



Université Claude Bernard



DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **29 novembre 2021**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame REUTER Audrey**

Titre de la thèse : « *Etude de la conjugaison bactérienne d'un point de vue pratique et fondamental* »

Résumé



Les communautés microbiennes sont composées d'espèces bactériennes variées capables d'échanger des informations génétiques par transfert horizontal de gènes. Parmi ceux-là, la conjugaison bactérienne permet le transfert de larges fragments d'ADN, la plupart du temps des plasmides, entre une bactérie donneuse et une receveuse en contact direct. L'acquisition du plasmide et l'expression des gènes portés par celui-ci convertissent la receveuse en transconjugant. Le produit des gènes peut conférer un mode de vie symbiotique, des facteurs de virulence ou des résistances aux métaux lourds ainsi qu'aux antibiotiques. On estime que la conjugaison est responsable de 80% de l'acquisition de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries, lesquelles constituent un enjeu de santé publique majeur dans le monde entier. Dans ce contexte, deux objectifs majeurs sont de développer de nouvelles stratégies antibactériennes alternatives aux antibiotiques ainsi que de mieux comprendre le mécanisme fondamental de dissémination de la résistance par conjugaison.

L'équipe « transfert d'ADN de cellule à cellule » dans laquelle j'ai réalisé mon doctorat combine analyses microscopiques et microbiologiques à l'échelle de la cellule unique et populationnelle pour comprendre le processus et la dynamique de la conjugaison. Mon projet de thèse visait à explorer les aspects pratiques et fondamentaux de ce mécanisme.

J'ai tout d'abord développé une stratégie antibactérienne innovante basée sur des plasmides délivrés par conjugaison et portant des systèmes CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR associated protein). Le système CRISPR-Cas est capable de reconnaître et de cibler des séquences d'ADN spécifiques et d'introduire des cassures double-brin létales pour les bactéries. Nous avons donc créé des plasmides appelés TAPs (Targeted-Antibacterial-Plasmids) mobilisables par conjugaison, capables de tuer spécifiquement des bactéries au sein d'une population. Par des techniques de dénombrements, de cytométrie en flux et de microscopie à fluorescence j'ai pu montrer la capacité des TAPs à être transférés et à tuer spécifiquement la souche ciblée. Nous avons également montré que les TAPs pouvaient re-sensibiliser une population bactérienne à un antibiotique.

Outre cette application biotechnologique, j'ai également étudié la dynamique de la conjugaison bactérienne à l'échelle cellulaire, en utilisant comme modèle le plasmide F. J'ai exploré le timing d'expression des gènes plasmidiques une fois le plasmide transféré dans la bactérie receveuse ainsi que l'établissement de la résistance aux antibiotiques après l'acquisition du plasmide. Je me suis intéressée aux gènes se situant sur

la première partie du plasmide à entrer dans la receveuse, appelée « *leading region* ». J'ai pu montrer que contrairement aux autres gènes plasmidiques, ceux-ci sont exprimés transitoirement uniquement dans le transconjugant et non chez la donneuse. Ces premiers résultats ont suggéré une stratégie d'expression qui permettrait d'abord l'établissement du plasmide transféré, sa maintenance dans la nouvelle cellule hôte, puis finalement son transfert à une nouvelle bactérie receveuse.

J'ai également étudié l'acquisition de la résistance à la tétracycline conférée par le plasmide F portant un gène codant pour une pompe à efflux spécifique, TetA, qui permet d'effluer la tétracycline hors de la cellule. Grâce à l'utilisation de la microscopie à fluorescence, nous avons pu observer et analyser la dynamique de production de TetA et l'efflux de la tétracycline en temps réel. Notre étude montre que la résistance à la tétracycline dépend d'un équilibre entre la production de TetA et la capacité de la tétracycline à bloquer cette production. De plus, nous avons pu corrélérer l'augmentation de la quantité intracellulaire de TetA avec la capacité des cellules à résister à des concentrations croissantes de tétracycline.