTCGCAAAGAA
pMal-3'PL	AGTTGGGTAACGCCAGGGTTTT
pMal-5'PL	CGCGCAGACTAATTCGAGCT
VCattI4-15rev	TTCTTACCTTTCCAACAGGTAG
VcattI4-24for	AAGGTAAGAAGCTGTCTAGAAA
VCattI4+36rev	GCGTGAATTTTTGATGATTTTC
VCR2-91	GTTGACAGTCCCTCTTGAGG
VCR2-122	TTATAACAAACGCCTCAAGA
VCR2-164	TTAATGGTAAGTTTATGGGA
VCR2+29	TAGCTCTCATGATATCTCCA
VCR2-46for	TGTGTTTGAGTTTAGTGGTA
pACYC184 5'	TGTAGCACCTGAAGTCAGCC
pACYC184 3'	ATACCCACGCCGAAACAAG

L'ADN polymérase Pwo a été utilisée pour amplifier ce fragment car elle génère des molécules d'ADN à bouts francs et elle est plus fidèle que la Taq polymérase. Les réactifs nécessaires à cette amplification sont les suivants: les dNTPs (200 μ M de chaque dNTP), l'oligonucléotide VC attI4-92 (0,2 μ M), l'oligonucléotide VC orf9-Bg/II (0,2 μ M), le tampon PCR de Pwo (Tris-HCl 10mM pH 8,85, KCl 25mM (NH₄)₂SO₄ 5mM) (Boehringer Mannheim), du MgSO₄ (3mM), l'ADN génomique de *V. cholerae* (1ng/ μ l) et l'ADN polymérase Pwo (0,025U/ μ l)(Boehringer Mannheim). Un total de 50 μ l de mélange réactionnel est déposé par tube et recouvert d'huile minérale stérile afin d'empêcher l'évaporation.

Le PCR est effectué dans l'appareil DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, Mississauga, Ontario) dans les conditions suivantes: 2 minutes à 94°C (dénaturation), 10 cycles de {15 secondes à 94°C, 30 secondes à 50°C et 1 minute à 72°C}, 20 cycles de {15 secondes à 94°C, 30 secondes d'hybridation à 50°C et «1 minute + 5N secondes (N = Nombre de cycles effectués)» d'élongation à 72°C}, suivi de 7 minutes à 72°C.

2.3.2.2. Digestions.

Le vecteur pACYC184 (New England BioLabs) a été digéré par les enzymes *EcoRV* (Pharmacia, Peapack, New Jersey, USA) et *BamHI* (New England BioLabs). Environ 20 µg d'ADN a été incubé 2 heures à 37°C en présence de 2,5U de *EcoRV*, 125U de *BamHI*, de BSA (0,1 µg/ µl) et de "NEBuffer *BamHI*" (Tris-HCl 10mM pH 7,9, NaCl 150mM, MgCl₂ 10mM, dithiothréitol 1mM) (New England BioLabs). La digestion *EcoRV* produit un bout franc tandis que la digestion *BamHI* produit un bout cohésif.

Le produit PCR de la première cassette du super intégron de *V. cholerae* a été digéré par l'enzyme *BglII* (Pharmacia) selon les indications du manufacturier. Le produit PCR purifié par précipitation à l'éthanol a été incubé 2 heures à 37°C en présence de 28U de *BglII* et de tampon "One-Phor-All Plus" (1X) (Pharmacia). Cette digestion produit un bout cohésif à l'extrémité 5' du fragment qui est compatible avec le bout cohésif *BamHI* du vecteur pACYC184.

Ces deux produits de digestions ont ensuite été purifiés sur gel d'agarose (0,6%) avec la trousse de purification d'ADN sur gel (QIAquick Gel Extraction Kit) (QIAGEN, Mississauga, Ontario) selon les indications du manufacturier.

2.3.2.3. Ligature et transformation.

Afin d'insérer le produit PCR digéré dans le vecteur digéré, une réaction de ligature a été faite. 10,5 ng de l'insert et 60 ng (ratio insert : vecteur de 1:1) du vecteur ont été incubés pendant une nuit à 16°C en présence de 8,25U de T4 ADN ligase (Pharmacia) du tampon "One-Phor-All Plus" (1X).

Des cellules HB101 (*Escherichia coli*) compétentes préparées au CaCl₂ ont été transformées avec le produit de ligature, tel que décrit par Sambrook et al. (1989). La sélection des clones pLQ641 s'est faite en inoculant des pétris LB-chloramphénicol avec les cellules transformées. Afin de confirmer que le clone choisi était bon et qu'il n'y avait pas de mutations dans la région pertinente, la région *attI4* de l'insert a été séquencée (méthode de Sanger) à l'aide de l'amorce pACYC184 5'.

2.3.3. Clonage du gène *intI4* dans le vecteur pMALTM-c2.

Le gène *intI4* de *Vibrio cholerae* a ensuite été inséré dans le vecteur de surproduction pMALTM-c2. Ce clonage consiste à insérer le gène *intI4* en aval du gène *malE* d'*E. coli* qui code la protéine liant le maltose (MBP). Il en résulte un clone (pLQ661) qui permet l'expression de la protéine de fusion MBP-IntI4 (Fig. 16). De plus, le gène *malE* est fusionné au gène *lacZ_α* et il y a un site de clonage polyvalent entre ces deux gènes. S'il y a une insertion à ce site, il y a inactivation du fragment α de la β -galactosidase, pour ainsi donner des colonies blanches au lieu de bleu sur un milieu XGal lorsque le vecteur est transformé dans une souche α -complémentaire tel que TB1.

2.3.3.1. Amplification de l'insert d'ADN.

Premièrement, un fragment d'ADN contenant le gène *intl4* a été amplifié par PCR (tel que décrit à la section 2.3.2.1.) en utilisant les oligonucléotides Intl4L (0,2 μ M) et Intl4R (0,2 μ M). Le début de l'oligonucléotide Intl4L correspond au début du gène *intl4* tandis que l'oligonucléotide Intl4R correspond à une séquence en aval du gène *intl4*. La séquence de l'oligonucléotide Intl4R n'est pas identique à celle de son site d'hybridation; un site de digestion *EcoRI* a été introduit par la substitution d'une adénine pour une thymine.

Le PCR est effectué dans l'appareil DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer) dans les conditions suivantes: 2 minutes à 94°C, 10 cycles de {15 secondes à 94°C, 30 secondes à 53°C et 1 minute à 72°C}, 20 cycles de {15 secondes à 94°C, 30 secondes à 53°C et «1 minute + 5N secondes (N = Nombre de cycles effectués) » à 72°C}, suivi de 7 minutes à 72°C.

2.3.3.2. Digestions enzymatiques.

Le vecteur pMALTM-c2 (New England BioLabs) a été digéré séquentiellement par les enzymes *XmnI* (New England BioLabs) et *EcoRI* (New England BioLabs). La digestion *XmnI* produit un bout franc tandis que la digestion *EcoRI* produit un bout cohésif. L'insertion du gène *intl4* au site *XmnI* de pMALTM-c2 va créer un gène de fusion *malE-intl4*.

Environ 6 μ g d'ADN ont été incubés 2 heures à 37°C en présence de 28U de *XmnI* et de Tampon NEB#2 (Tris-HCl 10mM pH 7,9, NaCl 50mM, MgCl₂ 10mM, dithiothréitol 1mM) (New England BioLabs). Cette digestion a été arrêtée par l'inactivation de *XmnI* à la chaleur (65°C; 20 minutes). Ensuite, l'ADN a été digéré par *EcoRI* en ajoutant 28U de cette enzyme et en incubant à 37°C pendant 2 heures.

Le produit PCR du fragment *intl4* a été digéré par l'enzyme *EcoRI* (New England BioLabs) selon les indications du fabricant. Le produit PCR purifié par précipitation à l'éthanol a été incubé 2 heures à 37°C en présence de 28U de *EcoRI* et de tampon "NEB *EcoRI*" (Tris-HCl 100mM pH 7,9, NaCl 50mM, MgCl₂ 10mM, TritonX[®]-100 0,025%) (New England BioLabs).

Ces deux produits de digestions ont ensuite été purifiés sur gel d'agarose (0,65%) avec la trousse de purification d'ADN sur gel (QIAquick Gel Extraction Kit) (QIAGEN) selon les indications du fabricant.

2.3.3.3. Ligature et transformation.

Afin d'insérer le produit PCR digéré dans le vecteur digéré, une réaction de ligature a été faite. Un total de 15 ng de l'insert et 100 ng du vecteur (ratio insert : vecteur de 1:1) ont été incubés pendant une nuit à 14°C en présence de 9U (1.6ul) T4 ADN ligase (Pharmacia), du tampon "One-Phor-All Plus" (1X) et d'adénosine triphosphate (1mM).

Des cellules TB1 (*Escherichia coli*) compétentes préparées au CaCl₂ ont été transformées avec le produit de ligature, tel que décrit par Sambrook et al. (1989). La sélection des clones pLQ661 s'est faite en inoculant des pétris LB-ampicilline-Xgal-IPTG avec les cellules transformées. Les cellules avec un vecteur ayant incorporé l'insert sont blanches tandis que les autres sont bleues. Afin de confirmer que le clone choisi était bon et qu'il n'y avait pas de mutations dans le gène *intl4*, cette région du clone a été séquencée (méthode de Sanger) à l'aide des amorces pMal-3'PL et Pmal-5'PL.

2.4. TEST D'EXCISION *IN VIVO* DE IntI4 ET LA MBP-IntI4.

Afin de déterminer si l'intégrase IntI4 est capable d'exciser des cassettes d'intégrons, un test de recombinaison *in vivo* a été effectué. Des cellules exprimant l'intégrase IntI4 ont été transformées avec un dérivé de pACYC184 contenant une cassette d'intégron (pLQ423, pLQ426, pLQ428 ou pLQ641). Après une induction de la production d'IntI4, l'ADN est extrait et un PCR est effectué avec les oligonucléotides pACYC184 5' et pACYC184 3'. Ces oligonucléotides se trouvent de part et d'autre de la séquence insérée dans le vecteur pACYC184. La longueur de l'amplicon produit permet de déterminer si une cassette a été excisée ou non.

D'abord, du milieu LB-ampicilline-chloramphénicol est inoculé avec une colonie de JM109 exprimant pLQ661 et l'un des dérivés de pACYC184 (Tableau 7). Cette culture est incubée à 37°C pendant une nuit. Un milieu LB-ampicilline-chloramphénicol-glucose est inoculé avec cette pré-culture ($1/50$ du volume total) et incubé à 37°C. Lorsque la densité optique (600nm) est à $\sim 0,5$, l'IPTG est ajouté à une concentration de 0,4mM et l'induction se poursuit à 37°C pendant une nuit. Les plasmides de ces cultures sont extraits à l'aide de la trousse Perfect Prep™ (5 Prime→3 Prime, Inc), tel que suggéré par le manufacturier.

Pour détecter si une cassette a été excisée par MBP-intI4, un PCR de cet ADN est effectuée en utilisant les oligonucléotides pACYC184 5' et pACYC184 3'. L'amplification se fait à l'aide de la Taq polymérase en présence de: les dNTPs (200 μ M de chaque dNTP), l'oligonucléotide pACYC184 5' (0,2 μ M), l'oligonucléotide pACYC184 3' (0,2 μ M), le tampon PCR de la Taq (Tris-HCl 10mM pH 8,5, KCl 50mM, Triton®X-100 0,1%) (Promega, Madison Wisconsin, USA), du MgCl₂ (1,5mM), l'ADN matrice (~ 1 ng/ μ l) et l'ADN polymérase Taq (0,025U/ μ l) (Promega). L'amplification se fait dans les conditions suivantes: 10 minutes à 94°C, 30 cycles de {1 minute à 94°C, 1 minute 55°C et 2 minute à 72°C}, suivi de 10 minutes à 72°C. Du colorant à échantillon 5X (bleu de bromophénol 0,25%; sucrose 35%) est ajouté au produit PCR. Le produit PCR coloré est déposé sur un

gel d'agarose (agarose 1,1%, bromure d'éthidium 3µg/ml dans du TBE 1X) et migré à ~7V/cm pendant 1 heure dans du tampon TBE 1X. L'ADN est visualisé par une lampe ultraviolette.

Pour s'assurer que la portion *Int14* de la protéine de fusion n'a pas perdu son activité, un test d'excision est effectué. Ce test d'excision est effectué tel que décrit ci-dessus, en utilisant une culture de JM109 exprimant pLQ661 et pLQ428.

2.5. SURPRODUCTION ET PURIFICATION DE LA MBP-*Int14*.

Suivant le clonage de *Int14* dans pMALTM-c2, il a été possible de surproduire et purifier la protéine de fusion MBP-*Int14*. Le gène de fusion *malE-Int14* est sous le contrôle du promoteur fort "tac", qui permet un haut niveau d'expression. Dans la plupart des cas, les protéines de fusion exprimées du pMALTM-c2 représentent de 20 à 40% du total des protéines cellulaires.

2.5.1. Surproduction.

D'abord, 10ml de milieu LB-ampicilline est inoculé avec une colonie de TB1 (pLQ661) et incubé à 37°C pendant une nuit. Un litre de milieu LB-ampicilline enrichi de glucose (0,2%) est ensuite inoculé avec cette pré-culture et incubé à 37°C. Lorsque la densité optique à 600nm atteint environ 0,5 (soit environ 3,5 heures d'incubation), la surproduction de la protéine de fusion est induite par l'ajout d'IPTG (0,3mM). Suite à une induction d'environ 16 heures à 30°C, les cellules TB1 (pLQ661) sont recueillies par une centrifugation de 10 minutes à 6000 g. Les culots de cellules sont resuspendus dans 60ml de tampon de colonne (Tris-HCl 20mM, NaCl 200mM et EDTA 1mM) et congelés à -20°C pendant une nuit.

La purification de MBP-*Int11* à partir de TB1(pLQ369) (Gravel et al., 1998) est faite de la même façon, sauf que l'induction était de 3 heures, à 37°C.

2.5.2. Purification.

Toutes les étapes de la purification sont effectuées à 4°C ou sur glace afin de minimiser la dénaturation des protéines. D'abord, les cellules resuspendues sont dégelées lentement dans de l'eau froide (afin d'éviter la dénaturation) et passées dans la presse de French (SLM instruments Inc., Rochester, New York, USA) deux fois à 1000 psi. Suite à une centrifugation de 30 minutes à 9000 g, l'extrait cru (i.e. la fraction soluble) est dosé par le test Bradford (Ausubel et al., 1987, chapitre 10.1) et diluée afin d'obtenir un extrait cru d'environ 2,5mg de protéines/ml. Cet extrait est déposé et élué sur une colonne de 2ml de résine d'amylose (New England BioLabs), où la protéine de fusion se fixe à la résine. Après le lavage de la colonne avec 20ml de tampon de colonne, la protéine de fusion est éluée avec une solution de tampon de colonne enrichie de maltose (20mM). La MBP-Int14 éluée est dosée par le test Bradford et entreposée à -20°C dans du glycérol (25%).

2.6. ANALYSE DE LA SURPRODUCTION PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR GEL SDS-PAGE.

2.6.1. Préparation du gel.

Afin d'analyser les protéines purifiées, on les électrophorèse sur gel discontinu de polyacrylamide-SDS (SDS-PAGE). Le système Mini-PROTEAN® II Dual Slab Cell (BIO-RAD) est utilisé à cette fin. D'abord, les plaques de verre sont montées tel que suggéré par le fabricant en utilisant des espaceurs de 1mm. Le gel de séparation est coulé en premier. On mélange l'acrylamide (9,5%), le bis-acrylamide (0,5%), le Tris-Cl (0,375M; pH 8,8) et le SDS (0,1%) et on polymérise l'acrylamide par l'ajout de persulfate d'ammonium (0,3mg/ml) et de TEMED (N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine) (0,07%). Lorsque le gel de séparation est bien polymérisé, le gel de tassement est coulé. Celui-ci est composé d'acrylamide (4,3%), de bis-acrylamide (0,2%), Tris-Cl (0,125M; pH 6,8) et SDS (0,4%) et on

polymérise l'acrylamide par l'ajout de persulfate d'ammonium (0,6mg/ml) et de TEMED (0,2%). Un peigne est mis en place et on attend la polymérisation.

Suite à la polymérisation, les gels sont installés dans l'appareil à électrophorèse, les réservoirs sont remplies de tampon d'électrode (Tris-Cl (25mM, glycine 192mM et SDS 0,1%), les peignes sont enlevés et les puits sont rincés avec le tampon.

2.6.2. Préparation des échantillons.

Les échantillons sont d'abord dilués avec du tampon d'échantillon 2X (Tris-HCl 0,125mM, pH 6,8, SDS 6%, glycérol 20%, β -mercaptoéthanol 5% et bleu de bromophénol (trace)). Les échantillons sont chauffés dans de l'eau bouillante pendant 4 minutes, centrifugés 1 minute à vitesse maximale dans une microcentrifugeuse et déposés dans les puits d'un gel SDS-PAGE.

2.6.3. Électrophorèse et coloration du gel.

Lorsque tous les échantillons sont déposés, un voltage de 15,4V/cm est appliqué. La migration est arrêtée lorsque le bleu du tampon d'échantillon est rendu au bas du gel. À ce temps, le gel est enlevé des plaques et placé dans un colorant (bleu de Coomassie 0,15%, acide trichloroacétique 10%, acide acétique 10% et méthanol 40%) pendant environ 1 heure. Le gel coloré est décoloré dans une solution d'acide acétique (12,5%) et d'isopropanol (12,5%) pendant quelques heures. Le gel est finalement séché à 80°C sous vide. Cette coloration/décoloration permet de révéler des bandes de protéines dans le gel.

2.7. IMMUNOADSORPTION.

Pour confirmer de façon absolue la présence de la MBP-IntI4, une immunoabsorption avec le sérum Anti-MBP a été faite. D'abord, un SDS-PAGE de la MBP-IntI4 est effectué, tel que décrit précédemment. Les protéines sont alors électro-éluées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 micron; NitroBind) avec un appareil de transfert Western (BIO-RAD, Mississauga, Ontario). Le transfert se fait tel que décrit dans Ausubel et al. (1993; chapitre 10.8), dans le tampon TGM (Tris-HCl 22mM, glycine 192mM, méthanol 20%), à 14V et 4°C pendant une nuit.

L'immunoabsorption primaire a été faite tel que décrit dans Ausubel et al. (1993; chapitre 10.8): la membrane est incubée une heure dans 100ml de la solution de blocage TBS-T (NaCl 150mM, Tris-HCl 20mM pH 7,4 et Tween-20 0,25%). La membrane est ensuite incubée dans 40ml de TBS-T/Ac-MBP (sérum anti-MBP (New England BioLabs) dilué 1:10 00 dans du TBS-T) pendant 1 heure. Cette membrane est lavée, à quatre reprises, dans du TBS-T pendant 15 minutes, à la température de la pièce.

L'immunoabsorption secondaire a été faite avec les réactifs de la trousse " Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus" (NEN™ Life Science Products, Guelph, Ontario), tel que suggéré par le fabricant. La membrane est incubée dans de l'IgG(lapin)-peroxidase de raifort (dilué 1:2000 dans du TBS-T) pendant 1 heure et lavé, à quatre reprises, dans du TBS-T pendant 10 minutes. La membrane est incubée pendant 1 minute dans le réactif de chemiluminescence (solution de luminol/H₂O₂/p-iodophénol) et exposé sur un film (Kodak Biomax, Montréal, Québec) pendant quelques secondes.

2.8. GELS DE RETARDEMENT.

Les interactions ADN-protéines peuvent facilement être détectées par électrophorèse sur gel d'acrylamide non-dénaturant (gel de retardement). Cette technique est basée sur l'observation que les complexes ADN-protéine migrent plus lentement que l'ADN "libre" lors d'une électrophorèse sur gel d'acrylamide non-dénaturant. Dans une expérience typique de gel de retardement, une protéine liant l'ADN est incubée brièvement avec une molécule d'ADN marquée radioactivement et contenant le site de liaison putatif. Ce mélange est ensuite soumis à une électrophorèse sur gel d'acrylamide non-dénaturant. Lorsque la protéine forme un complexe avec l'ADN, la mobilité de l'ADN est réduite. Après avoir fait l'autoradiographie du gel, on observe donc une bande qui correspond à l'ADN libre et une ou plusieurs bandes qui correspondent à différents complexes ADN-protéine. Le nombre de bandes d'ADN complexé varie selon le nombre de monomères protéiques qui se sont liés à l'ADN.

2.8.1. Préparation du gel.

Afin de détecter les interactions ADN-protéine, on électrophorèse un mélange d'ADN et d'une protéine sur gel d'acrylamide non-dénaturant. Le système PROTEAN® II xi Cell (BIO-RAD) est utilisé à cette fin. D'abord, les plaques de verres sont montées tel que suggéré par le fabricant en utilisant des espaceurs de 1mm. Un mélange d'acrylamide (4,75%), de bis-acrylamide (0,25%), de TBE 0,5X (Tris-HCl 45mM, acide borique 45mM et EDTA 10mM pH 8,0), de TEMED (0,1%) et de persulfate d'ammonium (0,7mg/ml) est coulé entre les plaques de verres et un peigne est installé. Lorsque l'acrylamide est polymérisé, le gel est installé dans l'appareil et du TBE (0,5X) est versé dans les réservoirs. Le peigne peut maintenant être enlevé et les puits sont rincés. Avant le dépôt des échantillons, le gel est soumis à une pré-électrophorèse à 20V/cm pendant au moins 30 minutes.

2.8.2.1. Préparation de sondes d'ADN.

Les sondes d'ADN utilisées dans les gels de retardement sont synthétisées par PCR en utilisant un oligonucléotidemarqué à la radioactivité. D'abord, 20pmol d'un des deux oligonucléotides servant à faire le fragment PCR radioactif sont marquées à l'extrémité 5' par du [γ - ^{32}P ou γ - ^{33}P] ATP (20 μCi , 6,7pmol; Easytides™ (Mandel, St-Laurent, Québec)) et 9,8U de la T4 polynucléotide kinase (Pharmacia), dans du tampon "One-Phor-All Plus" (1X) (Le mélange est incubé à 37°C pendant 1 heure). Le fragment voulu (Tableau 9) est ensuite amplifié en utilisant l'oligonucléotidemarqué et un oligonucléotidenon-marqué en présence de l'ADN contenant la séquence à amplifier. Cette amplification se fait à l'aide de la Taq polymérase en présence de: les dNTPs (200 μM de chaque dNTP), l'oligonucléotidemarqué (0,2 μM), l'oligonucléotidenon-marqué (0,2 μM), le tampon PCR de la Taq (Promega), du MgCl_2 (Tableau 9), l'ADN matrice (1ng/ μl) et l'ADN polymérase Taq (0,025U/ μl) (Promega). L'amplification se fait dans les conditions suivantes: 10 minutes à 94°C, 30 cycles de {1 minute à 94°C, 1 minute d'hybridation (voir tableau 9) et 1 minute à 72°C}, suivi de 10 minutes à 72°C. Finalement, le produit PCR est purifié en le déposant sur une colonne (1ml) de Séphadex G-50 (Pharmacia) et en centrifugeant (Sorvall RT 6000B, Mississauga, Ontario) à 1050 g pendant 3,5 minutes.

Tableau 9. Les variables dans les réactions PCR des différentes sondes.

Fragments	Oligonucléotide 5' et oligonucléotide 3'	Matrice d'ADN	[MgCl ₂] (mM)	Température d'hybridation (°C)
<i>attI4</i> -long	VC <i>attI4</i> -92 VCattI4+36rev	pLQ641	1,5	43
<i>attI4</i> -5'	VC <i>attI4</i> -92 VCattI4-15rev	pLQ641	1,5	43
<i>attI4</i> -3'	VCattI4-24for VCattI4+36rev	pLQ641	3,0	43
<i>VCR2</i> -long	VCR2-164 VCR2+29	pSU38:: <i>orf1-cat</i> *	2,5	51
<i>VCR2</i> -5'	VCR2-164 VCR2-91	pSU38:: <i>orf1-cat</i> *	2,5	45
<i>VCR2</i> -3'long	VCR2-122 VCR2+29	pSU38:: <i>orf1-cat</i> *	3,0	50
<i>VCR2</i> -3'	VCR2-46for VCR2+29	pSU38:: <i>orf1-cat</i> *	2,0	45

* pSU38::*orf1-cat*: la cassette *orf1* insérée dans le vecteur pSU38 (Mazel et al., 1998)

Afin d'identifier certaines régions liées par IntI4, des gels de retardement ont aussi été effectués avec des fragments *attI4* raccourcis par digestion enzymatique. Environ 10⁶cpm de la sonde *attI4*-3' marquée au brin supérieur a été digérée par 3U de *DdeI* (Pharmacia) dans le tampon "One-Phor-All Plus" (1X) à 37°C pendant environ 4 heures. La même quantité d'*attI4*-5' marquée au brin inférieur a été digérée par 1U de *DraIII* (New England BioLabs) dans le tampon NEB#3 (Tris-HCl 50mM pH 7,9, NaCl 100mM, MgCl₂ 10mM, dithiothréitol 1mM) et du BSA (0,1µg/µl) à 37°C pendant une nuit.

2.8.3. Préparation des échantillons et migration sur gel.

La réaction de liaison de la MBP-IntI4 à l'ADN se fait dans un total de 10µl. De 62,5 à 125 pmol de MBP-IntI4 purifié est ajouté à un mélange contenant du Tris-

HCl (66mM, pH 7.5), du $MgCl_2$ (6mM), du Triton X[®]-100 (0,02%), du dithiothréitol (3mM), du poly-(dIdC) (0.05 μ g/ μ l) (Sigma), et \sim 0.01pmol (20 000 cpm) d'un fragment d'ADN marqué. Du glycérol a aussi été ajouté afin d'obtenir une concentration finale de 10%. Dans certains cas, de l'ADN non-radioactif, de la MBP ou du sérum Anti-MBP sont ajoutés au mélange. L'ADN non-marqué est identique à la sonde utilisée, sauf qu'il n'est pas marqué radioactivement. Cet ADN agit comme compétiteur spécifique dans un gel de retardement.

Suite à une incubation de 15 minutes à température de la pièce, les échantillons sont déposés dans les puits et migrés à un voltage de 7,5 à 9V/cm. Après une migration d'environ 2,5 heures, le gel est transféré sur un papier 3M, recouvert d'une pellicule de plastique et séché sous vide à 80°C. Le gel séché est autoradiographié sur un film Kodak BioMax pendant une nuit à -70°C. Après l'exposition, le film est développé et les bandes d'ADN complexé et libre sont révélées.

2.9. INTERFÉRENCE PAR MÉTHYLATION.

L'interférence par méthylation est une bonne méthode disponible pour déterminer les séquences spécifiques d'ADN reconnues par des protéines (Fig. 17). Le DMS (diméthyle sulfate) ajoute un groupement méthyle à la position N7 de la guanine dans le grand sillon et à la position N3 de l'adénine dans le petit sillon de l'ADN double brin (Wissmann et Hillen, 1991). Les N7 des guanines et N3 des adénines peuvent former des liens hydrogènes avec les acides aminés (Pabo et Sauer, 1992) et la méthylation de ces bases peut empêcher la formation de complexes ADN-protéines (Blakely et Sherratt, 1994).

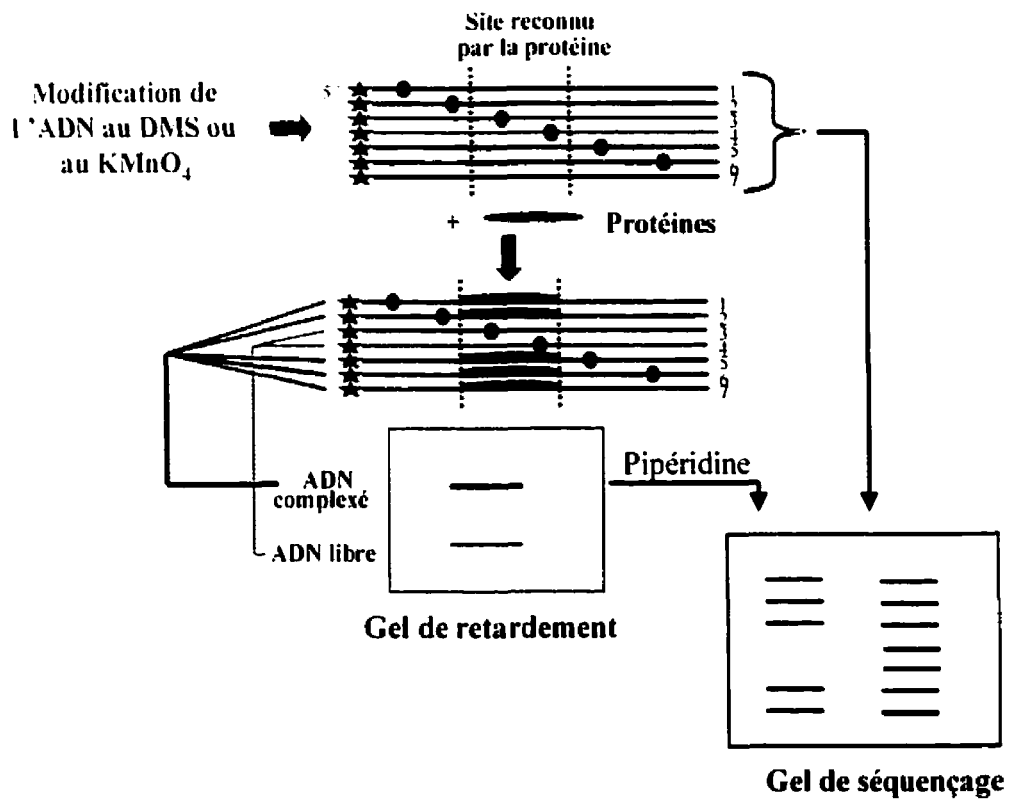


Figure 17. Principe de l'interférence au DMS et au KMnO_4 . Les lignes bleues et vertes représentent l'ADN et les petits points noirs sur ces lignes représentent les bases modifiées.

2.9.1. Modification au DMS.

Pour déterminer les sites essentiels à la formation d'un complexe, un fragment d'ADN marqué au ^{32}P (Section 2.8.2.) est traité au DMS dans des conditions tels que la plupart des molécules d'ADN n'ont pas subi plus d'une méthylation. Le traitement est effectué tel que décrit dans "Current Protocols in Molecular Biology" (Chapitre 12.3). D'abord, $\sim 4 \times 10^6$ cpm de sonde d'ADN marqué est ajouté à 1 μl de diméthyle sulfate (DMS) et 200 μl de tampon DMS (cacodylate de sodium 50mM, pH 8,0 et EDTA 1mM, pH 8,0). Après 5 minutes d'incubation à la température de la pièce, 40 μl d'acétate de sodium(3M, pH 5,0), 10 μg de tRNA et 600 μl d'éthanol 99% sont ajoutés et le tout est placé à -70°C pendant au moins 15 minutes pour précipiter l'ADN. L'ADN précipité est centrifugé 10 minutes à vitesse maximale d'une microcentrifugeuse (à 4°C). Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu dans 300 μl d'acide acétique (0,3M). Trois volumes (900 μl) d'éthanol (99%) sont ajoutés et l'ADN est reprécipité à -70°C , pendant 15 minutes. L'ADN est précipité dans le tube par une centrifugation de 10 minutes à vitesse maximale d'une microcentrifugeuse (à 4°C). Le surnageant est jeté et l'ADN est reprécipité avec l'acide acétique et l'éthanol. Après cette dernière précipitation, le culot est séché et resuspendu dans du TE.

2.9.2. Gel de retardement et électro-élution.

Suivant ce traitement, un gel de retardement est effectué pour séparer l'ADN complexé de l'ADN non-complexé. Ce gel est effectué tel que décrit précédemment (Section 2.8.), sauf pour deux modifications: 1) une plus grande quantité d'ADN est utilisée ($\sim 125\ 000\text{cpm}$) et 2) le gel n'est pas séché.

Après avoir identifié l'endroit où se trouve l'ADN complexé par l'autoradiographie, cet ADN est électro-élué du gel. D'abord, des bandes de gel d'acrylamide correspondant aux complexes ADN-protéine et à l'ADN non complexé sont

çoupées. Chaque bande est placée dans un petit trou coupé d'un gel d'agarose (1%). Un morceau de membrane de cellulose DEAE NA45 (Schleicher & Schuell) est placé à ~5mm du morceau de gel d'acrylamide (Fig. 18). Le gel d'agarose dans du tampon TBE (1X) est soumis à 7,8V/cm pendant ~40 minutes. La membrane est ensuite placée dans suffisamment de tampon NET (NaCl 1M, EDTA 0,1mM, Tris-HCl 20mM, pH 8,0) pour qu'elle soit complètement submergée (~250 μ l) et incubé à 65°C pendant 45 minutes. L'ADN, se trouvant maintenant dans le tampon NET, est précipité avec 3 volumes d'éthanol 99% à -20°C. Après au moins 5 heures à -20°C, le tube est centrifugé à vitesse maximale d'une microcentrifugeuse pendant 10 minutes (à 4°C). Afin d'éliminer l'excès de NaCl, le culot d'ADN est resuspendu dans de l'acétate de sodium (0,3M), 3 volumes (900 μ l) d'éthanol (99%) sont ajoutés et l'ADN est reprécipité à -70°C, pendant au moins 15 minutes. L'ADN est précipité dans le tube par une centrifugation de 10 minutes à vitesse maximale d'une microcentrifugeuse (à 4°C). Le surnageant est jeté et l'ADN est séché.

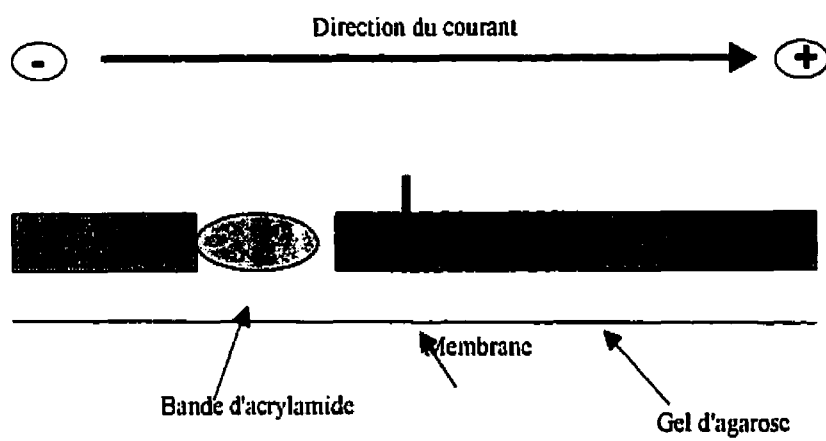


Figure 18. Schéma de l'électro-élution de l'ADN du gel d'acrylamide.

2.9.3. Coupure de l'ADN par la pipéridine.

Le pipéridine est un réactif utilisé pour couper l'ADN aux sites de modifications chimiques. Le culot d'ADN qui vient d'être électro-élué est resuspendu dans 100 μ l de pipéridine 1M, chauffé à 90°C pendant 30 minutes et lyophilisé à sec dans le Savant SpeedVac. L'ADN est resuspendu dans 40 μ l d'eau et lyophilisé à sec à deux reprises. L'ADN est resuspendu dans bleu de séquençage (formamide 98%, xylène cyanol FF 0,025%, bromophénol bleu 0,025% et EDTA 10mM, pH 8,0), quantifié par un comptage à scintillation (Beckman LS6000TA, Mississauga, Ontario) et, si nécessaire, dilué avec du bleu de séquençage.

2.9.4. Gel de séquençage.

En analysant cet ADN sur un gel de séquençage, il est finalement possible de déterminer lesquels des sites méthylés ont interféré dans la formation du complexe. Les résidus guanines et adénines qui interfèrent avec la liaison sont révélés par l'absence des fragments modifiés à ces résidus dans le puit de l'ADN complexé, mais leur présence dans le puit de l'ADN non-complexé coupé par la pipéridine.

Cette technique utilise un gel de polyacrylamide dénaturant, qui permet la résolution (au nucléotide près) de fragments d'ADN monocaténares. D'abord, la plaque thermostatée et la plaque de verre isothermique (Macrophor LKB, Pharmacia) sont lavées soigneusement avec de l'eau et de l'éthanol 99%. Afin d'empêcher le gel de coller aux plaques, celles-ci sont siliconisées en polissant avec du Sigmacote[®] (Sigma) et repolies avec de l'éthanol. Des espaceurs (0,4mm d'épaisseur) sont fixés sur la plaque thermostatée avec des pinces et la plaque isothermique est posée au-dessus des espaceurs.

En chauffant (environ 20 min.), de l'urée (0,5g/ml) est dissout dans de l'acrylamide (7,6%), du bis-acrylamide (0,4%) et du TBE(1X). Lorsque le mélange est refroidi, du persulfate d'ammonium (0,25mg/ml) et du TEMED (0,09%) sont ajoutés et le mélange est coulé entre les deux plaques légèrement inclinées. Les plaques sont remises à l'horizontale, la plaque isothermique est bien fixée à la plaque thermostatée avec les pinces et le peigne est inséré. Après 1 heure de polymérisation, le montage est fixé à la cloche LKB, les tuyaux d'arrivée d'eau sont branchés et la circulation d'eau (55°C) est démarrée. Les cuves sont remplies de TBE (1X), les peignes sont retirés, les puits sont rincés et on procède à une pré-électrophorèse de 30 minutes à 22,6V/cm.

Les échantillons sont ensuite chauffés à 95°C afin de dénaturer l'ADN, placés sur glace et déposés dans les puits bien rincés. Afin d'être capable de comparer les échantillons, des quantités équivalentes d'ADN (mesuré au compteur à scintillation) sont déposées dans chaque puit. L'électrophorèse est effectuée à ~28V/cm jusqu'à ce que le xylène cyanol ait migré 2/3 du trajet. À la fin de l'électrophorèse, le montage est défait et le gel est transféré sur un papier Whatman® 3MM Chr (Toronto, Ontario), recouvert d'une pellicule de plastique et séché sous vide à 80°C. Le gel séché est autoradiographié sur un film Kodak BioMax pendant au moins une nuit à -70°C. Après l'exposition, le film est développé et les bandes d'ADN sont révélées.

2.10. INTERFÉRENCE AU PERMANGANATE DE POTASSIUM.

Le permanganate de potassium (KMnO_4) permet d'identifier les résidus thymines en oxydant le lien double entre le C5 et C6 des thymines d'ADN simple brin pour ainsi produire la forme glycol (Panigrahi et al., 1992). Cette modification nuit aux interactions ADN-protéines et permet ainsi d'identifier les résidus thymines du site de reconnaissance (Fig. 17).

Pour déterminer les sites essentiels à la formation d'un complexe, un fragment d'ADN marqué au ^{32}P est traité au permanganate de potassium dans des conditions tels que la plupart des molécules d'ADN n'ont pas subi plus d'une modification. D'abord, $\sim 4 \times 10^6$ cpm de sonde d'ADN marqué (Section 2.8.2) dans du Tris-HCl (22mM, pH 8,0) est chauffée à 100°C pendant 3 minutes. Le KMnO_4 est ajouté à une concentration finale de 0,1mM et le mélange est incubé à la température de la pièce pendant 12 minutes. L'ADN est purifié sur une colonne de Séphadex G-50 (Section 2.8.2.). De l'éthanol 99% (2,5 volumes d'ADN) et de l'acétate de sodium 3M pH 5,0 ($1/9$ volume d'ADN) sont ajoutés afin de précipiter l'ADN à -70°C pendant 45 minutes. Le tube est centrifugé pendant 10 minutes à 4°C et à la vitesse maximale dans une microcentrifugeuse. Le surnageant est jeté et le culot est lyophilisé au "SpeedVac" et resuspendu dans 10 μ l de TE. Suivant ce traitement, un gel de retardement est effectué pour séparer l'ADN complexé de l'ADN non-complexé. Ce gel est effectué tel que décrit précédemment (Section 2.9.2.). Ensuite, cet ADN est électro-élué, coupé au pipéridine et analysé sur gel de séquençage tel que décrit à la section 2.9.

2.11. DÉTERMINATION DES SITES DE LIAISON D'Int14 PAR GEL DE RETARDEMENT AVEC UNE POPULATION MIXTE DE FRAGMENTS *att14*.

Un mélange de sondes *att14* variant en longueur (de 20-pb à pleine longueur) est d'abord préparé par une méthode semblable à la réaction de séquençage didésoxy (Ausebel et al., 1994; chapitre 7.4). Afin de déterminer plus spécifiquement les sites de liaison d'Int14, cette population de sondes *att14* est utilisée dans un gel de retardement et les ADN complexés sont analysés sur gel de séquençage. Le principe de cette technique est semblable aux interférences chimiques, sauf que l'ADN est coupé avant le gel de retardement (Fig. 19).

Le mélange de sondes *attI4* est préparé à partir de 1pmol de matrice (produit PCR d'*attI4-5'* ou *attI4-3'*), 4pmol d'oligonucléotidemarqué, 5U d'ADN polymérase Taq (Promega), du Tampon Taq (1X) (Promega), du MgCl₂ (1,3mM) et le mélange "Taq Sanger". Le mélange "Taq Sanger" est composé soit de dNTPs, ddATP et ddGTP, soit de dNTPs, ddTTP et ddCTP. Dans le premier cas, on retrouve 13mM de chaque dNTP, 130mM de ddATP et 193mM de ddGTP dans le mélange final. Dans le deuxième cas, on retrouve 13mM de chaque dNTP, 435mM de ddCTP et 452mM de ddTTP dans le mélange final. Le mélange est incubé à 94°C pendant 2 minutes, à 43°C pendant 1 minute et à 72°C pendant 10 minutes. On retrouve maintenant des molécules d'ADN composés d'un brin complet et d'un brin dont l'élongation a été arrêtée par l'incorporation d'un ddNTP.

Lorsque le mélange s'est refroidi, l'ADN est purifié sur une colonne de Séphadex G-50 (Section 2.8.2.) par une centrifugation à 1050 g pendant 4,5 minutes. L'ADN simple brin protubérant du brin complet est digéré par 5 U de nucléase Mung Bean (New England BioLabs). Cette digestion a lieu dans du tampon NEB#1 (1X) à 30°C. Après 30 minutes d'incubation, la nucléase est inactivée par du SDS (0,01%). L'ADN est purifié sur une colonne de Séphadex G-50 afin d'éliminer le SDS.

Un gel de retardement est effectué tel que décrit précédemment (Section 2.8), sauf pour trois modifications: 1) une plus grande quantité d'ADN est utilisée (~ 150 000cpm), 2) le gel est moins concentré en acrylamide (3,75%) et 3) le gel n'est pas séché. Ensuite, cet ADN est électro-élué et analysé sur gel de séquençage tel que décrit à la section 2.9.

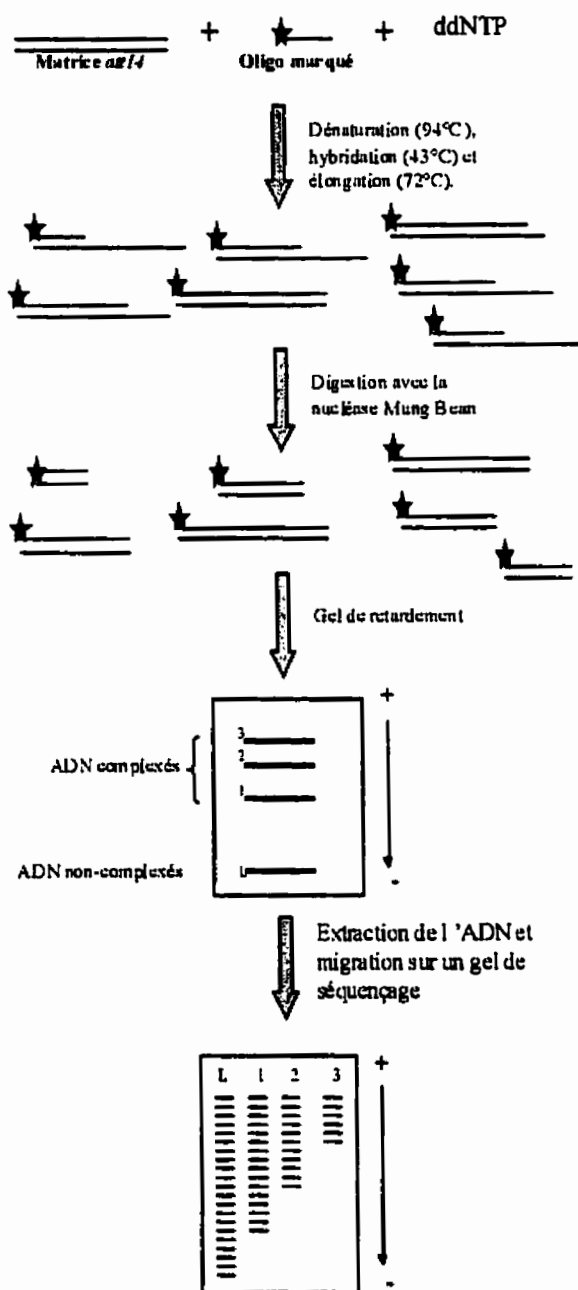


Figure 19. Principe de l'usage d'une population de fragments *attI4* pour déterminer les sites de liaison d'*IntI4*.

CHAPITRE III

RÉSULTATS ET DISCUSSION

3.1. LES CLONES pLQ661 et pLQ641.

La première cassette du super-intégron de *Vibrio cholerae* a été insérée dans le vecteur pACYC184. Afin de confirmer que ce clone (pLQ641) est bon, la région *attI4* de l'insert a été séquencée en utilisant l'amorce pACYC184 5'. Aucune mutation dans la région *attI4* n'a été détectée. Le clone peut donc servir comme matrice à la synthèse de fragments *attI4*. Le gène *intI4* du super-intégron de *Vibrio cholerae* a été inséré dans le vecteur pMAL™-c2. Le gène *intI4* de ce clone (pLQ661) a aussi été séquencé. Une mutation a été détectée, mais elle est silencieuse. Le clone pLQ661 obtenu va servir à la surproduction de la MBP-IntI4.

3.2. PURIFICATION DE LA MBP-INTI4.

Pour faciliter la purification de la protéine IntI4, le gène *intl4* de *Vibrio cholerae* a été introduit dans le vecteur d'expression pMAL™-c2, en aval du gène *malE*. Il en résulte un gène de fusion qui se traduit en la protéine de fusion MBP-IntI4. La protéine de fusion MBP-IntI4 a été surproduite dans la souche TB1 d'*Escherichia coli* et purifiée par chromatographie d'affinité sur une colonne de résine d'amylose. Des extraits de protéines avant et après l'induction et la purification ont été analysés sur gel SDS-PAGE. Une protéine d'environ 80-KDa est observée en grande quantité après l'induction à l'IPTG (Fig. 20A, puit 3), mais elle est absente avant l'induction (puit 2). Le poids moléculaire apparent de cette protéine concorde avec le poids moléculaire calculé de la MBP-IntI4. Cette même protéine est présente en grande quantité après la purification sur colonne d'amylose (puit 5). C'est la MBP-IntI4 qui est présente en plus grande quantité dans l'extrait purifié, mais il y a deux autres bandes de protéines (~43-KDa et ~60-KDa) sur le gel SDS-PAGE qui sont facilement visibles (puit 5). La bande à 43-KDa correspond au poids moléculaire de la MBP seule. La présence de la MBP résulte probablement de la dégradation de la protéine de fusion *in vivo*. Les portions MBP et IntI4 forment tout probablement des domaines séparés. Les acides aminés qui les joignent représentent donc une cible idéale pour les protéases cellulaires.

Pour confirmer de façon absolue la présence de la MBP-IntI4 et de déterminer si les protéines contaminatrices sont des produits de dégradation de la MBP-IntI4, une immunoabsorption avec le sérum Anti-MBP a été faite (Fig. 20B). La grosse bande de 80-KDa dans l'extrait purifié est marquée, ce qui nous permet de conclure qu'elle est la MBP-IntI4. La bande contaminante à ~43-KDa est aussi marquée. Cette dernière représente sûrement la MBP, tandis que l'autre bande contaminatrice (~60-KDa) est tout probablement un produit de dégradation de la protéine de fusion. Il y a aussi d'autres bandes de protéines qui ont été révélées par l'immunoabsorption. Ces bandes semblent aussi être des produits de

dégradation de la protéine de fusion. Par contre, leur nature exacte n'a pas été confirmée par séquençage d'acides aminés. Il est supposé que les protéines contaminatrices ne causent pas de problèmes dans les expériences de liaison ADN-protéines.

Il aurait été possible de séparer IntI4 de la MBP par digestion avec le facteur X_a . Toutefois, certaines intégrases sont très peu solubles et difficilement purifiées (elles ont une affinité pour les résines) (A Gravel et PH Roy, résultats non publiés). C'est la protéine de fusion qui a été utilisée dans les expériences de gel de retardement. Les comportements d'IntI1 et de la MBP-IntI1 ont déjà été comparés par gel de retardement, et aucune différence n'a été observée. C'est donc attendu que le comportement de la MBP-IntI4 soit similaire au comportement d'IntI4.

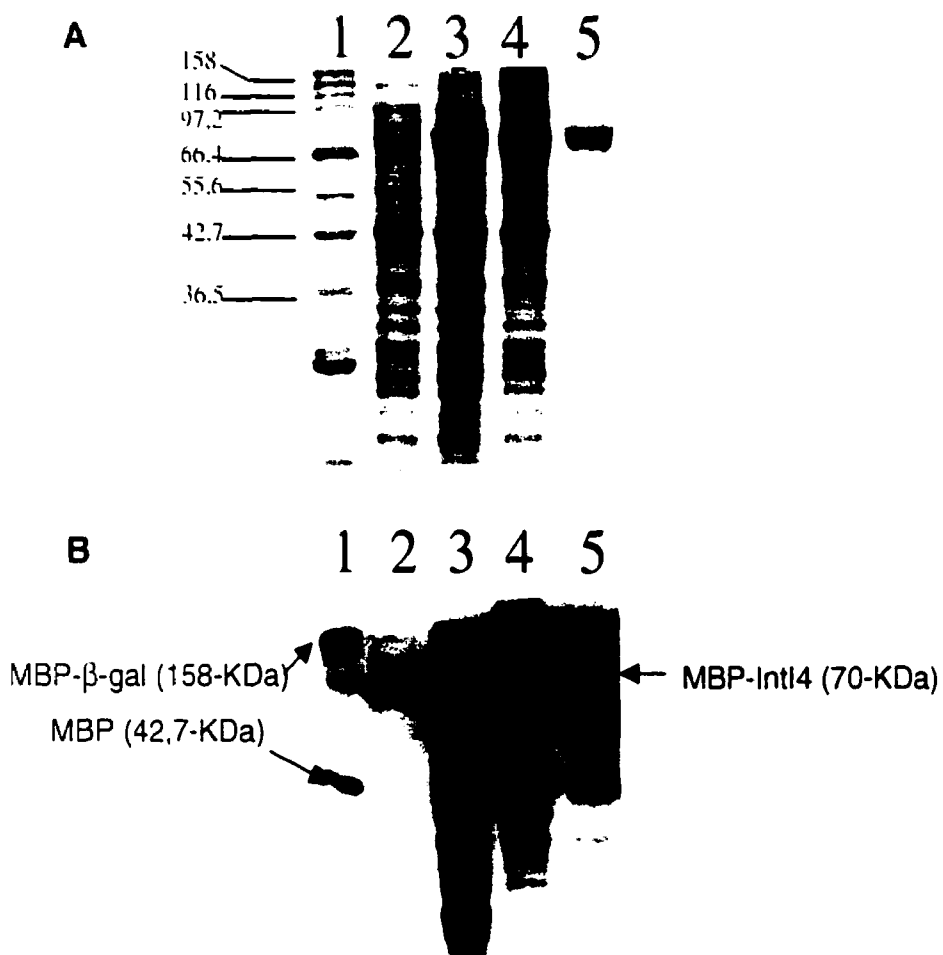


Figure 20. SDS-PAGE de la protéine de fusion MBP-Int14 et immunodétection de la MBP sur les extraits purifiés et non-purifiés de la MBP-Int14. (A) SDS-PAGE de la protéine de fusion MBP-Int14. (B) L'immunodétection de la MBP. L'immunoabsorbant primaire est le sérum anti-MBP (lapin) et l'immunoabsorbant secondaire est l'IgG(lapin)-peroxidase de raifort. Puit 1, échelle de poids moléculaire de protéines (New England BioLabs); Puit 2, TB1(pLQ661) avant l'induction; puit 3, TB1(pLQ661) après l'induction de la MBP-Int14; puit 4, l'extrait soluble de TB1 surexprimant la MBP-Int14; puit 5, la MBP-Int14 purifiée sur colonne d'amylose.

3.3. TESTS D'EXCISION *IN VIVO* DE *IntI4* ET LA MBP-*IntI4*.

3.3.1. Tests d'excision *in vivo* de *IntI4*.

Afin de déterminer si *IntI4* est capable de recombinaison spécifique de site, un test de recombinaison *in vivo* a été effectué. Des plasmides contenant une cassette ont été utilisés comme cibles. Suite à une induction de la production d'*IntI4* codé par le plasmide pVC3, l'ADN a été extrait et un PCR avec les oligonucléotides externes pACYC184 5' et pACYC184 3' a été effectué. Selon la taille de l'amplicon produit, il est possible de déterminer si une cassette a été excisée ou non (Tableau 10).

D'après les résultats (Fig. 21; tableau 10), *IntI4* a seulement été capable d'exciser la cassette *aacA1a-orfG* du plasmide pLQ428. En absence d'*IntI4*, un amplicon de 2499-pb a été produit (Fig. 21, puit 6), tandis qu'en présence d'*IntI4*, un amplicon de 1341-pb a été produit (puits 7). Un fragment de 1158-pb, correspondant à la cassette *aacA1-orfG*, a donc été excisé de pLQ428 en présence de *IntI4*. D'après une étude précédente (F Gagnon et PH Roy, résultats non-publiés), le taux d'excision de cette cassette par *IntI1* et *IntI3* était très élevé. Les séquences des *attC* impliqués sont donc très favorables à l'excision par les intégrases d'intégrons. Ces résultats indiquent aussi que des interactions en "*trans*" entre le super-intégron et un intégron de classe 1 est possible. Si les conditions le permettaient, une telle cassette pourrait peut-être se retrouver dans un super-intégron.

IntI4 ne semble pas être capable d'exciser efficacement les cassettes *aadA1* et *orf8* en aval des sites *attI1* et *attI4* (respectivement) et la cassette *aadA1* en aval de l'*attC* de *dfrA1*. Il ne serait pas surprenant que *IntI4* ne soit pas capable d'exciser une cassette en aval du site *attI1* car, en général, les intégrases d'intégron sont spécifiques à leur propre site *attI* (F Gagnon et PH Roy, résultats non-publiés). *IntI4* ne semble pas capable d'exciser la première cassette du super-intégron. Ces

résultats ne sont pas étonnants car il est déjà connu que l'excision d'une cassette est habituellement moins favorable lorsqu'elle est en première position de la région variable (F Gagnon et PH Roy, résultats non-publiés).

Quant à la cassette *aadA1* en aval de l'*attC* de *dfrA1*, il est déjà connu que celle-ci est excisée à un taux très faible par les intégrases *IntI1* et *IntI3* (F Gagnon et PH Roy, résultats non-publiés). Dans ces deux cas, c'est la nature de l'*attC* en amont de la cassette qui est responsable du faible taux d'excision. Il se peut que ce soit le cas avec *IntI4* aussi.

Il est important de noter que ces résultats sont basés sur des tests PCR. Il se peut donc qu'un taux d'excision extrêmement faible ne soit pas détecté par PCR, malgré que le PCR favorise les produits plus petits. Les résultats négatifs ne sont donc pas définitifs.

Tableau 10. La description des cassettes utilisées dans les tests d'excision et les longueurs possibles des amplicons avec les oligonucléotides pACYC184 5' et pACYC184 3'. Les amplicons obtenus par PCR sont soulignés.

Plasmide	Cassette et l'élément en amont	Amplicon avec excision (pb)	Amplicon sans excision (pb)
pLQ423	(<i>attI1</i>) + cassette <i>aadA1</i> .	604	<u>1456</u>
pLQ426	(<i>attC</i> de <i>dfrA1</i>) + cassette <i>aadA1</i> .	700	<u>1553</u>
pLQ428	(<i>attC</i> de <i>aadA1</i>) + cassette <i>aacA1a-orfG</i> .	<u>1341</u>	2499
pLQ641	(<i>attI4</i>) + cassette <i>orf8</i>	623	<u>1127</u>

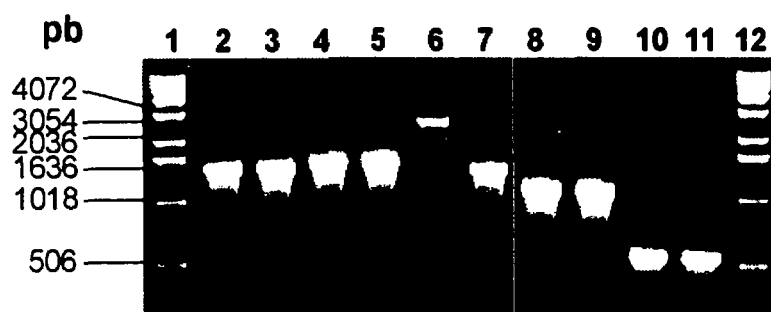


Figure 21. Électrophorèse des produits PCR obtenus avec les oligos pACYC184 5' et pACYC184 3' et d'une préparation d'ADN extrait d'une culture avant et après l'induction d'IntI4. Puit 1: Échelle d'ADN 1-kb (Gibco BRL). Puit 2: Préparation d'ADN de pLQ423. Puit 3: pLQ423 et pVC3. Puit 4: pLQ426. Puit 5: pLQ426 et pVC3. Puit 6: pLQ428. Puit 7: pLQ428 et pVC3. Puit 8: pLQ641. Puit 9: pLQ641 et pVC3. Puit 10: pACYC184. Puit 11: pACYC184 et pVC3. Puit 12: Échelle d'ADN 1-kb (Gibco BRL, Life Technologies, Burlington, Ontario).

3.3.2. Test d'activité *in vivo* de la MBP-IntI4.

Afin de s'assurer que la portion MBP de la protéine de fusion n'interfère pas avec la reconnaissance de l'ADN par IntI4, un test d'activité *in vivo* de la MBP-IntI4 a été fait. En absence de pLQ661 exprimant la MBP-IntI4, un amplicon de 2599-pb est produit par PCR avec les oligonucléotides externes pACYC184 5' et pACYC184 3' (Fig. 22, puit 2). Suite à l'induction de la production de MBP-IntI4, un amplicon de 1341-pb a été produit par PCR avec ces mêmes oligonucléotides (puit 1). Un fragment de 1158-pb, correspondant à la cassette *aacA1-orfG*, a donc été excisé de pLQ428 en présence de la MBP-IntI4. Ceci démontre que la portion IntI4 de la protéine de fusion MBP-IntI4 conserve son activité *in vivo*. Tel que IntI4, la protéine MBP-IntI4 est capable d'exciser la cassette *orfG-aacA1* de Tn2424 *in vivo*. Il est donc pris pour acquis que la protéine de fusion MBP-IntI4 interagit avec l'ADN de façon similaire à la protéine IntI4.

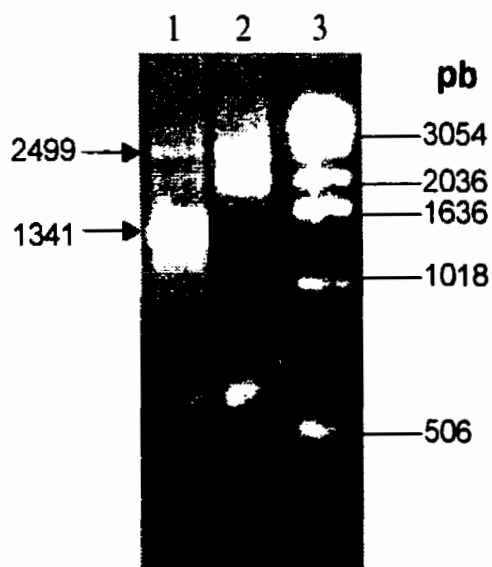
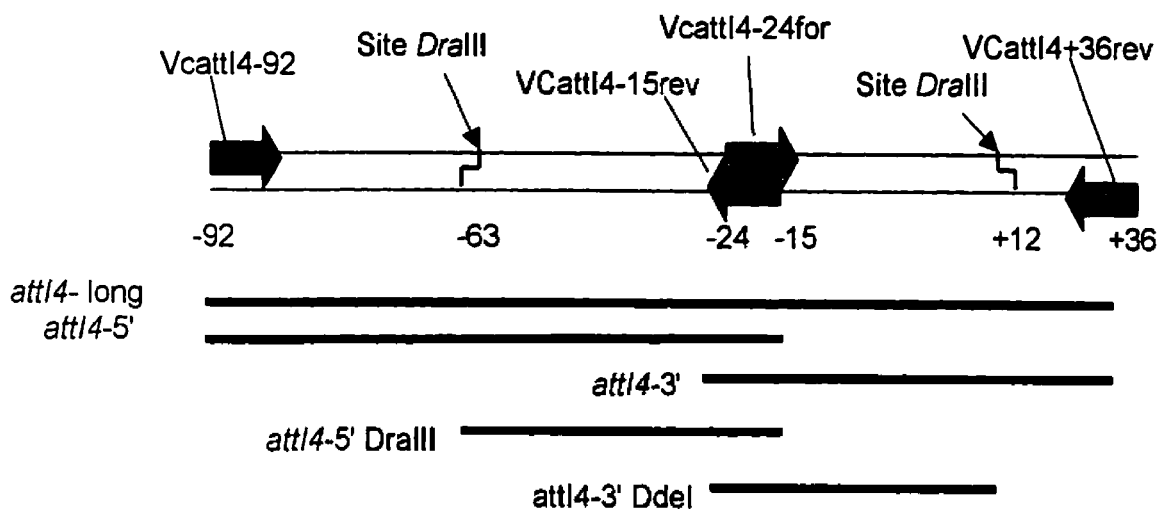


Figure 22. Électrophorèse des produits PCR obtenus avec les oligos pACYC184 5' et pACYC184 3'. Puit 1: PCR d'une préparation d'ADN extrait de HB101 (pLQ428-pLQ661) suite à une induction de la protéine de fusion MBP-Int14, Puit 2: PCR d'une préparation d'ADN extrait de HB101 (pLQ428) n'exprimant pas la protéine de fusion MBP-Int14. Puit 3: Échelle d'ADN 1-kb (Gibco BRL).

3.4. GELS DE RETARDEMENT.

3.4.1. Interactions entre MBP-IntI4 et le site attI4.

Afin de caractériser les interactions entre IntI4 et son site de recombinaison *attI4*, la liaison de la MBP-IntI4 sur des fragments *attI4* de longueurs différentes a été examinée par gel de retardement (Fig. 23). La liaison de la protéine de fusion au site *attI4* a premièrement été détectée en utilisant le fragment *attI4*-long (Fig. 24). Sept complexes ont été observés avec la MBP-IntI4 (puits 2 et 3) tandis qu'aucun complexe n'a été observé entre la MBP et le fragment *attI4* (puit 6). La formation des complexes ADN-protéine peut donc être attribuée à la portion IntI4 de la protéine de fusion. Les complexes sont sensibles à une compétition avec des fragments *attI4*-long non marqués (puit 5) et peuvent être convertis en des complexes à mobilité plus faible lorsque l'anticorps anti-MBP est ajouté (puit 4). Ces résultats démontrent que les complexes résultent d'interactions ADN-protéine spécifiques.



B

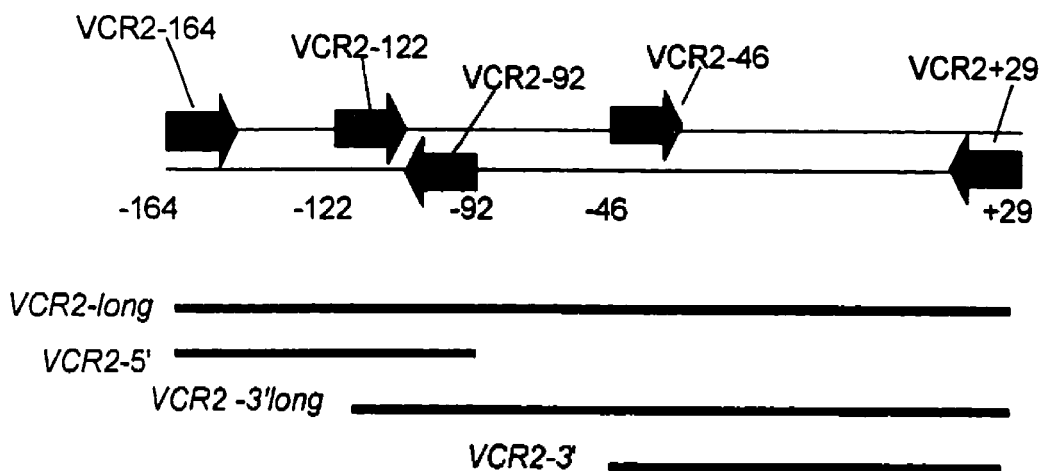


Figure 23. Fragments d'ADN couvrant les sites *attI4* (A) et *VCR2* (B). Les flèches remplies représentent les amorces utilisées. Les sites de digestion *DralII* et *Ddel* sont aussi indiqués. Les numéros sous l'ADN indiquent la position de l'extrémité-5' des amorces utilisées dans les PCR (si on considère que le G du site de recombinaison est en position 0).

MBP-Int14 (μM)	-	6	19	6	6	-
ADN non-marqué (pmol)	-	-	-	-	7	-
Sérum anti-MBP (1/10) (μl)	-	-	-	6	-	-
MBP(μM)	-	-	-	-	-	19

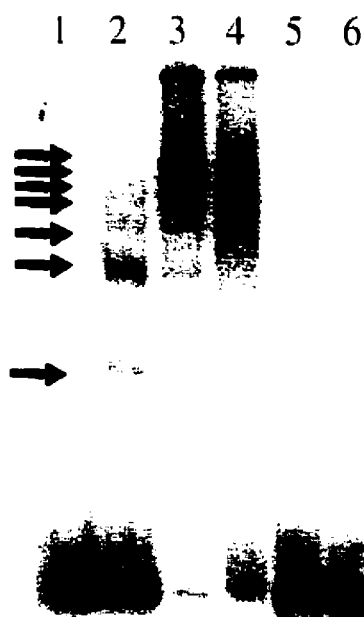


Figure 24. Liaison de la MBP-Int14 au fragment *att14*-long. Les concentrations de protéines et d'ADN sont indiquées dans le tableau. Une compétition avec de l'ADN non-marqué et un déplacement des complexes avec du sérum anti-MBP ont été effectués.

Des fragments *attI4* partiels (Fig. 25) ont ensuite été testés dans des expériences de gel de retardement. Cinq complexes ont été observés avec le fragment *attI4-5'* (puits 2 et 3) et quatre ont été observées avec le fragment *attI4-3'* (puits 8 et 9). Toutefois, le complexe à mobilité plus faible dans chacun de ces gels de retardement est très faible et n'est pas toujours observé. Ceci laisse penser que ces complexes résultent d'interactions non-spécifiques entre MBP-IntI4 et *attI4*. Si c'est le cas, il y a donc quatre complexes avec le fragment *attI4-5'* et trois complexes avec le fragment *attI4-3'*, pour un total de sept complexes, tel que déterminé avec le fragment *attI4-long*. La liaison aux sites sur le fragment *attI4-5'* n'est donc pas nécessaire à la liaison aux sites sur le fragment *attI4-3'*. Comme c'était le cas précédemment, aucun complexe n'a été formé entre la MBP et ces fragments partiels d'*attI4* (puits 6 et 12). La formation des complexes ADN-protéine peut donc être attribuée à la portion IntI4 de la protéine de fusion. Les complexes sont sensibles à une compétition avec des fragments non marqués (puits 5 et 11) et peuvent être convertis en des complexes à mobilité plus faible lorsque l'anticorps anti-MBP est ajouté (puits 4 et 10). Ces résultats démontrent que les complexes résultent d'interactions ADN-protéine spécifiques.

Des fragments *attI4* encore plus petits ont aussi été testés dans des expériences de gel de retardement (Fig. 23). Le fragment *attI4-3'* marqué à son extrémité 5' (à la position -24) est digéré par l'enzyme de restriction *DdeI* à la position +12. Un fragment de 37-pb (-24 à +12) (*attI4-3' DdeI*) est produit. MBP-IntI4 et ce fragment forment deux complexes dans le gel de retardement (Fig. 26). Il y a donc un site de liaison qui a été perdu avec l'élimination de la région +13 à +36 lors de la digestion enzymatique. Le fragment *attI4-5'* marqué à son extrémité 3' (à la position -15) est digéré par l'enzyme de restriction *DraIII* à la position -63. Un fragment de 49-pb (-63 à -15) (*attI4-5' DraIII*) est produit. MBP-IntI4 et ce fragment forment deux ou trois complexes dans le gel de retardement (les résultats ne sont pas clairs). Il y a donc au moins un site de liaison perdu avec l'élimination de la région -92 à -63 lors de la digestion enzymatique.

MBP-Int14 (μM)	-	19	31	19	19	-	-	19	31	19	19	-
ADN non-marqué (pmol)	-	-	-	-	16	-	-	-	-	-	17	-
Sérum anti-MBP (1/10) (μl)	-	-	-	3	-	-	-	-	-	3	-	-
MBP(μM)	-	-	-	-	-	19	-	-	-	-	-	19

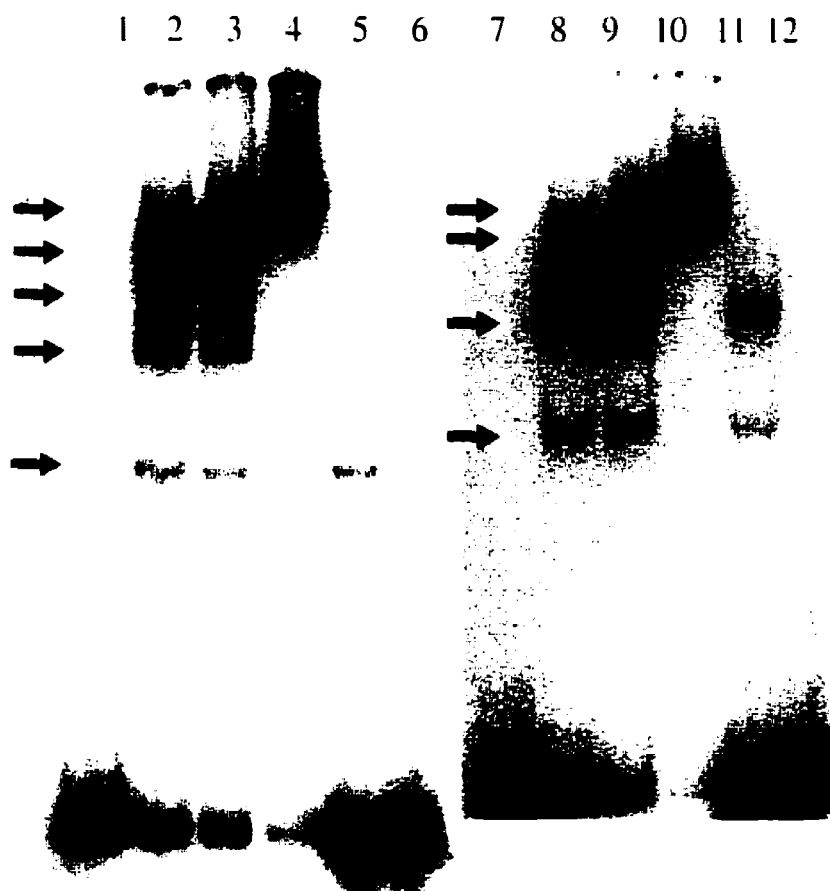


Figure 25. Liaison de la MBP-Int14 aux fragments *attI4-5'* (puits 1 à 6) et *attI4-3'* (puits 7 à 12). Les concentrations de protéines et d'ADN sont indiquées dans le tableau. Une compétition avec de l'ADN non-marqué et un déplacement des complexes avec du sérum anti-MBP ont été effectués.

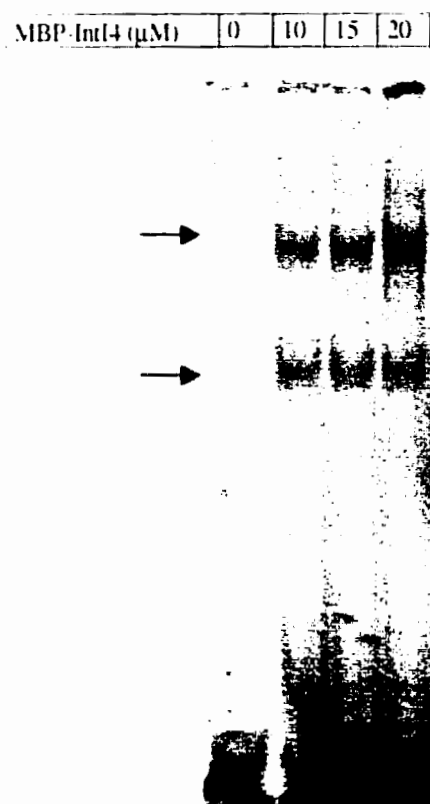


Figure 26. Liaison de la MBP-Int14 au fragment et att14-3' (*DdeI*).
Les concentrations de protéines sont indiquées dans le tableau.

Dans la plupart des systèmes de recombinaison spécifique de site, il y a deux monomères d'intégrase qui se lient sur chaque substrat d'ADN (un de chaque côté du site de recombinaison). Dans certains systèmes de recombinaison, plus de deux protéines se lient sur l'ADN. Lors de la recombinaison par λ Int, par exemple, une molécule d'IHF et jusqu'à quatre monomères Int peuvent se lier sur *attL* (Kim et al., 1990). Lors de la recombinaison par FLP, trois monomères de recombinase peuvent se lier aux sites "a", "b" et "c" de FRT, mais seulement la liaison aux sites "a" et "b" est nécessaire à la recombinaison (Senecoff et al., 1985). La liaison de sept monomères sur *attI4* est encore plus particulière.

Il a précédemment été déterminé que IntI1 avait quatre sites de liaison sur le site *attI1*: deux sur le fragment *attI1-5'* (-96 à -18) et deux sur le fragment *attI1-3'* (-19 à +71) (Fig. 15A) (Gravel et al., 1998). Comme IntI4 et IntI1 sont de la même famille et sont semblables, il est attendu que IntI4 se lie aux sites d'*attI4* qui correspondent aux sites de liaison d'IntI1 sur *attI1*. Si c'est le cas, IntI4 se lie probablement aux régions -50, -30, -10 et 0, tel que le fait IntI1 sur *attI1*. Dans chacune de ces régions, une séquence semblable (cinq nucléotides sur sept) à la séquence consensus GTTRRRY est présente. Ceci permet d'expliquer la liaison de deux monomères sur le fragment *attI4-5'* et deux monomères sur le fragment *attI4-3'*. Les régions -10 et 0 sont des séquences répétées inversées de part et d'autres du site de recombinaison. Tout probablement, un monomère d'IntI4 se lie sur chacun de ces sites afin de catalyser la coupure d'un brin d'ADN lors de la recombinaison. La région -30 d'*attI1* a été démontrée comme étant nécessaire à la recombinaison efficace entre *attI1* et un *attC* par IntI1 (Hansson et al., 1997). La liaison d'un monomère à cette région pourrait aider à réunir les substrats d'ADN. Comme la région -30 d'*attI4* est semblable à la région -30 d'*attI1*, un monomère d'IntI4 pourrait plausiblement se lier à cette région. La région -50 d'*attI1* n'est pas nécessaire à la recombinaison par IntI1, mais sa délétion entraîne une diminution du taux de recombinaison de 67% entre *attI1* et *attC* (Hansson et al., 1997). Aussi, la région -50 d'*attI4* est semblable à la région -50 d'*attI1*. Un monomère d'IntI4 pourrait

plausiblement se lier à cette région et aider à réunir les substrats d'ADN ou stabiliser le complexe ADN-protéine.

Quant aux autres complexes, il est possible d'attribuer leur présence à la liaison de IntI4 à d'autres sites sur les fragments d'*attI4*. Trois autres sites de liaison d'IntI4 sur *attI4* sont proposés (Fig. 27). Les intégrases d'intégrons semblent avoir une affinité pour les séquences GTTRRRY. En analysant la séquence d'*attI4* (-92 à +36), certains sites ne différant pas plus de deux nucléotides de la séquence consensus ont été identifiés. Un site dans la région du -40 (GGTAGCC) et un site à la région -80 (GTTATGG) ont été identifiés sur le brin supérieur. Comme IntI4 forme quatre complexes avec le fragment *attI4-5'* (-92 à -15), c'est concevable que IntI4 se lie aux régions -80 et -40, en plus des régions -50 et -30. Il y a donc un total de six sites de liaison "hypothétiques" d'IntI4 sur *attI4* ne différant pas trop de la séquence GTTRRRY: les régions -80, -50, -40, -30, -10 et 0. La position du septième site de liaison doit donc se trouver sur le fragment *attI4-3'* (-24 à +36). Afin d'éviter les encombrements stériques, ce site ne doit pas être trop près des régions -10 et 0. En aval de la région 0, il y a la séquence GATGATT sur le brin inférieur vers le +20 qui ressemble à la séquence consensus. La présence d'un site de liaison à cette région concorderait bien avec le résultat du gel de retardement avec le fragment *attI4-3' Ddel* (-24 à +12). Comme la séquence en aval du site *attI4* (i.e. le début de la première cassette) n'est pas bien conservée, il se peut que la liaison d'un monomère à la région +20 soit une "erreur" de la part de l'intégrase.

Un monomère d'IntI4 pourrait plausiblement se lier à chacune de ces trois régions et aider à la réunion des substrats d'ADN ou stabiliser le complexe ADN-protéine. Évidemment, il se peut que l'intégrase se lie à des sites autres que ceux mentionnés ci-dessus, mais ceux-ci ne sont pas évidents par leurs séquences. Il reste encore à déterminer si tous ces sites de liaison sont nécessaires à la recombinaison par IntI4.

3.4.2. Interactions entre MBP-IntI4 et le site attC.

La liaison de MBP-IntI4 à une région attC a aussi été testée (Fig. 23). Le fragment attC utilisé, le VCR2, appartient à la cassette de l'orf1 de *Vibrio cholerae*. La liaison de la protéine de fusion MBP-IntI4 à cet attC a premièrement été détectée dans des gels de retardement en utilisant le fragment VCR2-long comme substrat d'ADN. Étant donné que les VCRs sont des séquences répétées inversées, ce fragment était capable d'adopter une deuxième structure ayant une mobilité différente sur gel d'acrylamide (i.e. deux bandes d'ADN libre étaient observées). MBP-IntI4 était capable de former des complexes avec les deux structures du VCR2 et une variété de complexes a été observée. Il n'a donc pas été possible de déterminer le nombre exact de complexes formés entre IntI4 et ce fragment. Des fragments partiels du VCR2 ont donc été produits.

La liaison d'IntI4 sur des fragments VCR2 partiels a été observée par gel de retardement. Quatre complexes ont été observés avec le fragment VCR2-5' (-164 à -92) (Fig. 28). Quant au fragment VCR2-3'long (-122 à +29), plus de quatre complexes ont été observés, mais, tel que pour VCR2-long, ce fragment adopte une seconde structure à mobilité différente. Un fragment plus court, VCR2-3' (-46 à +29) a ensuite été testé. Celui-ci permet la formation de trois complexes (Fig. 28).

Au moins sept complexes peuvent être formés entre IntI4 et VCR2. En ce qui concerne VCR2-3', il est bien possible qu'un monomère se lie de chaque côté du site de recombinaison (sites 2R et 1R) (Fig. 29), tel qu'est habituellement le cas chez les intégrases. Ces monomères seraient responsables de catalyser la coupure de l'ADN lors de la recombinaison. L'autre complexe est dû à la formation d'un dimère protéique, ou, plus probablement, à la liaison d'IntI4 à un autre site. Un site de liaison possible se trouve vers la région -35 (GTTTAGT) (Fig. 29). Le rôle d'un monomère d'IntI4 lié à cette région pourrait être homologue au rôle d'IntI4 lié à la région -30 d'*attI4*, i.e. aider à la réunion des substrats d'ADN ou stabiliser le complexe ADN-protéine.

Quant à la liaison d'IntI4 sur *VCR2-5'*, il est probable qu'un monomère se lie de chaque côté du site inverse au site de recombinaison qui marque le début du *VCR2* (sites 1L et 2L, Fig. 29). Étant donné que le *VCR2* est une séquence palindromique, les sites 1L et 2L sont probablement liés de la même façon que les sites 1R et 2R. Les deux autres complexes sont dus à la formation d'un dimère protéique, ou, plus probablement, à la liaison d'IntI4 à d'autres sites. Un site de liaison possible se trouve vers la région -95 (GTTGACA, sur le brin inférieur) (Fig. 29). La liaison à ce site pourrait aider à stabiliser le complexe de recombinaison. Un autre site de liaison possible se trouve à l'extérieur du *VCR2*, vers la région -150 (GTTATGG). Comme les séquences à l'extérieur des éléments *attC* ne sont pas bien conservées, cette région ne se trouve pas chez toutes les *attC*. Il se peut donc que la liaison d'un monomère à un tel site soit une "erreur" de la part de l'intégrase. Évidemment, il se peut que l'intégrase se lie à des sites autres que ceux mentionnés ci-dessus, mais ceux-ci ne sont pas évidents par leurs séquences.

Que l'*attC* prend une structure cruciforme pendant la recombinaison demeure une possibilité. Si c'est le cas, l'importance du site inverse au site de recombinaison devient encore plus évident. Dans une structure cruciforme, le site inverse au site de recombinaison serait soit apparié, soit à proximité du site de recombinaison. La liaison des autres monomères pourrait stabiliser la structure du complexe ou aider à la réunion des substrats d'ADN.

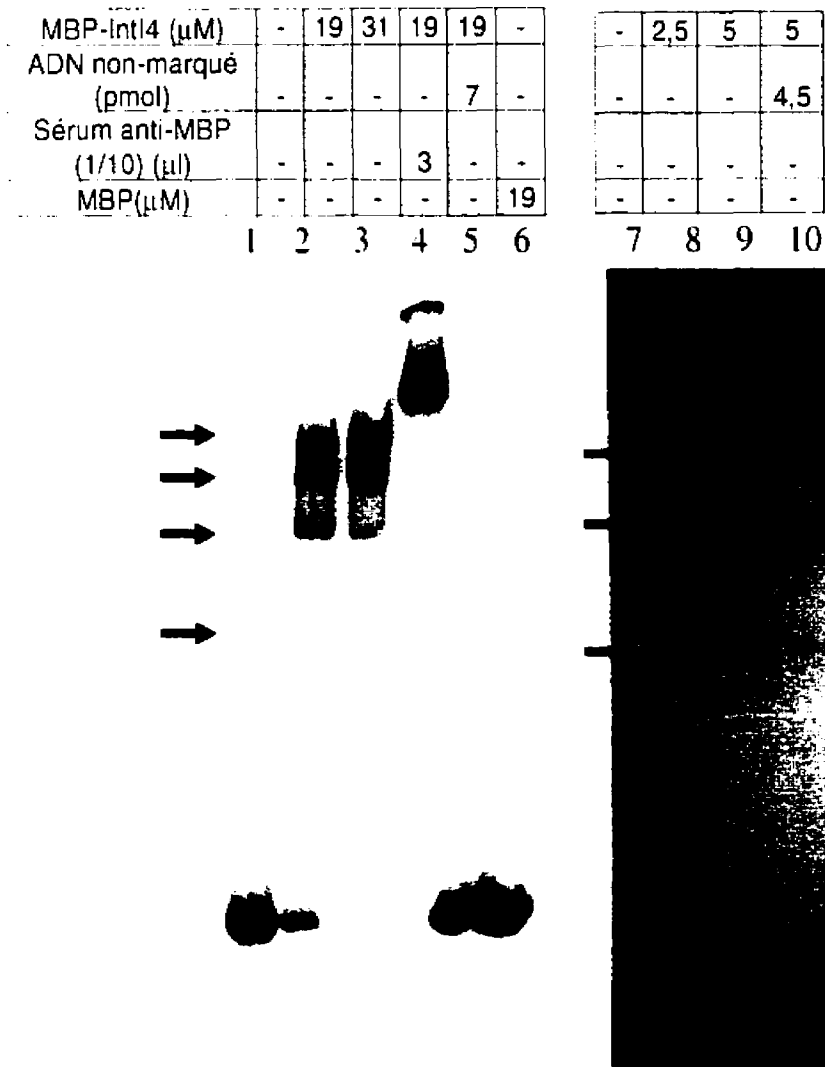


Figure 28. Liaison de la MBP-Int14 aux fragments VCR2-5' (puits 1 à 6) et VCR2-3' (puits 7 à 10). Les concentrations de protéines et d'ADN sont indiquées dans le tableau. Une compétition avec de l'ADN non-marqué a été effectuée.

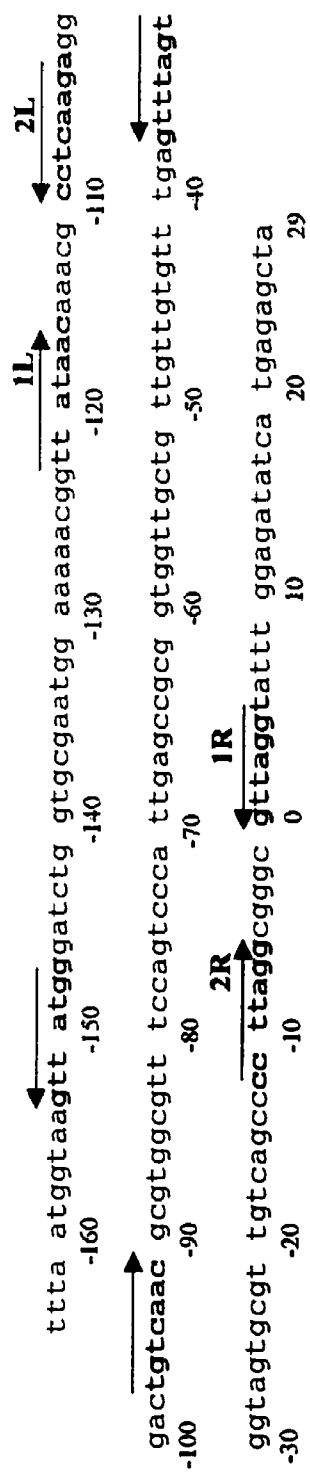


Figure 29. Sites de liaison IntI4-VCR2 proposés. La séquence du VCR2 et les sites de liaison d'IntI4 proposés. Les séquences GTTAAAC et RYAAAC (à cinq nucléotides près) susceptibles d'être liées par IntI4 sont en gras et soulignées par une flèche.

3.4.3. Interactions entre MBP-Int1 et le site attI4.

Comme le super-intégron de *Vibrio cholerae* ressemble beaucoup aux intégrons de résistance aux antibiotiques en ce qui concerne l'organisation, les intégrases et les sites de recombinaisons, il est intéressant d'étudier les interactions entre l'intégrase de l'un et les site *attI* de l'autre.

Les interactions entre MBP-Int1 et le site *attI4* ont été testées par gels de retardement. Premièrement, il a été déterminé que cette intégrase permet la formation de six complexes avec le fragment *attI4*-long (Fig. 30). La liaison d'Int1 sur les fragments partiels d'*attI4* a ensuite été testée. Quatre complexes ont été observés lors du gel de retardement avec le fragment *attI4*-5' (Fig. 30). Deux complexes très faibles ont été observés lors du gel de retardement avec le fragment *attI4*-3'. Les complexes avec *attI4*-3' sont très faibles comparés à ceux formées avec *attI4*-long et *attI4*-5' et nécessite beaucoup plus de MBP-Int1 pour être à peine visible.

Il est plausible de penser que des monomères d'Int1 se lient aux mêmes régions qui ont été suggérées pour IntI4. Sur le fragment *attI4*-5', quatre monomères pourraient se lier aux régions -80, -50, -40 et -30 d'*attI4*. Sur le fragment *attI4*-3', les deux complexes observés pourraient résulter de la liaison d'Int1 aux régions -10 et 0. Ces liaisons sur le fragment *attI4*-3' sont toutefois très faibles. D'après Collis et al. (1998), Int1 se lie très faiblement aux régions -10 et 0; c'est plutôt à la région -30 où la liaison est forte. On peut donc suggérer que la liaison d'Int1 à la portion 3' de *attI4* nécessite soit la séquence adjacente en 5', soit les monomères d'Int1 déjà liés à cette séquence en 5'.

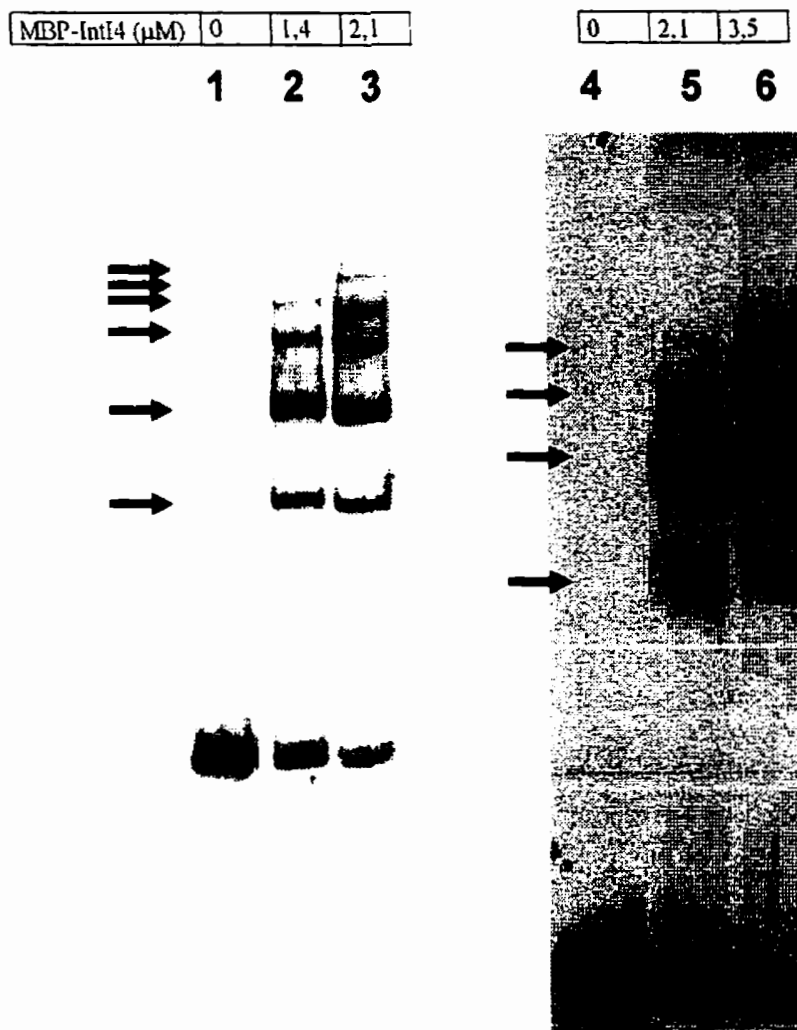


Figure 30. Liaison de la MBP-Int1 aux fragments *attI4*-long (puits 1 à 3) et *attI4*-5' (puits 4 à 6). Les concentrations de protéines sont indiquées dans le tableau.

3.5. AFFINITÉ RELATIVE D'IntI1 ET IntI4 POUR LES SITES DE RECOMBINAISON.

L'affinité de MBP-IntI4 et MBP-IntI1 pour les fragments d'ADN est très variable. Dans les gels de retardement avec les fragments *attI4* et *VCR2*, une concentration de 6 à 12 μ M de MBP-IntI4 était nécessaire à la formation de tous les complexes observés. Dans les gels de retardement de MBP-IntI1 avec les fragments *attI4*-long et *attI4*-5', une concentration plus faible de protéines (~2 μ M) était nécessaire à la formation de tous les complexes observés. La détection de complexes entre MBP-IntI1 et *attI4*-3' fait l'exception. Ces complexes sont très faibles comparés à ceux formés avec *attI4*-long et *attI4*-5' et nécessite beaucoup plus de MBP-IntI1 (>12 μ M) pour être à peine visibles.

Relativement peu de MBP-IntI1 est nécessaire la formation de complexes avec *attI4*, mais encore moins de MBP-IntI1 est nécessaire la formation de complexes avec *attI1* (0,250 μ M) (Gravel et al., 1998). Ces résultats indiquent que la MBP-IntI1 a une plus grande affinité pour le site *attI1*, mais possède toutefois plus d'affinité que la MBP-IntI4 pour le site *attI4*. Soit la MBP-IntI4 se dissocie plus rapidement de l'ADN, soit elle se fixe plus difficilement aux sites de reconnaissance.

Des intégrons de classe 1 ont déjà été identifiés dans des souches virulentes de *Vibrio cholerae* (Dalgaard et al., 1999; Falbo et al., 1999). Des interactions *en trans* entre IntI1 et *attI4* pourraient avoir lieu *in vivo*. Comme IntI1 semble posséder une plus grande affinité que IntI4 pour le site *attI4*, IntI1 fournie par un intégron de classe 1 pourrait faciliter l'intégration de nouvelles cassettes dans le super-intégron de *V. cholerae*. Si IntI1 peut effectuer la recombinaison au site *attI4*, l'évolution du super-intégron serait donc accélérée par l'insertion de nouvelles cassettes. Ces nouvelles cassettes intégrées pourraient être des cassettes de gènes de résistance aux antibiotiques ou des cassettes gène-VCR (dépendamment de l'affinité d'IntI1 pour les VCRs).

IntI4 n'est certainement pas la première recombinase spécifique de site à démontrer une affinité faible pour son substrat d'ADN. La recombinase λ Int se lie très faiblement aux sites "core" (C, C', B et B'), où la réaction de recombinaison a lieu (Kim et al., 1990; Ross et al., 1978). Ce sont des interactions avec les monomères liés aux sites "arm-type" qui facilitent la liaison d'Int aux sites *attP* et *attL* (Kim et al., 1990; Thompson et al., 1987).

Les conditions *in vitro* pourraient aussi être responsables de cette affinité faible. Une cause possible de cette affinité faible est la présence de la MBP. La portion MBP de la protéine de fusion n'a pas empêché l'excision *in vivo* d'une cassette, mais c'est possible qu'elle diminue l'affinité d'IntI4 pour son substrat d'ADN. La structure du substrat d'ADN pourrait aussi être responsable de cette liaison faible. Dans certains cas, un substrat d'ADN en superhélice est nécessaire pour la recombinaison. Lors de la recombinaison entre *attP* et *attB* par λ Int, le substrat *attP* doit être en superhélice, tandis que l'ADN substrat de la recombinase FLP peut être en superhélice ou linéaire (Gyohda et al., 2000). Une superhélicité de l'ADN substrat pourrait être nécessaire à la liaison stable d'IntI4 sur l'ADN.

3.6. INTERFÉRENCES.

Des expériences d'interférences au DMS et au KMnO_4 ont été entreprises afin de déterminer quels nucléotides d'*attI4* et *attC* sont impliqués dans la liaison de IntI4. À de trop hautes concentrations d'intégrase, il a été démontré que l'intégrase est capable de surmonter les interférences qui résultent de modifications chimiques (Panigrahi et al., 1992). Des concentrations "sous-saturantes" d'intégrases (de 12,5 à 25 μM , selon le cas) ont donc été utilisées dans les gels de retardement. Une concentration "sous-saturante" est la concentration de protéine quelque peu inférieure à la concentration "saturante", i.e. la concentration où les complexes sont à leur intensité maximale.

Malgré plusieurs tentatives, ces expériences n'ont pas permis de déterminer les sites spécifiques impliqués dans la liaison de MBP-Int14. Ce manque de résultats dans les expériences peut être dû à plus d'une cause. Dans le cas des interactions ADN-protéines, la reconnaissance de sites spécifiques dépend grandement des interactions permettant la formation de liens hydrogène entre les protéines et les bases individuelles. Toutefois, il est bien connu que la conformation locale d'une molécule d'ADN peut avoir une influence profonde sur les interactions ADN-protéines (Travers et al., 1989). Dans le cas de Int14, il est plausible que cette protéine dépend plus de la conformation locale de l'ADN plutôt que de la séquence spécifique. La conformation dépend évidemment de la séquence, mais elle ne serait pas significativement modifiée par la méthylation d'une guanine ou d'une adénine ou le bris d'un lien double dans une thymine.

Il ne faut pas non plus oublier les contacts avec le squelette de l'ADN, qui jouent un rôle intégral dans la reconnaissance spécifique de site. En fait, une proportion significative des liens hydrogène dans les complexes connus implique le squelette de l'ADN, plus particulièrement les atomes d'oxygène des liens phosphodiester (Pabo et Sauer, 1992). Ces contacts avec le squelette aident à tenir la protéine contre les bases dans un arrangement fixe, pour ainsi augmenter la spécificité des interactions chaîne latérale : base. Sans ces interactions, la protéine pourrait facilement glisser ou se déplacer. Si les liens avec le squelette de l'ADN sont assez stables, il est possible que la modification d'une base n'empêche pas la liaison de la protéine, ce qui pourrait être une explication possible du manque de résultats dans les expériences d'interférences.

Une autre explication plausible est que Int14 ne dépend pas spécifiquement de chaque base à son site de liaison pour se lier. Si c'est le cas, la modification d'une base ne l'empêcherait pas de se lier. Il faudrait peut-être que plus d'une base sur une molécule d'ADN soit modifiée afin d'empêcher la liaison de Int14.

Aussi, des interactions coopératives entre monomères liés à l'ADN peuvent aider un des monomères à se lier malgré une modification sur son site de reconnaissance. Ceci a été observé lors de la liaison de XerC et XerD au site *dif*. Les interactions coopératives entre ces deux protéines pouvaient partiellement surmonter les modifications de l'ADN qui devraient interférer avec les interactions spécifiques entre la recombinase et le site *dif* (Blakely et Sherratt, 1994). Étant donné qu'il y a tant de monomères de MBP-IntI4 qui se lient aux sites de recombinaison, cette explication est très plausible.

3.7. DÉTERMINATION DES SITES DE LIAISON D'INTI4 PAR GEL DE RETARDEMENT AVEC UNE POPULATION MIXTE DE FRAGMENTS *attI4*.

Un mélange de sondes *attI4* variant en longueur (de 20-pb à pleine longueur) a été produit par une méthode semblable à la réaction de séquençage didésoxy. Afin de déterminer plus spécifiquement les sites de liaison d'IntI4, cette population de sondes *attI4* a été utilisée dans un gel de retardement et les ADN complexés ont été analysés sur gel de séquençage.

Les produit PCR purifiés de *attI4-5'* (78-pb) et *attI4-3'* (61-pb) ont chacun été utilisés comme matrice. Afin d'avoir une population de fragments allant de 20-pb à la pleine longueur de la matrice (78 ou 61-pb, selon la matrice), la concentration de ddNTPs a été optimisée. Les concentrations de ddNTPs suggérées par Ausubel et al. (1994; chapitre 7.4) ont été augmentées de 33% afin de produire cette population de fragments *attI4*.

En analysant l'autoradiographie des gels de séquençage, deux particularités ont été observées. Premièrement, il y a des molécules d'ADN de toutes les longueurs possible (de 20-pb à la pleine longueur de la matrice) qui sont présentes. Selon le mélange "Taq Sanger" utilisé, il devrait seulement avoir les molécules se terminant

par une purine ou une pyrimidine. Il semble donc que la Taq polymérase n'a pas bien fait l'élongation de l'ADN. Des modifications dans le protocole d'élongation et de terminaison par ddNTP sont donc nécessaires.

Il était attendu que seulement les fragments les plus longs seraient capables d'être liés par plus d'un monomère. La deuxième particularité est donc la présence de fragments de toutes longueurs dans les puits d'ADN ayant été extrait du gel de retardement. Évidemment, il n'est pas très probable que quatre monomères de MBP-IntI4 se fixent sur un fragment des 20 premières paires de bases d'*attI4-5'*, par exemple. L'explication la plus évidente de cette observation est qu'il peut avoir plus d'une molécule d'ADN par complexe. Ceci nous rappelle de la recombinaise λ Int. Les monomères liés sur les sites B et P'2 d'*attL* ont le potentiel d'interagir avec le partenaire de recombinaison *attR* (Kim et al., 1990).

CHAPITRE IV

CONCLUSION

Les bactéries possèdent d'extraordinaires capacités d'évolution et d'adaptation à leur milieu. Par une seule étape de transfert horizontal, une bactérie peut acquérir de nouvelles capacités et ainsi profiter du succès d'évolution d'une autre bactérie. Il est bien connu que le transfert horizontal de gènes chez les bactéries est responsable, entre autres, de la distribution répandue de gènes de résistance aux antibiotiques et de gènes de virulence. Les intégrons, découverts pendant les années '80, sont des éléments génétiques très efficaces dans le transfert horizontal de gènes. Ils sont responsables de la capture et de la dissémination de gènes, surtout les gènes de résistance aux antibiotiques. L'insertion et l'excision de gènes dans l'intégron se font par un mécanisme de recombinaison spécifique de site catalysé par l'intégrase d'intégron.

Quatre classes d'intégrons ont été définies: les classes 1,2,3 et 4. Chaque classe possède son intégrase et son site *attI*. Ce sont les intégrons de classe 1 qui sont les plus répandus et c'est l'intégron de classe 4 qui se distingue le plus des autres classes d'intégrons. Ce super-intégron est composé d'un gène d'intégrase (*intI4*) et

de plus 150 cassettes. Il est localisé dans le petit chromosome de *Vibrio cholerae* et représente environ 3% de son génome.

Le but de cette étude était de caractériser les interactions entre l'intégrase IntI4 de *Vibrio cholerae* et ses sites de recombinaison *attI4* et *attC*. Il a été démontré que IntI4 peut former sept complexes avec le site *attI4*. En comparant les résultats avec les études de liaison IntI1-*attI1* et en analysant la séquence d'*attI4*, sept sites de liaison ont été proposés. Ces sites proposés sont les régions -80, -50, -40, -30, -10, 0 et +20. Dans chacune de ces régions, une séquence semblable (cinq nucléotides sur sept) à la séquence consensus GTTRRRY est présente.

Il a été démontré que IntI4 peut former sept complexes avec le site *VCR2*. La liaison de deux monomères d'IntI4 au site inverse au site de recombinaison (les sites 1L et 2L), ainsi qu'au site de recombinaison (les sites 2R et 1R) a été proposé. Trois autres sites ayant une séquence semblable (cinq nucléotides sur sept) à la séquence consensus GTTRRRY sur l'un ou l'autre des brins ont été proposés.

D'après ces études, IntI4 semble avoir une affinité faible pour ses sites de recombinaison. L'intégration et l'excision de nouvelles cassettes dans le super-intégron de *V. cholerae* a probablement eu lieu très lentement au cours de son évolution. Ce système de recombinaison a ainsi permis à *V. cholerae* d'accumuler un grand nombre de gènes non-essentiels pouvant lui conférer un avantage biologique.

Il a aussi été démontré que l'intégrase de classe 1, IntI1, peut former six complexes avec le site *attI4*. En comparant avec les études de liaison IntI1-*attI1* et en analysant la séquence, six sites de liaison ont été proposés. Ces sites proposés sont les régions -80, -50, -40, -30, -10 et 0. Dans chacune de ces régions, une séquence semblable (cinq nucléotides sur sept) à la séquence consensus GTTRRRY est présente.

Si c'est possible, le transfert de cassettes d'intégrons de résistance vers le super-intégron ou le transfert de cassettes de *V. cholerae* vers les intégrons de résistance pourraient entraîner de sérieuses répercussions. L'intégration de cassettes de gènes de résistance aux antibiotiques au site *attI4* pourrait rendre le traitement du choléra encore plus difficile. De plus, l'insertion de cassettes de gènes de virulence du super-intégron dans un intégron mobile pourrait rendre des bactéries multi-résistantes encore plus virulentes. Toutefois, la présence d'un intégron de classe 1 dans *Vibrio cholerae* est probablement trop récente pour que ceci se soit déjà produit.

Dans la plupart des systèmes de recombinaison spécifique de site, seulement deux ou trois monomères d'intégrase par molécule d'ADN sont nécessaires à la recombinaison spécifique de site. On peut donc se demander si la liaison des six ou sept monomères est nécessaire pour la recombinaison. La liaison de deux monomères (régions -10 et 0) est certainement nécessaire à la réaction de recombinaison tandis la liaison de monomères aux régions -30 et -50 aide probablement à la formation du complexe de recombinaison. Les régions -10 et 0 ont déjà été démontrées, chez *attI1*, comme étant essentiel à la recombinaison par *IntI1*, tandis que les régions -30 et -50 ont été démontrées comme étant nécessaire à une recombinaison efficace par *IntI1* (Hansson et al., 1997). Quant aux autres monomères, leur liaison aide à la formation du complexe de recombinaison ou ne sont pas nécessaires du tout. La liaison de tant de monomères, les indications que la coupure des brins est franche (i.e. sans aucun décalage entre le site de coupure de chaque brin) et la présence d'un domaine qui est unique aux intégrases d'intégrons pourraient indiquer que le mécanisme de recombinaison diffère un peu de celui des autres tyrosine recombinases.

Ces études nous permettent de poser d'intéressantes questions sur la spécificité et le mécanisme de recombinaison spécifique de site d'*IntI4*. Est-ce que la liaison de tous les monomères est nécessaire à une recombinaison efficace? Quel est le rôle de chacun de ces monomères? Est-ce que certains des monomères peuvent se

lier sur les deux substrats d'ADN? Est-ce que la liaison des monomères est coopérative? Est-ce que la recombinaison est effectuée en *cis* ou en *trans*? Des études plus détaillées pourraient donc être entreprises afin de répondre à ces questions. L'implication de molécules accessoires, tel que IHF, dans la recombinaison *in vivo* pourrait aussi être étudiée. Cette protéine joue un rôle important lors de la recombinaison spécifique de site catalysée par l'intégrase Int du bactériophage λ . Cette protéine ne semble pas être essentielle à la recombinaison spécifique de site catalysée par Int1, mais elle facilite la liaison de celle-ci à son substrat d'ADN (A Gravel, thèse de doctorat, U. Laval). D'autres protéines accessoires pourraient aussi être impliquées.

Ces études ont contribué à nos connaissances des interactions entre une intégrase d'intégron et ses sites de recombinaison. Toutefois, plusieurs questions intéressantes demeurent sans réponses. Comme c'est l'intégrase de classe 1 qui est la plus répandue et la plus efficace, les études de mécanisme de recombinaison des intégrases d'intégrons seraient tout probablement plus fructueuses si on utilisait Int1. Il serait toutefois intéressant de caractériser les interactions entre les autres intégrases d'intégrons et leurs sites de recombinaison respectifs.

RÉFÉRENCES

Abremski KE, Hoess RH (1992) Evidence for a second conserved arginine residue in the integrase family of recombination proteins. *Protein Eng* 5(1):87-91.

Alen C, Sherratt DJ, Colloms SD (1997) Direct interaction of aminopeptidase A with recombination site DNA in Xer site-specific recombination. *EMBO J.* 16(17):5188-97.

Andrews BJ, Proteau GA, Beatty LG, Sadowski PD (1985) The FLP recombinase of the 2 micron circle DNA of yeast: interaction with its target sequences. *Cell* 40(4):795-803.

Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M (1995) A novel integron-like element carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob Agents Chemother* 39(7):1612-5.

Arcangioli MA, Leroy-Setrin S, Martel JL, Chaslus-Dancla E (1999) A new chloramphenicol and florfenicol resistance gene flanked by two integron structures in *Salmonella typhimurium* DT104. *FEMS Microbiol Lett* 174(2):327-32.

Arciszewska LK, Sherratt DJ (1995) Xer site-specific recombination in vitro. *EMBO J* 14(9):21121-20.

Argos P, Landy A, Abremski K, Egan JB, Haggard-Ljungquist E, Hoess RH, Kahn ML, Kalionis B, Narayana SV, Pierson LS 3d, Sternberg N, Leong JM (1986) The

integrase family of site-specific recombinases: regional similarities and global diversity. *EMBO J* 5(2):433-40.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, chapitre 10.7.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1993) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, chapitre 10.8.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: John Wiley and Sons, chapitres 2.4, 7.4 et 12.3.

Barker A, Clark CA, Manning PA (1994) Identification of VCR, a repeated sequence associated with a locus encoding a hemagglutinin in *Vibrio cholerae* O1. *J Bacteriol* 176(17): 5450-8.

Beatty LG, Sadowski PD (1988) The mechanism of loading of the FLP recombinase onto its DNA target sequence. *J Mol Biol* 204(2): 283-94.

Bissonnette L, Roy PH (1992) Characterization of $\text{In}0$ of *Pseudomonas aeruginosa* plasmid pVS1, an ancestor of integrons of multiresistance plasmids and transposons of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 174(4): 1248-57.

Blake JA, Ganguly N, Sherratt DJ (1997) DNA sequence of recombinase-binding sites can determine Xer site-specific recombination outcome. *Mol Microbiol* 23(2): 387-98.

Blakely G, Colloms S, May G, Burke M, Sherratt D (1991) *Escherichia coli* XerC recombinase is required for chromosomal segregation at cell division. *New Biol* 3(8):789-98.

Blakely G, May G, McCulloch R, Arciszewska LK, Burke M, Lovett ST, Sherratt DJ (1993) Two related recombinases are required for site-specific recombination at *dif* and *cer* in *E. coli* K12. *Cell* 75(2):351-61.

Blakely GW, Sherratt DJ (1994) Interactions of the site-specific recombinases XerC and XerD with the recombination site *dif*. *Nucleic Acids Res* 22(25):5613-20.

Brown NL, Misra TK, Winnie JN, Schmidt A, Seiff M, Silver S (1986) The nucleotide sequence of the mercuric resistance operons of plasmid R100 and transposon Tn501: further evidence for *mer* genes which enhance the activity of the mercuric ion detoxification system. *Mol Gen Genet* 202(1):143-51.

Brown HJ, Stokes HW, Hall RM (1990) The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. *J Bacteriol* 178(15):4429-37.

Cameron FH, Groot Obbink DJ, Ackerman VP, Hall RM (1986) Nucleotide sequence of the AAD(2'') aminoglycoside adenylyltransferase determinant *aadB*. Evolutionary relationship of this region with those surrounding *aadA* in R538-1 and *dhfrII* in R388. *Nucleic Acids Res* 14(21):8625-35.

Campbell A (1981) Some general questions about movable elements and their implications. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 45(Pt1) : 1-9.

Collis CM, Grammaticopoulos G, Briton J, Stokes HW, Hall RM (1993) Site-specific insertion of gene cassettes into integrons. *Mol Microbiol* 9(1):41-52.

Collis CM, Hall RM (1992a) Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. *J Bacteriol* 174(5):1574-85.

Collis CM, Hall RM (1992b) Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol* 6(19):2875-85.

Collis CM, Hall RM (1995) Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. *Antimicrob Agents Chemother* 39(1):155-62.

Collis CM, Kim M, Stokes HW, Hall RM (1998) Binding of the purified integron DNA integrase IntI1 to integron- and cassette-associated recombination sites. *Mol Microbiol* 29(2):477-90.

Colloms SD, Alen C, Sherratt DJ (1998) The ArcA/ArcB two-component regulatory system of *Escherichia coli* is essential for Xer site-specific recombination at *psi*. *Mol Microbiol* 28(3):521-30.

Colloms SD, Bath J, Sherratt DJ (1997) Topological selectivity in Xer site-specific recombination. *Cell* 88(6):855-64.

Colloms SD, McCulloch R, Grant K, Neilson L, Sherratt DJ (1996) Xer-mediated site-specific recombination in vitro. *EMBO J* 15(5):1172-81.

Colloms SD, Sykora P, Szatmari G, Sherratt DJ (1990) Recombination at ColE1 *cer* requires the *Escherichia coli* *xerC* gene product, a member of the lambda integrase family of site-specific recombinases. *J Bacteriol* 172(12):6973-80.

Craig NL (1988) The mechanism of conservative site-specific recombination. *Annu Rev Genet* 22: 77-105.

Crisona NJ, Weinberg RL, Peter BJ, Summers DW, Cozzarelli NR (1999) The topological mechanism of phage lambda integrase. *J Mol Biol* 289(4):747-75.

Dalsgaard A, Forslund A, Tam NV, Vinh DX, Cam PD (1999) Cholera in Vietnam: changes in genotypes and emergence of class I integrons containing aminoglycoside resistance gene cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from 1979 to 1996. *J Clin Microbiol* 37(3):734-41.

de la Cruz F, Davies J (2000) Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends Microb* 8(3): 128-133.

Falbo V, Carattoli A, Tosini F, Pezzella C, Dionisi AM, Luzzi I (1999) Antibiotic resistance conferred by a conjugative plasmid and a class I integron in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Albania and Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 43(3):693-6.

Fling ME, Kopf J, Richards C (1985) Nucleotide sequence of the transposon Tn7 gene encoding an aminoglycoside-modifying enzyme, 3''(9)-O-nucleotidyltransferase. *Nucleic Acids Res* 13(19):7095-106.

Francia MV, de la Cruz F, Lobo JMG (1993) Secondary site for integration mediated by the Tn21 integrase. *Mol Microbiol* 10(4):823-28.

Francia MV, Zabala JC, de La Cruz F, Garcia Lobo JM (1999) The IntI1 integron integrase preferentially binds single-stranded DNA of the attC site. *J Bacteriol* 181(21):6844-9.

Gopaul DN, van Duyne GD (1999) Structure and mechanism in site-specific recombination. *Curr Opin Struct Biol* 9(1):14-20.

Gravel A, Fournier B, Roy PH (1998) DNA complexes obtained with the integron integrase IntI1 at the *attI1* site. *Nucleic Acids Res* 26(19):4347-4355.

Grindley ND (1997) Site-specific recombination: synapsis and strand exchange revealed. *Curr Biol* 7(10):R608-12.

Grinsted J, de la Cruz F, Schmitt R (1990) The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid* 24(3):163-89.

Guerineau F, Brooks L, Mullineaux P (1990) Expression of the sulfonamide resistance gene from plasmid R46. *Plasmid* 23(1):35-41.

Gyohda A, Komano T (2000) Purification and characterization of the R64 shufflin-specific recombinase. *J Bacteriol* 182(10): 2787-92.

Hall RM (1997) Mobile gene cassettes and integrons: moving antibiotic resistance genes in gram-negative bacteria. *Ciba Found Symp* 207:192-202.

Hall RM, Brookes DE, Stokes HW (1991) Site-specific insertion of genes into integrons: role of the 59-base element and determination of the recombination cross-over point. *Mol Microbiol* 5(8):1941-59.

Hall RM, Brown HJ, Brookes DE, Stokes HW (1994) Integrons found in different locations have identical 5' ends but variable 3' ends. *J Bacteriol* 176(20):6286-94.

Hall RM, Collis CM (1995) Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol Microbiol* 15(4):593-600.

Hall RM, Collis CM, Kim M-J, Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW (1999) Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci* 870:68-80.

Hall RM, Vockler C (1987) The region of the IncN plasmid R46 coding for resistance to beta-lactam antibiotics, streptomycin/spectinomycin and sulphonamides is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmids and in Tn21-like transposons. *Nucleic Acids Res* 15(18):7491-501.

Hallet B, Arciszewska LD, Sherratt DJ (1999) Reciprocal control of catalysis by the tyrosine recombinase XerC and XerD: an enzymatic switch in site-specific recombination. *Mol Cell* 4(6): 949-59.

Han YW, Gumport RI, Gardner JF (1993) Complementation of bacteriophage lambda integrase mutants: evidence for an intersubunit active site. *EMBO J* 12(12):4577-84.

Hansson K, Skold O, Sundstrom L (1997) Non-palindromic *attI* sites of integrons are capable of site-specific recombination with one another and with secondary targets. *Mol Microbiol* 26(3):441-53.

Hartley JL, Donelson JE (1980) Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature* 286(5776):860-5.

Jayaram M (1985) Two-micrometer circle site-specific recombination: the minimal substrate and the possible role of flanking sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(17):5875-9.

Kazama H, Hamashima H, Sasatsu M, Arai T (1998) Distribution of the antiseptic-resistance gene *qacE* delta 1 in gram-positive bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 165(2):295-9.

Kholodii GY, Mindlin SZ, Bass IA, Yurieva OV, Minakhina SV, Nikiforov VG (1995) Four genes, two ends, and a *res* region are involved in transposition of Tn5053: a

paradigm for a novel family of transposons carrying either a *mer* operon or an integron. *Mol Microbiol* 17(6):1189-200.

Kim S, Moitoso de Vargas L, Nunes-Duby SE, Landy A (1990) Mapping of a higher order protein-DNA complex: two kinds of long-range interactions in lambda *attL*. *Cell* 63(4):773-81.

Komano T (1999) Shufflons: multiple inversion systems and integrons. *Annu Rev Genet* 33:171-91.

Kwon HJ, Tirumalai R, Landy A, Ellenberger T (1997) Flexibility in DNA recombination: structure of the lambda integrase catalytic core. *Science* 276(5309):126-31.

Landy A (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annu Rev Biochem* 58:913-49.

Lawrence JG, Ochman H (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(16): 9413-9417.

Lee J, Jayaram M, Grainge I (1999) Wild-type Fip recombinase cleaves DNA in trans. *EMBO J* 18(3):784-91.

Levesque C, Brassard S, Lapointe J, Roy PH (1994) Diversity and relative strength of tandem promoters for the antibiotic-resistance genes of several integrons. *Gene* 142(1):49-54.

Manning PA, Clark CA, Focareta T (1999) Gene capture in *Vibrio cholerae*. *Trends Microbiol* 7(3):93-5.

Martinez E, de la Cruz F (1988) Transposon Tn21 encodes a RecA-independent site-specific integration system. *Mol Gen Genet* 211(2):320-5.

Martinez E, de la Cruz F (1990) Genetic elements involved in Tn21 site-specific integration, a novel mechanism for the dissemination of antibiotic resistance genes. *EMBO J* 9(4):1275-81.

Mazel D, Dychinco B, Webb VA, Davies J (1998) A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science* 280(5363):605-8.

McCulloch R, Burke ME, Sherratt DJ (1994) Peptidase activity of *Escherichia coli* aminopeptidase A is not required for its role in Xer site-specific recombination. *Mol Microbiol* 12(2):241-51.

Meyer JF, Nies BA, Wiedemann B (1983) Amikacin resistance mediated by multiresistance transposon Tn2424. *J Bacteriol* 155(2):755-60.

Mizuuchi K, Gellert M, Nash HA (1978) Involvement of super-twisted DNA in integrative recombination of bacteriophage lambda. *J Mol Biol* 121(3):375-92.

Mizuuchi K, Mizuuchi M, Gellert M (1982) Cruciform structures in palindromic DNA are favored by DNA supercoiling. *J Mol Biol* 156(2): 229-243.

Moitoso de Vargas L, Pargellis CA, Hasan NM, Bushman EW, Landy A (1988) Autonomous DNA binding domains of lambda integrase recognize two sequence families. *Cell* 54(7):923-9.

Neilson L, Blakely G, Sherratt DJ (1999) Site-specific recombination at *dif* by *Haemophilus influenzae* XerC. *Mol Microbiol* 31(3):915-26.

Nesvera J, Hochmannova J, Patek M (1998) An integron of class 1 is present on the plasmid pCG4 from gram-positive bacterium *Corynebacterium glutamicum*. *FEMS Microbiol Lett* 169(2):391-5.

Nunes-Duby SE, Kwon HJ, Tirumalai RS, Ellenberger T, Landy A (1998) Similarities and differences among 105 members of the Int family of site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res* 26(2):391-406.

Nunes-Duby SE, Matsumoto L, Landy A (1987) Site-specific recombination intermediates trapped with suicide substrates. *Cell* 50(5):779-88.

Nunes-Duby SE, Tirumalai RS, Dorgai L, Yagil E, Weisberg RA, Landy A (1994) Lambda integrase cleaves DNA in *cis*. *EMBO J* 13(18):4421-30.

Ogawa A, Takeda T (1993) The gene encoding the heat-stable enterotoxin of *Vibrio cholerae* is flanked by 123-base pair direct repeats. *Microbiol Immunol* 37(8): 607-613.

Osano E, Arakawa R, Ohsuka R, Wacharotayankun N, Kato N, Ohta M (1995) Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *bla_{IMP}* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother* 39(4):824-9.

Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH (1987) Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21):7378-82.

Ouellette M, Roy PH (1987) Homology of ORFs from Tn2603 and from R46 to site-specific recombinases. *Nucleic Acids Res* 15(23):10055.

Pabo CO, Sauer RT (1992) Transcription factors: structural families and principles of DNA recognition. *Annu Rev Biochem* 61:1053-95.

Panigrahi GB, Beatty LG, Sadowski PD (1992) The FLP protein contacts both major and minor grooves of its recognition target sequence. *Nucleic Acids Res* 20(22):5927-35.

Parsons RL, Prasad PV, Harshey RM, Jayaram M (1988) Step-arrest mutants of FLP recombinase: implications for the catalytic mechanism of DNA recombination. *Mol Cell Biol* 8(8):3303-10.

Paulsen IT, Littlejohn TG, Radstrom P, Sundstrom L, Skold O, Swedberg G, Skurray RA (1993) The 3' conserved segment of integrons contains a gene associated with multidrug resistance to antiseptics and disinfectants. *Antimicrob Agents Chemother* 37(4):761-8.

Poirel L, Guibert M, Bellais S, Naas T, Nordmann P (1999) Integron- and carbenicillinase-mediated reduced susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid in isolates of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype typhimurium DT104 from French patients. *Antimicrob Agents Chemother* 43(5):1098-104.

Radstrom P, Skold O, Swedberg G, Flensburg J, Roy PH, Sundstrom L (1994) Transposon Tn5090 of plasmid R751, which carries an integron, is related to Tn7, Mu, and the retroelements. *J Bacteriol* 176(11):3257-68.

Recchia GD, Aroyo M, Wolf D, Blakely G, Sherratt DJ (1999) FtsK-dependent and -independent pathways of Xer site-specific recombination. *EMBO J* 18(20):5724-34.

Recchia GD, Hall RM (1995) Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology* 141 (Pt 12): 3015-27.

Recchia GD, Hall RM (1997) Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol* 5(10):389-94.

Recchia GD, Stokes HW, Hall RM (1994) Characterisation of specific and secondary recombination sites recognised by the integron DNA integrase. *Nucleic Acids Res* 22(11):2071-8.

Richet E, Abcarian P, Nash HA (1988) Synapsis of attachment sites during lambda integrative recombination involves capture of a naked DNA by a protein-DNA complex. *Cell* 52(1):9-17.

Ross W, Landy A (1982) Bacteriophage lambda int protein recognizes two classes of sequence in the phage att site: characterization of arm-type sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79(24):7724-8.

Ross W, Landy A (1983) Patterns of lambda Int recognition in the regions of strand exchange. *Cell* 33(1):261-72.

Ross W, Landy A, Kikuchi Y, Nash HA (1979) Interaction of int protein with specific sites on lambda att DNA. *Cell* 18(2):297-307.

Rowe-Magnus D, Mazel D (1999) Resistance gene capture. *Curr Opin Microbiol* 2(5): 483-8.

Roy PH (1999) Transposons and integrons : Natural genetic engineering of bacterial resistance. *Can J Infect Dis* 10 (Suppl C): 4C-8C.

Sadowski P (1986) Site-specific recombinases: changing partners and doing the twist. *J Bacteriol* 165(2):341-7.

Sadowski PD (1993) Site-specific genetic recombination: hops, flips, and flops. *FASEB J* 7(9):760-7.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2^e édition.

Schmidt F, Klopfer-Kaul I (1984) Evolutionary relationship between Tn21-like elements and pBP201, a plasmid from *Klebsiella pneumoniae* mediating resistance to gentamicin and eight other drugs. *Mol Gen Genet* 197(1):109-19.

Schmidt FR, Nucken EJ, Henschke RB (1988) Nucleotide sequence analysis of 2"-aminoglycoside nucleotidyl-transferase ANT(2") from Tn4000: its relationship with AAD(3") and impact on Tn21 evolution. *Mol Microbiol* 2(6):709-17.

Schmitt R, Motsch S, Rogowsky P, de la Cruz F, Grinsted J (1985) On the transposition and evolution of Tn1721 and its relatives. *Basic Life Sci* 30:79-91.

Senecoff JF, Bruckner RC, Cox MM (1985) The FLP recombinase of the yeast 2-micron plasmid: characterization of its recombination site. *Proc Natl Acad Sci U S A*.82(21):7270-4.

Shapiro JA, Spom P (1977) Tn402: a new transposable element determining trimethoprim resistance that inserts in bacteriophage lambda. *J Bacteriol* 129(3):1632-5.

Sherratt DJ, Arciszewska LK, Blakely G, Colloms S, Grant K, Leslie N, McCulloch R (1995) Site-specific recombination and circular chromosome segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 347(1319):37-42.

Shibata N, Kurokawa H, Yagi T, Arakawa Y (1999) A class 3 integron carrying the IMP-1 metallo-beta-lactamase gene found in Japan. *39th Interscience Conference on Antimicrobial agents and Chemotherapy* Abstract 41.

Stark WM, Boocock MR, Sherratt DJ (1992) Catalysis by site-specific recombinase. *Trends Genet* 8(12): 432-9.

Stirling CJ, Colloms SD, Collins JF, Szatmari G, Sherratt DJ (1989) *xerB*, an *Escherichia coli* gene required for plasmid ColE1 site-specific recombination, is identical to *pepA*, encoding aminopeptidase A, a protein with substantial similarity to bovine lens leucine aminopeptidase. *EMBO J* 8(5):1623-7.

Stirling CJ, Szatmari G, Stewart G, Smith MC, Sherratt DJ (1988) The arginine repressor is essential for plasmid-stabilizing site-specific recombination at the ColE1 *cer* locus. *EMBO J* 7(13):4389-95.

Stokes HW, Hall RM (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol Microbiol* 3(12):1669-83.

Stokes HW, O'Gorman DB, Recchia GD, Parsekhian M, Hall RM (1997) Structure and function of 59-base element recombination sites associated with mobile gene cassettes. *Mol Microbiol* 26(4):731-45.

Subramanya HS, Arciszewska LK, Baker RA, Bird LE, Sherratt DJ, Wigley DB (1997) Crystal structure of the site-specific recombinase, XerD. *EMBO J* 16(17):5178-87.

Summers DK (1989) Derivatives of ColE1 *cer* show altered topological specificity in site-specific recombination. *EMBO J* 8(1):309-15.

Sundstrom L, Roy PH, Skold O (1991) Site-specific insertion of three structural gene cassettes in transposon Tn7. *J Bacteriol* 173(9):3025-8.

Tenover FC, Filpula D, Phillips KL, Plorde JJ (1988) Cloning and sequencing of a gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase from an R factor of *Citrobacter diversus*. *J Bacteriol* 170(1):471-3.

Thompson JF, Moitoso de Vargas L, Skinner SE, Landy A (1987) Protein-protein interactions in a higher-order structure direct lambda site-specific recombination. *J Mol Biol* 195(3):481-93.

Tietze E, Brevet J (1991) The trimethoprim resistance transposon Tn7 contains a cryptic streptothricin resistance gene. *Plasmid* 25(3): 217-20.

Tolmasky ME (1990) Sequencing and expression of *aadA*, *bla*, and *tnpR* from the multiresistance transposon Tn1331. *Plasmid* 24(3):218-26.

Tosini F, Visca P, Luzzi I, Dionisi AM, Pezzella C, Petrucca A, Carattoli A (1998) Class 1 integron-borne multiple-antibiotic resistance carried by IncFI and IncL/M plasmids in *Salmonella enterica* serotype typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother* 42(12):3053-8.

Travers AA (1989) DNA conformation and protein binding. *Annu Rev Biochem* 58:427-52.

Vaisvila R, Morgan RD, Raleigh EA (1998) 6th ASM Conference on Small Genomes Lake Arrowhead, CA, USA, Poster PA-22.

Waldman AS, Fitzmaurice WP, Scoocca JJ (1986) Integration of the bacteriophage HP1c1 genome into the *Haemophilus influenzae* Rd chromosome in the lysogenic state. *J Bacteriol* 165(1):297-300.

Ward JM, Grinsted J (1982) Physical and genetic analysis of the Inc-W group plasmids R388, Sa, and R7K. *Plasmid* 7(3):239-50.

Young H-K, Qumsieh MJ, McIntosh ML (1994) Nucleotide sequence and genetic analysis of the type Ib trimethoprim-resistant, Tn4132-encoded dihydrofolate reductase. *J Antimicrob Chemother* 34(5): 715-25.

Zieg J, Silverman M, Hilmen M, Simon M (1977) Recombinational switch for gene expression. *Science* 196(4286): 170-7.