DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **30 mars 2023**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame VIROLLE Chloé**

Titre de la thèse : *« Caractérisation de la protéine leading YfjB et étude de son importance pour l'établissement du plasmide F chez Escherichia coli lors de la conjugaison bactérienne »*

Résumé

L'incroyable capacité d'adaptation des bactéries face à leur environnement leur permet de coloniser diverses niches écologiques, allant des sols et eaux jusqu'aux tissus vivants et surfaces inertes. Il est désormais acquis que le transfert horizontal de gènes joue un rôle prépondérant dans la plasticité des génomes bactériens, permettant un bond évolutif associé à la dissémination rapide et efficace de nouveaux traits phénotypiques. La conjugaison bactérienne est ainsi un mécanisme de transfert horizontal de gènes d'intérêt majeur puisque responsable de 80% des disséminations de résistances aux antibiotiques acquises chez les bactéries. Étant le sujet de nombreuses recherches depuis la découverte du mécanisme en 1946, le plasmide F est désormais considéré comme un modèle pour l'étude de la conjugaison bactérienne. Parmi les différentes régions génétiques le composant, la région *leading* est définie comme étant la première à être transférée dans les cellules receveuses. Retrouvée conservée chez certains plasmides conjugatifs appartenant à divers groupes d'incompatibilité, il a été montré que cette région est exprimée de manière précoce lors de l'entrée du plasmide dans la receveuse. Bien que la plupart des gènes qui la composent soient de fonctions inconnues, il est proposé que la région *leading* joue un rôle majeur dans les étapes initiales d'établissement du plasmide dans la nouvelle cellule hôte.

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier le rôle de la région *leading* au cours de la conjugaison du plasmide F chez *Escherichia coli*, et plus précisément de caractériser le gène *yfjB*. La protéine YfjB partage une homologie avec les protéines de la famille ParB, notamment par la conservation d'un domaine de liaison à l'ADN. Afin de caractériser cette protéine *leading*, j'ai eu recours à une approche multidisciplinaire combinant la microbiologie classique, la microscopie à fluorescence en cellules vivantes, la génétique, les analyses omic ou encore la biochimie structurale. Les résultats obtenus permettent de mieux comprendre la dynamique de la protéine YfjB au niveau cellulaire, son activité moléculaire et son rôle dans l'établissement du plasmide F chez la bactérie receveuse. Mes travaux nous amènent alors à proposer un rôle de la protéine YfjB pour le bon déroulement des premières étapes de transfert du plasmide via une reprogrammation globale du profil d'expression génétique de la bactérie hôte. Cela irait dans le sens d'une stratégie développée par le plasmide F visant à limiter l'impact négatif de son acquisition sur la physiologie de la cellule receveuse, appuyant l'hypothèse d'une importance de la région *leading* pour l'établissement du plasmide.

Par ailleurs, j'ai pu participer à différents projets du laboratoire portant sur la dynamique intracellulaire de la conjugaison et son impact sur les populations bactériennes. Par utilisation de la microscopie à fluorescence en cellules vivantes, nous avons révélé une organisation spatio-temporelle précise des étapes clés de la conjugaison ainsi que la rapidité et l'efficacité de cette séquence d'évènements. En décrivant le profil et le timing d'expression des gènes plasmidiques dans la nouvelle cellule hôte, nous avons entre autres démontré l'importance de deux séquences de la région *leading* agissant comme promoteurs simples brins pour l'expression précoce et transitoire des gènes associés lors de l'entrée du plasmide dans la cellule receveuse. La conversion subséquente du plasmide en ADN double-brin abolit alors l'expression de la région *leading* et permet l'activation des promoteurs conventionnels qui contrôlent l'expression des autres gènes portés par le plasmide. Cette chronologie d'expression programmée des gènes plasmidiques permet la production des facteurs *leading* lors des premières étapes de transfert, puis des gènes impliqués dans le maintien du plasmide et finalement des machineries de conjugaison. L'utilisation de la microscopie à fluorescence nous a également permis d'analyser la dynamique de la mise en place de la résistance à la tétracycline conférée par un transposons Tn*10* porté par le plasmide F. Nous avons ainsi pu corréler la production de la pompe à efflux TetA avec la concentration intracellulaire de tétracycline en temps réel et en cellules vivantes. Notre étude démontre la mise en place d'une balance entre entrée et efflux de tétracycline dépendante de la concentration initiale de pompes à efflux spécifiques et généralistes codées par le chromosome et le plasmide, mais dépendant également de la concentration en tétracycline dans le milieu.

Bien que le transfert de gènes par conjugaison ait été extensivement étudié au cours des dernières décennies, les différents projets de recherche auxquels j'ai pu participer au cours de ma thèse apportent de nouvelles connaissances par diverses approches innovantes. En couvrant l'ensemble du mécanisme de conjugaison, nous proposons alors de nouveaux modèles intégrant les différents mécanismes moléculaires régissant la conjugaison dans le contexte de la cellule vivante.