



Un agent nosocomial humain et animal : étude de la dynamique du transfert de gènes de résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter*

Anne-Sophie Godeux

► To cite this version:

Anne-Sophie Godeux. Un agent nosocomial humain et animal : étude de la dynamique du transfert de gènes de résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter*. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lyon, 2020. Français. NNT : 2020LYSE1296 . tel-03613284

HAL Id: tel-03613284

<https://theses.hal.science/tel-03613284>

Submitted on 18 Mar 2022

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

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



N°d'ordre NNT : 2020LYSE1296

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale E2M2
« Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie, Modélisation »

Spécialité de doctorat : Sciences de la Vie
Discipline : Microbiologie

Soutenue le :
14 décembre 2020

Par :
Anne-Sophie Godeux

Un agent nosocomial humain et animal : Etude de la dynamique du transfert de gènes de résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter*

Directrice de thèse : Mme Maria-Halima Laaberki
Co- directeur de thèse : M. Xavier Charpentier
Co-directeur de thèse : M. Samuel Venner

Devant le jury composé de :

Da Ré, Sandra, rapportrice. Chargée de Recherche INSERM, Université de Limoges
Prudhomme, Marc, rapporteur. Maître de conférences, Université Paul Sabatier Toulouse 3
Doublet, Benoît, examinateur. Directeur de Recherche, INRAE, Université de Tours
Henry, Thomas, examinateur. Directeur de Recherche INSERM, Université Claude Bernard Lyon 1
Wisniewski-Dye, Florence, examinatrice. Professeur des Universités, Université Claude Bernard Lyon 1

Université Claude Bernard – LYON 1

Administrateur provisoire de l'Université	M. Frédéric FLEURY
Président du Conseil Académique	M. Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil d'Administration	M. Didier REVEL
Vice-Président de la Commission de Recherche	M. Jean-François MORNEX
Directeur Général des Services	M. Pierre ROLLAND

COMPOSANTES SANTE

Département de Formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directrice : Mme Anne-Marie SCHOTT
Faculté d'Odontologie	Doyenne : Mme Dominique SEUX
Faculté de Médecine et Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Doyenne : Mme Carole BURILLON
Faculté de Médecine Lyon-Est	Doyen : M. Gilles RODE
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation (ISPTR)	Directeur : M. Xavier PERROT
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (ISBP)	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA

COMPOSANTES SANTE

Département Génie Electrique et des Procédés (GEP)	Directrice : Mme Rosario FERRIGNO
Département Informatique	Directeur : M. Behzad SHARIAT
Département Mécanique	Directeur Marc BUFFAT
Ecole Supérieure de Chimie, Physique, Electronique (CPE Lyon)	Directeur : Gérard PIGNAULT
Institut de Science Financière et d'Assurance (ISFA)	Directeur : Nicolas LEBOISNE
Institut national du Professorat et de l'Education	Administrateur provisoire : M. Pierre CHAPEYRON
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. Christophe VITON
Observatoire de Lyon	Directrice : Mme Isabelle DANIEL
Polytechnique Lyon	Directeur : M. Emmanuel PERRIN
UFR Biosciences	Administratrice provisoire : Mme Kathrin GIESELER
UFR des Sciences et Techniques des Activités physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
UFR Faculté des Sciences	Directeur : M. Bruno ANDRIOLETTI

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes rapporteurs Mme Sandra Da Re et M. Marc Prudhomme, ainsi que mes examinateurs M. Benoît Doublet, M. Thomas Henry et Mme Florence Wisniewski-Dye d'avoir eu la gentillesse d'accepter de faire partie de mon jury de thèse. Je les remercie de leur intérêt pour ce travail et du temps consacré à la lecture et l'évaluation de ce manuscrit de thèse.

Je remercie également M. François-Loïc Cosset de m'avoir accueillie au sein du Centre International de Recherche en Infectiologie de Lyon.

Je remercie toute l'équipe pédagogique de l'UFR Bioscience, et en particulier M. Christophe Bruel, qui m'a permis de goûter aux joies de l'enseignement pendant cette année d'ATER. Merci à Nathalie Poussereau et Mathias Choquer pour leur bienveillance et leurs conseils précieux. Merci à Erwan Gueguen pour le temps passé à nous expliquer le fonctionnement et l'organisation des TP pour que nous soyons fins prêts pour un confinement de 2 mois pour cause de Covid. Enfin, merci à Patricia Luis pour son organisation des TD de Microbiologie en distanciel.

Merci aux personnes avec qui j'ai pu collaborer dans le cadre de ces travaux de thèse. Merci à Marisa Haenni et Agnese Lupo pour m'avoir toujours accueillie et considérée avec gentillesse et respect lorsque je venais les embêter pour des antibiogrammes. Merci à Gabriel Carvallho pour avoir pris en main la modélisation et avoir fait, encore et encore des simulations. Merci à Samuel Barreto pour ses analyses génétiques incroyables et ses rapports toujours très complets. Enfin, merci à tous les autres collaborateurs avec qui je regrette de n'avoir pas eu plus le temps d'interagir.

A présent je souhaite remercier mes encadrants. Malheureusement, je ne suis pas très grande écrivaine donc j'espère que vous saurez lire au-delà de ces quelques lignes qui ne pourront jamais représenter mes réels sentiments de gratitude et de respect.

Merci tout d'abord à Xavier pour m'avoir accueillie dans l'équipe et pour m'avoir fait confiance malgré mon parcours atypique. Merci pour ton esprit scientifique toujours à l'affut, prêt à se questionner et à rechercher de nouvelles pistes de réflexion. Merci pour ta bienveillance, ta disponibilité, ton calme et ta bonne humeur.

Merci à Samuel pour ces (très intenses) sessions de réflexion sur des notions auxquelles je n'étais vraiment pas habituée. J'ai ainsi pu m'ouvrir à de nouvelles façons de réfléchir et connecter un peu plus le monde de la Bactériologie avec celui de l'Ecologie et l'Evolution (à mon humble niveau). Merci à toi

pour ton implication dans ce projet et pour mon encadrement malgré la partie expérimentale qui a fini par prendre beaucoup de place.

Enfin, merci à Maria. Je n'aurai jamais pu rêver meilleur mentor que toi. Toujours disponible pour m'aider, tu as su être à mon écoute pendant ces quatre années (en fait plus de six années si on compte mon Master). Ta bienveillance m'aura donné autant professionnellement que personnellement, et j'aurai toujours un profond sentiment de respect pour ta capacité à combiner Recherche scientifique, enseignements à l'autre bout de la ville et vie familiale. Le tout en restant toujours optimiste et souriante. La Science et les jeunes scientifiques en devenir ont besoin de personnes altruistes et impliquées telles que toi pour continuer malgré les sacrifices et les difficultés que cela demande.

Je remercie tous mes collègues de l'équipe Horigene et nos voisins de l'équipe Légio. Sachez que ces années n'auraient pas été pareilles sans cette bonne ambiance au labo, donc merci à toutes les personnes qui y ont contribué.

Des compétents : Bénédicte, et ses amibes trop mignonnes ; Laetitia, et son esprit scientifique toujours au poil ; Isabelle et son aide précieuse au labo ; Léo pour son aide lors des TP de Microbio et ses fameuses constructions Lac qui m'ont sauvé la vie ; Kevin pour ses chansons dans le P2 et sa bonne humeur éternelle ; Alexandre, notre champion « Des chiffres et des lettres » fan d'Harry Potter ; et enfin Félix, le baroudeur-footballeur. Un petit coucou également à Elin qui m'a accompagnée pendant cette dernière année et qui fût la meilleure stagiaire de l'Univers.

Des moins compétents : Patricia, et le foie gras à Noël (c'est primordial) ; Christophe, le bricol'tout qui sait toujours où se trouve le truc qu'on cherche ; Anne, le puit de la connaissance mais qu'il ne faut pas solliciter après 19h (c'est comme avec les Gremlins, ça peut être dangereux pour vous) ; Nathalie, la jeune dame battue par des retraitées ; Johan et Annelise, nos bretons préférés ; Elisabeth qui rate tous les gâteaux et qui promet que sa vengeance sera terrible ; Claire, sans qui l'apocalypse serait une réalité ; Christophe, et ses précieux conseils pour le séquençage ; et enfin les petites dernières, Margaux et Juliette, qui ne savent pas encore dans quoi elles se sont embarquées !

Enfin, je remercie mes proches, en particulier Guillaume et Corentin mais ils savent déjà, et ma maman qui m'a toujours soutenue dans mes projets et qui a su me faire confiance à chaque fois.

Merci à tous.

Table des matières

Remerciements	7
Table des matières	10
Table des figures	13
Abréviations	15
Introduction	18
1. Les éléments génétiques mobiles associés à la résistance aux antibiotiques et leur propagation par les transferts horizontaux de gènes	18
1.1. Les éléments génétiques mobiles, moteur de l'instabilité génétique et de la dissémination de résistance aux antibiotiques	18
1.2. Les éléments transposables procaryotes	19
1.3. Les plasmides de résistance	27
1.4. Les bactériophages	29
1.5. Autres éléments génétiques mobiles porteurs de résistances aux antibiotiques	29
1.6. Les transferts horizontaux de gènes chez les bactéries, moteurs de la propagation d'AR-MGEs	31
2. La transformation naturelle et la diversité génétique chez les bactéries	36
2.1. Vue d'ensemble du mécanisme de la transformation naturelle	36
2.2. Rôles et raison d'être de la transformation naturelle chez les bactéries	42
3. <i>A. baumannii</i> , un pathogène nosocomial multi-résistant aux antibiotiques	51
3.1. <i>A. baumannii</i> ou l'émergence d'un vieil ennemi	51
3.2. Distribution globale et structure génétique des populations d'isolats cliniques d' <i>A. baumannii</i>	54

3.3.	Un microorganisme aux capacités de survie et d'adaptation exceptionnelles	56
3.4.	Antibiorésistance	60
4.	Les îlots de résistance chez <i>A. baumannii</i>	64
4.1.	Classification des îlots de résistance chez <i>Acinetobacter baumannii</i>	64
4.2.	Îlots de résistances du groupe GC1	66
4.3.	Le cas particulier de l'îlot de résistance AbaR4	71
4.4.	Autres îlots de résistance (groupe GC2)	72

Résultats 74

Développement d'outils pour l'étude de la transformation naturelle chez les isolats cliniques MDR d'*A. baumannii* 75

1.	Détection des événements de transformation naturelle chez <i>A. baumannii</i> par cytométrie en flux. 75	
1.1.	Contexte :	75
1.2.	Objectifs :	76
1.3.	Résultats principaux et discussion :	76
1.4.	Éléments complémentaires :	78
2.	L'élimination sans cicatrice des grands îlots de résistance AbaR entraîne une sensibilité aux antibiotiques et une transformabilité naturelle accrue chez <i>Acinetobacter baumannii</i>	103
2.1.	Contexte :	103
2.2.	Objectifs :	104
2.3.	Résultats principaux et discussion :	104
2.4.	Éléments complémentaires :	105

Dynamique des îlots de résistance et transformation naturelle chez *A. baumannii*..... 122

1.	Transfert de larges îlots de résistance aux antibiotiques chez les <i>Acinetobacter</i> pathogènes.122
----	--

1.1.	Contexte :.....	122
1.2.	Objectifs :.....	123
1.3.	Résultats principaux et discussion :.....	123
1.4.	Éléments complémentaires :	124
1.5.	Manuscrit de la publication en préparation	128
2.	L'inhibition de la transformation naturelle par les ilots de résistance AbaRs favorise la fixation de la résistance aux antibiotiques dans la population d' <i>Acinetobacter baumannii</i>	157
2.1.	Contexte :.....	157
2.2.	Objectifs :.....	158
2.3.	Résultats principaux et discussion :.....	158
2.4.	Perspective : la transposition des ilots de résistance.....	161
2.5.	Manuscrit de la publication en préparation	163
Conclusion		204
Références.....		208
Annexes		230
Contribution supplémentaire à une publication scientifique.		230
Résumés		246

Table des figures

Figure 1 : Mécanismes de transposition.....	20
Figure 2 : Structure des principaux éléments transposables.	22
Figure 3 : Intégration, développement et excision d'un ilot génomique.....	26
Figure 4 : Principaux mécanismes de transferts horizontaux de gènes.	30
Figure 5 : Mécanisme de conjugaison bactérienne.	32
Figure 6 : Mécanismes de la transduction.....	34
Figure 7 : Biogénèse du pilus de type 4.	37
Figure 8 : Liaison et internalisation de l'ADN exogène lors de la transformation naturelle.	39
Figure 9 : Devenir de l'ADN importé lors de la transformation naturelle.	41
Figure 10 : Modèle du fonctionnement de la protéine ComM lors de la transformation naturelle.	43
Figure 11 : Modèles de la raison d'être de la transformation naturelle.....	45
Figure 12 : Phylogénie du genre <i>Acinetobacter</i> basée sur l'alignement des familles de protéines du génomme cœur.	52
Figure 13 : Structure du système de sécrétion de type 6.....	58
Figure 14 : Structures connues portant le gène <i>bla</i> _{OXA-23} chez les bactéries <i>Acinetobacter</i>	63
Tableau 1 : Ilots de résistance <i>AbaR</i> chez les isolats <i>A. baumannii</i> du GC1.....	65
Figure 15 : Arbre phylogénétique et distribution des gènes de résistance aux antibiotiques chez 43 isolats cliniques d' <i>A. baumannii</i> du groupe GCI.	67
Figure 16 : Structure des ilots de résistance retrouvés chez les isolats cliniques <i>A. baumannii</i>	69
Tableau 2 : Profils de résistance aux métaux lourds des souches AB5075 et AYE dont les ilots <i>AbaRs</i> ont été délétés en comparaison avec les souches sauvages.	106
Figure 17 : Expérience de transfert contact-dépendant.....	125

Abréviations

µm	Micromètre
AbaR	<i>Acinetobacter baumannii</i> Resistance
AbGRI	<i>Acinetobacter baumannii</i> Genomic Resistance island
Ab-RI	<i>Acinetobacter baumannii</i> Resistance island
Acb	<i>Acinetobacter calcoaceticus-baumannii</i>
ADN	Acide desoxyribonucléique
ADNdb	ADN double-brin
ADNsb	ADN simple-brin
ANSES	Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de L'alimentation, de l'environnement et du travail
ARG	Antibiotic Resistance Gene
AR-MGE	Antibiotic Resistance-associated Mobile Genetic Element
ATP	Adenosine Tri Phosphate
bp	Base pair
CHDL	Carbapenem Hydrolizing class D
CRAB	Carbapenem Resistant <i>Acinetobacter baumannii</i>
EC1/2	European Clone 1/2
ET	Element Transposable
GC1/2/3	Global Clone 1/2/3
GFP	Green Fluorescent Protein
HGT	Horizontal Gene Transfer
ICE	Integrative Conjugative Element
IG	Ilot génomique
IR	Inverted Repeat
IS	Insertion sequence
Kbp	Kilo base pair
MARR	Mutiple Antibiotic Resistance Region

MDR	Multi Drug Resistant
MGE	Mobile Genetic Element
MITE	Miniature Inverted-Repeat Transposable Element
MLST	MultiLocus Sequence Typing
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-Field Electrophoresis Gel
ST	Sequence Type
T4P	Pilus de type 4
T4SS	Type 4 Secretion System
T6SS	Type 6 Secretion System
UV	Ultra-Violet

Introduction

1. Les éléments génétiques mobiles associés à la résistance aux antibiotiques et leur propagation par les transferts horizontaux de gènes

1.1. Les éléments génétiques mobiles, moteur de l'instabilité génétique et de la dissémination de résistance aux antibiotiques

Les génomes bactériens sont façonnés par les échanges de gènes, les réarrangements chromosomiques et l'activité des éléments génétiques mobiles (MGEs), des séquences d'ADN dont la particularité est d'être capable de mouvement à l'intérieur du génome ou entre différentes cellules bactériennes leur servant d'hôte (Darmon and Leach, 2014). Certains MGEs, comme les plasmides ou les phages, portent leur propre système de transfert vers une nouvelle cellule hôte. D'autres ne peuvent se mouvoir qu'à l'intérieur même du génome. Ils s'appuient pour cela sur de courtes séquences nucléotidiques spécifiques reconnues par des enzymes telles que des transposases ou des intégrases capables de couper et de coller de l'ADN sur ces sites, et dont les gènes sont souvent portés par les MGEs. Les séquences nucléotidiques bordées par de tels sites constituent des MGEs tels que les cassettes de gène liés aux intégrons, les transposons, les séquences d'insertion (IS) et les îlots génomiques.

En plus de porter les gènes codant les éléments essentiels à leur mouvement, les MGEs portent très souvent des gènes accessoires pouvant apporter un avantage adaptatif à la cellule hôte. Les gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs), les déterminants génétiques de l'expression d'un phénotype de résistance aux antibiotiques, sont des gènes accessoires que l'on retrouve par exemple très souvent associés à des MGEs (von Wintersdorff et al., 2016). Chez les bactéries, les phénotypes de résistance aux antibiotiques peuvent être le résultat de mutations dans l'ADN chromosomique de la bactérie, ce qui provoque la modification de protéines déjà existantes, ou bien être le résultat de l'acquisition de d'un nouveau gène (van Hoek et al., 2011). Dans ce dernier cas, la résistance est due à l'expression d'un gène de résistance porté par un MGE. Cette association entre ARG et MGE (AR-MGE) est particulièrement inquiétante car elle est l'un des moteurs principaux de la dissémination rapide de résistances aux antibiotiques chez certaines espèces pathogènes (Babakhani and Oloomi, 2018;

Partridge et al., 2018; Sun et al., 2019). La très grande diversité des MGEs chez les bactéries et leur mode de mouvement rend d'autant plus complexe la compréhension de cette dynamique.

1.2. Les éléments transposables procaryotes

1.2.1. Transposition et transposases

La transposition est définie comme un événement au cours duquel une enzyme de recombinaison spécialisée (recombinase) reconnaît spécifiquement les extrémités d'un segment génétique, l'élément transposable (ET), et provoque son mouvement d'un site donneur à un site cible (Merlin and Toussaint, 1999). Ce phénomène permet donc le déplacement autonome de matériel génétique sans nécessiter d'homologie entre l'ET et sa cible, lui permettant de s'insérer de manière répétée dans de nombreux sites au sein d'un génome. Les transposons peuvent être transférés d'un plasmide à d'autres plasmides ou d'un chromosome d'ADN à un plasmide et vice versa.

Les transposases sont des protéines à multiples domaines dont les séquences primaires sont peu conservées. Néanmoins, elles peuvent être regroupées selon leur nature, déterminée par la présence ou l'absence de divers domaines protéiques, ainsi que l'ordre des acides aminés les composant. Les 3 groupes principaux de transposases sont ainsi définis selon la séquence des acides aminés constituant le site actif du domaine impliqué dans la catalyse du mécanisme de transposition : le groupe des transposases DDE (motif Asparagine, Asparagine et Glutamine), le groupe des transposases DEDD et le groupe des transposases HUH (deux résidus Histidine séparés par un gros acide aminé hydrophobe). Les transposases DDE sont les plus communes et les mieux décrites mais le regroupement des ET selon leur transposase est de plus en plus complexe du fait de la grande variabilité de ces éléments, même au sein d'un même groupe.

Les transposases sont impliquées dans les différents types de mécanismes de transposition qui peuvent être conservatif ou réplicatif (**figure 1**) (Hallet and Sherratt, 1997; Merlin and Toussaint, 1999). La transposition conservative implique que le transposon quitte son site d'origine pour être inséré dans un autre site, à la manière d'un couper-coller. La transposition par excision/intégration est un cas particulier d'une transposition conservative dans laquelle le transposon est d'abord excisé pour former un élément intermédiaire circulaire par ligature des deux jonctions, avant d'être ensuite inséré dans le site cible. Dans ce type de transposition, l'ET est simplement déplacé sous la forme d'une copie unique conservée. A l'inverse, la transposition réplicative implique que le transposon d'origine reste dans son site et qu'une copie soit déplacée dans la séquence cible. Ce type de transposition débouche donc sur deux copies de l'ET, et est généralement plus complexe car elle nécessite que l'ET soit répliqué. Cette transposition réplicative peut alors se produire par deux mécanismes différents : (i) par l'intermédiaire de la formation d'un « co-intégrat » formé par la fusion entre le donneur et le receveur avant répllication de l'ET, puis la séparation en deux molécules une fois l'ET répliqué, (ii) ou un mécanisme de copier-coller dans lequel

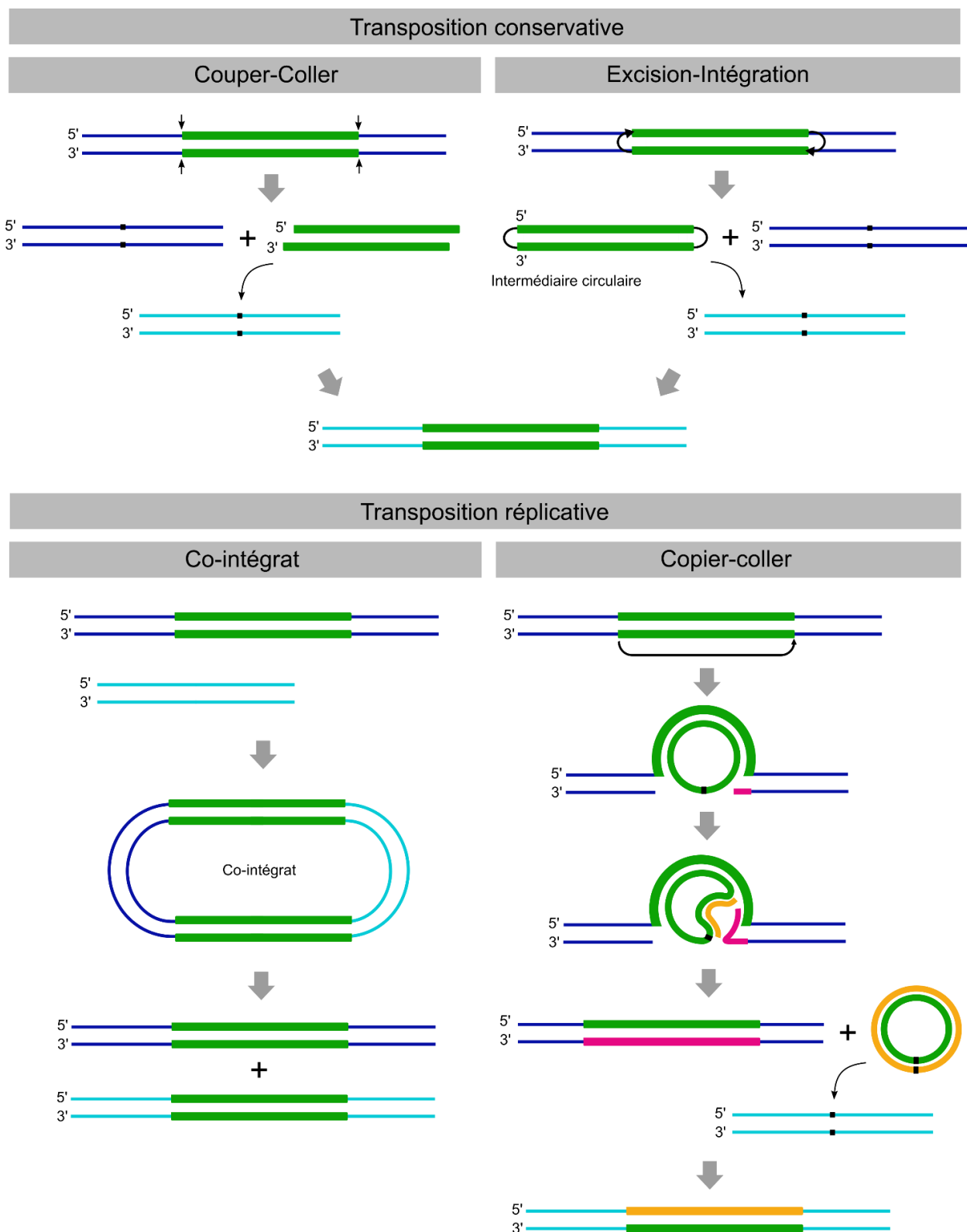


Figure 1 : Mécanismes de transposition.

Le type de mécanisme de transposition dépend de la transposase. L'élément transposable est représenté en vert ; L'ADN donneur est représenté en bleu foncé ; L'ADN receveur est représenté en bleu clair. Adapté de Merlin et Toussaint (1999) et Siguier et al. (2015).

l'ET est répliqué depuis sa localisation dans le donneur, aboutissant sur la formation d'un intermédiaire circulaire double-brin qui s'intègre ensuite dans le site receveur. Les ET ont ainsi souvent été caractérisés selon le mécanisme de transposition et la nature de leur intégrase, mais il est aujourd'hui plus courant de les regrouper par familles ou par classes.

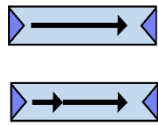
1.2.2. Séquences d'insertion

Les séquences d'insertion (IS) sont des segments d'ADN de petite taille, comprise entre 0,7-Kpb et 2,5-Kpb, ne contenant généralement que le gène codant la transposase et sont bordées à chaque extrémité par une séquence terminale en répétition inversée (IR), une courte séquence nucléotidique accompagnée en aval de sa séquence complémentaire inversée (**figure 2**).

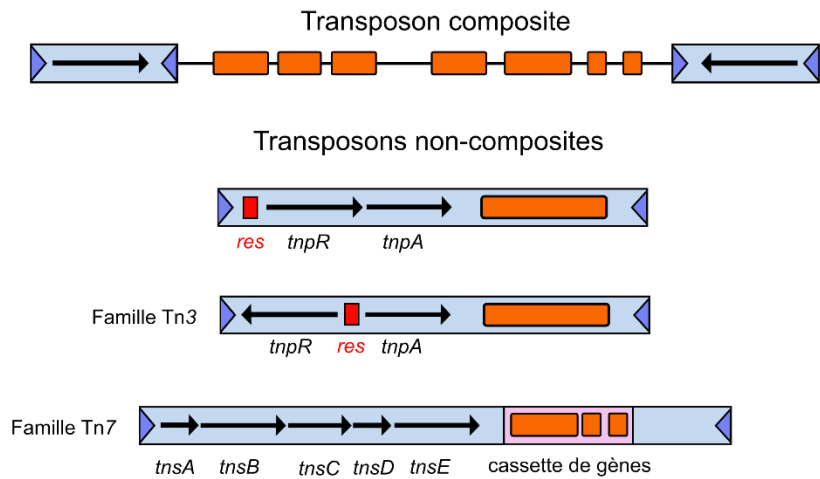
Bien que les IS partagent ces caractéristiques structurales générales, elles peuvent être classées en différentes familles selon des caractéristiques telles que la chimie de transposition, les séquences IR terminales, les gènes de transposase et leur organisation, ou encore la nature de la séquence cible d'insertion (Siguier et al., 2015). On compte aujourd'hui plus de 20 familles différentes selon la base de données ISFinder, dans laquelle sont centralisées les IS, et qui fournit un cadre de base pour leur nomenclature et leur classification. A l'origine, les IS ont ainsi reçu des numéros permettant de développer une nomenclature sous la forme IS n , où n est un nombre (IS1, IS2, IS3, IS10, IS50, IS911, IS26, etc.). Cependant, ISfinder attribue désormais un nom comprenant un code pour l'espèce dans laquelle l'IS a été identifiée pour la première fois et un numéro (par exemple, IS*Aba1* pour une IS identifiée chez la bactérie *Acinetobacter baumannii*).

Les IS, sous leur forme la plus simple, ne contiennent que le gène de la transposase et les IR. Elles sont alors souvent considérées comme des éléments parasites ne portant pas directement de gènes accessoires, tels que des gènes de résistances aux antibiotiques, et dont l'impact positif ou négatif sur la cellule hôte, dépend de son insertion dans le génome. En effet, le mouvement des IS dans le chromosome peut alors avoir différentes répercussions sur le génome et en particulier sur l'expression de gènes. L'insertion d'une IS dans un gène, ou dans une séquence régulatrice par exemple, provoque son inactivation, ce qui peut amener à l'activation ou l'inactivation d'autres gènes du génome. Certaines IS portent également des régions promotrices capables d'induire l'expression, voir même la surexpression de certains gènes chromosomiques lorsque celle-ci est insérée en amont, ce qui provoque parfois l'expression d'un phénotype de résistance aux antibiotiques (Héritier et al., 2006). Les conséquences de cette modification de l'expression d'un ou plusieurs gènes peut alors être bénéfique ou délétère pour la cellule. Les génomes bactériens étant majoritairement constitués de séquences codantes, la probabilité de provoquer un événement délétère est probablement élevée. Ainsi, une transposition fréquente peut vite devenir problématique, et il n'est pas impossible que l'expression de la transposase ou son activation soit régulée par divers mécanismes, comme par exemple lors du

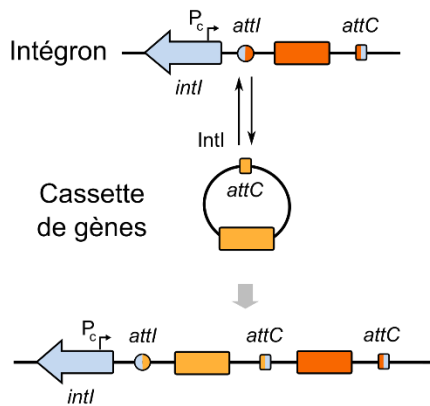
Séquences d'insertion



Transposons



Intégron et cassette de gènes



Ilot génomiques

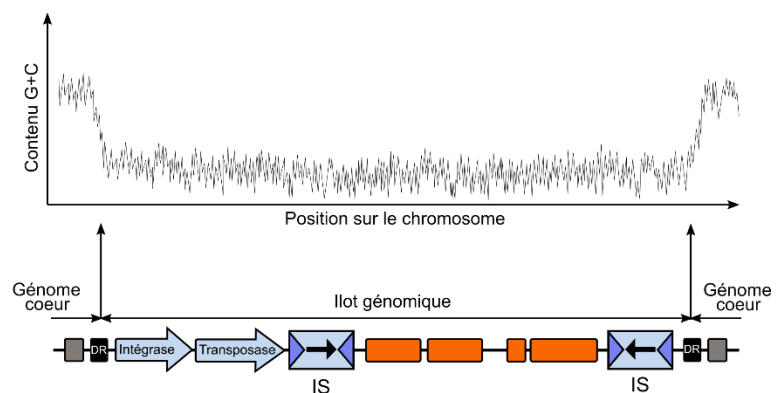


Figure 2 : Structure des principaux éléments transposables.

Les séquences d'insertion (IS) sont représentées par les triangles bleu clair dans lesquels le gène de la transposase (et parfois un second gène de régulation) est représenté par une fine flèche noire et les séquences terminales en répétition inversée sont représentées par les triangles bleu foncé. Les gènes accessoires portés par les transposons ou les îlots génomiques sont représentés par des rectangles orange. Les flèches épaisses bleu clair représentent des gènes codant des protéines impliquées dans la formation ou la mobilité de l'élément transposable. Les répétitions directes (DR) des îlots génomiques sont représentées par des rectangles noirs. Adapté de Merlin et Toussaint (1999), Siguier et al. (2015), Partridge et al. (2018), Juhas et al. (2009).

décalage du cadre de lecture nécessaire à l'expression d'une transposase complète dans certains cas (Chandler and Fayet, 1993).

1.2.3. Transposons composites

D'autres éléments appelés transposons composites sont constitués d'une séquence nucléotidique délimitée par deux exemplaires d'une même IS ou deux IS apparentées, et capable de se déplacer comme une seule unité (**figure 2**) (Siguier et al., 2015). Les deux IS peuvent être orientées de façon directe ou inverse et très souvent, seule l'une des deux IS du transposon code pour une transposase fonctionnelle responsable de la transposition alors que l'autre code pour un régulateur de la transposition. La nomenclature appliquée à ces éléments est comparable à celle des IS et s'écrit sous la forme Tn*n* dans laquelle *n* est également un nombre (Tn3, Tn5, Tn9, Tn10, etc.).

La séquence située entre les deux IS ne participe pas au phénomène de transposition et porte souvent des gènes accessoires codant par exemple pour des gènes de résistance aux antibiotiques, comme la kanamycine chez le Tn5, la tétracycline chez le Tn10 ou le chloramphénicol chez le Tn9. Dans certains cas, le portage du gène de résistance par le transposon composite assure à la fois la mobilisation du gène de résistance et l'expression du phénotype de résistance, à l'image du Tn2006 porteur de la résistance aux carbapénèmes, dont la surexpression du gène de résistance *bla_{OXA-23}* nécessaire au phénotype de résistance est assurée par la présence de l'*ISAba1* (Corvec et al., 2007; Héritier et al., 2006).

1.2.4. Transposons non composites

Les transposons non composites sont des éléments transposables bordés par des séquences répétées inversées, plutôt que par des IS, et comprenant des gènes codant les enzymes de transposition comme la transposase capable de reconnaître les IR, et un ou plusieurs gènes accessoires. A l'origine, ces transposons ont été décrits comme plus grands que les IS et séparés de cette catégorie du fait de la présence de gènes accessoires entre les IR. La découverte d'IS transportant des gènes accessoires et de transposons composites a néanmoins rendu cette séparation moins évidente. La nomenclature Tn*n* ne fait par exemple pas la distinction entre transposon composite ou non, et s'applique dès lors aux deux types. Chez les bactéries, les gènes de résistance aux antibiotiques sont souvent associés aux transposons de la famille Tn3. Les membres de cette grande famille sont généralement caractérisés par deux IR de 38 bp, un gène de la transposase (*tnpA*), un gène de résolvasse (*tnpR*), un site de résolution (*res*) et des gènes accessoires (**figure 2**). La transposition de ces ET se produit *via* un mécanisme réplcatif dans lequel TnpA catalyse la génération d'un co-intégrat qui est ensuite résolu par un mécanisme de recombinaison entre les sites *res* et catalysé par TnpR (Nicolas et al., 2015). Les gènes accessoires passagers des transposons de la famille Tn3 peuvent être très variables, et incluent

parfois des opérons entiers, comme l'opéron de résistance au mercure, ou des gènes de résistance aux antibiotiques.

La famille Tn7, est également une autre grande famille de transposons associés à la résistance aux antibiotiques chez les bactéries. Les transposons de cette famille Tn7 se démarquent par la nature de leur système de transposition. En effet, celui-ci fait intervenir les produits de 5 gènes (*tnsA*, *B*, *C*, *D*, *E*) plutôt qu'un seul long gène tel que *tnpA* des transposons de la famille Tn3 (**figure 2**). Lorsque la transposase est composée des protéines TnsA, B, C et E, la transposition s'effectue vers des sites d'insertion aléatoires. Lorsqu'elle se compose des protéines TnsA, B, C et D, elle catalyse alors la transposition en un site unique, *attTn7*, localisé près de l'origine de répllication (Merlin and Toussaint, 1999). A l'inverse des transposons de la famille Tn3, les membres de cette famille incluent donc des transposons capables de transposition dans un site cible spécifique.

1.2.5. Cassettes de gènes et intégrons

Une cassette de gène est un MGE de petite taille, généralement comprise entre 0,5 et 1 kb, et constituée d'un seul gène (parfois deux), généralement dépourvus de séquence promotrice, et d'un site de recombinaison *attC* (**figure 2**). Les cassettes de gènes peuvent exister sous une forme libre mais ne sont pas répllicatives et se trouvent ainsi généralement plutôt insérées dans un intégron. Ce dernier est caractérisé par un gène *intI* codant une recombinaise, un site de recombinaison *attI* et un promoteur (Pc) (**figure 2**). La recombinaise permet de catalyser la recombinaison entre le site *attI* de l'intégron et le site *attC* d'une cassette de gène, de manière à insérer la cassette dans l'intégron avec une orientation spécifique permettant l'expression du gène de la cassette sous la dépendance du promoteur de l'intégron (**figure 2**)(Labbate et al., 2009).

Différentes classes d'intégrons ont été définies selon la séquence de la protéine IntI (appelée IntI1, IntI2, IntI3, etc.) et des sites *attI* apparentés (*attI1*, *attI2*, *attI3*, etc.). Les intégrons de classe 1 (IntI1/*attI1*) semblent quasiment ubiquitaires chez les bactéries, avec une prévalence allant de 22 à 59% (Deng et al., 2015). Il sont également considérés comme des contributeurs majeurs de la dissémination de résistances aux antibiotiques chez les isolats cliniques de nombreuses espèces bactériennes à Gram négatif telles que *A. baumannii* (Fournier et al., 2006; Hamidian et al., 2015), *Pseudomonas aeruginosa* (Shahcheraghi et al., 2010) ou *Vibrio cholerae* (Dalsgaard et al., 2000), car ils portent très souvent plusieurs gènes ou de résistance aux antibiotiques ou aux antimicrobiens. Les gènes *qacEΔ1* et *sul1*, codant respectivement pour la résistance aux sels d'ammonium quaternaire (un antibactérien) et aux sulfonamides (une classe d'antibiotiques) sont par exemple situés dans un segment conservé, généralement commun à tous les intégrons de classe 1 (Recchia and Hall, 1997). D'autres cassettes de gènes apportent des résistances supplémentaires, telles que la résistance à la streptomycine-spectinomycine, aux aminoglycosides ou encore aux β-lactames (Deng et al., 2015).

1.2.6. Ilots génomiques

La mobilité de certains ET au sein du génome provoque parfois des événements d'insertion, de fusion ou de réarrangement entre différents MGEs. La recombinaison entre IS de différents transposons provoque alors parfois la formation d'un nouveau MGE. Des événements répétés de réarrangements génétiques peuvent ainsi conduire à la création d'un îlot génomique (IG) par accrétions de différents MGEs. Certains éléments conjugatifs intégratifs (ICE, *Integrative Conjugative Element*), transposons composites, plasmides intégrés dans le chromosome ou phages peuvent être considérés comme des IG. Les IG forment des segments d'ADN de grande taille, généralement comprise entre 10 et 200 Kbp, et qui diffèrent entre souches bactériennes, même étroitement apparentées (Dobrindt et al., 2004; Hacker and Kaper, 2000; Juhas et al., 2009). Les IG sont également caractérisés par (i) le contenu en nucléotides Guanine et Cytosine qui est souvent différent du reste du chromosome, (ii) des répétitions directes (DR) parfaites ou presque parfaites de 16 à 20 pb aux bornes de l'IG, (iii) des gènes fonctionnels ou cryptiques codant des protéines impliquées dans le transfert de l'IG comme des intégrases, des recombinases et des transposases, (iv) la présence d'ET comme des IS ou des transposons souvent impliqués dans le remodelage de l'îlot, et (v) des gènes accessoires offrant un avantage sélectif pour les bactéries hôtes (Juhas et al., 2009) (**figure 2**).

La plupart des IG hébergent des MGEs fonctionnels ou dégénérés, mobiles ou immobiles, et peuvent être mobiles à l'intérieur du génome (mais ils se limitent alors généralement à un site d'insertion spécifique) ou bien avoir perdu toute capacité de mouvement. Certains IG sont ainsi capables d'être excisés puis intégrés dans un locus différent du génome grâce à la présence des DR, qui surviennent généralement par l'intégration spécifique dans le site cible des IG, et qui peuvent ensuite agir comme des séquences de reconnaissance pour leur excision enzymatique (Schmidt and Hensel, 2004). Du fait de leur grande taille, les IG sont susceptibles d'avoir des coûts énergétiques très élevés pour la cellule. Cependant, des mécanismes de réarrangements génétiques, de perte de gènes ou d'acquisition d'autres MGEs leur font bénéficier d'une plasticité génétique importante qui continue le développement de l'îlot une fois inséré dans le chromosome (**figure 3**). L'ensemble de ces caractéristiques uniques en font des MGEs particulièrement adaptés à leur hôte et un facteur crucial dans l'évolution de beaucoup de bactéries.

L'importance des IG dans l'adaptabilité des bactéries est majoritairement dû à la présence de nombreux gènes accessoires dans l'îlot, qui peuvent apporter différents avantages phénotypiques à la cellule hôte. Il existe par exemple des gènes de virulence contenus dans les îlots de pathogénicité, des gènes cataboliques apportant de nouvelles voies métaboliques dans les îlots métaboliques ou encore des gènes de résistance aux antibiotiques dans les îlots de résistance (Darmon and Leach, 2014; Dobrindt et al., 2004; Hacker and Kaper, 2000; Lima et al., 2008; Que et al., 2013). Ces derniers ont ainsi été

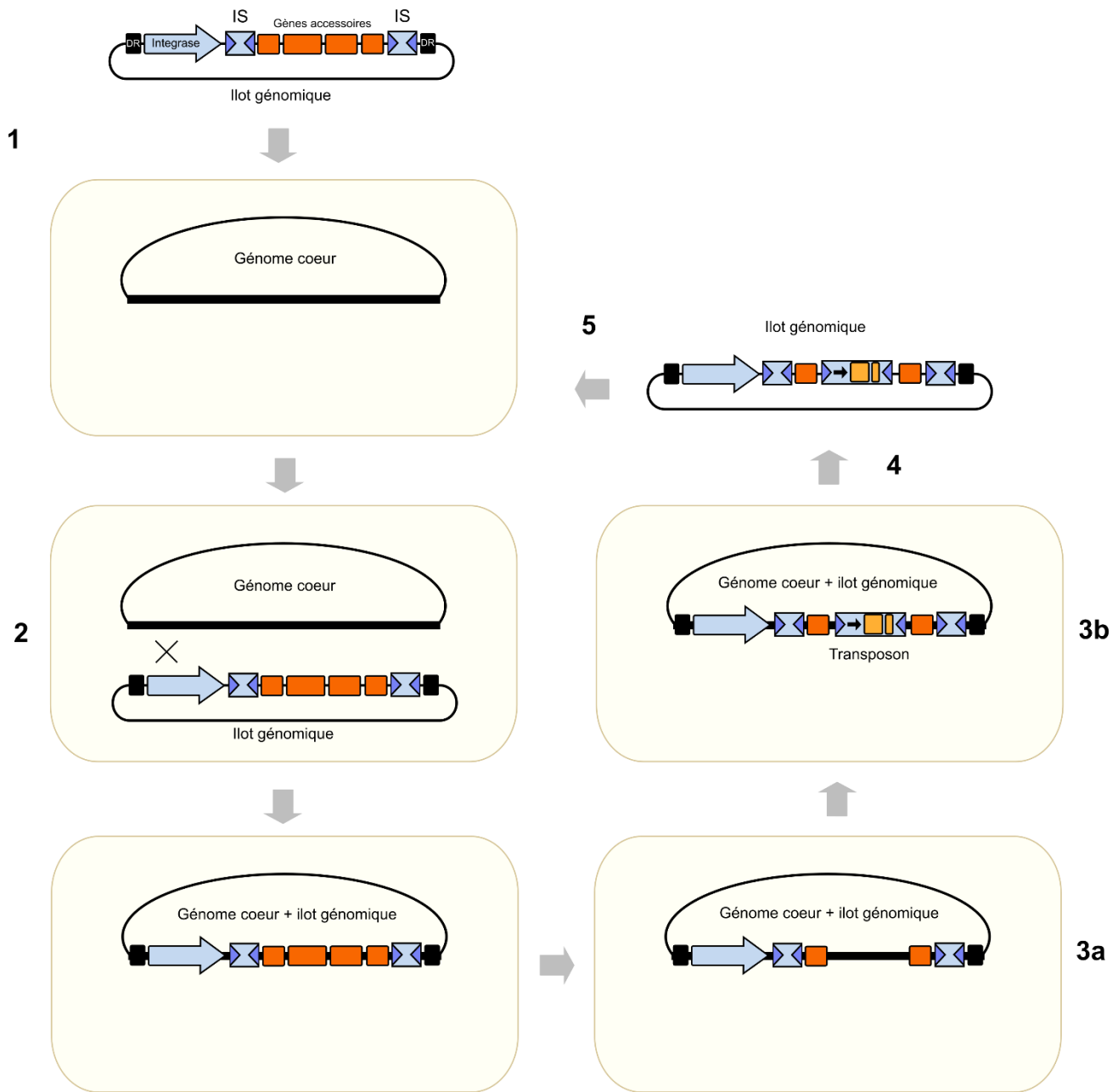


Figure 3 : Intégration, développement et excision d'un ilot génomique.

La cellule bactérienne (rectangle beige) contient le génome cœur (demi-cercle noir). La représentation schématique des différents éléments mobiles (ilot génomique, séquences d'insertion et transposon) est détaillée dans la **figure 2**. Le cycle de vie de l'ilot génomique est schématisé comme suit : (1) acquisition par l'hôte ; (2) intégration dans le chromosome de l'hôte par recombinaison ; (3) développement par réarrangements génétiques à la suite de la perte de gènes (a) ou de l'acquisition de MGE tel qu'un transposon (b) ; (4) excision du chromosome ; (5) transfert à une autre cellule hôte. Adapté de Juhas et al. (2009).

décrits chez de nombreuses espèces bactériennes, généralement pathogènes, comme *Salmonella typhi*, *S. typhimurium* et *S. enteritidis* (Miriagou et al., 2006), *A. baumannii* (Fournier et al., 2006; Hamidian and Hall, 2018), *Haemophilus influenzae* et *H. parainfluenzae* (Dimopoulou et al., 2007), *Staphylococcus aureus* (Ito et al., 2001) ou encore *Streptococcus pneumoniae* (Ding et al., 2009).

1.3. Les plasmides de résistance

Les plasmides sont des éléments génétiques extra-chromosomiques double-brins à réplication autonome, le plus souvent de forme circulaire et sont retrouvés chez des microorganismes appartenant aux trois domaines du vivant, Bactéries, Archées et Eucaryotes (Taylor et al., 2004).

1.3.1. Réplication et contrôle du nombre de copies

Les plasmides présentent une diversité très forte en termes de taille, de contenu de gènes, de gammes d'hôtes ou encore dans leur un mode de réplication et/ou de transmission. Cette capacité de réplication, implique souvent un ensemble de gènes dédiés spécifiquement à ce processus, et assure au plasmide sa transmission verticale à la descendance, c'est-à-dire d'une cellule mère à une cellule fille. Les plasmides portent également parfois des gènes leur permettant d'être transmis de façon horizontale, en opposition avec la transmission verticale, ce qui leur assure une propagation entre différentes cellules. L'ensemble de ces gènes de réplication et/ou de transmission forme le squelette génétique du plasmide, auquel s'ajoutent souvent des gènes accessoires passagers tels que des gènes de résistance aux antibiotiques. Ceux-ci sont généralement portés par d'autres MGEs, en particulier des ET tels que des IS ou des transposons, pour qui les plasmides deviennent des véhicules de choix du fait de leur capacité de transfert de cellule en cellule.

La réplication du plasmide débute dans une région spécifique appelée origine de réplication (*ori*) et est le plus souvent déclenchée par la liaison d'une protéine d'initiation (Rep) à des séquences répétées d'ADN appelées itérons. L'origine de réplication *ori* et le gène d'initiation *rep* codant la protéine Rep sont souvent localisés au même niveau sur le squelette du plasmide et forment une structure basique : le réplicon minimal. Néanmoins, bien que les plasmides portent leur propre système d'initiation de la réplication, ils exploitent généralement la machinerie de l'hôte (hélicase, polymérase, etc.) pour la synthèse d'ADN proprement dite. Cette dépendance à l'égard des protéines de réplication de l'ADN de l'hôte fait partie des facteurs délimitant le spectre d'hôtes du plasmide. Ainsi, certains plasmides ne sont efficacement maintenus que dans des taxons bactériens étroitement apparentés et sont alors appelés plasmides à spectre d'hôtes restreint. A l'inverse, d'autres plasmides, les plasmides à large spectre d'hôtes peuvent être retrouvés dans des genres bactériens très divers où ils sont efficacement répliqués et maintenus (Partridge et al., 2018).

Les plasmides apportent un coût énergétique supplémentaire à leur cellule hôte (San Millan and MacLean, 2017). Chaque événement de réplication est alors un surcoût susceptible de faire pencher la balance vers un effet délétère pour la cellule bactérienne et de provoquer la perte du plasmide. Afin d'équilibrer ce coût énergétique, les plasmides contrôlent généralement leur nombre de copies, soit le nombre de molécules du plasmide présentes au même moment dans la cellule. Les systèmes de contrôle du nombre de copies de plasmides varient considérablement selon le type de plasmide. Certains peuvent par exemple faire intervenir un ARN antisens capable de se lier à l'ARNm transcrit à partir du gène *rep* afin de réprimer sa traduction (Brantl, 2014), alors que d'autres possèdent un système dans lequel l'interaction de deux itérons de deux plasmides *via* les protéines Rep provoque le menottage des sites *ori*, bloquant ainsi l'initiation de la réplication (Chattoraj, 2000).

1.3.2. Classification des plasmides

La première classification des plasmides fut réalisée selon le phénomène d'incompatibilité, basé sur l'observation que des plasmides étroitement liés ne peuvent pas coexister stablement au sein d'une même lignée cellulaire. En effet, lorsque deux plasmides sont suffisamment proches, leurs systèmes de réplication et de contrôle du nombre de copies ne sont pas capables de différencier les copies du premier plasmide de celles du second, ce qui provoque généralement une surestimation du nombre de copies par le système de régulation et conduit finalement à une instabilité des plasmides en absence de sélection (Thomas, 2014). Des plasmides apparentés ou issus d'un même groupe ont donc plus de chance d'être incompatibles et peuvent alors classés dans un même groupe Inc.

Cependant, avec le développement des techniques moléculaires modernes, la classification des nouveaux plasmides s'effectue de moins en moins par des tests d'incompatibilité, et se dirige plutôt vers des outils de typage basés sur la PCR (*Polymerase Chain Reaction* en anglais) ou le séquençage (Carattoli et al., 2005, 2014).

1.3.3. Plasmides de résistance chez les bactéries pathogènes

Les plasmides sont d'importants véhicules de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries (Partridge et al., 2018; San Millan, 2018), et en particulier chez les bactéries multi-résistantes aux antibiotiques (MDR) du groupe des pathogènes ESKAPE comprenant *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et les Entérobactéries (Boucher et al., 2009; Oliveira et al., 2020). Ces plasmides de résistance peuvent porter des gènes de résistance à d'anciens antibiotiques, tels que la tétracycline, les sulfonamides ou la streptomycine (Harmer and Hall, 2015), des gènes de résistance à des antibiotiques modernes comme les carbapénèmes (Wright et al., 2014), ou de dernier recours comme la colistine, un antibiotique découvert dans les années 1950 mais à présent utilisé en traitement des infections causées

par des pathogènes multi-résistants aux antibiotiques (MDR, *Multi Drug Resistant*) (McGann et al., 2016; Michalopoulos et al., 2005). Ces derniers étant généralement utilisés dans le traitement des infections dues à des agents bactériens pathogènes MDR, la circulation de plasmides de résistance à ces antibiotiques est particulièrement alarmante.

1.4. Les bactériophages

Les bactériophages (ou phages) sont des virus n'infectant que les bactéries et pouvant être retrouvés dans tous les types d'environnements. Ce sont des parasites obligatoires dont le cycle infectieux peut parfois déboucher sur la mort puis la lyse de leur hôte bactérien (Moineau, 2013). Comme les virus infectant les organismes eucaryotes, les phages sont généralement composés d'une structure protéique formant une tête encapsidant du matériel génétique, et d'une queue. Etant incapables de se reproduire eux-mêmes, les bactériophages injectent leur matériel génétique dans une bactérie afin d'en exploiter la machinerie cellulaire de transcription et de traduction. Dans le cas d'un phage lytique, le génome viral est répliqué puis traduit pour former de nombreuses copies du virus qui sont ensuite libérées lors de la lyse de la bactérie-hôte. Dans le cas d'un phage lysogénique, le matériel génétique viral est aussi répliqué, mais il s'intègre ensuite au chromosome de la bactérie (ou reste sous forme de plasmide), sans être exprimé pour former des particules virales. Sous cette forme, le virus est appelé prophage et peut être transmis à la descendance de la bactérie infectée. Des stimuli peuvent parfois réactiver le prophage qui peut alors reprendre un cycle lytique et produire des particules virales.

Les bactériophages sont connus pour être des MGEs particulièrement importants pour l'évolution des bactéries et il est possible qu'ils soient également des vecteurs de la dissémination de gènes de résistances aux antibiotiques. En effet, les bactériophages encapsident parfois par erreur de l'ADN bactérien en plus de l'ADN phagique lors de la formation d'une particule virale, qui en infectant une nouvelle bactérie pourra transmettre cet ADN bactérien passager et les potentiels gènes qu'il contient. Ce phénomène, appelé transduction, est l'un des mécanismes principaux de transferts horizontaux de gènes permettant l'échange non-héréditaire de matériel génétique entre bactéries (Chiang et al., 2019). Les détails de ce mécanisme et de son rôle dans la transmission de gènes de résistance seront évoqués plus loin dans ce manuscrit.

1.5. Autres éléments génétiques mobiles porteurs de résistances aux antibiotiques

D'autres MGEs dont les caractéristiques les placent parfois à la frontière entre différents types, sont parfois responsables du mouvement de gènes de résistance aux antibiotiques. On compte par exemple les transposons conjugatifs, des éléments combinant les propriétés d'intégration des ET avec les

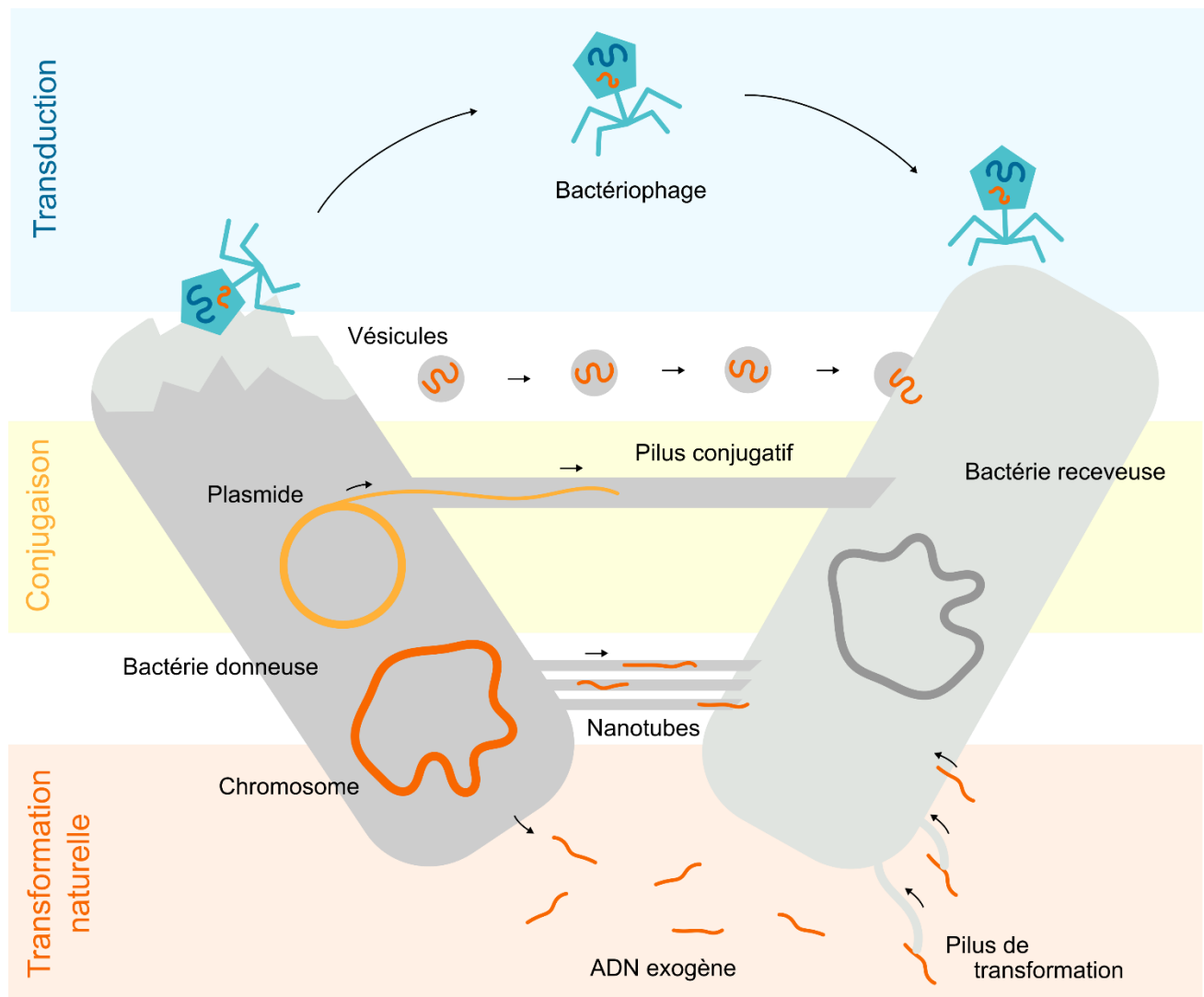


Figure 4 : Principaux mécanismes de transferts horizontaux de gènes.

La transduction (encadré bleu) permet le transfert d'un fragment d'ADN chromosomique par l'intermédiaire d'un bactériophage ; La conjugaison (encadré jaune), permet le transfert d'un plasmide conjugatif d'une cellule donneuse à une cellule receveuse par l'intermédiaire d'un pilus conjugatif. Enfin, la transformation naturelle (encadré orange) permet le transfert de gènes par l'internalisation active d'ADN exogène depuis l'environnement extérieur. D'autres mécanismes moins répandus ont également été décrits chez les bactéries, comme par exemple le transfert de fragments d'ADN dans des vésicules ou par l'intermédiaire de structures appelées nanotubes. Adapté de Hall et al. (2017).

propriétés de transfert des plasmides conjugatifs (Clewell et al., 1995; Salyers et al., 1995) ; Les bactériophages transposables comme le phage Mu, un phage tempéré s'intégrant au hasard dans le génome grâce à un mécanisme de transposition (Harshey, 2014) ; Ou encore les éléments transposables miniatures à IR (MITE, *Miniature Inverted-repeat Transposable Element*), des dérivés d'IS bactériennes ou de transposons mais incapables d'auto-transposition car ne possédant pas de gène codant la transposase (Delihas, 2011). Tout comme les bactériophages, ces MGEs ne sont pas autant étudiés que les IS, les transposons ou encore les plasmides et il est aujourd'hui difficile d'évaluer leur rôle dans la dissémination de gènes de résistances dans les populations bactériennes.

1.6. Les transferts horizontaux de gènes chez les bactéries, moteurs de la propagation d'AR-MGEs

Chez les bactéries, la transmission verticale de l'information génétique à la descendance s'effectue de manière clonale d'une cellule mère à la cellule fille. Ce mode de reproduction, bien que particulièrement efficace pour aboutir à un nombre important d'individus, n'en est pas moins limitant en termes de diversité génétique. Par opposition, les transferts horizontaux de gènes (HGT *Horizontal Gene Transfer*) sont des mécanismes d'échanges non-héréditaires de matériel génétique entre deux cellules bactériennes dont la finalité, l'acquisition de gènes permettant potentiellement l'expression de nouveaux caractères adaptatifs, est considérée comme la plus importante force motrice de l'évolution procaryote (Doolittle, 2000; Rocha, 2008). En outre, les MGEs exploitent ces mécanismes afin d'assurer leur transfert de cellule en cellule, ce qui revêt une importance particulière dans la compréhension de la dynamique de la propagation de l'antibiorésistance. Différents mécanismes de HGT ont été décrits chez les bactéries dont les trois principaux sont la transformation naturelle, la conjugaison et la transduction (**figure 4**).

1.6.1. La conjugaison

La conjugaison est un mécanisme de HGT permettant le transfert d'un plasmide conjugatif d'une cellule donneuse à une cellule receveuse, et nécessitant un contact direct entre les cellules (Llosa et al., 2002). Le processus de conjugaison nécessite trois étapes successives : (i) le traitement du substrat, (ii) son recrutement et (iii) son transfert dans la bactérie receveuse (**figure 5**). Le traitement de l'ADN plasmidique a lieu dans le cytoplasme de la cellule donneuse et requiert l'activité d'un complexe protéique appelé relaxosome qui facilite ensuite le recrutement et le transfert de l'ADN plasmidique sous sa forme linéaire simple-brin. L'étape de transfert nécessite quant à elle la mise en place d'un appareil de sécrétion transmembranaire, appelé système de sécrétion de type 4 (T4SS), qui permet

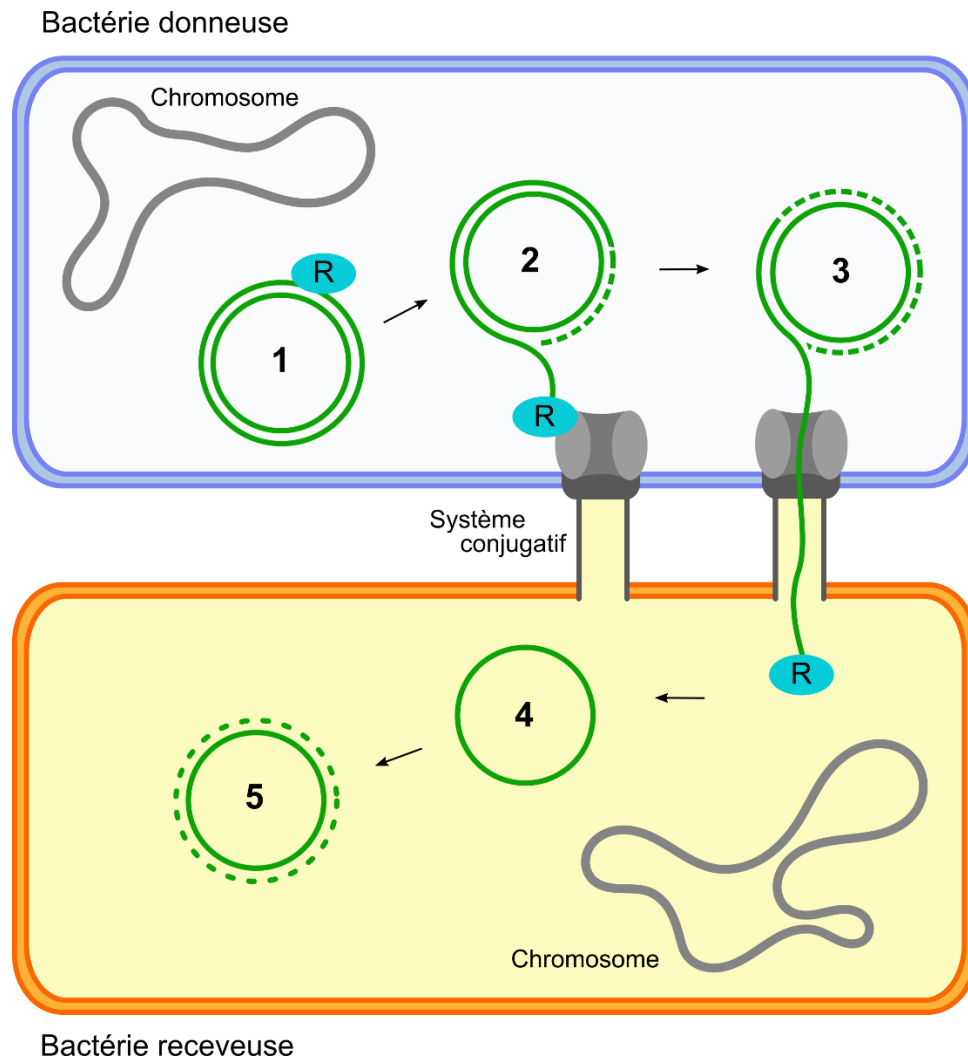


Figure 5 : Mécanisme de conjugaison bactérienne.

L'ADN plasmidique (en vert) est transféré d'une bactérie donneuse vers une bactérie receveuse suivant les étapes : (1) La relaxase (R, cercle bleu) coupe l'ADN plasmidique et forme un intermédiaire covalent avec l'extrémité 5' de l'origine de transfert appelé relaxosome. (2) La machinerie du système de conjugaison recrute le relaxosome, tandis que l'ADN du donneur est répliqué (cercle pointillé) en utilisant le brin d'ADN non coupé comme matrice. (3) La relaxase agit comme protéine pilote pour transférer le brin d'ADN à travers le pilus de conjugaison vers la bactérie receveuse. (4) Dans le cytoplasme de la bactérie receveuse, la relaxase effectue la réaction de coupure inverse permettant de recirculariser le brin d'ADN transféré. (5) Le brin d'ADN transféré est répliqué pour générer une copie complète du plasmide d'origine.

l'assemblage d'un pilus conjugatif médiant l'interaction entre les deux cellules (Ilango et al., 2015). Le transfert de l'ADN plasmidique vers la cellule receveuse est alors réalisé par l'intermédiaire du pilus conjugatif, puis le plasmide est recircularisé et répliqué sous sa forme double-brin dans le cytoplasme de la cellule receveuse pour former une nouvelle copie complète du plasmide d'origine. Le mécanisme de la conjugaison est initié par le plasmide qui porte les gènes nécessaires à l'expression de la machinerie conjugative. En cela, le plasmide provoque donc son propre transfert qui est subit par la cellule receveuse devenant ensuite à son tour une cellule donneuse.

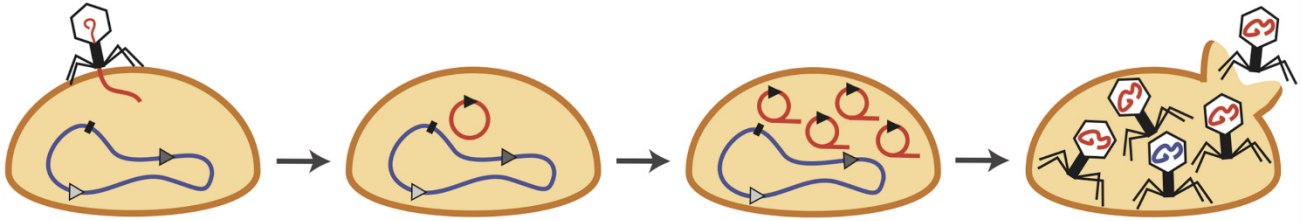
La conjugaison possède un rôle essentiel dans l'évolution et la diversification des bactéries et en particulier dans la propagation de résistances aux antibiotiques en facilitant le transfert rapide de plasmides conjugatifs porteurs de gènes de résistance. En outre, elle provoque également le transfert de certains plasmides non-conjugatifs capables d'exploiter le processus initié par un plasmide conjugatif se trouvant dans la même cellule (Partridge et al., 2018). Le phénomène est tel qu'il fut récemment suggéré de développer des moyens d'inhiber ce mécanisme, en complément de traitements antibiotiques, afin de limiter l'émergence de nouvelles résistances (Getino and Cruz, 2018; Graf et al., 2019).

1.6.2. La transduction

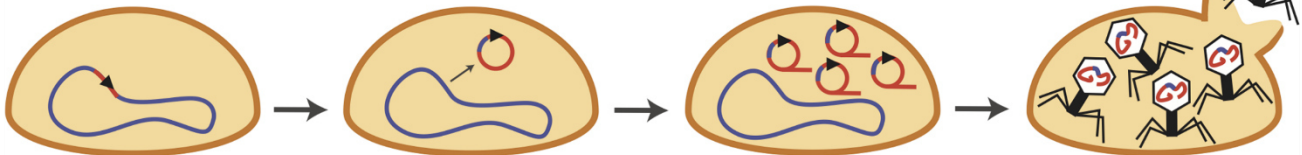
La transduction a lieu lorsqu'un bactériophage encapside parfois de l'ADN bactérien (chromosomique ou plasmide) puis l'injecte dans une autre cellule bactérienne lors de son cycle infectieux. Il existe trois types de transductions (Chiang et al., 2019) (**figure 6**) : (i) la transduction généralisée, lorsqu'une particule phagique encapside par erreur de l'ADN bactérien plutôt que de l'ADN viral ; (ii) la transduction spécialisée, lors d'un événement aberrant d'excision d'un prophage provoquant l'encapsidation d'une partie de l'ADN viral et un segment adjacent d'ADN du chromosome bactérien hôte dans la molécule excisée ; et (iii) la transduction latérale, découverte récemment chez *S. aureus* (Chen et al., 2018), dans laquelle l'étape d'encapsidation se produit avant l'excision du prophage, ce qui a pour conséquence de provoquer l'encapsidation de l'ADN chromosomique adjacent au prophage.

L'importance de ce mécanisme et des bactériophages dans la dissémination de gènes de résistance est encore aujourd'hui mal connue. Bien que plusieurs travaux aient démontré l'existence de transferts de gènes de résistance aux antibiotiques par transduction chez diverses espèces, telles que *Enterococcus gallinarum* et *Enterococcus faecalis* (Mazaheri Nezhad Fard et al., 2011), *Staphylococcus aureus* (Varga et al., 2012) et *Acinetobacter baumannii* (Wachino et al., 2019) ou bien la présence de gènes de résistance dans des particules phagiques (Gómez-Gómez et al., 2019), il est difficile d'évaluer leur réelle efficacité en dehors du cadre de l'expérimentation en laboratoire (Enault et al., 2017; Torres-Barceló, 2018). En outre, les bactériophages sont devenus depuis quelques années

Généralisée



Spécialisée



Latérale

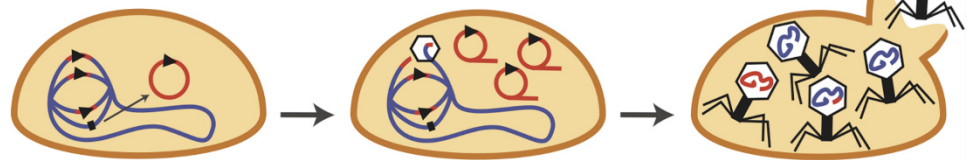


Figure 6 : Mécanismes de la transduction.

Transduction généralisée (en haut) : le phage est répliqué puis la terminase du phage initie son encapsidation à partir des sites *pac* (triangles noirs) ou des sites pseudo-*pac* (triangles gris). Un fragment d'ADN chromosomique bactérien (bleu) est emballé par erreur à la place de l'ADN phagique. Transduction spécialisée (au milieu) : l'ADN phagique est inséré dans le chromosome bactérien sous la forme d'un prophage avant d'être excisé à la suite de sa réactivation. Il emporte alors un segment d'ADN chromosomique bactérien avec lui lors de l'excision. L'ADN est ensuite encapsidé par la terminase pour former les particules virales. Transduction latérale (en bas) : Chez les phages de *S. aureus*, la réplication de l'ADN phagique se produit avant l'excision du prophage. La terminase est exprimée et initie l'emballage d'ADN tandis que le prophage est toujours attaché au chromosome bactérien. L'emballage de l'ADN continue à travers le chromosome hôte adjacent jusqu'à former plusieurs têtes de particule virale successives. Issu de Chiang et al. (2019).

une alternative prometteuse aux antibiotiques dans le cadre du traitement des infections aux bactéries MDR (Romero-Calle et al., 2019).

1.6.3. La transformation naturelle

La transformation naturelle est l'acquisition stable d'ADN exogène par une cellule bactérienne grâce à l'internalisation d'ADN exogène depuis le milieu extérieur par une cellule, suivie de son intégration dans le chromosome grâce à des mécanismes de recombinaison homologue (Blokesch, 2016; Johnston et al., 2014).

La transformation naturelle fût d'abord décrite par Frederick Griffith en 1928 grâce à des expériences réalisées chez *Streptococcus pneumoniae* (Griffith, 1928). Il observa qu'une souche non capsulée était capable d'acquérir un phénotype capsulé après avoir été incubée avec une souche morte capsulée. Griffith en conclut que du matériel génétique devait avoir été libéré par la souche morte puis acquis par la souche vivante se trouvant à proximité. Il faudra cependant attendre plusieurs dizaines d'années avant qu'il ne soit mis en évidence que l'ADN est le substrat nécessaire à cette transmission de matériel génétique (Avery et al., 1944). Dans les années qui suivirent la découverte de Griffith, la transformation naturelle fût particulièrement bien étudiée chez des espèces telles que *Bacillus subtilis* (Leisner et al., 2008; Mulder and Venema, 1982) ou *Streptococcus pneumoniae* (Dawson and Sia, 1931) pour les bactéries à Gram positif, et *Neisseria gonorrhoeae* (Hamilton and Dillard, 2006), ou *Vibrio cholerae* (Meibom et al., 2005) pour les bactéries à Gram négatif, ce qui permit de décrire en détail les étapes et éléments clés du mécanisme.

La conjugaison, la transduction et la transformation naturelle ont en commun l'existence d'une cellule donneuse et d'une cellule receveuse lors du transfert du matériel génétique. Ce transfert lors d'un HGT est partiel, et polaire dans la plupart des cas. Le matériel génétique se déplace de manière unidirectionnelle, de la cellule donneuse vers la cellule réceptrice, puis les cellules se séparent. Dans le cas de la conjugaison et de la transduction, le transfert est initié par l'intermédiaire porteur du matériel génétique, c'est-à-dire par le plasmide conjugatif ou le phage. Ceux-ci portent eux-mêmes tout le support génétique nécessaire à l'expression de l'appareillage menant au transfert : les plasmides conjugatifs portent les gènes qui codent par exemple les éléments protéiques formant le pilus conjugatif et les phages possèdent l'information génétique leur permettant d'encapsider de l'ADN, de former des particules virales puis d'infecter une nouvelle cellule. En revanche, la transformation naturelle est un mécanisme uniquement initié par la cellule bactérienne receveuse lorsque celle-ci développe la compétence pour la transformation naturelle, un état génétique spécifique durant lequel la bactérie est capable de capter et d'internaliser l'ADN exogène et qui peut être activé par de nombreux stimuli différents.

La transformation naturelle est considérée comme l'un des moteurs principaux de la dissémination de gènes de résistance chez les espèces pathogènes transformables. Elle permet par exemple l'acquisition d'un nouvel allèle d'un gène déjà présent, produisant alors une protéine insensible à l'action de l'antibiotique (Hamidian et al., 2019), ou bien l'acquisition d'un AR-MGE permettant d'exprimer une nouvelle enzyme capable par exemple de rendre la molécule de l'antibiotique inactive (Domingues et al., 2012a, 2012b). Plus généralement, la transformation naturelle est mécanisme de HGT, particulièrement important pour la diversification génétique des espèces bactériennes transformables, mais cette fonction reste encore aujourd'hui sujette à débat (Johnsborg et al., 2007). Le mécanisme de la transformation naturelle et ses différentes fonctions sont détaillés dans la section suivante.

2. La transformation naturelle et la diversité génétique chez les bactéries

2.1. Vue d'ensemble du mécanisme de la transformation naturelle

2.1.1. Induction de la compétence

La compétence est un état génétique finement régulé et soumis à divers stimuli environnementaux. Les gènes de compétence, qui contrôlent l'activation de la compétence et la mise en place de la machinerie protéique essentielle au processus de transformation naturelle peuvent être divisés en deux groupes : Les gènes précoces et les gènes tardifs. Les gènes précoces codent les protéines qui vont permettre le contrôle de l'induction de l'état de compétence alors que les gènes tardifs codent les protéines impliquées dans la liaison de l'ADN et son transport à l'intérieur de la cellule. Les gènes précoces sont souvent très divergents même au sein du genre bactérien, ce qui reflète la nature variable des signaux de contrôle de l'état de compétence. A l'inverse, les gènes tardifs sont très conservés au sein d'une même famille. Ainsi, de fortes similitudes existent entre les structures protéiques responsables de l'internalisation de l'ADN exogène dans la bactérie. Cette conservation du mécanisme souligne son importance pour la cellule bactérienne et suggère que le maintien d'une telle fonction ancestrale est encore essentiel chez de nombreuses espèces bactériennes.

Chez la quasi-totalité des espèces bactériennes transformables, la compétence est un état génétique finement régulé qui n'est activé que dans certaines conditions. L'expression des principaux gènes de compétence est contrôlée par un système de régulation complexe et variable selon les espèces. Il existe de nombreux exemples de signaux externes activateurs de la compétence,

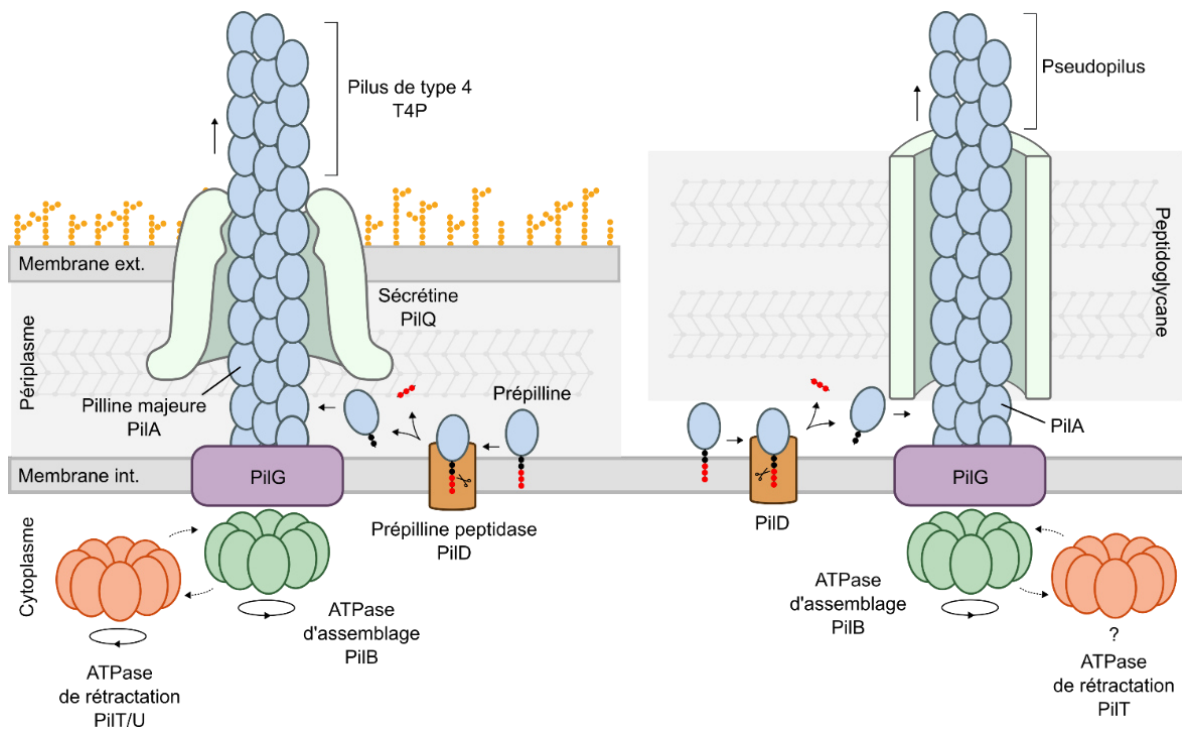


Figure 7 : Biogénèse du pilus de type 4.

Les prépilines ont en commun un court peptide signal (en noir), un motif de coupure et un domaine hydrophobe N-terminal servant d'ancrage dans la membrane (en rouge). Dans le périplasm, la prépilline peptidase PilD coupe le morceau N-terminal de la prépilline afin de générer la piline majeur PilA qui est ensuite chargée sur la protéine PilG située dans la membrane interne, pour former le filament du pilus de type 4 (T4P) ou un pseudopilus. Les PilA sont ensuite polymérisées et incorporées au pilus grâce à l'action de l'ATPase d'assemblage PilB (ou PilF), ce qui provoque l'extension du T4P en filament hélicoïdal. Chez les bactéries à Gram négatif (à gauche), le filament passe par la sécrétine PilQ qui forme un pore au travers de la membrane externe. Chez les bactéries à Gram positif (à droite), le T4P traverse le peptidoglycane *via* un mécanisme/intermédiaire inconnu. L'action de l'ATPase de rétraction PilT (conjointement avec PilU chez les bactéries à Gram négatif) permet la dépolymérisation du filament et sa rétraction. Adapté de Melville et Craig (2013).

souvent intimement liés au mode de vie de la bactérie. Chez *V. cholerae* par exemple, la compétence est activée lorsque la bactérie croie sur la chitine (Meibom et al., 2005; Metzger and Blokesch, 2016), le principal constituant des exosquelettes de crustacés se trouvant dans le milieu aquatique où cette bactérie réside. Les oligosaccharides solubles de chitine induisent indirectement l'expression de TfoX, le régulateur majeur de la compétence (Dalia et al., 2014; Meibom et al., 2005; Yamamoto et al., 2014). En plus du régulateur TfoX, une partie des gènes de compétence sont activés par HapR, un régulateur majeur de la détection du quorum (Lo Scrudato and Blokesch, 2012, 2013). De la même manière, ce dernier joue un rôle essentiel dans la régulation de la compétence chez *S. pneumoniae* et *S. mutans* (Shanker and Federle, 2017). Chez d'autres bactéries, la compétence peut être induite par la phase de croissance. Chez *Acinetobacter baylyi* par exemple, la compétence est induite immédiatement après le début de la phase de croissance exponentielle et reste active jusqu'à quelques heures dans la phase stationnaire, après quoi la compétence diminue progressivement (Palmen et al., 1993). Enfin, des facteurs de stress comme l'absence de nutriments (Bossé et al., 2009; Herriott et al., 1970; Sinha et al., 2013) ou un stress génotoxique provoquant des dommages liés à l'ADN, tel que l'exposition à des rayons U.V. ou à certains antibiotiques (Charpentier et al., 2011; Claverys et al., 2006; Prudhomme et al., 2006) peuvent également induire le développement de la compétence.

2.1.2. Liaison et transport de l'ADN extracellulaire

Lorsque la compétence est induite, l'activation de l'expression des gènes de compétence tardifs permet la mise en place de l'appareillage nécessaire à la liaison et à l'internalisation de l'ADN exogène. Chez les bactéries à Gram positif, ce processus s'effectue en une seule étape couplant la liaison de l'ADN sous sa forme double brin (ADNdb) avec son passage vers le cytoplasme sous une forme simple brin (ADNsb), l'autre brin étant dégradé lors du processus. Chez les bactéries à Gram négatif, l'internalisation de l'ADN depuis le compartiment extracellulaire vers le cytoplasme s'effectue en deux étapes du fait de la présence du périplasme, ce qui nécessite l'action de deux appareils protéiques indépendants.

Dans les deux cas, la captation de l'ADNdb est assurée par des filaments de type 4, des structures composées de sous-unités protéiques produites à l'intérieur de la cellule, puis assemblées en un filament hélicoïdal (Melville and Craig, 2013; Piepenbrink, 2019). Ces appendices extracellulaires sont impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques comme l'adhésion, la formation de biofilms ou la compétence. Chez les bactéries à Gram négatif, la structure impliquée dans la transformation naturelle est un pilus de type 4 (T4P) alors que chez les bactéries à Gram positif, il s'agit d'un pseudopilus (ou pilus de compétence), une structure analogue du T4P.

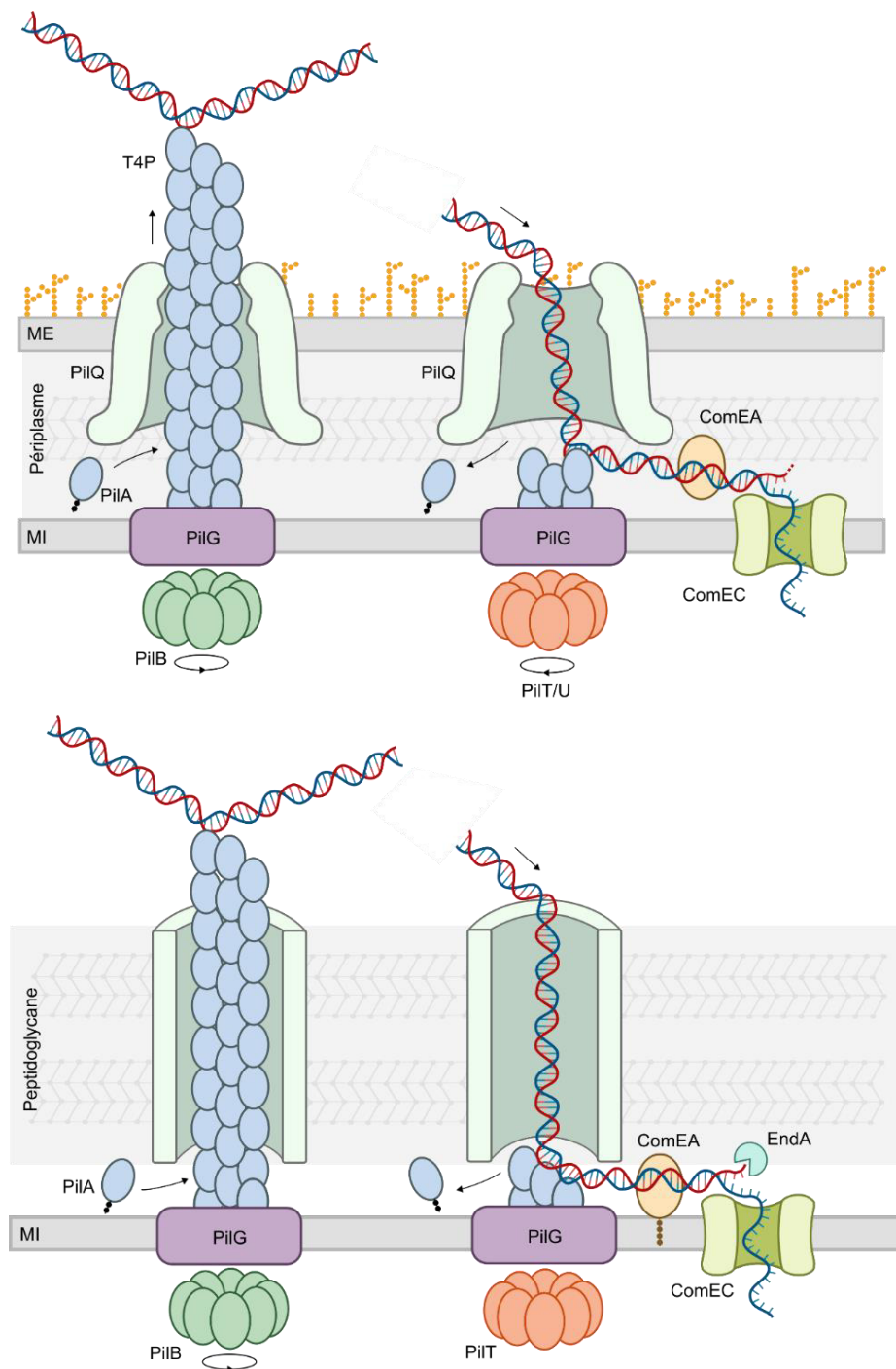


Figure 8 : Liaison et internalisation de l'ADN exogène lors de la transformation naturelle.

Bactéries à Gram négatif (en haut) : L'ADN capturé par le T4P, qui en se rétractant grâce à l'activité de l'ATPase PilT provoquant sa dépolymérisation, entre dans le périplasma. Le récepteur ComEA se fixe alors sur l'ADN et le prend en charge. Un seul des deux brins est internalisé vers le cytoplasme par la protéine ComEC qui forme un pore dans la membrane interne. Le brin non internalisé est dégradé dans le périplasma. Bactéries à gram positif (en bas) : L'ADN capturé par le pseudopili est transloqué à la surface de la bactérie où il est lié par la protéine ComEA qui permet ensuite son internalisation vers le cytoplasme au travers de la membrane par le transporteur ComEC. La dégradation de l'un des deux brins d'ADN est assurée par la nucléase EndA (chez *S. pneumoniae*) (Puyet et al., 1990) ou directement par la protéine ComEC (chez *B. subtilis*) (Baker et al., 2016). Adapté de Dubnau et Blokesch (2019).

Les T4P et les pseudopili utilisent différents constituants protéiques homologues pour leur biogénèse et leur fonctionnement : (i) les protéines de pilines qui servent de sous-unités constituant l'hélice transmembranaire du filament, (ii) une peptidase membranaire qui modifie les prépilines en pilines et (iii) les protéines ATPases qui permettent l'extension ou la rétraction du filament par polymérisation ou dépolymérisation des pilines (**figure 7**). En général, une piline, appelée piline majeure, constitue la quasi-totalité du pilus en complément d'autres pilines pouvant être incorporées le long du filament ou à son extrémité extracellulaire. Les pilines constituant la coiffe du pilus (majeur ou accessoire) servent vraisemblablement de récepteur pour la liaison de l'ADN, qui peut ensuite être internalisé dans la cellule (**figure 8**). Chez les bactéries à Gram positif, l'ADN est transmis du pilus à la membrane interne puis internalisé directement dans le cytoplasme de la cellule par des mécanismes pour la plupart inconnus. Chez les bactéries à Gram négatif, la rétraction du pilus entraîne le passage de l'ADNbd au travers de la membrane externe, grâce à la sécrétine formant le pore dans lequel passe le pilus. Une fois dans le périplasme, l'un des deux brins de l'ADNdb est pris en charge par la protéine comEA et un brin de l'ADN est dégradé afin de permettre le transport de l'ADNsb dans le cytoplasme de la bactérie *via* un canal transmembranaire formé par la protéine ComEC. La protéine ComEA est une protéine possédant deux motifs Helix-Hairpin-helix (HhH) capables de lier de manière non-spécifique l'ADN double-brin. Chez les bactéries Gram négatives, la protéine ComEA est présente de manière soluble dans le périplasme et est essentielle à la transformation chez *N. gonorrhoea* (Chen and Gotschlich, 2001) et *V. cholerae* (Seitz et al., 2014). De manière intéressante, son activité est totalement indépendante de celle du T4P, n'étant ni impliquée dans la biogénèse du pilus, ni dans la mobilité dépendante du T4P (Chen and Gotschlich, 2001). Une fois internalisé, l'ADNsb est pris en charge par des protéines cytoplasmiques qui vont permettre la recherche d'homologie dans le chromosome de la cellule hôte.

2.1.3. Intégration de l'ADN et recombinaison

L'ADNsb internalisé dans le cytoplasme est rapidement pris en charge par des protéines cytoplasmiques. La protéine DprA (*DNA processing A*) se lie à l'ADNsb, le protège et y charge la recombinaise RecA (Mortier-Barrière et al., 2007). La protéine RecA ainsi polymérisée sur l'ADNsb va ensuite favoriser la recherche d'homologie dans le chromosome hôte. Lorsqu'une séquence homologue est trouvée, RecA provoque l'invasion du brin d'ADNsb avec le brin homologue d'ADN chromosomique ce qui provoque la formation d'une structure intermédiaire contenant les trois brins d'ADN et une boucle de déplacement (*D-loop*). L'extension des branches de la *D-loop* au niveau des jonctions ADN lors du processus appelé migration de branche, permet ensuite d'augmenter ou de diminuer la quantité d'ADNsb transformant intégré dans le chromosome (**figure 9**).

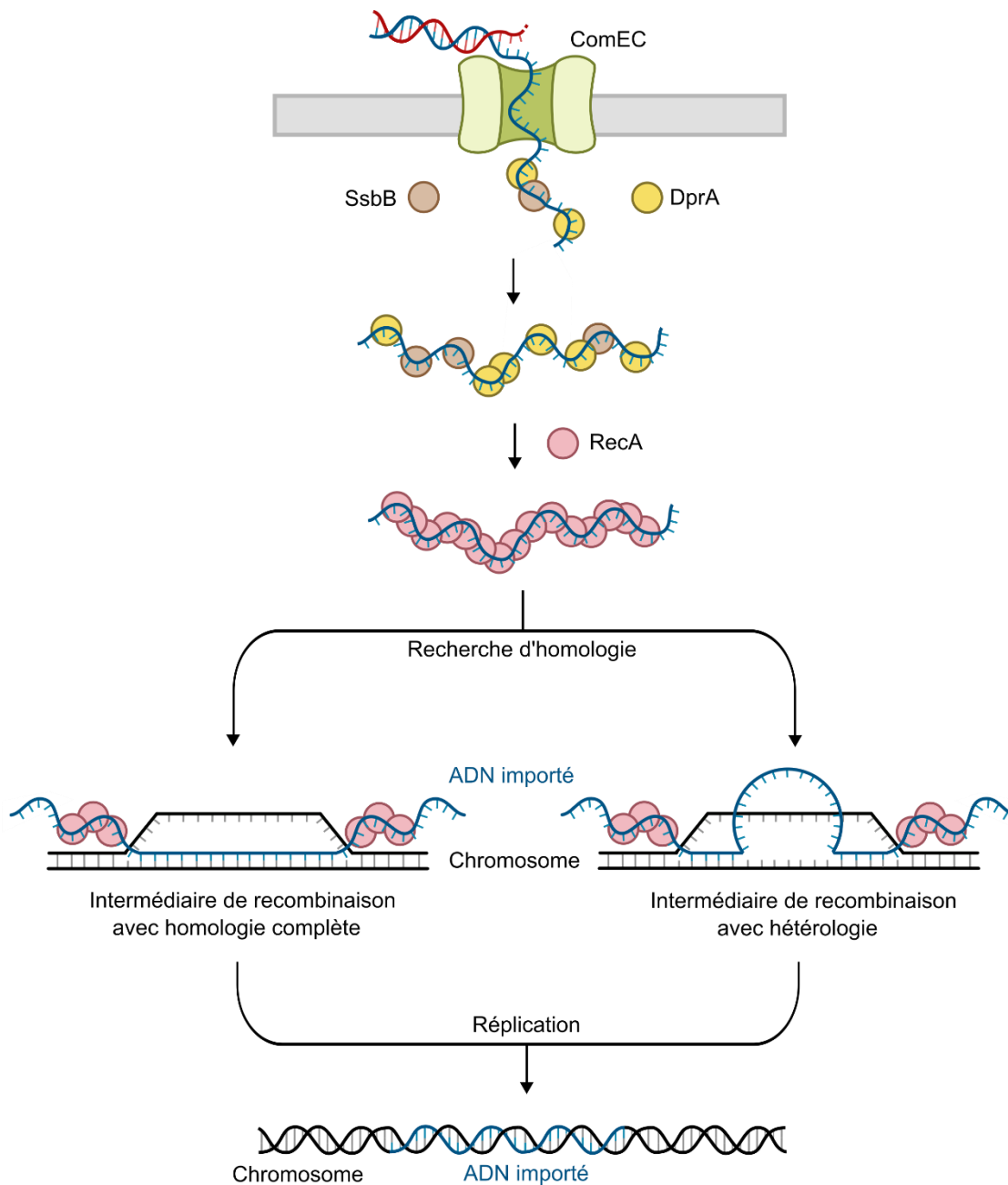


Figure 9 : Devenir de l'ADN importé lors de la transformation naturelle.

L'ADN simple-brin internalisé est rapidement pris en charge par des protéines cytoplasmiques telles que SsbB et DprA (pour *DNA processing protein A*). DprA permet ensuite le recrutement de la recombinaise RecA. La polymérisation de RecA sur l'ADN importé favorise la recherche d'homologie avec le chromosome de l'hôte. Lorsque de l'homologie est trouvée, l'invasion des brins permet la formation d'un intermédiaire de recombinaison comprenant des boucles de déplacement (D-loop). L'intermédiaire forme un hétéroduplex en double-brin si l'homologie est complète (à gauche). A l'inverse, si l'ADN importé contient des séquences hétérologues flanquées de séquences homologues, l'intermédiaire forme un hétéroduplex contenant une boucle simple brin (à droite). Les intermédiaires sont ensuite résolus par des mécanismes inconnus pour former la molécule d'ADN finale contenant l'ADN importé intégrée au chromosome. Adapté de Johnston et al. (2014).

Enfin, lorsque le processus de migration de branche s'arrête, le complexe est ensuite traité pour générer un hétéroduplex stable entre l'ADN transformant et le génome. Cet hétéroduplex est ensuite résolu par réplication puis ségrégation du chromosome, ce qui débouche sur deux cellules sur le point de se diviser abritant les génomes de deux géotypes distincts (l'une contenant le ADN transformant et l'autre non) (Dalia and Dalia, 2019).

La formation de la *D-loop*, la migration de branches et la résolution des jonctions ADN sont des étapes complexes du processus de recombinaison dont les mécanismes sous-jacents et les acteurs protéiques sont encore mal connus. En outre, l'appariement de l'ADNsb avec le chromosome pouvant être entièrement homologue ou bien contenir une partie hétérologue, les contraintes physiques diffèrent fortement selon le cas et impliquent potentiellement différents acteurs et mécanismes, alors plus ou moins essentiels à la résolution de telles structures (**figure 9**). Chez les bactéries à Gram positif, la protéine RadA est une hélicase interagissant avec RecA fin de promouvoir l'extension bidirectionnelle de la boucle de déplacement (Marie et al., 2017; Torres et al., 2019). Un phénomène également retrouvé chez les bactéries à Gram négatif et récemment mis en lumière par les travaux de Thomas Nero, Ankur Dalia et leurs collègues. Ces derniers proposent un modèle dans lequel la protéine ComM agit également comme un facilitateur de la migration de branche, en particulier dans le cas où l'ADN transformant contient une partie hétérologue flanquée de deux parties homologues (Nero et al., 2018). Dans ce modèle, l'activité hélicase de la protéine ComM permet l'ouverture de l'hélice double-brin de l'ADN chromosomique afin de faciliter le déroulement de la *D-loop* et permettre l'intégration de l'ADNsb (**figure 10**). En absence de l'activité de ComM, la capacité d'acquisition d'ADN exogène est alors réduite chez *V. cholerae* et *A. baylyi*, et ce en particulier dans le cas de l'acquisition d'un ADN contenant quelques centaines de paires de bases absentes du chromosome de la bactérie receveuse. Bien que non-essentiel, ce phénomène dépendant de ComM semble donc être particulièrement important dans le cas de l'intégration d'un fragment d'ADN hétérologue flanqué de parties homologues, tel que lors de la présence d'un transposon ou d'une cassette de gènes dans le génome de la bactérie donneuse.

2.2. Rôles et raison d'être de la transformation naturelle chez les bactéries

2.2.1. Pourquoi la transformation naturelle existe-t-elle chez les bactéries ?

La fonction de la transformation naturelle chez les bactéries est un sujet complexe et régulièrement débattu dans la littérature (Blokesch, 2017; Johnsborg et al., 2007). Trois hypothèses principales sur le devenir de l'ADN internalisé sont généralement discutées : l'ADN comme source de nutriments, l'ADN comme matrice pour la réparation de dommages sur l'ADN chromosomique et l'ADN comme source de nouveaux gènes (**figure 11**). C'est pour cette dernière hypothèse de « l'ADN pour l'évolution » que la transformation naturelle est définie comme un mode de HGT et revêt une importance particulière dans

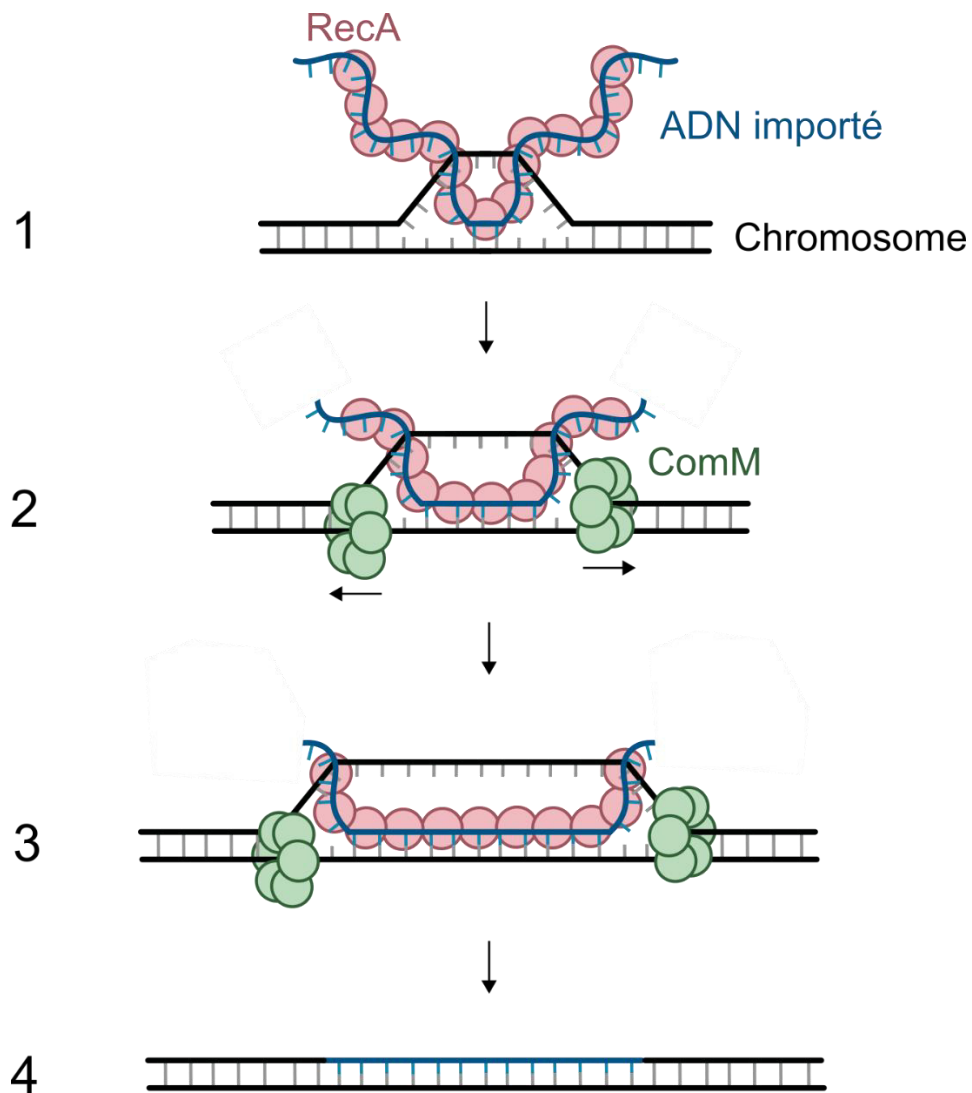


Figure 10 : Modèle du fonctionnement de la protéine ComM lors de la transformation naturelle.

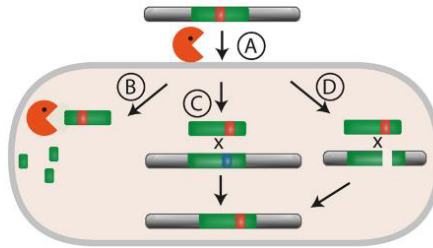
Lorsque l'homologie de séquence entre l'ADN importé et le chromosome est suffisante, la protéine RecA catalyse l'invasion des brins et la formation de la boucle de déplacement (1). La présence de RecA permet ensuite à la protéine ComM (sous forme multimérique) d'être chargée sur le brin d'ADN chromosomique déplacé et ainsi provoquer la dissociation des deux brins (2). Une autre possibilité pourrait être que ComM soit chargée sur les deux brins et que leur séparation soit effectuée à l'intérieur du canal créé par la forme multimérique de ComM. Dans les deux cas, l'activité hélicase de ComM permet de dérouler l'ADN natif ce qui provoque l'avancement de la boucle de déplacement (3). Enfin, les jonctions de la boucle sont résolues pour permettre la libération de la molécule d'ADN chromosomique finale ayant incorporé l'ADN importé (4). Adapté de Johnston et al. (2014)

la compréhension de l'adaptabilité des bactéries à leur environnement. Néanmoins, si ces trois hypothèses ne s'excluent pas nécessairement, certaines sont mieux supportées que d'autres par les données et il n'est pas impossible que différentes espèces puissent exploiter ce mécanisme pour différentes fonctions.

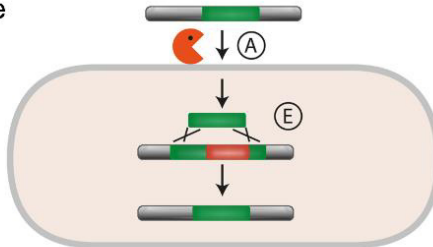
L'hypothèse de « l'ADN comme nourriture » a été initialement proposée par R. Redfield (Redfield, 1993a, 1993b, 2001) avec comme arguments principaux : (i) c'est un avantage à court terme pour la cellule, à l'instar de l'acquisition de gènes qui est plutôt dans une optique d'évolution à long terme, (ii) chez *Haemophilus influenzae* et *B. subtilis*, la carence en nutriments induit la compétence mais pas les dommages à l'ADN, (iii) de l'ADN non-apparenté peut tout aussi bien servir de source de nutriment et (v) l'ajout de ribonucléotides dans le milieu de croissance réduit l'expression de gènes de compétence chez *H. influenzae* (Macfadyen et al., 2001). Cependant, plusieurs contre-exemples s'opposent à cette hypothèse, comme le fait que chez les espèces *S. pneumoniae* et *A. baylyi*, la compétence est induite lors de la phase exponentielle de croissance pendant laquelle les nutriments sont présents en quantité suffisante (Claverys and Håvarstein, 2007; Palmen et al., 1993). En outre, certaines espèces sont capables de reconnaître et d'acquérir de l'ADN provenant uniquement de cellules de la même espèce, et donc ne provenant pas de n'importe quelle source d'ADN. Les bactéries de l'espèce *N. gonorrhoeae* sont par exemple capables de favoriser la captation d'ADN provenant de leur propre espèce grâce à la reconnaissance de motifs représentés dans la totalité de leur génome (Elkins et al., 1991). Le fait que la transformation naturelle tend à favoriser l'acquisition d'ADN apparenté, ou provenant d'espèces proches, plaide en faveur de l'hypothèse de « l'ADN pour la réparation ». Chez *S. pneumoniae*, des travaux montrant l'existence d'un phénomène de fratricide concomitant au développement de la compétence, supportent également cet argument (Borgeaud et al., 2015; Guiral et al., 2005). L'activité de fratricide, la mort d'une cellule provoquée par une cellule étroitement apparentée, ou même génétiquement identique, permet en effet de libérer des molécules d'ADN semblables dans l'environnement immédiat de la bactérie compétente. Cependant, des études récentes chez *V. cholerae*, *S. pneumoniae* et *A. baylyi* ont démontré que la compétence pouvait également être liée à une forme de prédation favorisant cette fois des cellules bactériennes appartenant à d'autres espèces (néanmoins proches), plutôt que les cellules apparentées (Borgeaud et al., 2015; Cooper et al., 2017; Kjos et al., 2016; Wholey et al., 2016). Par conséquent, une telle prédation conduit au transfert génétique non clonal de l'ADN, ce qui favorise cette fois l'hypothèse de « l'ADN pour l'évolution ». De plus, il a été récemment démontré que cette prédation observée chez *V. cholerae* favorisait le transfert d'ilots génomiques pouvant dépasser 150 kilobases (Matthey et al., 2019).

Un autre mécanisme bien moins connu, est la libération d'ADN dans le milieu extérieur par les bactéries. Des travaux chez *N. gonorrhoeae* ont par exemple montré que cette bactérie était capable de sécréter de l'ADN dans le milieu à l'aide d'un système de sécrétion de type IV (T4SS, *Type 4 secretion system*),

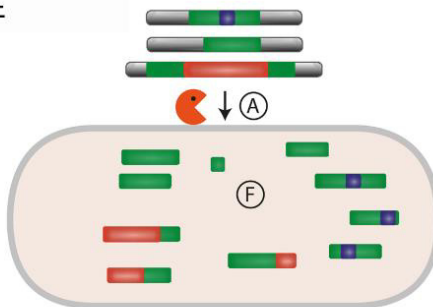
Modèles antérieurs



Nettoyage du chromosome



Gain de MGE



Infection

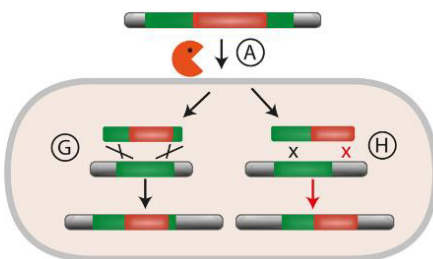


Figure 11 : Modèles de la raison d'être de la transformation naturelle.

L'internalisation d'ADN exogène depuis son environnement direct permet à la bactérie d'acquérir des fragments d'ADN de faible taille (A). Les modèles antérieurs du rôle de la transformation naturelle se sont concentrés sur le rôle de l'ADN en tant que source de nutriment (B), perturbateur de la transmission héréditaire de gènes (C) ou comme matrice pour la réparation des dommages liés à l'ADN (D). Dans le modèle du nettoyage du chromosome, l'ADN sert de matrice à l'élimination de MGEs insérés stablement dans le génome par recombinaison entre des séquences homologues situées à leur extrémités (E). Ce modèle est fortement affecté par la taille des fragments d'ADN importés car la probabilité d'acquérir un MGE diminue fortement avec celle-ci ou avec la taille du MGE (F). Malgré ce biais en faveur de la suppression de MGEs par recombinaison, certains d'entre eux peuvent être intégrés au génome par transformation naturelle, par recombinaison homologue (G) ou par recombinaison illégitime facilitée par de l'homologie (H). Issu de Rocha (2016).

fournissant activement un substrat pour la transformation naturelle (Dillard and Seifert, 2001; Hamilton and Dillard, 2006; Hamilton et al., 2005). Ensembles, ces travaux constituent un argument solide contre la principale critique de cette hypothèse de « l'ADN pour l'évolution », à savoir que l'ADN acquis lors la transformation naturelle provient de cellules mortes, et donc de cellules présentant une capacité adaptative moindre, et que cet ADN est fragmenté par des enzymes, ce qui ne permet pas de fournir un ADN substrat d'une qualité suffisante pour acquérir des gènes. L'existence d'une co-régulation de mécanismes tel que la prédation ou la sécrétion active d'ADN, avec le développement de la compétence pourrait donc être une stratégie mise en place chez certaines espèces afin de favoriser le transfert de gènes au travers de l'acquisition d'ADN (Veening and Blokesch, 2017).

Acquérir des gènes à partir d'un ADN libre du milieu extérieur n'est cependant jamais sans risques pour la bactérie. Pour internaliser de l'ADN exogène puis l'incorporer au génome lors de la transformation naturelle, les bactéries doivent d'abord développer la compétence et faire face au coût énergétique lié à la réplication et l'expression des gènes de compétences. Si le processus débouche sur l'incorporation de nouveaux gènes dans le génome, celle-ci peut ensuite provoquer des interférences avec le fonctionnement du génome cœur, en plus d'un coût énergétique supplémentaire de réplication et d'expression (Baltrus, 2013; Knöppel et al., 2014). La balance finale entre le coût et le bénéfice de l'acquisition de nouveaux gènes va alors avoir un effet sur le *fitness* de la bactérie pouvant être positif ou négatif, et donc respectivement améliorer ou diminuer la capacité adaptative de la bactérie dans un environnement donné. Les gènes bénéfiques seront retenus par la sélection, tandis que les autres seront inévitablement et naturellement perdus (Kuo and Ochman, 2009). Dans des conditions où la diversité génétique est essentielle pour s'adapter rapidement, la transformation naturelle pourrait alors offrir un moyen rapide de générer de la diversité génétique dans une population bactérienne soumises à un stress comme dans le cas des espèces bactériennes développant la compétence lors de la présence d'antibiotique dans le milieu antibiotiques (Charpentier et al., 2011; Claverys et al., 2006; Prudhomme et al., 2006). Cette hypothèse est également soutenue par des travaux de modélisation mathématique montrant qu'une population bactérienne capable de recombinaison homologue de gènes (sous-jacent à un événement de transformation naturelle), possédait une vitesse d'adaptation plus élevée par rapport aux populations qui en étaient incapables (Levin and Cornejo, 2009). En parallèle, des expériences d'évolution expérimentale réalisées chez *Helicobacter pylori* ont démontré que les cellules compétentes augmentaient leur *fitness* plus rapidement que les cellules non-compétentes (Baltrus et al., 2008). Une autre étude réalisée chez *A. baylyi*, met en évidence que la présence de recombinaison chez les bactéries favorise les échanges de gènes de résistances et provoque une évolution rapide de la résistance aux antibiotiques, au-delà des niveaux obtenus uniquement par mutation (Perron et al., 2012). Néanmoins, d'autres résultats également obtenus chez *A. baylyi* démontrent que cet avantage est dépendant de la phase de croissance et concluent que si la recombinaison accélère l'adaptation par accumulation rapide de multiples mutations adaptatives dans

le même fond génétique, elle n'est cependant pas suffisante pour tenir pleinement compte du maintien de la transformation naturelle chez les bactéries (Utnes et al., 2015).

Ces différents travaux, et leurs conclusions parfois contradictoires, illustrent parfaitement la complexité à évaluer les effets réels de ce mécanisme sur l'évolution des populations bactériennes. Certains auteurs suggèrent que la transformation naturelle et/ou la compétence pourrait avoir différents bénéfices, et donc différentes raisons d'être maintenus chez les bactéries (Seitz and Blokesch, 2013). En outre, l'apport de l'acquisition d'un nouveau gène sur le *fitness* de la bactérie est un effet qui varie selon les contraintes de l'environnement, et il est presque impossible de générer des conditions expérimentales qui reflètent cet environnement naturel de la bactérie. Les pressions de sélection exercées sur la fixation de ces gènes acquis par transformation naturelle ont pourtant des implications importantes pour l'évolution des phénotypes bactériens, qu'ils soient bénéfiques pour l'Homme, comme par exemple l'acquisition de nouvelles fonctions de biodégradation de produits chimiques polluants (Springael and Top, 2004), ou néfastes, comme l'évolution de la pathogénie ou la propagation de la résistance aux antibiotiques (Straume et al., 2015).

2.2.2. La porte ouverte à la propagation d'éléments génétique mobiles

Les MGEs sont souvent capables d'être mobilisés au sein du génome par eux-mêmes, et peuvent être présents plusieurs fois dans le chromosome, comme les transposons ou les IS. Ils profitent ensuite des mécanismes de HGT pour être transférés vers une autre cellule bactérienne, comme par exemple par l'intermédiaire de plasmides conjugatifs lors de la conjugaison (Hamidian et al., 2014a), ou par la transformation naturelle (Domingues et al., 2012a). Dans ce dernier cas, la présence de parties d'homologie entourant le MGE permet son intégration dans le chromosome lors de la recombinaison (**figure 11**). Ainsi l'efficacité du transfert de gènes est probablement plus élevée entre des organismes plus étroitement apparentés (ou d'espèces proches), ce qui conduit à la formation de groupes d'échange de plus haut niveau, découlant sur une rapidité plus élevée encore de la propagation de ces AR-MGEs. En plus de porter les gènes codant les éléments essentiels à leur mouvement, les MGEs portent très souvent des gènes accessoires pouvant apporter un avantage adaptatif à la cellule hôte. En effet, la plupart des événements de HGT étant neutres ou désavantageux pour la bactérie, ces derniers sont rapidement perdus (Berg and Kurland, 2002). Au contraire, les événements avantageux peuvent être conservés dans la population bactérienne. Ainsi, l'association d'un gène à haute valeur adaptative au MGE pourrait alors permettre à ce dernier d'assurer sa persistance dans son hôte (Hall et al., 2017). Les gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs), les déterminants génétiques de l'expression d'un phénotype de résistance aux antibiotiques, sont des gènes accessoires très souvent portés par des MGEs (von Wintersdorff et al., 2016). En effet, chez les bactéries, les phénotypes de résistance aux antibiotiques peuvent être le résultat de mutations dans l'ADN chromosomique de la bactérie, ce qui

provoque la modification de protéines déjà existantes, ou bien être le résultat de l'acquisition de nouveau matériel génétique par un mécanisme de HGT (van Hoek et al., 2011). Dans ce dernier cas, la résistance est due à l'expression d'un nouveau gène acquis par HGT, bien souvent facilité par un MGE. Cette association entre ARG et MGE (AR-MGE) est particulièrement inquiétante car elle est l'un des moteurs principaux de la dissémination rapide de résistances aux antibiotiques chez certaines espèces pathogènes (Partridge et al., 2018; Sun et al., 2019).

2.2.3. Le nettoyage du chromosome

Les MGEs sont des entités génétiques dont le but n'est autre que d'être propagé dans les génomes bactériens et pouvant pour cela adopter différentes stratégies évolutives et écologiques afin d'améliorer leur diversification, leur dissémination et leur réplication, souvent au détriment de leur hôte (Ågren, 2016; Darmon and Leach, 2014). Ces caractéristiques en font des éléments génétiques souvent qualifiés de gènes égoïstes ou parasites, un concept introduit avec le développement de la théorie du point de vue du gène (*the gene's-eye view*) par George Williams en 1966, puis développé par R. Dawkins en 1976 dans son livre *The selfish gene* (le gène égoïste). Dawkins propose alors un modèle d'évolution dans lequel il considère que les gènes sont les ultimes bénéficiaires de la sélection, en opposition aux organismes qui ne leur servent que de véhicules pendant un temps restreint (Dawkins, 1976). Cette idée fût ensuite centrale dans l'argumentation d'autres auteurs tels que Doolittle et Sapienza ou Orgel et Crick qui décrivent de grandes portions d'ADN eucaryote n'apportant qu'un effet neutre, voire négatif, sur le *fitness* de l'organisme et qui peuvent être de fait considéré comme des entités égoïstes (Doolittle and Sapienza, 1980; Orgel and Crick, 1980). Bien que ce concept de gène égoïste et ses implications évolutives restèrent longtemps cantonnés aux organismes eucaryotes supérieurs (Ågren, 2016), ils sont aujourd'hui largement appliqués aux organismes procaryotes et plus particulièrement aux bactéries (Darmon and Leach, 2014; Ghaly and Gillings, 2018; Koonin et al., 2017). L'une des caractéristiques principales des MGEs, en tant qu'éléments égoïstes, est d'exploiter les mécanismes de HGT pour maximiser leur propagation, à l'image des ilots de pathogénicités chez *S. aureus*, qui utilisent certains phages tempérés comme aide pour leur propre production et diffusion (Chen et al., 2015). Les phages et les plasmides conjugatifs exploitent ainsi la transduction et la conjugaison en portant eux-mêmes les gènes leur permettant de provoquer leur transfert, au détriment de leur hôte qui subit l'événement de HGT. La transformation naturelle, bien qu'elle soit entièrement sous le contrôle de la cellule hôte, est également largement considérée comme la porte ouverte à l'invasion par des MGEs. Cependant, une nouvelle hypothèse intéressante a été récemment proposée par N. Croucher et ses collègues : l'hypothèse de « l'ADN pour nettoyer » (**figure 11**). Dans ce modèle, la transformation naturelle permet à la bactérie d'importer de l'ADN exogène servant de matrice à l'élimination de MGEs insérés stablement dans le chromosome bactérien après avoir été acquis lors

d'un événement de HGT (Croucher et al., 2016; Rocha, 2016). Cette hypothèse repose d'abord sur le fait que la transformation naturelle présente un biais connu pour l'importation de molécules d'ADN courtes, l'acquisition de molécules d'ADN plus longues étant limitée par la dégradation extracellulaire (Nielsen et al., 2007; Overballe-Petersen et al., 2013) et certains mécanismes bactériens de protection contre l'invasion d'ADN étranger, comme la présence d'endonucléases (Johnston et al., 2013). La probabilité d'importer un fragment d'ADN exogène contenant des MGEs est donc d'autant plus faible (**figure 11**). L'existence d'un tel biais pour l'acquisition de séquences courtes d'ADN fait que la transformation naturelle va plutôt favoriser la délétion de séquences hétérologues et donc la suppression de gènes, plutôt que leur insertion et donc l'acquisition de gènes (Croucher et al., 2016). En intégrant ce biais dans un modèle mathématique, Croucher et ses collègues démontrent alors que la propagation d'un MGE entre plusieurs bactéries est inhibée lorsque les cellules utilisent la transformation naturelle pour les éliminer de leurs génomes (Croucher et al., 2016). Dans cette situation la transformation naturelle agit comme un moyen de protection contre les MGEs, en limitant leur invasion dans une population donnée. En confrontant ensuite leur hypothèse à un modèle expérimental biologique, ils démontrent également que la recombinaison chez *S. pneumoniae* est capable de supprimer efficacement des segments d'ADN hétérologue de 10 à 20 Kbp, ce qui correspond à la taille des IG chez cette bactérie (Apagyi et al., 2017). En outre, cette capacité de délétion est bien supérieure à la capacité d'insertion, démontrant le caractère asymétrique de la transformation naturelle. En parallèle, des simulations intégrant ce paramètre d'asymétrie dans une population recombinante suggèrent que la transformation serait efficace aussi bien pour éliminer les grands MGEs que des éléments plus petits comme des IS, suggérant que cette capacité de nettoyage serait efficace contre tout type de MGE (Apagyi et al., 2017).

Des trois mécanismes principaux de HGT, seule la transformation naturelle peut donc être à la fois une porte ouverte à l'invasion du génome par des MGEs, mais également un obstacle à leur propagation. Si l'on se place du point de vue d'un MGE stablement inséré dans le chromosome à la suite d'un événement de HGT, l'importation d'ADN exogène lors d'un nouvel événement de transformation naturelle pourrait provoquer leur élimination du chromosome par recombinaison et à terme leur disparition de la population bactérienne, en particulier s'il n'apporte pas d'avantage à son hôte. Certains auteurs, dont N. Croucher, ont alors relevé de nombreux cas d'inhibition de la transformation naturelle par des MGEs chez différentes espèces bactériennes (Blokesch, 2017; Croucher et al., 2016). De façon intéressante, les stratégies d'inhibition varient. Chez *V. cholerae* par exemple, l'expression de la nucléase IdeA, dont le gène est contenu dans un prophage, agit directement sur l'ADN transformant (Dalia et al., 2015). Cependant, dans la grande majorité des cas, cette inhibition est la conséquence de l'insertion du MGE dans un gène de compétence (Blokesch, 2017). On retrouve ainsi des exemples de prophages interrompant des gènes de compétence comme chez certaines espèces de *Streptococcus*, où un gène codant un élément du pilus de compétence, le gène *comYC*, est interrompu par un prophage

(Blokesch, 2017; Croucher et al., 2016). Un autre exemple retrouvé chez différentes espèces est l'interruption du gène de compétence *comM* par un MGE. Chez *A. baumannii*, ce MGE est un large îlot génomique de résistance pouvant mesurer jusqu'à 80 Kbp et contenir de nombreux ARGs. De façon intéressante, cette interruption du gène *comM* est présente chez la majorité des isolats cliniques multi-résistants de cette bactérie (Bi et al., 2019; Liu et al., 2014) et il a été démontré que l'absence de ComM chez *A. baylyi* avait pour conséquence de diminuer la capacité de la bactérie à réaliser des HGT *via* la transformation naturelle. Il est ainsi possible que la présence de cet îlot de résistance dans le gène *comM* ait différentes conséquences pour la bactérie, aussi bien en provoquant une interférence avec la transformation naturelle, qu'en participant au caractère résistant de son hôte.

3. *A. baumannii*, un pathogène nosocomial multi-résistant aux antibiotiques

3.1. *A. baumannii* ou l'émergence d'un vieil ennemi

3.1.1. Le genre *Acinetobacter* et sa taxonomie

Le genre *Acinetobacter* comprend un large groupe de bactéries à Gram négatif, biochimiquement et physiologiquement différentes, qui occupent des écosystèmes naturels très variables et dont certaines espèces jouent un rôle causal croissant dans les infections humaines opportunistes (**figure 12**). La découverte du genre *Acinetobacter* date de 1911 lorsqu'un microbiologiste allemand du nom de Beijerinck isole un microorganisme à partir d'un échantillon de sol et l'appelle *Micrococcus calco-aceticus* (Beijerinck, 1911). Malheureusement, le rapport de sa découverte ne contient pas de description du microorganisme. Celui-ci fût par conséquent occulté pendant de nombreuses années jusqu'à ce que l'une de ses souches, ayant été conservée, soit réexaminée bien plus tard et identifiée comme étant proche des bactéries *Bacterium anitratum* (Schaub and Hauber, 1948), *Moraxella glucidolytica* (Piechaud et al., 1951) et *Neisseria winogradskyi* (Lemoigne et al., 1952) décrites quelques années plus tard. En résulte une confusion dans l'identification et la classification de ces organismes très similaires à qui l'on donne parfois différents noms pour un même organisme, ou à l'inverse en les rassemblant sous la même dénomination alors qu'ils appartiennent en réalité à des espèces différentes. Il faudra attendre quelques décennies pour que la désignation du genre sous le nom *Acinetobacter* ne soit proposée par Brisou et Prevot en 1954 pour caractériser un ensemble de bactéries non mobiles classées dans le genre *Achromobacter* (Brisou and Prevot, 1954). En 1968, Paul Baumann, un microbiologiste américain, professeur à l'Université de Californie propose que les bactéries précédemment identifiées sous ces différents noms mais qui semblent partager des caractéristiques très proches, soient regroupées ensembles dans un seul et même genre pour lequel le nom *Acinetobacter* avait été proposé (Baumann et al., 1968). La même année, il isole *A. baumannii* du sol, laquelle sera bien plus tard nommée d'après son nom (Baumann, 1968). L'avancée des techniques d'identification par biologie moléculaire et séquençage permet des avancées majeures dans la taxonomie des *Acinetobacter* vers la fin des années 1980 (Bergogne-Bérézin and Towner, 1996). La nouvelle branche des *Moraxellaceae* de la superfamille des protéobactéries est alors proposée pour rassembler les membres des genres *Acinetobacter*, *Moraxella*, et *Psychrobacter* (ROSSAU et al., 1991) sur la base d'analyses de l'ARN16S et de techniques d'hybridation ARN-ADN (ROSSAU et al., 1989; Van Landschoot et al., 1986). Cependant, les membres du genre *Acinetobacter* sont encore mal décrit.

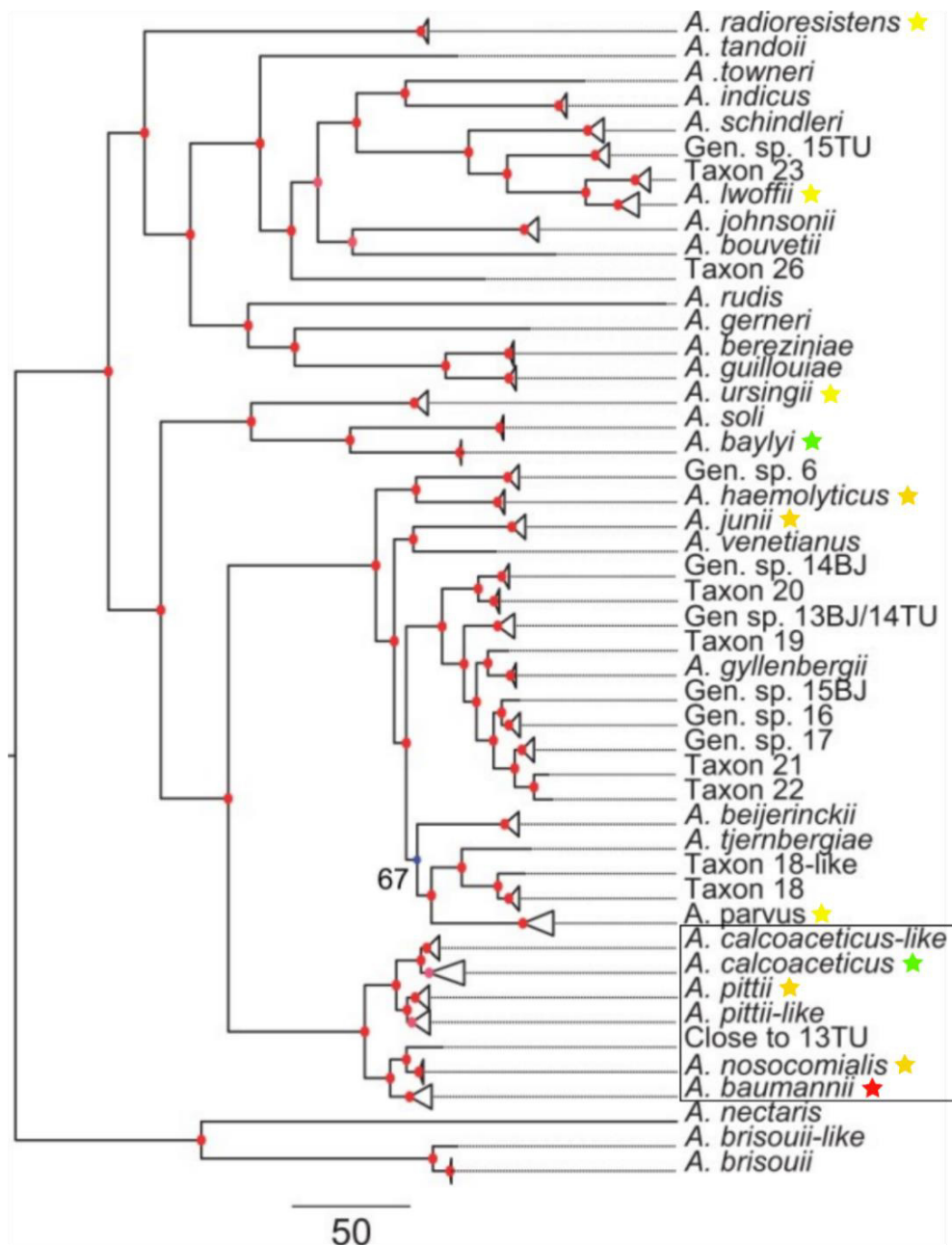


Figure 12 : Phylogénie du genre *Acinetobacter* basée sur l'alignement des familles de protéines du génome cœur.

Les triangles marquent des groupes de taxons appartenant à la même espèce ou ayant des valeurs d'identité moyenne entre nucléotides (ANI, *Average Nucleotide Identity*) supérieures à 95% et pouvant donc être considérés comme provenant de la même espèce. Les nœuds en rouge ont des supports *bootstrap* supérieurs à 95%. L'arbre a été enraciné à l'aide de deux génomes externes d'espèces distantes entre elles mais suffisamment proches du genre *Acinetobacter*. L'espèce majoritaire retrouvée dans des infections nosocomiales, *A. baumannii* est indiquée par une étoile rouge. Les espèces non-*baumannii* ayant plus rarement été impliquées dans des infections sont indiquées par une étoile jaune. Les souches environnementales de référence sont indiquées par une étoile verte. Le complexe *Acb Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* est indiquée par un encadré noir. Adapté de Touchon et al. (2014).

En effet, seule l'espèce *A. calcoaceticus*, parfois accompagnée de *A. lwoffii* est décrite dans le genre *Acinetobacter*. Une avancée majeure dans l'identification de différentes espèces du genre *Acinetobacter* sera la taxonomie des espèces *A. baumannii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii* et *A. junii*, accompagnée de la description des espèces connues *A. calcoaceticus* et *A. lwoffii* (Bouvet and Grimont, 1986). Jusqu'aux années 2000, de nouvelles espèces continuent à être reclassées dans ce genre. L'espèce *Acinetobacter* 13TU, qui a toujours été décrite comme étant très proche de *A. baumannii* à tel point qu'elle a d'abord été classée comme telle, fût ensuite renommée en *A. nosocomialis* et l'espèce *A. genomic species 3* fût renommée en *A. pittii* (Nemec et al., 2011). Ces deux espèces appartiennent au complexe *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* Acb ou complexe *A. baumannii* qui contient en plus les espèces *A. calcoaceticus* et *A. baumannii* (Gerner-Smidt et al., 1991; Nemec et al., 2011) (**figure 12**).

La classification taxonomique actuelle est la suivante : Domaine: Bactéries, Phylum: Protéobactéries, Classe: Gamma *Proteobacteria*, Ordre: Pseudomonadales, Famille: *Moraxellaceae*, Genre: *Acinetobacter*.

3.1.2. Les espèces pathogènes du complexe *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii*

A. baumannii, l'espèce la plus connue du genre *Acinetobacter* et du complexe Acb, est aujourd'hui considérée comme un pathogène nosocomial majeur, particulièrement redouté dans les unités de soins intensifs (Peleg et al., 2008; Towner, 2009). Son implication dans des infections acquises en milieu hospitalier ou communautaire n'est en effet pas nouvelle, on mentionne par exemple déjà son rôle dans des infections humaines à la fin des années 1960 (Gardner et al., 1970) et pendant les guerres d'Afghanistan et d'Irak où elle provoque des infections chez des blessés de guerre atteints de blessures traumatiques ou de brûlures (Calhoun et al., 2008; Hujer et al., 2006; O'Shea, 2012). Mais ce n'est que depuis quelques années, qu'*A. baumannii* a gagné en notoriété, principalement du fait de son caractère résistant aux antibiotiques. Ainsi, *A. baumannii* fait aujourd'hui partie des six micro-organismes multi-résistants aux antibiotiques les plus importants, et retrouvés dans les hôpitaux du monde entier (Antunes et al., 2014; Oliveira et al., 2020). Depuis quelques années, d'autres espèces telles que *A. nosocomialis*, *A. pittii*, *A. ursingii*, *A. haemolyticus*, *A. lwoffii*, *A. parvus* et *A. junii*, ont été identifiées plus occasionnellement dans des cas d'infections nosocomiales (Gaillard et al., 2012; Karah et al., 2011; Linde et al., 2002; Pailhoriès et al., 2018; Wang et al., 2019; Yakut et al., 2016). Bien que minoritaires par rapport aux infections causées par *A. baumannii*, l'augmentation de cas impliquant ces autres espèces pathogènes est inquiétante et pourrait suggérer leur émergence future en tant que pathogène nosocomial. En outre, la multirésistance aux antibiotiques ne semble pas être un caractère limité à l'espèce *A. baumannii*, puisque d'autres espèces telles que *A. pittii* et *A. nosocomialis* ont également été impliquées dans des cas d'infections nosocomiales par des isolats multi-résistants aux antibiotiques

(Fitzpatrick et al., 2015; Karah et al., 2011; Kouyama et al., 2012; Schleicher et al., 2013; Yang et al., 2012).

3.1.3. Manifestations cliniques

A. baumannii est particulièrement redoutée dans les services de soins intensifs des hôpitaux (Sun et al., 2020). Les cas cliniques d'infections causées par *A. baumannii* impliquent généralement des infections des voies respiratoires (Bert and Lambert-Zechovsky, 1996; Mah et al., 2001), des septicémies, des endocardites, des méningites, l'infections de brûlures ou de plaies chirurgicales (Oliveira et al., 2018) et des infections du tractus urinaire. Dans les services où l'utilisation de matériel d'assistance respiratoire est essentielle (Prashanth and Badrinath, 2000), *A. baumannii* fait partie des pathogènes principaux responsables de pneumonies associées à la ventilation mécanique, avec *Pseudomonas aeruginosa* (Joseph et al., 2010). Elle peut également être retrouvée dans des cas de co-infection, par exemple avec *Staphylococcus aureus* (Castellanos et al., 2019; Furuno et al., 2008) ou chez des patients atteints de forme sévère de grippe (Qin et al., 2020). *A. baumannii* est également une bactérie pathogène pour l'animal et fait l'objet, tout comme chez l'Homme, d'une implication croissante dans des infections, en particulier chez les animaux de compagnie mais également de rente (Francey et al., 2000; van der Kolk et al., 2019; Linz et al., 2018; Müller et al., 2014; Wareth et al., 2019). Les manifestations cliniques chez l'animal sont comparables à celle de l'Homme, incluant des infections respiratoires, l'infection de blessures ouvertes, du tractus urinaires ou consécutivement à la pose de dispositifs médicaux tels que des cathéters (Endimiani et al., 2011; Francey et al., 2000; Taj et al., 2020).

3.2. Distribution globale et structure génétique des populations d'isolats cliniques d'*A. baumannii*

3.2.1. Clone international I et II

Les isolats cliniques d'*A. baumannii* appartiennent généralement à l'une des deux lignées clonales principales, initialement appelées clones européens 1 et 2 (EC1 et EC2 pour *European Clone* 1 et 2) puis désormais connus comme les clones internationaux 1 et 2 (GC1 et GC2 pour *Global Clone* 1 et 2), ces clones étant finalement retrouvés de façon globale dans le monde (Diancourt et al., 2010; Hamidian and Hall, 2018). A l'origine, ces clones furent caractérisés par L. Dijkshoorn et ses collègues à partir de l'étude d'un échantillon de souches d'*A. baumannii* originaires d'Europe du Nord et comprenant à la fois des isolats cliniques responsables d'épidémies et des isolats sporadiques n'ayant pas provoqué d'épidémies (Dijkshoorn et al., 1996). En combinant des techniques d'identification génétique et phénotypique, telles que le profil des protéines d'enveloppe cellulaire, le ribotypage, les antibiogrammes

ou les empreintes génétiques génomique, les auteurs démontrèrent que les isolats cliniques épidémiques, même impliqués dans des épidémies distinctes, étaient liés entre eux par deux grands clusters. A l'inverse, les isolats non épidémiques étaient beaucoup plus hétérogènes et étaient notamment susceptibles aux antibiotiques. Finalement, un troisième clone épidémique GC3 fut plus récemment identifié par l'utilisation d'une méthode de caractérisation des empreintes génétiques (van Dessel et al., 2004).

3.2.2. Types de séquence (ST)

Quelques années plus tard, les lignées clonales des isolats cliniques provoquant de nouvelles épidémies au Royaume-Unis furent caractérisées par électrophorèse sur gel en champ pulsé (*Pulsed-field Gel Electrophoreses Gel* PFGE), résultats confirmés ensuite par la description d'un schéma de typage génomique multilocus (MLST *MultiLocus Sequence Typing* en anglais (Bartual et al., 2005). Dans cette étude, un schéma de MLST pour *A. baumannii* fut développé sur la base plusieurs dizaines d'isolats cliniques épidémiques isolés dans des hôpitaux européens au cours des années 1990 à 2001. Un schéma de typage fut alors proposé sur la base des régions conservées de plusieurs gènes domestiques comprenant par exemple les gènes *gyrB*, *recA* et *rpoD*. Le nombre d'allèles au niveau des loci individuels variant de 6 à 12, un total de 20 profils alléliques ou types de séquences (ST, *Sequence Type* en anglais) ont alors pu être distingués parmi les souches d'*A. baumannii* étudiées.

Par la suite, une méthode plus accessible basée sur la technique de la PCR multiplex fut proposée (Turton et al., 2007). Celle-ci se base sur un profil génétique spécifique de chaque groupe selon la caractérisation des allèles des gènes *ompA*, *csuE* et des gènes de type *bla*_{OXA-51} (Turton et al., 2007). La protéine A de la membrane externe (codée par le gène *ompA*) est une porine (Gribun et al., 2003; Sugawara and Nikaido, 2012). Le gène *csuE* code une partie d'un système d'assemblage de pilus (Tomaras et al., 2003). Le gène de type *bla*_{OXA-51} code la carbapénémase intrinsèque trouvée chez les bactéries *A. baumannii* (Héritier et al., 2005).

Cependant, ces différentes techniques ne furent pas appliquées pour évaluer la structure génétique de cette espèce dans sa globalité et en particulier des clones internationaux. Ainsi, en 2010, L. Diancourt et ses collègues réalisèrent une étude afin de déterminer la structure génétique de la population d'*A. baumannii*, en mettant en particulier l'accent sur les lignées clonales GC1 et GC2 précédemment décrites (Diancourt et al., 2010). Leur analyse révèle alors la présence de seulement cinq complexes clonaux, dont les trois principaux correspondent aux clones internationaux GC1 à GC3. En outre, ces résultats démontrent que ces lignées clonales correspondent aux complexes clonaux MLST, comprenant un ST majoritaire dans chacun d'entre eux. Les auteurs suggèrent alors que l'expansion clonale fut trop rapide pour permettre la différenciation génétique en de nombreux variants au sein de ces lignées clonales, expliquant la domination d'un ST par complexe clonal. Ainsi, ils conclurent que

leurs résultats étaient bien en accord avec les données épidémiologiques précédemment obtenues, indiquant que la majorité des épidémies étaient provoquées par des isolats multirésistants issus des GC1 à GC3, confirmant par ailleurs leur rapide propagation clonale.

Enfin, la combinaison de ces différentes techniques a permis récemment la description de lignages distincts (lignages 1 et 2) au sein du GC1, dont les caractéristiques sont intimement liées à la présence d'un îlot de résistance spécifique dans le génome de ces isolats (Hamidian et al., 2014b; Holt et al., 2016).

3.3. Un microorganisme aux capacités de survie et d'adaptation exceptionnelles

Le succès croissant d'*A. baumannii* en tant que pathogène nosocomial, tient principalement de sa capacité à résister à des conditions environnementales difficiles, à coloniser rapidement son hôte et à présenter des résistances aux antibiotiques et antimicrobiens. La persistance de cette bactérie dans des environnements très variés et à forte pression de sélection tels que les environnements cliniques, témoigne en effet de sa capacité d'adaptation à des environnements parfois très fluctuants.

3.3.1. Motilité, adhésion et formation de biofilms

A. baumannii est une bactérie qui ne possède pas de flagelle. Sa motilité est alors principalement due à des mouvements de translocation de surface de type *twitching*.

La motilité *twitching* est une forme de translocation bactérienne se produisant sur des surfaces humides grâce à l'extension, l'attache, puis la rétraction d'un pilus de type IV, qui fonctionne de manière similaire à un grappin (Mattick, 2002). Ce mouvement a pu être caractérisé à la fois chez des isolats cliniques des espèces pathogènes *A. nosocomialis* (Harding et al., 2013) et *A. baumannii* (Eijkelkamp et al., 2011; Wilharm et al., 2013), mais son intensité semble être variable (Vijayakumar et al., 2016).

La motilité *twitching* est particulièrement importante dans la colonisation de l'hôte et la formation de biofilms, l'un des moyens de survie les plus efficaces utilisés par les bactéries, et considéré comme particulièrement important pour la survie et la virulence d'*A. baumannii* (Eze et al., 2018; Perez et al., 2007). Ces agrégats de microorganismes forment une communauté complexe multi-cellulaire adhérant à la fois entre cellules et avec différentes surfaces, biotiques ou abiotiques. Les biofilms sont alors généralement un moyen pour les bactéries de survivre dans une niche écologique moins propice à un mode de vie planctonique (Kostakioti et al., 2013). Chez *A. baumannii*, il a été démontré que la formation de biofilm permettait à ce pathogène de persister dans les services cliniques, sur l'équipement médical (Costa et al., 2019; Song et al., 2013) ou dans l'hôte en permettant de résister aux défenses immunitaires (King et al., 2009). En outre, des travaux suggèrent que ces biofilms sont également

propices aux mécanismes de HGT du fait de la proximité et la cohésion cellulaire particulièrement élevée au sein de ces structures, comme par exemple chez *P. aeruginosa* (Nolan et al., 2020).

3.3.2. Compétition bactérienne médiée par le système de sécrétion de type VI

Les systèmes de sécrétion de type VI (T6SS) sont des machines de sécrétion macromoléculaires qui permettent l'injection de protéines effectrices dans les cellules cibles. Les T6SS sont ainsi utilisées par un certain nombre de bactéries pour la compétition inter-bactérienne ou pour provoquer des réponses dans les cellules eucaryotes lors du processus d'infection (Jani and Cotter, 2010). Les T6SS sont généralement composés de 13 sous-unités centrales, nommées TssA à TssM, et possèdent une structure similaire à celle d'une queue de bactériophage (Cascales and Cambillau, 2012; Leiman et al., 2009). Un complexe protéique forme la base de la structure et est ancré à la membrane cellulaire fournissant ainsi un support à l'ensemble. L'appareil d'injection est constitué d'un fourreau dans lequel passe une structure en forme d'aiguille formée d'un tube et se terminant par une pointe (**figure 13**). Le processus de sécrétion du T6SS est provoqué par la dynamique d'assemblage, de contraction et de désassemblage du fourreau. Lors de l'attaque, l'aiguille est projetée par contraction du fourreau, la pointe perce alors la membrane de la cellule cible, ce qui permet la libération de divers effecteurs à l'intérieur de celle-ci.

Plusieurs travaux ont permis d'identifier la présence de gènes codant les éléments d'un T6SS chez les bactéries *Acinetobacter*. En 2013, les travaux de M.D. Carruthers permettent de mettre en évidence la présence de gènes codant les éléments d'un T6SS chez la souche *A. nosocomialis* M2 et que celle-ci est capable de produire et d'utiliser un T6SS contre *Escherichia coli* dans le cadre de la compétition inter-bactérienne (Carruthers et al., 2013). Weber et ses collègues démontrent que ces gènes sont également présents chez *A. baumannii* et suggèrent que la plupart des souches produisent de façon constitutionnelle un T6SS fonctionnel (Weber et al., 2013). Néanmoins, Weber observe que la production de la protéine Hcp varie fortement selon les souches d'*A. baumannii* et que la souche ATCC17978 n'est pas capable de provoquer la mort d'*Escherichia coli* ou d'autres *Acinetobacter* à l'aide de son T6SS. A la suite de ces travaux, Weber et ses collègues démontrent que certaines souches cliniques possèdent un large plasmide de résistance porteur d'un régulateur de type TetR capable d'inhiber l'activité du T6SS (Weber et al., 2015). Chez ces souches, tandis que le T6SS est totalement inhibé dans une partie de la population cellulaire contenant le plasmide de résistance aux antibiotiques, une autre partie de la population subit de fréquentes pertes du plasmide, ce qui provoque l'activation du T6SS et donc la destruction des bactéries compétitrices. Di Venanzio et ses collègues proposent alors ensuite que l'activité du T6SS chez *A. baumannii*, pourrait être problématique pour le plasmide conjugatif. En effet, son transfert par conjugaison nécessitant un contact proche, celui-ci provoquerait alors également la mort médiée par le T6SS du donneur et du receveur (Di Venanzio et al., 2019). Ainsi,

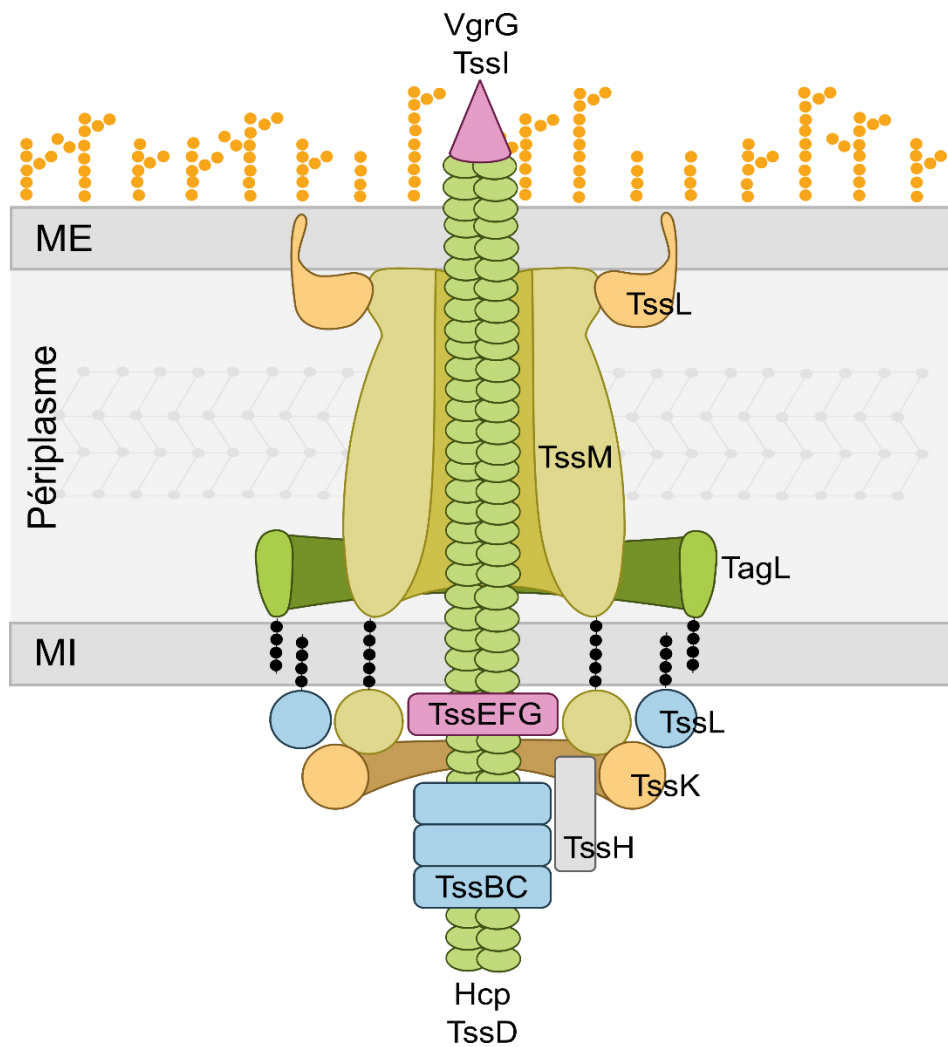


Figure 13 : Structure du système de sécrétion de type 6.

Le complexe protéique TssEFGK forme la base de la structure qui est ancrée dans la membrane interne grâce au complexe TssLM. La polymérisation des protéines Hcp et TssD grâce à l'ATPase TssH forme le tube de l'aiguille dont la pointe est formée des protéine VgrG et TssI. Le fourreau est composé du complexe TssBC. Adapté de Cascales et cambillau (2012).

Di Venanzio émet l'hypothèse que la répression du T6SS pourrait alors résoudre ce conflit entre plasmide et bactérie et favoriser la conjugaison du plasmide (Di Venanzio et al., 2019).

De façon intéressante, il fût récemment démontré que l'activité du T6SS chez *V. cholerae* favorise le transfert horizontal de grands fragments d'ADN par transformation naturelle grâce à la libération active d'un ADN moins fragmenté (Borgeaud et al., 2015).

3.3.3. Transferts horizontaux de gènes et transformation naturelle

Certaines espèces d'*Acinetobacter*, notamment *A. baylyi*, sont devenues depuis quelques années des organismes modèles du fait de leur diversité métabolique et génétique, et leur capacité à réaliser des HGT. Chez *A. baumannii*, cette propension à échanger du matériel génétique est particulièrement intéressante dans la compréhension de la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques ou antimicrobiens. Plusieurs mécanismes de HGT ont ainsi pu être mis en évidence chez *A. baumannii*, comme la conjugaison (Hamidian et al., 2016; Leungtonkham et al., 2018), la transduction (Krahn et al., 2016; Wachino et al., 2019), le transfert *via* vésicules extracellulaires (Rumbo et al., 2011) et la transformation naturelle (Domingues et al., 2019; Harding et al., 2013; Wilharm et al., 2013). Ces mécanismes ont généralement été étudiés et mis en cause dans le cadre de l'échange de gènes de résistance chez *A. baumannii*, soulignant l'intérêt de mieux comprendre le rôle et l'importance de ces mécanismes dans la problématique actuelle de l'antibiorésistance.

L'incroyable capacité de transformation naturelle des bactéries *Acinetobacter* fût originellement décrite en 1969 par Elliott Juni chez la souche *A. calcoaceticus* BD413 (qui deviendra plus tard *A. baylyi* ADP1), mais ces résultats ne rencontrèrent pas d'attention particulière (Juni and Janik, 1969). Dans les années 1990 toutefois, un regain d'intérêt s'opère pour la transformation naturelle chez cette bactérie. Lorenz et ses collègues, puis Palmen, décrivent alors la transformation naturelle chez la même souche *A. calcoaceticus* BD413, en utilisant aussi bien de l'ADN chromosomique que des plasmides (Lorenz et al., 1992; Palmen et al., 1992, 1993). De nombreux articles emboîtèrent ensuite le pas à ces travaux, et démontrèrent notamment que la transformation bactérienne chez cette souche était particulièrement efficace et qu'une petite partie d'homologie sur l'ADN transformant était suffisante pour permettre l'intégration de matériel hétérologue (de Vries and Wackernagel, 2002). Aujourd'hui, la souche *A. baylyi* ADP1 est considérée comme un modèle de prédilection de l'étude de la transformation naturelle chez les *Acinetobacter* dans l'environnement naturel et chez une espèce non-pathogène. Il faudra alors attendre les années 2010, pour démontrer la compétence pour la transformation naturelle chez un isolat clinique d'*A. baumannii* isolé depuis le sang d'un patient hospitalisé en soins intensifs en Argentine (Ramirez et al., 2010). Cependant, cette étude ne présente pas de preuve solide de la transformation naturelle chez *A. baumannii*, ne rapportant que l'importation de plasmides et sans démontrer l'inhibition du phénomène chez des mutants déficients pour l'appareil de transformation. C'est en 2013 que deux

laboratoires apporteront les preuves de l'acquisition d'un gène de résistance chromosomique par transformation naturelle chez plusieurs isolats cliniques d'*A. baumannii* (Whilharm et al., 2013) ainsi que chez *A. nosocomialis* M2, une espèce pathogène nosocomiale initialement classée comme *A. baumannii* M2, (Harding et al., 2013).

Les connaissances acquises sur la transformation naturelle sont majoritairement issues de travaux réalisés chez *A. baylyi*, y compris pour les gènes de compétence et les différents éléments protéiques constituant l'appareillage d'internalisation de l'ADN exogène (Friedrich et al., 2001; Leong et al., 2017; Link et al., 1998). Néanmoins, ceux-ci sont généralement conservés au sein d'un même genre bactérien, et on retrouve alors chez *A. baumannii* un système comparable dont les éléments sont codés par des gènes homologues à ceux originellement identifiés chez *A. baylyi* ou d'autres espèces bactériennes. Ainsi, les protéines ComEA et ComEC (appelée ComA dans Friedrich et al., 2001) présentent par exemple des similarités avec les protéines ComEA et ComEC de *N. gonorrhoeae* respectivement, et participent au transport de l'ADN au travers de la membrane interne (Smith et al., 2007). L'activité du T4P semble essentielle pour la transformation naturelle chez *A. nosocomialis* et *A. baumannii*. En effet, chez un mutant du gène *pilT*, l'absence ou la réduction de la rétractation du T4P consécutive à l'absence de l'ATPase PilT, provoque un phénotype hyperpillié et abolit la capacité à réaliser la transformation naturelle tout en réduisant seulement la capacité de mobilité de surface de la bactérie (Clemmer et al., 2011; Harding et al., 2013; Wilharm et al., 2013). Ceci est probablement dû à l'activité résiduelle du produit du gène *pilU*, également présent chez certaines souches d'*A. baumannii* (Antunes et al., 2011) et *A. baylyi* (Chlebek et al., 2019).

3.4. Antibiorésistance

Les antibiotiques sont des outils essentiels de la médecine moderne, utilisés à la fois pour le traitement des maladies infectieuses, mais également en tant que thérapie de soutien dans les interventions chirurgicales et la chimiothérapie anticancéreuse. Leur utilisation intense dans les environnements cliniques combinée à la capacité de dissémination rapide des gènes de résistances, a provoqué l'essor de microorganismes particulièrement résistants tels que les agents pathogènes ESKAPE (Oliveira et al., 2020; Vincent et al., 2009), dont *A. baumannii*.

3.4.1. Multirésistance aux antibiotiques

Dans les années 1970, certains s'inquiètent déjà de la problématique de l'antibiorésistance rencontrées avec cette bactérie (Denis and Bearez, 1972). Les premiers rapports sur le caractère résistant sont cependant souvent contradictoires, en partie du fait de la difficulté de l'identification des espèces du

genre *Acinetobacter* dont les espèces retrouvées en dehors des environnements cliniques sont majoritairement susceptibles aux antibiotiques.

A partir des années 1990, la problématique de l'antibiorésistance devient un sujet central dans le domaine de la santé publique, et les rapports d'isolats cliniques MDR d'*A. baumannii* deviennent de plus en plus inquiétants (Lyytikäinen et al., 1995; Peleg et al., 2008; Towner, 2009). Aujourd'hui, la multirésistance aux antibiotiques est une caractéristique particulièrement répandue chez ces isolats cliniques et semble tout autant toucher les isolats cliniques issus des milieux vétérinaires (Endimiani et al., 2011; Taj et al., 2020; Zordan et al., 2011). Ce phénotype de MDR est retrouvé dans le monde entier, et participe notamment à l'émergence de souches pan-résistantes, c'est-à-dire résistantes à la totalité des antibiotiques pouvant être utilisés en traitement de l'infection (Chan et al., 2007; Goic-Barisic et al., 2017).

En 2014, une étude réalisée chez des isolats cliniques d'*A. baumannii* fournis par le département américain de la défense et issus de patients de plusieurs centres hospitaliers militaires, a démontré que 80% des isolats se sont révélés être MDR, portant un total de 52 déterminants de résistance ou de familles de gènes uniques, connus pour conférer une résistance par exemples aux β -lactames (*bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-58}), aminosides (*aphA1*, *aacC1*, *armA*), macrolides (*msrA*, *msrB*), tétracycline (*tet(A)*, *tet(B)*), phénicolés (*cmiA4*, *catA1*, *cat4*), amines quaternaires (*qacE*, *qacE Δ 1*) ou encore sulfonamides (*sul1*, *sul2*) (Taitt et al., 2014). Plus inquiétant encore, parmi ces isolats déjà porteurs de nombreuses résistances, 40% d'entre eux présentaient également une résistance aux carbapénèmes, une classe d'antibiotiques de la famille des β -lactames utilisés dans le traitement des infections causées par des bactéries MDR.

3.4.2. Résistance aux carbapénèmes

En 2018, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), publie une liste des bactéries pathogènes à priorité critique incluant *A. baumannii* résistante aux carbapénèmes (CRAB pour *Carbapenem Resistant Acinetobacter baumannii* en anglais), *P. aeruginosa* résistante aux carbapénèmes et les entérobactéries résistantes aux carbapénèmes et aux céphalosporines de troisième génération (Tacconelli et al., 2018; WHO, 2017). Mais si la situation semble en effet empirer ces dernières années, l'apparition de résistances aux carbapénèmes n'est pas totalement nouvelle, en particulier chez *A. baumannii*. Dès les années 1980-1990, les études en milieux cliniques font en effet déjà état d'isolats résistants à l'imipénème, un antibiotique de la classe des carbapénèmes alors couramment utilisé dans le traitement des infections à *A. baumannii* (Godineau-Gauthey et al., 1988; Lyytikäinen et al., 1995). Ainsi pendant une période d'épidémie dans un hôpital en France, sur deux souches potentiellement épidémiques d'*A. baumannii* isolées de patients en unité de soins intensifs, l'une d'elle montrait une résistance accrue à l'imipénème et à tous les aminoglycosides et avaient provoqué la majeure partie

des cas lors de l'épidémie (Tankovic et al., 1994). L'apparition de ces résistances semble donc être concomitante au début de l'utilisation des carbapénèmes en antibiothérapie. Mais c'est dans les 10 dernières années que la situation est devenue particulièrement préoccupante avec de plus en plus d'isolats cliniques CRAB isolés sur tous les continents, en particulier en Amérique du Nord et dans certains pays d'Asie (Hamidian and Nigro, 2019).

La résistance aux carbapénèmes provient de l'acquisition d'un gène codant principalement une β -lactamase à spectre restreint de classe D, ou CHDL (*Carbapenem-Hydrolizing class D β -lactamase* en anglais)(Poirel and Nordmann, 2006). Il existe de nombreuses β -lactamases chez *A. baumannii* : des β -lactamases de Classe A (β -lactamases à spectre étendu ou ESBL), classe B (métallo- β -lactamases ou MBL), classe C (*Acinetobacter-derived-cephalosporinase* ou ADC) et classe D (CHDL). Les carbapénémases CHDL, appelées également oxacillinases d'*A. baumannii* appartiennent à trois groupes représentés par les oxacillinases OXA-23, OXA-24 et OXA-58 (Poirel et al., 2005). Les *A. baumannii* possèdent également une oxacillinase intrinsèque OXA-51 hydrolysant les carbapénèmes (Héritier et al., 2005), mais dont l'expression varie fortement, ce qui peut jouer un rôle dans la réduction de la sensibilité de la bactéries aux carbapénèmes, plutôt qu'un réel niveau de résistance cliniquement pertinent (Evans et al., 2008; Figueiredo et al., 2012; Merkier and Centrón, 2006). Le gène *bla*_{OXA-23} fût le premier gène codant une oxacillinase à être identifié et est aujourd'hui retrouvé de façon majoritaire dans les isolats cliniques CRAB (Hamidian and Nigro, 2019). Il fût caractérisé comme originaire d'*Acinetobacter radioresistens*, une espèce chez qui ce gène semble ubiquitaire (Paton et al., 1993). Cependant, la présence du gène en lui-même ne suffit pas à conférer un phénotype de résistance, et un contexte génétique spécifique est alors essentiel pour permettre à la bactérie d'exprimer la résistance aux carbapénèmes. Généralement, ce contexte génétique est un transposon composite dont l'IS située en amont du gène *bla*_{OXA-23} fournit une région promotrice permettant la surexpression du gène (Corvec et al., 2007; Figueiredo et al., 2009; Segal et al., 2007). Cinq transposons différents ont aujourd'hui été caractérisés comme porteurs du gène *bla*_{OXA-23} (Nigro and Hall, 2016), et dans quatre d'entre eux, les transposons Tn2006 (Corvec et al., 2007), Tn2008 (Adams-Haduch et al., 2008), Tn2008B (Nigro and Hall, 2015; Wang et al., 2011) et Tn2009 (Zhou et al., 2011), on retrouve au moins une IS*Aba1* située directement en amont du codon d'initiation du gène *bla*_{OXA-23}, (**figure 14**). Dans le cinquième transposon, le Tn2007, le gène *bla*_{OXA-23} est précédé par une IS*Aba4* (Corvec et al., 2007) (**figure 14**). Bien que toutes ces structures contenant le gène *bla*_{OXA-23} aient été appelées transposons composites, seuls le Tn2006 et le Tn2009 possèdent deux copies d'IS*Aba1* flanquant un segment interne contenant le gène *bla*_{OXA-23} (**figure 14**).

A l'origine, le transposon Tn2006 fût le premier transposon porteur du gène *bla*_{OXA-23} à être décrit et fût identifié sur un plasmide (Corvec et al., 2007). Il est composé de deux copies inversement orientées de l'IS*Aba1* qui flanquent un segment interne de 2445 bp contenant le gène *bla*_{OXA-23}, une ATPase

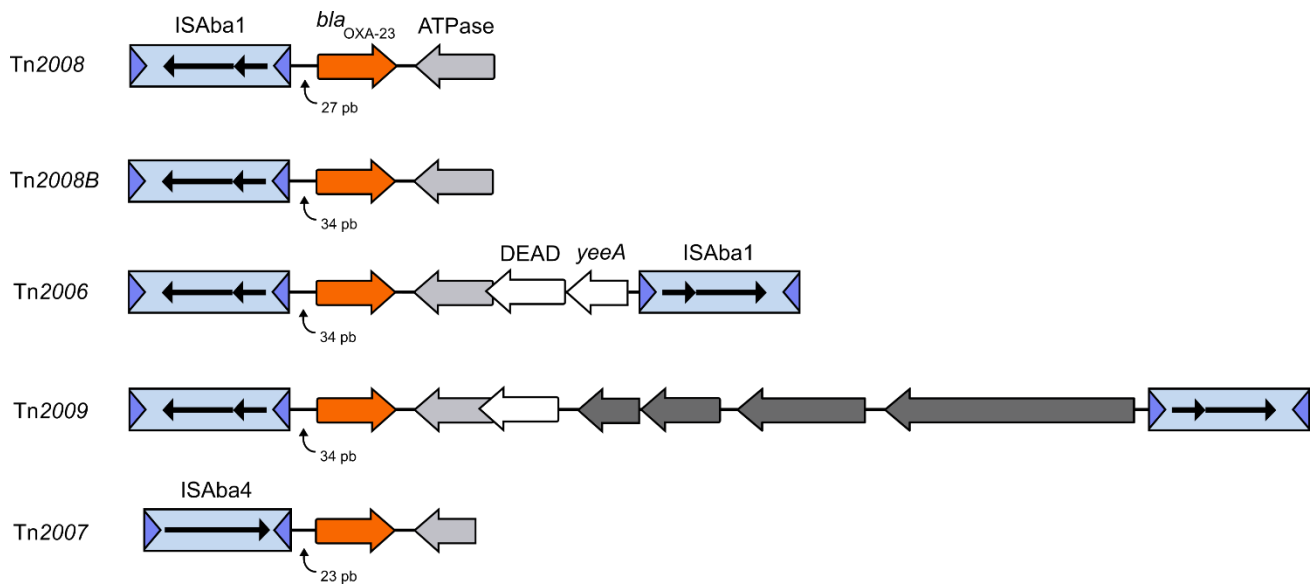


Figure 14 : Structures connues portant le gène *bla*_{OXA-23} chez les bactéries *Acinetobacter*.

Le gène *bla*_{OXA-23} est représenté par une flèche orange ; Le gène codant l'ATPase est représenté par une flèche gris clair ; l'hélicase DEAD et le gène *yeeA* codant une méthylase de l'ADN sont représentés par les flèches blanches. Les gènes spécifiques du transposon Tn2009 sont représentés par des flèches gris foncé. L'*ISAbal* est représenté par l'encadré bleu clair contenant deux flèches noires et l'*ISAbal* est représentée par l'encadré bleu clair contenant une flèche noire. La distance entre l'IS et du codon de départ du gène *bla*_{OXA-23} est indiqué par la flèche courbe et la valeur en paires de bases (bp). Adapté de Nigro et Hall (2016) et Mugnier et al (2010).

tronquée, une hélicase de la famille des protéines DEAD et le gène *yeeA* codant une méthylase de l'ADN putative (**figure 14**). Aujourd'hui, ce transposon est le contexte génétique prédominant dans lequel est retrouvé le gène *bla_{OXA-23}* et est également retrouvé dans de nombreuses localisations différentes dans le chromosome, en particulier dans des îlots de résistance chez *A. baumannii* (Nigro and Hall, 2016).

4. Les îlots de résistance chez *A. baumannii*

La présence d'un îlot de résistance est une caractéristique majeure des isolats cliniques MDR de la bactérie *A. baumannii*, un pathogène nosocomial de l'homme et de l'animal extrêmement redouté en milieu hospitalier (Bi et al., 2019; Ramírez et al., 2013). De structure complexe, ces îlots de résistances peuvent mesurer entre 8 et 86 Kpb et contenir de nombreux gènes de résistance aux antibiotiques (Bi et al., 2019). Bien que leur présence dans les souches cliniques remonte aux années 1970 (Hamidian and Hall, 2018), l'émergence récente d'un nouveau type d'îlot de résistance conférant la résistance aux carbapénèmes, des antibiotiques utilisés dans le traitement des infections causées par des bactéries MDR, est aujourd'hui particulièrement inquiétante. En effet, lorsqu'elles sont associées à des infections acquises en milieu hospitalier, les souches d'*A. baumannii* résistantes à cette classe d'antibiotique sont difficiles à traiter et associées à une mortalité élevée. Elles ont alors été récemment classées par l'Organisation Mondiale de la Santé dans la liste de pathogènes prioritaires en termes de surveillance et de développement de traitements (Tacconelli et al., 2018).

4.1. Classification des îlots de résistance chez *Acinetobacter baumannii*

Les MGEs porteurs de gènes de résistance aux antibiotiques les plus connus chez les isolats d'*A. baumannii* sont probablement les îlots de résistances AbaR (pour *Acinetobacter baumannii* Resistance en anglais). Mais il existe en réalité différents types d'îlots de résistance chez *A. baumannii*, faisant partis d'une grande famille de transposons ciblant pour la grande majorité le locus du gène *comM*, mais qui semblent néanmoins avoir suivis différentes histoires évolutives. Ces différents types d'îlots de résistance se distinguent par le transposon formant le squelette de l'îlot et par leur composition en gènes de résistance.

On distingue principalement deux grands types d'îlots de résistance chromosomiques chez *A. baumannii* : les îlots de type AbaRs, retrouvés chez les isolats du groupe GC1 (Holt et al., 2016) (tableau 1), et les îlots de type AbGRI (*A. baumannii* Genomic Resistance Island), retrouvés chez les isolats du groupe GC2 (Nigro et al., 2013). Il existe également un troisième type d'îlot de résistance, appelé

Nom	Taille (pb)	Souche	Source	Année	Cassettes de gènes	Autres gènes de résistance aux antibiotiques	Référence
AbaR0	63,636	WM98	Australie	1998	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), <i>catA1</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>aphA1b</i>	(Hamidian et al., 2014b)
AbaR1	86,244	AYE	France	2001	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i> <i>dfrA1-orfC</i> <i>veb1-aadB-arr2-</i> <i>cmlA5-oxa10-aadA1</i>	<i>strA</i> , <i>strB</i> <i>cmlA9</i> , <i>tetA</i> (G), <i>aacA</i> , <i>dfrA10</i> , <i>tetA</i> (A), <i>catA1</i> , <i>aphA1b</i> , <i>sul1</i>	(Fournier et al., 2006)
AbaR2	16,283	ACICU ^a	Italie	2005	<i>aacA4-orfO-oxa20</i>	<i>sul1</i> , Δ <i>aphA1b</i>	(Iacono et al., 2008)
AbaR3	62,989	AB0057	EUA	2004	<i>aacC1</i> -P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), <i>catA1</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>aphA1b</i>	(Adams et al., 2008)
AbaR4 ^b	16,812	AB0057	EUA	2004		<i>bla_{OXa-23}</i>	(Adams et al., 2008)
AbaR5	56,311	3208	Australie	1997	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), <i>aphA1b</i>	(Post and Hall, 2009)
AbaR6	27,392	D2	Australie	2006	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>aphA1b</i>	(Post et al., 2010)
AbaR7	19,668	A92	Australie	2005	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>aphA1b</i>	(Post et al., 2010)
AbaR8	45,138	D13	Australie	2009	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>aphA1b</i>	(Post et al., 2012)
AbaR9	39,268	AB056	EUA	2004	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i>	(Adams et al., 2010)
AbaR10	31,130	AB058	EUA	2003		<i>sul1</i>	(Adams et al., 2010)
AbaR11 ^c	19,713	AB5075	EUA	2008			(Gallagher et al., 2015)
AbaR12	38,181	LUH6013	Italie	1997	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>aphA1b</i>	(Krizova et al., 2011)
AbaR13	44,866	LUH6015	Italie	1998	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>aphA1b</i>	(Krizova et al., 2011)
AbaR14	20,779	LUH5881	Espagne	1998	<i>aacA4</i>	<i>sul1</i> , <i>aphA1b</i>	(Krizova et al., 2011)
AbaR15	55,471	LUH6125	Pologne	1998	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), <i>catA1</i>	(Krizova et al., 2011)
AbaR16	40,964	LUH7140	RU	2000	<i>aacC1</i> -P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>aphA1b</i>	(Krizova et al., 2011)
AbaR17	57,552	LUH8592	Bulgarie	2001	<i>aacC1</i> -P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), <i>catA1</i> , <i>aphA1b</i>	(Krizova et al., 2011)
AbaR18	52,297	NIPH2713	Rép. Tchèque	2005	<i>aacC1</i> -P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), Δ <i>catA1</i> , <i>aphA1b</i>	(Krizova et al., 2011)
AbaR19	32,084	NIPH2554	Rép. Tchèque	2005	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i>	(Krizova et al., 2011)
AbaR20		NIPH2665					
AbaR21	61,276	A297	Pays-bas	1984	<i>dfrA5</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), <i>catA1</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>aphA1b</i>	(Nigro et al., 2011)
AbaR22							
AbaR23	50,816	D81	Australie	2010	<i>aacC1</i> -P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), <i>catA1</i>	(Holt et al., 2016)
AbaR24	52,760	A1	RU	1982	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), <i>catA1</i>	(Holt et al., 2016)
AbaR25							
AbaR26	18,661	D30	Australie	2008	<i>aacC1</i> -P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>aphA1b</i>	(Holt et al., 2016)
AbaR27	48,346	A424	Croatie		Δ <i>aacC1</i> -P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), Δ <i>catA</i>	(Kochar et al., 2012)
AbaR28	18,553	MRSN 56	EUA	2010	<i>aacC1</i> -P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>aphA1b</i>	(McGann et al., 2014)
AbaR29	55,483	Canada-BC5	Canada	2007	<i>aacC1</i> -P-P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), <i>catA1</i>	(Holt et al., 2016)
AbaR30	63,177	A388	Grèce	2002	<i>aacA4-aacC1</i> -P-Q- <i>aadA1</i>	<i>sul1</i> , <i>tetA</i> (A), <i>catA1</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>aphA1b</i>	

Tableau 1 : Ilots de résistance AbaR chez les isolats *A. baumannii* du GC1.

^aLa souche ACICU portant l'AbaR2 est un isolat du groupe GC2. ^bL'AbaR4 est indiqué dans le tableau bien qu'il ne soit pas classé comme un ilot de type AbaR. ^cL'AbaR11 ne porte pas de région de résistance MARR et est considéré à part des autres AbaRs. Une case laissée vide signifie que les informations ne sont pas suffisantes pour être indiquées avec certitude. La taille des ilots est indiquée en paires de bases (pb). EUA : Etats-Unis d'Amérique ; RU : Royaume-Uni. Adapté de Hamidian et Hall (2018).

AbaR4 pour des raisons historiques, retrouvé à la fois chez les isolats du GC1 et du GC2. La structure complexe de ces ilots de résistance est formée par l'accrétion de plusieurs transposons, d'IS et/ou d'intégrons dont les remaniements génétiques, allant de la simple insertion de transposon à la délétion de parties entières, complexifie d'autant plus leur caractérisation.

4.2. Ilots de résistances du groupe GC1

4.2.1. Distribution des ilots AbaRs dans les lignages 1 et 2

Le premier AbaR, et encore à ce jour le plus grand, fut décrit chez un isolat MDR appartenant au groupe des GC1, la souche *A. baumannii* AYE (Fournier et al., 2006). Cet AbaR contient plus de 45 potentiels gènes de résistances aux antibiotiques, dont des gènes connus pour conférer un phénotype de résistance, en plus d'opérons de résistances à des métaux lourds. Plus tard, d'autres AbaRs de plus petite taille ont été décrit, toujours chez des isolats appartenant au GC1 (Adams et al., 2010; Adams-Haduch et al., 2008; Post and Hall, 2009; Post et al., 2010). La grande variabilité des ilots AbaRs, tant dans leur taille que dans leur composition en gènes de résistance et en transposons, témoigne de nombreux événements de réarrangement génétiques ainsi que de la perte ou le gain de gènes au sein de ces ilots (**tableau 1**). Ainsi, partageant à la fois une structure commune et probablement un moyen de mouvement identique, mais également de nombreuses différences, ces variants possèdent chacun leur propre histoire évolutive.

La grande majorité des isolats du GC1 présentent un ilot de résistance de type AbaR inséré dans le gène *comM*. Le lignage 1 du groupe GC1 regroupe les isolats ayant tous l'insertion d'un ilot AbaR dérivant d'un ancêtre commun présentant l'insertion d'un ilot ancestral AbaR0, dont le squelette est formé du transposon Tn6019 inséré dans le locus *comM* (**figure 15**) (Hamidian and Hall, 2018; Holt et al., 2016). La majorité des isolats de ce lignage ne possèdent généralement qu'un seul ilot de résistance de type AbaR, mais certains peuvent occasionnellement présenter un second transposon différent et dont la localisation génétique varie (Holt et al., 2016).

Les isolats du lignage 2 du GC2 possèdent soit le gène *comM* intact, soit portent un ilot dont le squelette est formé du transposon Tn6022 qui ne contient pas de gène de résistance (Holt et al., 2016). Une exception est la souche D36 qui porte un ilot AbaR4 inséré dans le gène *comM*.

4.2.2. Le squelette des ilots de résistance AbaRs

Le transposon Tn6019 forme le squelette de tous les ilots de type AbaR du lignage 1 du GC1 (à l'exception de l'AbaR4), y compris l'AbaR0. Ce transposon de 16,332 Kbp est délimité par deux IRs de 26 pb et est composé principalement d'un ensemble de gènes de transposition, d'un opéron de résistance à l'arsenate et l'arsenite (*arsHBRC*), du gène *uspA* codant une protéine de stress universelle

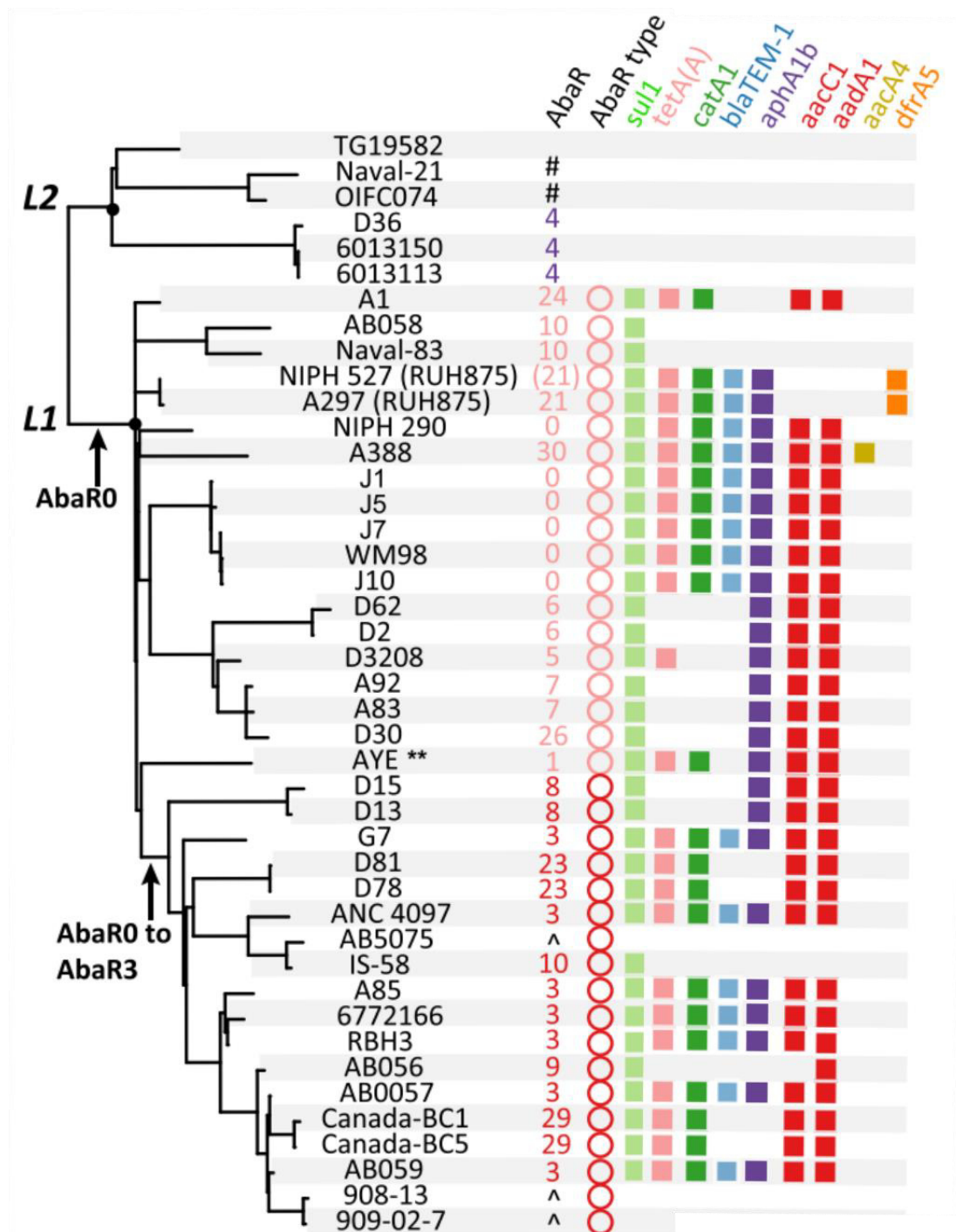


Figure 15 : Arbre phylogénétique et distribution des gènes de résistance aux antibiotiques chez 43 isolats cliniques d'*A. baumannii* du groupe GCI.

L1 et L2 indiquent respectivement les lignages 1 et 2. Les carrés de couleurs indiquent la présence d'un gène de résistance. Dans la colonne AbaR type, un cercle rose indique un AbaR dérivé de l'AbaR0 et un cercle rouge indique un AbaR dérivé d'un AbaR3. Issu de Hamidian et Hall (2018).

et d'un gène putatif de perméase au sulfate, *sup* (**figure 16**) (Fournier et al., 2006). Sous cette forme, le Tn6019 ne porte pas de résistance aux antibiotiques. Le Tn6019 fait partie d'une large famille de transposons comprenant deux groupes apparentés aux transposons Tn7 et Tn402/Tn5053 (Hamidian and Hall, 2018). Les transposons de cette famille présentent la caractéristique de cibler un site spécifique lors de la transposition (Waddell and Craig, 1989). Les cinq gènes qui forment le module de transposition (*tniCABDE*) codent des protéines apparentées à celles du transposon Tn402/Tn5053 (Hamidian and Hall, 2011). Les gènes *tniA* et *tniB* codent respectivement la transposase TniA et la protéine accessoire TniB impliquée dans le mécanisme de transposition tandis que les gènes *tniD* et *tniE* codent potentiellement les protéines impliquées dans le ciblage du site spécifique de transposition. Le gène *tniC* code une protéine contenant des domaines proches de ceux retrouvés dans la protéine TnsA du transposon Tn7, indiquant une potentielle activité d'endonucléase. Ainsi le transposon Tn6019 est suspecté d'utiliser un mécanisme de transposition de type coupé-collé comme le Tn7 (Hamidian and Hall, 2018).

Dans l'AbaR0, et tous les variants AbaRs qui en découlent, le gène *uspA* du Tn6019 est interrompu par un autre transposon composite, la présence d'un Tn6019 non-interrompu n'ayant jamais été décrite. Ce transposon composite est formé de deux copies orientées d'un transposon Tn6018 de résistance au cadmium et au zinc (précédemment appelé ISPpu12 (Fournier et al., 2006; Post et al., 2010)), délimitant une large région de résistance, la MARR (pour *Multiple Antibiotic Resistance Region*). Cette région de résistance MARR contient de nombreux gènes de résistance eux-mêmes associés à des MGEs de type transposons ou intégrons (Adams et al., 2008; Post et al., 2010).

D'autres événements de remaniements génétiques, en particulier des événements de recombinaison, sont également la source de délétions, parfois de régions entières, à l'image de l'AbaR de la souche AB5075 dans lequel un événement de recombinaison entre les deux copies du Tn6018, formant alors la structure Tn6019::Tn6018, est probablement la source de la perte de la totalité de la MARR (**figure 16**) (Gallagher et al., 2015; Holt et al., 2016).

4.2.3. La région de résistances multiples aux antibiotiques (MARR)

La présence d'un îlot AbaR est fortement associée au phénotype de multirésistance aux antibiotiques observés chez de nombreux isolats cliniques d'*A. baumannii* (Ramírez et al., 2013). Les transposons Tn6019 et Tn6018 ne portant pas de gènes de résistance aux antibiotiques, cette résistance est directement en lien avec la présence de la MARR dans les AbaRs. Sa variabilité en composition en gènes influe fortement sur le phénotype de résistance des isolats et est la conséquence d'importants remaniements génétiques dans cette région, principalement des insertions ou des délétions de transposons ou intégrons. Ainsi, il est difficile de décrire une structure type pour la MARR des îlots AbaR du fait de cette variabilité. Certains éléments sont retrouvés de façon presque ubiquitaire dans différents

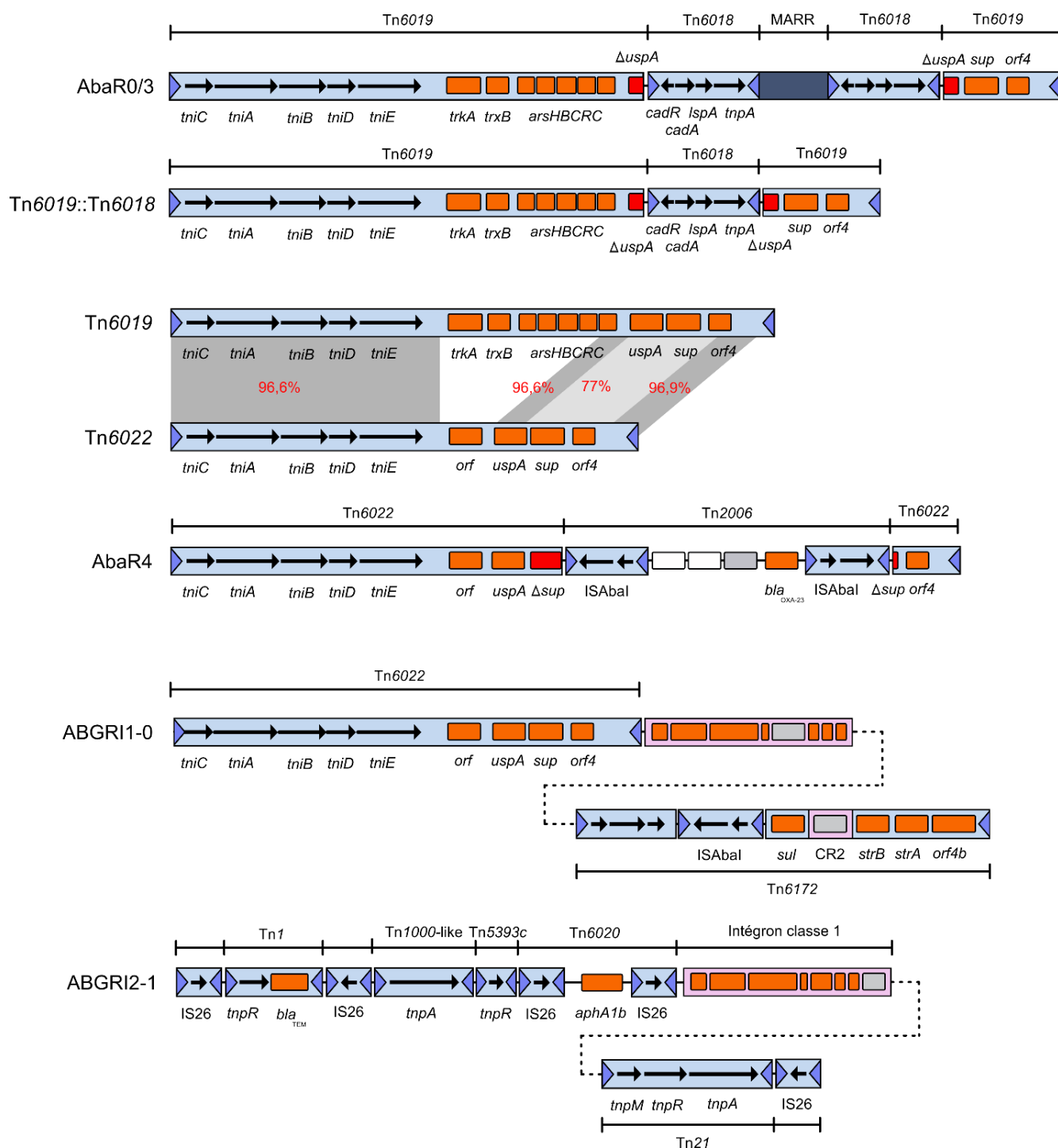


Figure 16 : Structure des îlots de résistance retrouvés chez les isolats cliniques *A. baumannii*.

Les séquences d'insertion (IS) et les transposons (Tn) sont représentés par les encadrés bleu clair contenant, un ou plusieurs gènes de transposase et/ou de régulateur (flèches noires) et des séquences terminales en répétition inversée (triangles bleu foncé). Les gènes accessoires sont représentés par des rectangles orange. La présence d'un autre élément génétique mobile est représenté par un cadre rose contenant des gènes codant les protéines impliquées dans la formation ou la mobilité de l'élément. Lorsqu'ils sont interrompus, les gènes *uspA* et *sup* sont indiqués en rouge. Les pourcentages en rouge indiquent le taux d'identité nucléotidiques entre les séquences des transposons Tn6019 et Tn6022. Adapté de Hamidian et Hall (2017,2018) et Nigro et al. (2013).

ilots, à l'image de l'intégron de classe 1 de la MARR des ilots dérivant de l'AbaR0 (Post and Hall, 2009; Post et al., 2010). Cependant, de nombreux remaniements se produisent également dans ces éléments. Par exemple, une délétion de 108 pb au niveau du gène *intI1* de l'intégron de classe 1 de l'AbaR0 a ensuite donné le variant AbaR3 et ses dérivés formant un sous-lignage à l'intérieur du lignage 1 (**figure 16**) (Hamidian and Hall, 2018). Cette délétion a probablement pour origine l'action d'une séquence d'insertion IS26 ayant retiré une partie de l'ADN qui se trouvait à côté.

Les MARR des ilots AbaR0 et AbaR3 sont les plus complètes en termes de gènes de résistances. Les variants des AbaR0 et AbaR3 dérivent tous de cette structure complète et sont souvent caractérisés par la perte ou le gain d'un élément caractérisant la grande variabilité des AbaRs tant en termes de compositions en gènes de résistance qu'en taille. On retrouve dans ces MARR deux gènes de résistance aux sulfonamides (*sul1*) entre lesquels sont insérés d'autres gènes de résistance aux antibiotiques. Les gènes *tetA(A)*-*tetR* du transposon Tn1721 confèrent une résistance à la tétracycline et à la doxycycline, les gènes *aacC1* et *aadA1* de l'intégron de classe 1 confèrent respectivement une résistance à la gentamicine et à la streptomycine, le gène *aphA1b* confère la résistance à la kanamycine et à la néomycine et le gène *bla_{TEM}* contribue à la résistance à l'ampicilline (Fournier et al., 2006). Enfin, le gène *catA1* de résistance au chloramphénicol est redondant, car tous les *A. baumannii* sont intrinsèquement résistants à cet antibiotique. Bien que complètes en termes de gènes de résistances, les MARR des ilots AbaR0 et AbaR3 ne sont pas les plus grandes que l'on ait pu décrire chez *A. baumannii*. En cette matière, l'ilot AbaR1 de la souche AYE fait figure d'exception. La MARR de cet ilot contient des gènes de résistance à l'ampicilline (*bla_{veb1}*, *bla_{OXA-10}*), aux sulfamides (*sul1*), à la streptomycine (*aadA1*, *strA*, *strB*), aux aminosides (*aadB*, *aacC1*, *aphA1b*, *aacA*), au chloramphénicol (*cmIA1*, *cmIA5*, *cmIA9*, *catA1*), au triméthoprim (*dfrA1*, *dfrA10*) et à la tétracycline (*tetA(A)*, *tetA(G)*) (Fournier et al., 2006; Hamidian and Hall, 2018). Seul un petit nombre de ces gènes sont partagés par les autres AbaR séquencés à ce jour. En outre, la MARR de l'ilot AbaR1 d'AYE contient également un second intégron de classe I de structure bien plus complexe que le premier (Levings et al., 2008).

Ces gènes de résistance, portés principalement par les ilots AbaRs (et AbGRI-1) du locus *comM*, confèrent ainsi une résistance à la plupart des antibiotiques utilisés dans la première phase de l'antibiothérapie avec des résistances à des antibiotiques plutôt anciens tels que la tétracycline ou les aminoglycosides. Il semble alors que les gènes de résistance trouvés dans ces AbaRs aient été acquis ensembles à un stade précoce (Hamidian and Hall, 2018). Cette conclusion a été récemment confirmée à l'aide d'une analyse temporelle de la phylogénie des isolats GC1 dont le génome avait été séquencés (Holt et al., 2016). Cette analyse date l'entrée du Transposon AbaR dans le GC1 au milieu des années 1970 et a montré que les premiers isolats réalisés incluent tous un AbaR0 ou bien un variant. Cette même étude démontre que l'AbaR3 est apparu dans les années 1990. Aujourd'hui, bien que ces antibiotiques ne soient plus, voire jamais, utilisés en antibiothérapie, la persistance de ces ilots de résistance chez les isolats cliniques d'*A. baumannii* reste problématique du fait de résistances croisées

ou d'interférence avec des composés dérivant de ces anciens antibiotiques. Il a par exemple été récemment démontré que le gène *aphA1b* de résistance à la kanamycine, un antibiotique non-utilisé à des fins thérapeutiques, pouvait conduire à une résistance à la tobramycine (McGann et al., 2014). De la même manière, le gène *bla_{TEM}* de résistance à l'ampicilline s'est récemment révélé être fortement associé à la résistance au sulbactam, un inhibiteur de β -lactamase bactérienne (Krizova et al., 2011; Yang et al., 2018).

4.3. Le cas particulier de l'îlot de résistance AbaR4

L'îlot AbaR4 fût d'abord identifié chez la souche *A. baumannii* AB0057 appartenant au GC1 et fût classé en tant qu'îlot AbaR (Adams et al., 2008). Néanmoins, une meilleure connaissance des îlots de résistance chez *A. baumannii* fait qu'aujourd'hui cet îlot AbaR4 n'est plus classé parmi les îlots AbaRs, mais comme un îlot de résistance indépendant ayant son histoire évolutive propre. L'îlot AbaR4 possède plusieurs caractéristiques spécifiques, comme le transposon composant son squelette, le contenu en gène de résistance, la localisation dans le génome et la distribution chez les lignées clonales d'isolats cliniques, qui sont différents des îlots AbaRs.

4.3.1. Structure

Le squelette de l'AbaR4 est constitué du transposon Tn6022, un transposon différent mais néanmoins relativement proche du Tn6019 formant les AbaRs (**figure 16**). Le Tn6022 est apparenté au Tn6021 de la souche ATCC 17918, lui-même l'un des premiers transposons apparentés au Tn6019 à avoir été identifié (Hamidian and Hall, 2011; Post and Hall, 2009). Comme le Tn6019, le Tn6022 appartient au même groupe de transposons ciblant un site de transposition spécifique et possède donc les mêmes caractéristiques. On retrouve ainsi les cinq gènes associés à la fonction de transposition (*tniCABDE*) (Hamidian and Hall, 2011), identiques à plus de 96% avec ceux du Tn6019 (**figure 16**) (Hamidian and Hall, 2018). Cependant, à la différence des îlots de type AbaRs, les îlots AbaR4 ne portent pas de gènes de résistance aux métaux lourds et ne possèdent pas de région de résistance MARR. En effet, le Tn6022 ne possède pas d'opéron de résistance à l'arsenate, qui est alors remplacé par une séquence codante de fonction inconnue, et le gène *uspA* n'est pas interrompu par les deux copies du Tn6018 entourant la MARR que l'on retrouve dans les AbaRs. Cependant, l'AbaR4 présente une insertion d'un transposon Tn2006 au niveau du gène *sup* codant la perméase au sulfate dans le Tn6022. Cette insertion d'un Tn2006 dans un Tn6022 est la caractéristique structurale majeure de l'îlot AbaR4 et ce qui le définit actuellement dans la classification des îlots de résistance chez *A. baumannii*.

Le Tn2006 est un transposon pouvant être retrouvé dans différentes localisations, comprenant majoritairement des îlots de résistance ou des plasmides (Nigro and Hall, 2016) et qui fût le premier transposon portant le gène *bla_{OXA-23}* de résistance aux carbapénèmes à être identifié (Corvec et al., 2007). La structure particulière du transposon Tn2006 est essentielle à l'expression d'un phénotype de résistance du fait de la présence de l'*ISAba1* en amont du gène *bla_{OXA-23}* dans le transposon. Bien que le gène *bla_{OXA-23}* puisse être retrouvé en association avec des transposons composites autres que le Tn2006, ceux-ci n'ont jamais été décrits comme présents dans un îlot de résistance chez *A. baumannii*.

4.3.2. Distribution et localisation

L'îlot AbaR4 peut être retrouvé à la fois chez les isolats du groupe GC1 et chez les isolats du groupe GC2, dans lesquels on le trouve principalement inséré dans de plus grandes structures appelés îlots AbGRI (voir chapitre suivant). A la différence des îlots AbaRs également, il peut être localisé dans différents endroits du chromosome, y compris majoritairement dans le locus du gène *comM* (Hamidian and Hall, 2011; Holt et al., 2016), mais également dans le locus du gène *pho*, un gène codant une phosphatase putative, et plus rarement dans d'autres localisations (Bi et al., 2019). De façon intéressante, cet îlot AbaR4 a aussi également été retrouvé sur un plasmide conjugatif, témoignant de son caractère mobile (Hamidian et al., 2014a). Il fût également montré que, malgré une représentation encore faible au niveau globale, la présence simultanée d'un îlot de type AbaR dans le gène *comM* et un îlot AbaR4 dans le gène *pho*, comme c'est le cas chez la souche *A. baumannii* AB0057, était fortement répandue en Angleterre (Turton et al., 2011) et posait le problème d'une combinaison des multiples résistances des AbaRs, à la résistance aux carbapénèmes de l'AbaR4. En outre, des îlots AbaR4 ont également pu être retrouvés dans des isolats cliniques d'autres espèces du groupe *A. baumannii* comme par exemple chez l'espèce *A. nosocomialis* (Kim et al., 2012).

4.4. Autres îlots de résistance (groupe GC2)

Chez les isolats du groupe GC2 (à l'exception de la souche ACICU), les îlots de résistance sont différents des îlots AbaRs trouvés chez les isolats du groupe GC1 (Post et al., 2010; Šeputienė et al., 2012). Ils sont appelés îlots AbGRI afin de les distinguer des îlots AbaRs. Parmi les îlots AbGRI, on retrouve les îlots AbGRI-1, insérés dans le gène *comM*, et les îlots AbGRI-2 pouvant être trouvés à la fois dans le gène *comM* et à différents endroits du chromosome (Nigro and Hall, 2012; Nigro et al., 2013). Ces deux types d'îlots peuvent être présents simultanément dans le chromosome des isolats du groupe GC2 et présentent une structure complexe (**figure 16**).

Le squelette des ilots AbGRI-1 est constitué d'un transposon *Tn6172*, apparenté au transposon *Tn6021* de la souche ATCC 17978 et d'un transposon *Tn6022* tel que retrouvé dans certains isolats du lignage 2 du GC1 (Post et al., 2010). Les ilots AbGRI-2 ont une structure extrêmement variable, résultant de l'accrétion de multiples IS et de transposons, et est apparentée à la région de résistance MARR retrouvées dans les ilots AbaRs (Blackwell et al., 2016). Chez certains isolats du GC2, la présence d'un transposon *Tn6022* contenant un *Tn2006* forme alors un AbaR4 inséré au sein d'une plus grande structure complexe (Saule et al., 2013). La souche ACICU fait figure d'exception, du fait qu'il s'agit d'un isolat du groupe GC2 portant un ilot de type AbaR retrouvé uniquement dans les isolats du groupe GC1 (Iacono et al., 2008). Cet ilot, appelé AbaR2 ne possède qu'un seul *Tn6018*, probablement du fait d'un événement de délétion provoquant la perte d'un fragment important de l'ilot (Adams et al., 2008).

On retrouve également ce type de gènes de résistance dans les ilots de résistance des isolats du groupe GC2. Dans les ilots de résistance AbGRI-1, le transposon *Tn6172* contient le gène de résistance aux sulfonamides *sul2* et les gènes de résistance à la streptomycine *strA* et *strB* et peut, chez certains variants, contenir des gènes de résistance à la tétracycline. Les ilots AbGRI-2 portent généralement le gène de résistance aux β -lactames *bla_{TEM}*, le gène de résistance aux sulfonamides *sul1*, et des gènes de résistances aux aminosides (*aadA1*, *aacC1*, *aphA1b*) (Nigro et al., 2013).

Résultats

Développement d'outils pour l'étude de la transformation naturelle chez les isolats cliniques MDR d'*A. baumannii*

1. Détection des événements de transformation naturelle chez *A. baumannii* par cytométrie en flux.

1.1. Contexte :

Au début de ce projet de thèse, il n'existait que peu de données expérimentales sur la transformation naturelle chez *A. baumannii*. Les connaissances se basent alors principalement sur le modèle *A. baylyi* ADP1, une souche présentant une capacité exceptionnelle à réaliser la transformation naturelle. Cependant, contrairement à *A. baumannii*, *A. baylyi* est retrouvée principalement dans les environnements naturels, n'est pas pathogène pour l'Homme et est susceptible à de nombreux antibiotiques. Ainsi, les deux espèces sont à la fois phylogénétiquement éloignées et appartiennent à des niches écologiques très différentes.

En 2013, les travaux de C. Harding et G. Wilharm démontrent que la souche *A. nosocomialis* M2 et d'autres isolats cliniques d'*A. baumannii* sont compétents pour la transformation naturelle (Harding et al., 2013; Wilharm et al., 2013). Toutefois, leurs méthodes expérimentales sont totalement différentes. De son côté, Harding réalise une première incubation des bactéries avec de l'ADN transformant pendant 2 heures dans un milieu riche liquide. Puis il réalise une seconde incubation, cette fois sur milieu riche solide, pendant 4 heures avant d'étaler les bactéries sur un milieu de sélection. Il obtient alors des fréquences de transformation naturelle comprises entre 10^{-7} et 10^{-6} (Harding et al., 2013). En revanche, G. Wilharm et ses collègues utilisent une méthode particulière basée sur l'hypothèse qu'*A. baumannii* importe de l'ADN exogène lorsqu'elle réalise une forme de mouvement de surface sur un milieu spécifique. Leur réflexion se fonde sur le fait que le T4P est un élément qui contribue à la mobilité des bactéries, et qui est également essentiel à l'importation d'ADN exogène chez de nombreuses espèces transformables (Averhoff and Friedrich, 2003; Claverys and Martin, 2003). Chez *N. gonorrhoeae* en particulier, le T4P est impliqué dans les deux processus à la fois (Wolfgang et al., 1998). Pour tester cette hypothèse, G. Wilharm et ses collègues utilisent alors un milieu spécifique semi-solide afin de réaliser leurs expériences de transformation naturelle, sur lequel la bactérie développe une mobilité de

surface. Cette méthode leur permet alors d'obtenir des fréquences de transformation naturelle comprises entre 10^{-8} à 10^{-3} (Wilharm et al., 2013). Il leur est par ailleurs impossible d'obtenir des transformants en utilisant des cellules planctoniques, comme c'est le cas chez *A. baylyi* ADP1.

1.2. Objectifs :

En se fondant sur ces nouvelles découvertes, notre objectif a été de développer des outils d'étude de la transformation naturelle chez *A. baumannii*, d'en améliorer les conditions expérimentales et enfin d'évaluer la capacité de transformation naturelle chez cette bactérie.

La méthode expérimentale classique de détection des événements de transformation naturelle implique l'utilisation d'un gène servant de marqueur de sélection des bactéries ayant réalisé la transformation naturelle (les transformants). Classiquement ce gène est un gène de résistance à un antibiotique et est présent soit dans le chromosome, soit sur un plasmide chez une souche donneuse de laquelle est extrait l'ADN substrat pour la transformation naturelle. La souche receveuse à l'inverse ne doit pas présenter le phénotype de résistance associé au marqueur de sélection. Les transformants, les bactéries receveuses ayant acquis un nouveau phénotype de résistance, vont alors pouvoir être sélectionnés grâce à l'acquisition du marqueur. Cependant l'utilisation de gènes de résistance aux antibiotiques en tant que marqueurs de sélection chez *A. baumannii* est rendue difficile par le phénotype de MDR et il est donc souvent nécessaire de connaître le profil de résistance et de susceptibilité aux antibiotiques des souches testées. Or ceci est à la fois fastidieux et compliqué lorsque l'on souhaite faire la détection de ces événements de transformation naturelle à grande échelle, par exemple pour des collections contenant plusieurs dizaines, voire des centaines d'isolats.

Ainsi, nous avons d'abord développé une méthode alternative de détection des événements de transformation naturelle, sans utiliser de gènes de résistance aux antibiotiques comme marqueur de sélection, afin de pouvoir ensuite l'utiliser pour évaluer la capacité de compétence pour la transformation naturelle d'une collection d'isolats cliniques d'origine vétérinaire.

Le travail effectué est présenté à la fin de ce chapitre sous la forme d'un article scientifique publié dans *Journal of Bacteriology* en 2018.

1.3. Résultats principaux et discussion :

Ces travaux nous ont permis de proposer une méthode alternative de la détection d'événements de transformation naturelle dans laquelle le marqueur de résistance aux antibiotiques est remplacé par un marqueur fluorescent basé sur la protéine fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*). L'analyse par cytométrie en flux des échantillons testés permet ensuite de détecter les événements d'acquisition du

marqueur fluorescent par transformation naturelle, avec une précision équivalente à la méthode classique utilisant les marqueurs de résistance aux antibiotiques. Cette méthode alternative est cependant limitée par un seuil de détection plus faible, fixé à une fréquence de 10^{-6} pour une analyse d'une durée acceptable (environ 1 heure). Pour accroître la possibilité de détecter des événements de transfert chez des souches possédant une capacité faible de transformation naturelle, nous avons donc également travaillé à améliorer les conditions expérimentales de transformation afin d'obtenir les fréquences les plus hautes possibles. Différents paramètres expérimentaux ont été testés dont le pH, la teneur en agarose du milieu de transformation, l'addition d'ions divalents ou encore la forme de l'ADN substrat.

De façon intéressante, les fréquences de transformation obtenues augmentaient avec la teneur en agarose, suggérant différentes possibilités telles que : (i) un possible rôle de cet élément dans l'induction de la compétence, à l'image de l'induction de la compétence chez *V. cholerae* par la chitine (Meibom et al., 2005), (ii) la perception mécano-chimique de la rétraction du T4P afin de stimuler la compétence, (iii) ou encore l'importance de certains paramètres physiques permettant d'améliorer l'interaction entre bactérie et ADN substrat. Les éléments de régulation de la compétence n'étant pas connus chez *A. baumannii*, ces résultats ouvrent ainsi la porte à différentes hypothèses pouvant contribuer à mieux comprendre l'induction de la compétence chez cette bactérie.

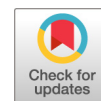
A la suite de ces résultats, la méthode de détection des événements de transformation naturelle par cytométrie en flux a ensuite été utilisée dans ces conditions expérimentales optimisées, afin d'évaluer la capacité de deux collections d'isolats d'*A. baumannii*. La première collection comprend des isolats cliniques MDR d'origine vétérinaire (chien, chats, furet, etc.), obtenus grâce au réseau RESAPATH (réseau d'épidémiosurveillance de l'antibiorésistance des bactéries pathogènes animales) de l'ANSES (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), et la seconde comprend des isolats d'origine non-clinique issus de différents élevages (poulets, canards, oies, etc.) (Wilharm et al., 2013). Nous avons alors pu déterminer que 50% des isolats cliniques de la première collection (6 sur 12) et 66% des souches non-cliniques de la seconde collection (6 sur 9) étaient naturellement transformables. En outre, parmi les souches ou isolats transformables, les niveaux de transformation étaient compris entre 10^{-2} et jusqu'à la limite de détection (10^{-6}). La variabilité observée dans les fréquences de transformation naturelle est équivalente à celle ayant pu être mise en évidence par G. Wilharm et ses collègues chez des isolats cliniques d'origine humaine (Wilharm et al., 2013), ou chez d'autres espèces bactériennes telles que *S. pneumoniae* ou *Haemophilus influenzae* (Evans and Rozen, 2013; Maughan and Redfield, 2009). Il n'est cependant pas à exclure que les conditions expérimentales particulières utilisées pour détecter les événements de transformation naturelle ne soient optimales que pour certains isolats, et que d'autres ne soient pas transformables dans ces conditions. En outre, il est possible que l'expression du marqueur ne soit pas suffisante pour permettre

la détection de transformants, ce qui résulterait sur un apparent manque de capacité à réaliser la transformation naturelle.

En conclusion, dans un contexte où la transformation naturelle chez *A. baumannii* est aujourd'hui bien établie et la mise en évidence dans les génomes de cette bactérie de taux de recombinaison élevés et de multiples événements de transferts horizontaux de gènes, ce mécanisme est fortement suspecté d'être l'un des potentiels contributeurs majeurs de la propagation de résistances aux antibiotiques chez *A. baumannii* par l'acquisition de gènes de résistance. Nos travaux confirment que la compétence pour la transformation naturelle est un phénomène répandu chez *A. baumannii*, et en particulier chez les isolats cliniques MDR, mais qu'il semble exister une certaine variabilité dans l'efficacité à acquérir de nouveaux gènes par ce mécanisme entre différents isolats.

1.4. Eléments complémentaires :

A la suite de la publication de ces travaux, Hu et ses collègues ont également évalué la capacité à réaliser la transformation naturelle de 142 isolats obtenus depuis des environnements cliniques en Chine, dont 97 isolats MDR and 45 isolats sensibles aux antibiotiques (Hu et al., 2019). Leur méthode expérimentale s'apparente alors à celle utilisée chez *A. baylyi* ADP1, dans laquelle la transformation naturelle s'effectue en milieu liquide sur des cellules planctoniques. Toutefois, ils démontrent que la présence de chlorure de sodium (NaCl) dans le milieu provoque une diminution de l'efficacité de la transformation naturelle chez *A. baumannii*, et obtiennent de meilleurs résultats en le retirant du milieu de transformation. Ils rapportent ainsi que 38% (54/142) des isolats cliniques d'*A. baumannii* testés sont transformables, avec des fréquences comprises entre 1.39×10^{-8} and 4.07×10^{-5} et sans différence significative entre isolats MDR et isolats sensibles aux antibiotiques (43.3%, 42/97 vs. 26.7%, 12/45 respectivement). La méthode proposée par Hu et ses collègues présentent donc l'avantage d'être facile à mettre en place, en particulier pour l'étude d'un nombre élevé d'échantillons. Toutefois, les fréquences de transformation naturelle obtenues avec cette méthode restent globalement inférieures à celles obtenues en utilisant un milieu semi-solide, ce qui pourrait en partie expliquer un pourcentage d'isolats transformables plus faible que celui obtenu pour nos collections.



Fluorescence-Based Detection of Natural Transformation in Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*

Anne-Sophie Godeux,^{a,b} Agnese Lupo,^c Marisa Haenni,^c Simon Guette-Marquet,^a  Gottfried Wilharm,^d
 Maria-Halima Laaberki,^{a,b}  Xavier Charpentier^a

^aCentre International de Recherche en Infectiologie, INSERM U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Université de Lyon, Villeurbanne, France

^bUniversité de Lyon, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France

^cUnité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Université Claude Bernard Lyon 1, ANSES Site de Lyon, Lyon, France

^dRobert Koch Institute, Wernigerode Branch, Wernigerode, Germany

ABSTRACT *Acinetobacter baumannii* is a nosocomial agent with a high propensity for developing resistance to antibiotics. This ability relies on horizontal gene transfer mechanisms occurring in the *Acinetobacter* genus, including natural transformation. To study natural transformation in bacteria, the most prevalent method uses selection for the acquisition of an antibiotic resistance marker in a target chromosomal locus by the recipient cell. Most clinical isolates of *A. baumannii* are resistant to multiple antibiotics, limiting the use of such selection-based methods. Here, we report the development of a phenotypic and selection-free method based on flow cytometry to detect transformation events in multidrug-resistant (MDR) clinical *A. baumannii* isolates. To this end, we engineered a translational fusion between the abundant and conserved *A. baumannii* nucleoprotein (HU) and the superfolder green fluorescent protein (sfGFP). The new method was benchmarked against the conventional antibiotic selection-based method. Using this new method, we investigated several parameters affecting transformation efficiencies and identified conditions of transformability one hundred times higher than those previously reported. Using optimized transformation conditions, we probed natural transformation in a set of MDR clinical and nonclinical animal *A. baumannii* isolates. Regardless of their origin, the majority of the isolates displayed natural transformability, indicative of a conserved trait in the species. Overall, this new method and optimized protocol will greatly facilitate the study of natural transformation in the opportunistic pathogen *A. baumannii*.

IMPORTANCE Antibiotic resistance is a pressing global health concern with the rise of multiple and panresistant pathogens. The rapid and unfailing resistance to multiple antibiotics of the nosocomial agent *Acinetobacter baumannii*, notably to carbapenems, prompt to understand the mechanisms behind acquisition of new antibiotic resistance genes. Natural transformation, one of the horizontal gene transfer mechanisms in bacteria, was only recently described in *A. baumannii* and could explain its ability to acquire resistance genes. We developed a reliable method to probe and study natural transformation mechanism in *A. baumannii*. More broadly, this new method based on flow cytometry will allow experimental detection and quantification of horizontal gene transfer events in multidrug-resistant *A. baumannii*.

KEYWORDS acinetobacter, *Acinetobacter baumannii*, cytometry, horizontal gene transfer, natural transformation

Received 26 March 2018 **Accepted** 27 June 2018

Accepted manuscript posted online 16 July 2018

Citation Godeux A-S, Lupo A, Haenni M, Guette-Marquet S, Wilharm G, Laaberki M-H, Charpentier X. 2018. Fluorescence-based detection of natural transformation in drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 200:e00181-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00181-18>.

Editor Victor J. DiRita, Michigan State University

Copyright © 2018 Godeux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Maria-Halima Laaberki, maria-halima.laaberki@vetagro-sup.fr, or Xavier Charpentier, xavier.charpentier@univ-lyon1.fr.

M.-H.L. and X.C. contributed equally to this article.

Acinetobacter baumannii is a Gram-negative bacterium responsible for health care-associated infections in humans and animals (1, 2). Outside the hospital, it has been detected in various environments (3), but its exact reservoir remains unclear. Asymptomatic carriage of *A. baumannii* has been reported in humans and animals, although the prevalence in healthy individuals seems low (4–7). Although rarely encountered in animals, *Acinetobacter* infections represent a major challenge for physicians in intensive care units since acquired antibiotic resistance is widespread in *A. baumannii* isolates. Worldwide, the percentage of invasive isolates with combined resistance to fluoroquinolones, aminoglycosides, and carbapenems is on the rise (8, 9). The ability of this bacterium to acquire multiple antibiotic resistance genes is well established, but the underlying mechanisms are not clearly understood. Genome sequencing of multidrug-resistant (MDR) strains revealed that multiple events of horizontal gene transfer are responsible for the acquired multidrug resistance (10, 11) and that extensive recombination events drive the diversification of *A. baumannii*, resulting also in antigenic variation (12). Among the horizontal gene transfer mechanisms, natural transformation has been demonstrated in some *A. baumannii* isolates, providing a plausible route for intra- and interspecific genetic exchanges (13–15). Natural transformation could notably explain the frequent occurrence in *A. baumannii* genomes of large genomic islands lacking features characteristic of self-transmissible elements, such as the *AbaR* genomic islands (16, 17). These islands carry multiple resistance genes and have also been revealed in pathogenic non-*baumannii* species (18). Natural transformation allows a bacterial cell to take up exogenous DNA and subsequently incorporate it into its genome through homologous recombination (19). Although some sequence identity is required between the donor DNA and the recipient's chromosome for recombination, natural transformation allows integration of more diverse sequences such as transposons, integrons, and gene cassettes from distant species (20). The recombination of exogenous DNA into the chromosome requires that the bacteria first enter the physiological state of competence, which includes the expression of a molecular machinery to take up DNA, protect it from degradation, and bring it to the chromosome. Although natural transformation is a conserved trait in bacteria, the conditions required to trigger competence and to transform are often elusive and species specific (19, 21). Interestingly, some antibiotics were found to induce competence in three distinct human pathogens, namely, *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila*, and *Streptococcus pneumoniae*, raising the concern that some antibiotic treatment may increase horizontal gene transfer events (22–24). More specifically in *A. baumannii* and related species, the description of natural transformation is rather recent and occurs upon movement on wet surfaces (13, 15).

Natural genetic transformation is generally detected through a phenotypic outcome. Acquisition of antibiotic resistance conferred to the cells by the chromosomal integration of a provided DNA fragment carrying an antibiotic resistance gene represents the most common phenotypic outcome (13). However, since most clinical isolates of *A. baumannii* are resistant to multiple antibiotics, using antibiotic selection to evaluate natural transformation in *A. baumannii* appears both experimentally challenging and ethically questionable. Thus, an alternative method to detect and quantify transformation events is needed to explore natural transformation in MDR clinical *A. baumannii* isolates. Previous work in the related species *Acinetobacter baylyi* indicated that green fluorescent protein (GFP) could be used as a selection-free method to qualitatively assess natural transformation in this nonpathogenic species (25). We present here a phenotypic and selection-free method based on flow cytometry to quantitatively assess transformation in *A. baumannii*. To this end, we developed a flow cytometry-optimized fluorescent marker consisting of a chromosomal translational protein fusion between a nucleoid-associated protein (HU) and the superfolder GFP (sfGFP). Flow cytometry effectively discriminates HU-sfGFP green fluorescent *A. baumannii* cells among a large population of nonfluorescent cells. We demonstrated that DNA encoding the HU-sfGFP marker is a suitable substrate for genetic transformation in *A. baumannii*. Compared to selection-based detection using an antibiotic resistance

marker, flow cytometry combined with the HU-sfGFP marker offers a more reliable and direct quantification of transformants. We took advantage of this transformation detection method to improve transformation conditions for *A. baumannii* and to probe natural transformation in MDR clinical isolates but also in nonclinical strains.

RESULTS

Optimization of a bright chromosomally encoded GFP fusion in *A. baumannii*.

We sought to use expression of GFP as a fluorescence-based phenotypic outcome of natural transformation. To allow the distinction of bacterial transformants from a larger nonfluorescent bacterial population, an optimal fluorescent marker should therefore confer a fluorescence bright enough to be discriminated from bacterial autofluorescence. Moreover, in order to be a suitable substrate for natural transformation in various *A. baumannii* isolates, this marker must insert in a conserved locus in the *A. baumannii* chromosome. We first took advantage of the recent strategy developed by Kjos et al., who engineered a bright strain of *S. pneumoniae* using a translational C-terminal fusion of the superfolder GFP (sfGFP) to HlpA, the unique nucleoid-associated protein of this Gram-positive pathogen (26). In Gram-negative bacteria, 12 nucleoid-associated proteins (NAPs) that possess DNA-binding activity are commonly described (27). Using the BLAST algorithm, we searched for genes encoding nucleoid-associated proteins in the genome of the multidrug-resistant clinical isolate *A. baumannii* AB5075. We identified three homodimeric small NAPs: HU (ABUW_2198), HNS (ABUW_3609), and Fis (ABUW_1533). Two other candidate proteins were also selected based on their abundance inferred from proteomic analysis performed in *A. baumannii* strain ATCC 17978 (28). In this particular strain, heat shock protein DnaK (ABUW_3879) and ribosomal protein S1 RpsA (ABUW_2242) were among the more abundant cytoplasmic proteins. Moreover, these two proteins appeared to be suitable candidates for GFP translation fusions based on successful C-terminal fusions in *Mycobacterium smegmatis* (29) and *Bacillus subtilis* (30). Consequently, we generated translational C-terminal fusions of the sfGFP with HU, HNS, Fis, DnaK, and RpsA proteins. Lastly, as a means of comparison, we constructed a strain carrying the sfGFP-encoding gene (referred to here as the sfGFP gene) under a strong constitutive synthetic promoter inserted into a neutral chromosomal locus in *A. baumannii*. The chosen locus was the sulfite reductase gene (ABUW_0643 or *cysI*) identified previously as a conserved but nonessential gene in *A. baumannii* (13). Using natural transformation, the six genetic constructs were independently integrated into the chromosome of the pathogenic AB5075 *A. baumannii* strain (Fig. 1A). *A. baumannii* was also transformed with a broad host-range and multicopy plasmid carrying the sfGFP gene under a strong constitutive promoter (plasmid pASG-1). Using Western blot analysis of bacterial lysates, we confirmed that all the AB5075 derivative strains expressed sfGFP protein fusions with the expected molecular weight (see Fig. S1 in the supplemental material). However, the Fis-sfGFP appeared to be less expressed than other sfGFP protein fusions. Then, fluorescence signals and subcellular localizations of the various sfGFP protein fusions were analyzed using fluorescence microscopy (Fig. 1B). Consistent with the immunoblotting analysis, the strain expressing the Fis-sfGFP marker presented a low green fluorescence that was comparable to the wild-type strain (autofluorescence, Fig. 1B). Otherwise, all other sfGFP fusions were detectable by fluorescence microscopy. Still, the cellular localization of the green fluorescence signal differs among the strains. As expected, free sfGFP expressed from either a chromosomal locus or from a plasmid (*cysI::sfgfp* or pASG-1) presented a diffuse localization pattern in bacterial cells. This localization pattern was similar for strains expressing sfGFP translation fusions with cytoplasmic proteins (DnaK-sfGFP and RpsA-sfGFP). In contrast, when sfGFP was fused to HU-sfGFP and HNS-sfGFP, the GFP signal showed a discrete pattern. The HU-sfGFP signal appeared as diffused as the nucleoid visualized by DAPI staining. Also, the subcellular localization of HNS-sfGFP was restricted to few discrete foci per cell. Subsequently, green fluorescence intensities of the various strains were then quantified by flow cytometry (Fig. 1C and D). All strains expressing sfGFP chromosomal markers, except Fis-sfGFP, exhibited a fluorescence

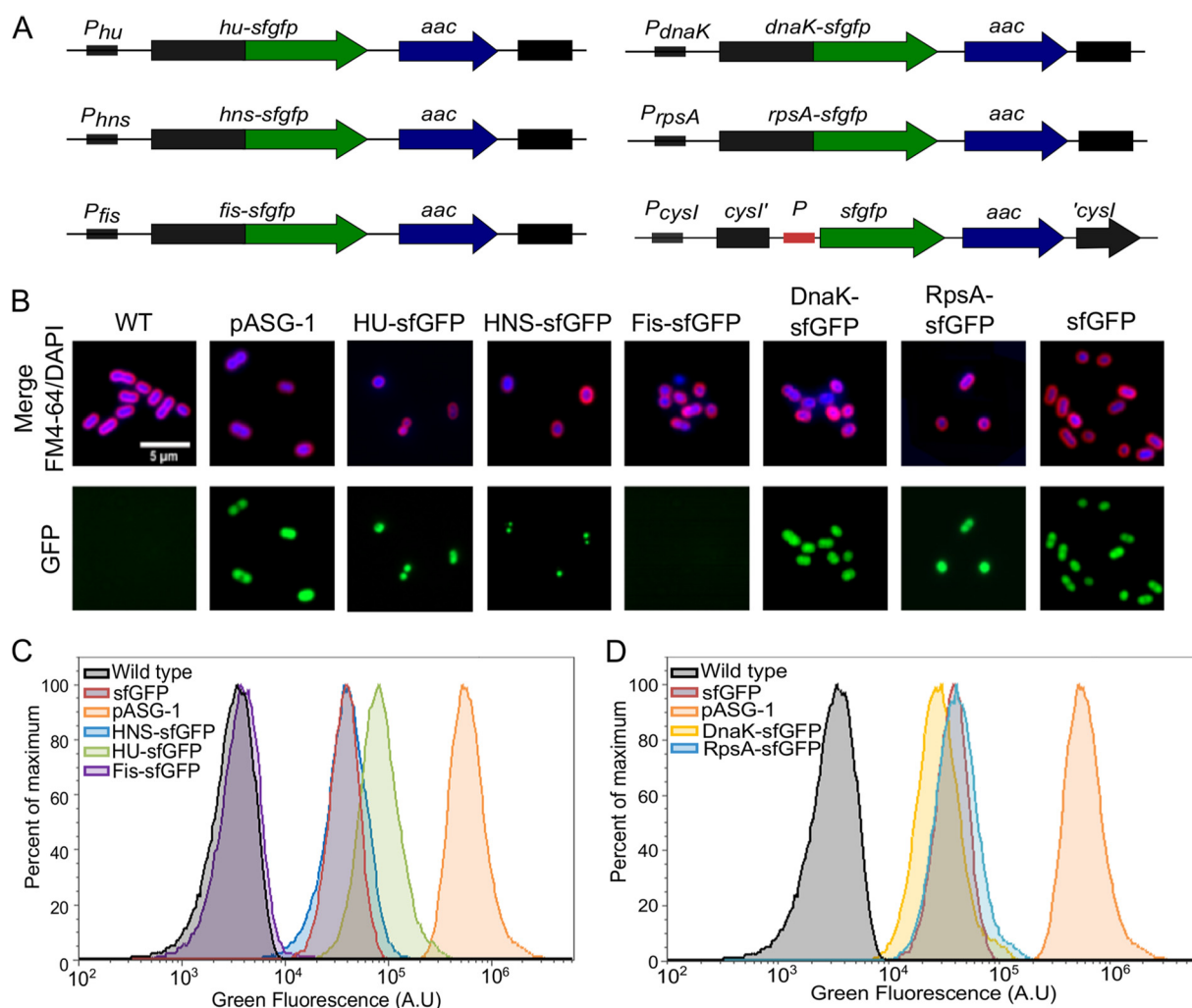


FIG 1 Engineering a chromosomal fluorescent marker in *A. baumannii*. (A) Schematic representation of genetic constructions encoding the fluorescent markers used in this study. The gene encoding sfGFP and sfGFP fused to the C terminus of HU, HNS, Fis, DnaK, and RpsA proteins is represented in green. An *aac*(3)/IV gene encoding resistance to apramycin is indicated in blue. The red box corresponds to a synthetic constitutive promoter. The sequences and genes in black are part of the AB5075 chromosome. (B) Fluorescence microscopy images of *A. baumannii* AB5075 derivatives expressing free or chimeric sfGFP proteins. Membranes were stained with FM4-64 and DNA with DAPI (upper row and first column). For illustration purposes, the green fluorescence intensities were normalized between the samples (lower row). (C and D) Flow cytometry histograms of the green fluorescence intensities of AB5075 derivatives expressing free sfGFP or sfGFP protein fusions in comparison to the wild-type level (WT). The results from a representative experiment are shown.

distinct from the unmarked wild-type strain (autofluorescence). As expected, cytoplasmic sfGFP expressed from a replicative plasmid (pASG1) displayed a strong green fluorescence in comparison to the wild-type strain (200-fold when comparing the mean intensities), whereas the cytoplasmic sfGFP expressed from the chromosome presented an intermediate green fluorescence level (an ~ 12 -fold increase relative to autofluorescence). Among the chromosomal markers, the HU-sfGFP construct presented the strongest fluorescence with a mean of 20-fold increase compared to wild-type levels. The other genetic constructs (RpsA-sfGFP, DnaK-sfGFP, and HNS-sfGFP) presented fluorescence levels comparable to the free sfGFP expressed from the *cysI* locus. Remarkably, the distribution of the fluorescence intensity of population expressing HU-sfGFP protein fusion does not overlap the wild-type autofluorescence allowing a clear resolution of the two populations (Fig. 1C). We ensured that the various fluorescent strains presented a growth similar to the wild-type strain, indicating that both the translational fusions and their chromosomal insertions could be used for downstream applications (see Fig. S2A in the supplemental material). Moreover, all fluorescent

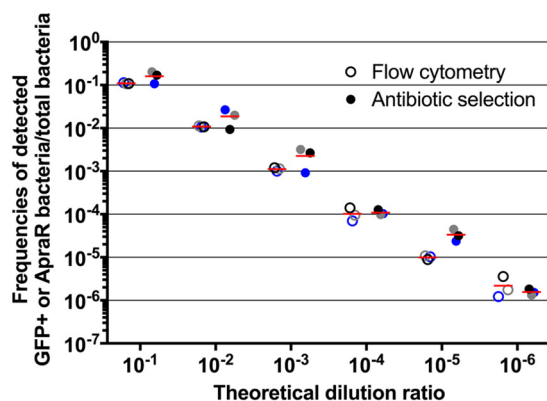


FIG 2 Comparison of paired measurements of *hu-sfgfp_aac* marker detection obtained by flow cytometry and antibiotic selection methods. HU-sfGFP cells were diluted into a suspension of wild-type *A. baumannii* AB5075 cells with increasing dilution factor (abscissa). Green fluorescent and apramycin-resistant populations were determined (ordinate) both by flow cytometry and antibiotic selection. The three dots represent technical replicates. For a given dilution ratio, dots of the same color indicate a sample tested by both methods; the horizontal lines represent the mean of the three measurements.

markers but Fis-sfGFP appear to be steadily expressed during growth in liquid medium with, expectedly, HU-sfGFP presenting the strongest signal among the six chromosomal constructions (see Fig. S2B in the supplemental material). In conclusion, among the six chromosomal fluorescent markers investigated, expression of the HU-sfGFP marker confers the highest fluorescence level, and its expression is compatible with bacterial growth, both characteristics required to constitute a genetic marker of natural transformation.

Benchmarking the HU-sfGFP chromosomal marker in *A. baumannii* transformation assay. In an *A. baumannii* population, the frequency of transformants does not usually exceed 10^{-3} , meaning that less than 1 of 1,000 bacterial cells integrate and express a selection marker (13). Thus, a fluorescence-based phenotypic outcome of natural transformation must be able to detect a rare population of sfGFP-expressing cells within a large population of nonfluorescent cells. Because of their high-resolution power, antibiotic resistance selection-based assays are frequently used to detect rare transformation events. We thus benchmarked the direct flow cytometry-based detection of the HU-sfGFP marker to the selection-based antibiotic marker detection classically used for testing natural transformation. To this end, the HU-sfGFP marker bears an apramycin resistance gene [*aac(3)-IV*], allowing comparison of both methods of selection/detection for the same chromosomal locus of recombination (Fig. 1A). First, we tested the sensitivity and specificity of flow cytometry-based detection of bacterial cells expressing the HU-sfGFP marker within large nonfluorescent bacterial populations and compared it to the apramycin resistance selection. We subjected to both methods of detection the same samples consisting of serial dilutions of HU-sfGFP cells into wild-type cells (Fig. 2). Both methods gave comparable determination of bacterial concentrations in the range of 10^{-1} to 10^{-6} dilution ratios and corresponded to the theoretical dilution factors. The latter dilution (10^{-6}) represents the lower detection limit mostly for technical reasons. With our current equipment and settings, analysis of $>10^6$ bacterial cells is possible but substantially increases the experimentation time.

We then tested the sensitivity and specificity of flow cytometry for the detection of HU-sfGFP transformants within wild-type cells. To this end, we used the genomic DNA (gDNA) extracted from the *hu-sfgfp_aac* strain as the substrate for natural transformation of wild-type AB5075 strain and compared the frequency of transformants measured either by flow cytometry or by antibiotic selection (see Materials and Methods for a detailed description of natural transformation assay). In *A. baylyi*, transformation efficiency increases in a DNA concentration-dependent manner (31). To assess the accuracy and reliability of the cytometry-based method, we used increasing concen-

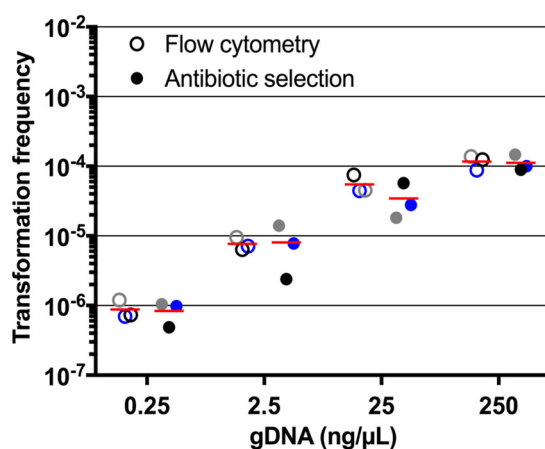


FIG 3 Comparison of flow cytometry sensitivity to antibiotic selection in detecting natural transformation with the *hu-sfgfp_aac* marker. Wild-type *A. baumannii* AB5075 cells were transformed using increasing amounts of *hu-sfgfp_aac* genomic DNA (gDNA). The DNA concentrations are expressed in nanograms of DNA per microliter of the bacterial suspension used in the transformation assay. The transformation frequencies were determined both by flow cytometry and by antibiotic selection for each gDNA concentration. For each method and DNA concentration, the three dots represent technical replicates. For a given gDNA concentration, dots of the same color indicate a sample tested by both methods. The horizontal lines represent the mean of the three measurements.

trations of DNA substrate for transformation experiments and found that both methods provided comparable results (Fig. 3). For both methods, transformation efficiencies were around 10^{-6} using 0.25 ng of *hu-sfgfp_aac* gDNA, and then the transformation frequencies increased by 10-fold with DNA concentration up to a transformation frequency of $\sim 10^{-5}$ for 2.5 ng of gDNA. However, for higher gDNA amounts (25 and 250 ng), the transformation frequencies seem to reach saturation and remained around 10^{-4} . Altogether, these results demonstrate that detection of HU-sfGFP marker by flow cytometry constitutes a method as quantitative and specific as the classical antibiotic selection method to follow natural transformation in *A. baumannii*. The apramycin resistance cassette of the HU-sfGFP chromosomal marker was required here to benchmark the fluorescence-based method against the antibiotic selection method. However, our initial objective was to obtain a transformation marker that does not confer additional antibiotic resistance. We consequently engineered a HU-sfGFP chromosomal marker without an apramycin resistance cassette (see Fig. S3A in the supplemental material). We ensured that the new genetic construct was still compatible with bacterial growth (see Fig. S3B in the supplemental material) and that the fluorescence emitted was comparable to the *hu-sfgfp_aac* strain (see Fig. S3C in the supplemental material). Therefore, all of the following experiments were performed using the HU-sfGFP marker without any antibiotic resistance gene.

Improving parameters of natural transformation of *A. baumannii*. To detect natural transformation in MDR clinical isolates, we first took advantage of the fluorescence-based method to optimize conditions of natural transformation in *A. baumannii*. Because less than a nanogram of gDNA already results in frequencies higher than 10^{-6} , we set this value as the detection threshold of transformation. We first investigated how the type of transforming DNA would influence the transformation frequencies. *A. baumannii* strain AB5075 was subjected to transformation using the same mass of DNA (50 ng) carrying the HU-sfGFP marker flanked by 2-kb-long regions homologous to the targeted chromosomal locus, either as a linear PCR product, as an insertion in nonreplicative plasmid (pASG-5), or as integrated at its locus in gDNA (Fig. 4A). Transformation using gDNA resulted in transformation efficiencies between 10^{-5} and 10^{-4} , which were comparable to the foregoing result (Fig. 3, 25 ng). However, transformation using a PCR product appeared less efficient, with at least 10-fold-fewer transformants than with gDNA. On the other hand, transformation frequencies using

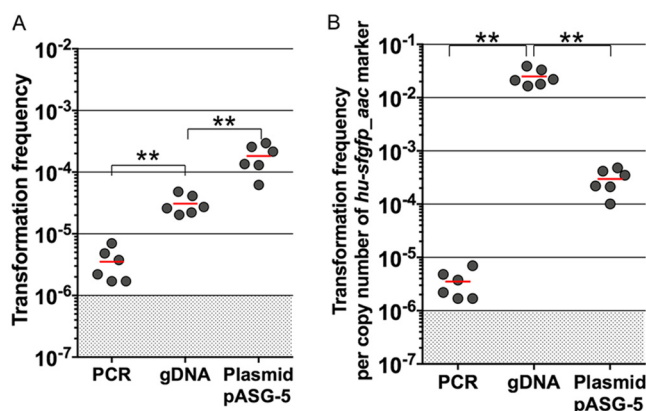


FIG 4 DNA forms and transformation efficiency. Comparison of transformation frequencies obtained with the *hu-sfgfp* marker on either a PCR fragment with 2 kb of flanking homology, gDNA, or a nonreplicative plasmid (pASG-5). The same mass of DNA (50 ng) was used for each DNA form. The graphics represent either absolute measurement (A) or results normalized to the copy number of the marker (B). A total of six independent transformation assays were performed on two separate occasions. The horizontal lines represent the means for each condition. The limit of detection (10^{-6}) is indicated by a shaded area. Two-by-two comparison using the nonparametric Mann-Whitney-Wilcoxon test (two-tailed) between the various conditions yielded *P* values of <0.01 (**).

pASG-5 were significantly higher than using gDNA (mean of 1.5×10^{-4}). As previously proposed for *A. baylyi* (31), the difference in transformation efficiency between gDNA and plasmid DNA (pASG-5) may be explained by the number of copies of markers, which was much greater when using plasmid DNA than in gDNA (Fig. 4B). With this result taken into consideration, the following experiments were performed using pASG-5 as the substrate of transformation. We tested first the impact of the bacterial culture and storage conditions prior to transformation assay and found that culturing bacteria in liquid broth results in slightly higher transformation efficiencies in comparison to bacteria stored at -80°C in conservation medium (5-fold decrease) (see Fig. S4 in the supplemental material). This decrease may be due partially to the presence of glycerol, given that the addition of glycerol to bacteria grown on solid or liquid media decreases transformation (respectively, by 4-fold and 2-fold) (see Fig. S4 in the supplemental material). The optimal pH values for natural transformation have been reported to be more than 6.5 for *A. baylyi* ADP1 and 7.5 in *A. baumannii* A118 (31, 32). We therefore investigated the effect of pH on natural transformation in strain AB5075. To this end, transformation medium was buffered in the range of 5.3 to 8.3 using the potassium phosphate buffering system of Palmen et al. (31) (Fig. 5A). We observed that at between pH 5.3 and pH 6.1, the transformation levels were around 10^{-4} . For pH values greater than 6.36, the transformation frequencies decrease by 10-fold steadily down to 100-fold for a pH above 7.36 to reach the lower detection limit. Based on the study of Traglia et al. performed on the *A. baumannii* strain A118, we also investigated the role of bovine serum albumin (BSA) on transformation efficiency and found no concentration-dependent effect on transformation level when 0.25 to 1% BSA was added to the transformation medium (see Fig. S5A in the supplemental material). On the contrary, the addition of BSA results in a moderate decrease in transformation (3- to 4-fold). We also investigated the role of divalent cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , and Mn^{2+}) in transformation. The addition of Mg^{2+} and Mn^{2+} did not improve the transformation level, in contrast to Ca^{2+} , which, upon addition alone or combined with other divalent cations, slightly increased the transformation levels (2-fold) (see Fig. S5B in the supplemental material). Finally, we tested the effect of the agarose concentration in the transformation medium and observed that at 0.25 to 1% agarose, bacteria were increasingly and steadily transformable (by 2- to 3-fold in comparison to the control condition 0.5%) (Fig. 5B).

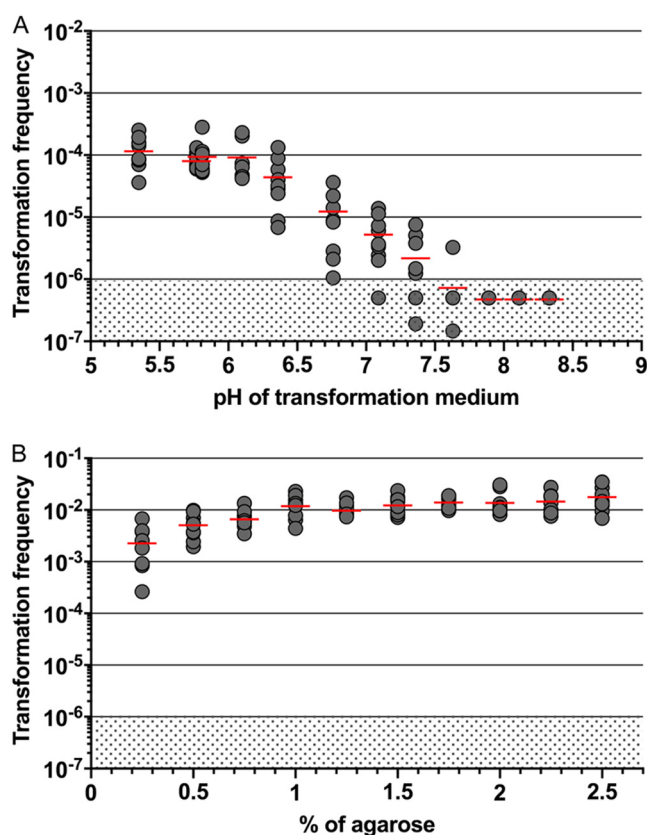


FIG 5 Parameters affecting transformability of *A. baumannii*. (A) Effect of pH on transformation efficiencies. Bacteria were transformed using 0.5% agarose in transformation medium buffered using potassium phosphate with a measured pH ranging from 5.35 to 8.33. The Spearman correlation coefficient between pH 5.35 and 6.1 and the transformation frequency is $r = -0.4$ (P [two tailed] > 0.05). The Spearman correlation coefficient between pH 6.1 and 7.89 and the transformation frequency is $r = -1$ (P [two tailed] < 0.01). (B) Effect of increasing concentrations of agarose on transformation efficiencies (0.5% agarose was used in the foregoing experiments). The Spearman correlation coefficient between agarose concentration and transformation frequency is $r = 0.9758$ (P [two tailed] < 0.0001). A total of nine independent transformation assays were performed on three separate occasions. The horizontal lines represent means for each condition. The limit of detection (10^{-6}) is indicated by a shaded area.

Altogether, using flow cytometry, we refined the optimal conditions for the transformation of *A. baumannii* strain AB5075 and improved by 100-fold the transformation frequencies of this strain (compare Fig. 3 to 5B).

Probing natural transformation in nonclinical and MDR clinical animal isolates.

To further validate the cytometry-based method and to gain insight into the transformation ability of nonclinical strains isolated from wild animals, we sought to estimate the transformation ability of nine fully sequenced strains isolated from wild storks, some of which were related to human clinical isolates (33). Taking advantage of avian strain genome availability (33), we confirmed that the HU gene and the flanking regions are highly conserved with at least 99.1% identity between the avian strain sequences and the AB5075 strain sequence. Previously, five of these nine strains were found to be transformable in a qualitative transformation assay using the antibiotic selection-based method (33). All five strains were also transformable using the fluorescence-based method, but their ability to undergo transformation spreads over a range of 3 orders of magnitude (Fig. 6A). Remarkably, the fluorescence based-method allowed us to detect transformation in one isolate that was not identified as transformable using the antibiotic selection method (33) (Fig. 6A, strain 280/1C). There is no clear correlation between the transformation level and the sequence identity of the transforming sequence given that strains that present the same sequence identity (99.4%) (Fig. 6A) are either highly transformable (strains 29D2 and 86II/2C) or not transformable (strains

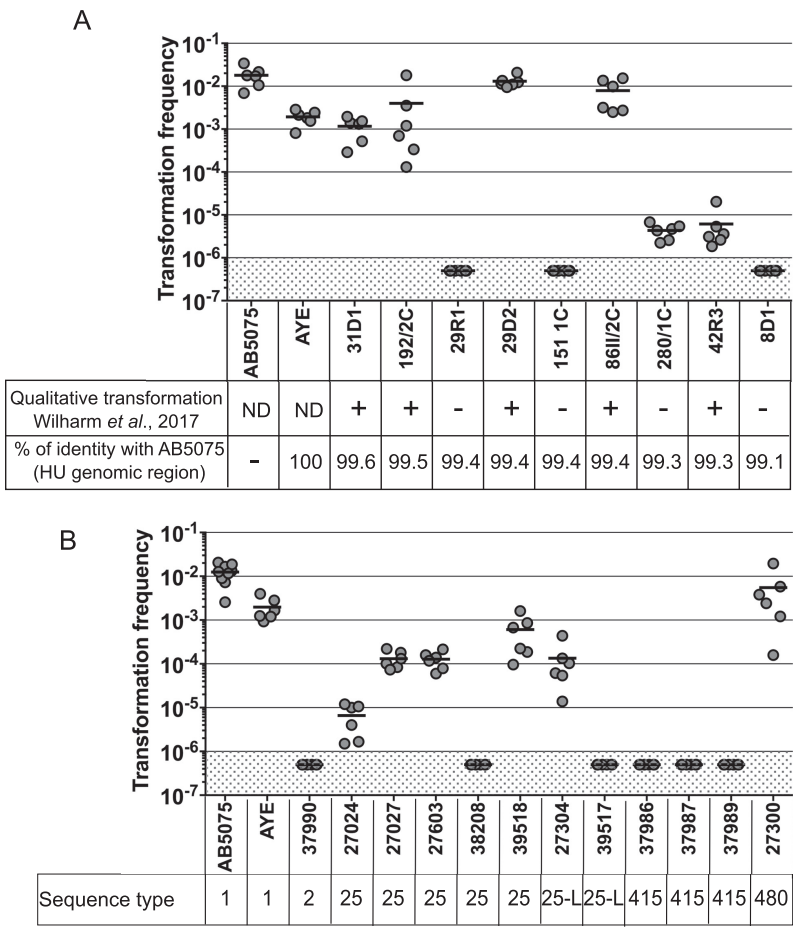


FIG 6 Determination of natural transformation frequencies of nonclinical and clinical *A. baumannii* isolates using flow cytometry. Wild animal (A) and clinical animal (B) isolates of *A. baumannii* were subjected to transformation using pASG-5 and the optimized conditions developed for the strain. (A) Results of transformation ability obtained in a qualitative manner are reproduced from the work of Wilharm *et al.* (33). ND, not done; +, transformable; -, not transformable. The percent sequence identity between the HU region of strain AB5075 (4,220 nucleotides long) with the recipient strain is indicated. (B) Sequence types (Pasteur scheme) of clinical isolates are specified (with 25-L representing ST25-like). A total of six to nine independent transformation assays were performed on two or three separate occasions. The horizontal lines represent the mean measurements for each strain. The limit of detection (10^{-6}) is indicated by shading.

29R1 and 151/1C). Remarkably, strains presenting levels sequence identities lower than the strain AYE (strains 29D2, 192/2C, and 86II/2C) still presented comparable levels of transformation (Fig. 6A).

Taking advantage of the flow cytometry-based method and improved conditions for testing transformation, we then investigated the transformation profile of clinical MDR *A. baumannii* isolates, again of animal origin (typed but not fully sequenced). We estimated the transformation frequencies of 12 *A. baumannii* isolates from diseased animals obtained through the French Surveillance Network for Antimicrobial Resistance in Animal Pathogens (Resapath). These isolates presented multiple antibiotic resistance, including to carbapenems (34). For 50% of the isolates (6 of 12) transformation could be detected, with transformation frequencies ranging from 10^{-6} , the limit of detection, up to 10^{-2} (Fig. 6B). Interestingly, most sequence type 25 (ST25) and ST25-like isolates were found to be transformable (5 of 7), in contrast to all of the ST415 isolates ($n = 3$). Altogether, these results on animal clinical isolates and nonclinical isolates demonstrate that the fluorescence-based method allows the detection of transformation events in *A. baumannii* regardless of the origin of the strain.

DISCUSSION

Acinetobacter baumannii is now an established member of the growing list of bacteria capable of undergoing natural genetic transformation (13, 33). Together with genomic evidence of high recombination rates and multiple horizontal gene transfer events, natural transformation should be considered a major contributor of antibiotic resistance genes acquisition in *A. baumannii*. To investigate natural transformation in clinical MDR isolates, we developed here a fluorescence-based assay to detect and quantify transformation. To select an optimal marker of transformation, we engineered seven chromosomal markers consisting in C-terminal translational fusion of sfGFP with abundant proteins. Interestingly, we obtained an sfGFP fusion protein with the Fis protein, an essential protein in AB5075 (35). However, the level of expression of this chimeric protein did not confer the cells a fluorescence level distinguishable from autofluorescence (Fig. 1B and C; see also Fig. S1 in the supplemental material). All other translational fusions were highly expressed and emitted a fluorescence signal that could distinguish the corresponding strains from the wild-type strain (Fig. 1; see also Fig. S1 in the supplemental material). Expectedly, the fluorescence intensity of the cells correlates with abundance of the sfGFP fusion protein (see Fig. S1 in the supplemental material). Yet, protein folding or its location in the bacterial cell also influences the fluorescence intensity of a protein fusion. For instance, HU-sfGFP and HNS-sfGFP fusions are both predicted to be associated with the nucleoid and seemed to be expressed at similar levels (see Fig. S1 in the supplemental material). However, the HU-sfGFP fusion was brighter than the HNS one regardless of the growth phase (Fig. 1 and S2). While the HU-sfGFP signal appears distributed evenly in the cell (Fig. 1B), the HNS-sfGFP signal was restricted to one to two discrete foci per cell. Both subcellular localizations observed in *A. baumannii* were reminiscent of localization patterns observed for HU and H-NS in *Escherichia coli* (36). Besides their use as fluorescent markers of natural transformation, the fusion proteins could be useful to further investigate the function of nucleoid-associated proteins in *A. baumannii*. However, the functionality of the fusion protein was not assessed in this study given that HU and HNS, along with RpsA and DnaK, are nonessential proteins for growth in rich medium (35).

The HU-sfGFP marker combined with flow cytometry performed at least as well as the classical antibiotic selection to determine transformation frequencies (Fig. 2 and 3). We thus investigated the chemical and physical parameters susceptible to alter transformation efficiencies in *A. baumannii*. We tested the influence of divalent cations Mg^{2+} , Ca^{2+} , and Mn^{2+} on transformation efficiency to find a mild (2-fold) but significant effect of Ca^{2+} , as in *A. baylyi* and A118. In A118, BSA was found to increase transformation by 2-fold (37), and yet the addition of this blood protein to the transformation medium results in a slight decrease in transformation efficiency in AB5075 (see Fig. S5A in the supplemental material). With a difference greater than 2 orders of magnitude, the parameter influencing transformation the most is pH (Fig. 5B). We found that transformation is more efficient at slightly acidic pH (5, 6), which is opposite to results obtained in *A. baylyi* ADP1 for which transformation drops by 10 to 100-fold at pH below neutrality (31). This is a clear indication that even closely related species can undergo natural transformation under specific conditions. Transformation occurring at mildly acidic pH in AB5075 led us to hypothesize that competence may be triggered in several specific sites within a host. For instance, acidic pH values are reminiscent of cutaneous pH (which is slightly lower than 5 [38]), or parts of the gastrointestinal tract, with pH levels of 5 to 7 in the colon (39). Noteworthy, these body sites contain large bacterial communities, including *A. baumannii* or other *Acinetobacter* species, that could offer substrates for natural transformation and foster the acquisition of antibiotic resistance genes (4, 5).

We also found that increasing agarose concentration improved transformation (Fig. 5A). A simple explanation for the apparent agarose concentration-dependent increase of natural transformation could be that at high concentrations, agarose physically impairs bacterial movement and somehow increases the local DNA/bacterial cell ratio

and therefore transformation efficiency. Another hypothesis could be that mechanochemical perception of type IV pilus retraction on agarose stimulates competence. Indeed, sensing pilus retraction was involved in the induction of virulence gene expression and holdfast synthesis, respectively, in *Pseudomonas aeruginosa* and *Caulobacter crescentus* (40, 41). Also, and intriguingly, agarose is a necessary component of the semisolid media required to natural transform *A. baumannii* or closely related species (13, 33, 42). One hypothesis could be that the competent state for natural transformation is induced by the presence of agarose itself. Indeed, agarose, a polymer produced by seaweed, is made of repeating units of disaccharide (β -galactose and 3,6-anhydro-L-galactopyranose). Some soil or marine isolates of *Acinetobacter* sp. produce an agarase able to degrade agarose (43, 44). Similarly to the degradation products of chitin that induce competence in *Vibrio cholerae* (45), the degradation products of agarose could represent the trigger of competence in *A. baumannii*. The regulatory cascade that triggers competence in *A. baumannii* is currently unknown, and its identification may provide clues about the inducing cues.

Regardless of the inducing mechanism, the improved assay results in the highest transformation frequencies ever reported for *A. baumannii*, which can be as high as 1% for strain AB5075. The combined improved assay and method of detection made possible the investigation of natural transformability on a panel of nonclinical strains and clinical isolates. We found that 50% of *A. baumannii* clinical isolates isolated from pets (6 of 12) and 66% of nonclinical strains isolated from wild birds (6 of 9) were transformable. Among transformable strains or isolates, the transformation levels vary from 10^{-2} down to the detection limit (10^{-6}). The variability of transformation efficiencies among *A. baumannii* isolates is reminiscent of the transformation levels observed in *A. baumannii* human clinical isolates (13) but also among isolates of other transformable species, such as *S. pneumoniae* or *Haemophilus influenzae* (46, 47). We ruled out the hypothesis that HU genomic region divergence prevents transformation. However, although HU gene and protein sequences are highly conserved, the expression level of the HU gene in the recipient strain varies, with some strains expressing less of the HU gene under the condition tested, resulting in cells presenting a lower fluorescent signal (see Fig. S6 in the supplemental material). Therefore, although the strain may be transformable, it is possible that transformants escape detection. As discussed beforehand, another explanation for the undetectable transformability may be related to strain-specific requirements for competence development. In this regard, the fact that most of the ST25 strains presented high level of transformation indicates that competence development is favored by the experimental conditions set for ST1 strains (AB5075 and AYE). These conditions may not be optimal for some strains, and we cannot rule out the possibility that strains that appear nontransformable in our assay would someday reveal themselves to be transformable under slightly different conditions. Variability among *A. baumannii* isolates may also result from mechanisms limiting transformation, such as secreted endonucleases that inhibit transformation in *Campylobacter jejuni* and *V. cholerae* (48–50).

A major limitation of our assay lies in its relative low sensitivity. Using our current equipment and settings, our assay does not allow us draw conclusions about the transformability of strains that would transform at frequencies below 10^{-6} . Yet, the use of HU-sfGFP and flow cytometry offers, for now, the possibility to phenotypically detect transformation events in clinical isolates of *A. baumannii* for which transformability could not have been otherwise investigated. Little is known about the conditions that foster horizontal gene transfer by transformation in *A. baumannii*. Our easy and rapid method now allows study of the environmental conditions that may influence the rates of horizontal gene transfer using undomesticated strains. For instance, the method could be used to quantify horizontal gene transfer by natural transformation resulting from intra- or interspecific predatory behaviors (50, 51). The new HU-sfGFP would also constitute an excellent tool for the live-cell imaging of transformation in this species. It also opens investigations on horizontal gene transfer in infection models, experimen-

tally testing the possibility that conditions specific to body sites, exposure to antibiotics, or antiseptics stimulate horizontal gene transfer.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, typing, and growth conditions. The bacterial strains or strains used in this study are listed in Table S1 in the supplemental material. Genotyping of the isolates was based on sequence type determination according to the multilocus sequence typing method described previously (52). Unless specified otherwise, *Acinetobacter baumannii* isolates and strains were grown in lysogeny broth (LB; Lennox). All experiments were performed at 37°C.

Construction of bacterial strains and plasmids. All the oligonucleotides used in this study for genetic modification are listed in Table S2 in the supplemental material. Plasmid pASG-1 was constructed by cloning chimeric PCR product from assembly of PCR1 (primers asg-2 and asg-4 on pKD-sfGFP were obtained from Erwan Gueguen [Université de Lyon]) and PCR2 (primers Apr_Fw3 and asg-3 on plasmid carrying an apramycin resistance cassette) into pX5, a pMMB207 derivative to place the sfGFP gene under the control of an artificial strong constitutive promoter. The plasmid pASG-5 was constructed by cloning a PCR performed on genomic DNA extracted from AB5075 *hu-sfGFP* strain using the primers mlo-32 and mlo-35 into pJET1.2 according to the manufacturer's instructions (CloneJET PCR cloning kit; Thermo Fisher Scientific). Plasmid pMHL-2 is a pGEM-T Easy derivative in which an apramycin resistance cassette and a *sacB* counterselection cassette have been cloned. All plasmid sequences are available upon request.

Gene disruptions were performed using overlap extension PCR to synthesize a large chimeric DNA fragment carrying the selection/detection marker flanked by 2-kb fragments that are homologous to the insertion site. The oligonucleotides used for strain construction are listed in Table S2 in the supplemental material. Briefly, the coding sequence of the GFP superfolder (sfGFP) and the apramycin resistance cassette [*aac(3)/I*] were amplified from plasmid pASG-1 using the primers mlo-28 and mlo-29. The DNA fragments allowing homologous recombination (2 kb upstream and downstream of the targeted locus) were obtained by PCR on genomic DNA of strain AB5075. In a second step, the fragments previously obtained were assembled by PCR. The PCRs were performed with a high-fidelity DNA polymerase (PrimeStarMax; TaKaRa). Subsequently, each PCR fragment was purified after migration on an agarose gel, followed by extraction as recommended by the manufacturer (QIAquick gel extraction kit; Qiagen). For fusion between the nucleoproteins and sfGFP, a linker sequence that encodes the RGS GGEEAAKAGTS sequence between sfGFP and the nucleoprotein has been added so as not to disturb the functioning of the proteins (26). All chimeric PCR products were independently introduced into the AB5075 wild-type strain using natural transformation as described above.

To obtain a chromosomal marker without antibiotic cassette (*hu-sfGFP* strain), we first inserted a *sacB-aac* cassette (amplified from pMHL-2 plasmid) into the *hu* gene using overlap extension PCR. The resulting strain was subsequently transformed with a chimeric PCR product carrying a *hu-sfGFP* fusion without an antibiotic determinant and counterselected recombinants on minimal medium (M63) with 10% sucrose.

Fluorescence microscopy. Five hundred microliters of culture was incubated 30 min at room temperature with formaldehyde (final concentration, 3.7%), DAPI (4',6'-diamidino-2-phenylindole; final concentration, 3 μ M), and FM4-64 (final concentration, 10 μ g/ml). Then, 3- μ l portions of the preparation were spotted onto a poly-L-lysine-coated coverslip. After adhesion of the bacterial cells, the coverslips were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS). The specimens were then observed under a fluorescence microscope by an immersion objective lens for a final magnification of $\times 1,000$ (EVOS FL; Life Technologies).

Flow cytometry. Bacterial suspensions were fixed with formaldehyde (final concentration, 3.7%) and membrane stained with FM4-64 (final concentration, 10 μ g/ml) for 30 min at room temperature and then washed twice with PBS and further diluted in PBS to obtain about 10^6 cells/ml. An Attune acoustic focusing cytometer (Life Technologies) was used for all flow cytometry acquisitions. Samples were run at a collection rate of 25 μ l/min, and fluorescence emission was detected using a 530/30 bandpass filter for GFP fluorescence and a 640 long-pass filter for FM4-64 fluorescence. To avoid aggregates, a maximum concentration of 10^6 /ml FM4-64-positive particles was analyzed. Flow cytometry data were analyzed using Attune software. Green fluorescence was analyzed on a minimum of 20 million FM4-64-positive particles.

Transformation assay. The following method was adapted from one published previously (13). Overnight cultures at 37°C in LB liquid medium were diluted in PBS to obtain 10^7 CFU/ml. Then, 10 μ l of bacterial suspension was mixed with 10 μ l of substrate DNA (at 100 ng/ μ l for genomic DNA), and 2.5 μ l of this bacterial/DNA suspension was then stabbed into 1 ml of freshly prepared motility medium (5 g/liter agarose, 5 g/liter tryptone, and 2.5 g/liter NaCl) in 2-ml Eppendorf tubes. After 20 h at 37°C, 200 μ l of PBS was added to the tube, and the bacteria were resuspended by vigorous vortexing. The transformants were then selected by plating on selective agar media (apramycin, 30 μ g/ μ l), or their fluorescence was measured by flow cytometry. Transformation frequencies were then determined by calculating the ratio of the number of transformant CFU (apramycin resistant or fluorescent) to the total number of CFU (antibiotic sensitive or nonfluorescent).

All of the transformation assays were performed on two or three separate occasions. On each occasion, three independent transformation reactions were conducted (three different bacterial cultures and DNA samples). All of the independent data points and the means of the measurements are plotted. Since normality of the distribution of transformation frequency does not apply for transformation

frequency analysis, only nonparametric tests were performed (Mann-Whitney-Wilcoxon and Spearman correlation tests).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/JB.00181-18>.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 2.6 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the LABEX ECOFECT. We are grateful to Omran Allatif from the Bioinformatics and Statistical platform of the CIRI for useful comments on statistical analysis.

This study was supported by the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon, within the program Investissements d'Avenir (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency. A.-S.G. and M.-H.L. were also supported by the Programme Jeune Chercheur from VetAgro Sup. A.L. and M.H. were supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES). G.W. received funding from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) within FOR 2251 (WI 3272/3-1).

REFERENCES

- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5:939–951. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>.
- Zordan S, Prenger-Berninghoff E, Weiss R, van der Reijden T, van den Broek P, Baljer G, Dijkshoorn L. 2011. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. *Emerg Infect Dis* 17:1751–1754. <https://doi.org/10.3201/eid1709.101931>.
- Eveillard M, Kempf M, Belmonte O, Pailhoriès H, Joly-Guillou M-L. 2013. Reservoirs of *Acinetobacter baumannii* outside the hospital and potential involvement in emerging human community-acquired infections. *Int J Infect Dis* 17:e802–5. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.03.021>.
- Zeana C, Larson E, Sahni J, Bayuga SJ, Wu F, Della-Latta P. 2003. The epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* does the community represent a reservoir? *Infect Control Hosp Epidemiol* 24:275–279. <https://doi.org/10.1086/502209>.
- Dijkshoorn L, Aken E van, Shunburne L, Reijden TJK van der, Bernards AT, Nemec A, Towner KJ. 2005. Prevalence of *Acinetobacter baumannii* and other *Acinetobacter* spp. in faecal samples from non-hospitalised individuals. *Clin Microbiol Infect* 11:329–332. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2005.01093.x>.
- Pailhoriès H, Kempf M, Belmonte O, Joly-Guillou M-L, Eveillard M. 2016. First case of OXA-24-producing *Acinetobacter baumannii* in cattle from Reunion Island, France. *Int J Antimicrob Agents* 48:763–764. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.09.005>.
- Hérivaux A, Pailhoriès H, Quinqueneau C, Lemarié C, Joly-Guillou M-L, Ruvoen N, Eveillard M, Kempf M. 2016. First report of carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* carriage in pets from the community in France. *Int J Antimicrob Agents* 48:220–221. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.03.012>.
- European Centre for Disease Prevention and Control. 2017. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016: annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). ECDC, Stockholm, Sweden.
- World Health Organization. 2017. Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016–2017. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Fournier P-E, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie J-M. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2:e7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020007>.
- Wright MS, Haft DH, Harkins DM, Perez F, Hujer KM, Bajaksouzian S, Benard MF, Jacobs MR, Bonomo RA, Adams MD. 2014. New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *mBio* 5:e00963–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00963-13>.
- Snitkin ES, Zelazny AM, Montero CI, Stock F, Mijares L, Comparative Sequence Program NISC, Murray PR, Segre JA. 2011. Genome-wide recombination drives diversification of epidemic strains of *Acinetobacter baumannii*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:13758–13763. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104404108>.
- Wilhelm G, Piesker J, Laue M, Skiebe E. 2013. DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J Bacteriol* 195:4146–4153. <https://doi.org/10.1128/JB.00754-13>.
- Touchon M, Cury J, Yoon E-J, Krizova L, Cerqueira GC, Murphy C, Feldgarden M, Wortman J, Clermont D, Lambert T, Grillot-Courvalin C, Nemec A, Courvalin P, Rocha EPC. 2014. The genomic diversification of the whole *Acinetobacter* genus: origins, mechanisms, and consequences. *Genome Biol Evol* 6:2866–2882. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu225>.
- Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS. 2013. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *mBio* 4:e00360–13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00360-13>.
- Bonnin RA, Poirel L, Nordmann P. 2012. AbaR-type transposon structures in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 67:234–236. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr413>.
- Krizova L, Dijkshoorn L, Nemec A. 2011. Diversity and evolution of AbaR genomic resistance islands in *Acinetobacter baumannii* strains of European clone I. *Antimicrob Agents Chemother* 55:3201–3206. <https://doi.org/10.1128/AAC.00221-11>.
- Kim DH, Ko KS. 2015. AbaR-type genomic islands in non-*baumannii* *Acinetobacter* species isolates from South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 59:5824–5826. <https://doi.org/10.1128/AAC.01175-15>.
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys J-P. 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* 12:181–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>.
- Domingues S, Harms K, Fricke WF, Johnsen P, da Silva JG, Nielsen KM. 2012. Natural transformation facilitates transfer of transposons, integrons and gene cassettes between bacterial species. *PLoS Pathog* 8:e1002837. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002837>.
- Seitz P, Blokesch M. 2013. Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 37:336–363. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00353.x>.
- Dorier MS, Fero J, Salama NR. 2010. DNA damage triggers genetic exchange in *Helicobacter pylori*. *PLoS Pathog* 6:e1001026. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001026>.
- Charpentier X, Kay E, Schneider D, Shuman HA. 2011. Antibiotics and UV radiation induce competence for natural transformation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 193:1114–1121. <https://doi.org/10.1128/JB.01146-10>.
- Prudhomme M, Attaiach L, Sanchez G, Martin B, Claverys J-P. 2006. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human patho-

- gen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 313:89–92. <https://doi.org/10.1126/science.1127912>.
25. Rizzi A, Pontiroli A, Brusetti L, Borin S, Sorlini C, Abruzzese A, Sacchi GA, Vogel TM, Simonet P, Bazzicalupo M, Nielsen KM, Monier J-M, Daffonchio D. 2008. Strategy for in situ detection of natural transformation-based horizontal gene transfer events. *Appl Environ Microbiol* 74:1250–1254. <https://doi.org/10.1128/AEM.02185-07>.
 26. Kjos M, Aprianto R, Fernandes VE, Andrew PW, van Strijp JAG, Nijland R, Veening J-W. 2015. Bright fluorescent *Streptococcus pneumoniae* for live-cell imaging of host-pathogen interactions. *J Bacteriol* 197:807–818. <https://doi.org/10.1128/JB.02221-14>.
 27. Dillon SC, Dorman CJ. 2010. Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nat Rev Microbiol* 8:185–195. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2261>.
 28. Soares NC, Cabral MP, Parreira JR, Gayoso C, Barba MJ, Bou G. 2009. 2-DE analysis indicates that *Acinetobacter baumannii* displays a robust and versatile metabolism. *Proteome Sci* 7:37. <https://doi.org/10.1186/1477-5956-7-37>.
 29. Fay A, Glickman MS. 2014. An essential nonredundant role for mycobacterial DnaK in native protein folding. *PLoS Genet* 10:e1004516. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004516>.
 30. Lewis PJ, Thaker SD, Errington J. 2000. Compartmentalization of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *EMBO J* 19:710–718. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.4.710>.
 31. Palmen R, Vosman B, Buijsman P, Breek CK, Hellingwerf KJ. 1993. Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J Gen Microbiol* 139:295–305. <https://doi.org/10.1099/00221287-139-2-295>.
 32. Rochelle PA, Day MJ, Fry JC. 1988. Occurrence, transfer and mobilization in epilithic strains of *Acinetobacter* of mercury-resistance plasmids capable of transformation. *Microbiology* 134:2933–2941. <https://doi.org/10.1099/00221287-134-11-2933>.
 33. Wilharm G, Kiehe E, Higgins PG, Poppel MT, Blaschke U, Leser S, Heider C, Heindorf M, Brauner P, Jäckel U, Böhlend K, Cuny C, Łopińska A, Kaminski P, Kasprzak M, Bochenski M, Ciebiera O, Tobółka M, Żolnierowicz KM, Siekiera J, Seifert H, Gagné S, Salcedo SP, Kaatz M, Layer F, Bender JK, Fuchs S, Semmler T, Pfeifer Y, Jerzak L. 2017. Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide. *Environ Microbiol* 19:4349–4364. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13931>.
 34. Lupo A, Châtre P, Ponsin C, Saras E, Jean-Boulouis H, Keck N, Haenni M, Madec J-Y. 2016. Clonal spread of *bla*_{OXA-23} ST25 *Acinetobacter baumannii* in companion animals in France. *Antimicrob Agents Chemother* 61:e01881-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01881-16>.
 35. Gallagher LA, Ramage E, Weiss EJ, Radey M, Hayden HS, Held KG, Huse HK, Zurawski DV, Brittnacher MJ, Manoel C. 2015. Resources for genetic and genomic analysis of emerging pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 197:2027–2035. <https://doi.org/10.1128/JB.00131-15>.
 36. Wang W, Li G-W, Chen C, Xie XS, Zhuang X. 2011. Chromosome organization by a nucleoid-associated protein in live bacteria. *Science* 333:1445–1449. <https://doi.org/10.1126/science.1204697>.
 37. Traglia GM, Quinn B, Schramm STJ, Soler-Bistue A, Ramirez MS. 2016. Serum albumin and Ca²⁺ are natural competence inducers in the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 60:4920–4929. <https://doi.org/10.1128/AAC.00529-16>.
 38. Matousek JL, Campbell KL. 2002. A comparative review of cutaneous pH. *Vet Dermatol* 13:293–300. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.2002.00312.x>.
 39. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. 2012. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Control Release* 162:56–67. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.06.003>.
 40. Persat A, Inclan YF, Engel JN, Stone HA, Gitai Z. 2015. Type IV pili mechanotransductionally regulate virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112:7563–7568. <https://doi.org/10.1073/pnas.1502025112>.
 41. Ellison CK, Kan J, Dillard RS, Kysela DT, Ducret A, Berne C, Hampton CM, Ke Z, Wright ER, Biais N, Dalia AB, Brun YV. 2017. Obstruction of pilus retraction stimulates bacterial surface sensing. *Science* 358:535–538. <https://doi.org/10.1126/science.aan5706>.
 42. Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS. 2013. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *mBio* 4:e00360-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00360-13>.
 43. Lakshmikanth M, Manohar S, Lalitha J. 2009. Purification and characterization of β -agarase from agar-liquefying soil bacterium, *Acinetobacter* sp. AG LSL-1. *Process Biochem* 44:999–1003. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.04.025>.
 44. Leema RT, Sachindra NM. 2016. Characterization of extracellular agarase production by *Acinetobacter junii* PS12B, isolated from marine sediments. *Biocatal Agric Biotechnol* 6:219–226.
 45. Meibom KL, Blokesch M, Dolganov NA, Wu C-Y, Schoolnik GK. 2005. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310:1824–1827. <https://doi.org/10.1126/science.1120096>.
 46. Evans BA, Rozen DE. 2013. Significant variation in transformation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *ISME J* 7:791–799. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.170>.
 47. Maughan H, Redfield RJ. 2009. Extensive variation in natural competence in *Haemophilus influenzae*. *Evol Int J Org Evol* 63:1852–1866. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00658.x>.
 48. Gaasbeek EJ, Wagenaar JA, Guilhabert MR, Wösten MMSM, van Putten JPM, van der Graaf-van Bloois L, Parker CT, van der Wal FJ. 2009. A DNase encoded by integrated element CJIE1 inhibits natural transformation of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 191:2296–2306. <https://doi.org/10.1128/JB.01430-08>.
 49. Gaasbeek EJ, Wagenaar JA, Guilhabert MR, Putten JPM van, Parker CT, Wal FJ van der. 2010. Nucleases encoded by the integrated elements CJIE2 and CJIE4 inhibit natural transformation of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol* 192:936–941. <https://doi.org/10.1128/JB.00867-09>.
 50. Cooper RM, Tsimring L, Hasty J. 2017. Interspecies population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. *Elife* 6:e25950. <https://doi.org/10.7554/eLife.25950>.
 51. Borgeaud S, Metzger LC, Scignari T, Blokesch M. 2015. The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science* 347:63–67. <https://doi.org/10.1126/science.1260064>.
 52. Diancourt L, Passet V, Nemec A, Dijkshoorn L, Brisse S. 2010. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multi-resistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 5:e10034. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010034>.

Fluorescence-based detection of natural transformation in drug resistant *Acinetobacter baumannii*

Authors: Anne-Sophie Godeux^{a,b}, Agnese Lupo^c, Marisa Haenni^c, Simon Guette-Marquet^a, Gottfried Wilharm^d, Maria-Halima Laaberki^{a,b,#,*} and Xavier Charpentier^{a,#,*}.

^a CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, 69100, Villeurbanne, France

^b Université de Lyon, VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Etoile, France.

^c Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Université Claude Bernard Lyon 1, ANSES Site de Lyon, Lyon, France

^d Robert Koch Institute, Wernigerode Branch, Wernigerode, Germany.

Contributed equally

* Correspondence to Maria-Halima Laaberki, maria-halima.laaberki@vetagro-sup.fr and Xavier Charpentier, xavier.charpentier@univ-lyon1.fr.

Supplementary material

Table S1. Bacterial strains used in this study

Strain	Genotype/comment	Reference or source
<i>A. baumannii</i> AB5075	wild type	(1)
<i>A. baumannii</i> AB5075	<i>cysI::Pst sfGFP-aac</i>	this study
<i>A. baumannii</i> AB5075	<i>hu sfGFP-aac</i>	this study
<i>A. baumannii</i> AB5075	<i>hns sfGFP-aac</i>	this study
<i>A. baumannii</i> AB5075	<i>fis sfGFP-aac</i>	this study
<i>A. baumannii</i> AB5075	<i>dnaK sfGFP-aac</i>	this study
<i>A. baumannii</i> AB5075	<i>rpsA sfGFP-aac</i>	this study
<i>A. baumannii</i> AB5075	<i>hu sfGFP</i>	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 27024	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 27027	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 27300	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 27304	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 27603	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 37986	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 37987	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 37989	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 37990	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 38208	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 39517	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> isolate 39518	MDR isolate from RESAPTH	this study
<i>A. baumannii</i> strain 8611/2C	Avian non-clinical strain, white stork	(2)
<i>A. baumannii</i> strain 192/2	Avian non-clinical strain, white stork	(2)
<i>A. baumannii</i> strain 29D2	Avian non-clinical strain, white stork	(2)
<i>A. baumannii</i> strain 31D1	Avian non-clinical strain, white stork	(2)
<i>A. baumannii</i> strain 42R3	Avian non-clinical strain, white stork	(2)
<i>A. baumannii</i> strain 8D1	Avian non-clinical strain, white stork	(2)
<i>A. baumannii</i> strain 29R1	Avian non-clinical strain, white stork	(2)
<i>A. baumannii</i> strain 280/1C	Avian non-clinical strain, white stork	(2)
<i>A. baumannii</i> strain 151/1C	Avian non-clinical strain, white stork	(2)

Table S2. Oligonucleotides used in this study for DNA manipulation (plasmid construction and overlapping extension PCR)

Genetic construction	Name	Sequence 5' to 3'	Template; Annealing site
Chromosomal modifications using overlap extension PCR			
<i>cysI::Pst-sfgfp_aac</i>	mlo-20	tccagggtgttataccc	AB5075 genomic DNA; 2kb upstream of the <i>cysI</i> gene
	mlo-21	ccaccatcaaacagagattttccgcgcaactacaccgtcatactgg	AB5075 genomic DNA; 5' of the <i>cysI</i> gene
	mlo-22	ggcgaaaatcctgtttgatgtgg	pASG-1; upstream of <i>Pst-sfgfp-aac</i> for PCR fusion
	mlo-23	tgtcgactcatgagctcagccaatcgactgg	pASG-1; downstream of <i>Pst-sfgfp-aac</i> for PCR fusion
	mlo-24	ccagtcgattggctgagctcatgctgacataatgaagcaggcgagatgggc	AB5075 genomic DNA; 3' of the <i>cysI</i> gene
<i>sfgfp_aac</i> marker	mlo-25	ccaatccaatccatctcgc	AB5075 genomic DNA; 2kb downstream of the <i>cysI</i> gene
	mlo-28	gcggcgaaagcggcgcgaaagcggccaccagctctctaaagggtgaagaactgttcacogg	pASG1; <i>sfgfp</i> (with linker)
	mlo-29	tcatgagctcagccaatcgactgg	pASG1; end of the <i>ApraR</i> cassette
<i>hns-sfgfp_aac</i>	mlo-26	ttaccgatgcaactagcc	AB5075 genomic DNA; 2kb upstream of the <i>hns</i> gene
	mlo-27	gcttcgcgcgcgtctgcgcgcgtgcgcggttaagaatacttcaagtttgcacc	AB5075 genomic DNA; 3' of <i>hns</i> gene for N-ter fusion (linker)
	mlo-30	ccagtcgattggctgagctcatgagcctcttaaaaagccaagcg	AB5075 genomic DNA; <i>hns</i> intergenic region
	mlo-31	tcctcatgtttggcgcatagg	AB5075 genomic DNA; 2kb downstream of the <i>hns</i> gene
<i>hu-sfgfp_aac</i>	mlo-32	tttgaacgtgtctcggc	AB5075 genomic DNA; 2kb upstream of the <i>hu</i> gene
	mlo-33	gctttcgcgcgcgtctgcgcgcgtgcgcgagcaactgaatctttaagaacttacc	AB5075 genomic DNA; 3' of <i>hu</i> gene for N-ter fusion (linker)
	mlo-34	ccagtcgattggctgagctcatgataaaccgcgccaatataggc	AB5075 genomic DNA; <i>hu</i> intergenic region
	mlo-35	tgtgaccacgagatggcgg	AB5075 genomic DNA; 2kb downstream of the <i>hu</i> gene
	mlo-57	taggtactaccaactcatgig	AB5075 genomic DNA; 2kb upstream of the <i>dnaK</i> gene
<i>dnaK-sfgfp_aac</i>	mlo-58	gctttcgcgcgcgtctgcgcgcgtgcgcgtttttgtcatctttacttcagtg	AB5075 genomic DNA; 3' of <i>dnaK</i> gene for N-ter fusion (linker)
	mlo-59	ccagtcgattggctgagctcatgaagacgcgcgaaagcgc	AB5075 genomic DNA; <i>dnaK</i> intergenic region
	mlo-60	aatacatcagcttggcc	AB5075 genomic DNA; 2kb downstream of the <i>dnaK</i> gene
	mlo-62	ctgctcagctgagtcgcg	AB5075 genomic DNA; 2kb upstream of the <i>rpsA</i> gene
<i>rpsA-sfgfp_aac</i>	mlo-63	gctttcgcgcgcgtctgcgcgcgtgcgcgttcattgtgcttgatcaagtcacc	AB5075 genomic DNA; 3' of <i>rpsA</i> gene for N-ter fusion (linker)
	mlo-64	ccagtcgattggctgagctcatgaactgaactgaacggtagcg	AB5075 genomic DNA; <i>rpsA</i> intergenic region
	mlo-65	gagttagggtggattgc	AB5075 genomic DNA; 2kb downstream of the <i>rpsA</i> gene
<i>fis-sfgfp_aac</i>	mlo-67	ccagatgtccgatgcgtc	AB5075 genomic DNA; 2kb upstream of the <i>fis</i> gene

	mlo-68	gcttcgccgcgcgtctgcgcgcgcgtgcgcgcgttcacatcattaaacgcgtgagc	AB5075 genomic DNA; 3' of <i>fis</i> gene for N-ter fusion (linker)
	mlo-69	ccagtcgattggcgtgagctcatgaaatgctcacgcgtctgc	AB5075 genomic DNA; <i>fis</i> intergenic region
	mlo-70	cgctgcttcacgcgcagc	AB5075 genomic DNA; 2kb downstream of the <i>fis</i> gene
<i>hu::sacB_aac</i>	mlo-32	tftgaacgtgtgtctcgcc	AB5075 genomic DNA; 2kb upstream of the <i>hu</i> gene
	asg-57	cggcagggtatgtgtagtggtgatagattgaagcaacgaatctttaagacc	AB5075 genomic DNA; 3' of <i>hu</i> gene
	mlo-29	tcatgagctcagccaatcgactgg	pMHL-2; <i>aac</i> gene
	asg-58	atcaccatcacatatactctgcgcg	pMHL-2; <i>sacB</i> gene (chimeric primer)
	mlo-34	ccagtcgattggctgagctcatgataaacgcgcgccaatatagcc	AB5075 genomic DNA; <i>hu</i> intergenic region
<i>hu-sfgfp</i>	mlo-35	tgtgaccacgagattggcgg	AB5075 genomic DNA; 2kb downstream of the <i>hu</i> gene
	mlo-32	tftgaacgtgtgtctcgcc	AB5075 <i>hu-sfGFP_aac</i> genomic DNA; 2kb upstream of the <i>hu</i> gene
	asg-59	gaagcagctccagcctacacaatc	AB5075 <i>hu-sfGFP_aac</i> genomic DNA; <i>sfgfp</i> gene
	asg-60	gattgttaggtggagctgcttaaacgcgcgccaatatagcc	AB5075 <i>hu-sfGFP_aac</i> genomic DNA; <i>sfgfp</i> gene and intergenic region downstream <i>hu</i> gene
	mlo-35	tgtgaccacgagattggcgg	AB5075 <i>hu-sfGFP_aac</i> genomic DNA; 2kb downstream of the <i>hu</i> gene
Primers for pASG-1 construction			
	asg-1	atatcatatgtctaaaggtaagaactgttcacgg	annealing on sfGFP gene, NdeI site
	asg-4	ggaacttcgaagcagctccagcctcacacaatcttattgtagatcctcatgcgtgc	annealing downstream sfGFP gene
	Apr_Fw3	gattgttaggtggagctgctcgaagtctccatcaaggcccgatcctgtgagcccttg	annealing upstream of Apramycin resistance gene
	asg-3	atataaagctgtcgactcatgagctcagccaatcgactgg	annealing downstream of Apramycin resistance gene, HindIII/Sall site

References

- Jacobs AC, Thompson MG, Black CC, Kessler JL, Clark LP, McQueary CN, Gancz HY, Corey BW, Moon JK, Si Y, Owen MT, Hallock JD, Kwak YI, Summers A, Li CZ, Rasko DA, Penwell WF, Honnold CL, Wise MC, Waterman PE, Lesho EP, Stewart RL, Actis LA, Palys TJ, Craft DW, Zurawski DV. 2014. AB5075, a Highly Virulent Isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a Model Strain for the Evaluation of Pathogenesis and Antimicrobial Treatments. *mBio* 5:e01076–14.
- Wilharm G, Skiebe E, Higgins PG, Poppel MT, Blaschke U, Leser S, Heider C, Heindorf M, Brauner P, Jäckel U, Böhländ K, Cuny C, Łopińska A, Kaminski P, Kasprzak M, Bochenki M, Ciebiała M, Tobółka M, Żohierowicz KM, Siekiera J, Seifert H, Gagné S, Salcedo SP, Kaatz M, Layer F, Bender JK, Fuchs S, Semmler T, Pfeifer Y, Jerzak L. Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide. *Environ Microbiol* 19:4349–4364.

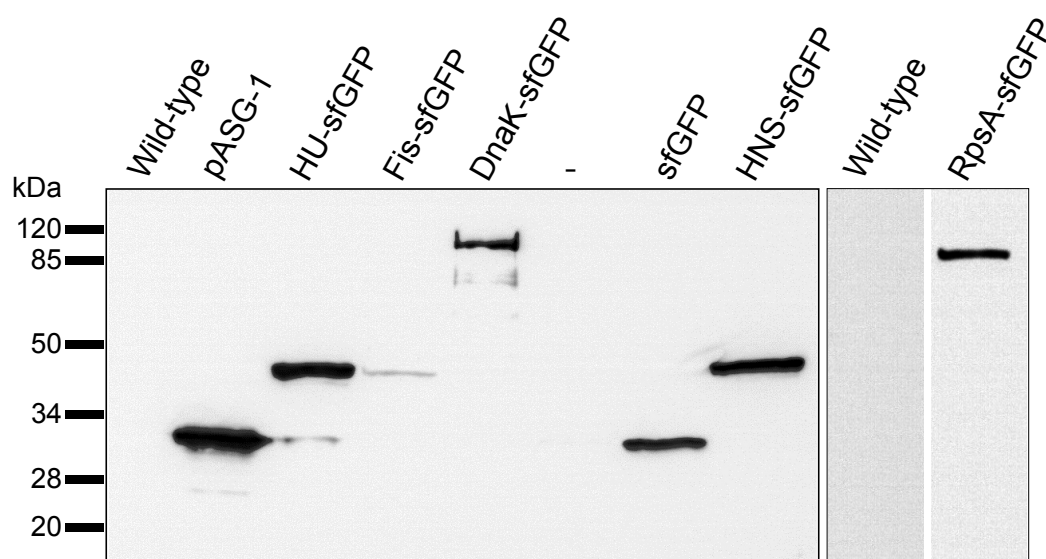


Figure S1. Immunoblotting performed on whole bacterial lysates from the various sfGFP constructs compared to the wild-type strain (WT).

Molecular mass standards are indicated in kilodaltons on the left side of the panel. Two independent western blots are delimited by black frames.

Each protein presented an apparent size corresponding to their theoretical molecular weight namely 27KDa for free sfGFP (expressed from a multicopy plasmid pASG-1), 37,2 KDa for HU-sfGFP, 38,2 KDa for Fis-sfGFP, 96,2 KDa for DnaK-sfGFP, 27KDa for free sfGFP (expressed from a neutral chromosomal locus, *cysI*), 40,7KDa for HNS-sfGFP, 89,2KDa for RpsA-sfGFP (MW of the chimeric proteins including the 10 amino-acid linker).

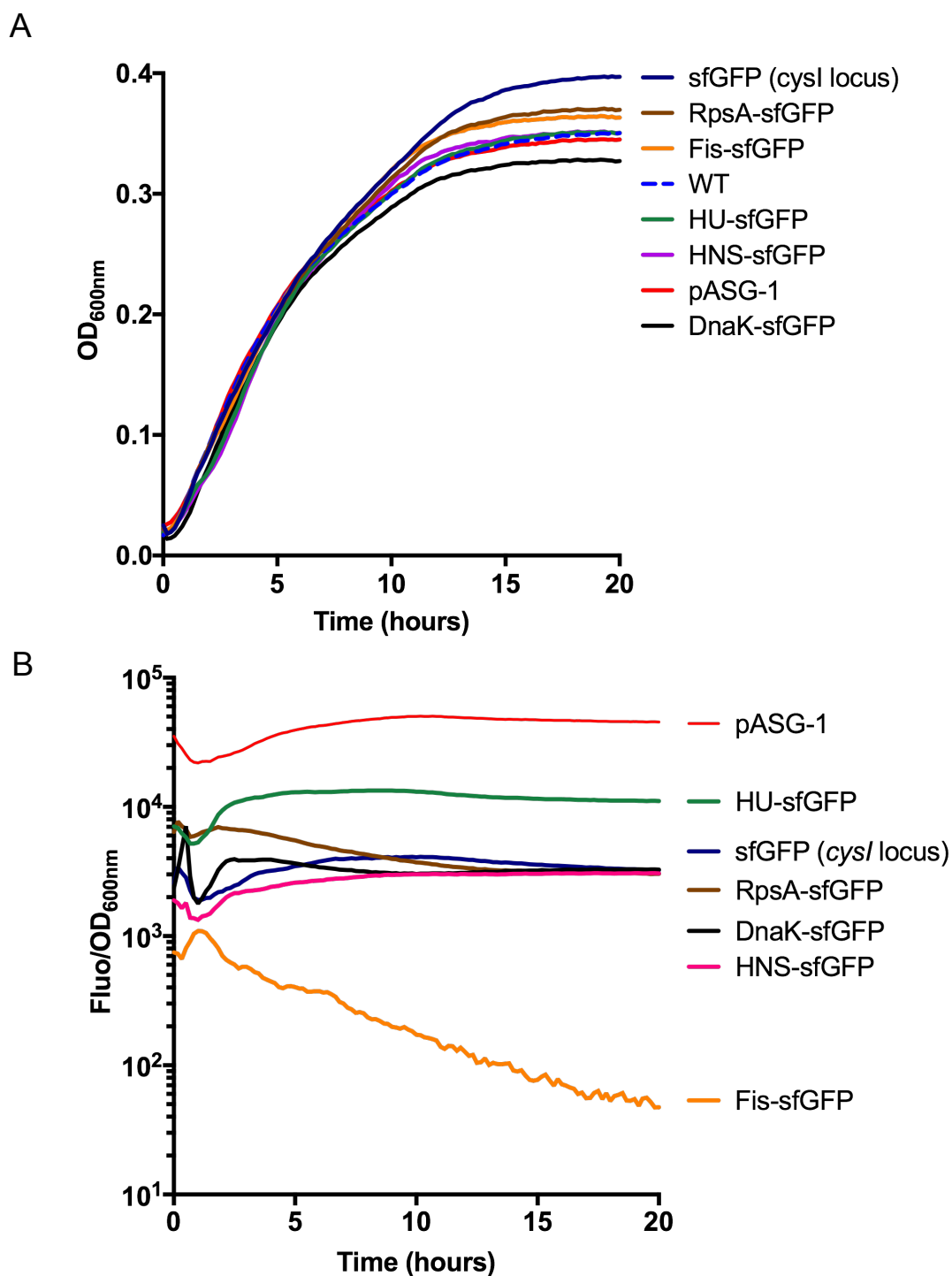


Figure S2. Growth and relative fluorescence during growth in liquid medium of AB5075 strain expressing various fluorescent markers

A. Bacterial growth curves throughout time of the seven fluorescent strains carrying either a multicopy plasmid (pASG-1) or chromosomal constructs (GFP expressed from a neutral locus (*cysI*), or GFP protein fusions) and of the wild type strain (WT). All strains were grown in tryptone-NaCl medium at 37°C.

B. Relative fluorescence to cell density of each strains (autofluorescence subtracted). Green fluorescence and optical density were monitored using a 96-well plate reader.

A representative experiment is shown. For each graph, the legends are ordered from up to bottom as curves appear on the graphic.

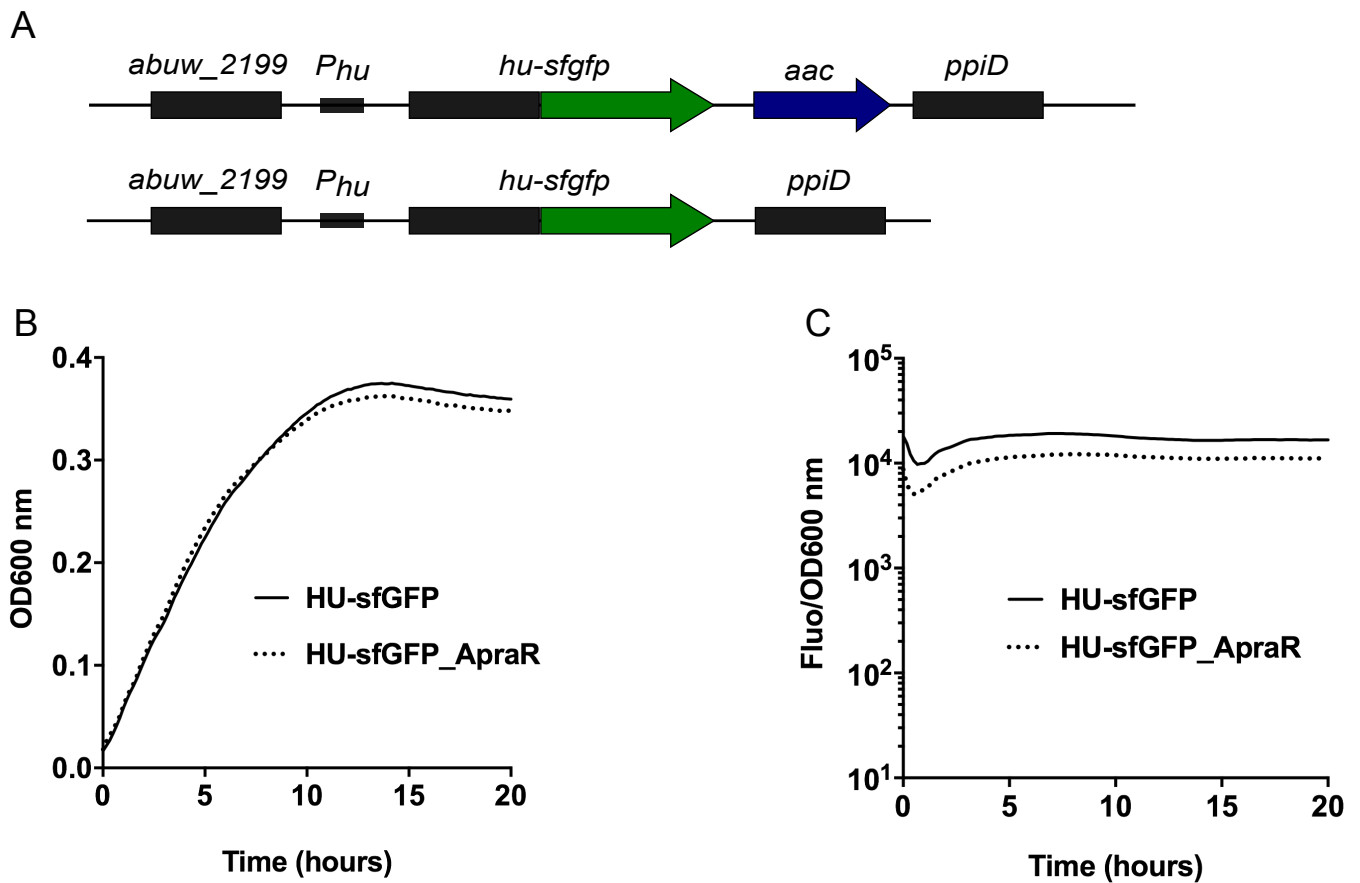


Figure S3. Validation of chromosomal HU-sfGFP marker without antibiotic resistance gene
 A. Schematic representation of genetic constructions encoding for the *hu-sfgfp* markers with and without Apramycin resistance cassette (*aac*). The upstream and downstream genes of the *hu* gene are represented (respectively *abu_w_2199* and *ppiD* genes).
 Bacterial growth curves (B) and fluorescence relative to cell density (C) throughout time of both fluorescent strains grown in Tryptone-NaCl medium at 37°C. Bacterial green fluorescence and optical density (OD600nm) were monitored using a 96-well plate reader.
 A representative experiment is shown.

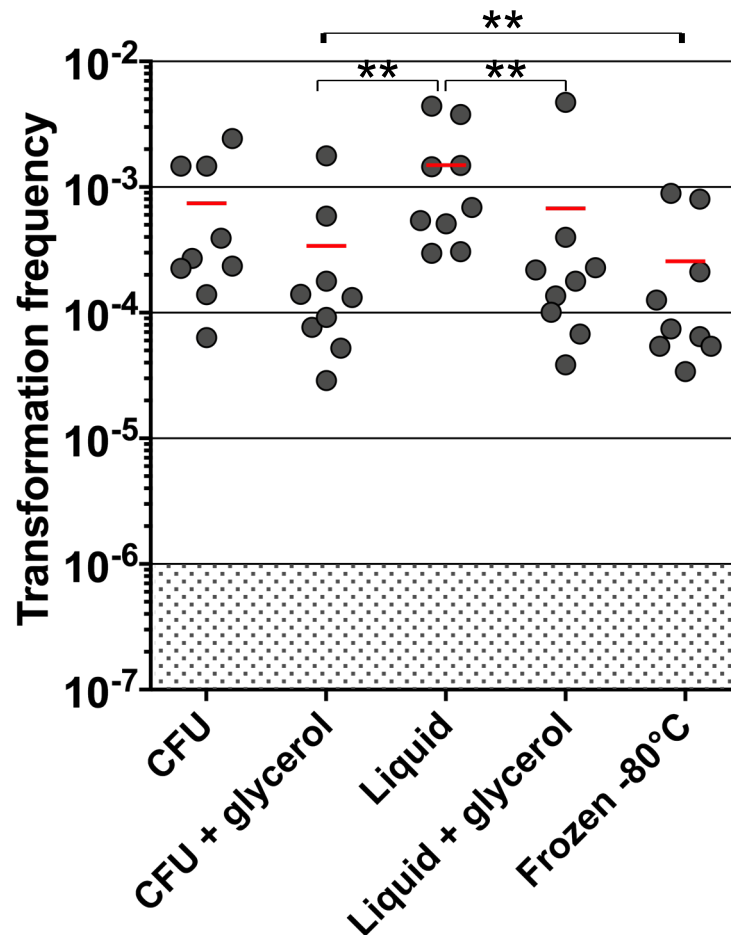


Figure S4. Effect of bacterial culture medium (agar or liquid) or storage (frozen) conditions prior to transformation.

- CFU: bacteria were grown on solid media (LB agar) and one colony forming unit (CFU) was resuspended in water prior to transformation assay.
 - Liquid: bacteria were grown overnight in liquid medium (LB) prior to transformation.
 - Frozen -80°C: after overnight growth in liquid LB, glycerol was added to a 30% final concentration and bacteria were stored at -80°C until resuspension in water prior to transformation assay.
- When “+ glycerol” is indicated, glycerol was added to a final concentration of 30%.

A total of nine independent transformation assays were performed on three separate occasions. The horizontal lines represent means for each condition. Comparison two by two using the non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test (two tailed) between the various conditions gave *p*-values <0.01 (**). The limit of detection (10⁻⁶) is indicated by a shaded grey area.

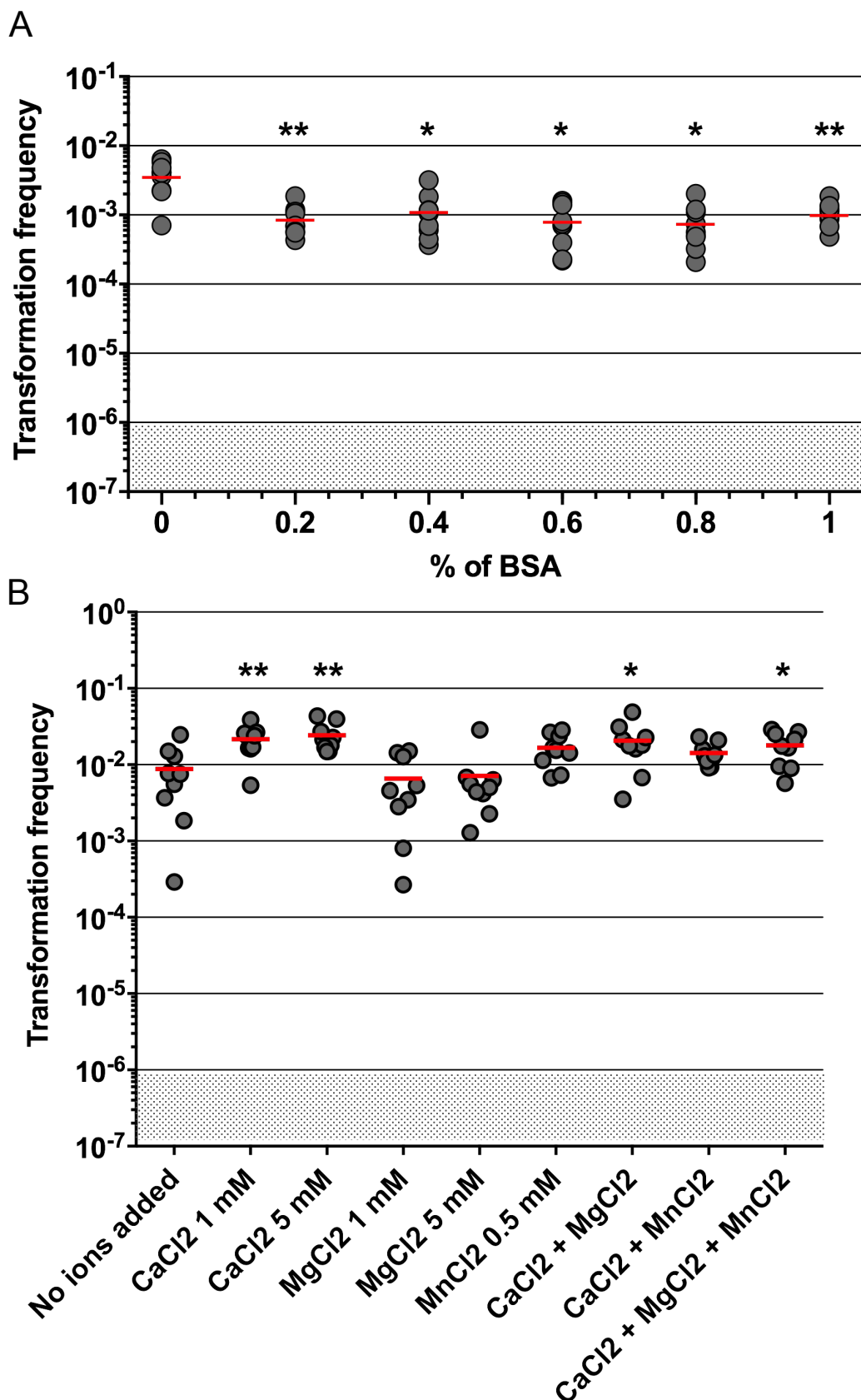


Figure S5. Effect of BSA and divalent cations on transformation

A. Effect of increasing concentrations of BSA on transformation efficiencies

B. Effect of divalent cations (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+}) on transformation efficiencies. Concentration are indicated in mM.

A total of nine independent transformation assays were performed on three separate occasions.. The horizontal lines represent means for each conditon. The limit of detection (10^{-6}) is indicated by a shaded grey area.

Comparison to the control condition (no BSA or no added cations) using the non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon (two tailed) test gave p -values <0.01 (**) or <0.05 (*), other comparisons gave p -values >0.05 .

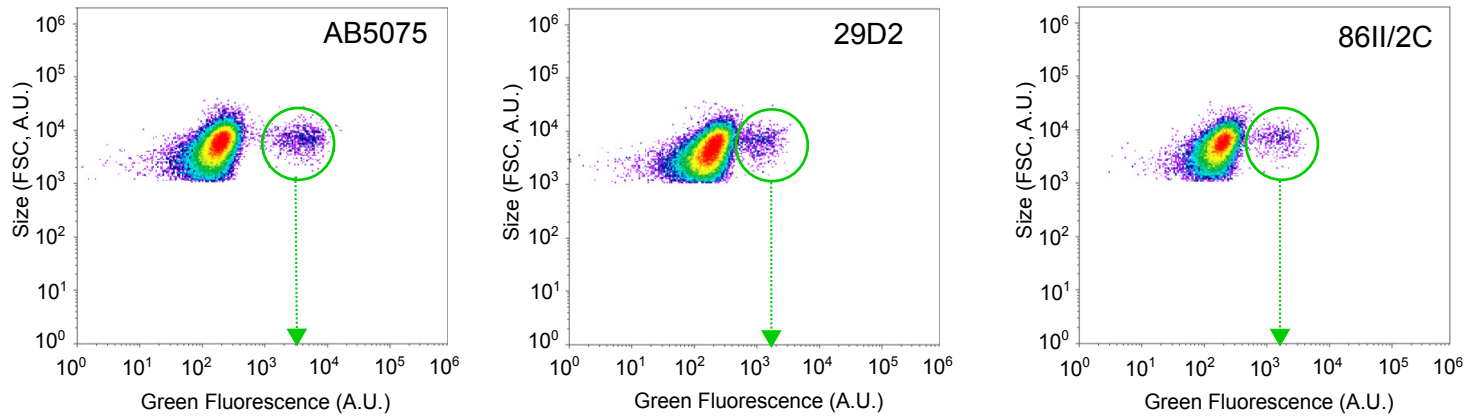


Figure S6. Intensity of green fluorescence in various strain background after transformation with HU-sfGFP marker.

Bacterial cells were recovered after transformation with pASG-5 plasmid of AB5075, 29D2 and 86II/2C strains and subjected to flow cytometry analysis. Density plots for green fluorescence intensity (abscissa) and size (FSC, ordinate) are shown (log scales). Among all the strains tested, transformed cells from strains 29D2 and 86II/2C presented a lower green fluorescence intensity in comparison to the reference strain (AB5075) as underlined by the green arrows. A representative experiment is shown.

2. L'élimination sans cicatrice des grands îlots de résistance AbaR entraîne une sensibilité aux antibiotiques et une transformabilité naturelle accrue chez *Acinetobacter baumannii*.

2.1. Contexte :

La résistance aux antibiotiques est un problème majeur chez *A. baumannii*, et en particulier chez les isolats cliniques provoquant des infections nosocomiales (Dijkshoorn et al., 2007). L'un des contributeurs majeurs de cette résistance aux antibiotiques pourrait être la présence d'un îlot de résistance AbaR inséré dans le chromosome de la bactérie. En effet, les îlots AbaRs contiennent de nombreux gènes de résistance et se retrouvent souvent associés au caractère MDR des isolats cliniques d'*A. baumannii*. De la même manière, les îlots AbaRs sont également connus pour porter plusieurs gènes de résistance aux métaux lourds, comme par exemple l'opéron de résistance à l'arsenate, l'opéron de résistance au zinc et au cadmium, dont au moins une copie est présente dans les îlots AbaRs, ou encore le module de résistance au mercure et organomercurel (Fournier et al., 2006; Hamidian and Hall, 2018). Cependant, malgré la forte augmentation de données génomiques, il n'existe pas de données expérimentales sur la réelle contribution des îlots AbaRs dans l'expression d'un phénotype de résistance aux antibiotiques ou aux métaux lourds, à l'exception de travaux réalisés en 2012 par M. Kochar et ses collègues (Kochar et al., 2012). Dans ceux-ci, des mutants ayant été délétés de leur AbaR (AbaR23, initialement appelé TnAbaR27 dans Kochar et al., 2012) présentaient alors une sensibilité nettement accrue au sulfaméthoxazole, en adéquation avec la perte des deux copies du gène *sul1* présentes dans l'AbaR, une augmentation mineure et variable de la sensibilité à la tétracycline due à la perte des gènes *tetAR(A)* également présents dans l'AbaR, mais également une augmentation inattendue de la résistance à la ciprofloxacine. Toutefois, il est à noter que la délétion de l'AbaR chez ces mutants fût réalisée par remplacement allélique avec une cassette contenant le gène *aacC1* conférant une résistance à la gentamycine, n'excluant pas de potentielles interférences avec l'analyse du profil de résistance des mutants obtenus.

Au-delà de leur composition en gènes de résistance, les îlots AbaRs sont également caractérisés par le fait qu'ils interrompent le gène *comM* lorsqu'ils sont présents dans le chromosome bactérien. Or, *A. baumannii* est aujourd'hui connue comme une bactérie naturellement transformable et le gène *comM* est un gène participant de manière non essentielle à ce mécanisme chez *A. baylyi* (Nero et al., 2018). En outre, nous avons démontré dans nos travaux précédents que la transformation naturelle était répandue parmi les isolats cliniques d'*A. baumannii*. Cependant, aucune étude de la conséquence de cette interruption sur la physiologie de la bactérie n'a été réalisée.

2.2. Objectifs :

Dans ces travaux nous avons évalué la contribution d'îlots AbaR à la résistance aux antibiotiques de deux souches cliniques d'origine humaine appartenant au GC1 : (i) la souche *A. baumannii* AYE portant l'îlot AbaR1 de 86-Kbp comprenant une région de résistance MARR très complète en termes de gènes de résistance aux antibiotiques et métaux lourds (Fournier et al., 2006), et (ii) la souche *A. baumannii* AB5075 portant l'îlot AbaR11 (Jacobs et al., 2014), un AbaR particulier dont la forme Tn6019::Tn6018 ne contient pas de région de résistance MARR. Dans cette optique, nous avons opté pour une stratégie de modification du génome « sans cicatrice » conduisant à la suppression de l'AbaR du chromosome tout en permettant la reconstruction du gène *comM*. Nous avons donc ensuite comparé souche sauvage et mutant délété de son AbaR afin de caractériser à la fois la contribution de cet îlot dans le phénotype de résistance, mais également les conséquences de la présence de l'AbaR chez la bactérie sur le mécanisme de transformation naturelle.

Le travail effectué est présenté à la fin de ce chapitre sous la forme d'un article scientifique publié dans *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* en 2020.

2.3. Résultats principaux et discussion :

Nous avons mis au point une méthode afin de produire les mutants de délétion d'un AbaR chez les souches *A. baumannii* AB5075 et *A. baumannii* AYE sans laisser de marques. Celle-ci repose sur l'utilisation de produits PCR (*Polymerase Chain Reaction*) chimères et exploite la transformation naturelle, un mécanisme que nous avons auparavant mis en évidence chez ces souches (voir chapitre précédent et Godeux et al. 2018). La modification chromosomique s'effectue en deux étapes successives : le remplacement de l'îlot AbaR par une cassette de gènes spécifique, puis son remplacement par le segment d'ADN contenant la modification souhaitée.

La première étape consiste donc d'abord à générer la cassette de remplacement de l'îlot AbaR puis son insertion dans le génome par transformation naturelle. Pour cela, nous avons produit un produit PCR chimère contenant une cassette de contre-sélection, le gène *sacB* de sensibilité au sucrose et le marqueur de sélection *aacC4* conférant la résistance à l'apramycine, le tout flanqué de deux séquences d'ADN identiques aux régions amont et aval de l'îlot AbaR, soit les régions d'ADN entourant et contenant le gène *comM*. Le produit PCR chimérique ainsi obtenu est ensuite utilisé comme substrat de la transformation naturelle chez les souches AB5075 et AYE sauvages. La présence des régions d'homologie permet la recombinaison de la cassette dans le chromosome, provoquant alors le remplacement de l'îlot AbaR par la séquence *sacB_aacC4*. Cet événement peut alors être sélectionné par l'expression d'un phénotype de résistance à l'apramycine. La seconde étape consiste à remplacer

la cassette par la séquence souhaitée, ici le gène *comM* intègre (ou une version contenant une délétion). Pour cela, un second produit PCR chimérique est généré, contenant la séquence du gène *comM* flanquée par les mêmes régions d'homologie que précédemment. Les transformants ayant subi un remplacement de la cassette et la reconstruction du gène *comM* sont sélectionnés par la perte du gène *sacB* de sensibilité au sucrose.

Une fois les mutants de délétion des AbaRs obtenus, nous avons tout d'abord comparé leur profil de résistance aux antibiotiques avec ceux de la souche sauvage portant l'AbaR. Chez le mutant de la souche AB5075, les profils de résistance à 14 antibiotiques appartenant à cinq classes d'antibiotiques furent identiques à ceux retrouvés chez la souche sauvage. Ceci s'explique par l'absence de la région de résistance MARR dans l'AbaR de cette souche. A l'inverse, chez le mutant de la souche AYE, la délétion de l'AbaR permet de restaurer la sensibilité aux aminosides, à la tétracycline et au sulfonamide, en adéquation avec la perte de l'îlot contenant des gènes de résistance à ces antibiotiques. Nous avons également observé une diminution partielle à d'autres antibiotiques tels que la ticarcilline, à la ceftazidime, à la céfépime, à l'aztréonam ou aux β -lactames, probablement du fait de mécanismes de résistance additionnels présents chez la souche AYE.

Enfin, nous avons comparé la capacité de transformation naturelle entre la souche sauvage et le mutant délété d'AbaR. Pour cela, nous avons mesuré les fréquences de transformation de chaque souche pour un marqueur génétique donné, le gène *rpoB* contenant une mutation ponctuelle conférant une résistance à la rifampicine. Nous avons alors pu observer que la reconstruction du gène *comM* provoque une augmentation significative de la capacité à acquérir le marqueur génétique avec une augmentation moyenne d'environ 1000 fois dans le mutant AB5075 et d'environ 300 fois dans le mutant AYE. Ainsi, l'acquisition d'un îlot AbaR chez une souche d'*A. baumannii* peut augmenter la résistance aux antibiotiques, mais au prix d'une diminution de la capacité à effectuer la transformation naturelle. L'acquisition d'un AbaR pourrait donc avoir un impact important sur l'évolution du génome d'*A. baumannii*. D'un point de vue appliqué, les mutants obtenus présentent l'avantage d'être efficacement transformables, ce qui les rend plus facilement génétiquement manipulables.

2.4. Elément complémentaires :

2.4.1. Résistance aux métaux lourds associée aux îlots AbaRs.

Les bactéries *Acinetobacter* présentent également souvent des résistances aux métaux lourds tels que le nickel, le mercure, le zinc (Deshpande et al., 1993; Dhakephalkar and Chopade, 1994) ou encore le cuivre (Williams et al., 2016). En complément des analyses des profils d'antibiorésistance des mutants AB5075 et AYE délétés des AbaRs, nous avons également comparé leurs profils de résistance à différents métaux lourds : cadmium (Cd), nickel (Ni), cuivre (Cu) et zinc (Zn). En effet, les AbaRs sont souvent porteurs de modules ou de gènes de résistance aux métaux lourds, en particulier les AbaRs

dérivant de l'AbaR0 tels que l'AbaR11 de la souche AB5075 ou l'AbaR1 de la souche AYE. Ceux-ci possèdent un squelette formé par le *Tn6019* contenant un module de résistance à l'arsenate, et au moins une copie du transposon *Tn6018* contenant des gènes de résistance au cadmium et au zinc (Fournier et al., 2006; Post et al., 2010). D'autres gènes de résistance aux métaux lourds peuvent être présents dans la région de résistance comme par exemple l'opéron de gènes de résistance au mercure dans l'AbaR1 (Fournier et al., 2006).

Pour réaliser cette analyse, différents disques contenant une solution du métal lourd d'intérêt à une concentration donnée (CdCl₂ 25mM, NiCl₂ 50mM, CuSO₄ 500mM ou ZnCl₂ 250mM) ont été déposés sur des géloses sur lesquelles les bactéries avaient été étalées au préalable. Après incubation à 37°C pendant environ 18 heures, les diamètres de la zone d'inhibition autour des disques déposés sur les géloses ont été mesurés puis comparés (**tableau 1**). Bien que l'expérience n'ait pas permis de quantifier le niveau de résistance présenté par les souches, aucune différence n'a pu être observée entre les mutants AB5075-T et AYE-T, et leurs équivalents sauvages porteurs d'AbaRs (WT). Ces résultats suggèrent que les gènes de résistances présents dans ces AbaRs pourraient ne pas être suffisamment exprimés pour contribuer à l'expression du phénotype de résistance chez leurs hôte bactérien, ou bien être redondants par rapport à d'autres gènes de résistance déjà présents dans le génome de la bactérie. La présence de gènes de résistance aux métaux lourds qui pourraient ne pas être exprimés pourraient être dû à un phénomène de co-sélection qui se produit lorsque les gènes de résistance aux métaux lourds et les gènes de résistance aux agents antimicrobiens sont physiquement liés ou bien situés à proximité les uns des autres sur des éléments génétiques mobiles tels que les îlots génomiques (Seiler and Berendonk, 2012).

Métal lourd ^a	Diamètre de la zone d'inhibition (mm) ^b			
	AB5075 WT	AB5075-T	AYE WT	AYE-T
CdCl ₂	20,2	20,8	21	21,3
ZnCl ₂	16,8	17,2	16,9	16,3
NiCl ₂	20,2	20,8	20,1	19,6
CuSO ₄	16,5	17,5	16,4	16,1

^aCdCl₂ 25mM (Cadmium), NiCl₂ 50mM (Nickel), CuSO₄ 500mM (Cuivre), ZnCl₂ 250mM (Zinc).

^bWT, wild-type ; AB5075-T, souche AB5075 sans AbaR11 ; AYE-T, souche AYE sans AbaR1.

Tableau 2 : Profils de résistance aux métaux lourds des souches AB5075 et AYE dont les îlots AbaRs ont été délétés en comparaison avec les souches sauvages.

Les AbaRs pourraient ainsi fournir un contexte génétique favorable à cette co-sélection, en particulier chez des souches cliniques soumises à de fortes pressions antibiotiques et permettre aux gènes de résistances aux métaux lourds de persister dans ces souches malgré l'absence d'expression des gènes ou l'absence d'une pression de sélection spécifique. Une hypothèse intéressante proposée par Bazzi et al., serait que les mécanismes de résistance aux métaux lourds chez les bactéries *Acinetobacter* pourraient également participer à l'expression d'un phénotype de résistance aux antimicrobiens, ce qui constituerait une voie potentielle à l'origine de ces résistances (Bazzi et al., 2020). Cependant, ce sujet complexe est encore peu exploré.

2.4.2. Délétion de l'AbaR1 de la souche AYE.

De façon intéressante, la souche AYE délétée de l'AbaR fût plus complexe à obtenir que pour la souche AB5075. En effet, dans les premières tentatives de délétion de l'îlot, nous avons utilisé un plasmide non réplcatif afin de véhiculer le produit PCR chimérique contenant la cassette *sacB_aacC4*. Toutefois, après avoir vérifié l'insertion de la cassette chez les transformants obtenus par PCR de contrôle, nous avons observé que le plasmide avait en réalité été entièrement intégré au chromosome. Ce phénomène est vraisemblablement le fait d'un événement de recombinaison site spécifique de type Campbell (Leenhouts et al., 1989; Young, 1983) du plasmide au niveau de la première moitié du gène *comM* située en amont de l'îlot AbaR. Nous avons donc été contraint d'utiliser uniquement des produits PCR pour réaliser la transformation naturelle.

Nous avons également observé que malgré une capacité à réaliser la transformation naturelle équivalente chez les deux souches AB5075 et AYE, l'événement de remplacement de l'îlot AbaR par la cassette s'effectuait plus rarement chez AYE que chez AB5075, le nombre de transformants obtenus étant beaucoup plus faible. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'îlot AbaR de la souche AYE est d'une taille beaucoup plus importante que celui de la souche AB5075, et que les contraintes physiques exercées lors de la recombinaison de la cassette dans le chromosome sont plus importantes.



Scarless Removal of Large Resistance Island AbaR Results in Antibiotic Susceptibility and Increased Natural Transformability in *Acinetobacter baumannii*

Anne-Sophie Godeux,^{a,b} Elin Svedholm,^a Agnese Lupo,^c  Marisa Haenni,^c Samuel Venner,^d  Maria-Halima Laaberki,^{a,b}  Xavier Charpentier^a

^aCIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, CNRS UMR5308, ENS de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

^bUniversité de Lyon, VetAgro Sup, Marcy-l'Étoile, France

^cUnité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Université de Lyon—ANSES Site de Lyon, Lyon, France

^dLaboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, CNRS UMR5558, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

Maria-Halima Laaberki and Xavier Charpentier contributed equally.

ABSTRACT With a great diversity in gene composition, including multiple putative antibiotic resistance genes, AbaR islands are potential contributors to multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. However, the effective contribution of AbaR to antibiotic resistance and bacterial physiology remains elusive. To address this, we sought to accurately remove AbaR islands and restore the integrity of their insertion site. To this end, we devised a versatile scarless genome editing strategy. We performed this genetic modification in two recent *A. baumannii* clinical strains: the strain AB5075 and the nosocomial strain AYE, which carry AbaR11 and AbaR1 islands of 19.7 kbp and 86.2 kbp, respectively. Antibiotic susceptibilities were then compared between the parental strains and their AbaR-cured derivatives. As anticipated by the predicted function of the open reading frame (ORF) of this island, the antibiotic resistance profiles were identical between the wild type and the AbaR11-cured AB5075 strains. In contrast, AbaR1 carries 25 ORFs, with predicted resistance to several classes of antibiotics, and the AYE AbaR1-cured derivative showed restored susceptibility to multiple classes of antibiotics. Moreover, curing of AbaRs restored high levels of natural transformability. Indeed, most AbaR islands are inserted into the *comM* gene involved in natural transformation. Our data indicate that AbaR insertion effectively inactivates *comM* and that the restored *comM* is functional. Curing of AbaR consistently resulted in highly transformable and therefore easily genetically tractable strains. Emendation of AbaR provides insight into the functional consequences of AbaR acquisition.

KEYWORDS AbaR, *Acinetobacter baumannii*, natural transformation, resistance island

Acinetobacter baumannii is responsible for health care-associated infections and concerns because of its intrinsic resistance to many antimicrobials and its ability to acquire resistance genes (1, 2). A potential contributor to multidrug resistance in *A. baumannii* is a genomic island, named AbaR, with a great diversity in gene content and carrying multiple putative antibiotic resistance genes (3, 4). The first report of AbaR described a large genomic island of 86 kbp in the epidemic *A. baumannii* strain AYE in 2006 (5). With a transposon backbone, AbaR islands are considered mobile genetic elements and present a modular structure (3, 4, 6). Although AbaR may contain up to 25 putative antibiotic resistance genes, most AbaR carry genes predicted to confer resistance mainly to aminoglycosides, tetracycline, and sulfonamide (4, 6, 7). Despite increasing genomic data, the actual contribution of AbaR-type islands to antibiotic

Citation Godeux A-S, Svedholm E, Lupo A, Haenni M, Venner S, Laaberki M-H, Charpentier X. 2020. Scarless removal of large resistance island AbaR results in antibiotic susceptibility and increased natural transformability in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 64:e00951-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00951-20>.

Copyright © 2020 Godeux et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Maria-Halima Laaberki, maria-halima.laaberki@vetagro-sup.fr.

Received 11 May 2020

Returned for modification 29 May 2020

Accepted 27 July 2020

Accepted manuscript posted online 10 August 2020

Published 21 September 2020

resistance has not been fully evaluated. Deletion mutants of the AbaR27 island (originally published as TnAbaR23) were previously obtained and revealed a restored susceptibility to sulfamethoxazole and a partial increased susceptibility to tetracycline (4, 8). The authors also suggested a paradoxical role of AbaR27 in increasing susceptibility to ciprofloxacin. However, deletions of AbaR27 were obtained by allelic replacement of this AbaR with the *aacC1* cassette, conferring resistance to gentamicin and confounded susceptibility testing against aminoglycosides. In addition, the original insertion site of AbaR was not restored, which prevented analysis of the physiological consequence of the insertion of AbaR in the targeted gene. AbaR islands are found inserted in the *comM* gene (4). This gene encodes a putative ATPase involved in natural transformation in a few transformable species, including nonpathogenic *Acinetobacter baylyi* (9, 10). Natural transformation allows bacteria to actively import exogenous DNA, and if the sequence of the imported DNA presents sufficient identity, it integrates into the recipient cell's chromosome by homologous recombination (11, 12). Interestingly, the *comM* gene is not strictly essential for transformation, but its mutation decreases the transformation efficiency by 2 orders of magnitude (9, 10). *A. baumannii* and related species *A. nosocomialis* were described as transformable in 2013 (13, 14). In *A. baumannii*, natural transformation appears as a conserved trait among clinical and nonclinical isolates of human and animal origin (13, 15, 16), providing the bacteria with a major route for acquisition of antibiotic resistance genes.

In this study, we aim at assessing the contribution of AbaR islands to antibiotic resistance of two human clinical strains of the main global clone 1 bearing small and large AbaRs. We also analyzed the consequences of AbaR-mediated *comM* gene disruption on the transformation efficiency of these strains. We bring evidence that interruption of the *comM* gene by AbaR results in a decrease in natural transformation. Using genetic approaches, we further confirm a role for the *comM* gene in natural transformation in *A. baumannii*.

RESULTS AND DISCUSSION

Curing AbaR in *A. baumannii* using a scarless genome editing strategy. To cure *A. baumannii* of the AbaR island while restoring the original insertion site, we devised a scarless genome editing strategy. This method, depicted in Fig. 1, allows deletion, insertion, or single-base mutation. In contrast to other methods, it does not require cloning or prior genetic engineering of the target strain (17–19). Rather, it relies on the use of chimeric PCR products and takes advantage of natural transformation, a phenotypic trait exhibited by most isolates of *A. baumannii*. The method is based on a two-step selection (Fig. 1): first the introduction of a selectable/counterselectable *sacB_aacC4* cassette at the loci of interest (Fig. 1B), and then the replacement of the cassette by the desired sequence (Fig. 1C). First, a chimeric PCR product is assembled, consisting of the *sacB_aacC4* cassette bearing a selection marker (*aacC4*) conferring resistance to apramycin, flanked by 2-kbp-long sequences identical to the target region (Fig. 1B). This chimeric PCR product is introduced by natural transformation, and *A. baumannii* transformants are selected using apramycin, an antibiotic to which most clinical isolates are sensitive. A second PCR product is assembled, still carrying the homologous flanking regions but whose sequence is designed to produce deletion, insertion, or single-base mutation (deletion in Fig. 1C). Genetic replacement and the loss of the previously inserted *sacB* gene is then selected using sucrose resistance selection. We applied this method to delete AbaR11 in strain AB5075. The strain AB5075 is an *A. baumannii* ST1 strain isolated from a bone infection in 2008 with multidrug resistance (aminoglycosides, fluoroquinolones, and β -lactams, including carbapenems) (20). This strain bears a 19.7-kbp-long AbaR11 inserted in the *comM* gene with 19 predicted genes corresponding to five modules found in other AbaRs (Fig. 2A) (4, 8, 21). In a previous study, we identified the strain AB5075 as naturally transformable (15). Using natural transformation of PCR chimeric products, the AbaR island was replaced upon genetic recombination by the *sacB_aacC4* cassette (Fig. 2B). Then, the strain

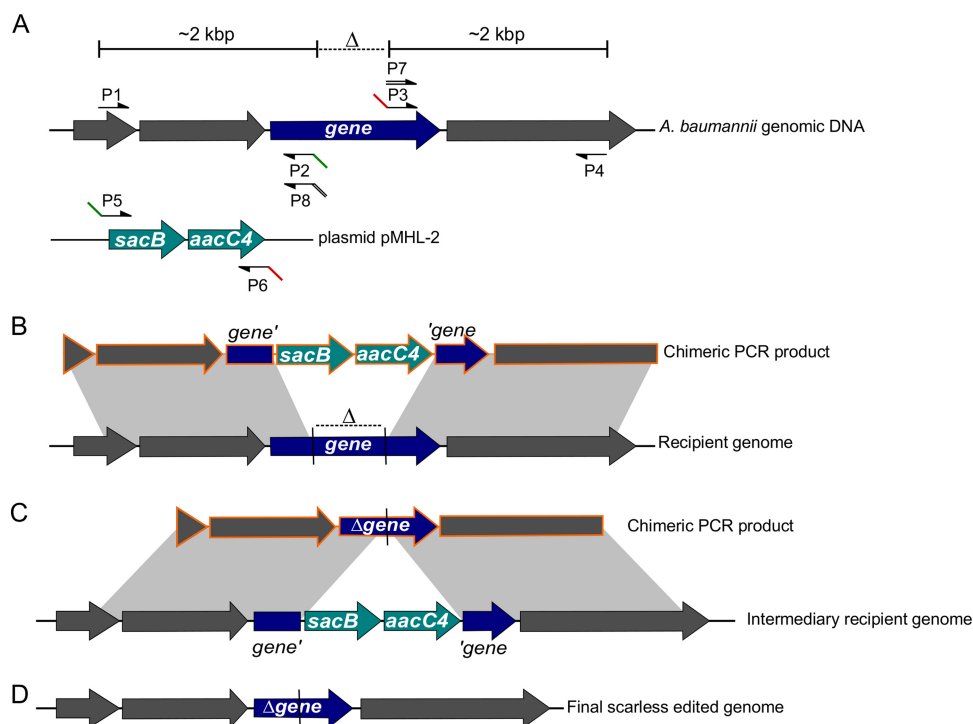


FIG 1 PCR-based genome editing of transformable *A. baumannii*. Schematic representations of steps for gene inactivation (dark blue gene) using natural transformation. (A) Annealing sites for primers of PCR assemblies on their respective templates: either *A. baumannii* genomic DNA for amplifications of 2 kbp upstream and downstream of the deleted region (Δ) or the laboratory plasmid pMHL-2 that bears the counterselectable cassette (light blue) with a *sacB* gene conferring sucrose sensitivity and the *aacC4* gene encoding resistance to apramycin. Note that primers P2, P3, and P7 share annealing sequences with primers P5, P6, and P8, respectively. (B) Chimeric PCR product (orange) obtained after two-step PCR assembly of products P1 + P2 with P5 + P6 and P3 + P4. This chimeric product bears the *sacB*_*aacC4* cassette flanked by two 2-kbp-long regions of homology with the recipient cell's genome (gray areas). These homologous regions allow the recombination of the chimeric PCR product into the recipient cell's genome, resulting, upon apramycin selection of the transformants, in the intermediary recipient genotype represented in panel C. (C) Chimeric PCR product obtained after two-step assembly PCR of products P1 + P8 with P7 + P4 bearing the deleted gene flanked by homologous regions (gray areas), allowing recombination and replacement of the counterselectable cassette in the intermediary recipient genome. (D) The transformants are selected based on their sucrose resistance resulting in the final scarless edited genome.

bearing the *sacB*_*aacC4* cassette in the *comM* gene was subjected to transformation with an assembly PCR encompassing the insertion region cured of AbaR, thereby carrying an intact *comM* gene. Then we performed genetic analysis of sucrose-resistant and apramycin-susceptible clones to select an AbaR-cured strain (named AB5075-R) with a restored *comM* gene presumably encoding a full-length ComM protein (Fig. 2C).

Resistance profiles associated with AbaR curing in two clinically relevant multidrug-resistant strains. We then sought to investigate the role of AbaR island in the multidrug resistance profile of strain AB5075. This AbaR contains 19 open reading frames (ORFs) with, besides transposon-related proteins, seven ORFs predicted to confer resistance to metals, three of unknown function, and the *sup* gene encoding a putative sulfate permease present in most AbaRs (Fig. 2A). Antibiotic susceptibilities were thus compared between the AB5075 parental strain and its AbaR-cured derivative, denoted AB5075-T (Table 1). As anticipated, the resistance profiles to 14 antibiotics belonging to five antibiotic classes were identical between the wild type and its AbaR-cured derivative. We then investigated the contribution to antibiotic resistance of a larger AbaR found only in another *A. baumannii* ST1 strain, the clinical strain AYE resistant to aminoglycosides, β -lactams (excluding imipenem, piperacillin-tazobactam, and ticarcillin-clavulanate), fluoroquinolones, and tetracycline and was of intermediate susceptibility to rifampicin (5, 22). This strain carries the largest AbaR described so far, AbaR1, at 86 kbp long, containing 25 genes putatively involved in resistance to

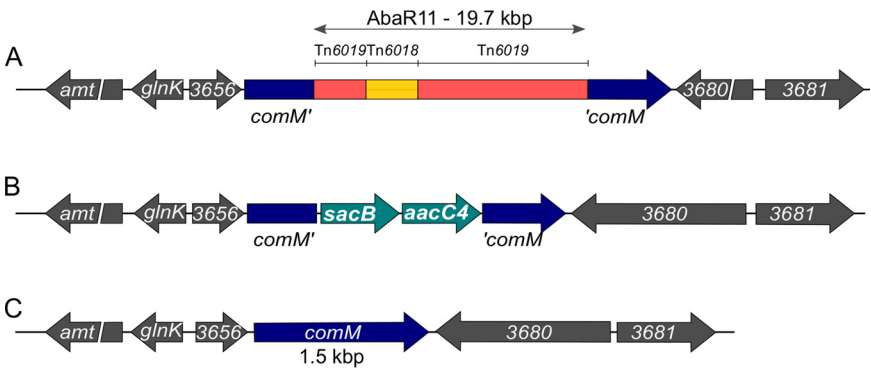


FIG 2 Genetic engineering of AbaR curing in *A. baumannii*. (A) Schematic representation of AbaR11 inserted in the *comM* gene in *A. baumannii* AB5075 genome. All the sequences and genes in gray color belong to the wild-type AB5075 chromosome, the interrupted *comM* gene is, however, highlighted in dark blue. Transposons Tn6019 and Tn6018 constituting AbaR11 are indicated as in reference 4. For illustration purposes, the scale of the AbaR island is not respected. (B) Intermediary genetic construct with the counterselectable cassette replacing the AbaR11 island. (C) Final genetic structure of the locus after restoring the *comM* gene integrity.

antibiotics of several classes. By exploiting natural transformation of the strain AYE (15), we cured this strain of its AbaR1 island and compared the resistance profiles to 21 antibiotics of the parental strain to that of its AbaR-cured AYE-T derivative (Table 2). In contrast to strain AB5075, curing the AbaR island from the strain AYE resulted in restored susceptibility to aminoglycosides, tetracycline, and sulfonamide. The resistance armamentarium conferred by the 86-kbp-long AbaR1 may be attributed to specific genes that are listed in Table 2 according to previous analyses (4, 5, 23). Restored resistances to sulfonamides and tetracycline are consistent with the previous report of AbaR27 deletion in strain A424 leading to the loss of two copies of *sul1* genes and one *tetA* gene (8).

In the AYE-T strain, partially decreased resistance to ticarcillin, ceftazidime, cefepime, and aztreonam was also observed. Only a partial loss of resistance to β -lactams upon AbaR1 curing is likely explained by the additional resistance mechanisms the AYE strain possesses, such as the overexpression of the *bla*_{ADC-11} gene encoding a narrow-spectrum chromosomal cephalosporinase (22, 24). In AYE-T strain ceftazidime, Etest values decreased from 12 μ g/ml to 3 μ g/ml in medium supplemented with cloxacillin

TABLE 1 Antimicrobial resistance profiles of *A. baumannii* strain AB5075 deleted of AbaR11 (AB5075-T) in comparison to the wild-type strain

Antibiotic ^a	Inhibition zone diam (mm) ^b	
	AB5075 WT	AB5075-T
AMK	20	20
GEN	11	12
TOB	10	10
CIP	6	6
PIP	6	6
TZP	6	6
TIC	6	6
TIM	6	6
CAZ	6	6
FEP	6	6
IMP	6	6
ATM	6	6
TET	18	18
SUF	6	6

^aAMK, amikacin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; CIP, ciprofloxacin; PIP, piperacillin; TZP, piperacillin plus tazobactam; TIC, ticarcillin; TIM, ticarcillin plus clavulanic acid; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; IMP, imipenem; ATM, aztreonam; TET, tetracycline; SUF, sulfonamide.

^bWT, wild type; AB5075-T, strain AB5075 deleted of AbaR11.

TABLE 2 Antimicrobial resistance profiles of *A. baumannii* strain AYE deleted of AbaR1 in comparison to the wild-type strain and genes carried by AbaR1 potentially involved in resistance

Antibiotic ^a	Inhibition zone diam (mm)		MIC (μg/ml)		MIC/C ^d (μg/ml)		Predicted AbaR1 resistance gene involved ^e
	AYE WT ^b	AYE-T ^c	AYE WT	AYE-T	AYE WT	AYE-T	
AMK	8	21	64	8	— ^f	—	<i>aadB</i> , <i>aacC1</i> , <i>aphA1b</i> , <i>aacA</i>
GEN	6	19	128	6	—	—	
TOB	6	18	24	1.5	—	—	
KAN	—	—	>256	2	—	—	
STR	—	—	128	0.64	—	—	Two <i>aadA1</i> copies, <i>strA</i> , <i>strB</i>
CIP	6	6	—	—	—	—	
PIP	6	6	—	—	—	—	
TZP	14	15	—	—	—	—	
TIC	6	19	—	—	—	—	<i>bla</i> _{VEB-1} , <i>bla</i> _{oxa-10} ^g
TIM	15	18	—	—	—	—	<i>bla</i> _{oxa-10} ^g
CAZ	6	11	>256	12	>256	3	<i>bla</i> _{VEB-1}
FEP	6	16	256	12	>256	16	<i>bla</i> _{VEB-1}
CTX	—	—	>32	>32	>32	>32	
ATM	6	11	—	—	—	—	<i>bla</i> _{VEB-1}
IMP	28	28	—	—	—	—	
MEM	20	22	—	—	—	—	
SUF	6	23	—	—	—	—	Five <i>sul1</i> copies
SXT	—	—	>32	0.25	—	—	Five <i>sul1</i> copies, <i>dhfrI</i> , <i>dhfrX</i>
TET	—	—	128	8	—	—	<i>tetA(A)</i> , <i>tetA(G)</i>
CHL	—	—	>256	>256	—	—	<i>cmlA1</i> , <i>cmlA5</i> , <i>cmlA9</i> , <i>catA1</i>
RIF	—	—	12	8	—	—	<i>arr-2</i>

^aAMK, amikacin; GEN, gentamicin; TOB, tobramycin; STR, streptomycin; KAN, kanamycin; CIP, ciprofloxacin; PIP, piperacillin; TZP, piperacillin plus tazobactam; TIC, ticarcillin; TIM, ticarcillin plus clavulanic acid; CAZ, ceftazidime; CTX, cefotaxime; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MEM, meropenem; ATM, aztreonam; SUF, sulfonamide; SXT, trimethoprim-sulfamethoxazole; TET, tetracycline; CHL, chloramphenicol; RIF, rifampicin.

^bWT, wild type.

^cAYE-T, strain AYE deleted of AbaR1.

^dC, cloxacillin at 250 μg/ml.

^eAccording to references 4 and 5.

^f—, not done.

^gAccording to reference 24, *oxa-10* gene expression is probably weak.

(250 μg/ml), the latter known to inhibit the cephalosporinase, whereas no significant differences were observed for cefepime, which is not a substrate for ADC-11 (25). Other chromosomal resistance determinants most likely contribute to the reduced susceptibility to cefotaxime, for instance, the predicted new class A β-lactamase on AYE chromosome (24). Despite the four putative chloramphenicol resistance genes on AbaR1, their deletion did not modify the high intrinsic resistance of *A. baumannii* to this antibiotic mediated by efflux (26). Deletion of AbaR1 resulted in a minor change of rifampicin susceptibility.

Contrarily to the previous report on AbaR27 deletion, we did not observe for both strains, AB5075 and AYE, an increased resistance to fluoroquinolone of the AbaR-cured strains (8).

Beyond the role of AbaR in GC1 resistance, this method should allow investigation of other genomic islands found in *A. baumannii* as long as strains are transformable. For instance, as strains of GC2 are seemingly transformable, scarless removal of the AbGR11 resistance island found in this clone is anticipated to be feasible (27, 28).

Curing of AbaR and repair of the *comM* gene result in increased transformation ability. AbaR islands are inserted in the *comM* gene (4). In the nonpathogenic species *A. baylyi*, a mutation of the latter gene is associated with reduced transformability (9). We therefore pursued this by investigating the role of *comM* in *A. baumannii* as well as the physiological consequence of AbaR-island disruption of this gene. To do so, we performed transformation assays comparing the levels of transformation frequency between the wild-type and AbaR-cured strains using an *rpoB* mutation (I581F) conferring resistance to rifampicin as a genetic marker (Fig. 3). For both clinical strains, curing AbaR and thus restoring the *comM* gene increased significantly the ability to acquire the genetic marker, with a mean increase of approximately 1,000-fold in strain

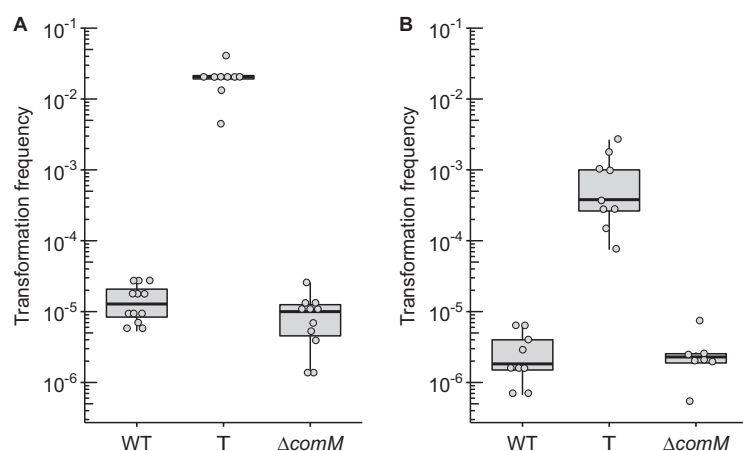


FIG 3 Transformation frequencies of *A. baumannii* strains AB5075 (A) and AYE (B) of a 3.8-kbp-long PCR product carrying a mutation in the *rpoB* gene conferring resistance to rifampicin (final concentration of 50 ng/μl, 125 ng per sample). For both strains, either the wild type or their “T” (ΔAbaR/repaid *comM*) or Δ*comM* derivatives were tested. At least seven independent transformation assays were performed on at least two separate occasions represented by separate dots and corresponding boxplots. All results were above the limit of detection (10^{-8}). Pairwise comparisons using the nonparametric Mann-Whitney-Wilcoxon test (two-tailed) gave *P* values of at least <0.005 between transformation frequencies obtained for the wild-type/Δ*comM* strains and the T derivatives.

AB5075-T (Fig. 3A) and of approximately 300-fold in strain AYE-T (Fig. 3B). With one bacterium of 100 that performed natural transformation, strain AB5075-T presented the highest transformation ability (Fig. 3A). Using the same genome editing strategy as depicted in Fig. 1, we generated markerless deletions of the *comM* gene (Δ*comM*) in both *A. baumannii* clinical strains. Consistently, deletion of the *comM* gene in both strains resulted in transformation levels comparable to levels observed for the wild-type strains bearing a genuine insertion in the *comM* gene by the *AbaR* island (Fig. 3A and B). Thus, prior to acquisition of *AbaR*, both strains were transformable at higher levels, and the subsequent disruption generated transformation defects that are consistent with previous observations made in other species or genera (9, 10). The data show that the *AbaR*-inactivated *comM* gene, once cured of *AbaR*, is still functional. This suggests that it has not been affected by mutational drifts, confirming that acquisition of *AbaR* occurred relatively recently (4).

The fact that acquisition of the *AbaR* element in the *comM* gene alters the natural transformability of *A. baumannii* and its capacity for further acquisitions by natural transformation is intriguing. Interestingly, acquisition of *AbaR* and consequent *comM* interruption did not hinder GC1 subsequent acquisition of different capsule gene clusters or *gyrA* or *parC* alleles leading to fluoroquinolone resistance (29). The significance of lower transformability is not known, but theoretical work suggests that intermediate transformation rates allow bacteria to maximize fitness in fluctuating stressful environments such as repeated antibiotic stress (30).

Conclusion. By exploiting natural transformation, we set up a genetic system to easily edit the genome of *A. baumannii*. We used this strategy to perform small-gene deletion but also to cure large genomic islands in two multidrug-resistant clinical *A. baumannii* strains. Moving beyond predicted resistance, this system allowed experimental determination of the antibiotic resistance conferred by the islands. We conclude that acquisition of *AbaR* islands may increase *A. baumannii* strain resistance to antibiotics, but it comes at the cost of decreasing the cell's ability to perform natural transformation by disrupting the *comM* gene. Thus, acquisition of *AbaR* may impact genome evolution of *A. baumannii*. From an applied perspective, the simultaneous deletion of *AbaR* and restoration of the *comM* function in two clinically relevant strains made them even more genetically amenable, blazing the trail for mutational analysis of these model *A. baumannii* strains.

TABLE 3 *Acinetobacter baumannii* strains used in this study

Strain name	Genotype	Description/phenotype	Reference
AB5075 WT	<i>A. baumannii</i> AB5075 wild type		31
AB5075 <i>comM::sacB_aacC4</i>	<i>A. baumannii</i> AB5075 <i>comM::sacB_aacC4</i>	Replacement of the AbaR island with the <i>sacB_aacC4</i> cassette, resistant to apramycin and sensitive to sucrose	This study
AB5075-T	<i>A. baumannii</i> AB5075 Δ AbaR11	Deletion of the AbaR11 island and a repaired <i>comM</i> gene, highly transformable strain	This study
AB5075 Δ <i>comM</i>	<i>A. baumannii</i> AB5075 Δ <i>comM</i>	Markerless 231-bp deletion of the <i>comM</i> gene	This study
AB5075 Rif ^r	<i>A. baumannii</i> AB5075 Rif ^r	Spontaneous <i>rpoB</i> mutant I581F; rifampicin resistant	This study
AYE WT	<i>A. baumannii</i> AYE wild type	Wild type	22
AYE <i>comM::sacB_aacC4</i>	<i>A. baumannii</i> AYE <i>comM::sacB_aacC4</i>	Strain with a replacement of the AbaR island with the <i>sacB_aacC4</i> cassette, resistant to apramycin and sensitive to sucrose	This study
AYE-T	<i>A. baumannii</i> AYE Δ AbaR1	Strain with a deletion of the AbaR1 island and a repaired <i>comM</i> gene, highly transformable and antibiotic susceptible strain	This study
AYE Δ <i>comM</i>	<i>A. baumannii</i> AYE Δ <i>comM</i>	Markerless 231-bp deletion of the <i>comM</i> gene	This study

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, typing, and growth conditions. The bacterial strains used in this study are listed in Table 3. Unless specified, *A. baumannii* isolates and strains were grown in Lennox broth (LB). All experiments were performed at 37°C. Antibiotic concentrations in selective media were 30 μ g/ml for apramycin and 100 μ g/ml for rifampicin.

Construction of bacterial strains. All oligonucleotides used in this study for genetic modification are listed in Table S1 in the supplemental material. Gene disruptions were performed using overlap extension PCR to synthesize large chimeric DNA fragments carrying the selection marker flanked by 2-kbp-long fragments that are homologous to sequences flanking the insertion site. The PCRs were performed with a high-fidelity DNA polymerase (PrimeStarMax; TaKaRa) (see “Detailed protocol of chimeric PCR for mutation in *A. baumannii*” in the supplemental material). When used as the template for the generation of PCR products, genomic DNA was extracted and purified using the Wizard Genomic DNA purification kit (Promega) according to the manufacturer’s guidelines. The AB5075 wild-type strain was naturally transformed with an assembly PCR product to generate the AB5075 *comM::sacB_aacC4* strain. The AYE *comM::sacB_aacC4* was then obtained by transforming the AYE wild-type strain with genomic DNA extracted from the AB5075 *comM::sacB_aacC4* strain. For both strains, transformants were selected on LB plates supplemented with apramycin, and susceptibility to sucrose was verified on M63 plates supplemented with 10% sucrose. The AB5075 and AYE *comM::sacB_aacC4* strains were naturally transformed with an assembly PCR product (obtained from assembly PCR on wild-type genomic DNA) to generate their T and Δ *comM* derivatives. Transformants were selected on M63 plates supplemented with 10% sucrose, and susceptibility to apramycin was verified on LB plates supplemented with apramycin. All chromosomal modifications were verified in transformants using colony PCR (cf. Table S1). Removal of AbaR and restoration of the *comM* gene were verified by Sanger sequencing.

The AB5075 rifampicin-resistant (Rif^r) strain was generated by selecting spontaneous mutants after plating an overnight culture of the AB5075 wild-type strain on plates supplemented with rifampicin.

Antibiotic susceptibility testing. Susceptibility of the strains to a panel of 15 antibiotics (ticarcillin, ticarcillin-clavulanic acid, piperacillin, piperacillin-tazobactam, ceftazidime, cefepime, meropenem, imipenem, gentamicin, tobramycin, amikacin, ciprofloxacin, tetracycline, aztreonam, and sulfonamide) was evaluated by disc diffusion on Muller-Hinton agar (Bio-Rad, France) according to the CA-SFM 2013 recommendations (https://resapath.anses.fr/resapath_uploadfiles/files/Documents/2013_CASFM.pdf). Inhibition values were interpreted according to CA-SFM 2013 breakpoints for all antibiotics but aztreonam, for which *Pseudomonas* spp. breakpoints are given. Susceptibilities of wild-type AYE and deleted AbaR1 mutant were also compared by Etest strips (bioMérieux, France) for tetracycline, streptomycin, trimethoprim-sulfamethoxazole, chloramphenicol, rifampicin, and β -lactams, including cefotaxime, ceftazidime, and cefepime. The strain *Pseudomonas aeruginosa* CIP 7110 was used as control for all antibiotic susceptibility testing.

Transformation assay. The method used in this study was described in reference 15 with the following modifications. After overnight incubation at 37°C on Lennox broth agar, the strains were cultured for a few hours in 2 ml of Lennox broth (LB) until an optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of at least 1 was reached. The bacterial broths were then diluted to an OD₆₀₀ of 0.01 in phosphate-buffered saline (PBS). Then, small aliquots of bacterial suspensions (5 to 10 μ l) were mixed with DNA substrate. To measure transformation frequency, a final PCR concentration of 50 ng/ μ l was used. The mixtures (2.5 μ l) were deposited on the surface of 1 ml of transformation medium (2% agarose D3 [Euromedex], 5 g/liter of tryptone, 2.5 g/liter NaCl), poured in 2-ml microtubes, and incubated overnight at 37°C. The next day, bacteria were recovered by resuspension in 300 μ l of PBS. For genome edition experiments, the suspensions were spread on selective media (see “Construction of bacterial strains” for details). To measure transformation frequency, the bacterial suspensions were serially diluted and spread on LB agar plates without antibiotic or supplemented with rifampicin. All the transformation assays were performed on at least two separate experiments. On each occasion, at least three independent transformation reactions were conducted (three different transformation tubes). All the independent data points are

plotted. As normality of the distribution of transformation frequency does not apply for transformation frequency analysis, nonparametric tests were performed (Mann-Whitney-Wilcoxon).

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

SUPPLEMENTAL FILE 1, PDF file, 0.1 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the LABEX ECOFECT for building an “ecofectian” community.

This work was supported by the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon, within the program Investissements d’Avenir (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR). A.-S.G. and M.-H.L. were also supported by Programme Jeune Chercheur from VetAgro Sup. A.L. and M.H. were supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES).

REFERENCES

- Dijkshoorn L, Nemec A, Seifert H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol* 5:939–951. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1789>.
- WHO. 2017. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. WHO, Atlanta, GA.
- Bonnin RA, Poirel L, Nordmann P. 2012. AbaR-type transposon structures in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 67:234–236. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr413>.
- Hamidian M, Hall RM. 2018. The AbaR antibiotic resistance islands found in *Acinetobacter baumannii* global clone 1 – structure, origin and evolution. *Drug Resist Updat* 41:26–39. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2018.10.003>.
- Fournier P-E, Vallenet D, Barbe V, Audic S, Ogata H, Poirel L, Richet H, Robert C, Mangenot S, Abergel C, Nordmann P, Weissenbach J, Raoult D, Claverie J-M. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet* 2:e7. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020007>.
- Post V, White PA, Hall RM. 2010. Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 65:1162–1170. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq095>.
- Post V, Hamidian M, Hall RM. 2012. Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* variants belonging to global clone 1. *J Antimicrob Chemother* 67:1039–1040. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr586>.
- Kochar M, Crosatti M, Harrison EM, Rieck B, Chan J, Constantinidou C, Pallen M, Ou H-Y, Rajakumar K. 2012. Deletion of TnAbaR23 results in both expected and unexpected antibiogram changes in a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 56:1845–1853. <https://doi.org/10.1128/AAC.05334-11>.
- Nero TM, Dalia TN, Wang JC-Y, Kysela DT, Bochman ML, Dalia AB. 2018. ComM is a hexameric helicase that promotes branch migration during natural transformation in diverse Gram-negative species. *Nucleic Acids Res* 46:6099–6111. <https://doi.org/10.1093/nar/gky343>.
- Gwinn ML, Ramanathan R, Smith HO, Tomb JF. 1998. A new transformation-deficient mutant of *Haemophilus influenzae* Rd with normal DNA uptake. *J Bacteriol* 180:746–748. <https://doi.org/10.1128/JB.180.3.746-748.1998>.
- Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverie J-P. 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* 12:181–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>.
- Dubnau D, Blokesch M. 2019. Mechanisms of DNA uptake by naturally competent bacteria. *Annu Rev Genet* 53:217–237. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043641>.
- Wilharm G, Piesker J, Laue M, Skiebe E. 2013. DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J Bacteriol* 195:4146–4153. <https://doi.org/10.1128/JB.00754-13>.
- Harding CM, Tracy EN, Carruthers MD, Rather PN, Actis LA, Munson RS. 2013. *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *mBio* 4:e00360-13. <https://doi.org/10.1128/mBio.00360-13>.
- Godeux A-S, Lupo A, Haenni M, Guette-Marquet S, Wilharm G, Laaberki M-H, Charpentier X. 2018. Fluorescence-based detection of natural transformation in drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 200:e00181-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00181-18>.
- Domingues S, Rosário N, Cândido Â, Neto D, Nielsen KM, Da Silva GJ. 2019. Competence for natural transformation is common among clinical strains of resistant *Acinetobacter* spp. *Microorganisms* 7:30. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7020030>.
- Trebosc V, Gartenmann S, Royet K, Manfredi P, Tötzel M, Schellhorn B, Pierres M, Tigges M, Locuro S, Sennhenn PC, Gitzinger M, Bumann D, Kemmer C. 2016. A novel genome-editing platform for drug-resistant *Acinetobacter baumannii* reveals an AdeR-unrelated tigecycline resistance mechanism. *Antimicrob Agents Chemother* 60:7263–7271. <https://doi.org/10.1128/AAC.01275-16>.
- Wang Y, Wang Z, Chen Y, Hua X, Yu Y, Ji Q. 2019. A highly efficient CRISPR-Cas9-based genome engineering platform in *Acinetobacter baumannii* to understand the H₂O₂-sensing mechanism of OxyR. *Cell Chem Biol* 26:1732.e5–1742.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2019.09.003>.
- Biswas I. 2015. Genetic tools for manipulating *Acinetobacter baumannii* genome: an overview. *J Med Microbiol* 64:657–669. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000081>.
- Jacobs AC, Thompson MG, Black CC, Kessler JL, Clark LP, McQueary CN, Gancz HY, Corey BW, Moon JK, Si Y, Owen MT, Hallock JD, Kwak YI, Summers A, Li CZ, Rasko DA, Penwell WF, Honnold CL, Wise MC, Waterman PE, Lesho EP, Stewart RL, Actis LA, Palys TJ, Craft DW, Zurawski DV. 2014. AB5075, a highly virulent isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a model strain for the evaluation of pathogenesis and antimicrobial treatments. *mBio* 5:e01076-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.01076-14>.
- Gallagher LA, Ramage E, Weiss EJ, Radey M, Hayden HS, Held KG, Huse HK, Zurawski DV, Brittnacher MJ, Manoil C. 2015. Resources for genetic and genomic analysis of emerging pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 197:2027–2035. <https://doi.org/10.1128/JB.00131-15>.
- Poirel L, Menuteau O, Agoli N, Cattoen C, Nordmann P. 2003. Outbreak of extended-spectrum β -lactamase VEB-1-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in a French hospital. *J Clin Microbiol* 41:3542–3547. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.8.3542-3547.2003>.
- Paterson DL, Bonomo RA. 2005. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 18:657–686. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.657-686.2005>.
- Coyne S, Guigon G, Courvalin P, Périchon B. 2010. Screening and quantification of the expression of antibiotic resistance genes in *Acinetobacter baumannii* with a microarray. *Antimicrob Agents Chemother* 54:333–340. <https://doi.org/10.1128/AAC.01037-09>.
- Rodríguez-Martínez J-M, Nordmann P, Ronco E, Poirel L. 2010. Extended-spectrum cephalosporinase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:3484–3488. <https://doi.org/10.1128/AAC.00050-10>.
- Coyne S, Rosenfeld N, Lambert T, Courvalin P, Périchon B. 2010. Overexpression of resistance-nodulation-cell division pump AdeFGH confers multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 54:4389–4393. <https://doi.org/10.1128/AAC.00155-10>.
- Hamidian M, Hall RM. 2017. Origin of the AbGR1 antibiotic resistance island found in the *comM* gene of *Acinetobacter baumannii* GC2 isolates. *J Antimicrob Chemother* 72:2944–2947. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx206>.
- Hu Y, He L, Tao X, Meng F, Zhang J. 2019. High DNA uptake capacity of

- international clone II *Acinetobacter baumannii* detected by a novel planktonic natural transformation assay. *Front Microbiol* 10:2165. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02165>.
29. Holt K, Kenyon JJ, Hamidian M, Schultz MB, Pickard DJ, Dougan G, Hall R. 2016. Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. *Microb Genom* 2:e000052. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000052>.
30. Carvalho G, Fouchet D, Danesh G, Godeux A-S, Laaberki M-H, Pontier D, Charpentier X, Venner S. 2020. Bacterial transformation buffers environmental fluctuations through the reversible integration of mobile genetic elements. *mBio* 11:e02443-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02443-19>.
31. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, Donskey CJ, Ecker DJ, Massire C, Eshoo MW, Sampath R, Thomson JM, Rather PN, Craft DW, Fishbain JT, Ewell AJ, Jacobs MR, Paterson DL, Bonomo RA. 2006. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 4114–4123. <https://doi.org/10.1128/AAC.00778-06>.

Supplementary Material

Scarless removal of large resistance island AbaR results in antibiotic susceptibility and increased natural transformability in *Acinetobacter baumannii*.

Table S1: primers used in this study

Detailed protocol of chimeric PCR for mutation in *A. baumannii*

Table S1: primers used in this study

Genetic construct	Name*	Sequence 5' to 3'	Template; Annealing site
Chromosomal modifications using overlap extension PCR			
<i>comM::sacB_aacC4</i>	mlo-2 (P1)	GCCTGGAATTGTCATCAACAGAACC	AB5075 and AYE genomic DNA; <i>amt</i> gene = 2kb upstream of the <i>comM</i> gene
	mlo-3 (P2)	GGCCCAATTG CCCTATAGTGAGT CGATTGCTGATGCTGTATGGTGGGG	AB5075 and AYE genomic DNA; 5' <i>comM</i> gene and adapter sequence reverse-complement to primer mazF-K7-F (bold and orange)
	mlo-4 (P3)	GGGTTTGCTCGGGT CGGTGGCATATG CAATGAATCCTTGTCCATGTGGG	AB5075 and AYE genomic DNA; 3' <i>comM</i> gene and adapter sequence reverse-complement to primer mlo-1 (bold and blue)
	mlo-5 (P4)	GCATGTCTTGCTGTGCGTGTTGC	AB5075 and AYE genomic DNA; <i>ABUW_3681</i> gene = 2kb downstream of the <i>comM</i> gene
	mazF-K7-F (P5)	CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTG	pMHL-2 (Godeux et al., 2018) ; upstream <i>sacB</i> gene and adapter sequence (bold)
	mlo-1 (P6)	CATATGCCACCGACCCGAGCAAACCCGCCAGGGTTTCCCAGTCACGAC	pMHL-2 (Godeux et al., 2018) ; downstream <i>aacC4</i> gene and adapter sequence (bold)
Δ AbaR	mlo-6 (P7)	<u>ACCGCCCCCAACCAAGTGCAATTG</u>	AB5075 and AYE genomic DNA ; <i>comM</i> at AbaR insertion locus (annealing with mlo-7 is underlined)
	mlo-7 (P8)	<u>CAATTGCACTGGTTGGGGGCGGTT</u> CACACCCCAAACCGGGTGAAATTAC	AB5075 and AYE genomic DNA ; <i>comM</i> at AbaR insertion locus (annealing with mlo-6 is underlined)
Δ <i>comM</i>	asg-75 (P7')	<u>AATTTCTAGTGACGCCG</u>	AB5075 and AYE genomic DNA; 5' <i>comM</i> gene (annealing with asg-76 is underlined)
	asg-76 (P8')	<u>CGGCGTGCACTAGAAATTC</u> CAAACCGGGTGAAATTAC	AB5075 and AYE genomic DNA; 3' <i>comM</i> gene (annealing with asg-75 is underlined)

Primers for control using colony PCR and for sequencing of the <i>comM</i> locus			
	mlo-80	CGGATCTTCGATGCTGGC	AbaR1 from AYE strain
	mlo-84	GCAACGATGTTACGCAGC	AbaR1 from AYE strain
	comM-For	CCACAATGGAACAAGAAGATGTCT	5' of the <i>comM</i> gene
	comM-Rev	TTAAGAGTGATTACCTCGATAAGA	3' of the <i>comM</i> gene
	mlo-29	TCATGAGCTCAGCCAATCGACTGG	End of ApraR cassette
	asg-61	CCACAGAATGATGTCACG	5' of the <i>aacC4</i> gene
PCR product carrying the <i>rpoB</i> mutation as substrate for natural transformation			
	mlo-104	AAGATATCGGTCTCCAAGC	AB5075 genomic DNA; <i>rpoB</i> gene
	mlo-105	AGTACGGCCTTCAACGTCAT	AB5075 genomic DNA; <i>rpoB</i> gene

*as referred in Fig.1

Detailed protocol of chimeric PCR for mutation in *A. baumannii*

Two rounds of PCR are required to produce chimeric PCR products: a first PCR to add overlapping extensions to the DNA fragments and a second to assemble the first DNA fragments.

1. First PCR (Overlapping extension PCR)

PCR mix:

PCR mix	25µL reaction
DNA template [20ng to 100ng/µL]	1µL
Primer F 10µM	0.5µL
Primer R 10µM	0.5µL
PrimeSTAR premix (Takara)	12.5µL
H2O qsp 25µL	10.5µL

PCR cycling conditions :

Initial denaturation 98°C- 2 min.	30 cycles
Denaturation 98°C - 20 sec.	
Annealing 55°C – 20 sec.	
Extension 72°C – 40 min.	
Final extension 72°C – 5 min.	

Then proceed to PCR purification after migration of the whole PCR reactions in buffered agarose gel stained with SYBR Safe (ThermoFisher). The bands at the correct size are excised from the gel above a blue-light transilluminator (this is critical) and DNA extracted following instructions of the manufacturer (Omega Bio-Tek/VWR).

Alternatively, the PCR products are purified using magnetic beads following manufacturer's protocol (Ampure XP /Beckman Coulter) after a direct DpnI digestion of the genomic DNA in the PCR mix.

The purified PCR products are then analyzed (5µL) on agarose gel stained with ethidium bromide. Concentration should be at least 30ng/µL for each PCR products and a single band obtained.

2. Second PCR (assembly PCR)

This second round of PCR assembles the three PCR products with a ratio of 1/2/1 for PCR[P1 + P2] / PCR[P5 + P6] / PCR[P3 + P4] in the PCR mix using the P1 (forward primer) and P4 (reverse primer).

PCR mix: [DNA concentration for example]

PCR Assembly	50µL reaction
PCR[P1 + P2] [100ng/µL]	1
PCR[P5 + P6] [30ng/µL]	6
PCR[P3 + P4] [100ng/µL]	1
Primer P1 10µM	1
Primer P4 10µM	1
PrimeStar premix (Takara)	25
H2O	15

Note that the total amount of PCR products is close to 500ng for a 50µL reaction, this can be up to 800ng-1µg, without exceeding a total of 10µL of first PCR products for a 50µL PCR reaction.

PCR cycling conditions:

Initial denaturation 98°C- 2'

Denaturation 98°C -20"

Annealing 55°C – 20"

Extension 72°C – 1' 30"

Final extension 72°C – 5'

30 cycles

Then proceed to PCR purification either after migration in buffered agarose gel stained using SYBR Safe (Thermofisher) followed by gel extraction (Omega Bio-Tek/VWR) or alternatively using Ampure XP beads (Beckman Coulter).

Dynamique des îlots de résistance et transformation naturelle chez *A. baumannii*

1. Transfert de larges îlots de résistance aux antibiotiques chez les *Acinetobacter* pathogènes.

1.1. Contexte :

Les transferts horizontaux de gènes sont fortement suspectés d'être à l'origine du mouvement des îlots de résistance chez les bactéries *Acinetobacter*. La conjugaison pourrait par exemple être à l'origine du transfert de l'îlot de résistance AbaR4 porteur de la résistance aux carbapénèmes, qui fût parfois retrouvé sur des plasmides (Hamidian et al., 2014a). Néanmoins, la plupart des îlots de résistances chez *A. baumannii*, y compris les îlots AbaRs et AbaR4, ont une localisation chromosomique (Bi et al., 2019; Hamidian et al., 2014b). De plus, certains ont également été décrits dans d'autres espèces d'*Acinetobacter* appartenant au complexe *A. baumannii*-*A. calcoaceticus*, les espèces *A. nosocomialis*, *haemolyticus*, *pitii* et *seifertii* (Bi et al., 2019; Kim and Ko, 2015; Kim et al., 2013). La transformation naturelle, un mécanisme répandu chez les bactéries *Acinetobacter* (Domingues et al., 2019; Godeux et al., 2018; Harding et al., 2013; Wilharm et al., 2013), pourrait alors être une possible voie de diffusion de ces îlots présents dans le chromosome.

Un facteur limitant pour le transfert de ces îlots, est leur grande taille. En effet, bien qu'il puisse toujours servir de substrat pour la transformation naturelle (Overballe-Petersen et al., 2013), l'ADN du milieu extracellulaire est généralement fortement fragmenté selon les contraintes environnementales (Ascher et al., 2009). Il est alors possible que la transformation naturelle présente un biais pour l'acquisition de courts fragments d'ADN plutôt que de long fragments, ce qui limiterait la diffusion d'éléments génétiques de grande taille (Apagyi et al., 2017; Croucher et al., 2016). Néanmoins, de récents travaux chez *Vibrio cholerae* ont mis en évidence que des bactéries compétentes, en provoquant la lyse des bactéries environnantes via l'activité du système de sécrétion de type 6 (T6SS), pouvaient favoriser les échanges de larges segments d'ADN (Borgeaud et al., 2015). Cette activité de lyse par le T6SS est également retrouvée chez les bactéries du genre *Acinetobacter*. Chez *A. baylyi*, le rôle de l'interaction bactérienne via le T6SS dans la libération d'ADN des cellules d'*Escherichia coli* a démontré le transfert d'ADN ultérieur vers cette espèce tellurique non pathogène (Cooper et al., 2017; Ringel et al., 2017). Chez *A. baumannii* et *A. nosocomialis*, on retrouve également une capacité de lyse médiée par le T6SS, mais

ses conséquences sur la transformation naturelle n'ont pas été explorées (Carruthers et al., 2013; Harding et al., 2015; Weber et al., 2013).

1.2. Objectifs :

Dans les travaux précédents, nous avons démontré que la transformation naturelle était un mécanisme répandu chez les isolats cliniques MDR et que la présence d'un îlot de résistance dans le génome de ces bactéries contribuait à leur phénotype de résistance aux antibiotiques. Dans la présente étude, nous décrivons les transferts inter-espèces et inter-genres de résistance aux antibiotiques, notamment la résistance aux carbapénèmes, par transformation naturelle dans des populations mixtes d'*A. nosocomialis* et d'*A. baumannii*.

Le travail effectué ici est présenté à la fin de ce chapitre sous la forme d'une publication actuellement en préparation. La publication est rédigée en anglais.

1.3. Résultats principaux et discussion :

Nous avons tout d'abord mis en évidence qu'un simple contact entre deux souches portant des résistances aux antibiotiques dans des conditions favorables à la transformation naturelle suffisait à provoquer le transfert de ces résistances, y compris de la résistance à l'imipénème, un antibiotique de la classe des carbapénèmes. Nous avons ensuite démontré que la transformation naturelle était le mécanisme à l'origine de ce transfert dans une co-culture entre la souche receveuse *A. nosocomialis* M2 et la souche donneuse *A. baumannii* 40288. Celui-ci se produit dans les premières heures après mise en contact des bactéries. De plus, l'efficacité et la cinétique de ce transfert en co-culture furent équivalentes à celles obtenues avec de l'ADN génomique purifié saturant, suggérant que le de l'ADN substrat était rapidement disponible pour provoquer un transfert de gènes efficace.

Nous avons alors émis l'hypothèse que des mécanismes d'interaction bactérienne, telle que l'activité de prédation médiée par le T6SS, pouvaient faciliter ces échanges de gènes. Cependant, aucune activité de prédation n'a pu être détectée dans nos conditions expérimentales induisant la transformation naturelle. De plus, seule une faible diminution de l'efficacité de transformation a pu être observée chez un mutant du T6SS de la souche M2 en co-culture avec la souche 40288. Nous avons donc conclu que l'acquisition de la résistance à l'imipénème par la souche receveuse pouvait ne pas reposer entièrement sur la prédation médiée par le T6SS de la souche donneuse.

Nous avons ensuite transformé la souche receveuse M2 avec du surnageant filtré à partir d'une culture de 4 heures de la souche 40288. Malgré une légère diminution de l'efficacité de transformation pouvant provenir du processus de filtrage, les fréquences de transformation naturelle pour l'acquisition de la résistance à l'imipénème furent comparables à celles obtenues dans les expériences de co-culture ou

avec de l'ADN génomique saturant. De façon étonnante, la quantité d'ADN dans le surnageant était très faible par rapport au nombre total de cellules dans la culture (quantité par rapport à la masse bactérienne). Cependant, cette quantité d'ADN semblait suffisante pour favoriser des transferts génétiques très efficaces. La concentration d'ADN était significativement plus faible pour la souche M2, ce qui était compatible avec une efficacité de transformation plus faible lorsque cette souche était utilisée comme donneur. Compte tenu de la qualité élevée de l'ADN libéré, la lyse d'un faible sous-ensemble de la population bactérienne pourrait suffire à fournir de l'ADN pour la transformation.

En fournissant un substrat d'ADN de haute qualité pour la transformation naturelle, les mécanismes de libération d'ADN tels que la prédation, le fratricide ou la sécrétion d'ADN favoriseraient donc l'acquisition de grands fragments d'ADN permettant des événements de recombinaison plus importants (Borgeaud et al., 2015). En comparant l'efficacité du transfert de deux grands ilots de résistance AbaR4 et AbaR1, d'une longueur de 17-Kbp et 86-Kbp respectivement, nous avons en effet constaté que l'acquisition de ces ilots était plus fréquente dans des conditions de co-culture que lors de l'utilisation d'ADN génomique purifié. En outre, le séquençage de transformants de co-culture a permis d'identifier des fragments d'ADN recombinant dans le chromosome avec des longueurs allant de 16-Kbp à presque 140-Kbp, soit environ 3,7% de la longueur totale du génome de la bactérie.

1.4. Eléments complémentaires :

1.4.1. Expériences de transfert de gènes contact-dépendant.

Dans ces travaux, nous avons mis en évidence qu'une activité de prédation médiée par le T6SS n'était pas essentielle au transfert de la résistance à l'imipénème par transformation naturelle chez *A. nosocomialis*. Par la suite, nous avons réalisé des expériences complémentaires pour vérifier si un contact direct entre bactéries était néanmoins nécessaire pour la libération d'ADN substrat dans le milieu extracellulaire. Pour cela, des expériences de transformation en co-culture en plaçant une barrière physique entre bactéries donneuses et bactéries receveuses ont été réalisées. La souche receveuse M2 fût d'abord placée directement en contact avec le milieu de transformation avant d'être recouverte d'un filtre stérile dont le diamètre des pores (0,22 µm) ne permet pas aux cellules bactériennes de le traverser. La souche donneuse 40288, ou de l'ADN génomique extrait de celle-ci, est alors placé au-dessus du filtre de façon à être séparée de la souche M2. Dans la condition où de l'ADN génomique purifié était déposé au-dessus du filtre, la fréquence des transformants Imi^R était équivalente à la fréquence de transformation obtenue dans les expériences de co-culture sans filtre ($F=2,0 \times 10^{-5}$) (**figure 17**). Ceci confirme que l'ADN libre est capable de traverser les pores du filtre et devenir substrat de transformation pour la cellule receveuse. A l'inverse, dans la condition où le filtre séparait bactéries receveuses des bactéries donneuses, aucun transformant n'a pu être détecté. Nous avons alors émis l'hypothèse qu'un contact entre les deux souches était nécessaire pour favoriser la

libération d'ADN par la donneuse. La même expérience fût alors réitérée mais en déposant cette fois-ci un mélange de bactéries issues de la donneuse 40288 et de la souche M2 non-transformable au-dessus du filtre. Cependant, aucun transformant ne fût à nouveau détecté (**figure 17**). Une explication possible à ces résultats pourrait être de nature physique. Il est en effet possible que l'ADN libéré par les bactéries ne soit pas capable de traverser le filtre car sa conformation l'en empêche. Ceci pourrait provenir du fait que l'ADN libéré est à la fois peu fragmenté et recouvert par des complexes protéiques. Il pourrait alors se trouver sous la forme de grandes molécules ne pouvant pas traverser le filtre. Une autre possibilité serait que le filtre retienne physiquement une partie de l'ADN libre du fait d'interactions électro-statiques.

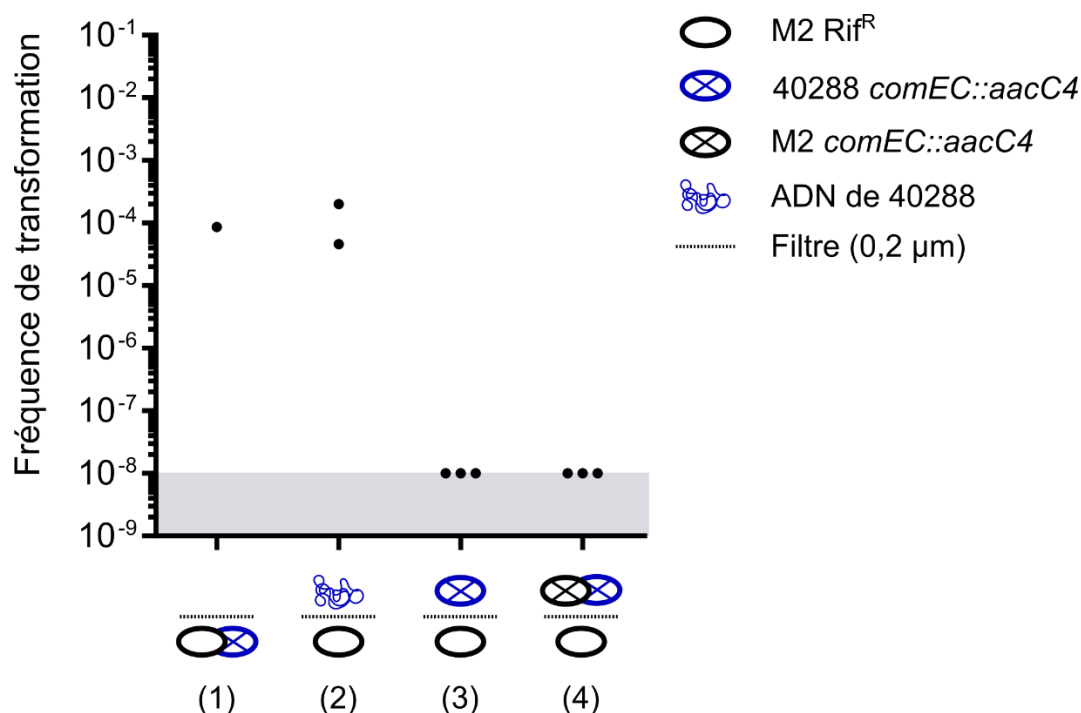


Figure 17 : Expérience de transfert contact-dépendant.

Les fréquences de transformation correspondent aux fréquences d'acquisition de la résistance à l'imipénème par les bactéries de la souche receveuse M2 Rif^R dans différentes conditions : (1) en co-culture avec des bactéries de la souche donneuse 40288 *comEC::aacC4* et un filtre placé au-dessus du mélange de bactéries ; (2) avec de l'ADN purifié depuis la souche 40288 ; (3) en co-culture avec des bactéries de la souche donneuse 40288 *comEC::aacC4* mais avec un filtre séparant physiquement les bactéries des deux souches ; (4) en co-culture avec un mélange de bactéries de la souche donneuse 40288 *comEC::aacC4* et de la souche M2 *comEC::aacC4* séparées de la souche receveuse par un filtre. Une expérience est représentée pour laquelle les différents réplicas sont indiqués par des points.

Etant donné la faible quantité d'ADN libéré par les bactéries donneuses dans le milieu, il est alors possible que la majorité de l'ADN disponible soit en fait liée au filtre, le rendant inaccessible pour la bactérie. De façon surprenante, le surnageant de la souche 40288 utilisé dans les expériences de transformation naturelle et qui permet d'obtenir des fréquences de transformation élevées, est obtenu par filtration avec un filtre équivalent à celui utilisé dans les expériences de contact. Cependant, à la différence de l'ADN libéré par les bactéries qui va diffuser de manière passive au travers du filtre, le surnageant filtré est obtenu par l'application d'une forte pression du liquide au travers du filtre. Il est donc possible que cette pression permette de faciliter le passage de l'ADN, même de haut poids moléculaire, dans le filtre.

1.4.2. Internalisation d'ADN exogène et filamentation.

Chez *A. baylyi*, la prédation de bactéries voisines médiée par le T6SS provoque la libération d'un ADN pouvant ensuite être récupéré pour réaliser la transformation naturelle (Cooper et al., 2017; Ringel et al., 2017). Cependant, de récents travaux ont démontré que cette absorption d'ADN pouvait induire une réponse SOS et provoquer l'arrêt de la division cellulaire chez une partie de la population d'*A. baylyi*, entraînant alors la filamentation des cellules (Lin et al., 2019). Afin de vérifier si ce phénomène est également présent chez *A. baumannii* et *A. nosocomialis*, nous avons réalisé des observations microscopiques des souches *A. nosocomialis* M2 et *A. baumannii* AYE en présence de la souche donneuse 40288 non transformable. Bien qu'un marqueur fluorescent ait été ajouté aux souches M2 et AYE, les bactéries ne présentèrent pas de fluorescence verte lors de l'observation au microscope à épifluorescence. Il ne fût donc pas possible de différencier les cellules receveuses M2 et AYE des cellules donneuses 40288. Néanmoins, aucune bactérie filamenteuse n'a pu être observée dans les échantillons de co-culture suggérant que ce phénomène de filamentation observé chez *A. baylyi* lui est probablement propre.

1.4.3. Analyses génomiques des transformants.

Afin de caractériser avec plus de précision les segments d'ADN recombinés dans le chromosome des transformants, les génomes de transformants supplémentaires *Imi^R* et *Tet^R* obtenus lors de co-cultures de la souche *A. nosocomialis* M2 respectivement avec la souche *A. baumannii* 40288 et AYE, ont été séquencés à l'aide de la technologie Illumina. Ces génomes sont ensuite analysés par Samuel Barreto (Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Université Claude Bernard, Lyon 1) dans le cadre d'une collaboration.

La méthode utilisée permet de localiser avec précision les fragments d'ADN recombinés dans le génome des transformants. Pour cela, les séquences des fragments obtenus après séquençage de

l'ADN des transformants (*reads*) sont alignés sur le génome du donneur, triés puis comptabilisés afin de ne conserver que les sites ayant une couverture supérieure à 25X. Les fragments où l'haplotype est différent entre le donneur et le receveur, et correspond à l'haplotype du donneur, sont alors identifiés comme les fragments convertis, c'est-à-dire les fragments acquis par le transformant. Enfin, les séquences insérées sont confirmées par criblage des *reads* à l'aide du logiciel *Mash screen* (Ondov et al., 2019).

En complément, de nouveaux séquençages des génomes seront réalisés en utilisant la technologie Nanopore afin d'obtenir la totalité de la séquence ADN insérée dans le gène *comM* plutôt que des contigs obtenus par la seule technologie Illumina. En effet, la présence de MGEs de type IS ou transposon rend complexe l'assemblage des génomes et en diminue la couverture lors du séquençage.

1.5. Manuscrit de la publication en préparation

Transfer of large antibiotic resistance islands in pathogenic *Acinetobacter* spp.

Authors: Anne-Sophie Godeux^{a,b}, Elin Sveldhom^a, Samuel Barreto^f, Agnese Lupo^c, Marisa Haenni^c, Anais Potron^{d,e}, Samuel Venner^f, Maria-Halima Laaberki^{a,b,#,*} and Xavier Charpentier^{a,#,*}.

a. CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, 69100, Villeurbanne, France

b. Université de Lyon, VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Etoile, France.

c. Unité Antibiorésistance et Virulence Bactériennes, Université Claude Bernard Lyon 1, ANSES Site de Lyon, Lyon, France

d. French National Reference Center for Antibiotic Resistance, University Hospital of Besançon, Besançon, France

e. UMR6249, CNRS Chrono-Environnement, Franche-Comté University, Besançon, France.

f. UMR CNRS 5558 – LBBE "Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive", Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France.

Contributed equally

* Correspondence to Maria-Halima Laaberki, maria-halima.laaberki@vetagro-sup.fr and Xavier Charpentier, xavier.charpentier@univ-lyon1.fr.

Running title: Acquisition of resistance island in pathogenic *Acinetobacter*

Abstract

Antibiotic resistance widespread is a major threat that greatly limits therapeutic options to treat infections caused by multi-drug resistant bacteria such as pathogenic bacteria from the *Acinetobacter* gender, especially in the well-known nosocomial pathogen *A. baumannii* in which the resistance to carbapenems, a class of last resort antibiotics, has recently raised worldwide. Extensive genetic exchanges through horizontal gene transfers (HGT) are one of the driving forces behind the spread of antibiotic resistance among *Acinetobacter* isolates. In this work, we aimed to evaluate the contribution of natural transformation, a mechanism of HGT commonly found in *A. baumannii* clinical isolates, in the spread of the carbapenems resistance. An effective and rapid transfer of the carbapenems resistance genetic determinants was possible between different *Acinetobacter* spp. in experimental conditions that mimic a bacterial community. Furthermore, the naturally transformable *A. nosocomialis* strain M2 was able to acquire the carbapenems resistance in only a few hours at a high frequency, through natural transformation of a high-quality DNA released by a donor strain. Genetic analyses of transformants showed that natural transformation fostered the acquisition of large DNA fragment containing mobile genetic elements such as the Tn2006 or even a large resistance island named AbaR4 that carry the *bla*_{OXA-23} gene conferring the resistance to carbapenems.

Introduction

In 2017, WHO set carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* as a priority for research on new antibiotics (WHO, 2017). Although bacteria from the *Acinetobacter baumannii* complex – with most of the disease-causing species (*A. baumannii*, *A. pittii* and *A. nosocomialis*) – are responsible for less than 2% of healthcare associated infections, they are steadily resistant to multiple antibiotics as exemplified by the alarming combined resistance to fluoroquinolones, aminoglycosides and carbapenems observed in Europe for nearly 30% of the isolates (European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) and eCDC, 2018). Potential contributors to multi-drug resistance of pathogenic *Acinetobacter spp.* are large resistance islands with a great diversity in gene content including multiple putative antibiotic-resistance genes (Bonnin et al., 2012; Hamidian and Hall, 2018). The most well-known of these *Acinetobacter* resistance islands (Ab-RIs), are AbaRs islands that can be found in a large number of clinical isolates from the global clone 1 of *A. baumannii* (Hamidian and Hall, 2018). The first report of an AbaR described a large genomic island of 86Kbp in the epidemic strain AYE in 2006 (Fournier et al., 2006). Since then, analysis of more than 3000 *A. baumannii* genomes deposited in the NCBI database revealed that Ab-RIs, including AbaR and other types or RI, are present in nearly 65% of them (Bi et al., 2019). Genomic island contribution to *A. baumannii* resistance became concerning upon the rise of AbaR4 (Adams et al., 2008). Indeed, this latter AbaR type can confer resistance to last resort antibiotics carbapenems by conveying transposon Tn2006-*bla*_{OXA-23}. Among the carbapenem-hydrolyzing oxacillinases that can be found widespread in *Acinetobacter baumannii*, the *bla*_{OXA-23} gene, encoding the OXA23 oxacillinase, has been increasingly reported worldwide (Meshkat et al., 2019; Mugnier et al., 2010) and can be found in many different genetic contexts (Nigro and Hall, 2016), in which the presence of an IS, in most cases IS*Aba1*, induces an overexpression of the *bla*_{OXA-23} gene and allows the expression of the resistance to carbapenems (Mugnier et al., 2009). The Tn2006 is the main genetic context for the *bla*_{OXA-23} gene and can be found in different locations, including plasmids, but it is most often found inserted in AbaR4 (Nigro and Hall, 2015). Furthermore, this transposon was shown to be capable of movement in the genome (Mugnier et al., 2009).

Resistance islands potentially spread by horizontal gene transfer. Indeed, some resistance islands, mainly the AbaR4, can be found on plasmids. Conjugation could thus explain their diffusion. However, more than 85% of them, including AbaRs and AbaR4 islands, have a chromosomal location (Bi et al., 2019; Hamidian et al., 2014). Moreover, AbaRs have been described in GC2 strains (Iacono et al., 2008) and even in other *Acinetobacter* species from the *A. baumannii*-*A. calcoaceticus* complex, namely, *A. nosocomialis*, *haemolyticus*, *pittii*, and *seifertii* (Bi et al., 2019; Kim and Ko, 2015; Kim et al., 2013). Horizontal transfer of these islands by natural transformation is therefore also a plausible route of diffusion. Natural transformation, one of the main mechanism of horizontal gene transfers, allows bacteria to actively import an exogenous DNA fragment and, provided a sufficient sequence identity with

the bacterial genome, it integrates the recipient cell's genome (Johnston et al., 2014). Transformation was successfully performed in laboratory conditions for *A. baumannii* and *A. nosocomialis* using purified DNA of various forms (Godeux et al., 2018; Harding et al., 2013; Traglia et al., 2019; Wilharm et al., 2013). Recent studies on *Acinetobacter baylyi* highlights the role of bacterial interaction through T6SS in DNA release from *Escherichia coli* cells allowing the subsequent DNA transfer to this telluric non-pathogenic species (Cooper et al., 2017; Ringel et al., 2017). Some *A. baumannii* and *A. nosocomialis* have also recently shown to display a T6SS activity but the consequences of this fratricide activity on natural transformation was not explored (Carruthers et al., 2013; Harding et al., 2015; Weber et al., 2013). *A. nosocomialis* strain M2 display an active T6SS (Carruthers et al., 2013). Therefore, studying transfer of resistance gene, and notably large resistance island, in *A. baumannii* and related species during bacterial interaction could bring insight into the diffusion of antibiotic resistance in this organism. In the current study, we describe inter-species and inter-genus transfers of antibiotic resistance, notably the carbapenem resistance, by natural transformation in mixed populations of *A. nosocomialis* and *A. baumannii*.

Results

Intra and interspecies emergence of resistant recombinants through natural transformation in mixed populations of pathogenic *Acinetobacter*.

To address the transfer of antibiotic resistance in a mixed population, we first assessed if double resistant recombinants could arise from a heterogeneous bacterial population containing either two different strains of *A. baumannii* or two different species each with distinct resistance marker. To do so, we choose four imipenem resistant (Imi^R) *A. baumannii* strains were chosen (AB5075, 37896, 40288, CNRAB1), and five imipenem sensitive strains either from the *baumannii* (29D2, A118, AYE, 27304, 27024) or *nosocomialis* (M2) species. We then mixed Rif^R derivatives of each imipenem sensitive strains with each Imi^R strain and measured the frequency of double Rif^R/Imi^R recombinants. Recombinants were detected in most of the tested couples (83%, 20/24) with highly variable frequencies ranging from $2,10 \times 10^{-9}$ to $4,82 \times 10^{-4}$. To control the ability of all wild type strains to undergo natural transformation, each one was transformed with purified genomic DNA (gDNA) extracted from their rifampicin resistant (Rif^R) derivative and transformants were obtained for all strains with variable frequencies ranging from $3,82 \times 10^{-6}$ to $5,23 \times 10^{-3}$ (**figure 1**).

Interestingly, the remaining couples for which no recombinants could be detected all shared the presence of the *A. baumannii* strain 37986, meaning that neither the rifampicin nor the

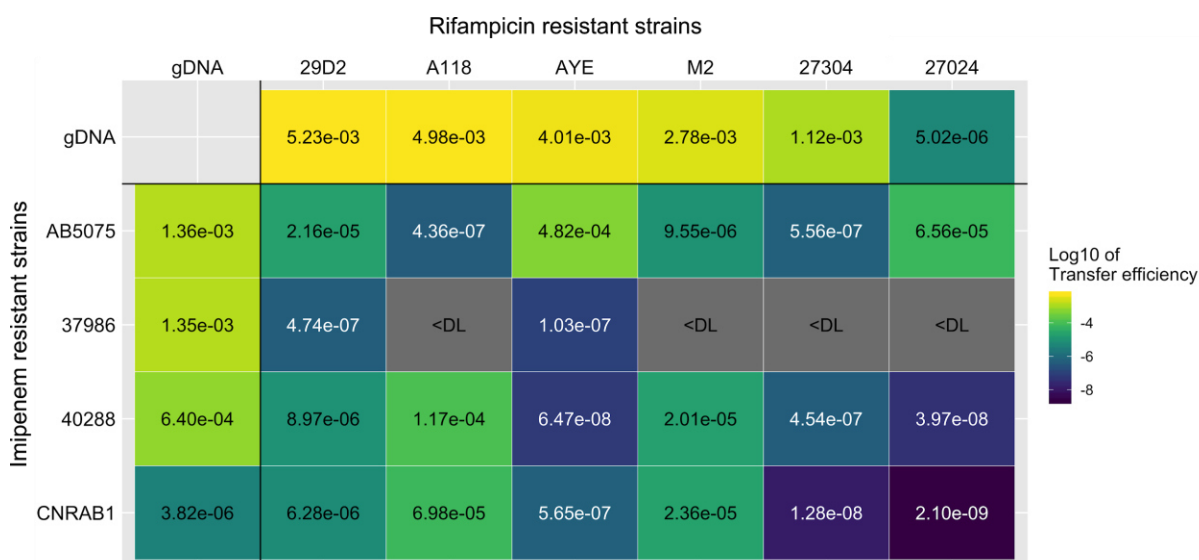


Figure 1. Emergence of double recombinants in mixed culture of *Acinetobacter* spp. Natural transformation ability of each strain alone is indicated in the first line and column and was measured by transforming wild-type strains with gDNA extracted from their rifampicin resistant derivatives. The rest of the table indicates the frequencies of double imipenem and rifampicin resistant recombinants that arose in a mixed culture performed in natural transformation conditions from different couples. The couples were made by mixing a rifampicin resistant strain (29D2, A118, AYE, M2, 27304, and 27024) with an imipenem resistant one (AB5075, 37986, 40288 and CNRAB1). The transformation frequencies are represented by a colour gradient from blue to yellow, and transformation frequencies below detection limit (<DL) are denoted in grey. Data shown are the mean of natural transformation assays done in two or three biological replicates with three technical replicates each.

imipenem resistance could be transferred in those couples. We hypothesized that this absence of recombinants could be linked to a genetic incompatibility. Indeed, the rifampicin resistance is due to a mutation on the *rpoB* gene that could cause a fitness cost on the bacterium and thus limit the emergence of rifampicin recombinants in some population (Andersson, 2003, 2006). Besides, the imipenem resistance also can have various genetic contexts in *A. baumannii* as plasmids or insufficient flanking homology that may not be horizontally transferred between *Acinetobacter*. This incompatibility was then confirmed by additional transformation assays in which all imipenem sensitive strains were incubated with gDNA extracted from the 37986 strain, but we fail to detect Imi^R transformants.

The acquisition of the carbapenem resistance by pathogenic *Acinetobacter* arises in a few hours in mixed culture.

To better characterize the effectiveness of the imipenem resistance transfer by natural transformation between two different *Acinetobacter*, we further study *A. nosocomialis* M2 / *A. baumannii* 40288 mixed population. The *Acinetobacter nosocomialis* strain M2 is a naturally transformable clinical strain sensitive to a broad range of antibiotics (Wisplinghoff et al., 2012), whereas the *A. baumannii* strain

40288 is a carbapenem resistant ST25 donor strain isolated from diseased animals through French national surveillance program (Resapath)(Lupo et al., 2016). In the herebefore transformation assays, double recombinants emerged from the M2 x 40288 couple at a frequency of around $2,01 \times 10^{-5}$ (**figure 1**). To characterize the origin of the Imi^R Rif^R recombinants, a directionality was imposed to the transfer by interrupting the *comEC* gene of the 40288 strain, making it a non-transformable donor strain (**table S2**). Imipenem resistant recombinants from the recipient strain M2 Rif^R were selected using plates with rifampicin and imipenem. We succeeded in transferring resistance to imipenem in *A. nosocomialis* strain M2 Rif^R with a transfer efficiency of about 4×10^{-5} when in a mixed culture with the donor strain (**figure 2A**) that is as efficient than transformation with genomic DNA extracted from the donor strain (gDNA, about 3×10^{-5} , **figure 2A**).

We then compared the kinetics of the imipenem transfer in the M2 Rif^R strain in mixed culture or using gDNA. The same natural transformation assays than previously were performed but transformants were plated regularly during the period of incubation into the transformation medium. Kinetics profiles were similar between the two conditions as transformants could be detected 3 hours after contact in the transformation medium, with a peak of transformation at 4 hours (**figure 2B**). We thus concluded that DNA was quickly available in the spent medium during the early growth phase of the mixed culture and that it had been used by the recipient bacteria as a substrate for natural transformation. Furthermore, this DNA was potent enough to provide high natural transformation efficiencies comparable to those obtained with purified gDNA.

Lateral transfer of antibiotic resistance relies on DNA released by donor bacteria independently of a T6SS-killing activity.

To confirm that free gDNA in the spent medium of the mixed culture was the substrate for the acquisition of the imipenem resistance during natural transformation, sensitivity of this substrate to DNase1 was tested. Transformation assays were performed with or without the addition of DNase1 in the transformation medium and transformants were plated at 6 hours after contact (**figure 2C**). As intended, no transformants could be detected when DNase1 was added to the bacteria transformed with purified DNA. When bacteria were transformed in mixed culture and DNase1 was added, the frequency of imipenem transfer was greatly impaired in comparison to the same condition but without the DNase1, thus confirming the role of the free DNA as a substrate for natural transformation. However, as transformants were still being detectable even with DNase1 added in the medium, this suggested that some DNA was still available in the spent medium of the mixed culture for natural transformation. It is possible that

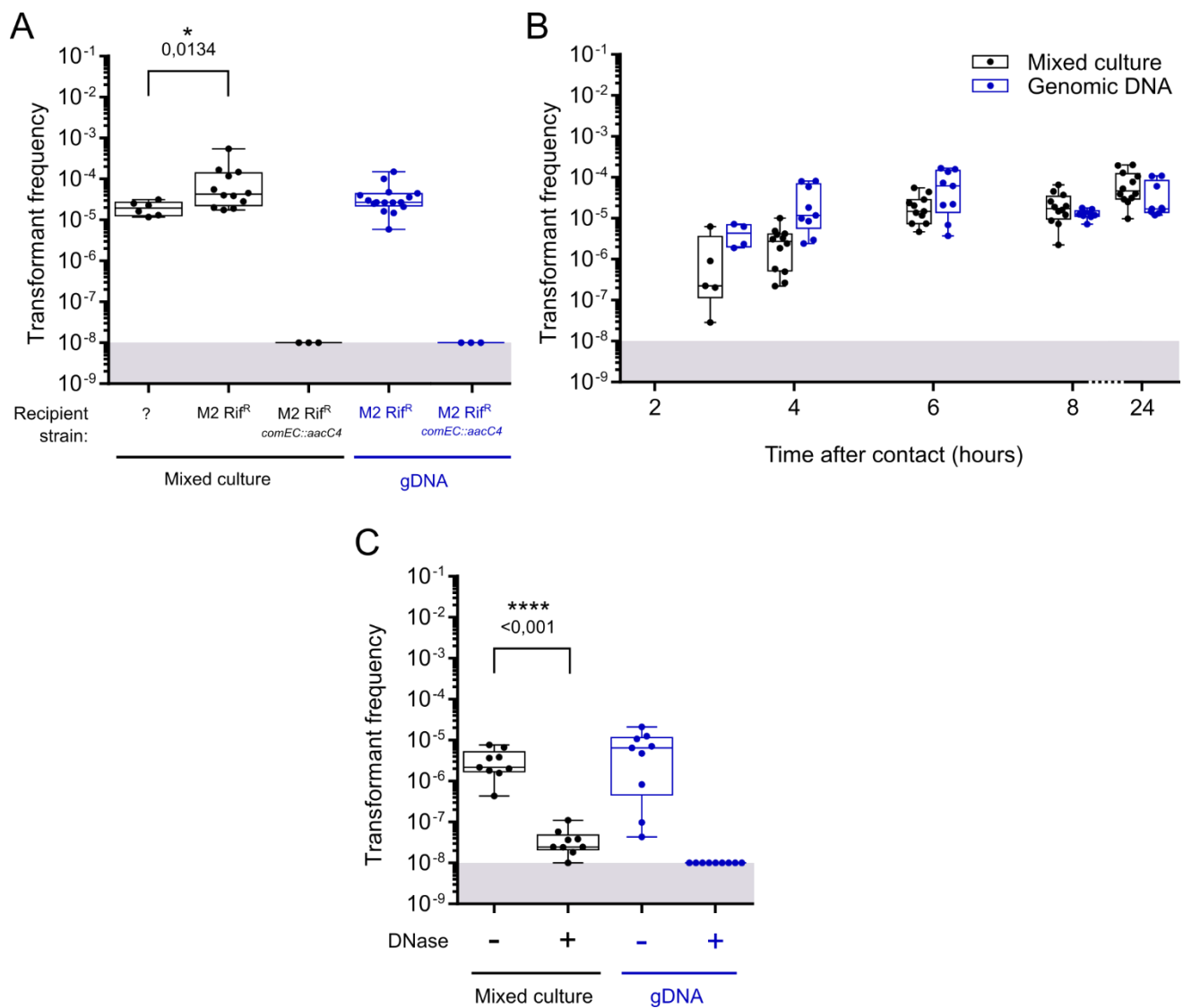


Figure 2. Acquisition of carbapenem resistance by natural transformation in a mixed culture.

Experiments were either performed in a mixed culture between the donor and the recipient strain (in black) or by transforming the recipient strain with gDNA extracted from the donor strain (in blue). At least three independent transformation assays were performed on two separate occasions. The boxplots represent the distributions of the relative imipenem resistant CFUs obtained for each condition with a horizontal line representing the median. The limit of detection (10^{-8}) is indicated by the grey area. Statistics: MWW, Comparison two by two using the non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test (two tailed). p -values are indicated. **A.** Natural transformation assays were performed either with no directionality in which double recombinants arose from a mixed culture of *A. nosocomialis* strain M2 Rif^R and *A. baumannii* strain 40288 (question mark), or with directionality in which the acquisition of imipenem resistance by the recipient *A. nosocomialis* strain M2 Rif^R or its $\Delta comEC$ derivative when in a mixed culture with the donor *A. baumannii* strain 40288 $\Delta comEC$ or when using saturating gDNA. * p -value=0,0134. **B.** Kinetics of the imipenem resistance transfer in *A. nosocomialis* strain M2 Rif^R. **C.** Sensitivity of transformation frequencies to DNase1 treatment (6 hours experiments).

this DNA was either less sensitive to the DNase1 or was potent enough that even a small quantity was sufficient to allow the emergence of transformants despite the activity of the DNase1.

We then investigated the contribution of a T6SS-killing in acquisition of the imipenem resistance in a mixed culture. An Δhcp derivative of the strain M2 was constructed and when using the same conditions than previously published (Carruthers et al., 2013), the mutant showed a 4-log reduction in its ability to kill an *A. baumannii* 40288 prey (**figure S2**). In the transformation medium however, the Δhcp M2 strain had only a slight defect in acquisition of the imipenem resistance after 4 hours of contact despite a more visible defect after 24 hours of contact, with a 12-fold decrease in the transformants frequency (**figure 3A**), suggesting that the transfer might be independent of the T6SS-mediated killing. Consistently with those results, we observed an absence of T6SS-mediated killing in the transformation medium where the recovery of the *A. baumannii* 40288 strain predated by the *A. nosocomialis* M2 strain was the same than in the absence of the predator (control) or when in contact with a T6SS defective M2 strain (**figure 3B**). Therefore, we concluded that the T6SS-mediated lysis is not involved in gene transfer in mixed population.

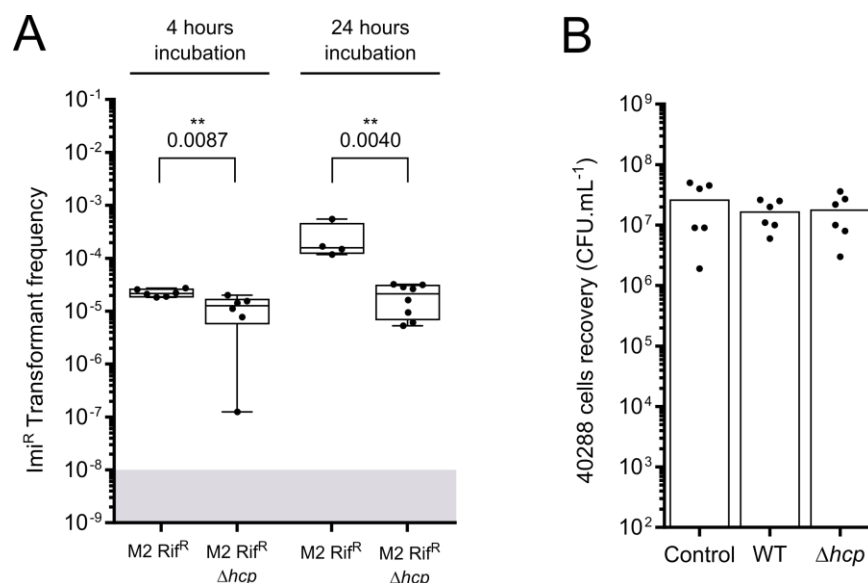


Figure 3. Contribution of the T6SS-killing in the acquisition of the imipenem resistance in mixed culture. **A.** Acquisition of the imipenem resistance by a M2 Rif^R strain or a derivative Hcp mutant (Δhcp) in natural transformation assays. The boxplots represent the distributions of the relative imipenem resistant CFUs obtained for each condition. **B.** Quantitative competition assay measuring the recovery of the 40288 strain in mixed culture during a transformation assay with either the M2 strain or with its Δhcp mutant. Control is performed without the predating M2 strain. Statistics: Comparison two by two using the non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test (two tailed) between the results obtained gave *p*-values indicated on the figure.

Natural transformation assays were then reiterated with free DNA released from a 40288 donor strain instead of a mixed culture with the latter. The substrate DNA was obtained from a filtered spent medium of a 4-hours culture of the 40288 donor strain and transformation assays were performed in the same conditions as previously. Despite a slightly lowered efficacy when compared to the mixed culture or gDNA, bacteria from the recipient strain were able to acquire the imipenem resistance from DNA that was present in the filtered spent medium of the donor strain (**figure 5A**). This free DNA was confirmed to be sensitive to DNase1 and was the substrate of the natural transformation as no transformants could be detected in a non-transformable recipient derivative. We thus concluded that the 40288 strain is naturally releasing free DNA in the medium during log phase growth, and this process is independent of a T6SS-killing activity.

Regarding those results, we wondered if this phenomenon could also take place inside a homogeneous population where competent cells would acquire DNA released from neighbouring related kin cells. We thus tested the ability of the M2 Rif^R recipient strain to acquire a common resistant marker when in a mixed culture with an isogenic M2 donor strain and compared it with a 40288 donor strain. Transformation assays were then performed with 40288 and M2 derivatives impaired for natural transformation (*comEC::aacC4* derivatives). We first used purified gDNA from the donor strains as control for transformation efficiency, and we did not observe any significant difference in the acquisition of the marker by the recipient strain when using DNA extracted from either strain (40288 or M2) (**figure 4B**). In mixed culture, the recipient strain was also able to acquire the apramycin marker from both donor strains, however the transformants frequency was lower when the isogenic M2 was used as the donor strain (**figure 4B**).

Moreover, the same effect could be observed when using the spent medium of the M2 donor strain suggesting that the lowered efficiency of the transfer with the M2 donor strain was due to the DNA substrate and not a direct interaction between the recipient and the donor. We concluded that the strain 40288 was a better DNA donor than the strain M2 by simply releasing more DNA or releasing a more potent DNA in the medium.

To test this hypothesis, we measured the DNA concentration in the spent medium from a 4-hour culture of both strains, 40288 and M2 and its efficiency was confirmed in transformation assays. As expected, the strain 40288 has confirmed to release more DNA in the spent medium than the strain M2 (**figure 4C**). Surprisingly however, quantities of DNA in spent media were very low with concentrations of around 2,24 ng/μL for the 40288 strain and 0,71 ng/μL for the M2 strain, which was almost as low as the detection limit (0,40 ng/μL, obtained by adding DNase1 in the sample). Despite this low amount of DNA, this substrate was potent enough to provide high natural transformation frequencies comparable to those obtained with saturating purified gDNA (**figures 4A and B**).

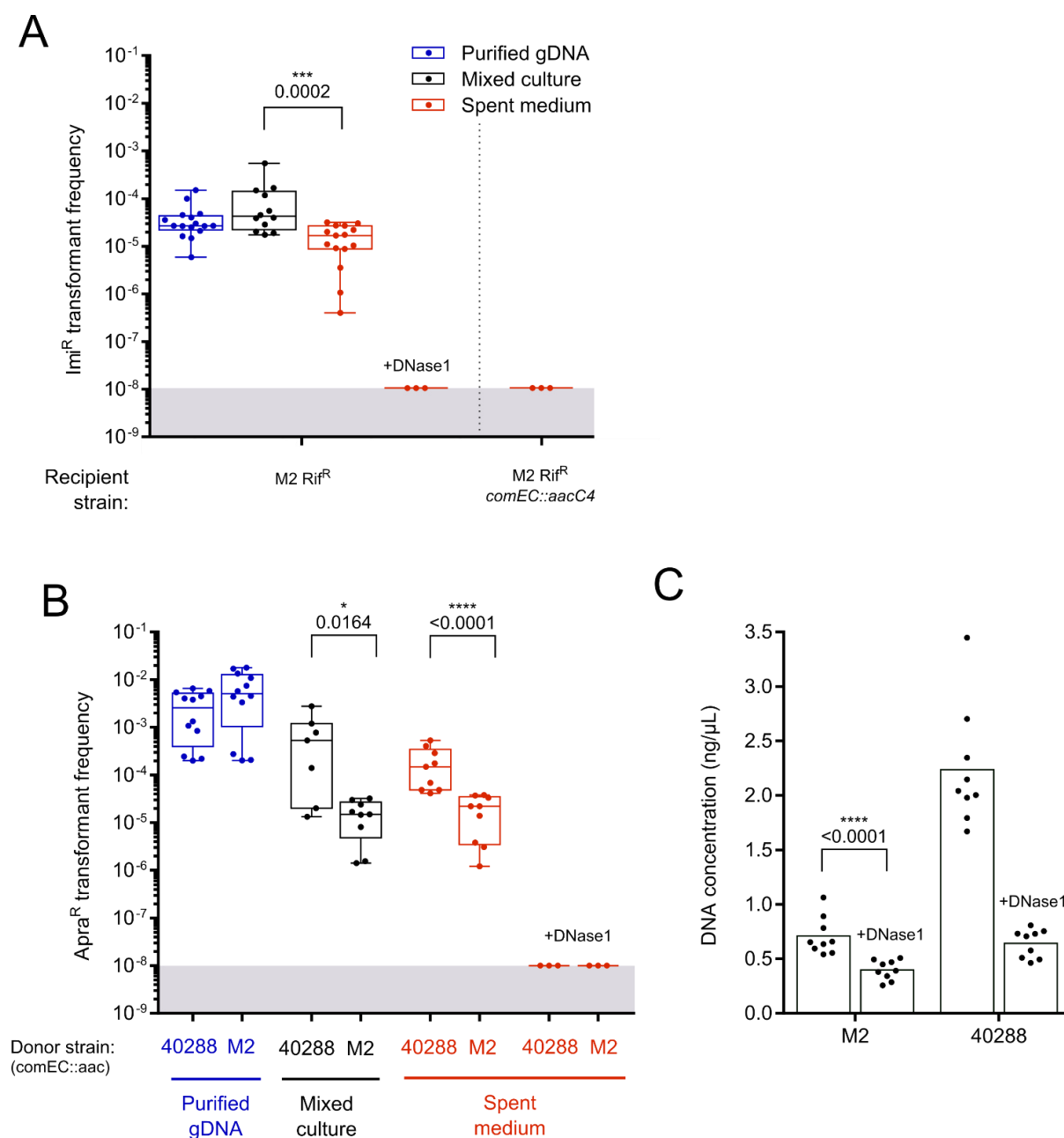


Figure 4. A highly potent DNA is released into the medium that allows high natural transformation efficiencies.

Controls for natural transformation assays were done by adding DNase1 in the transformation medium or by using a non-transformable recipient *comEC::aacC4* strain. **A**. Acquisition of the imipenem resistance from the 40288 *comEC::aacC4* donor strain by the M2 Rif^R recipient strain in a mixed culture, with purified gDNA or with spent medium filtered from an overnight culture of the donor strain. **B**. Acquisition of a common apramycin resistance marker (*aacC4*) from a 40288 *comEC::aacC4* donor strain by the M2 Rif^R recipient strain in a mixed culture, with purified gDNA or with spent medium filtered from an overnight culture of the donor. **C**. Quantification of the extracellular DNA in the spent medium filtered from an overnight culture of the 40288 strain or the M2 strain. DNase1 was added to the sample to assess the detection limit. Statistics: Comparison two by two using the non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test (two tailed) between the results obtained gave *p*-values indicated on the figure.

DNA released by *A. baumannii* fosters transfer and recombination of large chromosomal fragment.

To better characterize the imipenem resistance transfer at a genetic level, we then studied the genetic context of the *bla*_{OXA-23} gene found in the 40288 donor strain and in transformants. In the genome of the 40288 strain, the *bla*_{OXA-23} gene was found in the Tn2006 transposon which itself was inserted at two distinct locations (**figure 5A**). The first one was inside a large AbaR island of 16-kb inserted in the *comM* gene and the second was directly inserted in the beginning of the *vgrG* gene, encoding a T6SS component. This gene, in a putative operon with a LysM domain effector, is referred hereunder as *vgrG3* according to Fitzsimons et al. (Fitzsimons et al., 2018). However, the insertion of the Tn2006 into this *vgrG3* gene did not impair T6SS-mediated killing as two transformants bearing the *vgrG3*::Tn2006 insertion were still proficient for T6SS-mediated killing of *E. coli* contrarily to a Δhcp M2 derivative (**figure S3**). The presence of the two copies of the IS*Aba1* in both transposons are consistent with the high carbapenem resistance displayed by the strain and we ensured that both locations of insertion resulted in the same level of resistance to imipenem (**table S3**).

We then characterize the extent of DNA recombination occurring in the recipient M2 cells by whole genome sequencing. To this end, four imipenem resistant transformants obtained upon co-cultures with the strain 40288 were analyzed: two with transfer of AbaR4 and two with a Tn2006 insertion into the *vgrG3* gene. The recombination fragments were as large as 29 and 36Kbp for the two AbaR4 transformants (**figure 5A**). Withdrawing the AbaR4 insertion (16.8Kbp), the recombination corresponded to 12 and 19Kbp of homologous regions of both chromosomes in a region presenting 92% of identity between both genomes. For the recombinants carrying the *vgrG3*::Tn2006 insertion, the recombination tracks were of 16Kbp and 25Kbp with homologous regions of 11 and 20Kbp respectively (**figure 5A**).

We then wondered whether one could be preferably transferred through natural transformation in different conditions. To this aim, we tested around a hundred transformants randomly picked from two separate mixed culture or gDNA transformation assays, and we determined the proportion of transformants carrying each insertion using colony PCR. In both conditions, the *vgrG3*::Tn2006 insertion was predominant but interestingly, we found that 26% (25/96) of the transformants obtained in mixed culture presented the insertion of an AbaR4 inserted in the *comM* gene against only 5% (5/95) of the transformants obtained with purified gDNA (**figure 4B**). Together, those results suggest that the mixed culture was prone to allow the transfer of larger DNA fragments like genomic islands.

The AbaR4 island is one of the many representatives of resistance islands that can be found in *A. baumannii* clinical isolates. The largest AbaR-type island described so far, the 86Kbp-long AbaR1,

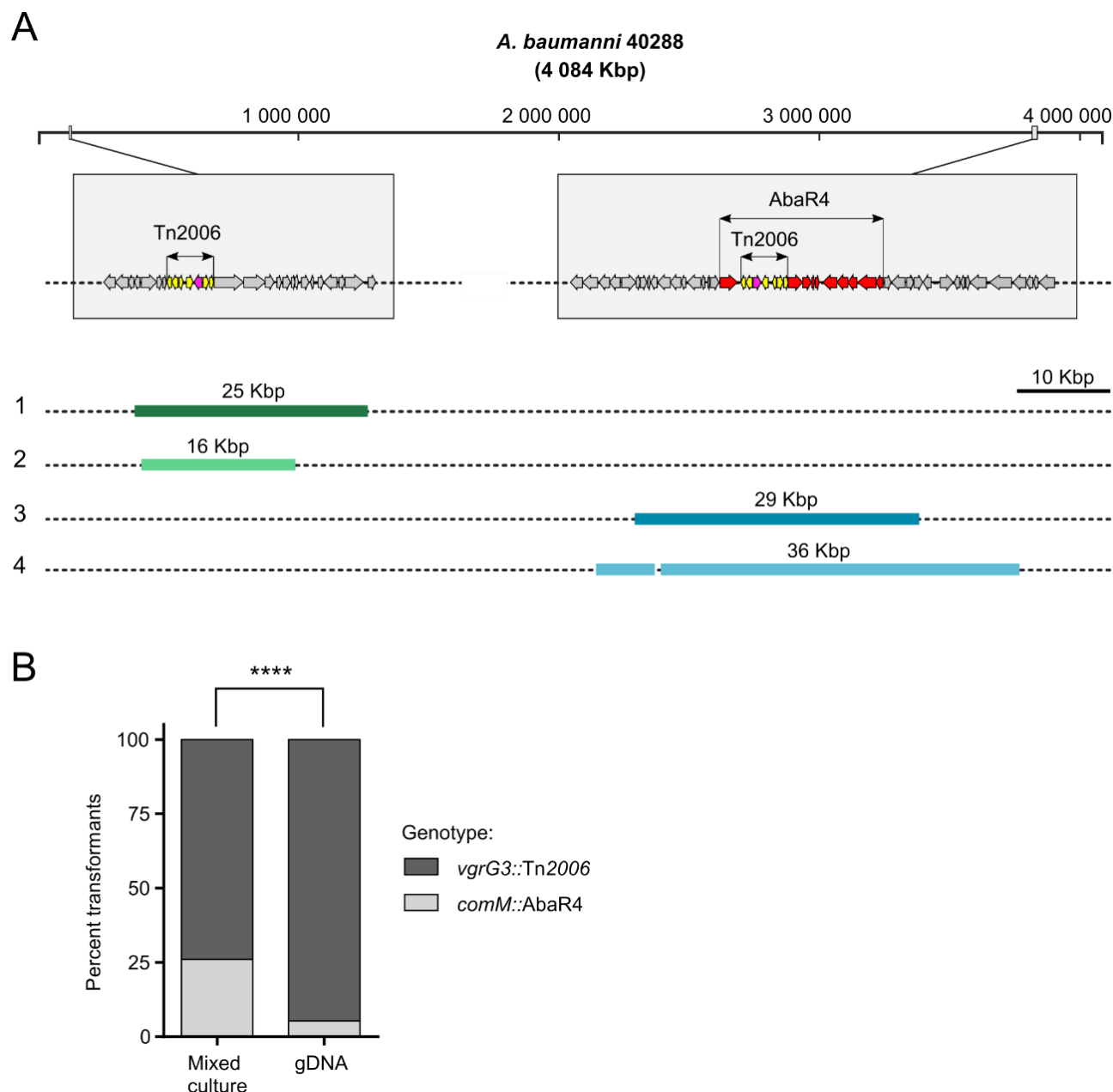


Figure 5. Genetic analysis of the imipenem transfer resistance.

A. Graphical representation of the chromosomal locations and genetic contexts of the *bla*_{OXA-23} gene in the *A. baumannii* strain 40288 and acquired DNA fragments in transformants of *A. nosocomialis* strain M2. The chromosome of the 40288 strain is represented by a thick black line in which small light grey squares indicate the locations of the *bla*_{OXA-23} gene (in purple), either in the *Tn2006* (genes in yellow), in the *vgrG3* gene (bottom box) or in the *Tn2006* from an *AbaR4* island (genes in red) in the *comM* gene (top box). Sizes of the chromosome, the *Tn2006* transposon and the *AbaR4* island are indicated in brackets. Below are the recombination events in four M2 Imi^R transformants (1 to 4) in mixed culture with the 40288 strain with either the *Tn2006* located in the *vgrG3* gene (1 and 2) or in the *comM* gene (3 and 4). Recombinant fragments are represented by the colored squares and their size is indicated above each one. All the recombination events were mapped against the donor strain's genome. **B.** PCR analysis of the *comM* locus integrity among the Imi^R transformants obtained either in a mixed-culture with the 40288 strain or purified DNA of this latter strain. Around 100 Imi^R and *oxa-23* PCR positive CFUs from 2 independent transformation assays were analyzed by PCR probing the *comM* gene integrity. Statistical significance was calculated using Pearson's Chi-squared test returning *p*-value <0.0001 (****).

contains genes putatively involved in resistance to heavy metals and antibiotics of several classes (Fournier et al., 2006). As natural transformation in mixed culture conditions seemed to favour the transfer of large genomic fragments, we next tested if this large AbaR1 island could also be acquired by natural transformation. In a previous work, we showed that curing the AbaR1 island from the AYE strain chromosome induces a lost resistance to aminoglycosides, tetracycline and to some β -lactams although decrease in resistance to cephalosporin was partial (Godeux et al., 2020). We thus use the tetracycline resistance as a marker for the transfer of AbaR1 from the *A. baumannii* strain AYE (donor strain) to the *A. nosocomialis* strain M2 (recipient strain). To select the acquisition of the AbaR1, we used the rifampicin resistant derivative of strain M2 as previously and a derivative of the strain AYE impaired for natural transformation (*comEC::aacC4*). *A. nosocomialis* M2 transformants were selected using a combination of rifampicin and tetracycline. The mixed culture condition resulted in an efficiency for tetracycline transfer of about 10^{-7} (**figure 6A**). Along with tetracycline resistance, we verified on transformants that all the resistances associated with the AbaR1 island were also transferred upon transformation indicating that the entire 86 Kb-long island has been inserted into the chromosome of the recipient strain (**table S3**). Noteworthy, only few transformants were detected when using purified DNA indicating that co-culture is a more efficient way of transferring this large resistance island. We confirmed that the transfer is dependent on the transformation machinery as no transformants were detected when a *comEC::aacC4* derivative of the *A. nosocomialis* strain M2 was exposed to both sources of DNA.

Finally, we analysed the genomes of two tetracycline resistant transformants from co-cultures with AYE. As expected, the entire AbaR1 island (86Kbp) was inserted into the genome of the recipient cells (**figure 6B**). However, the recombination tracks indicated that larger recombination segments occurred flanking the *comM* locus, with total lengths of 120 and 138 Kbp. In the second Tet^R M2 transformant, two smaller recombination events (15 Kbp and 438bp) occurred closely to the larger one. Taken together, these results indicate that the recombination of large homologous regions and the transfer of determinant of resistance including large resistance islands are favoured when bacteria are in a mixed-culture

Discussion

Antibiotic resistance is a major concern in bacteria and a particularly growing threat in *Acinetobacter* pathogenic species. In the last few years, natural transformation has been shown to be common in clinical isolates of *A. baumannii* under various experimental conditions (Domingues et al., 2019; Godeux et al., 2018). However, little is known about its current contribution to the horizontal transfer of antibiotic resistant genetic determinants that can be naturally found in this bacterium. In this work, we investigated the transfer of the resistance to

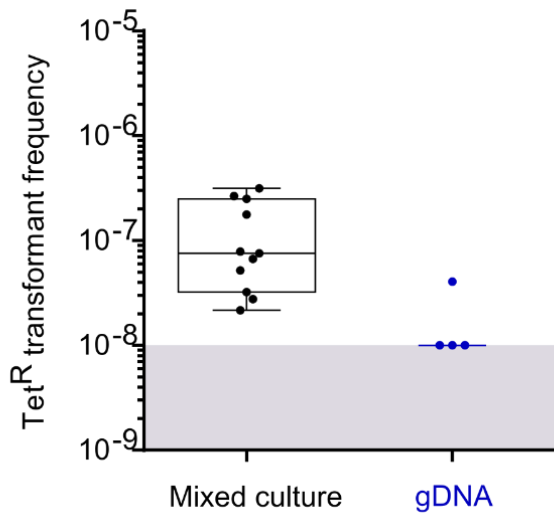
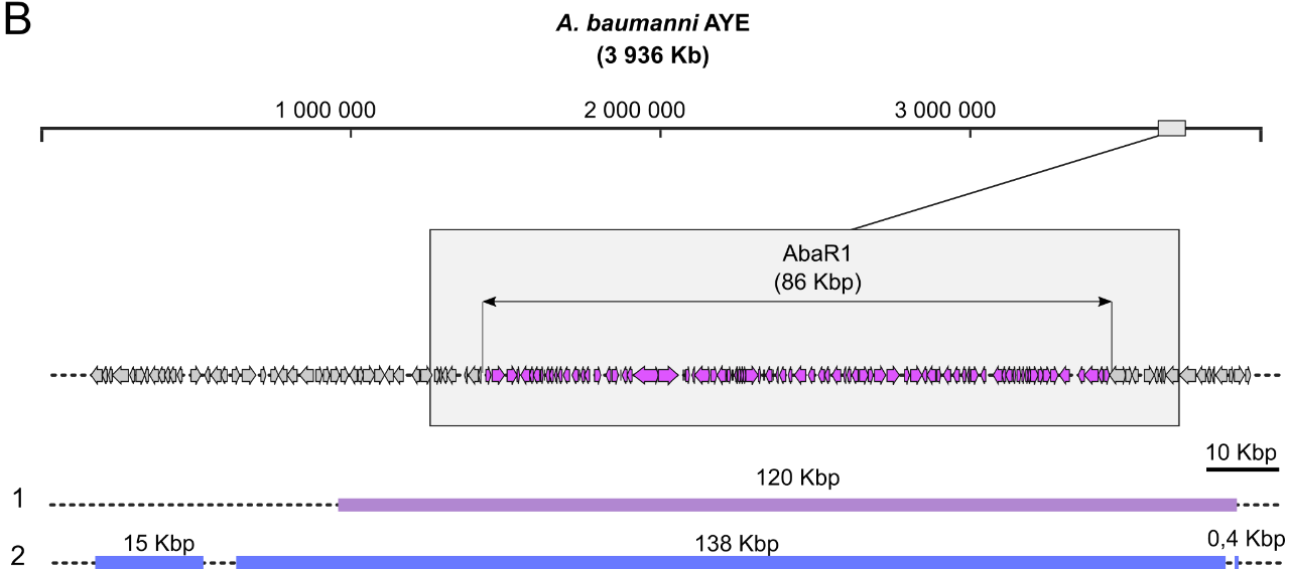
A**B**

Figure 6. Transfer of the AbaR1 island through natural transformation.

A. Acquisition of tetracycline resistance by the *A. nosocomialis* strain M2 Rif^R or its *comEC::aacC4* derivative either when in a mixed culture with *A. baumannii* strain AYE or incubated with genomic DNA from this latter strain. **B.** Graphical representation of the chromosomal locations of the AbaR1 island in the *A. baumannii* AYE strain and recombination DNA fragments in *A. nosocomialis* M2 transformants. The chromosome of the AYE donor strain is represented by a thick black line in which a small light grey square indicates the chromosomal location of the AbaR1 island. In the box is represented the AbaR1 island (in purple) inserted in the chromosome. Below are the recombination events that occurred in two tetracycline-resistant transformants (numbering 1 to 2) of *A. nosocomialis* strain M2 in mixed culture with *A. baumannii* strain AYE with tetracycline-resistance determinant located in the *comM* locus. Recombinant fragments are represented by the colored squares and their size is indicated above each one. All the recombination events were mapped against the donor strain's genome.

carbapenem, one of the most rapidly and widely spread resistance in *A. baumannii* clinical isolates (Hamidian and Nigro, 2019), greatly limiting therapeutic options for the treatment of infections caused by *A. baumannii*.

We first showed that in experimental conditions triggering natural transformation, two different clinical strains of *A. baumannii* bearing two different antibiotic resistances, including one resistant to carbapenems, could lead to the emergence of double resistant recombinants in most of the cases (**figure 1**). To better understand the contribution of the imipenem resistance transfer during this process, we then focus on the *A. nosocomialis* strain M2 and *A. baumannii* strain 40288 couple, and imposed a directionality to the genetic transfer by using a non-transformable derivative of the 40288, making it a donor only (*A. baumannii* strain 40288 *comEC::aacC4*). We showed that when the M2 recipient and the 40288 donor were mixed, the transfer of the imipenem resistance was very efficient, occurring at a frequency higher than 10^{-5} (**figures 1A and 2A**), and happens in the first few hours after contact with a peak at 4-hours (**figure 2C**). Furthermore, both efficacy and kinetics of transformation in mixed culture were equivalent to the ones obtained with saturating purified gDNA, suggesting that DNA substrate was quickly available for uptake and potent enough to provide an efficient transfer in this mixed population of bacteria.

Those latter results let us consider the possibility of an active interaction between the donor and the recipient cells that might enhance the HGT process. Surprisingly, despite having a strong T6SS-mediated killing activity against the 40288 donor as a prey in canonical killing conditions (as described in Carruthers et al. 2013, and in **figure S1**), the recipient M2 strain had no T6SS activity in our experimental conditions that induce natural transformation (**figure 3B**). This lack of T6SS-mediated killing was also consistent with our observation of only a small decrease in the transformation efficiency of an Δhcp mutant derivative of the M2 recipient strain in mixed culture with the 40288 donor (**figure 3A**). We thus concluded that the acquisition of the imipenem resistance by the recipient strain could not rely on T6SS-mediated killing of the donor strain. However, other mechanisms have been described for the release of DNA in the environment such as the active secretion of DNA by bacteria directly into the medium. In *Neisseria gonorrhoeae*, a large genomic island encodes a type 4 secretion system (T4SS) that allows the release of DNA into the medium during exponential growth phase without cell lysis (Dillard and Seifert, 2001; Hamilton et al., 2005). In an undomesticated strain of *Bacillus subtilis*, DNA is released during a short period of time in late-exponential phase under the control of early competence genes and this DNA is a potent substrate for natural transformation (Zafra et al., 2012).

We succeeded in transforming the *A. nosocomialis* M2 recipient strain with filtered spent medium of a 4-hours culture of the *A. baumannii* 40288 donor strain despite a slight decrease in the efficacy of the transformation that may come from the filtering process. Natural transformation frequencies for the acquisition of the imipenem resistance were comparable to our mixed culture experiment or when we used saturating gDNA (**figure 4A**). Moreover, we confirmed that this type of HGT could also occur

between related cells, as transformants could be obtained from a transformation assay performed between a recipient M2 strain and an isogenic derivative donor (**figure 4B**). A possible explanation could be the involvement of toxin-antitoxin mechanisms used for bacterial competition (Guérin et al., 2017) or similar secretion mechanisms that could induce the lysis of a specific part of the bacterial population as observed in *Streptococcus pneumoniae*. In this bacterium, competent cells are able to recognize and kill non-competent kin cells or other closely related species when co-cultivated, leading to the lysis of up to 30% of the population (Eldholm et al., 2009). When the quantity of DNA in the filtered spent medium was measured, the concentration was surprisingly low relatively to the total number of cells in the culture (**figure 4C**). However, this quantity of DNA was sufficient to promote highly efficient genetic transfers comparable to the one obtained with the mixed culture or purified gDNA (**figure 4A and B**). The DNA concentration was significantly lower for the M2 strain (**figure 4C**), consistent with a lower transformation efficiency when this strain was used as a donor. Given the high quality of the released DNA, the lysis of only a minimal subset of the population could be enough to provide DNA for transformation.

The benefit of an active release of DNA on the effectiveness of genetic transfers has been highlighted in T6SS-mediated killing and natural transformation in *V. cholerae* (Borgeaud et al., 2015). Indeed, while exogenous DNA found in natural environments is generally highly fragmented, it can still be used by bacteria for transformation (Overballe-Petersen et al., 2013). However, it thus favours the uptake and recombination of short fragments. By providing high quality DNA substrate for natural transformation, mechanisms of active DNA release such as cell-killing, fratricide, or DNA secretion instead favour the acquisition of large fragments of DNA and thus larger recombination events. This benefit can be observed in experimental set up mimicking bacterial communities in comparison to saturating purified DNA as previously demonstrated in *Streptococcus pneumoniae* (Cowley et al., 2018) or in this current work. Indeed, when comparing the effectiveness of the transfer of a large resistance island of around 17-Kb named AbaR4 in mixed culture or when using purified gDNA, we found that bacteria were more prone to acquire this island in the first condition (**figure 5B**). Moreover, we were only able to obtain multiple transformants that acquired the AbaR1 island, an 86-Kb resistant island and currently the largest known resistance island in *A. baumannii*, when in a mixed culture with the donor (**figure 6A**). Sequencing of some of these mixed culture transformants finally showed that recombinant DNA fragments found in the chromosome following the acquisition of the resistance island were larger than expected, with lengths ranging from 16-Kb to almost 140-Kb (**figure 5A and 6B**), that represents approximately 3,7% of the total genome length of the bacterium.

Conclusion

Altogether, this work highlights the importance of natural transformation, one of the major HGT mechanisms in bacteria, in the acquisition of resistance to clinically relevant antibiotics in *A. baumannii*.

By naturally releasing high quality DNA in the environment, some strains of *A. baumannii* may be highly potent donors for the uptake and recombination of large DNA fragments during natural transformation by a competent cell. This allows *A. baumannii* to acquire novel antibiotic resistances within a few hours when in a bacterial community, and even complete resistance islands containing multiple antibiotic resistance genes. However, this DNA release can occur through many various mechanisms in bacteria and further work will be needed to characterize this phenomenon in *Acinetobacter* species.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains or strains used in this study are listed in **table S1**. Unless specified, *Acinetobacter baumannii* isolates and strains were grown in lysogeny broth (LB) (Lennox). All experiments were performed at 37°C. Antibiotic concentrations were: 15µg/mL for tetracycline, 1.6µg/mL for imipenem (always spread extemporaneously on LB agar plate) and 100µg/mL for rifampicin.

Construction of bacterial strains. All the oligonucleotides used in this study for genetic modification are listed in supplementary **table S2**. Gene disruptions were performed using a scarless genome editing strategy described in Godeux et al. 2020. Overlap extension PCR were used to synthesize large chimeric DNA fragments carrying the selection marker flanked by 2 Kbp fragments that are homologous to the insertion site. The oligonucleotides used for strain construction are listed in **table S2**. The PCRs were performed with a high-fidelity DNA polymerase (PrimeStarMax, Takara).

Transformation assay. The method used in this study was described in Godeux et al. 2018, with the following modifications. After overnight incubation at 37°C on Lennox Broth agar, the strains were cultured for a few hours in 2 mL of Lennox Broth (LB) until OD_{600nm} of 1. The bacterial broths were then diluted to an OD_{600nm} of 0.01 in PBS. Then bacterial suspensions of the recipient strain were mixed with an equal volume of either genomic DNA extracted from the donor strain (concentration 200 ng/µL), or a bacterial suspension of the donor strain at an OD_{600nm} of 0.01 for mixed culture, or with a filtered spent medium of a 4-hours culture in tryptone-NaCl medium of the donor strain. The mixture (2.5µL) was deposited on the surface of 1mL of transformation medium poured in 2mL micro tubes and incubated overnight at 37°C. The next day, bacteria were recovered by resuspension in 300µL of PBS, serial diluted and spread on LB agar plate without antibiotic or supplemented with the required antibiotic.

For kinetics of transformation, bacteria were recovered from the transformation medium at various times points: 0 and 30min after contact in the transformation medium, then one point every hour from 1 to 8

hours after contact and one final point at 24 hours after contact. For each point, bacteria were harvested from an independent sample and plated as previously described.

For DNase1 experiments, 0.6U of DNase1 (Sigma) were added per microliter of the transformation mixture and transformation were performed for 6 hours.

For T6SS-mediated killing assay in transformation medium, bacteria were mixed as described in the mixed culture condition and recovery of the donor strain was measured on selective medium after serial dilution.

All the transformation assays were performed on at least two separate occasions. On each occasion, three independent transformation reactions were conducted (three different bacterial cultures). All the independent data points are plotted. As normality of the distribution of transformation frequency does not apply for transformation frequency analysis, non-parametric tests were performed (Mann-Whitney-Wilcoxon).

DNA measurement in spent media. Bacteria were prepared as for transformation assay lasting 4h at 37°C in 2mL-eppendorf tubes. After the 4h incubation, the cells were harvested with 300µL of sterile water. As control, 25µL of the bacterial suspension were used for serial dilutions in 96-well plates for numbering on LB agar with or without supplements to verify the survival and M2 transformation efficiencies. DNA quantification in the spent medium of the donor was performed through fluorescent labelling with Quant-iT reagent (Invitrogen Qubit dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Fluorescence was measured with Infinite M200PRO (TECAN) and Magellan7.1 SP1 (TECAN) and DNA concentration was calculated by comparison with Quant-iT standards (Invitrogen Qubit dsDNA HS Assay Kit, Thermo Fisher Scientific) in Tryptone NaCl.

Genome sequencing, assembly, and annotations. Genomes were sequenced using a combination of Illumina and nanopore technologies and assembled with Unicycler (Wick et al., 2017). Gene annotations were performed using the software tool Prokka (Seemann, 2014) with the *A. baumannii* AB5075-UW genome as reference (Jacobs et al., 2014).

References

- Adams, M.D., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K.M., Lavender, H., Jamison, J.J., MacDonald, I.J., Martin, K.M., Russo, T., Campagnari, A.A., et al. (2008). Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* *190*, 8053–8064.
- Andersson, D.I. (2003). Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* *6*, 452–456.
- Andersson, D.I. (2006). The biological cost of mutational antibiotic resistance: any practical conclusions? *Curr. Opin. Microbiol.* *9*, 461–465.
- Bi, D., Xie, R., Zheng, J., Yang, H., Zhu, X., Ou, H.-Y., and Wei, Q. (2019). Large-Scale Identification of AbaR-Type Genomic Islands in *Acinetobacter baumannii* Reveals Diverse Insertion Sites and Clonal Lineage-Specific Antimicrobial Resistance Gene Profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *63*.
- Bonnin, R.A., Poirel, L., and Nordmann, P. (2012). AbaR-type transposon structures in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* *67*, 234–236.
- Borgeaud, S., Metzger, L.C., Scignari, T., and Blokesch, M. (2015). The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science* *347*, 63–67.
- Carruthers, M.D., Nicholson, P.A., Tracy, E.N., and Munson, R.S. (2013). *Acinetobacter baumannii* Utilizes a Type VI Secretion System for Bacterial Competition. *PLoS One* *8*.
- Cooper, R.M., Tsimring, L., and Hasty, J. (2017). Inter-species population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. *Elife* *6*.
- Cowley, L.A., Petersen, F.C., Junges, R., Jimenez, M.J.D., Morrison, D.A., and Hanage, W.P. (2018). Evolution via recombination: Cell-to-cell contact facilitates larger recombination events in *Streptococcus pneumoniae*. *PLOS Genetics* *14*, e1007410.
- Dillard, J.P., and Seifert, H.S. (2001). A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Mol. Microbiol.* *41*, 263–277.
- Domingues, S., Rosário, N., Cândido, Â., Neto, D., Nielsen, K.M., and Da Silva, G.J. (2019). Competence for Natural Transformation Is Common among Clinical Strains of Resistant *Acinetobacter* spp. *Microorganisms* *7*.
- Eldholm, V., Johnsborg, O., Haugen, K., Ohnstad, H.S., and Håvarstein, L.S. (2009). Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology (Reading)* *155*, 2223–2234.
- European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net), and eCDC (2018). Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2017.
- Fitzsimons, T.C., Lewis, J.M., Wright, A., Kleifeld, O., Schittenhelm, R.B., Powell, D., Harper, M., and Boyce, J.D. (2018). Identification of Novel *Acinetobacter baumannii* Type VI Secretion System Antibacterial Effector and Immunity Pairs. *Infect. Immun.* *86*.

- Fournier, P.-E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., et al. (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2, e7.
- Godeux, A.-S., Lupo, A., Haenni, M., Guelle-Marquet, S., Wilharm, G., Laaberki, M.-H., and Charpentier, X. (2018). Fluorescence-based detection of natural transformation in drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology* JB.00181-18.
- Godeux, A.-S., Svedholm, E., Lupo, A., Haenni, M., Venner, S., Laaberki, M.-H., and Charpentier, X. (2020). Scarless removal of large resistance island AbaR results in antibiotic susceptibility and increased natural transformability in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.
- Guérin, J., Bigot, S., Schneider, R., Buchanan, S.K., and Jacob-Dubuisson, F. (2017). Two-Partner Secretion: Combining Efficiency and Simplicity in the Secretion of Large Proteins for Bacteria-Host and Bacteria-Bacteria Interactions. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 148.
- Hamidian, M., and Hall, R.M. (2018). The AbaR antibiotic resistance islands found in *Acinetobacter baumannii* global clone 1 – Structure, origin and evolution. *Drug Resistance Updates* 41, 26–39.
- Hamidian, M., and Nigro, S.J. (2019). Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Genom* 5.
- Hamidian, M., Kenyon, J.J., Holt, K.E., Pickard, D., and Hall, R.M. (2014). A conjugative plasmid carrying the carbapenem resistance gene blaOXA-23 in AbaR4 in an extensively resistant GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate. *J Antimicrob Chemother* 69, 2625–2628.
- Hamilton, H.L., Domínguez, N.M., Schwartz, K.J., Hackett, K.T., and Dillard, J.P. (2005). *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 55, 1704–1721.
- Harding, C.M., Tracy, E.N., Carruthers, M.D., Rather, P.N., Actis, L.A., and Munson, R.S. (2013). *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio* 4.
- Harding, C.M., Nasr, M.A., Kinsella, R.L., Scott, N.E., Foster, L.J., Weber, B.S., Fiester, S.E., Actis, L.A., Tracy, E.N., Munson, R.S., et al. (2015). *Acinetobacter* strains carry two functional oligosaccharyltransferases, one devoted exclusively to type IV pilin, and the other one dedicated to O-glycosylation of multiple proteins. *Mol. Microbiol.* 96, 1023–1041.
- Iacono, M., Villa, L., Fortini, D., Bordoni, R., Imperi, F., Bonnal, R.J.P., Sicheritz-Ponten, T., De Bellis, G., Visca, P., Cassone, A., et al. (2008). Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2616–2625.
- Jacobs, A.C., Thompson, M.G., Black, C.C., Kessler, J.L., Clark, L.P., McQueary, C.N., Gancz, H.Y., Corey, B.W., Moon, J.K., Si, Y., et al. (2014). AB5075, a Highly Virulent Isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a Model Strain for the Evaluation of Pathogenesis and Antimicrobial Treatments. *MBio* 5, e01076-01014.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., and Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology* 12, 181–196.

- Kim, D.H., and Ko, K.S. (2015). AbaR-type genomic islands in non-baumannii *Acinetobacter* species isolates from South Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* *59*, 5824–5826.
- Kim, D.H., Choi, J.-Y., Kim, H.W., Kim, S.H., Chung, D.R., Peck, K.R., Thamlikitkul, V., So, T.M.-K., Yasin, R.M.D., Hsueh, P.-R., et al. (2013). Spread of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Global Clone 2 in Asia and AbaR-Type Resistance Islands. *Antimicrob Agents Chemother* *57*, 5239–5246.
- Lupo, A., Châtre, P., Ponsin, C., Saras, E., Boulouis, H.-J., Keck, N., Haenni, M., and Madec, J.-Y. (2016). Clonal Spread of *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 25 Carrying blaOXA-23 in Companion Animals in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *61*.
- Meshkat, Z., Amini, Y., Sadeghian, H., and Salimizand, H. (2019). ISAbal/blaOXA-23-like family is the predominant cause of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Iran. *Infection, Genetics and Evolution* *71*, 60–66.
- Mugnier, P.D., Poirel, L., and Nordmann, P. (2009). Functional analysis of insertion sequence ISAbal, responsible for genomic plasticity of *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* *191*, 2414–2418.
- Mugnier, P.D., Poirel, L., Naas, T., and Nordmann, P. (2010). Worldwide Dissemination of the blaOXA-23 Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* *16*, 35–40.
- Nigro, S., and Hall, R.M. (2015). Distribution of the blaOXA-23-containing transposons Tn2006 and Tn2008 in Australian carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* *70*, 2409–2411.
- Nigro, S.J., and Hall, R.M. (2016). Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the oxa23 carbapenemase gene. *J Antimicrob Chemother* *71*, 1135–1147.
- Overballe-Petersen, S., Harms, K., Orlando, L.A.A., Mayar, J.V.M., Rasmussen, S., Dahl, T.W., Rosing, M.T., Poole, A.M., Sicheritz-Ponten, T., Brunak, S., et al. (2013). Bacterial natural transformation by highly fragmented and damaged DNA. *PNAS* *110*, 19860–19865.
- Ringel, P.D., Hu, D., and Basler, M. (2017). The Role of Type VI Secretion System Effectors in Target Cell Lysis and Subsequent Horizontal Gene Transfer. *Cell Rep* *21*, 3927–3940.
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* *30*, 2068–2069.
- Traglia, G.M., Place, K., Dotto, C., Fernandez, J.S., Montaña, S., Bahiense, C.D.S., Soler-Bistue, A., Iriarte, A., Perez, F., Tolmasky, M.E., et al. (2019). Interspecies DNA acquisition by a naturally competent *Acinetobacter baumannii* strain. *Int. J. Antimicrob. Agents* *53*, 483–490.
- Weber, B.S., Miyata, S.T., Iwashkiw, J.A., Mortensen, B.L., Skaar, E.P., Pukatzki, S., and Feldman, M.F. (2013). Genomic and functional analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter*. *PLoS ONE* *8*, e55142.
- WHO (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.
- Wick, R.R., Judd, L.M., Gorrie, C.L., and Holt, K.E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLOS Computational Biology* *13*, e1005595.
- Wilharm, G., Piesker, J., Laue, M., and Skiebe, E. (2013). DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J. Bacteriol.* *195*, 4146–4153.

Wisplinghoff, H., Paulus, T., Lugenheim, M., Stefanik, D., Higgins, P.G., Edmond, M.B., Wenzel, R.P., and Seifert, H. (2012). Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *Journal of Infection* 64, 282–290.

Zafra, O., Lamprecht-Grandío, M., de Figueras, C.G., and González-Pastor, J.E. (2012). Extracellular DNA Release by Undomesticated *Bacillus subtilis* Is Regulated by Early Competence. *PLoS One* 7.

Funding Information

This work was supported by the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR). ASG and MHL were also supported by *Programme Jeune Chercheur* from VetAgro Sup Higher Education and Research. AL and MH were supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES).

Acknowledgments

We thank the LABEX ECOFECT for building the “ecofectian” community. We are grateful to Omran Allatif of the Bioinformatics and Statistical platform in the CIRI for useful comments on Rstudio scripts.

Supplementary Material

Transfer of large antibiotic resistance islands in pathogenic *Acinetobacter* spp.

Table S1: Bacterial strain used in this study

Table S2: Primers used in this study

Table S3: Antimicrobial susceptibility profiles of transformants

Figure S1: T6SS-mediated killing assay of *A. nosocomialis* strain M2 in LB medium.

Figure S2: T6SS-mediated killing assay of a VgrG3 impaired mutant of *A. nosocomialis* strain M2 in LB medium.

Table S1: bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain	Description/phenotype	Reference
Recipient strains for natural transformation		
M2	<i>A. nosocomialis</i> strain M2 wild-type	(Niu et al., 2008)
M2 Rif ^R	Spontaneous <i>rpoB</i> mutant; rifampicin resistant	This study
M2 Rif ^R $\Delta comEC::aacC4$	Insertion of an apramycin resistance cassette in the <i>comEC</i> gene of the M2 Rif ^R mutant; Non transformable and rifampicin resistant	This study
AYE	<i>A. baumannii</i> strain AYE wild-type	(Fournier et al., 2006)
AYE Rif ^R	Spontaneous <i>rpoB</i> mutant; rifampicin resistant	This study
29D2	<i>A. baumannii</i> nonclinical isolate 29D2 wild-type	(Wilharm et al., 2017)
29D2 Rif ^R	Spontaneous <i>rpoB</i> mutant; rifampicin resistant	This study
A118	<i>A. baumannii</i> strain A118 wild-type	(Ramirez et al., 2010)
A118 Rif ^R	Spontaneous <i>rpoB</i> mutant; rifampicin resistant	This study
27304	<i>A. baumannii</i> veterinary clinical isolate 27304	Resapath, ANSES
27304 Rif ^R	Spontaneous <i>rpoB</i> mutant; rifampicin resistant	This study
27024	<i>A. baumannii</i> veterinary clinical isolate 27024	Resapath, ANSES
27024 Rif ^R	Spontaneous <i>rpoB</i> mutant; rifampicin resistant	This study

Donor strains for natural transformation		
40288	<i>A. baumannii</i> veterinary clinical isolate 40288; carbapenems resistant	(Lupo et al., 2016)
40288 $\Delta comEC::aacC4$	Insertion of an apramycin resistance cassette in the <i>comEC</i> gene; Not naturally transformable	This study
AB5075	<i>A. baumannii</i> strain AB5075 wild-type; carbapenems resistant	(Jacobs et al., 2014)
37986	<i>A. baumannii</i> veterinary clinical isolate 37986; carbapenems resistant	(Lupo et al., 2016)
CNRAB1	<i>A. baumannii</i> human clinical isolate CNRAB1; carbapenems resistant	CNR*
M2 $\Delta comEC::aacC4$	Insertion of an apramycin resistance cassette in the <i>comEC</i> gene; Not naturally transformable	This study
AYE $\Delta comEC::aacC4$	Insertion of an apramycin resistance cassette in the <i>comEC</i> gene; Not naturally transformable	This study
AB5075 $\Delta comEC::aacC4$	Insertion of an apramycin resistance cassette in the <i>comEC</i> gene; Not naturally transformable	This study

*Centre National de Référence de l'antibiorésistance de Besançon, France.

Table S2: primers used in this study

Genetic construct	Name	Sequence 5' to 3'	Template; Annealing site
Chromosomal modifications using overlap extension PCR			
<i>comEC::aacC4</i>	comEC_UP_F	TGGTGTCGCTGTACTAATTACGGT	AB5075 genomic DNA; 2kb upstream of the <i>comEC</i> gene
	comEC_apra_R	GTGCCGTGCTAGTAGCACGCCCTCCCGTTCAGAGCCTCGCCCACTTTTTC	AB5075 genomic DNA; Chimeric, middle of the <i>comEC</i> gene
	comEC_apra_F	GGCGAGCGGTCAGCTAACCGACTCGAGTACTGGATAGGCTCTGGTTGAGTA	AB5075 genomic DNA; Chimeric, middle of the <i>comEC</i> gene
	Apr_Fw	CAGGCTGGGTGCCAAGCTCT	pMHL-2 (Godeux et al., 2018) ; downstream <i>aacC4</i> gene
	Apr_Rev	TCATGAGCTCAGCCAATCGACTGG	pMHL-2 (Godeux et al., 2018) ; upstream <i>aacC4</i> gene
	comEC_DW_R	CTTCAGTTCACGCATCAAGCTTGT	AB5075 genomic DNA; 2kb upstream of the <i>comEC</i> gene
Primers for control of the transformants using colony PCR			
	comM-For	CCACAATGGAACAAGAAGATGTCT	M2 genomic DNA; 5' of the <i>comM</i> gene
	comM-Rev	TTAAGAGTGATTACCTCGATAAGA	M2 genomic DNA; 3' of the <i>comM</i> gene
	OXA23-For	GATCGGATTGGAGAACCAGA	<i>bla_{OXA-23}</i> gene
	OXA23-Rev	ATTTCTGACCGCATTTCCAT	<i>bla_{OXA-23}</i> gene
	mlo-80	CGGATCTTCGATGCTGGC	AbaR1 from AYE strain
	mlo-84	GCAACGATGTTACGCAGC	AbaR1 from AYE strain
	5'-J-Rev	ATGGAATGTAGTACTCTGACG	AbaR1 from AYE; AbaR junction
	3'-J-For	GATTCACATCATATTCATTCGCCC	AbaR1 from AYE; AbaR junction

Minimum inhibitory concentration (E-test)				
Antibiotic	40288 WT	M2 WT	M2 Rif ^R <i>comM</i> ::AbaR4	M2 Rif ^R <i>vgrG3</i> ::Tn2006
IMP	>32	0.25	>32	>32

Table S3: Antimicrobial susceptibility profiles of imipenem resistant transformants. Two different transformants that acquired a distinct genetic context of the Tn2006-*bla*OXA-23 were tested. In M2 *comM*::AbaR4, the transposon is localized in the AbaR4 inserted in the *comM* gene. In M2 *vgrG3*::Tn2006, the transposon is inserted in the *vgrG3* gene encoding a T6SS element. Susceptibility of the strains to imipenem were compared by E-test strips (BioMérieux, France). The strain *Pseudomonas aeruginosa* CIP 7110 was used as control.

Inhibition zone diameter in mm					
Antibiotic	AYE WT	M2 WT	M2 Rif ^R	M2 Rif ^R <i>comM</i> ::AbaR1	
				Clone 1	Clone 2
AMK	8	29	28	15	14
GEN	6	29	28	12	12
TOB	6	26	25	9	7
TIG	19	25	27	29	27
FOS	8	6	6	6	6
COL	19	19	20	20	20
CIP	6	26	29	29	29
PIP	6	22	22	12	14
TIC	6	30	25	6	6
IMP	28	40	40	40	40
TZP	14	29	25	25	25
TIM	15	29	28	23	25
MEM	20	33	27	23	24
CAZ	6	23	22	6	6
FEP	6	26	25	6	6
ATM	6	16	10	6	6
RIP	13	17	6	6	6

Minimum inhibitory concentration (E-test)					
Antibiotic	M2	AYE WT	M2 Rif ^R <i>comM</i> ::AbaR1		
			AYE Δ AbaR	Clone 1	Clone 2
TET	4	128	8	48	48

Table S4: Antimicrobial susceptibility profiles of tetracycline resistant transformants.

Susceptibility of the strains to a panel of 17 antibiotics: amikacin (AMK), gentamicin (GEN), tobramycin (TOB), tigecycline (TIG), Fosfomycin (FOS), colistin (COL), ciprofloxacin (CIP), piperacillin (PIP), piperacillin-tazobactam (TZP), ticarcillin (TIC), ticarcillin-clavulanic acid (TIM), ceftazidime (CAZ), cefepime (FEP), meropenem (MEM), aztreonam (ATM), rifampin (RIF) and imipenem (IMP) was evaluated by disc diffusion on Muller-Hinton agar (Biorad, France) following the CA-SFM 2013 recommendations. Inhibition values were interpreted according to CA-SFM 2013 breakpoints for all antibiotics but aztreonam, for which *Pseudomonas* spp. breakpoints were used. Resistance of wild type AYE, AbaR-cured AYE mutant (AYE Δ AbaR from Gdeux et al. 2020) and M2 *comM*::AbaR1 transformants were also compared by E-test strips (bioMérieux, France) for tetracycline (TET). The strain *Pseudomonas aeruginosa* CIP 7110 was used as control for all the antibiotic susceptibility testing.

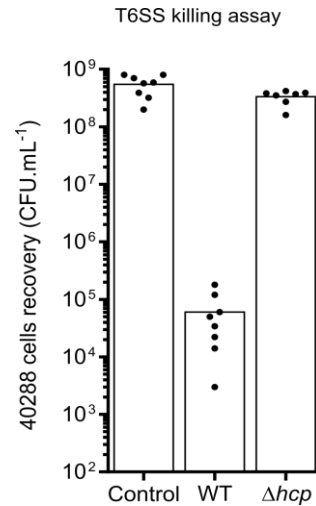


Figure S1. T6SS-mediated killing assay of *A. nosocomialis* strain M2 in LB medium.

Recovery of the *A. baumannii* strain 40288 incubated either with the wild type M2 strain (WT) or its *hcp* gene mutant derivative (Δhcp). The assays were performed according to Carruthers et al., 2013. Strains were grown 2h at 37°C in liquid LB, when ODs were below 2, they were diluted to an OD of 0.4. The bacterial suspensions were then mixed for a ratio of 10:1 (predator:prey) and 10 μ L of the mixed suspension spotted on a dried plain LB plate then incubated at 37°C during 4h.

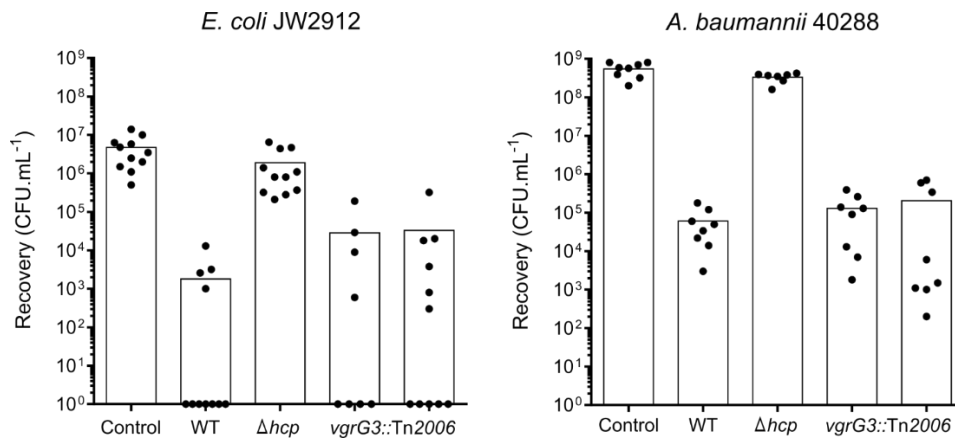


Figure S2: T6SS-mediated killing assay of a VgrG3 impaired mutant of *A. nosocomialis* strain M2 in LB medium.

Killing assays were performed as described in figure S1. *Escherichia coli* strain JW2912 (Kan^R) and *A. baumannii* strain 40288 were both used as preys and were incubated either with the wild type M2 strain (WT), its *hcp* gene mutant derivative (Δhcp) or with an imipenem resistant transformant carrying an insertion into the *vgrG3* gene (*vgrG3*::Tn2006, two transformants tested).

REFERENCES:

- Carruthers, M.D., Nicholson, P.A., Tracy, E.N., and Munson, R.S. (2013). *Acinetobacter baumannii* Utilizes a Type VI Secretion System for Bacterial Competition. *PLoS One* 8.
- Fournier, P.-E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., et al. (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2, e7.
- Godeux, A.-S., Lupo, A., Haenni, M., Guette-Marquet, S., Wilharm, G., Laaberki, M.-H., and Charpentier, X. (2018). Fluorescence-based detection of natural transformation in drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology* JB.00181-18.
- Jacobs, A.C., Thompson, M.G., Black, C.C., Kessler, J.L., Clark, L.P., McQueary, C.N., Gancz, H.Y., Corey, B.W., Moon, J.K., Si, Y., et al. (2014). AB5075, a Highly Virulent Isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a Model Strain for the Evaluation of Pathogenesis and Antimicrobial Treatments. *MBio* 5, e01076-01014.
- Lupo, A., Châtre, P., Ponsin, C., Saras, E., Boulouis, H.-J., Keck, N., Haenni, M., and Madec, J.-Y. (2016). Clonal Spread of *Acinetobacter baumannii* Sequence Type 25 Carrying blaOXA-23 in Companion Animals in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61.
- Niu, C., Clemmer, K.M., Bonomo, R.A., and Rather, P.N. (2008). Isolation and Characterization of an Autoinducer Synthase from *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 190, 3386–3392.
- Ramirez, M.S., Don, M., Merkier, A.K., Bistué, A.J.S., Zorreguieta, A., Centrón, D., and Tolmasky, M.E. (2010). Naturally Competent *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate as a Convenient Model for Genetic Studies. *J Clin Microbiol* 48, 1488–1490.
- Wilharm, G., Skiebe, E., Higgins, P.G., Poppel, M.T., Blaschke, U., Leser, S., Heider, C., Heindorf, M., Brauner, P., Jäckel, U., et al. (2017). Relatedness of wildlife and livestock avian isolates of the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* to lineages spread in hospitals worldwide. *Environ. Microbiol.* 19, 4349–4364.

2. L'inhibition de la transformation naturelle par les ilots de résistance AbaRs favorise la fixation de la résistance aux antibiotiques dans la population d'*Acinetobacter baumannii*

2.1. Contexte :

Le rôle évolutif de la transformation naturelle a toujours été sujet à débat au sein de la communauté scientifique. L'hypothèse la plus couramment acceptée est celle de la diversité génétique qui propose que ce mécanisme serve principalement à acquérir de nouveaux gènes. En cela, la transformation naturelle est souvent considérée comme une forme de reproduction sexuelle chez les bactéries permettant d'améliorer leur capacité adaptative par l'apport de nouveau matériel génétique.

Les approches scientifiques du problème de l'évolution des mécanismes sexuels, dont la transformation naturelle, chez les bactéries et leurs conséquences, ont été majoritairement le domaine de la théorie génétique des populations et de la modélisation mathématique (Leclerc et al., 2019; Moradigaravand and Engelstädter, 2013; Redfield, 2001). Ces outils permettent en effet d'appréhender la très grande complexité de la dynamique des transferts de gènes au sein des populations bactériennes, et en particulier de gènes de résistance aux antibiotiques. Cependant, seule une minorité de ces travaux se concentrent sur la transformation naturelle, malgré les preuves croissantes de l'importance de ce mécanisme dans la dissémination de l'antibiorésistance (Leclerc et al., 2019).

Récemment, une nouvelle hypothèse sur le rôle de la transformation naturelle a été proposée par Croucher et al. dans des travaux alliant modélisation mathématique et données expérimentales (Croucher et al., 2016). Cette hypothèse propose que la transformation naturelle serve à « nettoyer » le chromosome en permettant l'élimination des MGEs parasites insérés dans le génome. Cette théorie s'appuie principalement sur le fait que la transformation naturelle présente en réalité un biais pour l'acquisition de fragments de petite tailles, diminuant ainsi la probabilité d'acquérir un MGE. Cette asymétrie favorisera alors l'élimination, plutôt que l'addition d'ADN dans le chromosome (Apagyi et al., 2017), et pourrait également stabiliser les populations bactériennes hétérogènes soumis à une sélection négative (Harrow et al., 2020). Croucher souligne également que de nombreux MGEs interfèrent avec la transformation naturelle (Croucher et al., 2016). Ce phénomène pourrait être expliqué par le comportement « égoïste » de ces entités génétiques qui favorisera alors diverses stratégies leur permettant de limiter leur probabilité d'être éliminés par transformation naturelle.

Cependant, cette inhibition de la transformation naturelle pourrait également provoquer une baisse du fitness de la bactérie en l'empêchant de réaliser ce mécanisme fondamental.

L'interférence d'un MGE avec la transformation naturelle peut se manifester de différente manière chez les bactéries (Blokesch, 2017). Chez la bactérie *A. baumannii* par exemple, la présence d'un îlot de résistance (dénommé Ab-RI dans la suite du texte) inséré dans le gène *comM* est susceptible de diminuer la capacité de la bactérie à réaliser la transformation naturelle étant donné la fonction importante mais non-essentielle de ce gène de compétence (Nero et al., 2018). De façon intéressante, la présence de cet îlot dans le gène de *comM* est fortement répandue parmi les isolats cliniques multi-résistants aux antibiotiques d'*A. baumannii* (Bi et al., 2019). Les îlots Ab-RI apportent donc à la fois un bénéfice pour la cellule du fait des gènes de résistance qu'ils transportent avec eux, tout en interférant avec un mécanisme important de la bactérie hôte. En inhibant la transformation naturelle, les MGEs peuvent empêcher leur élimination du chromosome bactérien, ils peuvent également réduire l'aptitude de leur cellule hôte, conduisant éventuellement à un compromis pour optimiser leur maintenance à long terme.

2.2. Objectifs :

Dans cette étude, nous avons combiné données expérimentales et modèle mathématique afin d'étudier les conséquences de l'interférence d'un MGE avec la transformation naturelle sur sa persistance dans une population hétérogène. Nous avons tout d'abord créé un modèle expérimental robuste, fondé sur des observations empiriques réalisées chez la bactérie *A. baumannii*. Nous avons ensuite exploité ce modèle afin de quantifier l'effet d'un îlot de résistance sur le fitness sur leur hôte bactérien puis les différents niveaux d'inhibition de la transformation naturelle de MGEs présentant différentes stratégies d'interférence. Enfin, nous avons ensuite utilisé un modèle mathématique s'appuyant sur ces données expérimentales et empiriques pour tester l'hypothèse que les MGEs transférés horizontalement par transformation peuvent recourir à des stratégies « égoïstes » visant à maximiser leur propre fixation et leur propagation dans les populations bactériennes.

2.3. Résultats principaux et discussion :

Un facteur important de la fixation d'un MGE acquis horizontalement par une bactérie dans une population hétérogène est son effet sur le fitness de la cellule hôte. Nous avons donc tout d'abord quantifié cet effet pour deux îlots de résistance d'*A. baumannii* (Ab-RI) différents : (i) l'îlot AbA4, d'une taille moyenne (16-Kbp) et contenant un gène de résistance aux carbapénèmes, et (ii) l'îlot AbA1, d'une taille importante (86-Kbp) et contenant plus de 40 gènes de résistance putatifs. Les Ab-RI ont été transférés horizontalement dans une même

souche réceptrice *A. nosocomialis* M2, puis l'effet sur le fitness de cet hôte a été mesuré grâce à des compétitions bactériennes. Nous avons observé que l'îlot AbaR1 avait un effet négatif sur le *fitness* de la bactérie, en adéquation avec sa grande taille et sa composition en gènes. En comparaison, l'AbaR4 présentait un effet négatif modéré sur son hôte et uniquement dans l'un des deux milieux testés, l'effet étant neutre dans le second milieu.

Nous avons ensuite créé un modèle expérimental simple, s'appuyant sur les données empiriques observées chez les isolats cliniques d'*A. baumannii*, afin de quantifier le niveau d'interférence des Ab-RI. Nous avons pour cela construit différents mutants chez lesquels les gènes *comM*, *pilT* ou *pho* sont interrompus, représentant respectivement des stratégies d'inhibition modérée, totale ou nulle de la transformation naturelle. Nous avons ensuite mesuré la capacité de chacun à acquérir un gène contenant une mutation ponctuelle dans des conditions de co-culture. Nous avons alors observé que l'interruption du gène *comM* provoquait une diminution faible de la capacité de la bactérie à acquérir la mutation ponctuelle (diminution moyenne de 0,7-log), mais que cette diminution était beaucoup plus importante dans le cas de l'acquisition d'un fragment d'ADN hétérologue d'une taille supérieure à 2-Kbp (diminution moyenne de 2-logs). Ces résultats confirmèrent alors ceux obtenus récemment par Nero et al. chez *V. cholerae* et *A. baylyi*, chez qui l'absence de ComM provoque également une baisse plus importante de la capacité à acquérir une séquence hétérologue de quelques paires de bases, plutôt qu'une mutation ponctuelle (Nero et al., 2018). En outre, nous avons également observé que plus la taille du fragment d'ADN augmentait, plus sa fréquence d'acquisition diminuait.

En accord avec l'hypothèse de la théorie de « la transformation pour nettoyer » proposée par Croucher et al., nous avons ensuite comparé la capacité des bactéries avec ou sans gène *comM* fonctionnel, à éliminer un fragment d'ADN hétérologue d'une taille croissante comprise entre 2 et 16-Kbp. Les résultats obtenus ont tout d'abord montré que les fréquences d'élimination étaient significativement plus hautes que les fréquences d'acquisition, confirmant le caractère asymétrique de la transformation naturelle (Apagyi et al., 2017). En revanche, l'augmentation de la taille du fragment éliminé ne provoquait de baisse de son élimination que dans le cas des bactéries ne possédant pas le gène *comM* fonctionnel. ComM pourrait alors être particulièrement importante pour faciliter l'élimination d'ADN du chromosome, en particulier de long fragments hétérologues.

En exploitant données empiriques et expérimentales obtenues chez le modèle *A. baumannii*, nous avons ensuite construit un modèle mathématique afin de simuler différentes situations de compétition entre variants d'Ab-RI théoriquement en compétition pour l'exploitation de l'hôte. Chaque variant possède son propre site d'insertion spécifique illustrant des stratégies différentes d'interférence avec la transformation naturelle : inhibition incomplète (interruption de *comM*), inhibition totale (interruption de *pilT*) et absence d'inhibition (interruption de *pho*).

Le modèle permet alors de simuler la dynamique d'une communauté de MGEs exploitant des bactéries évoluant dans un environnement fluctuant, afin de comprendre l'effet de la stratégie d'insertion sur le succès évolutif des MGE intégrés. Les AbaRs sont des MGEs apportant une résistance à un stress antibiotique, mais provoquant un coût sur le *fitness* de leur hôte bactérien. Le stress antibiotique provoque une augmentation de la mortalité des cellules sensibles mais pas celle des cellules portant un AbaR.

Les premières simulations réalisées modélisent une situation simple où les AbaRs avec différentes stratégies sont en compétition pour un hôte cellulaire. Les résultats ont alors démontré que lorsque l'environnement est suffisamment stressant, perturber un gène de compétence comme *comM* ou *pilT*, plutôt qu'un gène neutre comme *pho*, devient alors une stratégie avantageuse pour l'AbaR qui représente la majorité des génotypes présents en fin de simulation. Cependant, dans cette situation simple, les proportions de cellules *comM::AbaR* et *pilT::AbaR* sont identiques, suggérant qu'une inhibition partielle de la transformation naturelle est suffisante pour fournir cet avantage.

Cependant, les données empiriques démontrent que l'insertion dans le gène *comM* est majoritaire. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'inhibition partielle provoqué par cette interruption du gène *comM* était plus avantageuse pour la cellule hôte car elle lui permet de conserver une part de sa capacité d'adaptation grâce à l'acquisition de mutations ponctuelles (SNP, Single Nucleotide Polymorphism). Dans les simulations suivantes, nous avons donc ajouté un second paramètre de stress antibiotique lié à la présence ou l'absence d'un allèle présentant un SNP (stress2). Les résultats des simulations montrent alors que la population de cellules de génotype *comM::AbaR* persiste de façon stable dans la population totale, leur quantité restant constante quelle que soit la fréquence du stress2, au contraire de la population de cellules avec les génotypes *pilT::AbaR* et *pho::AbaR*, plus variables selon l'intensité du stress2.

Ainsi, ces résultats montrent donc qu'une inhibition partielle de la transformation par un AbaR pourrait avoir facilité le succès de ces îlots en leur permettant de réduire la capacité de la cellule hôte à nettoyer ses MGEs par transformation naturelle, tout en lui permettant néanmoins de conserver une capacité d'adaptation *via* l'acquisition ou la perte de mutations ponctuelles. Dans l'ensemble, le succès évolutif des îlots de résistance chez *A. baumannii* pourrait donc être en partie dû à leur site d'insertion prédominant, le gène *comM*.

Enfin, nous avons continué à étudier ce possible avantage de l'inhibition partielle de la transformation sur la stabilité et la compétitivité des AbaR dans des environnements fluctuants, en étendant le modèle de calcul pour tenir compte de deux SNP affectant cette fois la croissance cellulaire plutôt que la mortalité due à un antibiotique, selon des fluctuations environnementales. Les résultats obtenus démontrent que les cellules possédant des AbaRs capables d'interférer avec la transformation, les cellules *comM::AbaR* et *pilT::AbaR*,

deviennent majoritaires dans ces conditions de stress. Cependant, ces deux populations subsistent de manière presque équivalente, suggérant que le caractère intermédiaire de l'inhibition de la transformation présentées par les cellules *comM::AbaR* n'a pas suffi à leur conférer d'avantage décisif par rapport aux cellules n'étant plus capables de réaliser la transformation. Or, cette distribution des différents génotypes dans la population obtenue lors de ces simulations ne reflète pas entièrement la situation observée dans les populations d'isolats cliniques d'*A. baumannii* (Bi et al., 2019). En effet, les bactéries présentant l'insertion d'un îlot de résistance dans un site autre que le gène *comM*, y compris dans le gène *pilT*, sont très minoritaires. Il est alors possible que dans ces simulations, l'absence de nettoyage des MGEs provoqué par une inhibition (totale ou non) de la transformation, soit finalement plus avantageuse que de préserver un certain niveau d'adaptation des bactéries par l'acquisition de SNPs.

2.4. Perspective : la transposition des îlots de résistance.

La transposition des îlots de résistance est un autre paramètre intéressant pouvant être inclus dans le modèle mathématique. En effet, les squelettes des îlots de résistance sont formés par des transposons apparentés aux transposons de la famille du Tn7, dont la caractéristique inhabituelle est de cibler des sites d'insertion spécifiques. Bien que les îlots *AbaRs* insérés dans le gène *comM* soient généralement considérés comme ayant perdu leur capacité de mouvement par transposition, nous avons pu observer lors de nos expériences que l'îlot *AbaR4* était encore capable de transposition. En effet, pour générer un mutant de la souche *A. nosocomialis* M2 portant un *AbaR4* inséré dans un site neutre pour la transformation naturelle, nous avons transféré l'*AbaR4* présent naturellement dans le gène *pho* de la souche *A. baumannii* AB0057 vers la souche M2, par transformation naturelle. Cependant, et de façon surprenante, nous avons observé après contrôle par amplification PCR, que le gène *comM* des transformants était alors également interrompu par un *AbaR4*, et nous n'avons pas été en mesure de retrouver de transformants avec la seule insertion de l'*AbaR4* dans le gène *pho*. Le mutant n'a alors pu être obtenu qu'après avoir inclus une mutation dans le gène *tniA* de l'*AbaR4* codant la transposase ou dans un mutant présentant une délétion dans le gène *comM*. Ceci suggère que le transposon formant le squelette de l'*AbaR4* posséderait une forte affinité pour le locus *comM*. Cette observation serait alors cohérente avec la forte prédominance de *comM* comme site d'insertion des îlots de résistance. Il serait alors intéressant d'intégrer ce mécanisme de transposition chez les MGEs en compétition dans le modèle mathématique, avec des MGEs présentant différentes stratégies d'affinités pour le site de transposition.

Enfin, une conséquence possible à ce mécanisme de transposition pourrait être que la présence d'un îlot de résistance *AbaR4* dans un autre locus que le gène *comM* ne serait en réalité possible que si le gène *comM* est déjà interrompu par un îlot. Des analyses génomiques centrées sur la recherche de co-occurrence d'une insertion dans *comM* et dans un second locus pourrait alors apporter des éléments de réponses.

2.5. Manuscrit de la publication en préparation

Inhibition of natural transformation by AbaR islands promotes fixation of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* population

Authors: Anne-Sophie Godeux^{a,b} and Gabriel Carvalho^c, Maria-Halima Laaberki^{a,b,#,*}, Samuel Venner^{c,#,*}, and Xavier Charpentier^{a,#,*}.

a. CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, 69100, Villeurbanne, France

b. Université de Lyon, VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Etoile, France.

c. UMR CNRS 5558 – LBBE "Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive", Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France.

Contributed equally

*Correspondence to Maria-Halima Laaberki, maria-halima.laaberki@vetagro-sup.fr, samuel.venner@univ-lyon1.fr, and Xavier Charpentier, xavier.charpentier@univ-lyon1.fr.

Abstract

Natural transformation (NT), a key mechanism of horizontal gene transfer in bacteria, allows the recombination of exogenous DNA fragments into the chromosome, following their internalisation from the external environment. This process has been primarily known to promote genetic diversity in bacteria through the acquisition of new genes, including mobile genetic elements (MGE), that often carry antibiotic resistance genes. However, an interesting new approach to the role of NT has been recently proposed in which bacteria could “clean” their chromosome by using exogenous, and free from parasitic MGE, DNA from neighbouring cells. This hypothesis has also been connected to empirical data showing that some MGE can interfere with NT in multiple ways in bacteria. In this work, we first used the well-known resistance islands inserted in the *comM* gene of naturally transformable pathogenic species of the *Acinetobacter* genus, to generate a powerful experimental model to quantify the interference of those islands with NT. Resulting empirical data were then implemented into a computational model in which multiple interference strategies and their consequences on the ability of the bacterial host to adapt and on the persistence of the MGE in bacterial population, can be simulated. Together, our data showed that although the insertion of an AbaR island in the *comM* gene induces a decrease in the ability of the bacterium to acquire DNA, especially heterologous DNA, this interference with natural transformation was not detrimental for the adaptability and the persistence of the bacterial host in fluctuating environments.

Introduction

Natural transformation, one of the main HGT mechanisms in bacteria (Blokesch, 2016; Johnston et al., 2014), allows a bacterium to uptake extracellular DNA (eDNA) from its environment, ultimately leading to the homologous recombination of the taken-up DNA into the bacterial chromosome when homology regions are present (Dubnau and Blokesch, 2019). Among HGT mechanisms, natural transformation has the particularity of being under the control of bacteria, unlike conjugation or transduction, which are driven by the transferred MGEs, i.e. plasmids or phages, respectively. The ability to transform is related to a particular phenotypic cell state, called competence, which is often triggered by environmental factors and is generally expressed at a given time by only a small minority of cells within a population (Johnston et al., 2014). Despite the difficulty of detecting the status of competence, it has been experimentally demonstrated in many bacterial species with various phylogenetic origins and in very different experimental setups (Blokesch, 2016; Harding et al., 2013; Meibom et al., 2005). Genes specifically involved in competence, such as *comEC* and *dprA*, are extremely widespread, and present an ubiquity close to essential genes (Carvalho et al., 2020; Pimentel and Zhang, 2018). This suggests that most bacterial species may actively transform in their natural habitat.

Despite the pervasiveness of natural transformation and that it was discovered almost a century ago (Griffith, 1928), its evolutionary function is still controversial (Ambur et al., 2016; Blokesch, 2016). Among the alternative hypotheses proposed, few benefits from strong empirical support. The most frequently emphasized function of transformation is to serve as a mean for genetic diversification and mixing in bacterial populations, favouring the emergence of favourable genetic polymorphisms and the efficient adaptation to new environments (Levin and Cornejo, 2009; Moradigaravand and Engelstädter, 2013; Takeuchi et al., 2014). In this model, bacteria take up DNA from neighbouring cells to acquire new genetic traits, mainly from the horizontal transfer of single nucleotide polymorphisms (SNP) (Hamidian et al., 2019) or mobile genetic elements (MGEs) such as transposons, integrons and genomic islands (Blokesch, 2017; Domingues et al., 2012). The consequence of this is that natural transformation serves as an open door for MGEs to enter a host cell, particularly integrated MGEs unable to drive their own horizontal transfer from cells to cells. Despite that, a growing body of evidences reveals that MGEs often interfere with natural transformation in their host bacteria leading to partial or total inhibition of the mechanism (Blokesch, 2017).

MGEs display various ways to interfere with transformation, however, although the mechanisms and the quantification of this interference are often well described, its consequences on the dynamics of MGEs and bacterial populations are poorly understood. Interference strategies include the production of an element that will interfere with the

mechanism or its regulation, such as the production of an extracellular DNase in *Campylobacter jejuni* and *Vibrio cholerae* (Blokesch and Schoolnik, 2008; Dalia et al., 2015; Gaasbeek et al., 2009) or the expression of a toxin-antitoxin operon that reduces the proportion of transformed cells in *Pneumococcus pneumoniae* (Chan and Espinosa, 2016), or the interruption of genes involved in natural transformation (Blokesch, 2017), such as the interruption of the *comM* gene by a large resistance island in *Acinetobacter baumannii* (Ab-RI). Those diverse strategies lead to various levels of interference with natural transformation. For instance, the interruption of the *comM* gene does not totally impaired natural transformation as this gene is known to be involved in, but not essential to natural transformation and only induce a decrease in the natural transformation efficiency (Nero et al., 2018).

Despite their probable interference with natural transformation, the Ab-RI inserted in the *comM* gene are found in most multi-drug resistant (MDR) clinical isolates of *A. baumannii* including isolates from both global clones 1 and 2 (Bi et al., 2019; Hamidian and Hall, 2018; Šeputienė et al., 2012). Those islands share a highly intricate structure formed by the accretion of multiple MGEs, a variable size and gene composition, and are known to often carry multiple antimicrobial resistances. AbaRs islands are the most well-characterized Ab-RI in *A. baumannii* and usually carry resistances to heavy metals and resistances to antibiotics such as tetracycline, aminoglycosides, chloramphenicol, ampicillin, and streptomycin. Another resistance island, named AbaR4 despite not being strictly classified as an AbaR island, has recently emerged as a major concern for the evolution of antibiotic resistance in *Acinetobacter* pathogenic species, as this island carries the *bla_{OXA-23}* gene (Mugnier et al., 2010; Yoon et al., 2017). This gene, when associated to a specific genetic context such as the Tn2006 transposon mainly found in AbaR4 islands, is responsible for the resistance to carbapenems, one of the last resort antibiotics used against multi-drug resistant (MDR) bacteria (Bassetti et al., 2019). While AbaRs islands are all inserted in the chromosomal locus of the *comM* gene, AbaR4 islands can be found in various genomic locations. These includes both genes involved in natural transformation such as the *comM* gene or the *pilT* gene (Wilharm et al., 2013), but also plasmids or other chromosomal loci with no known effect on natural transformation such as the *pho* gene (Bi et al., 2019; Hamidian et al., 2014). However, as insertions in the chromosomal locus of the *comM* gene represent the majority of the insertions of all Ab-RI found in clinical isolates of *A. baumannii* (Bi et al., 2019), this supposes that the interference with natural transformation is also widespread in those isolates. In the other hand, natural transformation is also considered as a major mechanism for the spread of MGEs associated with antibiotic resistance (AR-MGEs) in clinical isolates of *A. baumannii*. Growing evidence of intraspecies and interspecies exchanges of antibiotic resistance genes (ARGs) in *Acinetobacter* populations (Kim and Ko, 2015) indeed supports that the emergence of antibiotic resistance largely relies on the genetic acquisition of ARGs through horizontal gene transfers

(HGT) and especially through natural transformation, a mechanism widespread in clinical isolates of *A. baumannii* (Domingues et al., 2019; Godeux et al., 2018; Hu et al., 2019). This example perfectly emphasized the counterintuitive aspect of the interference of MGEs with a mechanism that contributes to their propagation. However, a recent hypothesis on the role of natural transformation may bring new insights on the understanding of this dynamics between MGE and natural transformation. Croucher and colleagues indeed recently proposes that natural transformation is a bacterial mechanism that cure bacterial genomes from their parasitic MGEs, mainly integrated phages, by replacing them with DNA from kin cells (Croucher et al., 2016). This hypothesis is partly based on the premise that transformation is biased toward the acquisition of homologous kin DNA rather than foreign DNA such as MGEs. In this way, transformation would promote the integrity or stability of the bacterial genome rather than its mixing (Apagyi et al., 2017).

In a previous work, we have unified the two major evolutionary functions of transformation, genetic diversification, and bacterial genome curing, within a single theoretical framework (Carvalho et al., 2020). Natural transformation could allow the bacterium to transiently acquire accessory genes carried by MGEs, by allowing their acquisition and subsequent removal, and would thus be a particularly effective strategy for buffering against unpredictable environmental fluctuations. Overall, while MGEs inhibiting transformation may prevent their removal from the bacterial chromosome, they may also reduce the fitness of their host cell, possibly leading to a trade-off to optimize their long-term maintenance.

In this new work, we combine experimental data to quantify this interference with a computational model to simulate its consequences on the persistence of MGEs with various interference strategies. Robust experimental models are generated to quantify the fitness effects of Ab-RIs on their bacterial host and the inhibition of natural transformation by Ab-RIs. Bacteria with disruption in *pilT*, *comM* and *pho* genes, known to be naturally interrupted by Ab-RIs but with diverse inhibition effect on natural transformation, are tested for their ability to acquire a single nucleotide polymorphism or a heterologous fragment. A computational model based on those experimental data is then used to computationally simulate the dynamics of a community of MGEs exploiting bacteria evolving in a fluctuating environment to understand the effect of the insertion strategy on the evolutionary success of integrated MGEs.

Results

The fitness effect of an Ab-RI varies with their type and with the culture medium.

Resistant islands bring benefits to their host as they carry multiple ARGs. But this benefit is highly dependent on the environment and thus can rapidly be a waste of energy when conditions change. The fixation of a horizontally acquired genetic element in bacterial

populations heavily depends on its fitness effect on the bacterial host (Bragg and Wagner, 2009). One major contributor to this effect, is the energetic burden caused by the transcription and translation activities of the genetic element that thus increases with the length of the sequence and the number of genes it contains. Horizontally transferred genes and mobile genetics elements carrying resistance genes may thus be deleterious to the bacterium by adding a fitness cost to the cell in absence of antibiotics (Baltrus, 2013). We measured the effect of the acquisition of a Ab-RI on the fitness of the same host bacterium through isogenic bacterial competitions assays (Knöppel et al., 2014). We first selected two different RI: (i) the AbaR4 island from the *A. baumannii* 40288 strain and the AbaR1 island from the *A. baumannii* strain AYE. The AbaR4 is a 16-kbp long Ab-RI that contains the *Tn2006-bla_{OXA-23}* transposon conferring the resistance to carbapenems, and the AbaR1 is a 86-Kb long Ab-RI that contains multiple transposons carrying various antibiotic resistance genes including 45 putative resistance genes and 2 operons associated with arsenic and mercury resistances (Fournier et al., 2006). Both AbaR1 and AbaR4 are inserted in the *comM* gene in the chromosome. The *A. nosocomialis* strain M2 was then chosen as the host bacterium for competition. This pathogenic specie of *Acinetobacter* is also often involved in nosocomial infections like *A. baumannii* (Wisplinghoff et al., 2012) but usually display a lot more sensitivities to antibiotics and is naturally transformable (Harding et al., 2013; Wilharm et al., 2013). While some Ab-RI have been found in some isolates of *A. nosocomialis*, the M2 strain does not carry any Ab-RI in its genome. Resistance islands were first horizontally transferred from the *A. baumannii* strain 40288 and strain AYE to the same *A. nosocomialis* strain M2 recipient using a scarless genome editing strategy (**tables S1 and S2**) (Godeux et al., 2020). Bacterial competitions were then performed between wild-type bacteria and their AbaR-deleted derived mutants. As the fitness cost may depend on the medium (Remold and Lenski, 2001), competitions were also performed in two different media containing multiple sources of carbon (LB broth and tryptone-NaCl medium) (**figure 1**).

As AbaR1 and AbaR4 were both inserted in the *comM* gene, we first measured the fitness effect of an interruption of the *comM* gene, by competing an M2 mutant with a deletion in the *comM* gene ($\Delta comM$) with the M2 WT strain (**figure S1**). As we did not observe any defect in the fitness of the $\Delta comM$ mutant in comparison to the WT strain, bacterial competitions were then performed between M2 AbaR-insert mutants (M2-AbaR1 and M2-AbaR4). In competitions between M2 AbaR1 and M2 WT, the presence of the AbaR1 was deleterious for their host cells with a selection coefficient around -0,03 in both media. In competition between M2 AbaR4 and M2 WT, the fitness effect of the Ab-RI was dependent on the competition medium. The presence of the AbaR4 was deleterious in richer medium (LB) with a selection coefficient of around -0,023 but had only a neutral effect in less rich medium (tryptone-NaCl). In both media,

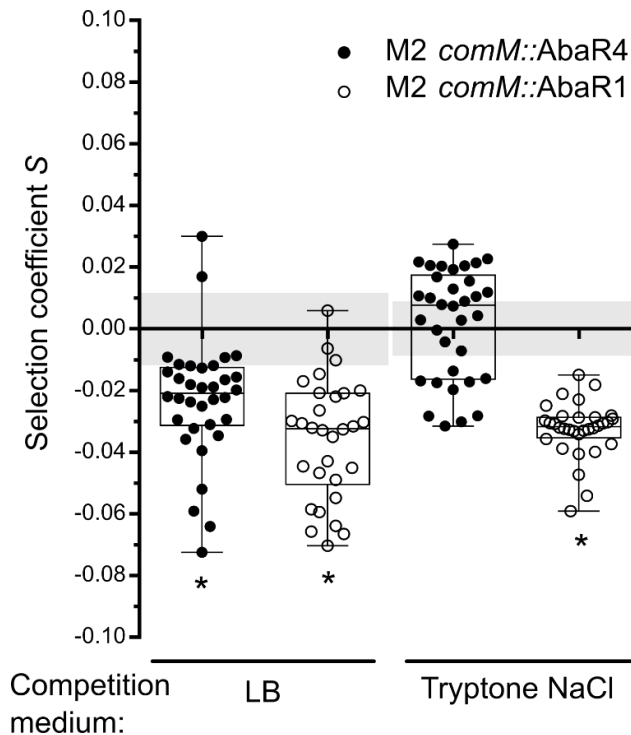


Figure 1: Analysis of the fitness of AbaR1 and AbaR4 insertion mutants.

Fitness costs of AbaR4 (black dots) and AbaR1 (white dots) insertion mutants were measured using isogenic bacterial competitions in LB medium (left) or in tryptone NaCl medium (right) and are reported relative to the M2 wild-type strain ($s=0$). Competitions between M2 WT and M2 Hu-sfGFP determined the detection limits of a neutral fitness effect indicated by the grey area ($|s|=0,0117$ for LB medium and $|s|=0,0088$ for tryptone NaCl). Measures of fitness are represented by the dotplot; Boxes represent the interquartile range (25th–75th percentile) and whiskers the range. * indicates deleterious AbaR.

the AbaR4 had a lower fitness negative effect of the cells than the AbaR1. This could be due to the smaller size of the AbaR4 that only contains the *bla*_{OXA-23} antibiotic resistance gene.

The interruption of the *comM* gene has a minor effect on the capacity of the bacteria to acquire a single nucleotide polymorphism.

To quantify different effects of the interference of an Ab-RI with natural transformation, three genetic locus, known to be insertion sites for Ab-RIs and with various levels of transformation inhibition, were selected: (i) the *pilT* gene, which is essential for natural transformation as its interruption completely abolishes the DNA uptake (Wilharm et al., 2013), (ii) the *comM* gene, the main insertion site for Ab-RIs and a non-essential gene for transformation as its interruption

has an intermediate effect on the ability of the bacterium to undergo transformation, (iii) and the *pho* gene, a gene that is not known to be involved in natural transformation.

To quantify the effect of the interruption of those genes on the ability of the *A. nosocomialis* strain M2 to horizontally acquire a SNP, mutants were generated from the M2 wild-type strain (WT) : The M2 $\Delta comM$ mutant with a deletion in the *comM* gene, the M2 *pilT::aphA* mutant with an interruption of the *pilT* gene and the M2 Δpho mutant with a deletion in the *pho* gene. Bacteria from the different mutants and the WT strain were then transformed with purified genomic DNA (gDNA) extracted from a non-transformable M2 mutant carrying a single mutation in the *rpoB* gene that confers the resistance to rifampicin (M2 *rpoB2* (Rif^R) *comEC::aacC4*) and frequency of rifampicin resistant transformants was measured and compared (**figure 2A**). Bacteria from the M2 WT strain displayed a high ability to acquire the rifampicin resistance with frequencies above $7,0 \cdot 10^{-3}$, whereas bacteria from the M2 $\Delta comM$ mutant displayed a ~6-fold reduction in their ability to acquire the SNP, similarly to what was observed in *V. cholerae* and *A. baylyi* (Nero et al., 2018). Moreover, we did not observe any defect in the natural transformation capacity of the M2 Δpho mutant, confirming that this gene is not involved in this mechanism.

Interesting data recently obtained in *Streptococcus pneumoniae* and *Vibrio cholerae* showed that natural transformation events that occur between cells in a mixed culture can lead to a more efficient uptake and recombination events (Cowley et al., 2018; Matthey et al., 2019). We thus performed new transformation assays in a mixed culture condition, to verify that the defect we previously observed in M2 $\Delta comM$ mutant persists in experimental conditions favouring cell-to-cell contact. We designed an experiment in which a kanamycin resistance marker was inserted in the chromosome of the recipient strains to only select for transformants originated from them, along with the M2 *rpoB2*(Rif^R) *comEC::aacC4* strain as a non-transformable donor to ensure the directionality of the transfer. Donor and recipient cells were then directly put in contact in a mixed culture. Interestingly, natural transformation frequencies for the acquisition of the rifampicin resistance in mixed culture independently from the state of the *comM* gene, were around ~500-fold lower than with purified gDNA for all the strains (**figure 2B**). This may be the consequence of using an M2 strain donor, as bacteria from this strain do not release enough free DNA to ensure the highest efficiency of natural transformation in mixed culture (data not published). However, as previously, we found a 6-fold reduction in the capacity of the bacteria lacking the *comM* gene to acquire the rifampicin resistance from neighbouring cells than when using gDNA. Bacteria without an intact *pho* gene did not display any significant defect in their natural transformation ability in those conditions either.

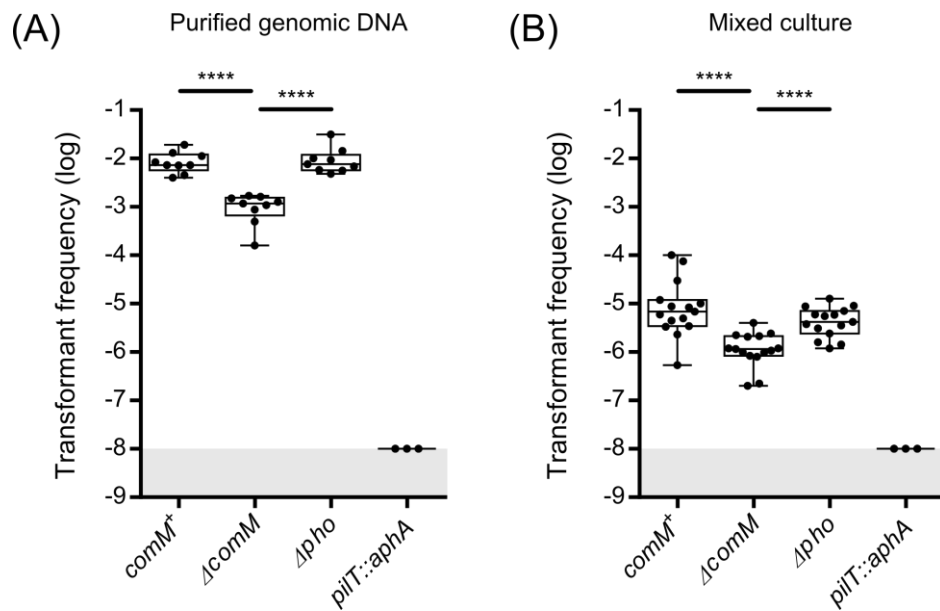


Figure 2: Single nucleotide polymorphism acquisition by natural transformation in mixed culture is impaired in a strain lacking an intact *comM* gene.

Transformation rates of a single mutation in the *rpoB* gene were measured for the wild-type strain (WT), a mutant with a deletion in the *comM* gene ($\Delta comM$), a mutant with a deletion in the *pho* gene (Δpho) and a non-transforming mutant (*pilT::aphA*). Transformation assays were performed using: **A.** purified genomic DNA extracted from a M2 *rpoB2* (Rif^R) *comEC::aacC4* donor or **B.** in mixed culture with the latter. Transformant frequencies represent the ratio between the number of transformants and the total number of recipient cells. The limit of detection for transformants frequencies is indicated by the grey area ($F < 10^{-8}$). Data are shown as experimental replicates (black dots) from at least 4 independent experiments. Statistics: Mann-Whitney non-parametric test, **** $P < 0.0001$.

The acquisition efficiency of a heterologous DNA fragment through natural transformation depends on its size and the integrity of the *comM* gene.

Although bacteria with a deletion in the *comM* gene had only a slight decrease in their ability to acquire a SNP through natural transformation, this defect is more likely to arise when heterologous DNA is acquired by the bacterium (Nero et al., 2018). We then hypothesized that the defect linked to the absence of an intact *comM* gene may also increase with the size of the acquired MGE, particularly when large DNA elements like an Ab-RI are recombined into the chromosome.

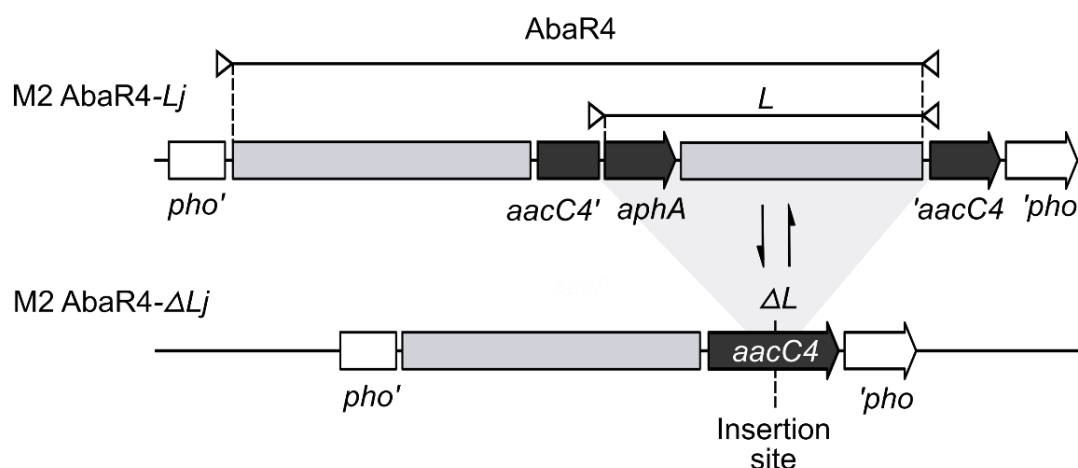
Based on previous work by Apaglyi *et al.*, we designed an experimental setup to compare the ability of bacteria with or without an intact *comM* gene, to horizontally acquire a heterologous DNA fragment of variable length from 2 to 16-Kb. Taking advantage of the presence of an AbaR4 island inserted in the *pho* gene of the chromosome of the *A. baumannii* strain AB0057,

we produced *A. nosocomialis* M2 mutants that carry a DNA insert (labelled *L*) of variable *j* length, that are parts of this Ab-RI (**figure 3A** and **figure S2** for detailed genetic modifications). Firstly, a parental genotype was generated by transferring the *AbaR4* island of the AB0057 strain into the *pho* gene of the M2 WT strain. The resulting strain M2 *AbaR4* was then modified to generate two sets of derivative genotypes used to measure the rate of exchange of the *L* insert of variable length *j*. The first set of derivative genotypes, labelled M2 *AbaR4-L_j*, have an insertion of a *j*-kb long DNA sequence into an *aacC4* apramycin resistance gene placed into the *AbaR4*. This way, the *L* fragment separates the 5' half of the *aacC4* gene, placed directly upstream an inserted *aphA* aminoglycoside resistance gene, from its 3' half placed directly at the end of the *AbaR4* (**figure 3A**). The second genotype, M2 *AbaR4-ΔL_j*, had the *L_j* DNA insert removed leading to the reconstitution of an intact *aacC4* gene. The acquisition of the *L* fragment by an *AbaR4-ΔL_j* recipient cell thus induces the loss of the apramycin resistance and the gain of the aminoglycoside resistance (**figure 3A**). In addition, transformation assays were performed in mixed culture between the M2 *AbaR4-ΔL_j* recipient with a *rpoB2*(Rif^R) rifampicin resistance marker, and a non-transformable M2 *AbaR4-L_j* donor carrying a *tetA* tetracycline resistance gene into the *comEC* gene (**figure 3B**). Finally, *ΔcomM* derivatives of each M2 *AbaR4-ΔL_j* genotype were obtained to compare the acquisition of the *L* fragment between *comM*⁺ and *ΔcomM* bacteria. We ensured that all bacteria from the *ΔcomM* genetic background displayed the same defect in their ability to acquire a 2-Kb control gene cassette, when compared to the *comM*⁺ background, independently from their *L* fragment (**figure S3**).

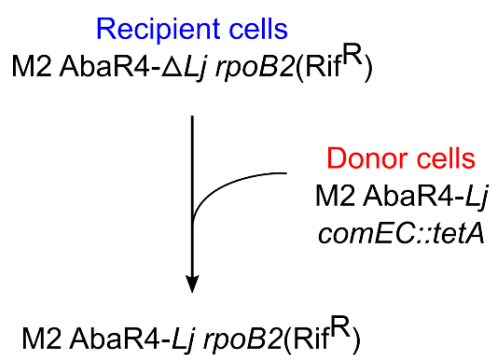
Each *AbaR4-ΔL_j* / *AbaR4-L_j* couple were submitted to natural transformation, and the acquisition rate of the *L* fragment relatively to its length was measured and compared between bacteria from the *comM*⁺ and the *ΔcomM* genetic background. Firstly, consistent with previous data from *Streptococcus pneumoniae* (Apagyi et al., 2017), we observed that the acquisition of the *L* fragment was less efficient as its length increased (**figure 3C**), confirming that long MGEs are less prone to be acquired by bacteria. However, bacteria lacking the *comM* gene displayed a globally impaired natural transformation ability that decreased their acquisition rates of the *L* fragment by around 2-logs compared to *comM*⁺ bacteria (**figure 3C**). Interestingly, we did not observe any additional defect in *ΔcomM* bacteria to acquire larger *L* fragments. Together, those results confirmed that the ComM protein is particularly important for the acquisition of heterologous DNA fragments irrespectively of its length.

Then, in line with the chromosome curing model of natural transformation, we hypothesized that the interruption of the *comM* gene could not only have an impact on the acquisition, but also on the deletion of heterologous DNA fragments from the chromosome. To test this hypothesis, we modified our system to quantify the effect of the absence of the *comM* gene on

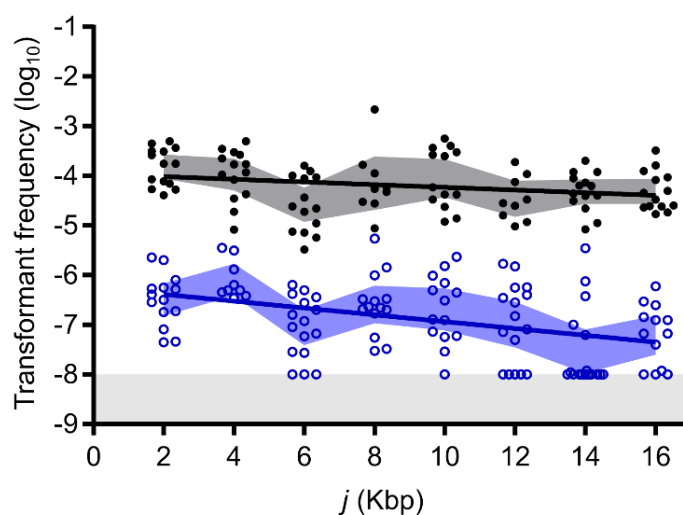
(A)



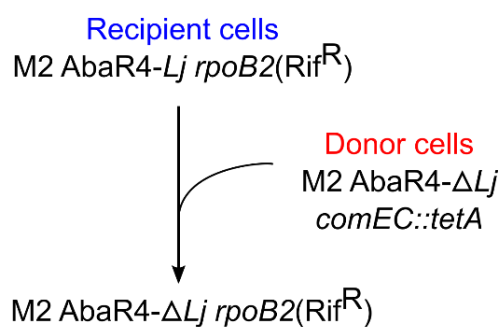
(B)



(C)



(D)



(E)

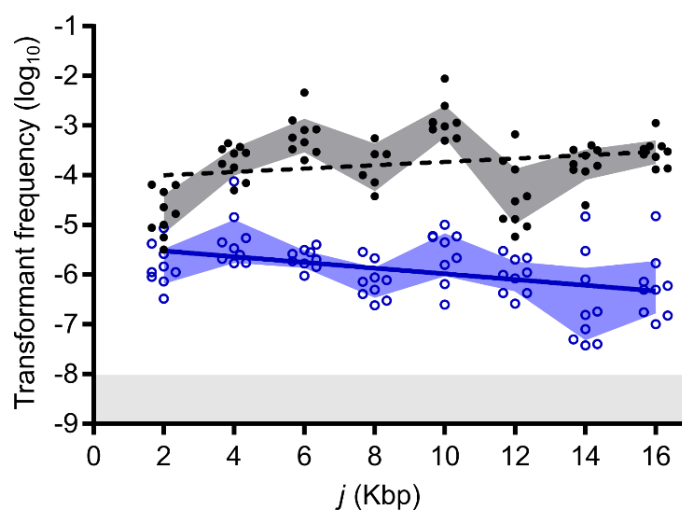


Figure 3: The ability of an AbaR-carrying bacterium to acquire or delete large heterologous DNA sequences through natural transformation is impaired due to the interruption of the *comM* gene.

A. Genotypes the M2 AbaR4-*Lj*/ Δ *Lj* couples used to generate events of acquisition or deletion of a heterologous DNA fragment. In the M2 AbaR4-*Lj* genotype, the *j*-kb long *L* fragment is part of an AbaR4 inserted in the *pho* gene, is delimited by the two halves of an *aacC4* apramycin resistance gene (*aacC4'* and '*aacC4*') and contains an *aphA* aminoglycoside resistance gene inserted directly downstream the 3'half of *aacC4*. In the M2 AbaR4- Δ *Lj* genotype, the *L* fragment has been removed to reconstruct the *aacC4* gene. The acquisition of *L* induces the expression of the *aphA* gene and the interruption of the *aacC4* gene leading to a kanamycin resistant/apramycin sensitive phenotype, whereas its deletion induces the reconstruction of an intact *aacC4* gene and the elimination of the *aphA* gene leading to a kanamycin sensitive/apramycin resistant phenotype. **B. and D. Genotypes of derivatives used as recipient or donor to generate the acquisition and the deletion of the *L* fragment.** Acquisition events were obtained by naturally transforming M2 AbaR4- Δ *Lj* *rpoB2*(Rif^R) recipient cells with non-transformable M2 AbaR4-*Lj* *comEC::tetA* and deletion events were obtained by naturally transforming M2 AbaR4-*Lj* *rpoB2*(Rif^R) recipient cells with non-transformable M2 AbaR4- Δ *Lj* *comEC::tetA*. **Natural transformation frequencies of C. acquisition or E. deletion of a heterologous *L* fragment with variable size in mixed culture.** Transformant frequencies are represented using a log transformation of the ratio of the number of transformants to the number of total recipient cells. The genetic backgrounds of the *comM* gene are represented for acquisition and for deletion of the *L* fragment (*comM*⁺ in black and Δ *comM* in blue). Replicates are represented by dots for each length of the *L* fragment (2 to 16-Kbp) and confidence intervals of the mean are indicated by the coloured area (*comM*⁺ in dark grey and Δ *comM* in blue). Detection limit ($F=8$) is indicated by the light grey area and experimental events where no acquisition or deletion events could be detected were considered as under this limit and were given the detection limit value. A regression linear model is represented for each condition, as a full line when the slope is significantly different from 0 or as a pointed line if not.

the deletion of the *L* fragment. To detect those events of deletion, the M2 AbaR4-*Lj* genotypes were used as Rif^R recipient cells and the M2 AbaR4- Δ *Lj* *comMEC::aacC4* were used as non-transformable donor cells (**figure 3D**). The deletion of the *L* fragment from the chromosome of an AbaR-*Lj* recipient cell induces the gain of the apramycin resistance and the loss of the aminoglycoside resistance (**figure 3A**). Transformation assays were performed as previously, and deletion rates of the *L* fragments were also compared depending on the state of the *comM* gene. Deletion rates were greatly impaired for Δ *comM* bacteria, with frequencies ranging between 1,0 to 2,8-log lowered, depending on *j*, in comparison to *comM*⁺ bacteria. Surprisingly, the length of the *L* fragment had no effect on the efficiency of its deletion from the chromosome of bacteria with an intact *comM* gene suggesting a different situation than when DNA is acquired (**figure 3E**). However, the deletion of the *L* fragment was less efficient as its length increased in bacteria with a non-intact *comM* gene (**figure 3E**), suggesting that the ComM protein might be particularly important for the deletion of DNA.

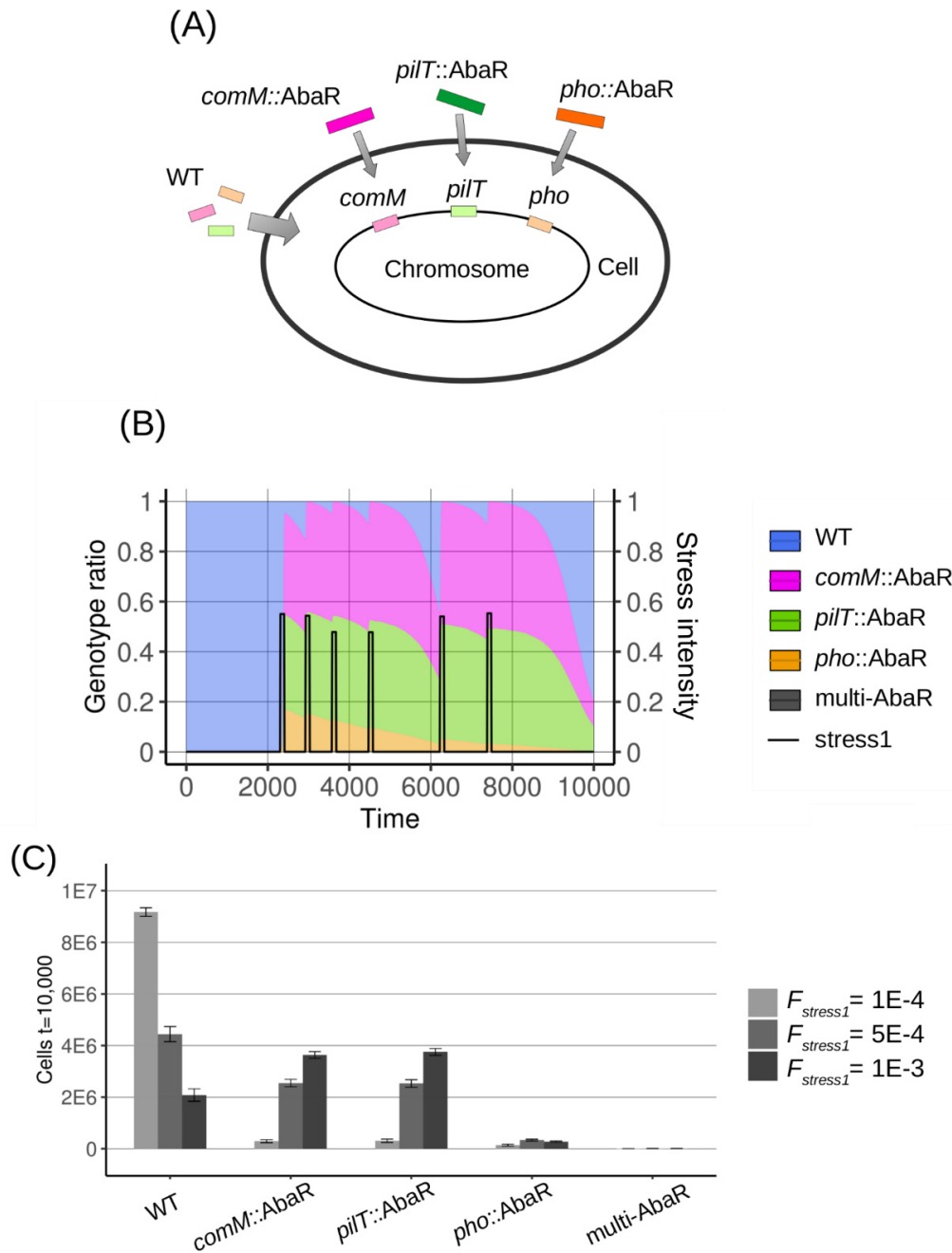


Figure 4: Simulated competitions between AbaR islands. **A.** Three AbaRs with specific insertion sites (*comM*, *pilT* or *pho*) compete to colonize the same bacterial population. AbaRs confer complete stress resistance but induce a fitness cost c , which reduces the growth rate of their host cell. Stress occurs randomly during simulations. **B.** Example of stress dynamic during one simulation. Here, 6 stress pulses occur. **C.** Mean number of cells of the different genotypes at the end of simulations ($t=10,000$) for an AbaR cost of 1%. WT are cells without any AbaR. *comM*::AbaR are cells with only the AbaR inserted in *comM*. *pilT*::AbaR are cells with only the AbaR inserted in *pilT*. *pho*::AbaR are cells with only the AbaR inserted in *pho*. multi-AbaR are cells with multiple AbaRs inserted in different sites (the costs of AbaRs are cumulated). Results are the mean and standard error of 200 simulations.

In addition to those results, we observed that independently from the status of the *comM* gene, natural transformation was significantly more efficient at deleting heterologous DNA fragments than at acquiring them (pairwise comparisons using the parametric student test or non-parametric Mann-Whitney-Wilcoxon test, p -values<0.0001). This effect is also more important as the size of the element increased, particularly for bacteria with a non-intact *comM* gene.

Inhibiting transformation is an advantage in the competition between AbaRs.

Our first data supports the role of natural transformation to also remove parasitic MGEs from the chromosome of bacteria. Given the impaired natural transformation in $\Delta comM$ bacteria, inhibiting transformation may thus be a strategy used by MGEs to prevent their removal and to improve their persistence in bacterial populations. To test this hypothesis, we used a computational model and simulated the dynamic of three competing AbaRls (labelled AbaR for convenience) with different insertion strategies: in *comM*, *pilT* or *pho* (**figure 4A**). The disruption of *comM* partially inhibits transformation, the disruption of *pilT* completely prevents DNA uptake and the disruption of *pho* is neutral. The differences in transformation between cells with an intact or non-intact *comM* gene in the computational model were calibrated with the experimental transformant frequencies measured for insertion and deletion in the *comM*⁺ and $\Delta comM$ bacteria (see Material & Methods and **table 1**). Simulations were initialized with only the WT bacterial genotype present and all AbaRs and WT alleles were added to the extracellular compartment at a residual rate. AbaRs confer stress resistance but reduce the growth rate of their host cell. The environment of bacteria was disturbed by a stochastic stress which increases the death rate of susceptible cells during limited periods (**figure 4B**). In experimental competitions, AbaR selection coefficients ranged between 0 and -0.05 depending on the culture medium and on the AbaR type (**figure 1**). To account for these potential costs, we simulated an AbaR cost c of 0.01, which translates into 1% growth reduction induced by each AbaR to its host cell in the model.

Simulation results showed that AbaRs targeting competence genes (*comM* or *pilT*) became successful in the condition with the highest stress frequency ($F_{stress1} = 1E-3$), whereas AbaRs targeting a genetic locus with no impact on transformation (*pho*::AbaR) were systematically lost from the total population (**figure 4C**). In those simulations, when the environment was sufficiently stressful, it thus became an advantageous strategy to disrupt a competence gene rather than a neutral gene such as *pho*. Although, the insertion of the AbaR in the *comM* gene partially inhibits transformation, which resulted in an incomplete protection against its deletion compared to the insertion in the *pilT* gene, they showed similar levels of fixation, suggesting that incomplete transformation inhibition is enough to provide a significant fitness advantage to AbaRs.

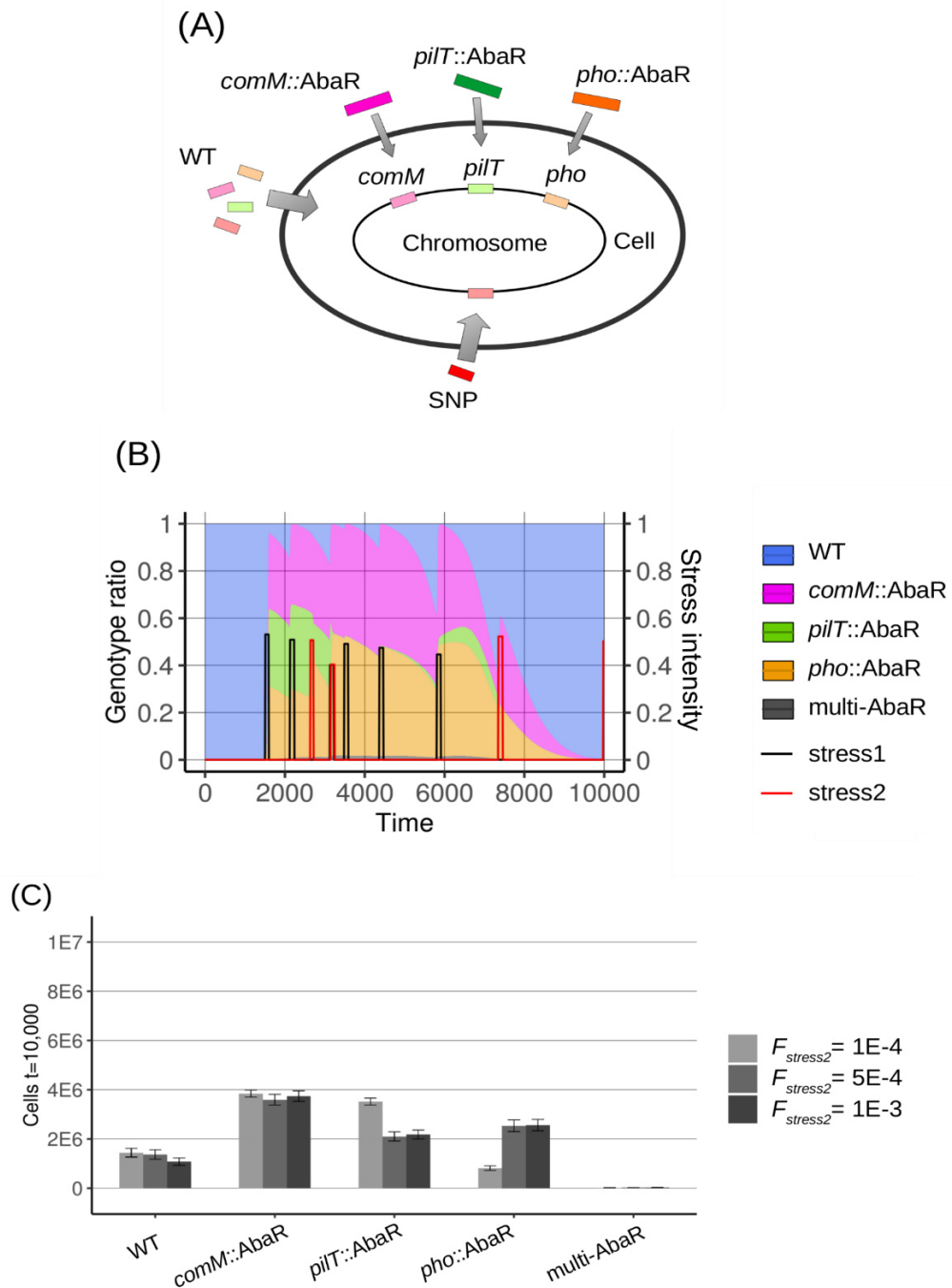


Figure 5: Simulated competition between AbaR genomic islands when one SNP provides resistance to a second stochastic stress. **A.** AbaRs provide resistance to stress1 and the SNP provides resistance to stress2. Like AbaRs, the SNP reduces the growth rate of its host by 1%. **B.** Example of stress dynamic during one simulation where 5 stress1 and 4 stress2 occur. Both stress types occur stochastically and independently. **C.** Mean number of cells with the different AbaR types (with and without the SNP) at the end of the simulations. Results are the mean and standard error of 200 simulations.

Transformation modulation by AbaRs targeting *comM* maintains the adaptability of their host bacteria.

Transformation inhibition seems to be an effective strategy to enhance the competitiveness of AbaRs. However, transformation can increase the fitness of bacteria and inhibiting it completely may be detrimental. Especially, transformation enhances the adaptation capacity of bacteria and their mean fitness in fluctuating environments (Carvalho et al., 2020; Wylie et al., 2010). The experimental data shows that the inactivation of *comM* significantly reduces SNP acquisition but does not completely prevent SNP uptake. Thus, targeting *comM* instead of other competence genes such as *pilT*, which completely prevent transformation, could preserve the adaptation capacity of AbaRs' host cells. To test this hypothesis, we extend the computational model to include a fourth insertion site which can be occupied by a SNP providing resistance to a specific stress (**figure 5A**), i.e. the AbaRs carry a resistance for stress1 and the SNP provides a resistance for stress2. Both stresses occur stochastically and independently (**figure 5B**). Surprisingly, results show that the *comM*::AbaR cells only slightly dominated the *pilT*::AbaR cells in the condition when the stress2 is $5E-4 \text{ t}^{-1}$ or higher (**figure 5C**). The mean quantity of *comM*::AbaR however remains constant regardless of the frequency of stress2 whereas *pilT*::AbaR and *pho*::AbaR are both influenced. The mean quantity of *pilT*::AbaR decreases with stress2 frequency while the mean quantity of *pho*::AbaR increases. Thus, cells with an AbaR inserted in the *comM* gene had a more stable persistence in the population despite the increased risk of AbaR removal due to the selective pressure for the acquisition of the SNP providing resistance. The preservation of the transformation efficiency of AbaR hosts may be advantageous for the cells despite the increased risk of AbaR removal due to the selective pressure for the acquisition of the SNP providing resistance.

SNPs providing resistance are not common and most of the time, those SNPs are neutral or deleterious in the absence of the antibiotics pressure (Melnyk et al., 2015). To further investigate the competitiveness of AbaRs in fluctuating environments, we extend the computational model to account for two SNPs affecting cell growth depending on environmental fluctuations. In addition to the three AbaR insertion sites, we add two insertion sites which can be occupied by single nucleotide polymorphisms (SNP) which increase or decrease the growth rate of bacteria depending on the environment type (**figure 6A**). In the default environment, each SNP decreases the growth rate of their host cell by 1% but, for each SNP, stochastic environmental switches occur during which cells with the corresponding SNP increase their growth rate by 1% (**figure 5B**). The wild type alleles of the SNP sites remain neutral (i.e. do not affect the growth rate) in all environments. Results show that in those conditions, cells carrying AbaRs that interfere with natural transformation predominated in the population (**figure 6C**). Surprisingly, both the *comM*::AbaR cells and the *pilT*::AbaR cells were

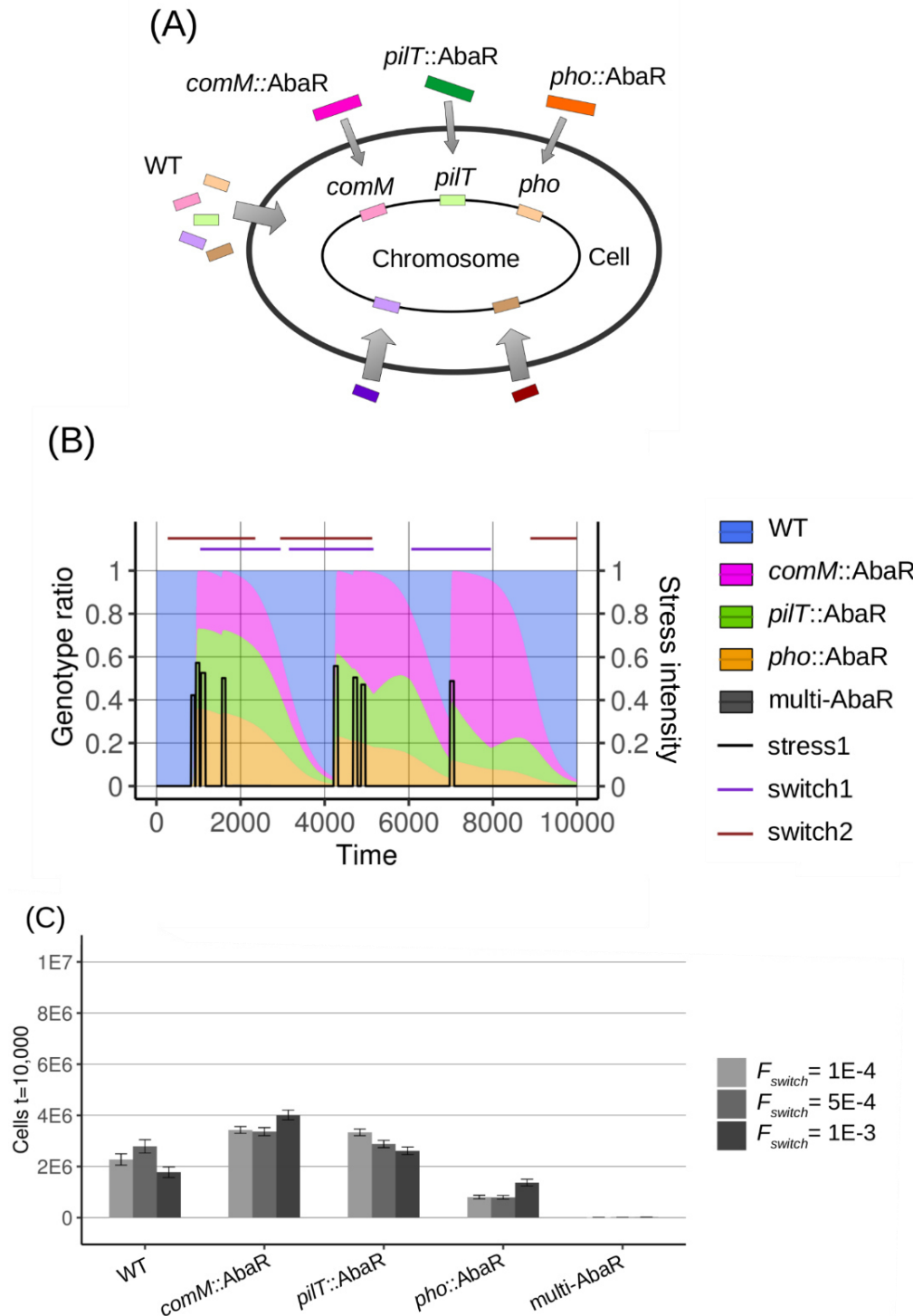


Figure 6: Competitiveness of AbaRs genomic islands in fluctuating environments when two SNPs decrease or increase bacterial growth depending on the environment (e.g. nutriment availability). **A.** Cells possess two SNP insertion sites. Each SNP decreases the growth rate of bacteria by 1% in the default environments and increases bacterial growth during the corresponding environmental switches (i.e. the two SNP types are influenced by distinct environmental switches). **B.** Example of environmental switch dynamics during one simulation. Here, 3 switch1 and 3 switch2 occur during the simulation. Consequently, the effect of SNPs on bacterial growth fluctuates randomly over time. **C.** Mean number of cells with the different AbaR types (with and without the SNP) at the end of the simulations. Results are the mean and standard error of 200 simulations.

yet equally successful, showing that the total abolition of natural transformation was not enough detrimental even in conditions where cells might need to constantly adapt to fluctuating environmental pressures.

Discussion

Horizontal gene transfers are mechanisms that drive the evolution of bacterial population and foster the spread of antibiotic resistance within bacteria. However, the role and contribution of natural transformation has remained controversial and unclear. In a previous work, we proposed a computational model to encompass the duality of natural transformation by considering this mechanism to both acquire and delete genes, leading to a better ability to adapt against environmental fluctuations. In this new work, we combined experimental data and computational modelling to assess the consequences of various strategies displayed by MGEs to inhibit natural transformation, on their persistence in bacterial populations and on their bacterial host adaptability.

We first take advantage of the high capacity of the *A. nosocomialis* strain M2 to naturally transform DNA (Harding et al., 2013; Wilharm et al., 2013) to horizontally transfer two different Ab-RIs originated from *A. baumannii* to quantify the fitness effect of those large MGEs on the bacterial host. Our results showed that Ab-RIs can impose a high fitness cost on their bacterial host but the intensity of this cost can strongly vary depending on the characteristics of the island in terms of size and gene composition and also on the competition medium (**figure 1**). The large AbaR1 island originated from the *A. baumannii* strain AYE imposed a high fitness cost on the new bacterial host regardless of the competition medium. This high cost is probably due to the presence of 45 clustered antimicrobial resistance genes and genes related to heavy metal resistance (Fournier et al., 2006). The arsenic resistance operon present in this AbaR1 is for example known to impose a high fitness cost to their bacterial host (Gullberg et al., 2014). In contrast, the smaller AbaR4, originated from the *A. baumannii* 40288 clinical isolate which also contains less genes, imposed lower a fitness cost to the bacterial cell in a single competition medium (**figure 2**). By imposing only a minor fitness cost to its host cell in certain conditions, the AbaR4, that also carry a unique but highly problematic carbapenem resistance gene *bla_{OXA-23}*, could explain the success of this Ab-RI in *Acinetobacter* species (Meshkat et al., 2019; Mugnier et al., 2010).

Based on empirical data gathered in *A. baumannii* clinical isolates, we then generated a simple and robust experimental model to mimic the interference of natural transformation by Ab-RIs, when genes known to be common insertion sites for those MGEs are interrupted (Bi et al., 2019). Mutants of the *comM*, *pilT* and *pho* genes were generated, and inhibition of natural

transformation was quantified. The *comM* gene is known to have an intermediate effect on natural transformation of the bacterial cell (Nero et al., 2018), whereas the *pilT* gene is essential for competence (Wilharm et al., 2013). We then quantified the interference of Ab-RIs with natural transformation towards the acquisition of a SNP in those different mutants. Mutations are indeed a fundamental aspect of bacterial adaptation and evolution (Hershberg, 2015), and in *A. baumannii* some SNP are mainly acquired by natural transformation and can lead to the expression of a new antibiotic resistance (Hamidian et al., 2019). Our results confirmed that the interruption of the *comM* gene in *A. nosocomialis* induced only a small decrease in its ability to acquire a SNP through natural transformation compared to the wild-type strain or the *pho* mutant (**figure 2**). As clinical isolates of *A. baumannii* mainly carry Ab-RIs inserted in the *comM* gene, they thus keep a high ability to acquire new mutations through natural transformation. In comparison, the interruption of the *pilT* gene induced a total inhibition of natural transformation, leading the bacterium unable to acquire new alleles.

We then test the hypothesis that it might inhibit more dramatically the acquisition of large MGEs such as genomic islands. We designed an experimental model in which we measured the efficiency of bacteria to acquire or delete a heterologous DNA *L* fragment of a size comparable to a genomic Ab-RIs. Bacteria with an intact *comM* gene were able to acquire or delete the *L* fragment with a high efficiency, even if its size dramatically increased (**figure 3**). This ability was however greatly impaired in bacteria with a non-intact *comM* gene leading to rare HGT events for the largest *L* fragments. Interestingly, in those bacteria the deletion efficiency decreased as the size of *L* increased. As this effect was not observed in bacteria with an intact *comM* gene, this might be related to the function of the ComM protein. Taken together, those results showed that the ComM protein is important not only for the acquisition of heterologous DNA fragments, but also for the deletion of those DNA fragments, as bacteria without an intact *comM* gene were greatly impaired for both. However, the absence of ComM may particularly impair the process of removing larger DNA fragments. As previously proposed by Croucher et al., our results of a higher efficiency of deletion compared to insertion of heterologous DNA fragments suggests that natural transformation may be more prone to remove parasitic MGEs than acquire them.

The insertion sites preferentially targeted by Ab-RIs, mainly *comM*, may thus be explained by the evolutionary dynamics of these MGEs. Based on the experimental transformation rates measured, we then built the computational model to simulate the consequences of the natural transformation interference on the dynamics of MGEs and bacterial populations. Our simulation results show that, in stressful environments selecting for the resistance carried by Ab-Rs, Ab-Rs targeting competence genes such as *pilT* or *comM* outcompete Ab-Rs targeting neutral insertion sites (**figure 4**). In addition, when the cost of Ab-Rs is high (5% growth reduction), transformation inhibition is not sufficient to allow Ab-Rs to colonize the

bacterial population despite frequent stresses lethal to wild type cells, which can explain the relatively low experimental selection coefficients measured (**figure 1**).

To analyse the specificity of the *comM* gene compared to genes completely preventing transformation such as *pilT*, we then simulated the dynamics of SNPs in fluctuating environments to mimic the optimization of the bacterial fitness through SNP acquisition and removal by natural transformation.

Results show that in conditions where SNPs can be acquired or deleted by natural transformation and can confer an ecological advantage, *comM::AbaR* cells with a reduced ability to undergo natural transformation were overall slightly more fixed and stabilized in the bacterial population than the *pilT::AbaR* or the *pho::AbaR* cells (**figures 5 and 6**). By targeting the *comM* gene, Ab-RIs might thus have helped to maintain the adaptation capacity of their host cell, which can improve the long-term persistence of AbaRs in a bacterial population facing stochastic environmental changes while reducing the probability to be cured from the chromosome. This insertion strategy supports the hypothesis that bacteria use transformation to both diversify their genome, including the acquisition of MGEs carrying resistance genes, and to cure their chromosome from parasitic or obsolete MGEs. While MGEs not infecting transformation preserve the adaptability of their host cell, they stay vulnerable to removal. Thus, the large proportion of Ab-RIs interfering with natural transformation may be partially due to the optimal trade-off between the two evolutionary functions of transformation.

However, our results also showed that the complete abolition of natural transformation in *pilT::AbaR* cells was not detrimental to those cells as they were also able to persist in the global population, almost as effectively as *comM::AbaR* cells (**figure 5 and 6**). This suggest that even if a complete inhibition of transformation impairs the adaptation capacity of bacteria, it did not lead to the total counter selection of MGEs with this strategy. Interestingly, this result does not completely reflect the distribution of Ab-RIs insertion sites observed in *A. baumannii* clinical isolates, as insertions of Ab-RIs largely occur in the *comM* gene. Other insertions in competence genes such as *pilT* generally have less than 4 iterations in 3,258 genomes retrieved from the NCBI database (Bi et al., 2019). This suggests that the intermediate inhibition of natural transformation displayed by *A. baumannii* bacteria with a predominant insertion site *comM*, which modulates transformation to reduce Ab-RIs removal while maintaining an efficient SNPs acquisition may not be the sole decisive element of the evolutionary success of Ab-RIs. One explanation could be that parameters for natural transformation events used for simulations were not optimal and further work on the model is needed to better understand how natural transformation can shape those bacterial populations. Another parameter that was not included in this model was the ability of some Ab-RIs to transpose in the genome. The backbone of Ab-RIs is composed of related transposons

that belong to a large family of transposons related to the Tn7 and Tn402/Tn5053 (Hamidian and Hall, 2018)., that exhibit the characteristic of targeting a specific site during transposition (Waddell and Craig, 1989). As transposons of Ab-RI have independently moved into the same position in the *comM* genes, this indicates that transposons of this type target may specifically target this site (Hamidian and Hall, 2018). Furthermore, it appears that when an Ab-RI is inserted in another locus in the chromosome, another Ab-RI is already inserted in the *comM* gene (Bi et al., 2019). This might be the indication of a high affinity for the target site in the *comM* gene. Further work could thus be done by integrating the transposition parameter in the computational model, as well as competition between different Ab-RI for one target site.

The relative autonomy of MGEs and their ability to be transferred both horizontally and vertically can generate evolutionary conflicts and arms race dynamics between MGEs and their host bacteria (Gómez et al., 2015). Coevolution between MGEs and their hosts is frequently studied by focusing on phages or conjugative plasmids which can easily be considered as parasitic and selfish MGEs (Ghaly and Gillings, 2018). Because they carry the machinery for their horizontal transfer, these MGEs can increase their own transfer at the expense of their host cells (Iranzo et al., 2016; Koonin et al., 2017). However, the coevolution dynamics between bacterial cells and integrated MGEs such as genomic islands, which circulate horizontally mainly through natural transformation, is much more elusive. Further work around this race dynamics is thus needed and could help to better understand how those specific MGEs that often carry resistances to antibiotics can persist in bacterial populations.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids, and genetic constructs.

Bacterial strains with genotypes and plasmids are detailed in table S1. All the oligonucleotides used in this study for genetic modification are listed in table S2.

Chromosomal modifications in *Acinetobacter*. Genetic constructions were performed using overlap extension PCR to create assembly PCR fragments carrying the genetic construction with a selection marker flanked by 2 kbp-long fragments that are homologous to the insertion site. A scarless genetic strategy was used to create the mutations without antibiotic resistance markers (Godeux et al., 2020). All PCRs for genetic modifications were performed with a high-fidelity DNA polymerase (PrimeStarMax, Takara) and chromosomal modifications were confirmed by colony PCR (Dream Taq, Thermo Fisher).

Bacterial strains for competitions. The M2 *hu-sfgfp aacC4* (Hu-sfGFP) strain was obtained from a previous work (Godeux 2018). The M2 *comM::AbaR4* and M2 *comM::AbaR1* strains were generated by naturally transforming the M2 *comM::sacB aacC4* with purified genomic

DNA extracted from the *A. baumannii* 40288 clinical isolate and the *A. baumannii* AYE strain. Fluorescent variants were generated by naturally transforming bacteria with a PCR product of the *hu-sfgfp aacC4* construct.

Bacterial strains for SNP acquisition. The M2 *rpoB2*(Rif^R) rifampicin resistant variant of the *A. nosocomialis* M2 wild-type (WT) strain was obtained by plating an overnight bacterial culture on a LB agar plate supplemented with rifampicin. Spontaneous resistant mutants were then purified and the *rpoB* gene from each one was further sequenced. The M2 *rpoB2*(Rif^R) strain displayed a normal growth in LB plates supplemented with rifampicin and had a 1565A>T point mutation into the coding sequence of the *rpoB* gene leading to the substitution of a glutamine into a leucine at the position 522 in the amino acids sequence. The non-transformable derivative M2 *rpoB2*(Rif^R) *comEC::aacC4* strain was obtained by naturally transforming the M2 *rpoB2*(Rif^R) strain with a PCR product of the *comEC::aacC4* construct. The M2 Δ *comM* strain has a deletion of 231 bp in the coding sequence of the *comM* gene and the M2 Δ *pho* strain has a deletion of 825 bp in the coding sequence of the *pho* gene. Both mutants were generated using the scarless genetic strategy. Final recipient strains were generated by transforming the M2 WT, M2 Δ *comM* and M2 Δ *pho* strains with an assembly PCR to generate kanamycin resistant variants carrying the selective marker *attn7::[NLuc aphA]*. The M2 *pilT::aphA* was obtained from Gottfried Wilharm (Wilharm et al., 2013).

Bacterial strains for acquisition and deletion of the L insert in mixed culture. *A. nosocomialis* M2 mutants carrying heterologous DNA chromosomal inserts with variable length were generated following the steps described in **figure S2**. Rifampicin resistant derivatives for selection of recipient strains were obtained by transforming bacteria with a PCR product of the *rpoB* gene amplified from purified genomic DNA extracted from the rifampicin resistant M2 *rpoB2*(Rif^R) strain. Non-transformable derivatives for donor strains were obtained by transforming bacteria with a PCR product of the *comEC::tetA* chromosomal modification.

Bacterial competitions

Bacterial competitions were performed by competing an *A. nosocomialis* M2 strain carrying an AbaR island inserted in the *comM* gene (M2 *comM::AbaR4* or M2 *comM::AbaR1* against the isogenic *A. nosocomialis* M2 with no AbaR. A single chromosomal fluorescent Hu-sfGFP marker was alternately expressed in each genetic background (Godeux et al., 2018), as the bright fluorescence displayed by this marker is sufficient to effectively discriminate fluorescent cells from the non-fluorescent cells using flow cytometry thus allowing us to circumvent the use of two fluorescent markers. The fitness cost associated with the expression of the Hu-sfGFP marker was measured by competing the M2 *hu-sfgfp aacC4* strain against the M2 wild-type strain and was withdrawn from the final selection marker.

Bacterial competitions were performed as previously described (Knöppel et al., 2014). Briefly, bacteria from the competing strains were grown in the competition medium (LB broth or Tryptone-NaCl medium) for one night. The next day, overnight cultures were mixed at equal ratio in a 24-wells plates and were pre-incubated at 37°C for 1 hour. Competitions were then performed in 12-wells plates by diluting 1000-fold each day the competing culture in a fresh liquid medium and incubated for 24 hours (10 generations per day). The ratio of AbaR carrying cells to wild-type cells was measured by counting 10^5 total cells using flow cytometry (Attune acoustic flow cytometer) at 0, 10 and 20 generations. Selection coefficients were determined using the model $s = [\ln R(t)/R(0)]/t$ as previously described (Dykhuizen, 1990) where R is the ratio of mutant to wild-type cells.

Statistics: The standard deviation of the selection coefficient measured in the control competition between the M2 wild-type strain and the M2 *hu-sfgfp aacC4* strain was used to determine the detection limit of the experiment for both LB medium and tryptone NaCl. The confidence interval for selection coefficients of each competition was then calculated and compared to the SD of the control strain to determine the fitness effect of the AbaR insert. An insert was considered as deleterious if its confidence interval did not overlap with the SD for the control strain and neutral if it overlapped.

Transformation assays

Bacteria were grown approximately 5-6 hours in LB liquid medium at 37°C and were then diluted in PBS to obtain bacterial suspensions of 10^7 cells/mL. Then an equal volume of the bacterial suspension and the DNA substrate solution (at 100 ng/μL) were mixed together and 2,5 μL of this bacteria/DNA mix were spotted on the surface of a 1 mL transformation medium (tryptone 5 g/L, NaCl 2,5 g/L, agarose type D3 2%) freshly prepared in a 2-mL Eppendorf tube. After 20h at 37°C, bacteria were harvested by adding 200 μL of PBS in the tube and vortexing. Transformants were selected after plating the bacteria in selective agar media containing various antibiotics (apramycin 30 μg/μL, kanamycin 15 μg/μL, rifampicin 100 μg/mL, tetracycline 15 μg/mL, nalidixic acid 60 μg/mL). Transformation frequencies were determined by calculating the ratio of the number of transformants CFU (counted in selective media) to the total number of CFU (counted in non-selective media).

Computational model

We used a previous stochastic computational model (Carvalho et al., 2020), complemented with additional genetic elements and insertion sites in bacterial chromosomes. The model is composed of two compartments: bacterial cells (intracellular compartment) and extracellular DNA (extracellular compartment). Bacteria possess several insertion sites on their

chromosome which can be occupied by two types of DNA each. Insertion sites include three genes, *comM*, *pilT* and *pho*, and can be occupied by their respective wild-type allele (an intact gene) or by their respective AbaR genomic island (*comM*::AbaR, *pilT*::AbaR or *pho*::AbaR) which inactivates the gene on insertion site. Depending on the scenario, two additional sites can be occupied by their respective wild type allele or by a single nucleotide polymorphism (**figures 4A, 5B and 6B**). Considering all combinations of DNA type, there is a total of $2^5=32$ possible genotypes i . Bacteria uptake eDNA from the extracellular compartment and replace their own using transformation. Bacteria release DNA upon cell lysis which can be enhanced by a stochastic bactericidal stress.

Bacterial growth follows a logistic growth model and the number of replicating cells per genotype i and per time step dt , $G_{i,t+1}$, is determined using a binomial distribution:

$$G_{i,t+1} \sim \text{Bin}(\mu_{i,t} \cdot dt, N_{i,t}) \quad (1)$$

$$\mu_{i,t} = (\mu_{\max} - \frac{\mu_{\max} - k_b}{K} N_{\text{tot},t}) * (1 - c_i) \quad (2)$$

$N_{i,t}$ is the number of cells with the genotype i at time t . $\mu_{i,t}$ is the replication rate of genotype i at time t . $\mu_{\max}$ is the maximal growth rate. k_b is the constant basal lysis rate, independent of the presence of stress. $N_{\text{tot},t}$ is the total number of cells in the population (considering all genotypes) at time t . c_i is the cost, in term of cell replication, induced by all DNA types possessed by the genotype i . K is the carrying capacity. The number of lysed cells per time step $L_{i,t+1}$ is calculated using a binomial distribution:

$$L_{i,t+1} \sim \text{Bin}(k_{i,t} \cdot dt, N_{i,t}) \quad (3)$$

$$k_{i,t} = k_b + I_{S,t} * (1 - r_i) \quad (4)$$

$k_{i,t}$ is the lysis rate of genotype i at time t . $I_{S,t}$ is the intensity of the stress at time t . r_i is the stress resistance provided the DNA types possessed by the genotype i . Stress increases the lysis rate of susceptible cells whereas the lysis rate of cells carrying any AbaR (stress1) or SNP (stress2) remains at the basal rate k_b . The number of competent cells undergoing a transformation event during a time step $C_{i,t+1}$ is determined using a binomial distribution:

$$C_{i,t+1} \sim \text{Bin}(T_{i,t} \cdot dt, N_{i,t}) \quad (5)$$

$$T_{i,t} = T_{\max,i} * (\frac{\alpha A_{\text{tot},t}}{1 + \alpha A_{\text{tot},t}}) \quad (6)$$

$T_{i,t}$ is the transformation rate at time t . $T_{max,i}$ is the maximal transformation rate of the genotype i . α is the binding rate between cells and eDNA. $A_{tot,t}$ is the total number of eDNA at time t . Genotypes i with $pilT::AbaR$ have a non-intact $pilT$ gene and cannot uptake eDNA ($T_{i,t}=0$). For the other genotypes, when a transformation event is triggered, a random eDNA molecule is selected in the extracellular compartment, considering the proportion of the different eDNA molecules. Depending on the eDNA molecule j selected and on the integrity of the $comM$ gene in the competent cell, the success probability of the transformation event varies. The transformation success probabilities of couples i, j are based on the experimental results of acquisition and removal of DNA fragments of 16kb and are reported in table 1. Cells undergoing a transformation event change their genotype accordingly to the DNA type integrated. If the insertion fails, the eDNA is deleted and the genome of the cell remains intact. The overall variation of a genotype i during a time step is summarized by:

$$N_{i,t+1} = N_{i,t} + G_{i,t+1} - L_{i,t+1} - C_{i,t+1}^{i \rightarrow i} + C_{i,t+1}^{l \rightarrow i} \quad (7)$$

In the extracellular compartment, eDNA is degraded at a constant rate R_j . The number of degraded eDNA molecules j per time step, $D_{j,t+1}$, is determined using a binomial distribution:

$$D_{j,t+1} \sim Bin(R_j \cdot dt, A_{j,t}) \quad (8)$$

$A_{j,t}$ is the number of eDNA of type j . The extracellular compartment is alimented by eDNA from lysed cells, each lysed cell releasing DNA molecules corresponding to their DNA composition. In addition, eDNA is added at a constant rate to the extracellular compartment (open system). The number of eDNA molecules j added per time step M_j is defined by:

$$M_j = M_{input,j} \cdot dt \quad (9)$$

$M_{input,j}$ is the number of molecules of eDNA of type j added per time unit. $M_{input,j}$ is residual and set to be orders of magnitude lower than the DNA released by cell lysis. The overall variation of eDNA of type j in the extracellular compartment during a time step is summarized by:

$$A_{j,t+1} = A_{j,t} - D_{j,t+1} + M_{input,j} + \sum_{i=1}^n [L_{i,t+1}^j - C_{i,t+1}^j] \quad (10)$$

Environmental fluctuations are modelled by two different scenarios: 1) stochastic stress and 2) environmental switches. 1) The probability of a stress to start during a time step is $F_{stress} \cdot dt$. When a stress starts, another identical stress cannot begin before the first one ended. The duration d_{stress} and intensity I_{stress} of each stress are randomly drawn from a normal distribution with the means and standard deviations $d_{S,mean}$, $d_{S,sd}$, $I_{S,mean}$ and $I_{S,sd}$. 2) Bacteria are can also be exposed to two distinct environmental fluctuations (or switches) that influence the effect of

SNP1 and SNP2 on bacterial growth. Similarly, to the stresses, environmental fluctuations are triggered with a probability $F_{switch} * dt$ during a time step. The duration d_{switch} of fluctuations is randomly drawn from a normal distribution with the means and standard deviations $d_{switch,mean}$ and $d_{switch,sd}$. During an environmental fluctuation, the corresponding SNP increases the growth rate of its host cell by G_{SNP} (implemented as a negative cost) while SNPs decrease the growth rate of their host cell by G_{SNP} in the absence of switch.

Experiment		Simulation		
Transformation event	Symbol	eDNA	Recipient cell	Success probability
Deletion 16kb fragment <i>comM</i> ⁺	D_{comM+}	WT	<i>comM</i> ⁺	1
Acquisition 16kb fragment <i>comM</i> ⁺	A_{comM+}	AbaR	<i>comM</i> ⁺	$\frac{A_{comM+}}{D_{comM+}} = 1.6*10^{-1}$
Acquisition <i>rpoB2</i> mixed culture <i>comM</i> ⁺	S_{comM+}	SNP	<i>comM</i> ⁺	$\frac{A_{comM+}}{D_{comM+}} = 1.6*10^{-1}$
Deletion 16-Kbp fragment $\Delta comM$	$D_{\Delta comM}$	WT	$\Delta comM$	$\frac{D_{\Delta comM}}{D_{comM+}} = 1.9*10^{-3}$
Acquisition 16-Kbp fragment $\Delta comM$	$A_{\Delta comM}$	AbaR	$\Delta comM$	$\frac{A_{\Delta comM}}{D_{comM+}} = 2.1*10^{-4}$
Acquisition <i>rpoB2</i> mixed culture $\Delta comM$	$S_{\Delta comM}$	SNP	$\Delta comM$	$\frac{A_{comM+} S_{\Delta comM}}{D_{comM+} S_{comM+}} = 3.7*10^{-3}$

Table 1: Transformation success probability. The success probability of transformation events in simulations are based on the experimental results of 16-Kbp DNA fragments acquisition and removal (figure 3C,D) and the *rpoB2* (Rif^R) mutation acquisition in mixed cultures (figure 2B) in *comM*⁺ and $\Delta comM$ strains. The deletion of 16-Kbp fragments in the *comM*⁺ strain is the maximum experimentally obtained and is taken as the reference in the computational model. That is, the transformation event WT + *comM*⁺ (equivalent to the experimental D_{comM+}) has the success probability 1 and the success probability of the other events are relative to this value. In addition, the experimental acquisition of the *rpoB2* mutation being orders of magnitude lower than the 16-Kbp fragment acquisition (results from different protocols), the success probability of SNP acquisition in the simulations has been aligned with AbaR acquisition for comparison of transformation modulation to be possible between AbaRs and SNPs. Thus, AbaRs and SNP transformation success only differ by their ratio between *comM*⁺ and $\Delta comM$ strains.

References

- Ambur, O.H., Engelstädter, J., Johnsen, P.J., Miller, E.L., and Rozen, D.E. (2016). Steady at the wheel: conservative sex and the benefits of bacterial transformation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371.
- Apagyi, K.J., Fraser, C., and Croucher, N.J. (2017). Transformation asymmetry and the evolution of the bacterial accessory genome. *Mol. Biol. Evol.*
- Baltrus, D.A. (2013). Exploring the costs of horizontal gene transfer. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* 28, 489–495.
- Bassetti, M., Peghin, M., Vena, A., and Giacobbe, D.R. (2019). Treatment of Infections Due to MDR Gram-Negative Bacteria. *Front. Med.* 6.
- Bi, D., Xie, R., Zheng, J., Yang, H., Zhu, X., Ou, H.-Y., and Wei, Q. (2019). Large-Scale Identification of AbaR-Type Genomic Islands in *Acinetobacter baumannii* Reveals Diverse Insertion Sites and Clonal Lineage-Specific Antimicrobial Resistance Gene Profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63.
- Blokesch, M. (2016). Natural competence for transformation. *Current Biology* 26, R1126–R1130.
- Blokesch, M. (2017). In and out-contribution of natural transformation to the shuffling of large genomic regions. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 22–29.
- Blokesch, M., and Schoolnik, G.K. (2008). The extracellular nuclease Dns and its role in natural transformation of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 190, 7232–7240.
- Bragg, J.G., and Wagner, A. (2009). Protein material costs: single atoms can make an evolutionary difference. *Trends Genet.* 25, 5–8.
- Carvalho, G., Fouchet, D., Danesh, G., Godeux, A.-S., Laaberki, M.-H., Pontier, D., Charpentier, X., and Venner, S. (2020). Bacterial Transformation Buffers Environmental Fluctuations through the Reversible Integration of Mobile Genetic Elements. *MBio* 11.
- Chan, W.T., and Espinosa, M. (2016). The *Streptococcus pneumoniae* pezAT Toxin–Antitoxin System Reduces β -Lactam Resistance and Genetic Competence. *Front Microbiol* 7.
- Cowley, L.A., Petersen, F.C., Junges, R., Jimenez, M.J.D., Morrison, D.A., and Hanage, W.P. (2018). Evolution via recombination: Cell-to-cell contact facilitates larger recombination events in *Streptococcus pneumoniae*. *PLOS Genetics* 14, e1007410.
- Croucher, N.J., Mostowy, R., Wymant, C., Turner, P., Bentley, S.D., and Fraser, C. (2016). Horizontal DNA Transfer Mechanisms of Bacteria as Weapons of Intragenomic Conflict. *PLOS Biology* 14, e1002394.
- Dalia, A.B., Seed, K.D., Calderwood, S.B., and Camilli, A. (2015). A globally distributed mobile genetic element inhibits natural transformation of *Vibrio cholerae*. *PNAS* 112, 10485–10490.
- Domingues, S., Harms, K., Fricke, W.F., Johnsen, P.J., Silva, G.J. da, and Nielsen, K.M. (2012). Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrons and Gene Cassettes between Bacterial Species. *PLOS Pathogens* 8, e1002837.

Domingues, S., Rosário, N., Cândido, Â., Neto, D., Nielsen, K.M., and Da Silva, G.J. (2019). Competence for Natural Transformation Is Common among Clinical Strains of Resistant *Acinetobacter* spp. *Microorganisms* 7.

Dubnau, D., and Blokesch, M. (2019). Mechanisms of DNA Uptake by Naturally Competent Bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 53, 217–237.

Dykhuizen, D.E. (1990). Experimental Studies of Natural Selection in Bacteria. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21, 373–398.

Fournier, P.-E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., et al. (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2, e7.

Gaasbeek, E.J., Wagenaar, J.A., Guilhabert, M.R., Wösten, M.M.S.M., van Putten, J.P.M., van der Graaf-van Bloois, L., Parker, C.T., and van der Wal, F.J. (2009). A DNase encoded by integrated element CJIE1 inhibits natural transformation of *Campylobacter jejuni*. *J. Bacteriol.* 191, 2296–2306.

Ghaly, T.M., and Gillings, M.R. (2018). Mobile DNAs as Ecologically and Evolutionarily Independent Units of Life. *Trends in Microbiology* 26, 904–912.

Godeux, A.-S., Lupo, A., Haenni, M., Guette-Marquet, S., Wilharm, G., Laaberki, M.-H., and Charpentier, X. (2018). Fluorescence-based detection of natural transformation in drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology* JB.00181-18.

Godeux, A.-S., Svedholm, E., Lupo, A., Haenni, M., Venner, S., Laaberki, M.-H., and Charpentier, X. (2020). Scarless removal of large resistance island *AbaR* results in antibiotic susceptibility and increased natural transformability in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

Gómez, P., Ashby, B., and Buckling, A. (2015). Population mixing promotes arms race host–parasite coevolution. *Proc Biol Sci* 282.

Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *Epidemiology & Infection* 27, 113–159.

Gullberg, E., Albrecht, L.M., Karlsson, C., Sandegren, L., and Andersson, D.I. (2014). Selection of a Multidrug Resistance Plasmid by Sublethal Levels of Antibiotics and Heavy Metals. *MBio* 5, e01918-14.

Hamidian, M., and Hall, R.M. (2018). The *AbaR* antibiotic resistance islands found in *Acinetobacter baumannii* global clone 1 – Structure, origin and evolution. *Drug Resistance Updates* 41, 26–39.

Hamidian, M., Kenyon, J.J., Holt, K.E., Pickard, D., and Hall, R.M. (2014). A conjugative plasmid carrying the carbapenem resistance gene *blaOXA-23* in *AbaR4* in an extensively resistant GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate. *J Antimicrob Chemother* 69, 2625–2628.

Hamidian, M., Hawkey, J., Wick, R., Holt, K.E., and Hall, R.M. (2019). Evolution of a clade of *Acinetobacter baumannii* global clone 1, lineage 1 via acquisition of carbapenem- and aminoglycoside-resistance genes and dispersion of *ISAba1*. *Microb Genom* 5.

Harding, C.M., Tracy, E.N., Carruthers, M.D., Rather, P.N., Actis, L.A., and Munson, R.S. (2013). *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio* 4.

- Hershberg, R. (2015). Mutation—The Engine of Evolution: Studying Mutation and Its Role in the Evolution of Bacteria. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7.
- Hu, Y., He, L., Tao, X., Meng, F., and Zhang, J. (2019). High DNA Uptake Capacity of International Clone II *Acinetobacter baumannii* Detected by a Novel Planktonic Natural Transformation Assay. *Front Microbiol* 10.
- Iranzo, J., Puigbò, P., Lobkovsky, A.E., Wolf, Y.I., and Koonin, E.V. (2016). Inevitability of Genetic Parasites. *Genome Biol Evol* 8, 2856–2869.
- Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., and Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology* 12, 181–196.
- Kim, D.H., and Ko, K.S. (2015). AbaR-type genomic islands in non-*baumannii* *Acinetobacter* species isolates from South Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5824–5826.
- Knöppel, A., Lind, P.A., Lustig, U., Näsvall, J., and Andersson, D.I. (2014). Minor fitness costs in an experimental model of horizontal gene transfer in bacteria. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1220–1227.
- Koonin, E.V., Wolf, Y.I., and Katsnelson, M.I. (2017). Inevitability of the emergence and persistence of genetic parasites caused by evolutionary instability of parasite-free states. *Biol Direct* 12.
- Levin, B.R., and Cornejo, O.E. (2009). The population and evolutionary dynamics of homologous gene recombination in bacterial populations. *PLoS Genet.* 5, e1000601.
- Matthey, N., Stutzmann, S., Stoudmann, C., Guex, N., Iseli, C., and Blokesch, M. (2019). Neighbor predation linked to natural competence fosters the transfer of large genomic regions in *Vibrio cholerae*. *ELife* 8, e48212.
- Meibom, K.L., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.-Y., and Schoolnik, G.K. (2005). Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310, 1824–1827.
- Melnyk, A.H., Wong, A., and Kassen, R. (2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol Appl* 8, 273–283.
- Meshkat, Z., Amini, Y., Sadeghian, H., and Salimizand, H. (2019). ISAba1/blaOXA-23-like family is the predominant cause of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Iran. *Infection, Genetics and Evolution* 71, 60–66.
- Moradigaravand, D., and Engelstädter, J. (2013). The evolution of natural competence: disentangling costs and benefits of sex in bacteria. *Am. Nat.* 182, E112–126.
- Mugnier, P.D., Poirel, L., Naas, T., and Nordmann, P. (2010). Worldwide Dissemination of the blaOXA-23 Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*1. *Emerg Infect Dis* 16, 35–40.
- Nero, T.M., Dalia, T.N., Wang, J.C.-Y., Kysela, D.T., Bochman, M.L., and Dalia, A.B. (2018). ComM is a hexameric helicase that promotes branch migration during natural transformation in diverse Gram-negative species. *Nucleic Acids Res.* 46, 6099–6111.
- Pimentel, Z.T., and Zhang, Y. (2018). Evolution of the Natural Transformation Protein, ComEC, in Bacteria. *Front. Microbiol.* 9.

- Remold, S.K., and Lenski, R.E. (2001). Contribution of individual random mutations to genotype-by-environment interactions in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 11388–11393.
- Šeputienė, V., Povilonis, J., and Sužiedėlienė, E. (2012). Novel Variants of AbaR Resistance Islands with a Common Backbone in *Acinetobacter baumannii* Isolates of European Clone II. *Antimicrob Agents Chemother* *56*, 1969–1973.
- Takeuchi, N., Kaneko, K., and Koonin, E.V. (2014). Horizontal gene transfer can rescue prokaryotes from Muller's ratchet: benefit of DNA from dead cells and population subdivision. *G3 (Bethesda)* *4*, 325–339.
- Waddell, C.S., and Craig, N.L. (1989). Tn7 transposition: recognition of the attTn7 target sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *86*, 3958–3962.
- Wilharm, G., Piesker, J., Laue, M., and Skiebe, E. (2013). DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J. Bacteriol.* *195*, 4146–4153.
- Wisplinghoff, H., Paulus, T., Lugenheim, M., Stefanik, D., Higgins, P.G., Edmond, M.B., Wenzel, R.P., and Seifert, H. (2012). Nosocomial bloodstream infections due to *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii* and *Acinetobacter nosocomialis* in the United States. *Journal of Infection* *64*, 282–290.
- Wylie, C.S., Trout, A.D., Kessler, D.A., and Levine, H. (2010). Optimal Strategy for Competence Differentiation in Bacteria. *PLOS Genetics* *6*, e1001108.
- Yoon, E.-J., Kim, J.O., Yang, J.W., Kim, H.S., Lee, K.J., Jeong, S.H., Lee, H., and Lee, K. (2017). The blaOXA-23-associated transposons in the genome of *Acinetobacter* spp. represent an epidemiological situation of the species encountering carbapenems. *J Antimicrob Chemother* *72*, 2708–2714.

Supplementary Material

Inhibition of natural transformation by AbaR islands promotes the fixation of antibiotic resistance in *Acinetobacter baumannii* population

Table S1: Bacterial strains and plasmids used in this study.

Table S2: Primers used in this study.

Figure S1: Chromosomal modifications used to generate the genotypes carrying the *L* fragment with a variable length.

Figure S2: Fitness cost of the interruption of the *comM* gene.

Figure S3: Natural transformation controls for bacterial strains used for the measure of the acquisition/deletion of the *L* fragment.

Figure S4: SNP proportion in the different genotypes.

Table S3: Natural transformation parameters used in computational simulations.

Table S1: Bacterial strains and plasmids used in this study

Name/Genotype	Source	Comments
strains used for the measure of acquisition of a single nucleotide polymorphism		
M2 WT	Niu <i>et al.</i> 2008	<i>A. nosocomialis</i> M2 Wild-type strain
M2 <i>comM::[sacB aacC4]</i>	This study	Sucrose sensitive and apramycin resistant
M2 Δ <i>comM</i>	This study	Deletion into the <i>comM</i> gene
M2 <i>pho::[sacB aacC4]</i>	This study	Sucrose sensitive and apramycin resistant
M2 Δ <i>pho</i>	This study	Deletion into the <i>pho</i> gene
M2 <i>attn7::[lacZ aphA]</i>	This study	Natural transformation with assembly PCR
M2 Δ <i>comM</i> <i>attn7::[lacZ aphA]</i>	This study	Kanamycin resistant
M2 Δ <i>pho</i> <i>attn7::[lacZ aphA]</i>	This study	Kanamycin resistant
M2 <i>pilT::km</i>	Wilharm <i>et al.</i> , 2013	Not naturally transformable ; Kanamycin resistant
M2 <i>rpoB2</i> (Rif ^R)	This study	Spontaneous mutation in <i>rpoB</i> gene ; Rifampicin resistant
M2 <i>rpoB2</i> (Rif ^R) <i>comEC::aacC4</i>	This study	Rifampicin resistant, apramycin resistant
Strains used for bacterial competitions		
M2 <i>hu-sfgfp aacC4</i>	Godeux <i>et al.</i> , 2018	Fluorescent ; apramycin resistant
M2 <i>comM::[AbaR4]</i>	This study	Natural transformation with genomic DNA from <i>A. baumannii</i> 40288 strain
M2 <i>comM::[AbaR1]</i>	This study	Natural transformation with genomic DNA from <i>A. baumannii</i> AYE strain
AYE WT	Fournier <i>et al.</i> 2006	<i>A. baumannii</i> AYE Wild-type strain
M2 <i>comM::[AbaR4] hu-sfgfp aacC4</i>	This study	Fluorescent ; apramycin resistant
M2 <i>comM::[AbaR1] hu-sfgfp aacC4</i>	This study	Fluorescent ; apramycin resistant
M2 Δ <i>comM</i> <i>hu-sfgfp aacC4</i>	This study	Fluorescent ; apramycin resistant
Strains used for the measure of acquisition and deletion of the <i>L</i> fragment		
M2 <i>pho::[AbaR4]</i>	This study	Natural transformation with genomic DNA from <i>A. baumannii</i> AB0057 strain
M2 <i>comM::[sacB aacC4] pho::[AbaR4]</i>	This study	Sucrose sensitive and apramycin resistant
M2 Δ <i>comM</i> <i>pho::[AbaR4]</i>	This study	Deletion into the <i>comM</i> gene
M2 Δ <i>comM</i> <i>pho::[AbaR4 sacB aacC4]</i>	This study	Intermediate genotype
M2 Δ <i>comM</i> <i>pho::[AbaR4 Δ'aacC4]</i>	This study	Intermediate genotype
M2 Δ <i>comM</i> <i>pho::[AbaR4 tniA::(sacB aacC4) Δ'aacC4]</i>	This study	Intermediate genotype
M2 Δ <i>comM</i> <i>pho::[AbaR4 tniA1(Oc) Δ'aacC4]</i>	This study	Intermediate genotype
M2 Δ <i>comM</i> <i>pho::[AbaR4 tniA1(Oc) aacC4::(aphA Lj)]</i>	This study	Intermediate genotype
M2 <i>rpoB2</i> (Rif ^R) Δ <i>comM</i> <i>pho::[AbaR4 tniA1(Oc) aacC4::(aphA Lj)]</i>	This study	Recipient strain for deletion ; deletion into the <i>comM</i> gene ; Rifampicin resistant

M2 <i>comEC::tetA ΔcomM pho::[AbaR4 tniA1(Oc) aacC4::(aphA Lj)]</i>	This study	Donor strain for acquisition ; not naturally transformable
M2 <i>ΔcomM pho::[AbaR4 tniA1(Oc) aacC4 ΔLj]</i>	This study	Intermediate genotype
M2 <i>rpoB2(Rif^R) ΔcomM pho::[AbaR4 tniA1(Oc) aacC4 ΔLj]</i>	This study	Recipient strain for acquisition ; deletion into the <i>comM</i> gene ; Rifampicin resistant
M2 <i>comEC::tetA ΔcomM pho::[AbaR4 tniA1(Oc) aacC4 ΔLj]</i>	This study	Donor strain for deletion ; not naturally transformable
M2 <i>pho::[AbaR tniA1(Oc) aacC4::(aphA L)]</i>	This study	Intermediate genotype
M2 <i>rpoB2(Rif^R) comM⁺ pho::[AbaR4 tniA1(Oc) aacC4::(aphA Lj)]</i>	This study	Recipient strain for deletion ; rifampicin resistant
M2 <i>comM⁺ pho::[AbaR4 tniA1(Oc) aacC4 ΔLj]</i>	This study	Intermediate genotype
M2 <i>rpoB2(Rif^R) comM⁺ pho::[AbaR4 tniA1(Oc) aacC4 ΔLj]</i>	This study	Recipient strain for acquisition ; Rifampicin resistant
Plasmids		
pASG-4	Godeux <i>et al.</i> 2018	Not replicative in <i>Acinetobacter</i>
pMHL-7		Contains the [<i>sacB aacC4</i>] cassette
pMHL-2	Godeux <i>et al.</i> 2018	Contains the <i>aacC4</i> gene
pXDC116	Derivative of pXDC61 (Charpentier <i>et al.</i> 2009)	Contains the Kan ^R cassette

Table S2: Primers used in this study

Primer name	Sequence 5' to 3'	Template ; annealing site	Use (genetic construct)
mlo-104	AAGATATCGGTCTCCAAGC	M2 genomic DNA ; <i>rpoB</i> gene	<i>rpoB2</i> (Rif ^R)
mlo-105	AGTACGGCCTTCGTCAT	M2 genomic DNA ; <i>rpoB</i> gene	<i>rpoB2</i> (Rif ^R)
mlo-97	ATACCGCCGTAGAATGCC	M2 genomic DNA ; 2-kbp Upstream <i>comM</i> gene	$\Delta comM$
comM-Rev	TTAAGAGTGATTACCTCGATAAGA	M2 genomic DNA ; 3' of the <i>comM</i> gene	$\Delta comM$
asg-100	AATTTCCAGTGCACGACG	M2 genomic DNA ; <i>comM</i> gene	$\Delta comM$
asg-76	CGGCGTGCACTAGAAATTCACGGGTGAAATTAC	M2 genomic DNA ; <i>comM</i> gene	$\Delta comM$
Apra-For	ATCAAGGCCCGATCCTTGGAGCCCTTG	pMHL-2 (Godeux et al., 2018) ; Beginning of <i>aacC4</i> gene	<i>[aacC4 ΔL]</i> ; <i>aacC4::aphA</i>
mlo-29	TCATGAGCTCAGCCAATCGACTGG	pMHL-2 (Godeux et al., 2018) ; End of Apra ^R cassette	<i>[aacC4 ΔL]</i> ; <i>[sacB aacC4]</i> ; <i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)]</i> (L=2, 4-kbp)
asg-58	ATCACCCATCACATATACCTGCCG	pMHL-2 (Godeux et al., 2018) ; Upstream <i>sacB</i> gene	<i>[sacB aacC4]</i>
asg-85	ACCCTGTATTTACGTCAG	M2 genomic DNA ; 2-kbp Upstream <i>pho</i> gene	<i>pho::[sacB aacC4]</i> ; <i>pho::[AbaR4 sacB aacC4]</i> ; Δpho
asg-86	CGGCAGGTATATGTGATGGGTGATTACGACGGCTCACATATTGGTC	M2 genomic DNA ; <i>pho</i> gene	<i>pho::[sacB aacC4]</i> ; <i>pho::[AbaR4 sacB aacC4]</i> ; Δpho
asg-87	CCAGTCGATTGGCTGAGCTCATGACTAAAGCAAGCGGTG	M2 genomic DNA ; <i>pho</i> gene	<i>pho::[sacB aacC4]</i>
asg-88	AACCAGCAATAACACC	M2 genomic DNA ; 2-kbp Downstream <i>pho</i> gene	<i>pho::[sacB aacC4]</i> ; <i>pho::[AbaR4 sacB aacC4]</i> ; Δpho ; <i>pho::[AbaR4 Δ'aacC4]</i>
asg-97	ATCACCCATCACATATACCTGCCGTTGGGACGCAATTGG	M2 genomic DNA ; <i>pho</i> gene	Δpho
asg-108	TTCAGTTGTCTCAAAGGACGC	AbaR4 island	<i>pho::[AbaR4 sacB aacC4]</i> ; <i>pho::[AbaR4 Δ'aacC4]</i> ; <i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)]</i> (L=2, 10-kbp)
asg-137	CGGCAGGTATATGTGATGGGTGATGTCAGTTCCACAAATAAATCAGAGT	M2 genomic DNA ; Beginning of 3'half <i>pho</i> gene	<i>pho::[AbaR4 sacB aacC4]</i>
asg-77b	GTCAGTTCACAAATAAATCAGAGT	M2 genomic DNA ; Beginning of 3'half <i>pho</i> gene	<i>pho::[AbaR4 Δ'aacC4]</i>
asg-138	ACTCTGATTTATTTGTGGTGAATCATGCCCTCGTGGTCAG	pMHL-2 (Godeux et al., 2018) ; <i>aacC4</i> gene	<i>pho::[AbaR4 Δ'aacC4]</i>
mlo-74	TGACAGAGCTGACGCC	M2 genomic DNA ; Beginning of <i>pho</i> gene	<i>tniA::[sacB aacC4]</i> ; <i>tniA1</i> (Oc)
asg-159	GACCACATTGGGTTATAGAATGATACGACTA	AbaR4 island ; <i>tniA</i> gene	<i>tniA1</i> (Oc)
asg-160	TAGTCGTATCATTCTATCCAATGTGGTTGTC	AbaR4 island ; <i>tniA</i> gene	<i>tniA1</i> (Oc)
asg-161	CGGCAGGTATATGTGATGGGTGATTATTGACAGCATTAGATTC	AbaR4 island ; <i>tniA</i> gene	<i>tniA::[sacB aacC4]</i>

asg-162	CCAGTCGATTGGCTGAGCTCATGATAGGGCGAATGAATATGATGTG	AbaR4 island ; <i>tniA</i> gene	<i>tniA::[sacB aacC4]</i>
R18	TGAGAGACGCTACTC	AbaR4 island	<i>tniA::[sacB aacC4] ; tniA1(Oc)</i>
comEC-For	TGGTGTGCTGTACTAATTACGGT	M2 genomic DNA ; <i>comEC</i> gene	<i>comEC::aacC4</i>
asg-67	GGGTTGAGATATACTCGCG	M2 genomic DNA ; 2-kb upstream <i>comEC</i> gene	<i>comEC::tetA</i>
comEC-Rev	CTTCAGTTCACGCATCAAGCTTGT	M2 genomic DNA ; <i>comEC</i> gene	<i>comEC::aacC4 ; comEC::tetA</i>
asg-168b	GGAAGTATCAGAATTGGTTAATCAATGATATGTTGCTCAG	M2 genomic DNA ; <i>comEC</i> gene	<i>comEC::tetA</i>
asg-169	CATATATAATAATTAAGTTTATTTTCAAAAAGGCTCAATATACTG	M2 genomic DNA ; <i>comEC</i> gene	<i>comEC::tetA</i>
asg-148	GACTTGAGGCGCAGCGTCGTCCAGACCTGACC	pMHL-2 ; <i>aacC4</i> gene	<i>aacC4::aphA</i>
kan-F	CTGCGCCTCAAGTGTTTC	pXDC116 ; Kan ^R cassette	<i>aacC4::aphA</i>
kan-R	TGCCTCGTAAGAAGG	pXDC116 ; Kan ^R cassette	<i>aacC4::aphA</i>
R3	CAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATTTACCATATGTGC	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=2-kbp)</i>
F4.2	CCTTCTTCACGAGGCATTAAGGCAAGATTAGC	AbaR4 island	<i>[AbaR aacC4::(aphA L)] (L=2-kbp)</i>
oxa23-Rev	ATTTCTGACCGCATTTCCAT	<i>bla_{oxa-23}</i> gene	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=4-kbp)</i>
R5	CAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATTATTCGAGAATGG	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=4-kbp)</i>
F6.2	CCTTCTTCACGAGGCTAGACAGTGATGAG	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=4-kbp)</i>
F7	TTTGAGACTGAATAAGG	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=6-kbp)</i>
R7	CAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATAGATCATCGCAGTAGAC	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=6-kbp)</i>
F8.2	CCTTCTTCACGAGGCAAGTTCATTGTCTACTGCG	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=6-kbp)</i>
asg-107	TCTTTCGTATCTGAATTTCCACG	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=6-kbp)</i>
asg-84	CATTCCAATAAGTTCGACTTCTG	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=8-kbp)</i>
R9	CAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATTGTTACTTGGGTG	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=8-kbp)</i>
F10.2	CCTTCTTCACGAGGCAAGTACCAGAAGC	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=8-kbp)</i>
oxa23-D	CAGTGCTTTTAGTTGTTGTGA	<i>bla_{oxa-23}</i> gene	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=8-kbp)</i>
F11	AAAGCGTATCTTGCTG	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=10-kbp)</i>
R11	CAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATTGCGCATGGCAGTG	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=10-kbp)</i>
F12.2	CCTTCTTCACGAGGCAAACTGCCATGGCG	AbaR4 island	<i>[AbaR4 aacC4::(aphA L)] (L=10-kbp)</i>

F13	TTTCTCAGATACAGCC	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=12-kbp)
R13	CAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATAAGCACCGTAATTCTC	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=12-kbp)
F14.2	CCTTCTTCACGAGGCAATGAGAATTACGGTGC	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=12-kbp)
asg-79	AGAAGTCGTTATTGG	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=12-kbp)
mlo-111	CACTAGAAGCGCCAAGTACGA	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=14-kbp)
R15	CAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATATCTGAGAGACGC	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=14-kbp)
F16.2	CCTTCTTCACGAGGCATTCTCAGATACAGCC	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=14-kbp)
R16	ATGGAAGCACCGTAATTC	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=14-kbp)
F17	TGTCATTACAGCAATAGATAGAG	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=16-kbp)
R17	CAAGGGCTCCAAGGATCGGGCCTTGATACAAGCTTTACTGATGTG	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=16-kbp)
F18.2	CCTTCTTCACGAGGCAATCAGTAAAGCTTGTC	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=16-kbp)
R18	TGAGAGACGCTACTC	AbaR4 island	[AbaR4 <i>aacC4</i> ::(<i>aphA L</i>)] (L=16-kbp)

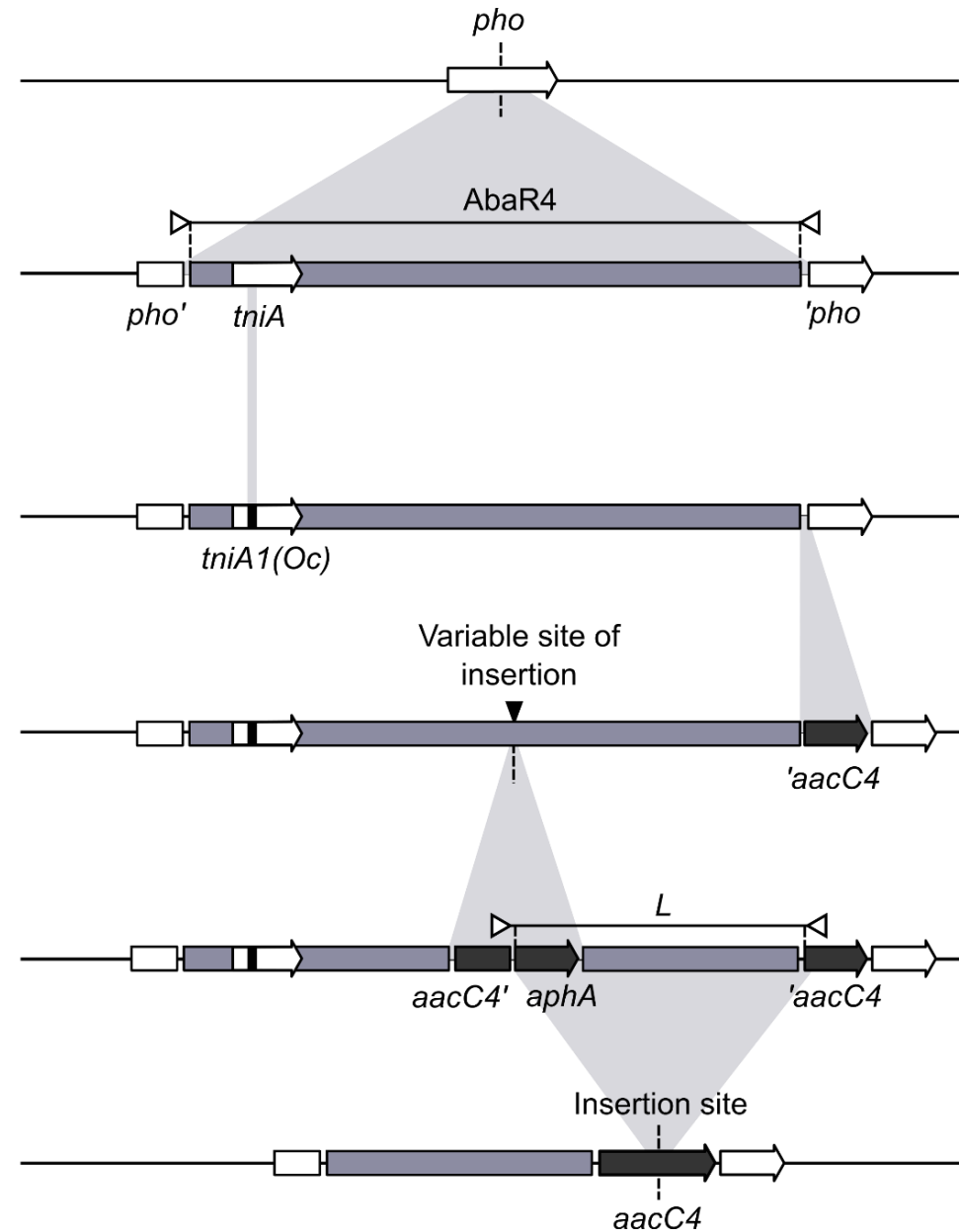
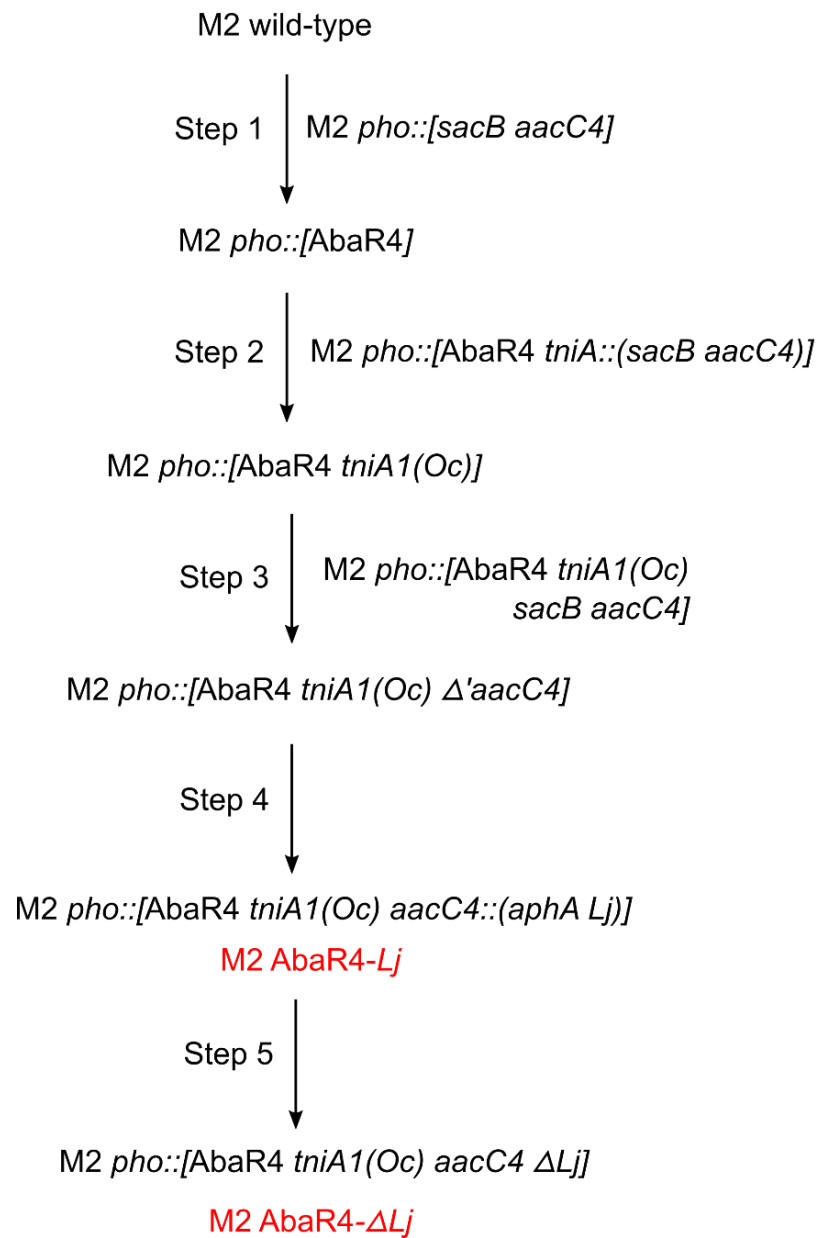


Figure S1: Chromosomal modifications used to generate the genotypes carrying the *L* fragment with a variable length. The *A. nosocomialis* M2 wild-type strain was modified to insert a large AbaR4 island into the *pho* gene (**step 1**). This was achieved by transforming the M2 *pho::[sacB aacC4]* intermediate with purified genomic DNA extracted from the *A. baumannii* AB0057 strain which naturally carries the AbaR4 island inserted into its *pho* gene. To avoid any transposition of the AbaR4 island, a point mutation leading to the generation of a stop codon and a change into the open reading frame was inserted into the coding sequence of the *tniA* gene of the AbaR4, generating the M2 *pho::[AbaR4 tniA1(Oc)]* strain (**step 2**). The M2 *pho::[AbaR4 tniA1(Oc) Δ'aacC4]* strain was then obtained by transforming the M2 *pho::[AbaR4 tniA1(Oc) sacB aacC4]* intermediate with the 3'half of the *aacC4* gene resulting to its insertion between the end of the AbaR4 and the 3'half of the *pho* gene (**step 3**). This parental strain was then transformed with different genetic constructs composed of the 5'half of the *aacC4* gene and a kanamycin resistance gene (*aphA*) flanked by 2-Kbp regions that are homologous to different insertion sites of the AbaR4. It generated 8 different M2 *pho::[AbaR4 tniA1(Oc) aacC4::(aphA Lj)]* genotypes in which an heterologous DNA fragment labelled *L*, had a variable *j* length of 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 and 16-Kbp (**step 4**). Finally, each of these genotypes, renamed M2 AbaR-*Lj*, were transformed with a PCR product of the *aacC4* gene to remove the *L* fragment and reconstruct the intact *aacC4* gene (**step 5**). The resulting M2 *pho::[AbaR4 tniA1(Oc) aacC4 ΔLj]* genotypes were renamed M2 AbaR4-Δ*Lj*. The Δ*comM* derivatives were obtained by transforming the M2 Δ*comM* strain with genomic DNA extracted from the different M2 AbaR4-*Lj* and M2 AbaR4-Δ*Lj* strains.

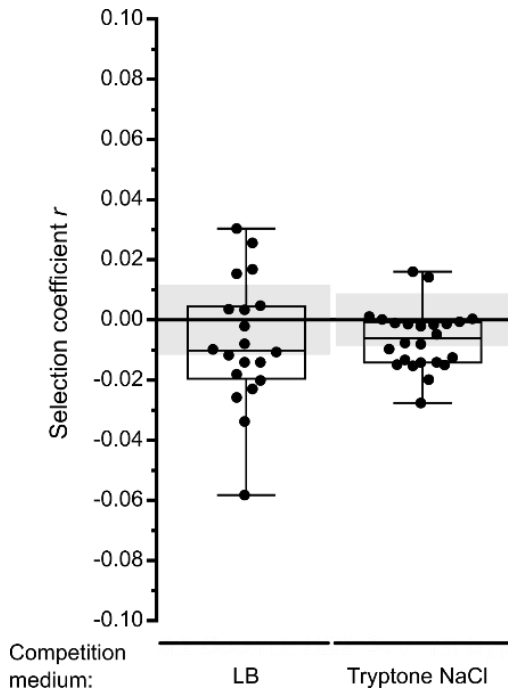


Figure S2: Fitness cost of the interruption of the *comM* gene.

Fitness costs of the interruption of the *comM* gene in the M2 $\Delta comM$ strain measured using isogenic bacterial competitions in LB medium (left) or in tryptone NaCl medium (right) and reported relative to the M2 wild-type strain ($s=0$). The detection limit of the experiment in each medium is indicated by the grey area ($|s|=0,0117$ for LB medium and $|s|=0,0088$ for tryptone NaCl). Measures of fitness are represented by the dotplot ; Boxes represent the interquartile range (25th–75th percentile) and whiskers the range.

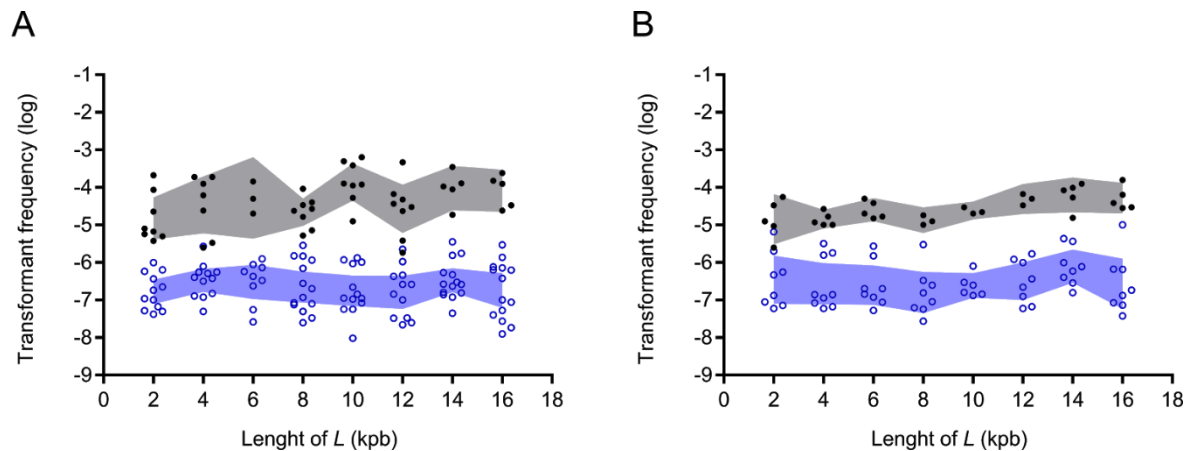


Figure S3: Natural transformation controls for bacterial strains used for the measure of the acquisition/deletion of the L fragment. **A.** M2 *rpoB2*(Rif^R) *comM*⁺/ $\Delta comM$ *pho*::[AbaR4 *tniA1*(Oc) *aacC4*::(*aphA Lj*)] and **B.** M2 *rpoB2*(Rif^R) *comM*⁺/ $\Delta comM$ *pho*::[AbaR4 *tniA1*(Oc) *aacC4* ΔLj] recipient strains were transformed in mixed culture with the same M2 *comEC*::*tetA* strain. The two genetic backgrounds of the *comM* gene are represented by distinct colors (*comM*⁺ in black and $\Delta comM$ in blue). Numbers of the x-axis only indicate the length of the L insert of the tested strain and are not a parameter of the experiment. The transformant frequency represents the log transformation of the ratio of tetracycline resistant transformants to the total recipient cells. Replicates are represented by dots and confidence intervals of the mean are indicated by the coloured area (*comM*⁺ in dark grey and $\Delta comM$ in blue).

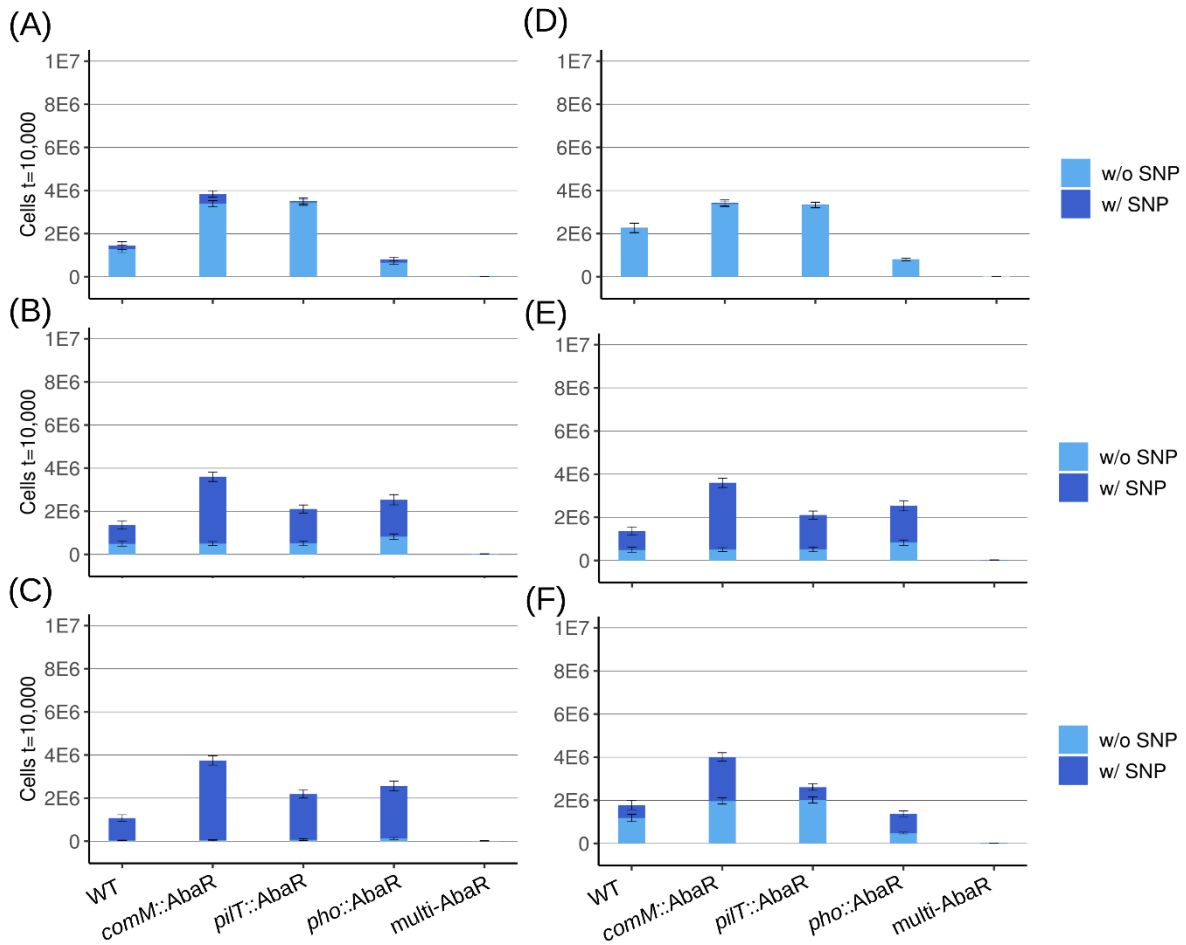


Figure S4: SNP proportion in the different genotypes. **A, B, C.** Scenarios where one SNP provides resistance to stress2 for a stress2 frequency of A) $1E-4$, B) $5E-4$ and C) $1E-3$ t^{-1} . **D, E, F.** Scenarios where two SNPs influence cell growth for an environmental switch frequency of D) $1E-4$, E) $5E-4$ and F) $1E-3$ t^{-1} . Results are the mean of 200 simulations and error bars are the standard error. Proportions of each genotype is represented by the coloured bars: cells with at least one SNP are in dark blue and cells without any SNP are in light blue.

Conclusion

Les travaux réalisés au cours de cette thèse s'inscrivent dans une volonté d'améliorer notre compréhension du rôle des mécanismes de transfert de gènes dans l'évolution des bactéries pathogènes. Dans cet objectif, nous avons exploré la contribution de la transformation naturelle, l'un de ces mécanismes de HGT principaux, dans la dynamique de dissémination de gènes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes du genre *Acinetobacter*. Deux axes principaux ont alors été développés : (i) la mise au point d'outils expérimentaux adaptés à l'étude de la transformation naturelle chez les bactéries *A. baumannii* MDR et (ii) l'étude de la dynamique de larges ilots de résistance et de la transformation naturelle chez les bactéries pathogènes *Acinetobacter*.

Au commencement de ces travaux de thèse, les données de la littérature traitant de la transformation naturelle chez *A. baumannii* sont encore très restreintes, malgré un intérêt croissant pour cet organisme. Nous avons donc commencé par développer un premier axe de travail consistant en la mise en place de différents outils expérimentaux au sein du laboratoire. En outre, l'une des difficultés principales à laquelle nous avons dû faire face, est le caractère résistant de la bactérie *A. baumannii*. En effet, les multiples résistances aux antibiotiques, présentées principalement par les souches et isolats cliniques de cette espèce, limitent grandement l'utilisation de marqueurs de sélection antibiotique à la base de la méthodologie classique de biologie moléculaire ou de génétique bactérienne. Pour pallier cette limitation, nous avons donc mis au point deux outils nous permettant de limiter l'utilisation de ces marqueurs : une méthode alternative de détection des événements de transfert de gènes basée sur un marqueur fluorescent, et une stratégie de modification génétique « sans cicatrice » exploitant la recombinaison génétique lors du mécanisme de transformation naturelle. Ces outils nous ont ensuite permis de quantifier les niveaux de transformabilité d'une collection d'isolats cliniques et non-cliniques d'*A. baumannii* et de générer des mutants délétés de leur îlot de résistance présent dans le chromosome. Nous avons alors pu mettre en évidence expérimentalement que la transformation naturelle était un mécanisme répandu chez les isolats cliniques d'*A. baumannii*, et que le caractère multi-résistant de ces isolats pouvait être causé par la présence de ces ilots de résistance, dont l'insertion dans le gène *comM* provoquait également une baisse de la capacité à réaliser la transformation naturelle.

A la suite de ces premiers travaux ayant permis la mise en place d'une méthodologie expérimentale robuste, nous avons développé le second axe sur l'étude du rôle de la transformation naturelle dans la dynamique des gènes de résistance chez *A. baumannii*. Pour cela, nous nous sommes concentrés sur les ilots de résistance présents dans le chromosome de la majorité des isolats cliniques d'*A. baumannii*, dont la présence est souvent associée à leur caractère MDR (Bi et al., 2019; Hamidian and Hall, 2018; Hamidian and Nigro, 2019; Ramírez et al., 2013). Nous avons alors mis au point des expériences de co-culture entre une bactérie receveuse capable de réaliser la transformation naturelle, et une bactérie donneuse porteuse d'un îlot de résistance. Dans ces conditions, la transformation naturelle permettait à la bactérie receveuse d'acquérir en quelques heures de larges ilots de résistance, s'accompagnant alors de l'acquisition d'un phénotype de résistance aux antibiotiques. Malgré une quantité faible dans le milieu, l'ADN libre produit par la bactérie donneuse constituait un substrat très efficace pour la transformation naturelle, faisant alors de la co-culture une condition particulièrement favorable aux transferts de larges séquences d'ADN.

Ces données nous ont donc permis de mettre en lumière l'importance de la transformation naturelle dans la circulation des gènes de résistance chez les *Acinetobacter* pathogènes. Il est donc clair que ce mécanisme, et plus largement les mécanismes de transferts de gènes, aient eu un rôle prépondérant dans le modelage des génomes de ces bactéries au cours de l'évolution, favorisant ainsi l'émergence de souches pathogènes particulièrement résistantes et bien adaptées à leur environnement.

L'un des concepts intéressants qui pourrait être mis en parallèle de ces travaux de transferts en co-culture est celui de la reproduction sexuelle procaryote. En effet, bien que les bactéries soient asexuées, les informations génétiques de leurs génomes peuvent être développées et modifiées grâce aux mécanismes de HGT, qui sont alors parfois assimilés à une forme de « sexe bactérien » (Narra and Ochman, 2006; Redfield, 2001; Rocha, 2016). Celle-ci diffère cependant de la reproduction sexuelle des eucaryotes, par son caractère unidirectionnel et qui n'implique pas de fusion ou de reproduction de gamètes. En 1973, Baker et Parker proposent que le phénomène donneur-receveur des procaryotes est directement analogue au phénomène mâle-femelle des eucaryotes et conduit à une évolution parallèle due à la sélection sexuelle dans les deux groupes (Baker et al., 2016). Chez les procaryotes, la condensation de l'information génétique en une molécule héréditaire circulaire unique aurait en effet conduit à la perte de la fusion des gamètes et à la spécialisation des individus en donneurs ou en receveurs. Lorsque assimilé au processus de transfert génétique par transformation naturelle, le donneur est alors une bactérie capable de fournir un ADN substrat pour la transformation, alors qu'un receveur est une bactérie capable d'utiliser ce substrat lors d'un événement de

transformation. De façon intéressante, et bien que ces deux status ne s'excluent pas obligatoirement, nous avons pu constater dans nos travaux de co-culture, que certaines souches constituaient de « bons receveurs » et de « mauvais donneurs », alors que d'autres souches constituaient de « bons donneurs » et de « mauvais receveurs ». La souche *A. nosocomialis* M2 présentait par exemple une capacité accrue à réaliser la transformation naturelle, sans produire une quantité suffisante d'ADN libre pour permettre des transferts de gènes efficaces. A l'inverse, la souche *A. baumannii* 40288 produisait une quantité suffisante d'ADN favorisant les transferts génétiques vers un receveur, tout en présentant une capacité très limitée à réaliser la transformation. Un tel investissement spécifique dans la libération d'ADN pourrait alors être considéré comme analogue à la compétition spermatique, où les organismes eucaryotes mâles augmentent le nombre de spermatozoïdes afin d'améliorer le succès de la fécondation (Vos et al., 2019). Ces caractéristiques pourraient alors faire d'*A. baumannii* un modèle particulièrement intéressant pour l'étude de l'évolution des mécanismes sexuels chez les organismes procaryotes.

Cependant, malgré cette propension exceptionnelle à réaliser la transformation naturelle, une interrogation subsiste : pourquoi ces ilots sont-ils majoritairement insérés dans le gène *comM*, si ce gène est impliqué dans le mécanisme à l'origine de leur transfert ? Ce cas n'étant pas une exception, nous avons alors émis l'hypothèse que l'inhibition de la transformation naturelle par des MGEs comme les ilots de résistances d'*A. baumannii*, pourrait permettre de diminuer leur probabilité d'être éliminés du chromosome et donc favoriser leur succès évolutif. Pour tester cette hypothèse, nous avons combinés approche expérimentale et modèle mathématique afin de : (i) quantifier le niveau d'inhibition de la transformation naturelle par des MGEs avec différentes stratégies d'insertion, afin de (ii) simuler ensuite mathématiquement les conséquences de ces différentes stratégies d'inhibition sur la fixation des MGEs dans une population bactérienne. A l'aide d'un modèle expérimental nous avons donc tout d'abord démontré que l'interruption du gène *comM* provoquait une diminution drastique mais partielle de la capacité de la bactérie à acquérir et éliminer de grands fragments d'ADN hétérologue, tout en conservant une capacité élevée à acquérir de nouveaux allèles par le biais d'une mutation ponctuelle dans un gène déjà présent dans le chromosome. Puis nous avons utilisé ces données expérimentales afin de générer un modèle mathématique de la dynamique de circulation des ilots de résistance AbaRs dans une population bactérienne. Ces travaux de modélisation ont alors démontré que l'interférence sur la transformation naturelle provoquée par l'insertion d'un AbaR dans le gène *comM* pouvait faciliter sa fixation, en particulier dans des environnements fluctuants. Cependant, les résultats obtenus dans les différentes simulations n'ont pas permis d'obtenir une situation similaire à celle observée dans les populations d'isolats cliniques d'*A. baumannii* où les cellules *comM::AbaR* deviennent

fortement majoritaires. Ceci suggère que d'autres facteurs influent sur la fixation de ces ilots au-delà de l'interférence qu'ils provoquent avec la transformation naturelle, comme par exemple une activité de transposition spécifique dans le gène *comM*.

Dans une récente revue de la littérature explorant les études de modélisation mathématique axées sur le transfert horizontal de gènes et l'antibiorésistance, Lerclerc *et al.* mettent en évidence l'existence d'une lacune particulièrement importante dans l'étude de la dynamique de la transformation naturelle et de la transduction dans ce phénomène (Leclerc et al., 2019). Ils soulignent pourtant l'importance de tels travaux et de leurs implications globales dans la problématique de l'antibiorésistance, et appellent à développer davantage ce domaine afin d'améliorer notre capacité à contrôler la résistance aux antimicrobiens. Dans ces derniers travaux nous avons donc souhaité aborder le sujet complexe du rôle évolutif de la transformation naturelle dans la propagation de l'antibiorésistance chez les bactéries pathogènes, en combinant des approches expérimentales et un modèle mathématique. En valorisant ainsi une démarche scientifique multi-disciplinaire, ces travaux de thèse s'inscrivent directement dans une volonté de coopération entre microbiologistes et modélisateurs afin d'explorer des sujets complexes à la frontière entre Evolution, Ecologie et Bactériologie.

Références

- Adams, M.D., Goglin, K., Molyneaux, N., Hujer, K.M., Lavender, H., Jamison, J.J., MacDonald, I.J., Martin, K.M., Russo, T., Campagnari, A.A., et al. (2008). Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* *190*, 8053–8064.
- Adams, M.D., Chan, E.R., Molyneaux, N.D., and Bonomo, R.A. (2010). Genomewide Analysis of Divergence of Antibiotic Resistance Determinants in Closely Related Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *54*, 3569–3577.
- Adams-Haduch, J.M., Paterson, D.L., Sidjabat, H.E., Pasculle, A.W., Potoski, B.A., Muto, C.A., Harrison, L.H., and Doi, Y. (2008). Genetic Basis of Multidrug Resistance in *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates at a Tertiary Medical Center in Pennsylvania. *Antimicrob Agents Chemother* *52*, 3837–3843.
- Ågren, J.A. (2016). Selfish genetic elements and the gene's-eye view of evolution. *Curr Zool* *62*, 659–665.
- Antunes, L.C.S., Imperi, F., Carattoli, A., and Visca, P. (2011). Deciphering the Multifactorial Nature of *Acinetobacter baumannii* Pathogenicity. *PLOS ONE* *6*, e22674.
- Antunes, L.C.S., Visca, P., and Towner, K.J. (2014). *Acinetobacter baumannii*: evolution of a global pathogen. *Pathog Dis* *71*, 292–301.
- Apagyi, K.J., Fraser, C., and Croucher, N.J. (2017). Transformation asymmetry and the evolution of the bacterial accessory genome. *Mol. Biol. Evol.*
- Ascher, J., Ceccherini, M.T., Pantani, O.L., Agnelli, A., Borgogni, F., Guerri, G., Nannipieri, P., and Pietramellara, G. (2009). Sequential extraction and genetic fingerprinting of a forest soil metagenome. *Applied Soil Ecology* *42*, 176–181.
- Averhoff, B., and Friedrich, A. (2003). Type IV pili-related natural transformation systems: DNA transport in mesophilic and thermophilic bacteria. *Arch. Microbiol.* *180*, 385–393.
- Avery, O.T., MacLeod, C.M., and McCarty, M. (1944). STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *J Exp Med* *79*, 137–158.
- Babakhani, S., and Oloomi, M. (2018). Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J. Basic Microbiol.* *58*, 905–917.
- Baker, J.A., Simkovic, F., Taylor, H.M.C., and Rigden, D.J. (2016). Potential DNA binding and nuclease functions of ComEC domains characterized in silico. *Proteins* *84*, 1431–1442.
- Baltrus, D.A. (2013). Exploring the costs of horizontal gene transfer. *Trends Ecol. Evol. (Amst.)* *28*, 489–495.
- Baltrus, D.A., Guillemin, K., and Phillips, P.C. (2008). Natural Transformation Increases the Rate of Adaptation in the Human Pathogen *Helicobacter Pylori*. *Evolution* *62*, 39–49.

- Bartual, S.G., Seifert, H., Hippler, C., Luzon, M.A.D., Wisplinghoff, H., and Rodríguez-Valera, F. (2005). Development of a Multilocus Sequence Typing Scheme for Characterization of Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol* 43, 4382–4390.
- Baumann, P. (1968). Isolation of *Acinetobacter* from Soil and Water. *J Bacteriol* 96, 39–42.
- Baumann, P., Doudoroff, M., and Stanier, R.Y. (1968). A Study of the *Moraxella* Group II. Oxidative-negative Species (Genus *Acinetobacter*)¹. *J Bacteriol* 95, 1520–1541.
- Bazzi, W., Abou Fayad, A.G., Nasser, A., Haraoui, L.-P., Dewachi, O., Abou-Sitta, G., Nguyen, V.-K., Abara, A., Karah, N., Landecker, H., et al. (2020). Heavy Metal Toxicity in Armed Conflicts Potentiates AMR in *A. baumannii* by Selecting for Antibiotic and Heavy Metal Co-resistance Mechanisms. *Front Microbiol* 11.
- Beijerinck, M. (1911). Pigmenten als oxydatieproducten gevormd door bacterien. *Versl Koninklijke Akad Wetensch Amsterdam* 19, 1092–103.
- Berg, O.G., and Kurland, C.G. (2002). Evolution of Microbial Genomes: Sequence Acquisition and Loss. *Mol Biol Evol* 19, 2265–2276.
- Bergogne-Bérézin, E., and Towner, K.J. (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev* 9, 148–165.
- Bert, F., and Lambert-Zechovsky, N. (1996). Sinusitis in mechanically ventilated patients and its role in the pathogenesis of nosocomial pneumonia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 15, 533–544.
- Bi, D., Xie, R., Zheng, J., Yang, H., Zhu, X., Ou, H.-Y., and Wei, Q. (2019). Large-Scale Identification of *AbaR*-Type Genomic Islands in *Acinetobacter baumannii* Reveals Diverse Insertion Sites and Clonal Lineage-Specific Antimicrobial Resistance Gene Profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63.
- Blackwell, G.A., Hamidian, M., and Hall, R.M. (2016). *IncM* Plasmid R1215 Is the Source of Chromosomally Located Regions Containing Multiple Antibiotic Resistance Genes in the Globally Disseminated *Acinetobacter baumannii* GC1 and GC2 Clones. *MSphere* 1.
- Blokesch, M. (2016). Natural competence for transformation. *Current Biology* 26, R1126–R1130.
- Blokesch, M. (2017). In and out-contribution of natural transformation to the shuffling of large genomic regions. *Curr. Opin. Microbiol.* 38, 22–29.
- Borgeaud, S., Metzger, L.C., Scignari, T., and Blokesch, M. (2015). The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science* 347, 63–67.
- Bossé, J.T., Sinha, S., Schippers, T., Kroll, J.S., Redfield, R.J., and Langford, P.R. (2009). Natural competence in strains of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 298, 124–130.
- Boucher, H.W., Talbot, G.H., Bradley, J.S., Edwards, J.E., Gilbert, D., Rice, L.B., Scheld, M., Spellberg, B., and Bartlett, J. (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESCAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48, 1–12.
- Bouvet, P.J.M., and Grimont, P.A.D. (1986). Taxonomy of the Genus *Acinetobacter* with the Recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov.,

Acinetobacter johnsonii sp. nov., and *Acinetobacter junii* sp. nov. and Emended Descriptions of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36, 228–240.

Brantl, S. (2014). Plasmid Replication Control by Antisense RNAs. *Microbiology Spectrum* 2.

Brisou, J., and Prevot, A.R. (1954). [Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 86, 722–728.

Calhoun, J.H., Murray, C.K., and Manring, M.M. (2008). Multidrug-resistant Organisms in Military Wounds from Iraq and Afghanistan. *Clin Orthop Relat Res* 466, 1356.

Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology* 303, 298–304.

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

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

Carruthers, M.D., Nicholson, P.A., Tracy, E.N., and Munson, R.S. (2013). *Acinetobacter baumannii* Utilizes a Type VI Secretion System for Bacterial Competition. *PLoS One* 8.

Cascales, E., and Cambillau, C. (2012). Structural biology of type VI secretion systems. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 367, 1102–1111.

Castellanos, N., Nakanouchi, J., Yüzen, D.I., Fung, S., Fernandez, J.S., Barberis, C., Tuchscher, L., and Ramirez, M.S. (2019). A Study on *Acinetobacter baumannii* and *Staphylococcus aureus* Strains Recovered from the Same Infection Site of a Diabetic Patient. *Curr. Microbiol.* 76, 842–847.

Chan, P.-C., Huang, L.-M., Lin, H.-C., Chang, L.-Y., Chen, M.-L., Lu, C.-Y., Lee, P.-I., Chen, J.-M., Lee, C.-Y., Pan, H.-J., et al. (2007). Control of an outbreak of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and infection in a neonatal intensive care unit. *Infect Control Hosp Epidemiol* 28, 423–429.

Chandler, M., and Fayet, O. (1993). Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Molecular Microbiology* 7, 497–503.

Charpentier, X., Kay, E., Schneider, D., and Shuman, H.A. (2011). Antibiotics and UV Radiation Induce Competence for Natural Transformation in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 193, 1114–1121.

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

Chen, I., and Gotschlich, E.C. (2001). ComE, a Competence Protein from *Neisseria gonorrhoeae* with DNA-Binding Activity. *J Bacteriol* 183, 3160–3168.

Chen, J., Carpena, N., Quiles-Puchalt, N., Ram, G., Novick, R.P., and Penadés, J.R. (2015). Intra- and inter-generic transfer of pathogenicity island-encoded virulence genes by cos phages. *The ISME Journal* 9, 1260–1263.

- Chen, J., Quiles-Puchalt, N., Chiang, Y.N., Bacigalupe, R., Fillol-Salom, A., Chee, M.S.J., Fitzgerald, J.R., and Penadés, J.R. (2018). Genome hypermobility by lateral transduction. *Science* *362*, 207–212.
- Chiang, Y.N., Penadés, J.R., and Chen, J. (2019). Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLOS Pathogens* *15*, e1007878.
- Chlebek, J.L., Hughes, H.Q., Ratkiewicz, A.S., Rayyan, R., Wang, J.C.-Y., Herrin, B.E., Dalia, T.N., Biais, N., and Dalia, A.B. (2019). PilT and PilU are homohexameric ATPases that coordinate to retract type IVa pili. *BioRxiv* 634048.
- Claverys, J.-P., and Håvarstein, L.S. (2007). Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 219–229.
- Claverys, J.-P., and Martin, B. (2003). Bacterial “competence” genes: signatures of active transformation, or only remnants? *Trends Microbiol.* *11*, 161–165.
- Claverys, J.-P., Prudhomme, M., and Martin, B. (2006). Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* *60*, 451–475.
- Clemmer, K.M., Bonomo, R.A., and Rather, P.N. (2011). Genetic analysis of surface motility in *Acinetobacter baumannii*. *Microbiology* *157*, 2534–2544.
- Clewell, D.B., Flannagan, S.E., and Jaworski, D.D. (1995). Unconstrained bacterial promiscuity: the Tn916-Tn1545 family of conjugative transposons. *Trends Microbiol.* *3*, 229–236.
- Cooper, R.M., Tsimring, L., and Hasty, J. (2017). Inter-species population dynamics enhance microbial horizontal gene transfer and spread of antibiotic resistance. *Elife* *6*.
- Corvec, S., Poirel, L., Naas, T., Drugeon, H., and Nordmann, P. (2007). Genetics and Expression of the Carbapenem-Hydrolyzing Oxacillinase Gene blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* *51*, 1530–1533.
- Costa, D.M., Johani, K., Melo, D.S., Lopes, L.K.O., Lopes Lima, L.K.O., Tipple, A.F.V., Hu, H., and Vickery, K. (2019). Biofilm contamination of high-touched surfaces in intensive care units: epidemiology and potential impacts. *Lett. Appl. Microbiol.* *68*, 269–276.
- Croucher, N.J., Mostowy, R., Wymant, C., Turner, P., Bentley, S.D., and Fraser, C. (2016). Horizontal DNA Transfer Mechanisms of Bacteria as Weapons of Intragenomic Conflict. *PLOS Biology* *14*, e1002394.
- Dalia, A.B., and Dalia, T.N. (2019). Spatiotemporal Analysis of DNA Integration during Natural Transformation Reveals a Mode of Nongenetic Inheritance in Bacteria. *Cell* *179*, 1499-1511.e10.
- Dalia, A.B., Lazinski, D.W., and Camilli, A. (2014). Identification of a Membrane-Bound Transcriptional Regulator That Links Chitin and Natural Competence in *Vibrio cholerae*. *MBio* *5*.
- Dalia, A.B., Seed, K.D., Calderwood, S.B., and Camilli, A. (2015). A globally distributed mobile genetic element inhibits natural transformation of *Vibrio cholerae*. *PNAS* *112*, 10485–10490.

- Dalsgaard, A., Forslund, A., Serichantalergs, O., and Sandvang, D. (2000). Distribution and content of class 1 integrons in different *Vibrio cholerae* O-serotype strains isolated in Thailand. *Antimicrob. Agents Chemother.* *44*, 1315–1321.
- Darmon, E., and Leach, D.R.F. (2014). Bacterial Genome Instability. *Microbiol Mol Biol Rev* *78*, 1–39.
- Dawkins, R. (1976). *The selfish gene* (New York: Oxford University Press).
- Dawson, M.H., and Sia, R.H. (1931). IN VITRO TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES : I. A TECHNIQUE FOR INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES IN VITRO. *J. Exp. Med.* *54*, 681–699.
- Delihias, N. (2011). Impact of Small Repeat Sequences on Bacterial Genome Evolution. *Genome Biol Evol* *3*, 959–973.
- Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., Chen, D., Bian, H., Li, Y., and Yu, G. (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* *14*.
- Denis, F., and Bearez, M.C. (1972). Importance en pathologie humaine et sensibilité aux antibiotiques des acinetobacter (Moraxella oxydase négative). *Médecine et Maladies Infectieuses* *2*, 219–229.
- Deshpande, L.M., Kapadnis, B.P., and Chopade, B.A. (1993). Metal resistance in *Acinetobacter* and its relation to beta-lactamase production. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* *6*, 55–59.
- van Dessel, H., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T., Bakker, N., Paauw, A., van den Broek, P., Verhoef, J., and Brisse, S. (2004). Identification of a new geographically widespread multiresistant *Acinetobacter baumannii* clone from European hospitals. *Res. Microbiol.* *155*, 105–112.
- Dhakephalkar, P.K., and Chopade, B.A. (1994). High levels of multiple metal resistance and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. *Biometals* *7*, 67–74.
- Di Venanzio, G., Flores-Mireles, A.L., Calix, J.J., Haurat, M.F., Scott, N.E., Palmer, L.D., Potter, R.F., Hibbing, M.E., Friedman, L., Wang, B., et al. (2019). Urinary tract colonization is enhanced by a plasmid that regulates uropathogenic *Acinetobacter baumannii* chromosomal genes. *Nature Communications* *10*, 1–13.
- Diancourt, L., Passet, V., Nemec, A., Dijkshoorn, L., and Brisse, S. (2010). The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS ONE* *5*, e10034.
- Dijkshoorn, L., Aucken, H., Gerner-Smidt, P., Janssen, P., Kaufmann, M.E., Garaizar, J., Ursing, J., and Pitt, T.L. (1996). Comparison of outbreak and nonoutbreak *Acinetobacter baumannii* strains by genotypic and phenotypic methods. *J. Clin. Microbiol.* *34*, 1519–1525.
- Dijkshoorn, L., Nemec, A., and Seifert, H. (2007). An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 939–951.
- Dillard, J.P., and Seifert, H.S. (2001). A variable genetic island specific for *Neisseria gonorrhoeae* is involved in providing DNA for natural transformation and is found more often in disseminated infection isolates. *Mol. Microbiol.* *41*, 263–277.

- Dimopoulou, I.D., Kartali, S.I., Harding, R.M., Peto, T.E.A., and Crook, D.W. (2007). Diversity of antibiotic resistance integrative and conjugative elements among haemophili. *J. Med. Microbiol.* *56*, 838–846.
- Ding, F., Tang, P., Hsu, M.-H., Cui, P., Hu, S., Yu, J., and Chiu, C.-H. (2009). Genome evolution driven by host adaptations results in a more virulent and antimicrobial-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 14. *BMC Genomics* *10*, 158.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., and Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* *2*, 414–424.
- Domingues, S., Harms, K., Fricke, W.F., Johnsen, P.J., Silva, G.J. da, and Nielsen, K.M. (2012a). Natural Transformation Facilitates Transfer of Transposons, Integrins and Gene Cassettes between Bacterial Species. *PLOS Pathogens* *8*, e1002837.
- Domingues, S., Nielsen, K.M., and da Silva, G.J. (2012b). Various pathways leading to the acquisition of antibiotic resistance by natural transformation. *Mob Genet Elements* *2*, 257–260.
- Domingues, S., Rosário, N., Cândido, Â., Neto, D., Nielsen, K.M., and Da Silva, G.J. (2019). Competence for Natural Transformation Is Common among Clinical Strains of Resistant *Acinetobacter* spp. *Microorganisms* *7*.
- Doolittle, W.F. (2000). Uprooting the tree of life. *Sci. Am.* *282*, 90–95.
- Doolittle, W.F., and Sapienza, C. (1980). Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* *284*, 601–603.
- Eijkelkamp, B.A., Stroehrer, U.H., Hassan, K.A., Papadimitriou, M.S., Paulsen, I.T., Brown, M.H., and Lo, R. (2011). Adherence and motility characteristics of clinical *Acinetobacter baumannii* isolates. *FEMS Microbiol Lett* *323*, 44–51.
- Elkins, C., Thomas, C.E., Seifert, H.S., and Sparling, P.F. (1991). Species-specific uptake of DNA by gonococci is mediated by a 10-base-pair sequence. *J. Bacteriol.* *173*, 3911–3913.
- Enault, F., Briet, A., Bouteille, L., Roux, S., Sullivan, M.B., and Petit, M.-A. (2017). Phages rarely encode antibiotic resistance genes: a cautionary tale for virome analyses. *The ISME Journal* *11*, 237–247.
- Endimiani, A., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Bertschy, I., Rossano, A., Koch, C., Gerber, V., Francey, T., Bonomo, R.A., and Perreten, V. (2011). *Acinetobacter baumannii* isolates from pets and horses in Switzerland: molecular characterization and clinical data. *J. Antimicrob. Chemother.* *66*, 2248–2254.
- Evans, B.A., and Rozen, D.E. (2013). Significant variation in transformation frequency in *Streptococcus pneumoniae*. *ISME J* *7*, 791–799.
- Evans, B.A., Hamouda, A., Towner, K.J., and Amyes, S.G.B. (2008). OXA-51-like beta-lactamases and their association with particular epidemic lineages of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* *14*, 268–275.
- Eze, E.C., Chenia, H.Y., and Zowalaty, M.E.E. (2018). *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infect Drug Resist* *11*, 2277–2299.

- Figueiredo, S., Poirel, L., Croize, J., Recule, C., and Nordmann, P. (2009). In Vivo Selection of Reduced Susceptibility to Carbapenems in *Acinetobacter baumannii* Related to ISAba1-Mediated Overexpression of the Natural blaOXA-66 Oxacillinase Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 2657–2659.
- Figueiredo, S., Bonnin, R.A., Poirel, L., Duranteau, J., and Nordmann, P. (2012). Identification of the naturally occurring genes encoding carbapenem-hydrolysing oxacillinases from *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter johnsonii*, and *Acinetobacter calcoaceticus*. *Clin. Microbiol. Infect.* 18, 907–913.
- Fitzpatrick, M.A., Ozer, E., Bolon, M.K., and Hauser, A.R. (2015). Influence of ACB complex genospecies on clinical outcomes in a U.S. hospital with high rates of multidrug resistance. *J. Infect.* 70, 144–152.
- Fournier, P.-E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., et al. (2006). Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Genet.* 2, e7.
- Francey, T., Gaschen, F., Nicolet, J., and Burnens, A.P. (2000). The Role of *Acinetobacter baumannii* as a Nosocomial Pathogen for Dogs and Cats in an Intensive Care Unit. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14, 177–183.
- Friedrich, A., Hartsch, T., and Averhoff, B. (2001). Natural transformation in mesophilic and thermophilic bacteria: identification and characterization of novel, closely related competence genes in *Acinetobacter* sp. strain BD413 and *Thermus thermophilus* HB27. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3140–3148.
- Furuno, J.P., Hebden, J.N., Standiford, H.C., Perencevich, E.N., Miller, R.R., Moore, A.C., Strauss, S.M., and Harris, A.D. (2008). Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Acinetobacter baumannii* in a long-term acute care facility. *Am J Infect Control* 36, 468–471.
- Gaillard, T., Darles, C., Pons, S., Martinaud, C., Soler, C., and Brisou, P. (2012). *Acinetobacter parvus* bacteraemia community-acquired. *Int. J. Med. Microbiol.* 302, 327–329.
- Gallagher, L.A., Ramage, E., Weiss, E.J., Radey, M., Hayden, H.S., Held, K.G., Huse, H.K., Zurawski, D.V., Brittnacher, M.J., and Manoel, C. (2015). Resources for Genetic and Genomic Analysis of Emerging Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *J. Bacteriol.* 197, 2027–2035.
- Gardner, P., Griffin, W.B., Swartz, M.N., and Kunz, L.J. (1970). Nonfermentative gram-negative bacilli of nosocomial interest. *The American Journal of Medicine* 48, 735–749.
- Gerner-Smidt, P., Tjernberg, I., and Ursing, J. (1991). Reliability of phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* species. *J. Clin. Microbiol.* 29, 277–282.
- Getino, M., and Cruz, F. (2018). Natural and Artificial Strategies To Control the Conjugative Transmission of Plasmids. *Microbiology Spectrum* 6.
- Ghaly, T.M., and Gillings, M.R. (2018). Mobile DNAs as Ecologically and Evolutionarily Independent Units of Life. *Trends in Microbiology* 26, 904–912.
- Godeux, A.-S., Lupo, A., Haenni, M., Guette-Marquet, S., Wilharm, G., Laaberki, M.-H., and Charpentier, X. (2018). Fluorescence-based detection of natural transformation in drug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Bacteriology* JB.00181-18.

- Godineau-Gauthey, N., Lesage, D., Tessier, F., Kollia, D., and Daguet, G.L. (1988). *Acinetobacter calcoaceticus* variete *Anitratus* ou *Acinetobacter baumannii* Etude de la sensibilité aux antibiotiques de 65 souches hospitalières. *Médecine et Maladies Infectieuses* 18, 124–129.
- Goic-Barisic, I., Seruga Music, M., Kovacic, A., Tonkic, M., and Hrenovic, J. (2017). Pan Drug-Resistant Environmental Isolate of *Acinetobacter baumannii* from Croatia. *Microb. Drug Resist.* 23, 494–496.
- Gómez-Gómez, C., Blanco-Picazo, P., Brown-Jaque, M., Quirós, P., Rodríguez-Rubio, L., Cerdà-Cuellar, M., and Muniesa, M. (2019). Infectious phage particles packaging antibiotic resistance genes found in meat products and chicken feces. *Scientific Reports* 9, 13281.
- Graf, F.E., Palm, M., Warringer, J., and Farewell, A. (2019). Inhibiting conjugation as a tool in the fight against antibiotic resistance. *Drug Dev. Res.* 80, 19–23.
- Gribun, A., Nitzan, Y., Pechatnikov, I., HersHKovits, G., and Katcoff, D.J. (2003). Molecular and structural characterization of the HMP-AB gene encoding a pore-forming protein from a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii*. *Curr. Microbiol.* 47, 434–443.
- Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *Epidemiology & Infection* 27, 113–159.
- Guiral, S., Mitchell, T.J., Martin, B., and Claverys, J.-P. (2005). Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 8710–8715.
- Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 641–679.
- Hall, J.P.J., Brockhurst, M.A., and Harrison, E. (2017). Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 372.
- Hallet, B., and Sherratt, D.J. (1997). Transposition and site-specific recombination: adapting DNA cut-and-paste mechanisms to a variety of genetic rearrangements. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 157–178.
- Hamidian, M., and Hall, R.M. (2011). AbaR4 replaces AbaR3 in a carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate belonging to global clone 1 from an Australian hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 2484–2491.
- Hamidian, M., and Hall, R.M. (2018). The AbaR antibiotic resistance islands found in *Acinetobacter baumannii* global clone 1 – Structure, origin and evolution. *Drug Resistance Updates* 41, 26–39.
- Hamidian, M., and Nigro, S.J. (2019). Emergence, molecular mechanisms and global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microb Genom* 5.
- Hamidian, M., Kenyon, J.J., Holt, K.E., Pickard, D., and Hall, R.M. (2014a). A conjugative plasmid carrying the carbapenem resistance gene blaOXA-23 in AbaR4 in an extensively resistant GC1 *Acinetobacter baumannii* isolate. *J Antimicrob Chemother* 69, 2625–2628.
- Hamidian, M., Wynn, M., Holt, K.E., Pickard, D., Dougan, G., and Hall, R.M. (2014b). Identification of a marker for two lineages within the GC1 clone of *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 69, 557–558.

- Hamidian, M., Holt, K.E., and Hall, R.M. (2015). Genomic resistance island AGI1 carrying a complex class 1 integron in a multiply antibiotic-resistant ST25 *Acinetobacter baumannii* isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* *70*, 2519–2523.
- Hamidian, M., Ambrose, S.J., and Hall, R.M. (2016). A large conjugative *Acinetobacter baumannii* plasmid carrying the *sul2* sulphonamide and *strAB* streptomycin resistance genes. *Plasmid* *87–88*, 43–50.
- Hamidian, M., Hawkey, J., Wick, R., Holt, K.E., and Hall, R.M. (2019). Evolution of a clade of *Acinetobacter baumannii* global clone 1, lineage 1 via acquisition of carbapenem- and aminoglycoside-resistance genes and dispersion of ISAba1. *Microb Genom* *5*.
- Hamilton, H.L., and Dillard, J.P. (2006). Natural transformation of *Neisseria gonorrhoeae*: from DNA donation to homologous recombination. *Mol. Microbiol.* *59*, 376–385.
- Hamilton, H.L., Domínguez, N.M., Schwartz, K.J., Hackett, K.T., and Dillard, J.P. (2005). *Neisseria gonorrhoeae* secretes chromosomal DNA via a novel type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* *55*, 1704–1721.
- Harding, C.M., Tracy, E.N., Carruthers, M.D., Rather, P.N., Actis, L.A., and Munson, R.S. (2013). *Acinetobacter baumannii* strain M2 produces type IV pili which play a role in natural transformation and twitching motility but not surface-associated motility. *MBio* *4*.
- Harding, C.M., Nasr, M.A., Kinsella, R.L., Scott, N.E., Foster, L.J., Weber, B.S., Fiester, S.E., Actis, L.A., Tracy, E.N., Munson, R.S., et al. (2015). *Acinetobacter* strains carry two functional oligosaccharyltransferases, one devoted exclusively to type IV pilin, and the other one dedicated to O-glycosylation of multiple proteins. *Mol. Microbiol.* *96*, 1023–1041.
- Harmer, C.J., and Hall, R.M. (2015). The A to Z of A/C plasmids. *Plasmid* *80*, 63–82.
- Harrow, G.L., Lees, J.A., Hanage, W.P., Lipsitch, M., Corander, J., Colijn, C., and Croucher, N.J. (2020). Negative frequency-dependent selection and asymmetrical transformation stabilise multi-strain bacterial population structures. *BioRxiv* 2020.06.05.118836.
- Harshey, R.M. (2014). Transposable phage Mu. *Microbiol Spectr* *2*.
- Héritier, C., Poirel, L., Fournier, P.-E., Claverie, J.-M., Raoult, D., and Nordmann, P. (2005). Characterization of the Naturally Occurring Oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* *49*, 4174–4179.
- Héritier, C., Poirel, L., and Nordmann, P. (2006). Cephalosporinase over-expression resulting from insertion of ISAba1 in *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* *12*, 123–130.
- Herriott, R.M., Meyer, E.M., and Vogt, M. (1970). Defined Nongrowth Media for Stage II Development of Competence in *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* *101*, 517–524.
- van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A.P., and Aarts, H.J.M. (2011). Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Front Microbiol* *2*.
- Holt, K., Kenyon, J.J., Hamidian, M., Schultz, M.B., Pickard, D.J., Dougan, G., and Hall, R. (2016). Five decades of genome evolution in the globally distributed, extensively antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* global clone 1. *Microb Genom* *2*.
- Hu, Y., He, L., Tao, X., Meng, F., and Zhang, J. (2019). High DNA Uptake Capacity of International Clone II *Acinetobacter baumannii* Detected by a Novel Planktonic Natural Transformation Assay. *Front Microbiol* *10*.

Hujer, K.M., Hujer, A.M., Hulten, E.A., Bajaksouzian, S., Adams, J.M., Donskey, C.J., Ecker, D.J., Massire, C., Eshoo, M.W., Sampath, R., et al. (2006). Analysis of Antibiotic Resistance Genes in Multidrug-Resistant *Acinetobacter* sp. Isolates from Military and Civilian Patients Treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 50, 4114–4123.

Iacono, M., Villa, L., Fortini, D., Bordoni, R., Imperi, F., Bonnal, R.J.P., Sicheritz-Ponten, T., De Bellis, G., Visca, P., Cassone, A., et al. (2008). Whole-genome pyrosequencing of an epidemic multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strain belonging to the European clone II group. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 2616–2625.

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

Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tienasitorn, C., and Hiramatsu, K. (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45, 1323–1336.

Jacobs, A.C., Thompson, M.G., Black, C.C., Kessler, J.L., Clark, L.P., McQueary, C.N., Gancz, H.Y., Corey, B.W., Moon, J.K., Si, Y., et al. (2014). AB5075, a Highly Virulent Isolate of *Acinetobacter baumannii*, as a Model Strain for the Evaluation of Pathogenesis and Antimicrobial Treatments. *MBio* 5, e01076-01014.

Jani, A.J., and Cotter, P.A. (2010). Type VI Secretion: Not Just for Pathogenesis Anymore. *Cell Host & Microbe* 8, 2–6.

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

Johnston, C., Martin, B., Granadel, C., Polard, P., and Claverys, J.-P. (2013). Programmed Protection of Foreign DNA from Restriction Allows Pathogenicity Island Exchange during Pneumococcal Transformation. *PLOS Pathogens* 9, e1003178.

Johnston, C., Martin, B., Fichant, G., Polard, P., and Claverys, J.-P. (2014). Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology* 12, 181–196.

Joseph, N.M., Sistla, S., Dutta, T.K., Badhe, A.S., Rasitha, D., and Parija, S.C. (2010). Role of intensive care unit environment and health-care workers in transmission of ventilator-associated pneumonia. *J Infect Dev Ctries* 4, 282–291.

Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., and Crook, D.W. (2009). Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 376–393.

Juni, E., and Janik, A. (1969). Transformation of *Acinetobacter calco-aceticus* (*Bacterium anitratum*). *J Bacteriol* 98, 281–288.

Karah, N., Haldorsen, B., Hegstad, K., Simonsen, G.S., Sundsfjord, A., Samuelsen, Ø., and Norwegian Study Group of *Acinetobacter* (2011). Species identification and molecular characterization of *Acinetobacter* spp. blood culture isolates from Norway. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 738–744.

Kim, D.H., and Ko, K.S. (2015). *AbaR*-type genomic islands in non-*baumannii* *Acinetobacter* species isolates from South Korea. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 5824–5826.

- Kim, D.H., Choi, J.Y., Jung, S.-I., Thamlikitkul, V., Song, J.-H., and Ko, K.S. (2012). AbaR4-Type Resistance Island Including the blaOXA-23 Gene in *Acinetobacter nosocomialis* Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 4548–4549.
- Kim, D.H., Choi, J.-Y., Kim, H.W., Kim, S.H., Chung, D.R., Peck, K.R., Thamlikitkul, V., So, T.M.-K., Yasin, R.M.D., Hsueh, P.-R., et al. (2013). Spread of Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Global Clone 2 in Asia and AbaR-Type Resistance Islands. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 5239–5246.
- King, L., Swiatlo, E., Swiatlo, A., and McDaniel, L. (2009). Serum resistance and biofilm formation in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 55, 414–421.
- Kjos, M., Miller, E., Slager, J., Lake, F.B., Gericke, O., Roberts, I.S., Rozen, D.E., and Veening, J.-W. (2016). Expression of *Streptococcus pneumoniae* Bacteriocins Is Induced by Antibiotics via Regulatory Interplay with the Competence System. *PLOS Pathogens* 12, e1005422.
- Knöppel, A., Lind, P.A., Lustig, U., Näsvall, J., and Andersson, D.I. (2014). Minor fitness costs in an experimental model of horizontal gene transfer in bacteria. *Mol. Biol. Evol.* 31, 1220–1227.
- Kochar, M., Crosatti, M., Harrison, E.M., Rieck, B., Chan, J., Constantinidou, C., Pallen, M., Ou, H.-Y., and Rajakumar, K. (2012). Deletion of TnAbaR23 Results in both Expected and Unexpected Antibigram Changes in a Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 1845–1853.
- van der Kolk, J.H., Endimiani, A., Graubner, C., Gerber, V., and Perreten, V. (2019). *Acinetobacter* in veterinary medicine, with an emphasis on *Acinetobacter baumannii*. *J Glob Antimicrob Resist* 16, 59–71.
- Koonin, E.V., Wolf, Y.I., and Katsnelson, M.I. (2017). Inevitability of the emergence and persistence of genetic parasites caused by evolutionary instability of parasite-free states. *Biol Direct* 12.
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., and Hultgren, S.J. (2013). Bacterial Biofilms: Development, Dispersal, and Therapeutic Strategies in the Dawn of the Postantibiotic Era. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3.
- Kouyama, Y., Harada, S., Ishii, Y., Saga, T., Yoshizumi, A., Tateda, K., and Yamaguchi, K. (2012). Molecular characterization of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp. in Japan: predominance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 and IMP-type metallo- β -lactamase-producing non-*baumannii* *Acinetobacter* species. *J. Infect. Chemother.* 18, 522–528.
- Krahn, T., Wibberg, D., Maus, I., Winkler, A., Bontron, S., Sczyrba, A., Nordmann, P., Pühler, A., Poirel, L., and Schlüter, A. (2016). Intraspecies Transfer of the Chromosomal *Acinetobacter baumannii* blaNDM-1 Carbapenemase Gene. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 3032–3040.
- Krizova, L., Dijkshoorn, L., and Nemec, A. (2011). Diversity and Evolution of AbaR Genomic Resistance Islands in *Acinetobacter baumannii* Strains of European Clone I. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55, 3201–3206.

- Kuo, C.-H., and Ochman, H. (2009). Deletional Bias across the Three Domains of Life. *Genome Biol Evol* 1, 145–152.
- Labbate, M., Case, R.J., and Stokes, H.W. (2009). The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Methods Mol. Biol.* 532, 103–125.
- Leclerc, Q.J., Lindsay, J.A., and Knight, G.M. (2019). Mathematical modelling to study the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in bacteria: current state of the field and recommendations. *Journal of The Royal Society Interface* 16, 20190260.
- Leenhouts, K.J., Kok, J., and Venema, G. (1989). Campbell-like integration of heterologous plasmid DNA into the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl Environ Microbiol* 55, 394–400.
- Leiman, P.G., Basler, M., Ramagopal, U.A., Bonanno, J.B., Sauder, J.M., Pukatzki, S., Burley, S.K., Almo, S.C., and Mekalanos, J.J. (2009). Type VI secretion apparatus and phage tail-associated protein complexes share a common evolutionary origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4154–4159.
- Leisner, M., Stingl, K., Frey, E., and Maier, B. (2008). Stochastic switching to competence. *Curr. Opin. Microbiol.* 11, 553–559.
- Lemoigne, M., Girard, H., and Jacobelli, G. (1952). [Soil bacteria easily utilizing 2-3, butanediol]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 82, 389–398.
- Leong, C.G., Bloomfield, R.A., Boyd, C.A., Dornbusch, A.J., Lieber, L., Liu, F., Owen, A., Slay, E., Lang, K.M., and Lostroh, C.P. (2017). The role of core and accessory type IV pilus genes in natural transformation and twitching motility in the bacterium *Acinetobacter baylyi*. *PLoS ONE* 12, e0182139.
- Leungtongkam, U., Thummeepak, R., Tasanapak, K., and Sitthisak, S. (2018). Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in association with conjugative plasmid or class 1 integrons of *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE* 13, e0208468.
- Levin, B.R., and Cornejo, O.E. (2009). The population and evolutionary dynamics of homologous gene recombination in bacterial populations. *PLoS Genet.* 5, e1000601.
- Lima, W.C., Paquola, A.C.M., Varani, A.M., Van Sluys, M.-A., and Menck, C.F.M. (2008). Laterally transferred genomic islands in *Xanthomonadales* related to pathogenicity and primary metabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 87–97.
- Lin, L., Ringel, P.D., Vettiger, A., Dürr, L., and Basler, M. (2019). DNA Uptake upon T6SS-Dependent Prey Cell Lysis Induces SOS Response and Reduces Fitness of *Acinetobacter baylyi*. *Cell Reports* 29, 1633-1644.e4.
- Linde, H.-J., Hahn, J., Holler, E., Reischl, U., and Lehn, N. (2002). Septicemia Due to *Acinetobacter junii*. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 2696–2697.
- Link, C., Eickernjäger, S., Porstendörfer, D., and Averhoff, B. (1998). Identification and Characterization of a Novel Competence Gene, *comC*, Required for DNA Binding and Uptake in *Acinetobacter* sp. Strain BD413. *J Bacteriol* 180, 1592–1595.
- Linz, B., Mukhtar, N., Shabbir, M.Z., Rivera, I., Ivanov, Y.V., Tahir, Z., Yaqub, T., and Harvill, E.T. (2018). Virulent Epidemic Pneumonia in Sheep Caused by the Human Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Front. Microbiol.* 9.

- Liu, F., Zhu, Y., Yi, Y., Lu, N., Zhu, B., and Hu, Y. (2014). Comparative genomic analysis of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates reveals extensive genomic variation and diverse antibiotic resistance determinants. *BMC Genomics* 15, 1163.
- Llosa, M., Gomis-Rüth, F.X., Coll, M., and de la Cruz Fd, F. (2002). Bacterial conjugation: a two-step mechanism for DNA transport. *Mol. Microbiol.* 45, 1–8.
- Lo Scrudato, M., and Blokesch, M. (2012). The regulatory network of natural competence and transformation of *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet.* 8, e1002778.
- Lo Scrudato, M., and Blokesch, M. (2013). A transcriptional regulator linking quorum sensing and chitin induction to render *Vibrio cholerae* naturally transformable. *Nucleic Acids Res.* 41, 3644–3658.
- Lorenz, M.G., Reipschläger, K., and Wackernagel, W. (1992). Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile soil extract and groundwater. *Arch. Microbiol.* 157, 355–360.
- Lyytikäinen, O., Kõljalg, S., Härmä, M., and Vuopio-Varkila, J. (1995). Outbreak caused by two multi-resistant *Acinetobacter baumannii* clones in a burns unit: emergence of resistance to imipenem. *J. Hosp. Infect.* 31, 41–54.
- Macfadyen, L.P., Chen, D., Vo, H.C., Liao, D., Sinotte, R., and Redfield, R.J. (2001). Competence development by *Haemophilus influenzae* is regulated by the availability of nucleic acid precursors. *Molecular Microbiology* 40, 700–707.
- Mah, M.W., Memish, Z.A., Cunningham, G., and Bannatyne, R.M. (2001). Outbreak of *Acinetobacter baumannii* in an intensive care unit associated with tracheostomy. *Am J Infect Control* 29, 284–288.
- Marie, L., Rapisarda, C., Morales, V., Bergé, M., Perry, T., Soulet, A.-L., Gruget, C., Remaut, H., Fronzes, R., and Polard, P. (2017). Bacterial RadA is a DnaB-type helicase interacting with RecA to promote bidirectional D-loop extension. *Nat Commun* 8.
- Matthey, N., Stutzmann, S., Stoudmann, C., Guex, N., Iseli, C., and Blokesch, M. (2019). Neighbor predation linked to natural competence fosters the transfer of large genomic regions in *Vibrio cholerae*. *ELife* 8, e48212.
- Mattick, J.S. (2002). Type IV pili and twitching motility. *Annu. Rev. Microbiol.* 56, 289–314.
- Maughan, H., and Redfield, R.J. (2009). Extensive Variation in Natural Competence in *Haemophilus Influenzae*. *Evolution* 63, 1852–1866.
- Mazaheri Nezhad Fard, R., Barton, M.D., and Heuzenroeder, M.W. (2011). Bacteriophage-mediated transduction of antibiotic resistance in enterococci. *Lett. Appl. Microbiol.* 52, 559–564.
- McGann, P., Courvalin, P., Snesrud, E., Clifford, R.J., Yoon, E.-J., Onmus-Leone, F., Ong, A.C., Kwak, Y.I., Grillot-Courvalin, C., Lesho, E., et al. (2014). Amplification of aminoglycoside resistance gene *aphA1* in *Acinetobacter baumannii* results in tobramycin therapy failure. *MBio* 5, e00915.
- McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A.C., Clifford, R., Hinkle, M., Whitman, T., Lesho, E., and Schaecher, K.E. (2016). *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *blaCTX-M* on a Novel IncF Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 60, 4420–4421.

- Meibom, K.L., Blokesch, M., Dolganov, N.A., Wu, C.-Y., and Schoolnik, G.K. (2005). Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* *310*, 1824–1827.
- Melville, S., and Craig, L. (2013). Type IV Pili in Gram-Positive Bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *77*, 323–341.
- Merkier, A.K., and Centrón, D. (2006). bla(OXA-51)-type beta-lactamase genes are ubiquitous and vary within a strain in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* *28*, 110–113.
- Merlin, C., and Toussaint, A. (1999). Les éléments transposables bactériens. *médecine/sciences* *15*, I.
- Metzger, L.C., and Blokesch, M. (2016). Regulation of competence-mediated horizontal gene transfer in the natural habitat of *Vibrio cholerae*. *Curr. Opin. Microbiol.* *30*, 1–7.
- Michalopoulos, A.S., Tsiodras, S., Rellos, K., Mentzelopoulos, S., and Falagas, M.E. (2005). Colistin treatment in patients with ICU-acquired infections caused by multiresistant Gram-negative bacteria: the renaissance of an old antibiotic. *Clinical Microbiology and Infection* *11*, 115–121.
- Miriagou, V., Carattoli, A., and Fanning, S. (2006). Antimicrobial resistance islands: resistance gene clusters in *Salmonella* chromosome and plasmids. *Microbes Infect.* *8*, 1923–1930.
- Moineau, S. (2013). Bacteriophage. In *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*, S. Maloy, and K. Hughes, eds. (San Diego: Academic Press), pp. 280–283.
- Moradigaravand, D., and Engelstädter, J. (2013). The evolution of natural competence: disentangling costs and benefits of sex in bacteria. *Am. Nat.* *182*, E112–126.
- Mortier-Barrière, I., Velten, M., Dupaigne, P., Mirouze, N., Piétremont, O., McGovern, S., Fichant, G., Martin, B., Noirot, P., Cam, E.L., et al. (2007). A Key Presynaptic Role in Transformation for a Widespread Bacterial Protein: DprA Conveys Incoming ssDNA to RecA. *Cell* *130*, 824–836.
- Mulder, J.A., and Venema, G. (1982). Isolation and partial characterization of *Bacillus subtilis* mutants impaired in DNA entry. *J. Bacteriol.* *150*, 260–268.
- Müller, S., Janssen, T., and Wieler, L.H. (2014). Multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary medicine--emergence of an underestimated pathogen? *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* *127*, 435–446.
- Narra, H.P., and Ochman, H. (2006). Of what use is sex to bacteria? *Curr Biol* *16*, R705–710.
- Nemec, A., Krizova, L., Maixnerova, M., van der Reijden, T.J.K., Deschaght, P., Passet, V., Vanechoutte, M., Brisse, S., and Dijkshoorn, L. (2011). Genotypic and phenotypic characterization of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex with the proposal of *Acinetobacter pittii* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 3) and *Acinetobacter nosocomialis* sp. nov. (formerly *Acinetobacter* genomic species 13TU). *Res. Microbiol.* *162*, 393–404.
- Nero, T.M., Dalia, T.N., Wang, J.C.-Y., Kysela, D.T., Bochman, M.L., and Dalia, A.B. (2018). ComM is a hexameric helicase that promotes branch migration during natural transformation in diverse Gram-negative species. *Nucleic Acids Res.* *46*, 6099–6111.

- Nicolas, E., Lambin, M., Dandoy, D., Galloy, C., Nguyen, N., Oger, C.A., and Hallet, B. (2015). The Tn3-family of Replicative Transposons. *Microbiology Spectrum* 3.
- Nielsen, K.M., Johnsen, P.J., Bensasson, D., and Daffonchio, D. (2007). Release and persistence of extracellular DNA in the environment. *Environ Biosafety Res* 6, 37–53.
- Nigro, S., and Hall, R.M. (2015). Distribution of the blaOXA-23-containing transposons Tn2006 and Tn2008 in Australian carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 70, 2409–2411.
- Nigro, S.J., and Hall, R.M. (2012). Tn6167, an antibiotic resistance island in an Australian carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* GC2, ST92 isolate. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1342–1346.
- Nigro, S.J., and Hall, R.M. (2016). Structure and context of *Acinetobacter* transposons carrying the oxa23 carbapenemase gene. *J Antimicrob Chemother* 71, 1135–1147.
- Nigro, S.J., Post, V., and Hall, R.M. (2011). The multiresistant *Acinetobacter baumannii* European clone I type strain RUH875 (A297) carries a genomic antibiotic resistance island AbaR21, plasmid pRAY and a cluster containing ISAbal-sul2-CR2-strB-strA. *J. Antimicrob. Chemother.* 66, 1928–1930.
- Nigro, S.J., Farrugia, D.N., Paulsen, I.T., and Hall, R.M. (2013). A novel family of genomic resistance islands, AbGRI2, contributing to aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* isolates belonging to global clone 2. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 554–557.
- Nolan, L.M., Turnbull, L., Katrib, M., Osvath, S.R., Losa, D., Lazenby, J.J., and Whitchurch, C.B. (2020). *Pseudomonas aeruginosa* is capable of natural transformation in biofilms. *Microbiology (Reading, Engl.)*.
- Oliveira, D.M.P.D., Forde, B.M., Kidd, T.J., Harris, P.N.A., Schembri, M.A., Beatson, S.A., Paterson, D.L., and Walker, M.J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews* 33.
- Oliveira, P.R., Leonhardt, M.C., Carvalho, V.C., Kojima, K.E., Silva, J.S., Rossi, F., and Lima, A.L.L. (2018). Incidence and risk factors associated with infection after intramedullary nailing of femoral and tibial diaphyseal fractures: Prospective study. *Injury* 49, 1905–1911.
- Ondov, B.D., Starrett, G.J., Sappington, A., Kostic, A., Koren, S., Buck, C.B., and Phillippy, A.M. (2019). Mash Screen: high-throughput sequence containment estimation for genome discovery. *Genome Biology* 20, 232.
- Orgel, L.E., and Crick, F.H.C. (1980). Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* 284, 604–607.
- O'Shea, M.K. (2012). *Acinetobacter* in modern warfare. *Int. J. Antimicrob. Agents* 39, 363–375.
- Overballe-Petersen, S., Harms, K., Orlando, L.A.A., Mayar, J.V.M., Rasmussen, S., Dahl, T.W., Rosing, M.T., Poole, A.M., Sicheritz-Ponten, T., Brunak, S., et al. (2013). Bacterial natural transformation by highly fragmented and damaged DNA. *PNAS* 110, 19860–19865.
- Pailhoriès, H., Tiry, C., Eveillard, M., and Kempf, M. (2018). *Acinetobacter pittii* isolated more frequently than *Acinetobacter baumannii* in blood cultures: the experience of a French hospital. *Journal of Hospital Infection* 99, 360–363.

- Palmen, R., Vosman, B., Kok, R., Zee, J.R. van der, and Hellingwerf, K.J. (1992). Characterization of transformation-deficient mutants of *Acinetobacter calcoaceticus*. *Molecular Microbiology* 6, 1747–1754.
- Palmen, R., Vosman, B., Buijsman, P., Breek, C.K., and Hellingwerf, K.J. (1993). Physiological characterization of natural transformation in *Acinetobacter calcoaceticus*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 295–305.
- Partridge, S.R., Kwong, S.M., Firth, N., and Jensen, S.O. (2018). Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev* 31.
- Paton, R., Miles, R.S., Hood, J., Amyes, S.G., Miles, R.S., and Amyes, S.G. (1993). ARI 1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2, 81–87.
- Peleg, A.Y., Seifert, H., and Paterson, D.L. (2008). *Acinetobacter baumannii*: Emergence of a Successful Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 538–582.
- Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., Rather, P.N., and Bonomo, R.A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 3471–3484.
- Perron, G.G., Lee, A.E.G., Wang, Y., Huang, W.E., and Barraclough, T.G. (2012). Bacterial recombination promotes the evolution of multi-drug-resistance in functionally diverse populations. *Proc Biol Sci* 279, 1477–1484.
- Piechaud, D., Piechaud, M., and Second, L. (1951). ETUDE DE 26 SOUCHES DE MORAXELLA-LWOFFI. In ANNALES DE L INSTITUT PASTEUR, (MASSON EDITEUR 21 STREET CAMILLE DESMOULINS, ISSY, 92789 MOULINEAUX CEDEX 9 ...), pp. 97–99.
- Piepenbrink, K.H. (2019). DNA Uptake by Type IV Filaments. *Front Mol Biosci* 6.
- Poirel, L., and Nordmann, P. (2006). Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 826–836.
- Poirel, L., Marqué, S., Héritier, C., Segonds, C., Chabanon, G., and Nordmann, P. (2005). OXA-58, a novel class D {beta}-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 202–208.
- Post, V., and Hall, R.M. (2009). AbaR5, a Large Multiple-Antibiotic Resistance Region Found in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 53, 2667–2671.
- Post, V., White, P.A., and Hall, R.M. (2010). Evolution of AbaR-type genomic resistance islands in multiply antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother* 65, 1162–1170.
- Post, V., Hamidian, M., and Hall, R.M. (2012). Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* variants belonging to global clone 1. *J. Antimicrob. Chemother.* 67, 1039–1040.
- Prashanth, K., and Badrinath, S. (2000). Simplified phenotypic tests for identification of *Acinetobacter* spp. and their antimicrobial susceptibility status. *J. Med. Microbiol.* 49, 773–778.
- Prudhomme, M., Attaiech, L., Sanchez, G., Martin, B., and Claverys, J.-P. (2006). Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 313, 89–92.

- Puyet, A., Greenberg, B., and Lacks, S.A. (1990). Genetic and structural characterization of endA. A membrane-bound nuclease required for transformation of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Mol. Biol.* *213*, 727–738.
- Qin, T., Geng, T., Zhou, H., Han, Y., Ren, H., Qiu, Z., Nie, X., Du, T., Liang, J., Du, P., et al. (2020). Super-dominant pathobiontic bacteria in the nasopharyngeal microbiota as causative agents of secondary bacterial infection in influenza patients. *Emerg Microbes Infect* *9*, 605–615.
- Que, F., Wu, S., and Huang, R. (2013). *Salmonella* pathogenicity island 1(SPI-1) at work. *Curr. Microbiol.* *66*, 582–587.
- Ramirez, M.S., Don, M., Merkier, A.K., Bistué, A.J.S., Zorreguieta, A., Centrón, D., and Tolmasky, M.E. (2010). Naturally Competent *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolate as a Convenient Model for Genetic Studies. *J Clin Microbiol* *48*, 1488–1490.
- Ramírez, M.S., Vilacoba, E., Stietz, M.S., Merkier, A.K., Jeric, P., Limansky, A.S., Márquez, C., Bello, H., Catalano, M., and Centrón, D. (2013). Spreading of AbaR-type genomic islands in multidrug resistance *Acinetobacter baumannii* strains belonging to different clonal complexes. *Curr. Microbiol.* *67*, 9–14.
- Recchia, G.D., and Hall, R.M. (1995). Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology (Reading, Engl.)* *141* (Pt 12), 3015–3027.
- Recchia, G.D., and Hall, R.M. (1997). Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiol.* *5*, 389–394.
- Redfield, R.J. (1993a). Evolution of Natural Transformation: Testing the DNA Repair Hypothesis in *Bacillus Subtilis* and *Haemophilus Influenzae*. *Genetics* *133*, 755–761.
- Redfield, R.J. (1993b). Genes for breakfast: the have-your-cake-and-eat-it-too of bacterial transformation. *J. Hered.* *84*, 400–404.
- Redfield, R.J. (2001). Do bacteria have sex? *Nat. Rev. Genet.* *2*, 634–639.
- Ringel, P.D., Hu, D., and Basler, M. (2017). The Role of Type VI Secretion System Effectors in Target Cell Lysis and Subsequent Horizontal Gene Transfer. *Cell Rep* *21*, 3927–3940.
- Rocha, E.P.C. (2008). The organization of the bacterial genome. *Annu. Rev. Genet.* *42*, 211–233.
- Rocha, E.P.C. (2016). Using Sex to Cure the Genome. *PLoS Biol* *14*.
- Romero-Calle, D., Guimarães Benevides, R., Góes-Neto, A., and Billington, C. (2019). Bacteriophages as Alternatives to Antibiotics in Clinical Care. *Antibiotics (Basel)* *8*.
- ROSSAU, R., VANDENBUSSCHE, G., THIELEMANS, S., SEGERS, P., GROSCHE, H., GÖTHE, E., MANNHEIM, W., and DE LEY, J. (1989). Ribosomal Ribonucleic Acid Cistron Similarities and Deoxyribonucleic Acid Homologies of *Neisseria*, *Kingella*, *Eikenella*, *Simonsiella*, *Alysiella*, and Centers for Disease Control Groups EF-4 and M-5 in the Emended Family *Neisseriaceae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *39*, 185–198.
- ROSSAU, R., VAN LANDSCHOOT, A., GILLIS, M., and DE LEY, J. (1991). Taxonomy of *Moraxellaceae* fam. nov., a New Bacterial Family To Accommodate the Genera *Moraxella*,

Acinetobacter, and Psychrobacter and Related Organisms. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 41, 310–319.

Rumbo, C., Fernández-Moreira, E., Merino, M., Poza, M., Mendez, J.A., Soares, N.C., Mosquera, A., Chaves, F., and Bou, G. (2011). Horizontal transfer of the OXA-24 carbapenemase gene via outer membrane vesicles: a new mechanism of dissemination of carbapenem resistance genes in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 3084–3090.

Salysers, A.A., Shoemaker, N.B., Stevens, A.M., and Li, L.Y. (1995). Conjugative transposons: an unusual and diverse set of integrated gene transfer elements. *Microbiol. Rev.* 59, 579–590.

San Millan, A. (2018). Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. *Trends in Microbiology* 26, 978–985.

San Millan, A., and MacLean, R.C. (2017). Fitness Costs of Plasmids: a Limit to Plasmid Transmission. *Microbiol Spectr* 5.

Saule, M., Samuelsen, Ø., Dumpis, U., Sundsfjord, A., Karlson, A., Balode, A., Miklasevics, E., and Karah, N. (2013). Dissemination of a Carbapenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain Belonging to International Clone II/Sequence Type 2 and Harboring a Novel AbaR4-Like Resistance Island in Latvia. *Antimicrob Agents Chemother* 57, 1069–1072.

Schaub, I.G., and Hauber, F.D. (1948). A Biochemical and Serological Study of a Group of Identical Unidentifiable Gram-negative Bacilli from Human Sources. *J Bacteriol* 56, 379–385.

Schleicher, X., Higgins, P.G., Wisplinghoff, H., Körber-Irrgang, B., Kresken, M., and Seifert, H. (2013). Molecular epidemiology of *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter nosocomialis* in Germany over a 5-year period (2005-2009). *Clin. Microbiol. Infect.* 19, 737–742.

Schmidt, H., and Hensel, M. (2004). Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin. Microbiol. Rev.* 17, 14–56.

Segal, H., Jacobson, R.K., Garny, S., Bamford, C.M., and Elisha, B.G. (2007). Extended –10 Promoter in ISAb-1 Upstream of blaOXA-23 from *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3040–3041.

Seiler, C., and Berendonk, T.U. (2012). Heavy metal driven co-selection of antibiotic resistance in soil and water bodies impacted by agriculture and aquaculture. *Frontiers in Microbiology* 3, 399.

Seitz, P., and Blokesch, M. (2013). Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 336–363.

Seitz, P., Pezeshgi Modarres, H., Borgeaud, S., Bulushev, R.D., Steinbock, L.J., Radenovic, A., Dal Peraro, M., and Blokesch, M. (2014). ComEA is essential for the transfer of external DNA into the periplasm in naturally transformable *Vibrio cholerae* cells. *PLoS Genet.* 10, e1004066.

Šeputienė, V., Povilonis, J., and Sužiedėlienė, E. (2012). Novel Variants of AbaR Resistance Islands with a Common Backbone in *Acinetobacter baumannii* Isolates of European Clone II. *Antimicrob Agents Chemother* 56, 1969–1973.

- Shahcheraghi, F., Badmasti, F., and Feizabadi, M.M. (2010). Molecular characterization of class 1 integrons in MDR *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical settings in Iran, Tehran. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *58*, 421–425.
- Shanker, E., and Federle, M.J. (2017). Quorum Sensing Regulation of Competence and Bacteriocins in *Streptococcus pneumoniae* and mutants. *Genes (Basel)* *8*.
- Siguier, P., Gournayre, E., Varani, A., Ton-Hoang, B., and Chandler, M. (2015). Everyman's Guide to Bacterial Insertion Sequences. In *Mobile DNA III*, (John Wiley & Sons, Ltd), pp. 555–590.
- Sinha, S., Mell, J., and Redfield, R. (2013). The availability of purine nucleotides regulates natural competence by controlling translation of the competence activator Sxy. *Mol Microbiol* *88*, 1106–1119.
- Smith, M.G., Gianoulis, T.A., Pukatzki, S., Mekalanos, J.J., Ornston, L.N., Gerstein, M., and Snyder, M. (2007). New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Genes Dev* *21*, 601–614.
- Song, C., Yu, J., Ai, Q., Liu, D., Lu, W., Lu, Q., and Peng, N. (2013). [Diversity analysis of biofilm bacteria on tracheal tubes removed from intubated neonates]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi* *51*, 602–606.
- Springael, D., and Top, E.M. (2004). Horizontal gene transfer and microbial adaptation to xenobiotics: new types of mobile genetic elements and lessons from ecological studies. *Trends in Microbiology* *12*, 53–58.
- Straume, D., Stamsås, G.A., and Håvarstein, L.S. (2015). Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Genet. Evol.* *33*, 371–380.
- Sugawara, E., and Nikaido, H. (2012). OmpA Is the Principal Nonspecific Slow Porin of *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* *194*, 4089–4096.
- Sun, D., Jeannot, K., Xiao, Y., and Knapp, C.W. (2019). Editorial: Horizontal Gene Transfer Mediated Bacterial Antibiotic Resistance. *Front. Microbiol.* *10*.
- Sun, R.-X., Song, P., Walline, J., Wang, H., Xu, Y.-C., Zhu, H.-D., Yu, X.-Z., and Xu, J. (2020). Morbidity and mortality risk factors in emergency department patients with *Acinetobacter baumannii* bacteremia. *World J Emerg Med* *11*, 164–168.
- Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A., Harbarth, S., Mendelson, M., Monnet, D.L., Pulcini, C., Kahlmeter, G., Kluytmans, J., Carmeli, Y., et al. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis* *18*, 318–327.
- Taitt, C.R., Leski, T.A., Stockelman, M.G., Craft, D.W., Zurawski, D.V., Kirkup, B.C., and Vora, G.J. (2014). Antimicrobial resistance determinants in *Acinetobacter baumannii* isolates taken from military treatment facilities. *Antimicrob. Agents Chemother.* *58*, 767–781.
- Taj, Z., Rasool, M.H., Almatroudi, A., Saqalein, M., and Khurshid, M. (2020). Extensively Drug-resistant *Acinetobacter baumannii* Belonging to International Clone II from A Pet Cat with Urinary Tract Infection; The First Report from Pakistan. *Pol. J. Microbiol.* *69*, 1–4.
- Tankovic, J., Legrand, P., De Gatines, G., Chemineau, V., Brun-Buisson, C., and Duval, J. (1994). Characterization of a hospital outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* by phenotypic and genotypic typing methods. *J Clin Microbiol* *32*, 2677–2681.

- Taylor, D.E., Gibreel, A., Lawley, T.D., Tracz, D.M., Funnel, B.E., and Phillips, G.J. (2004). Plasmid biology. *Plasmid Biol.* 35, 473–492.
- Thomas, C.M. (2014). Plasmid Incompatibility. In *Molecular Life Sciences: An Encyclopedic Reference*, E. Bell, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 1–3.
- Tomaras, A.P., Dorsey, C.W., Edelmann, R.E., and Actis, L.A. (2003). Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology (Reading, Engl.)* 149, 3473–3484.
- Torres, R., Serrano, E., and Alonso, J.C. (2019). *Bacillus subtilis* RecA interacts with and loads RadA/Sms to unwind recombination intermediates during natural chromosomal transformation. *Nucleic Acids Res.* 47, 9198–9215.
- Torres-Barceló, C. (2018). The disparate effects of bacteriophages on antibiotic-resistant bacteria. *Emerg Microbes Infect* 7, 168.
- Towner, K.J. (2009). *Acinetobacter*: an old friend, but a new enemy. *J. Hosp. Infect.* 73, 355–363.
- Turton, J.F., Gabriel, S.N., Valderrey, C., Kaufmann, M.E., and Pitt, T.L. (2007). Use of sequence-based typing and multiplex PCR to identify clonal lineages of outbreak strains of *Acinetobacter baumannii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 807–815.
- Turton, J.F., Baddal, B., and Perry, C. (2011). Use of the accessory genome for characterization and typing of *Acinetobacter baumannii*. *J. Clin. Microbiol.* 49, 1260–1266.
- Utnes, A.L.G., Sørum, V., Hülter, N., Primicerio, R., Hegstad, J., Kloos, J., Nielsen, K.M., and Johnsen, P.J. (2015). Growth phase-specific evolutionary benefits of natural transformation in *Acinetobacter baylyi*. *The ISME Journal* 9, 2221–2231.
- Van Landschoot, A., Rossau, R., and De Ley, J. (1986). Intra- and Intergeneric Similarities of the Ribosomal Ribonucleic Acid Cistrons of *Acinetobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 36, 150–160.
- Varga, M., Kuntová, L., Pantůček, R., Mašlaňová, I., Růžicková, V., and Doškař, J. (2012). Efficient transfer of antibiotic resistance plasmids by transduction within methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* USA300 clone. *FEMS Microbiol. Lett.* 332, 146–152.
- Veening, J.-W., and Blokesch, M. (2017). Interbacterial predation as a strategy for DNA acquisition in naturally competent bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 15, 621–629.
- Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., Anandan, S., Balaji, V., and Biswas, I. (2016). Biofilm Formation and Motility Depend on the Nature of the *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates. *Frontiers in Public Health* 4.
- Vincent, J.-L., Rello, J., Marshall, J., Silva, E., Anzueto, A., Martin, C.D., Moreno, R., Lipman, J., Gomersall, C., Sakr, Y., et al. (2009). International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *JAMA* 302, 2323–2329.
- Vos, M., Buckling, A., and Kuijper, B. (2019). Sexual Selection in Bacteria? *Trends in Microbiology* 27, 972–981.
- de Vries, J., and Wackernagel, W. (2002). Integration of foreign DNA during natural transformation of *Acinetobacter* sp. by homology-facilitated illegitimate recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2094–2099.

- Wachino, J., Jin, W., Kimura, K., and Arakawa, Y. (2019). Intercellular Transfer of Chromosomal Antimicrobial Resistance Genes between *Acinetobacter baumannii* Strains Mediated by Prophages. *Antimicrob Agents Chemother* 63.
- Waddell, C.S., and Craig, N.L. (1989). Tn7 transposition: recognition of the attTn7 target sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86, 3958–3962.
- Wang, T., Costa, V., Jenkins, S.G., Hartman, B.J., and Westblade, L.F. (2019). *Acinetobacter radioresistens* infection with bacteremia and pneumonia. *IDCases* 15, e00495.
- Wang, X., Zong, Z., and Lü, X. (2011). Tn2008 is a major vehicle carrying blaOXA-23 in *Acinetobacter baumannii* from China. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 69, 218–222.
- Wareth, G., Neubauer, H., and Sprague, L.D. (2019). *Acinetobacter baumannii* – a neglected pathogen in veterinary and environmental health in Germany. *Vet Res Commun* 43, 1–6.
- Weber, B.S., Miyata, S.T., Iwashkiw, J.A., Mortensen, B.L., Skaar, E.P., Pukatzki, S., and Feldman, M.F. (2013). Genomic and functional analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter*. *PLoS ONE* 8, e55142.
- Weber, B.S., Ly, P.M., Irwin, J.N., Pukatzki, S., and Feldman, M.F. (2015). A multidrug resistance plasmid contains the molecular switch for type VI secretion in *Acinetobacter baumannii*. *PNAS* 112, 9442–9447.
- WHO (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed.
- Wholey, W.-Y., Kochan, T.J., Storck, D.N., and Dawid, S. (2016). Coordinated Bacteriocin Expression and Competence in *Streptococcus pneumoniae* Contributes to Genetic Adaptation through Neighbor Predation. *PLoS Pathog.* 12, e1005413.
- Wilharm, G., Piesker, J., Laue, M., and Skiebe, E. (2013). DNA uptake by the nosocomial pathogen *Acinetobacter baumannii* occurs during movement along wet surfaces. *J. Bacteriol.* 195, 4146–4153.
- Williams, C.L., Neu, H.M., Gilbreath, J.J., Michel, S.L.J., Zurawski, D.V., and Merrell, D.S. (2016). Copper Resistance of the Emerging Pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Appl Environ Microbiol* 82, 6174–6188.
- von Wintersdorff, C.J.H., Penders, J., van Niekerk, J.M., Mills, N.D., Majumder, S., van Alphen, L.B., Savelkoul, P.H.M., and Wolffs, P.F.G. (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol* 7.
- Wolfgang, M., Lauer, P., Park, H.S., Brossay, L., Hébert, J., and Koomey, M. (1998). PilT mutations lead to simultaneous defects in competence for natural transformation and twitching motility in pilated *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* 29, 321–330.
- Wright, M.S., Haft, D.H., Harkins, D.M., Perez, F., Hujer, K.M., Bajaksouzian, S., Benard, M.F., Jacobs, M.R., Bonomo, R.A., and Adams, M.D. (2014). New insights into dissemination and variation of the health care-associated pathogen *Acinetobacter baumannii* from genomic analysis. *MBio* 5, e00963-00913.
- Yakut, N., Kepenekli, E.K., Karaaslan, A., Atici, S., Akkoc, G., Demir, S.O., Soysal, A., and Bakir, M. (2016). Bacteremia due to *Acinetobacter ursingii* in infants: Reports of two cases. *Pan Afr Med J* 23.

Yamamoto, S., Mitobe, J., Ishikawa, T., Wai, S.N., Ohnishi, M., Watanabe, H., and Izumiya, H. (2014). Regulation of natural competence by the orphan two-component system sensor kinase ChiS involves a non-canonical transmembrane regulator in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* *91*, 326–347.

Yang, J., Chen, Y., Jia, X., Luo, Y., Song, Q., Zhao, W., Wang, Y., Liu, H., Zheng, D., Xia, Y., et al. (2012). Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Clin. Microbiol. Infect.* *18*, E506-513.

Yang, Y., Fu, Y., Lan, P., Xu, Q., Jiang, Y., Chen, Y., Ruan, Z., Ji, S., Hua, X., and Yu, Y. (2018). Molecular Epidemiology and Mechanism of Sulbactam Resistance in *Acinetobacter baumannii* Isolates with Diverse Genetic Backgrounds in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

Young, M. (1983). The mechanism of insertion of a segment of heterologous DNA into the chromosome of *Bacillus subtilis*. *Journal of General Microbiology* *129*, 1497–1512.

Zhou, H., Zhang, T., Yu, D., Pi, B., Yang, Q., Zhou, J., Hu, S., and Yu, Y. (2011). Genomic Analysis of the Multidrug-Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain MDR-ZJ06 Widely Spread in China ▽. *Antimicrob Agents Chemother* *55*, 4506–4512.

Zordan, S., Prenger-Berninghoff, E., Weiss, R., van der Reijden, T., van den Broek, P., Baljer, G., and Dijkshoorn, L. (2011). Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* in veterinary clinics, Germany. *Emerging Infect. Dis.* *17*, 1751–1754.

Annexes

Contribution supplémentaire à une publication scientifique.

Bacterial transformation buffers environmental fluctuations through the reversible integration of Mobile genetic elements.

Authors: Gabriel Carvalho,^a David Fouchet,^a Gonché Danesh,^a **Anne-Sophie Godeux**,^{b,c} Maria-Halima Laaberki,^{b,c} Dominique Pontier,^a Xavier Charpentier,^b Samuel Venner,^a.

a. Université de Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, UMR5558, Villeurbanne, France.

b. CIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, CNRS, UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, Univ Lyon, 69100, Villeurbanne, France

c. Université de Lyon, VetAgro Sup, 69280 Marcy l'Etoile, France.



Bacterial Transformation Buffers Environmental Fluctuations through the Reversible Integration of Mobile Genetic Elements

 Gabriel Carvalho,^a David Fouchet,^a Gonché Danesh,^a Anne-Sophie Godeux,^{b,d}  Maria-Halima Laaberki,^{b,c,d} Dominique Pontier,^a  Xavier Charpentier,^{b,d} Samuel Venner^a

^aUniversité de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR 5558, Villeurbanne, France

^bCIRI, Centre International de Recherche en Infectiologie, Inserm, U1111, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

^cUniversité de Lyon, VetAgro Sup, Marcy-l'Étoile, France

^dCNRS UMR5308, École Normale Supérieure de Lyon, University of Lyon, Villeurbanne, France

Xavier Charpentier and Samuel Venner contributed equally to this study and their author order was determined alphabetically.

ABSTRACT Horizontal gene transfer (HGT) promotes the spread of genes within bacterial communities. Among the HGT mechanisms, natural transformation stands out as being encoded by the bacterial core genome. Natural transformation is often viewed as a way to acquire new genes and to generate genetic mixing within bacterial populations. Another recently proposed function is the curing of bacterial genomes of their infectious parasitic mobile genetic elements (MGEs). Here, we propose that these seemingly opposing theoretical points of view can be unified. Although costly for bacterial cells, MGEs can carry functions that are at points in time beneficial to bacteria under stressful conditions (e.g., antibiotic resistance genes). Using computational modeling, we show that, in stochastic environments, an intermediate transformation rate maximizes bacterial fitness by allowing the reversible integration of MGEs carrying resistance genes, although these MGEs are costly for host cell replication. Based on this dual function (MGE acquisition and removal), transformation would be a key mechanism for stabilizing the bacterial genome in the long term, and this would explain its striking conservation.

IMPORTANCE Natural transformation is the acquisition, controlled by bacteria, of extracellular DNA and is one of the most common mechanisms of horizontal gene transfer, promoting the spread of resistance genes. However, its evolutionary function remains elusive, and two main roles have been proposed: (i) the new gene acquisition and genetic mixing within bacterial populations and (ii) the removal of infectious parasitic mobile genetic elements (MGEs). While the first one promotes genetic diversification, the other one promotes the removal of foreign DNA and thus genome stability, making these two functions apparently antagonistic. Using a computational model, we show that intermediate transformation rates, commonly observed in bacteria, allow the acquisition then removal of MGEs. The transient acquisition of costly MGEs with resistance genes maximizes bacterial fitness in environments with stochastic stress exposure. Thus, transformation would ensure both a strong dynamic of the bacterial genome in the short term and its long-term stabilization.

KEYWORDS natural transformation, horizontal gene transfer, mobile genetic elements, resistance genes, stochastic environment

Horizontal gene transfer (HGT), i.e., the passage of heritable genetic material between organisms by means other than parent-offspring transmission, is commonly observed in bacteria (1–3). By promoting the spread of genes of antibiotic or heavy

Citation Carvalho G, Fouchet D, Danesh G, Godeux A-S, Laaberki M-H, Pontier D, Charpentier X, Venner S. 2020. Bacterial transformation buffers environmental fluctuations through the reversible integration of mobile genetic elements. *mBio* 11:e02443-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02443-19>.

Invited Editor Eugene V. Koonin, National Center for Biotechnology Information, NLM, NIH

Editor Igor B. Zhulin, The Ohio State University

Copyright © 2020 Carvalho et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Gabriel Carvalho, gabriel.carvalho@univ-lyon.fr, or Samuel Venner, samuel.venner@univ-lyon1.fr.

Received 16 September 2019

Accepted 21 January 2020

Published 3 March 2020

metal resistance and virulence factors, HGT is an important threat to human health (4). Among all known mechanisms by which HGTs occur, one can distinguish HGTs resulting from the infectious and propagative behavior of mobile genetic elements (conjugation and transduction) and HGTs that are exclusively controlled by the bacterial cells (5–7). By far, the most widespread of those is natural transformation, i.e., the import of free extracellular DNA (eDNA) and its integration into the bacterial genome by homologous recombination (8, 9). The DNA import system is expressed under the state of competence, which is triggered by signals that are often elusive and difficult to reproduce under laboratory conditions (10, 11). Despite this difficulty, transformation has been experimentally demonstrated in more than 80 bacterial species distributed throughout the tree of life, indicative of an ancestral origin (8, 10, 12). The list of transformable species keeps growing, now including species that had long been considered incapable of transformation (13, 14). In addition, transformation-specific genes required for the uptake of eDNA (*comEC* and *dprA*) are widespread (see Fig. S1 in the supplemental material) (15; see also reference 16), suggesting that most bacterial species may undergo transformation in their natural habitat.

In spite of this ubiquity and that this mechanism has been documented for a long time (17), the evolutionary causes of transformation are complex to disentangle and are still debated. The proposals of the evolutionary function of transformation can be organized into four main categories (see Croucher et al. [18] for a review). First, transformation could be a means of importing eDNA as a nutrient. However, this proposal is questionable, because the competence machinery includes complex and costly mechanisms for the protection or selection of imported DNA (19, 20). Such mechanisms are essential for its successful integration into the genome, whereas they are unnecessary if the imported DNA exclusively serves as a nutrient (10). Second, imported DNA from transformation could be a raw material to repair double-stranded DNA (dsDNA) break. This hypothesis is mainly supported by the fact that the exposition to specific mutagens increases the transformation rate in some species. However, there are also numerous counterexamples of this bacterial response, which calls into question the generic nature of this proposal (18).

Third, the commonly emphasized evolutionary benefits of transformation are the genetic diversification and mixing within bacterial populations, and as a result, transformation is often considered analogous to eukaryotic sexual reproduction. Computational modeling approaches have shown that gene acquisition and genetic mixing from transformation can provide a selective advantage by allowing bacteria to combine favorable mutations (Fisher-Muller effect) (21, 22) and to efficiently exploit new or fluctuating environments (23). Under fluctuating selection of different alleles, transformable bacteria may also benefit from the acquisition of old alleles present in their environment to restore a fitter phenotype (24). In complement to these theoretical investigations, an increasing number of recent studies, in part fueled by the exponential growth of genome sequencing, show that through transformation, bacteria frequently acquire new functions carried by transposons, integrons, and genomic islands (25–28). Transformation enables the acquisition of antibiotic resistance by *Campylobacter jejuni* and capsule switching by *Streptococcus pneumoniae*, leading to vaccine escape (29–31). *Bacillus subtilis* presents a large accessory genome, a diversity seemingly generated by transformation, allowing this species to colonize various ecological niches, from soils and plants to animals (27). Overall, the eDNA obtained from transformation may provide habitat-specific genes and favors adaptation to new environments (32). Yet, genome-based evidences of the benefit of transformation are inherently biased, as they tend to highlight HGT events that result in the acquisition of genes providing clear selective advantage (e.g., antibiotic resistance).

Fourth, in opposition to the genetic diversification and mixing paradigm, Croucher et al. (18) recently proposed the radically distinct hypothesis that the main evolutionary function of transformation is to cure bacterial genomes of integrated genetic parasites, such as bacteriophages. Based on the observation that bacterial genomes are inevitably parasitized by mobile genetic elements (MGEs) (33, 34), they argue that transformation

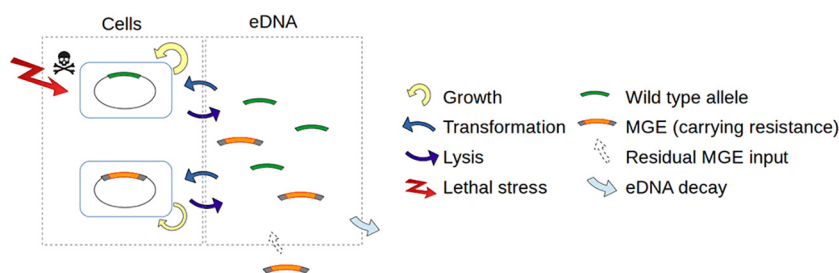


FIG 1 Schematic representation of the computational model. Bacterial cell growth follows a logistic growth model. The bacterial cells have an insertion site in their chromosome at which two types of alleles from the eDNA compartment can be integrated from transformation and replace their current DNA: wild-type (WT) allele and MGE. The integration of a WT allele is costless for cells, whereas the integration of MGEs causes a cost in terms of cell replication. Bacterial populations are faced with stochastic stresses of random duration and intensity. In the absence of stress, cells are lysed at a basal rate. Under stress exposure, the lysis rate of WT cells increases but remains unchanged for cells with an MGE carrying resistance. Each lysed cell releases its DNA and fuels the extracellular compartment with eDNA. MGEs are constantly added to the extracellular environment at a marginal rate (MGE input) simulating residual arrival from neighboring populations. The WT alleles and MGEs are degraded at a constant rate in the extracellular compartment.

favours the insertion of short DNA sequences from kin cells, thus tending to remove infesting DNA rather than acquire additional foreign DNA (18, 35). Following this “chromosomal curing” hypothesis (18), transformation would be mainly a defense mechanism against infectious genetic parasites rather than a mechanism to acquire new genes or generate genetic diversity and mixing, which would be marginal events. In favor of this proposal, several observations point out that cells are much more likely to undergo recombination with closely related neighbors than with distant lineages carrying foreign DNA (35, 36). Bacteria usually grow close to their siblings, and the emergent physical vicinity favors the exchange of DNA sequences between closely related genotypes. In addition, bacteria may regulate the competence state using quorum sensing, hence ensuring that a critical amount of kin cells are nearby (37). They may also select DNA with specific uptake sequences to avoid integrating exogenous DNA (20). In few cases, competent bacteria kill their own kin cells, enriching their surrounding with clonal DNA (38). Considering all the barriers to the acquisition of foreign DNA, transformation would mainly act as a conservative mechanism instead of a means of genetic diversification and mixing (36).

The third (genetic diversification) and fourth (chromosomal curing) sets of proposals for transformation function are both relevant and supported by solid empirical and simulated data, but they also seem antagonistic. In this theoretical work, we examine the possibility of unifying these two proposals within the same framework by considering the dynamics of MGEs and bacterial populations in fluctuating environments. Unlike the study by Croucher et al. (18), (i) we consider the frequent case of noninfectious MGEs (such as genomic islands) which can integrate into bacterial chromosomes and carry resistance genes but which are also costly for bacteria by reducing their growth capacity, and (ii) we take into account the fact that bacteria evolve in a stochastic environment characterized by unpredictable exposures to stress (e.g., antibiotics and heavy metals). Using a computational model introducing competition between bacterial genotypes with different transformation strategies (transformation rate), we assess whether an optimal transformation rate emerges from the dual function of acquiring then eliminating MGEs carrying resistance genes.

RESULTS

Transformable cells are competitive in stochastic environments. Based on the model summarized in Fig. 1 and detailed in Materials and Methods, we simulated competition between several bacterial genotypes differing in their transformation rates. Population dynamics were simulated in four distinct environments: one stress-free constant environment and three environments with stochastic stress exposure, differ-

entiated by stress frequency (see Fig. S2 in the supplemental material). Exposure to stress increases the lysis rate of susceptible cells, i.e., stresses are bactericidal, see Materials and Methods. In each tested environment, bacterial genotypes share the same eDNA pool resulting from bacterial dead cells and initially composed of wild-type (WT) alleles. A small amount of MGEs carrying a stress resistance gene were introduced to this pool. The transformable genotypes also compete with two control genotypes: a nontransformable genotype susceptible to stress (NTS) and a nontransformable resistant genotype (NTR) carrying a resistance gene that has the same cost in terms of cell replication as the MGE (see Materials and Methods).

In the stress-free environment, all genotypes can grow when they are alone (see Fig. S3). In the competition context, the NTR genotype becomes extinct, because carrying a resistance gene reduces growth rate, while all other genotypes have similar demographic performances and do not experience extinction regardless of their transformation rate (Fig. 2A and B). This is related to the fact that there is no transformation cost in these simulations (see Fig. S4 when a cost is introduced). MGEs carrying resistance are extremely marginal in the extracellular compartment (Fig. 2D); therefore, upon transformation, cells mostly integrate WT alleles into their genome and conserve their wild-type phenotype (Fig. 3A).

When bacterial cells are exposed to stress, even at a low frequency, the most efficient strategies that emerge are those with an intermediate transformation rate ($10^{-3} < \text{maximal transformation rate of a genotype } i [T_{\max,i}] < 10^{-2} \text{ t}^{-1}$), which have both a high abundance (no extinction) and a higher stochastic growth rate λ (i.e., geometric mean, see Materials and Methods) (Fig. 2A to C). The NTS genotype, which cannot acquire resistance genes, is disadvantaged and often goes extinct, whereas it could grow if it was alone, i.e., without competition with other genotypes (Fig. S3). The performance of genotypes with a very low transformation rate ($T_{\max,i} < 10^{-4} \text{ t}^{-1}$) is very similar to that of the NTS genotype even if the extinction probabilities of these genotypes are lower (Fig. 2A and B). Interestingly, and even without introducing a direct cost for transformation (in terms of replication or cell mortality), cells that transform at a very high rate ($T_{\max,i} > 10^{-2} \text{ t}^{-1}$) are also counterselected (Fig. 2A and B). These strategies induce very frequent changes in phenotype, including the detrimental transitions WT→resistant (MGE infected) between stresses and resistant (MGE infected)→WT during stresses (see Fig. S5).

Although the NTR genotype always performed well alone (Fig. S3), it was outcompeted in all environments except in a few simulations with high stress frequency ($2 \times 10^{-3} \text{ t}^{-1}$) (Fig. 2A). This result shows that continuously carrying the resistance gene may be beneficial if the environmental stress is frequently encountered. However, despite that in the most stressful environment the NTR genotype had the highest mean total cells at the end of the simulations, it actually suffered ~25% extinction, whereas the predominant transformable genotypes persisted in all simulations (Fig. 2B) and had a higher stochastic growth rate (λ) than NTR genotypes (Fig. 2C). The observation that the intermediate transformable genotypes outcompete the NTR genotype suggests that transformation gives a fitness advantage in stochastic environments by removing MGEs, which is costly for replication, during the periods without stress.

However, transformation is inherently risky. Transformation may lead to the acquisition of toxic and highly detrimental genes and the generation of recombination intermediates that can jeopardize chromosome integrity (39, 40). To account for such a transformation cost, we implemented a probability of cell lysis during transformation events. By including this cost (up to 10% risk of lysis during transformation), genotypes with high transformation rates were greatly impaired while strategies with intermediate transformation rates ($10^{-3} < T_{\max,i} < 10^{-2} \text{ t}^{-1}$) remained optimal, even if the optimum shifted toward the lower transformation rates (see Fig. S4A and B).

The competence of the cells for transformation is often regulated either by an abiotic environment (e.g., stress) or bacterial density. To explore the influence of competence regulation on the optimal transformation rate, we implemented two commonly occurring triggers of competence: stress exposure and biomass (see Mate-

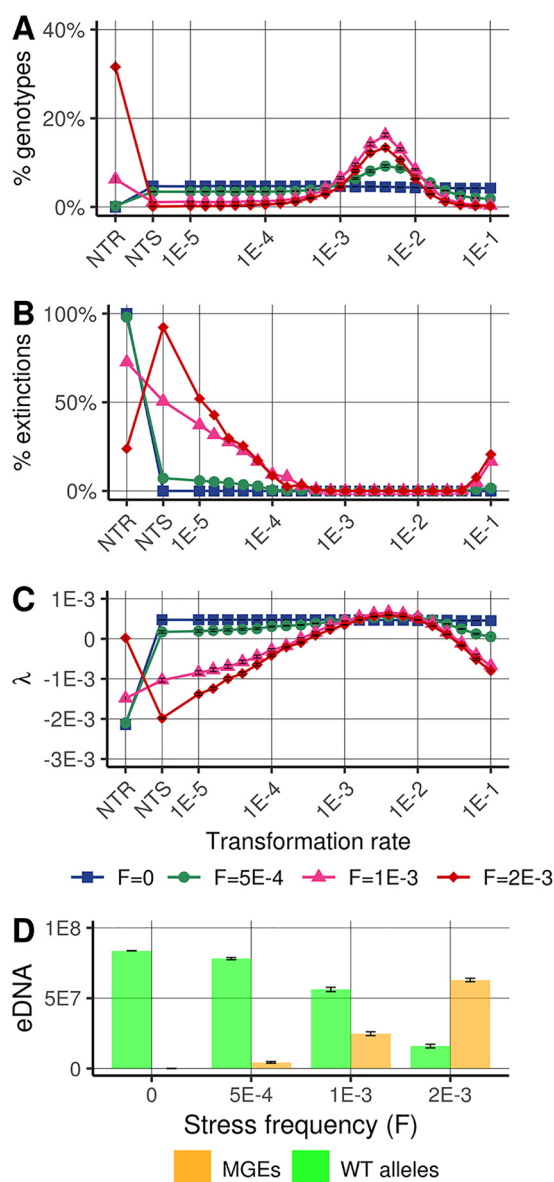


FIG 2 Relative success of genotypes according to their transformation strategies. (A) Proportions of the competing genotypes at $t = 5,000$: nontransformable resistant (NTR), nontransformable susceptible (NTS), and 21 genotypes with transformation rates ranging from 10^{-5} to 10^{-1} per time unit (t^{-1}). (B) Proportions of extinction of the genotypes at $t = 5,000$, among the 500 simulations. (C) Stochastic growth rate, as proxy of the fitness of the genotypes in stochastic environments (see Materials and Methods). (D) Composition of the extracellular compartment at $t = 5,000$. Represented data are the means and standard errors calculated from 500 simulations. Population dynamics are simulated in four distinct environments: one stress-free constant environment ($F = 0$) and three environments with stochastic stress exposure, differentiated by stress frequency of $F = 5 \times 10^{-4}$, $F = 10^{-3}$, and $F = 2 \times 10^{-3} t^{-1}$ (see Fig. S2 in the supplemental material).

rials and Methods). In the stress trigger scenario, i.e., when competence is induced by stress exposure, the optimal transformation rate increased (Fig. S4C and D). In the biomass trigger scenario, i.e., when competence is favored at high bacterial densities, genotypes with high transformation rates performed better than under a constitutive competence scenario, but the optimal genotype remained unchanged (Fig. S4C and D). To further investigate the stability of the evolutionary strategy of transformable genotypes, we tested the ability of the different genotypes (which emerge by mutation) to invade a population that initially included only the NTS genotype (see Materials and Methods). The results show that the most efficient genotypes remain those with an

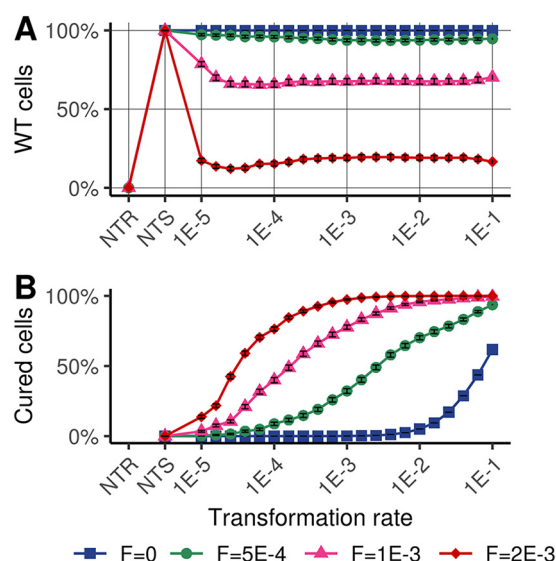


FIG 3 Maintenance of wild-type alleles in transformable genotypes. (A) Percentages of wild-type (WT) cells at the end of the simulations for each genotype. Extinct genotypes are not accounted for the calculus. (B) Percentages of WT cells from cure, i.e., WT cells with past MGE integration.

intermediate transformation rate, even if their invasion requires a longer simulation time (Fig. S4E and F).

In the literature, the fitness cost induced by MGEs is very variable (e.g., MGEs with antibiotic resistance genes [41]). In our simulations, when the cost of MGEs was modified, the eDNA composition of the extracellular compartment varied greatly, but the distribution of transformable genotypes remained qualitatively unchanged (see Fig. S6A and B). Moreover, the variation in the input of MGEs or in the rate of degradation of eDNA does not qualitatively change the results (Fig. S6E and F and S7A and B) or the specific accentuated degradation of extracellular MGEs (up to 10 times the one of WT alleles) (Fig. S6C and D). Finally, the optimal intermediate transformable genotypes remained stable when we increased the mean intensity or mean duration of the stresses or if the stress is bacteriostatic and not bactericidal (i.e., if stress exposure reduces the replication rate of susceptible cells instead of increasing cell lysis; see Materials and Methods) (see Fig. S8). Overall, the results point out that intermediate transformation rates are extremely efficient strategies for buffering environmental stochasticity in many ecological contexts.

The competitiveness of transformable cells relies on the reversible integration of MGEs. To examine the importance of chromosomal curing in the success of genotypes with intermediate transformation rates (Fig. 2A to C) (transformation rates $10^{-3} < T_{\max,i} < 10^{-2} t^{-1}$), we determined the phenotypic composition (proportion of WT cells and cells infected by MGEs) for the different genotypes (Fig. 3A) as well as the proportion of WT cells from parent cells that previously had an MGE in their genome (WT cells from cure) (Fig. 3B). The proportions of WT cells were similar in all transformable genotypes despite genotypes being represented in various proportions (Fig. 2A). The proportion of WT cells, however, decreased as the stress frequency increased. By determining the origin of WT cells in stochastic stressful environments, we found that most of them originated from genome cure for the predominant genotypes (Fig. 3B) (transformation rates between 10^{-3} and $10^{-2} t^{-1}$). The proportion of WT cells from cure increases with the frequency of stress exposure (Fig. 3B).

These results show that transformation, performed at an intermediate rate, is a powerful mechanism for regenerating the WT genotype in stochastic environments. From the analysis of transformation events performed by the dominant genotype ($T_{\max,i} = 10^{-2.4} t^{-1}$), we find that the switch of phenotypes (WT→resistant or resistant→WT) occurs mainly when the genotype faces intermediate numbers of stresses

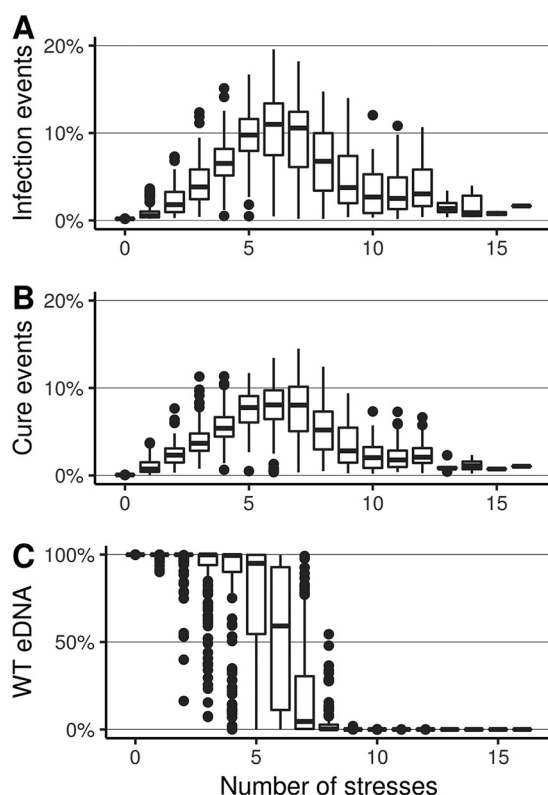


FIG 4 Types of transformation events (infection or cure) for the predominant genotype (with transformation rate $10^{-2.4} t^{-1}$). (A) Box plot of the percentages of cure events (MGE infected cell $\rightarrow$ WT cell) among all transformation events depending on the number of stresses. (B) Box plot of the percentage events of infection by MGE (WT cell $\rightarrow$ MGE infected cell) among all transformation events depending on the number of stresses. Results group simulations with all stress frequencies. (C) Composition of the extracellular compartment at $t = 5,000$ (box plot of the percentage of WT alleles).

during simulations (~ 4 to 7 stresses for 5,000 time units) (Fig. 4A and B), which also corresponds to a greater eDNA diversity in the extracellular compartment (Fig. 4C). With extreme number of stresses, the environment is either very little disturbed or, conversely, frequently disturbed, and the great majority of transformation events are neutral since they replace the DNA of the cells with another identical DNA (Fig. 4).

DISCUSSION

While transformation is often considered a mechanism sustaining bacterial genetic diversification and mixing, recent investigations suggest that its primary function would be to cure bacterial genomes of their infectious parasitic genetic elements (18, 35). We show that when bacteria face a fluctuating environment containing temporarily beneficial MGEs (costly MGEs for bacterial growth but carrying stress resistance genes), these two points of view can be unified in a common framework. In our simulations, genotypes with an intermediate transformation rate, when competing with other genotypes, have a large selective advantage in fluctuating environments (stochastic stress exposure) by maximizing the probability of genotype persistence and their stochastic growth rate (Fig. 2B and C). In our simulations, these intermediate transformation rates favor the random acquisition of extracellular MGEs carrying resistance genes, which allows genotypes to continue to grow during periods of environmental stress. Furthermore, these same transformation strategies allow MGE removal (genome cure) after each stress episode and thus the reconstitution of the initial genome, which is beneficial because maintaining MGEs is costly in terms of replication for host cells (42). Overall, our results suggest that intermediate transformation rates, by generating reversible integration of MGEs, stabilize over the long term the genotypes and genomes of bacteria that evolve in a stochastic environment.

Bacterial populations often face variable environments and are exposed to a wide variety of unpredictable stresses (e.g., heavy metals and antibiotics). The most widely proposed adaptation mechanisms to deal with them correspond to the diversified bet hedging—stochastic switching between phenotypic states (43–46)—corresponding to a risk-spreading strategy that facilitates genotype invasion and persistence in the face of unpredictable fluctuating environmental conditions (47). The most common example corresponds to the production of both reproductive individuals (replicative cells in bacteria) and individuals that remain in a dormant state for a more or less prolonged period of time (or “persister” cells in bacteria) (48, 49). Similarly, transformation can be seen as a risk-spreading strategy by randomly producing new phenotypes from MGE integration, then reconstituting the initial genotype by MGE removal. Interestingly, this strategy would enable coping with a wide variety of stresses (by successively integrating and removing different MGEs) while maintaining active (replicative) cells during and between periods of stress. In this sense, transformation could be one of the most efficient risk-spreading strategies in a stochastic environment, which could explain its ubiquity in the bacterial phylum (see Fig. S1 in the supplemental material).

We aimed to simulate transformation rates with orders of magnitude coherent with empirical observations (50). However, empirical estimation of the transformation rates in the laboratory is scarce—and almost impossible in the field—because (i) the state of competence in bacteria is often dependent on environmental conditions with differing triggering factors between strains (37, 51), (ii) the estimation of the transformation rate does not account for transformation events replacing DNA with an identical allele, which is the majority of the transformation events in our simulations (Fig. 4), and (iii) the transformation rate depends on the characteristics of the imported DNA, such as its size but also the capacity of few MGEs to inhibit transformation once acquired (51). Because of these limitations, in our study, we considered a wide range of transformation rates, and we show that, when in competition, genotypes with transformation rates too low or too high should be counterselected because they generate too little or too much phenotypic change, often leading to the formation of phenotypes that are not adequate for environmental conditions (cells with MGE in stress-free period or WT cells during exposure to stress) (Fig. S5). Thus, the wording “intermediate transformation rate” used in the manuscript is likely to be applicable to natural populations, but an extensive meta-analysis or experimental screening of natural isolates would be necessary to know the distribution of transformation rates in natural environments and to confirm this inference. However, it is already known that mutants displaying phenotypes of elevated transformability are easily isolated in transformable species under laboratory conditions (52–56). Such a hypertransformable phenotype is due to mutations causing upregulation of the transformation system or alteration of components of the competence machinery. Interestingly, these hypertransformable phenotypes are not common in natural isolates, suggesting that they can arise but are quickly counterselected. Our prediction is also consistent with the fact that in many transformable species, only a fraction of cells of the same genotype are in the state of competence and are likely to transform at the same time, even if all cells are under controlled laboratory conditions favorable for transformation (8, 57–59). This heterogeneity in competence states, which would correspond to the intermediate transformation rates in our model, should greatly contribute to the spreading of risks in a stochastic environment.

While our model aims to be generalist, it is difficult to determine the extent to which the optimal transformation rate found is specific to strain-environment-MGE combinations. However, the sensitivity analysis carried out shows that the optimal intermediate transformation rate is robust in the large range of parameters tested (Fig. S6 to 8), including when rare transformable mutants have to invade a nontransformable population (Fig. S4E and F). When competence is triggered by high cell density, the optimal transformation rate remains unchanged even if genotypes with a high transformation rate have a higher fitness than when the competence is constitutively expressed (Fig. S4C and D). When competence is triggered by stress exposure, the optimal

transformation rate increases. In this latter situation, cells are rarely in a state of competence (exposure to stress being rare), and when cells are exposed to stress, high transformation rates would confer a selective advantage by increasing the chances of capturing MGEs carrying resistance genes (which are relatively rare in the extracellular environment at the beginning of stress exposure).

According to our proposal, the extracellular compartment would constitute a reservoir of MGEs, providing bacteria with a “communal gene pool” (60), which should be highly fluctuating in its composition. In our model, we introduced MGEs at an extremely low rate, simulating the residual intake of MGEs from other nearby bacterial populations. The proportion of these MGEs remains extremely low when stress is rare or absent (Fig. 2D), while they can become extremely abundant in the extracellular compartment when stress exposure becomes frequent (Fig. 2D). Moreover, the spatial distribution of eDNA could be heterogeneous, and transformation rates may themselves fluctuate spatially within the same population (e.g., in or out of biofilms [61]). Cells close to the spatial boundaries of an isogenic population could tend to acquire more foreign DNA and cells in the center more kin DNA, making subpopulations more subject to MGE acquisition or removal and subject to variable transformation triggers. Our work then encourages empirical analysis of the spatiotemporal dynamics of the extracellular compartment whose composition should depend on the regime of environmental fluctuations (intensity, duration, and frequency of exposure to stress) but also on the connectivity between bacterial populations and the degree of persistence of MGEs or wild alleles according to their characteristic (e.g., their size). With the advent of methods to study bacteria-MGE interactions in complex microbiota (62, 63), contrasting antibiotic treatments could be an ideal experimental design to explore the dynamics of this extracellular reservoir and its consequences on the spread of resistance genes. For example, permanent antibiotic treatment could enrich the extracellular compartment with MGEs to such an extent that bacteria can no longer cure their genome through transformation. This point of view sheds new light on our understanding of (and fight against) the spread of antibiotic resistance in hospitals and potentially paves the way to new strategies for fighting antimicrobial resistance.

Independently of the transient acquisition of MGEs carrying resistance genes, there are undoubtedly empirical facts in favor of the perennial acquisition of new genes from different species by natural transformation (64, 65). We propose that such perennial integration should be the result of rare and “accidental” transformation events leading to the formation of new bacterial strains potentially in competition with the parent strain. This process should involve coevolution mechanisms such as compensatory mutations to improve the stability of the MGE-host couple long term (66). Therefore, one of the main evolutionary causes of transformation should be to generate reversible integration of MGE to buffer environmental stochasticity, while the perennial acquisition of new genes should be a by-product of transformation (or an exaptation) only exceptionally occurring, when bacteria face new but lasting environmental conditions. These accidental transfers would, however, play a key role in the diversification of bacterial lines and would be of the same order as horizontal transfers observed in eukaryotes, which are rare but have a profound impact on their evolution (67, 68).

Contrary to our proposal, the “chromosomal curing” hypothesis focuses on the removal of infectious MGEs, which parasitize bacterial genomes (18). This point of view is particularly relevant in the case of high selective pressure driven by infectious phages. However, the chromosomal curing hypothesis alone cannot explain the frequent observations of accumulation of resistance genes in MGEs transferable by transformation, such as resistance islands which can be very numerous and diversified (42, 69). Here, we propose that bacteria, through transformation, actively exploit specific categories of MGEs, such as transposons, integrons, gene cassettes, and genomic islands, that can be very variable in their composition in resistance genes and can be integrated transiently into the bacterial genome. However, further investigations will be needed to study the interactions between the different evolutionary functions of transformation by considering both fluctuating stress exposure and various

classes of MGEs, such as infectious phages, integrative MGEs carrying stress resistance genes, or conjugative elements.

In conclusion, in this work, we point out that transformation, which is a widespread trait, allows the transient acquisition of MGEs carrying stress resistance genes, which increases bacterial fitness under stochastic stress exposure. Because many bacterial species are probably frequently exposed to such fluctuating environments, this function could be often operational. However, it must be evaluated both empirically and theoretically in different ecological contexts and in interaction with the other functions already proposed. Here, our work is focused on natural transformation, which is the most common mechanism of HGT capable of generating chromosomal gene replacement. Yet, our conclusion may also apply to any other mechanism which promotes large chromosomal recombination events between individuals of bacterial populations. Namely, it may also explain the presence of the “distributive conjugal transfer” in one of the rare family of bacteria, the *Mycobacteriaceae*, which lack *ComEC* and the transformation system (70). Understanding the evolution of bacterial populations and communities in a fluctuating environment will also require addressing the coevolution of bacteria and MGEs by considering a possible alternation of genetic conflicts and cooperation between them. This perspective could help understand and prevent the spread of antibiotic resistance in bacterial populations and communities.

MATERIALS AND METHODS

We developed a stochastic computational model which includes two types of compartments: bacterial cells and extracellular DNA (eDNA), similarly to previous models (18). The overall structure of the model is displayed in Fig. 1. Bacterial cells have an insertion site in their chromosome which can be occupied by two DNA types: a wild type (WT) allele and a costly MGE conferring stress resistance. In the population, 23 genotypes (i) compete with each other, among which 21 genotypes (i) differ in their maximal transformation rates ($T_{\max,i}$). We also introduced two control nontransforming genotypes, one with the WT allele and one with the stress resistance allele, named NTS and NTR, respectively. The NTR genotype is initialized with cells carrying the stress resistance allele and its associated cost. The transformable and the NTS genotypes are initialized with WT cells only, i.e., cells carrying the WT allele. Genotypes, according to their transformation strategy, are equally distributed at the beginning of the simulations, with an initial population size $N_0 = K/10$ cells, with K the carrying capacity. Bacterial growth follows a logistic growth model, with a carrying capacity $K = 10^7$ cells (i.e., the maximum number of cells that the habitat can support). The number of replicating cells per genotype i with allele j and per time step dt , $G_{i,j,t+1}$, is determined using a binomial distribution:

$$G_{i,j,t+1} \sim \text{Bin}(\mu_{j,t} dt, N_{i,j,t}) \quad (1)$$

$$\mu_{j,t} = \left(\mu_{\max} - \frac{\mu_{\max} - k_b}{K} N_{\text{tot},t} \right) * (1 - c_j) \quad (2)$$

$N_{i,j,t}$ is the number of cells with the genotype i carrying the DNA type j at time t . $\mu_{j,t}$ is the replication rate of cells with the DNA type j at time t . $\mu_{\max}$ is the maximal growth rate. k_b is the constant basal lysis rate, independent of the presence of stress. $N_{\text{tot},t}$ is the total number of cells in the population (considering all genotypes) at time t , and c_j is the cost induced by the DNA type j on the replication of cells ($c_{\text{WT}} = 0$ and $c_{\text{MGE}} > 0$). The number of lysed cells per time step $L_{i,j,t+1}$ is calculated using a binomial distribution:

$$L_{i,j,t+1} \sim \text{Bin}(k_{j,t} dt, N_{i,j,t}) \quad (3)$$

$$k_{j,t} = k_b + I_{S,t} * (1 - r_j) \quad (4)$$

$k_{j,t}$ is the lysis rate of cells with the DNA type j at time t . $I_{S,t}$ is the intensity of the stress at time t . r_j is the stress resistance provided by the allele j . Stresses increase the lysis rate of cells carrying a wild-type allele, whereas the lysis rate of cells carrying an MGE remains at the basal rate k_b ($r_{\text{WT}} = 0$ and $r_{\text{MGE}} = 1$). The number of competent cells undergoing a transformation event during a time step $C_{i,j,t+1}$ is determined using a binomial distribution:

$$C_{i,j,t+1} \sim \text{Bin}(T_{i,t} dt, N_{i,j,t}) \quad (5)$$

$$T_{i,t} = T_{\max,i} * \left(\frac{\alpha A_{\text{tot},t}}{1 + \alpha A_{\text{tot},t}} \right) \quad (6)$$

$T_{i,t}$ is the transformation rate at time t . $T_{\max,i}$ is the maximal transformation rate of the genotype i and is the only parameter differentiating the 21 transformable genotypes. α is the binding rate between cells and eDNA. $A_{\text{tot},t}$ is the total number of eDNA at time t . The probability of a cell to take up a particular type of eDNA is proportional to the DNA composition of the extracellular compartment. Cells undergoing a transformation event change their genotype accordingly to the DNA type integrated. The overall variation of a genotype i containing a DNA type j (WT or MGE) during a time step is summarized by:

$$N_{i,j,t+1} = N_{i,j,t} + G_{i,j,t+1} - L_{i,j,t+1} - C_{i,j,t+1}^{j \rightarrow j} + C_{i,j,t+1}^{j \rightarrow j} \quad (7)$$

TABLE 1 Default parameters used

Symbol	Default value	Unit	Description
N_0	10^6	Cells	Initial number of wild type cells (split between genotypes)
$\mu_{\max}$	0.3	t^{-1}	Maximal growth rate
k_b	0.2	t^{-1}	Basal lysis rate
K	10^7	Cells	Carrying capacity of the environment
c_{WT}	0	%	Fitness cost of WT alleles
c_{MGE}	5	%	Fitness cost of MGEs (growth rate reduction)
r_{WT}	0	%	Resistance carried by WT alleles
r_{MGE}	100	%	Resistance carried by MGEs
$T_{\max,i}$	Specified	t^{-1}	Maximal transformation rate of a genotype i
α	4×10^{-5}	t^{-1}	Binding rate cell/eDNA
c_{trans}	0	NA ^a	Transformation cost (lysis probability per transformation events)
F_{stress}	Specified	t^{-1}	Stress frequency
l_{mean}	0.5	t^{-1}	Mean stress intensity (death rate increase)
l_{SD}	0.05	t^{-1}	Standard deviation stress intensity
d_{mean}	100	t	Mean stress duration
d_{SD}	10	t	Standard deviation stress duration
R_{WT}	0.15	t^{-1}	Decay rate of the extracellular wild type alleles
R_{MGE}	0.15	t^{-1}	Decay rate of the extracellular MGEs
$M_{\text{input},WT}$	0	Molecule· t^{-1}	Input of WT alleles in the extracellular compartment
$M_{\text{input},MGE}$	10^3	Molecule· t^{-1}	Input of MGEs in the extracellular compartment
P_{mut}	0	Replication $^{-1}$	Probability to switch genotype during cell replication
t_f	5,000	t	Duration of one simulation
dt	0.01	t	Time step

^aNA, not applicable.

In the extracellular compartment, eDNA is degraded at a constant rate R_j . The number of degraded eDNA molecules per time step $D_{j,t+1}$ is determined using a binomial distribution:

$$D_{j,t+1} \sim \text{Bin}(R_j dt, A_{j,t}) \quad (8)$$

$A_{j,t}$ is the number of eDNAs of type j . The extracellular compartment is alimented by eDNA from lysed cells, each lysed cell releasing a DNA molecule corresponding to its DNA. In addition, eDNA is added at a constant rate to the extracellular compartment (open system). The number of eDNA molecules j added per time step M_j is defined by:

$$M_j = M_{\text{input},j} * dt \quad (9)$$

$M_{\text{input},j}$ is the number of molecules of eDNA of type j added per time unit. Only MGEs are added this way in the extracellular compartment ($M_{\text{input},WT} = 0$). $M_{\text{input},MGE}$ is set to be residual, that is, orders of magnitude lower than the DNA released by cell lysis. The overall variation of a DNA of type j in the extracellular compartment during a time step is summarized by:

$$A_{j,t+1} = A_{j,t} - D_{j,t+1} + M_{\text{input},j} + \sum_{i=1}^n [L_{i,j,t+1} + C_{i,j,t+1}^{j \rightarrow i} - C_{i,j,t+1}^{i \rightarrow j}] \quad (10)$$

Bacteria are exposed to random stresses affecting the lysis rate of WT cells and occurring with a frequency F_{stress} . The probability of a stress to start during a time step is $F_{\text{stress}} \times dt$. When a stress starts, another one cannot begin before the first one ended. The duration d_s and intensity l_s of each stress are randomly drawn from a normal distribution with the means and standard deviations d_{mean} , d_{SD} , l_{mean} , and l_{SD} . To estimate the efficiency of a genotype in fluctuating environments, we calculate its stochastic growth rate λ as the logarithm of the geometric mean:

$$\lambda = \frac{1}{t_f} * \ln \left(\frac{N_{f,i} + 1}{N_{0,i}} \right) \quad (11)$$

with t_f as the simulation time, $N_{f,i}$ as the final number of cells of the genotype i , and $N_{0,i}$ as the initial number of cells of the genotype i .

The summary of the parameters used is presented in Table 1. The order of magnitude of the parameters corresponds to that from previous computational models of transformation (18, 24). The transformation rates of the genotypes in our simulated bacterial community ranged from $10^{-5} t^{-1}$ to $10^{-1} t^{-1}$, which is in the range of previous models. With the basal lysis rate $k_b = 0.2 t^{-1}$ and the simulation time $t_f = 5,000t$, approximately 1,000 cell generations are produced per simulation in antibiotic-free environments. The system does not reach equilibrium with $t_f = 5,000t$, but increasing simulation time only mildly influences simulation outcomes (see Fig. S7E and F in the supplemental material). The carrying capacity K is set to 10^7 cells, but diminishing K could increase the selection pressure on genotypes and increasing K could reduce selection pressure, i.e., the distribution of genotypes could be more narrow or wide but remains qualitatively similar (Fig. S7C and D). The mean stress intensity used ($l_{\text{mean}} = 0.5 t^{-1}$) significantly increases the death rate above the maximal growth rate ($k_b + l_{\text{mean}} \gg \mu_{\max}$), characteristic of lethal stresses such as bactericidal antibiotic concentrations. In addition, we considered a scenario where the antibiotic is bacteriostatic (Fig. S8E and F). In this case,

the lysis rate $k_{j,t}$ remains constant ($k_{j,t} = k_b$), but the growth rate of susceptible cells $\mu_{WT,t}$ is reduced by a factor $(1 - G_{inh})$ during stress exposure.

We also considered two scenarios with regulated transformation, transformation triggered by stress or by biomass (Fig. S4C and D). In the stress trigger scenario, the transformation rate $T_{i,t}$ is weighted by the factor $I_{S,t}/I_{mean}$, i.e., transformation is activated during stresses:

$$T_{i,t} = T_{max,i} * \left(\frac{\alpha A_{tot,t}}{1 + \alpha A_{tot,t}} \right) * \frac{I_{S,t}}{I_{mean}} \quad (12)$$

In the biomass trigger scenario, the transformation rate $T_{i,t}$ is weighted by the factor $N_{tot,t}/K$, i.e., transformation is reduced during stresses if the cell population collapses:

$$T_{i,t} = T_{max,i} * \left(\frac{\alpha A_{tot,t}}{1 + \alpha A_{tot,t}} \right) * \frac{N_{tot,t}}{K} \quad (13)$$

Finally, we considered an evolutionary scenario to test the invasiveness of the different genotypes which emerge by mutation in a population initially composed exclusively of the NTS genotype (Fig. S4E and F). With this "mutation scenario," simulations are initialized with only NTS cells, and each cell has a probability P_{mut} at each replication to randomly switch to one of the 22 other genotypes. The number of genotype switches $S_{i,j,t+1}$ depends on the number of replicating cells in the same time step $G_{i,j,t+1}$ and the mutation probability P_{mut} :

$$S_{i,j,t+1} \sim \text{Bin}(P_{mut}, G_{i,j,t+1}) \quad (14)$$

Muted cells are moved from the genotype i to another, which modifies equation 7 accordingly. Genotypes conserve their DNA type j upon switching; consequently, the NTR and NTS genotypes cannot switch between each other but can emerge from transformable genotypes.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material is available online only.

FIG S1, PDF file, 0.1 MB.

FIG S2, PDF file, 0.1 MB.

FIG S3, PDF file, 0.1 MB.

FIG S4, PDF file, 0.3 MB.

FIG S5, PDF file, 0.2 MB.

FIG S6, PDF file, 0.3 MB.

FIG S7, PDF file, 0.3 MB.

FIG S8, PDF file, 0.3 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Vincent Miele for his computer programming advice.

This work was supported by the LabEx ECOFECT (ANR-11-LABX-0048) of Université de Lyon, the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), and the Université de Lyon 1. Simulations were performed using the computing cluster CC LBBE/PRABI.

S.V. and X.C. conceived and led the study. S.V., X.C., G.C., D.F., and G.D. designed the model. G.C. and G.D. implemented the model. G.C. managed the simulation program. G.C., S.V., and X.C. wrote the manuscript. All authors gave fruitful comments during the research process and revised the manuscript.

We declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Soucy SM, Huang J, Gogarten JP. 2015. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat Rev Genet* 16:472–482. <https://doi.org/10.1038/nrg3962>.
2. Gogarten JP, Townsend JP. 2005. Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution. *Nat Rev Microbiol* 3:679–687. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1204>.
3. Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature* 405:299–304. <https://doi.org/10.1038/35012500>.
4. Von Wintersdorff CJH, Penders J, Van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, Van Alphen LB. 2016. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front Microbiol* 7:173. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00173>.
5. Hall JPJ, Brockhurst MA, Harrison E. 2017. Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 372:20160424. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0424>.
6. Arber W. 2014. Horizontal gene transfer among bacteria and its role in biological evolution. *Life (Basel)* 4:217–224. <https://doi.org/10.3390/life4020217>.
7. García-Aljaro C, Ballesté E, Muniesa M. 2017. Beyond the canonical strategies of horizontal gene transfer in prokaryotes. *Curr Opin Microbiol* 38:95–105. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.04.011>.
8. Johnston C, Martin B, Fichant G, Polard P, Claverys JP. 2014. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nat Rev Microbiol* 12:181–196. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>.
9. Dubnau D, Blokesch M. 2019. Mechanisms of DNA uptake by naturally competent bacteria. *Annu Rev Genet* 53:217–237. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112618-043641>.
10. Blokesch M. 2016. Natural competence for transformation. *Curr Biol* 26:R1126–R1130. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.058>.
11. Attaiach L, Charpentier X. 2017. Silently transformable: the many ways

- bacteria conceal their built-in capacity of genetic exchange. *Curr Genet* 63:451–455. <https://doi.org/10.1007/s00294-016-0663-6>.
12. Johnsborg O, Eldholm V, Håvarstein LS. 2007. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Res Microbiol* 158:767–778. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.09.004>.
 13. Meibom K, Blokesch M, Dolganov N, Cheng-Yen W, Schoolnik G. 2005. Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science* 310:1824–1827. <https://doi.org/10.1126/science.1120096>.
 14. LaBrie SD, Dimond ZE, Harrison KS, Baid S, Wickstrum J, Suchland RJ, Hefty PS. 2019. Transposon mutagenesis in *Chlamydia trachomatis* identifies CT339 as a ComEC homolog important for DNA uptake and lateral gene transfer. *mBio* 10:e01343-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.01343-19>.
 15. Mendler K, Chen H, Parks DH, Lobb B, Hug LA, Doxey AC. 2019. AnnoTree: visualization and exploration of a functionally annotated microbial tree of life. *Nucleic Acids Res* 47:4442–4448. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz246>.
 16. Pimentel ZT, Zhang Y. 2018. Evolution of the natural transformation protein, ComEC, in bacteria. *Front Microbiol* 9:2980. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02980>.
 17. Griffith F. 1928. The significance of pneumococcal types. *J Hyg (Lond)* 27:113–159. <https://doi.org/10.1017/s0022172400031879>.
 18. Croucher NJ, Mostowy R, Wymant C, Turner P, Bentley SD, Fraser C. 2016. Horizontal DNA transfer mechanisms of bacteria as weapons of intragenomic conflict. *PLoS Biol* 14:e1002394. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002394>.
 19. Bergé M, Mortier-Barrière I, Martin B, Claverys JP. 2003. Transformation of *Streptococcus pneumoniae* relies on DprA- and RecA-dependent protection of incoming DNA single strands. *Mol Microbiol* 50:527–536. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03702.x>.
 20. Mell JC, Redfield RJ. 2014. Natural competence and the evolution of DNA uptake specificity. *J Bacteriol* 196:1471–1483. <https://doi.org/10.1128/JB.01293-13>.
 21. Takeuchi N, Kaneko K, Koonin EV. 2014. Horizontal gene transfer can rescue prokaryotes from Muller's ratchet: benefit of DNA from dead cells and population subdivision. *G3 (Bethesda)* 4:325–339. <https://doi.org/10.1534/g3.113.009845>.
 22. Moradigaravand D, Engelstädter J. 2013. The evolution of natural competence: disentangling costs and benefits of sex in bacteria. *Am Nat* 182:E112–E126. <https://doi.org/10.1086/671909>.
 23. Levin BR, Cornejo OE. 2009. The population and evolutionary dynamics of homologous gene recombination in bacteria. *PLoS Genet* 5:e1000601. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000601>.
 24. Engelstädter J, Moradigaravand D. 2014. Adaptation through genetic time travel? Fluctuating selection can drive the evolution of bacterial transformation. *Proc Biol Sci* 281:20132609. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2609>.
 25. Domingues S, Nielsen KM, da Silva GJ. 2012. Various pathways leading to the acquisition of antibiotic resistance by natural transformation. *Mob Genet Elements* 2:257–260. <https://doi.org/10.4161/mge.23089>.
 26. Blokesch M. 2017. In and out—contribution of natural transformation to the shuffling of large genomic regions. *Curr Opin Microbiol* 38:22–29. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.04.001>.
 27. Brito PH, Chevreux B, Serra CR, Schyns G, Henriques AO, Pereira-Leal JB. 2018. Genetic competence drives genome diversity in *Bacillus subtilis*. *Genome Biol Evol* 10:108–124. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx270>.
 28. Mostowy R, Croucher NJ, Hanage WP, Harris SR, Bentley S, Fraser C. 2014. Heterogeneity in the frequency and characteristics of homologous recombination in pneumococcal evolution. *PLoS Genet* 10:e1004300. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004300>.
 29. Johnston C, Campo N, Bergé MJ, Polard P, Claverys JP. 2014. *Streptococcus pneumoniae*, le transformiste. *Trends Microbiol* 22:113–119. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.002>.
 30. Croucher NJ, Harris SR, Fraser C, Quail MA, Burton J, van der Linden M, McGee L, von Gottberg A, Song JH, Ko KS, Pichon B, Baker S, Parry CM, Lamberts LM, Shahinas D, Pillai DR, Mitchell TJ, Dougan G, Tomasz A, Klugman KP, Parkhill J, Hanage WP, Bentley SD. 2011. Rapid pneumococcal evolution in response to clinical interventions. *Science* 331:430–434. <https://doi.org/10.1126/science.1198545>.
 31. Jeon B, Muraoka W, Sahin O, Zhang Q. 2008. Role of Cj1211 in natural transformation and transfer of antibiotic resistance determinants in *Campylobacter jejuni*. *Antimicrob Agents Chemother* 52:2699–2708. <https://doi.org/10.1128/AAC.01607-07>.
 32. Polz MF, Alm EJ, Hanage WP. 2013. Horizontal gene transfer and the evolution of bacterial and archaeal population structure. *Trends Genet* 29:170–175. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2012.12.006>.
 33. Iranzo J, Puigbo P, Lobkovsky AE, Wolf YI, Koonin EV. 2016. Inevitability of genetic parasites. *Genome Biol Evol* 8:2856–2869. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw193>.
 34. Koonin EV, Wolf YI, Katsnelson MI. 2017. Inevitability of the emergence and persistence of genetic parasites caused by evolutionary instability of parasite-free states. *Biol Direct* 12:1–12. <https://doi.org/10.1186/s13062-017-0202-5>.
 35. Apagyi KJ, Fraser C, Croucher NJ. 2018. Transformation asymmetry and the evolution of the bacterial accessory genome. *Mol Biol Evol* 35:575–581. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx309>.
 36. Ambur OH, Engelstädter J, Johnsen PJ, Miller EL, Rozen DE. 2016. Steady at the wheel: conservative sex and the benefits of bacterial transformation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 371:20150528. <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0528>.
 37. Seitz P, Blokesch M. 2013. Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 37:336–363. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00353.x>.
 38. Claverys JP, Martin B, Håvarstein LS. 2007. Competence-induced fratricide in streptococci. *Mol Microbiol* 64:1423–1433. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05757.x>.
 39. Hülter N, Sørum V, Borch-Pedersen K, Liljegen MM, Utnes ALG, Primicerio R, Harms K, Johnsen PJ. 2017. Costs and benefits of natural transformation in *Acinetobacter baylyi*. *BMC Microbiol* 17:34. <https://doi.org/10.1186/s12866-017-0953-2>.
 40. Johnston C, Caymaris S, Zomer A, Bootsma HJ, Prudhomme M, Granadel C, Hermans PWM, Polard P, Martin B, Claverys J-P. 2013. Natural genetic transformation generates a population of merodiploids in *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Genet* 9:e1003819. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003819>.
 41. Vogwill T, Maclean RC. 2015. The genetic basis of the fitness costs of antimicrobial resistance: a meta-analysis approach. *Evol Appl* 8:284–295. <https://doi.org/10.1111/eva.12202>.
 42. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev* 31:e00088-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>.
 43. Grimbergen AJ, Siebring J, Solopova A, Kuipers OP. 2015. Microbial bet-hedging: the power of being different. *Curr Opin Microbiol* 25:67–72. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.04.008>.
 44. Cohen D. 1966. Optimizing reproduction in a randomly varying environment. *J Theor Biol* 12:119–129. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90188-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90188-3).
 45. Seger J, Brockmann HJ. 1987. What is bet-hedging? *Oxford Surv Evol Biol* 4:182–211.
 46. Slatkin M. 1974. Hedging one's evolutionary bets. *Nature* 250:704–705. <https://doi.org/10.1038/250704b0>.
 47. Beaumont HJE, Gallie J, Kost C, Ferguson GC, Rainey PB. 2009. Experimental evolution of bet hedging. *Nature* 462:90–93. <https://doi.org/10.1038/nature08504>.
 48. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. 2017. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nat Rev Microbiol* 15:453–464. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>.
 49. Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. 2016. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science* 354:aaf4268. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4268>.
 50. Godeux A-S, Lupo A, Haenni M, Guette-Marquet S, Wilharm G, Laaberk M-H, Charpentier X. 2018. Fluorescence-based detection of natural transformation in drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol* 200:e00181-18. <https://doi.org/10.1128/JB.00181-18>.
 51. Durieux I, Ginevra C, Attiaeh L, Picq K, Juan P-A, Jarraud S, Charpentier X. 2019. Diverse conjugative elements silence natural transformation in *Legionella* species. *Proc Natl Acad Sci U S A* 116:18613–18618. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909374116>.
 52. Lacks SA, Greenberg B. 2001. Constitutive competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae* caused by mutation of a transmembrane histidine kinase. *Mol Microbiol* 42:1035–1045. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02697.x>.
 53. Sexton JA, Vogel JP. 2004. Regulation of hypercompetence in *Legionella pneumophila*. *J Bacteriol* 186:3814–3825. <https://doi.org/10.1128/JB.186.12.3814-3825.2004>.
 54. Ween O, Teigen S, Gaustad P, Kilian M, Håvarstein LS. 2002. Competence without a competence pheromone in a natural isolate of *Streptococcus*

- infantis*. J Bacteriol 184:3426–3432. <https://doi.org/10.1128/JB.184.13.3426-3432.2002>.
55. Kong L, Siranosian KJ, Grossman AD, Dubnau D. 1993. Sequence and properties of *mecA*, a negative regulator of genetic competence in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 9:365–373. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01697.x>.
 56. Ma C, Redfield RJ. 2000. Point mutations in a peptidoglycan biosynthesis gene cause competence induction in *Haemophilus influenzae*. J Bacteriol 182:3323–3330. <https://doi.org/10.1128/JB.182.12.3323-3330.2000>.
 57. Johnsen PJ, Dubnau D, Levin BR. 2009. Episodic selection and the maintenance of competence and natural transformation in *Bacillus subtilis*. Genetics 181:1521–1533. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.099523>.
 58. Fontaine L, Wahl A, Fléhard M, Mignolet J, Hols P. 2015. Regulation of competence for natural transformation in streptococci. Infect Genet Evol 33:343–360. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.09.010>.
 59. Maamar H, Dubnau D. 2005. Bistability in the *Bacillus subtilis* K-state (competence) system requires a positive feedback loop. Mol Microbiol 56:615–624. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04592.x>.
 60. Norman A, Hansen LH, Sørensen SJ. 2009. Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 364: 2275–2289. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0037>.
 61. Bae J, Oh E, Jeon B. 2014. Enhanced transmission of antibiotic resistance in *Campylobacter jejuni* biofilms by natural transformation. Antimicrob Agents Chemother 58:7573–7575. <https://doi.org/10.1128/AAC.04066-14>.
 62. Marbouty M, Baudry L, Cournac A, Koszul R. 2017. Scaffolding bacterial genomes and probing host-virus interactions in gut microbiome by proximity ligation (chromosome capture) assay. Sci Adv 3:e1602105. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1602105>.
 63. Beaulaurier J, Zhu S, Deikus G, Mogno I, Zhang X-S, Davis-Richardson A, Canepa R, Triplett EW, Faith JJ, Sebra R, Schadt EE, Fang G. 2018. Metagenomic binning and association of plasmids with bacterial host genomes using DNA methylation. Nat Biotechnol 36:61–69. <https://doi.org/10.1038/nbt.4037>.
 64. Straume D, Stamsås GA, Håvarstein LS. 2015. Natural transformation and genome evolution in *Streptococcus pneumoniae*. Infect Genet Evol 33: 371–380. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.10.020>.
 65. Dixit PD, Pang TY, Maslov S. 2017. Recombination-driven genome evolution and stability of bacterial species. Genetics 207:281–295. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.300061>.
 66. Björkman J, Andersson DI. 2000. The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. Drug Resist Updat 3:237–245. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0147>.
 67. Venner S, Miele V, Terzian C, Biémont C, Daubin V, Feschotte C, Pontier D. 2017. Ecological networks to unravel the routes to horizontal transposon transfers. PLoS Biol 15:e2001536. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2001536>.
 68. Schaack S, Gilbert C, Feschotte C. 2010. Promiscuous DNA: horizontal transfer of transposable elements and why it matters for eukaryotic evolution. Trends Ecol Evol 25:537–546. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.06.001>.
 69. Stokes HW, Gillings MR. 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. FEMS Microbiol Rev 35:790–819. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x>.
 70. Derbyshire KM, Gray TA. 2014. Distributive conjugal transfer: new insights into horizontal gene transfer and genetic exchange in mycobacteria. Microbiol Spectr 2:MGM2-0022-2013. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MGM2-0022-2013>.

Résumés

A human and animal nosocomial agent: study of the dynamics of antibiotic resistance gene transfer in *Acinetobacter*.

In recent decades, the intensive use of antibiotics by humans has led to the emergence of multidrug-resistant (MDR) pathogenic bacteria such as *Acinetobacter baumannii*, which is responsible for nosocomial infections. In most of MDR clinical strains of this bacteria, the presence of large genomic resistance islands (RI), including the well-known AbaR islands, is correlated with their resistance feature. The recent global dissemination of strains carrying the resistance island vector of a resistance gene to carbapenems, a class of last resort antibiotics, illustrates the ease of circulation and fixation of these islands in bacterial populations. This phenomenon greatly relies on horizontal gene transfer mechanisms occurring in the *Acinetobacter* genus, including natural transformation. However, our understanding of this phenomenon is still limited. The objective of this work is thus to bring new elements for the study of the dynamics of antimicrobial resistance circulation in *A. baumannii* with a focus on resistance islands.

We first develop experimental tools adapted to the study of MDR strains and isolates of *A. baumannii* with a selection-free method based on flow cytometry to detect transformation events in MDR clinical *A. baumannii* isolates and a versatile scarless genome editing strategy used to generate mutants cured from their RIs. Altogether our results show that regardless of their origin, most of the isolates displayed natural transformability, indicative of a conserved trait in the species, despite the insertion of a resistance islands in the *comM* gene involved in natural transformation.

Then, using an experimental condition that mimic a bacterial community, we show that natural transformation allows an effective and rapid transfer of the carbapenems resistance genetic determinants between different *Acinetobacter* spp. Genetic analyses of transformants showed that natural transformation fostered the acquisition of large DNA fragments containing mobile genetic elements such transposons or large RIs.

Finally, by combining empirical, ecological, and mathematical approaches, we explore the hypothesis that the fixation of RIs in *A. baumannii* populations is the result of a high selection pressure due to the continued use of antibiotics in hospital environments, and their interference with the intrinsic capacity of the bacterium to rid of these islands by recombination.

Altogether, these results pave the way for an in-depth understanding of the ecological and evolutionary role of natural transformation regarding the propagation of antibiotic resistance in transformable pathogenic bacteria such as *A. baumannii*.

Un agent nosocomial humain et animal : Etude de la dynamique du transfert de gènes de résistance aux antibiotiques chez *Acinetobacter*

Au cours des dernières décennies, l'utilisation intensive d'antibiotiques par l'homme a conduit à l'émergence de bactéries pathogènes multirésistantes (MDR) telles qu'*Acinetobacter baumannii*, responsable d'infections nosocomiales. Chez la plupart des souches cliniques MDR de cette bactérie, la présence de grands îlots de résistance (RI), dont les plus connus sont appelés îlots AbaR, est corrélée au caractère MDR. La récente dissémination mondiale de souches porteuses d'un îlot de résistance vecteur d'un gène de résistance aux carbapénèmes, une classe d'antibiotiques de dernier recours, illustre la rapidité de circulation et de fixation de ces îlots dans les populations bactériennes. Ce phénomène repose en grande partie sur les mécanismes de transfert horizontal de gènes se produisant chez les *Acinetobacter*, y compris la transformation naturelle. Cependant, notre compréhension de ce phénomène est encore limitée. L'objectif de ce travail est donc d'apporter de nouveaux éléments pour l'étude de la dynamique de la circulation de la résistance aux antimicrobiens chez *A. baumannii* avec un focus particulier sur les îlots de résistance.

Nous proposons tout d'abord des outils expérimentaux adaptés à l'étude des souches MDR d'*A. baumannii*, avec le développement d'une méthode sans sélection basée sur la cytométrie en flux permettant de détecter les événements de transformation chez les isolats cliniques MDR, ainsi qu'une stratégie d'édition du génome utilisée afin de générer des mutants délétés de leurs RI. Dans l'ensemble, nos résultats montrent que quelle que soit leur origine, la plupart des isolats sont capable de transformation naturelle, malgré l'insertion d'un îlot de résistance dans le gène *comM* impliqué dans la transformation naturelle.

Nous démontrons ensuite que la transformation naturelle permet un transfert efficace et rapide des déterminants génétiques de la résistance aux carbapénèmes entre différentes espèces pathogènes d'*Acinetobacter* en utilisant des conditions expérimentales imitant une communauté bactérienne. Les analyses génétiques des transformants démontrent que ces transferts favorisent l'acquisition de grands fragments d'ADN contenant des éléments génétiques mobiles tels que des transposons ou de grands RIs.

Enfin, en combinant des approches empiriques, écologiques et mathématiques, nous explorons l'hypothèse que la fixation des RI dans les populations d'*A. baumannii* est le résultat d'une pression de sélection due à l'utilisation d'antibiotiques en milieu hospitalier, et à l'interférence des RIs avec la capacité intrinsèque de la bactérie à réaliser la transformation.

Dans l'ensemble, ces travaux ouvrent la voie à une compréhension approfondie du rôle écologique et évolutif de la transformation naturelle dans la propagation de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries pathogènes transformables telles que *A. baumannii*.

