

Faculté des sciences

Utilisation de la conjugaison bactérienne, associée à Crispr/Cas9 pour combattre les bactéries multi-résistantes

Auteur : Jaumain Roland

Promoteurs : M. Patrice Soumillion & M. Bernard Hallet

Lecteurs : M. René Reszohazy & M. Pascal Hols

Année académique 2019-2020

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du Master en sciences
biologiques

Table des matières

Remerciements.....	iv
Abstract.....	v
Résumé.....	vii
1. Introduction	1
1.1 La multi-résistance bactérienne aux antibiotiques.....	1
1.1.1 Situation actuelle.....	1
1.1.2 Origine et causes de la multi-résistance.....	2
1.1.3 Modes de transmission.....	3
1.1.4 Quelles solutions ?	4
1.2 La conjugaison bactérienne.....	6
1.2.1 Principe général.....	6
1.2.2 Structure génétique des plasmides	8
1.2.3 Plasmides conjugatifs autonomes.....	9
1.2.4 Plasmides conjugatifs mobilisables.....	10
1.3 Le système Crispr/Cas9	10
2. Objectifs et stratégies.....	12
3. Matériel et méthodes.....	14
3.1 Design et construction d'un plasmide conjugatif mobilisable.....	14
3.2 Sélection et vérification des bactéries recombinantes	16
3.3 Conjugaison bactérienne.....	17
3.4 Début de construction d'un plasmide conjugatif autonome	18
4. Résultats expérimentaux.....	20
4.1 Construction et vérification du plasmide de conjugaison	20
4.2 Test de conjugaison et vérification.....	21
4.3 Test visuel de l'efficacité Crispr sur le gène RFP plasmidique	23
4.4 Test de l'efficacité Crispr sur le gène AmpR plasmidique	24
4.5 Test de l'efficacité Crispr sur le gène AmpR chromosomique	25
4.6 Construction d'un plasmide autonome : 1ère partie	26
5 Discussion et perspectives.....	30
6 Conclusion.....	37
Bibliographie	38
Lexique & Index des figures	43
Annexes.....	44

Remerciements

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Messieurs les professeurs Patrice Soumillion et Bernard Hallet, du groupe de Biochimie et Génétique des Microorganismes pour m'avoir accordé leur confiance en m'acceptant au sein de leur laboratoire, pour leur présence ainsi que pour le temps qu'ils n'ont pas hésité à m'accorder en répondant à mes questions et en m'accompagnant dans mon travail lors de ce mémoire. Je les remercie pour leur patience et leur disponibilité.

Je remercie également les Professeurs René Reszohazy et Pascal Hols d'avoir accepté d'être lecteurs de ce mémoire ainsi que de m'avoir fourni leurs précieux conseils.

Je remercie Monsieur André Lejeune, conseiller aux études, pour son infinie patience, ses nombreux conseils et son suivi lors de mon parcours d'étudiant.

Je voudrais remercier également les membres de l'équipe du laboratoire BGM, pour leur accueil et leurs aides précieuses lors de mon mémoire. Je remercie en particulier les deux techniciens du laboratoire, Damien Evrard et Brigitte Delplace qui ont toujours été présents pour m'aider et pour répondre à mes questions.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à l'ensemble du personnel pédagogique de l'école de Biologie et plus spécialement à tous les professeurs responsables de la formation que j'ai suivi pour m'avoir transmis une partie de leurs connaissances et pour avoir enrichi mon capital humain pendant les formations théoriques et pratiques.

Je remercie finalement ma famille proche, mes amis et les rares collègues qui m'ont soutenu moralement durant ces années d'étude.

Abstract

The problem of multidrug-resistant bacteria is becoming a global emergency. Indeed, the WHO estimates that by 2050, there will be more deaths in the world due to these pathogenic bacteria than cancer-related deaths. The misuse of antibiotics for many years has led, among other things, to the appearance and development of multi-resistant bacteria. With the discovery of new antibiotics becoming increasingly rare, we risk returning to a pre-antibiotic era, where the slightest bacterial infection can be very dangerous to health.

The causes of the emergence of multi-resistance to antibiotics are multiple. They are mainly due to the overuse of antibiotics in modern medicine and in the food industry. This leads to an evolution of bacteria which, through mutation or DNA exchange, promotes the acquisition of genes conferring resistance to these antibiotics. Resistant bacteria then multiply and then become the majority, making the fight against infection very difficult. To make matters worse, when a bacterium has a gene for resistance to an antibiotic, it can transmit it to other bacteria of the same species or to different genera. This "horizontal" mode of transmission is mainly due to natural transformation, transduction via bacteriophages, or conjugation between bacteria.

Bacterial conjugation, one of the natural phenomena driving evolution, consists of a transfer of DNA - mainly via plasmids - between two bacteria in contact. Bacteria containing the genes necessary for conjugation initiate the machinery necessary for the formation of a pilus to establish contacts between the two bacteria, initiates the single-stranded cut of the conjugative plasmid which is then "pulled" to the recipient cell by a specialized secretion system. Once transferred, the plasmid is then synthesized as a double-stranded plasmid and the target bacterium then carries the same plasmid as the donor bacterium. In the end, this system allows an exchange of genetic material between bacteria, such as an antibiotic resistance genes.

The project related to this thesis consists in taking advantage of the conjugation mechanism to destroy bacterial antibiotic resistance genes. Indeed, the idea is to use a "donor" bacterium carrying a conjugation plasmid, itself containing a DNA "killing" system based on Crispr/Cas9 to target and destroy an antibiotic resistance gene in a target "recipient" bacterium.

In a first step, we will use the Crispr/Cas9 system in a minimum "mobilizable" type conjugation plasmid, i.e. a relatively small plasmid, the bulk of the conjugation machinery of which is contained in the genome of the host bacterium. In a second step, the idea will be to use the Crispr/Cas9 system in an autonomous conjugation plasmid in order to make the dissemination system much more efficient.

Our system has shown that Crispr/Cas9 works well with a mobilizable plasmid and has made it possible to cut an ampicillin resistance gene present either in a plasmid or in the chromosome of a recipient cell. The implementation of this system in a stand-alone plasmid is promising and, but still at an early stages. This system could perhaps, in the long term, complement the various solutions that are being put in place to combat bacterial multi-resistance.

Résumé

Le problème lié aux bactéries multi-résistantes aux antibiotiques devient une urgence à l'échelle mondiale. En effet, l'OMS estime que d'ici 2050, il y aura plus de décès dans le monde dus à ces bactéries pathogènes que de décès liés aux cancers. La mauvaise utilisation des antibiotiques depuis de nombreuses années a permis, entre autres, l'apparition et le développement de bactéries multi-résistantes. La découverte de nouveaux antibiotiques se faisant de plus en plus rare, nous risquons de revenir à une époque pré-antibiotique, où la moindre infection bactérienne risquait d'être fatale pour la santé.

Les causes de l'apparition de la multi-résistance aux antibiotiques sont multiples. Elles sont principalement dues à la surutilisation d'antibiotiques dans la médecine moderne et dans le secteur agroalimentaire. Cela entraîne une évolution des bactéries qui, par mutation ou échange d'ADN, acquièrent des gènes de résistance à ces antibiotiques. Ces bactéries résistantes se multiplient et deviennent alors majoritaires, rendant la lutte contre l'infection très difficile. Pour aggraver la situation, lorsqu'une bactérie possède un gène de résistance à un antibiotique, elle peut le transmettre à d'autres bactéries de la même espèce ou d'espèces différentes. Ce mode de transmission « horizontal » est principalement dû à la transformation naturelle, à la transduction via bactériophages, ou encore à la conjugaison entre bactéries.

La conjugaison bactérienne, un des phénomènes naturels moteurs de l'évolution bactérienne, consiste en un transfert d'ADN – principalement de plasmides - entre deux bactéries en contact. Les bactéries contenant les gènes nécessaires à la conjugaison mettent en place la machinerie nécessaire pour établir le contact entre les deux bactéries, et initient la coupure simple brin du plasmide conjugatif qui est alors « tracté » vers la bactérie receveuse par un système de sécrétion spécifique. Une fois transféré, le plasmide est alors re-synthétisé sous forme double brin et la bactérie cible devient porteuse du même plasmide que la bactérie donneuse. Au final, ce système permet un échange de matériel génétique entre bactéries, tel que par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques.

Le projet de ce mémoire consiste à tirer profit du mécanisme de conjugaison, pour aller détruire les gènes bactériens de résistance aux antibiotiques. En effet, l'idée est d'utiliser une bactérie « donneuse » portant un plasmide de conjugaison, lui-même équipé d'un système « tueur » basé sur Crispr/Cas9 afin de cibler et détruire un gène de résistance aux antibiotiques chez une bactérie cible « receveuse ».

Dans un premier temps, nous allons utiliser le système Crispr/Cas9 dans un plasmide de conjugaison minimum de type « mobilisable », c'est-à-dire un plasmide relativement petit, dont l'essentiel de la machinerie de conjugaison est fournie par le génome de la bactérie hôte. Dans un deuxième temps, l'idée sera d'utiliser le système Crispr/Cas9 dans un plasmide de conjugaison autonome afin de rendre le système de dissémination beaucoup plus efficace.

Notre système a montré le bon fonctionnement de Crispr/Cas9 avec un plasmide de type mobilisable et a permis de couper un gène de résistance à l'ampicilline présent, soit dans un plasmide, soit dans le chromosome. La mise en place de ce système dans le plasmide autonome RP4 est prometteuse mais nécessite des développements ultérieurs. A terme, ce système pourrait compléter les différentes solutions qui sont mises en place pour lutter contre la multi-résistance bactérienne.

1. Introduction

La résistance bactérienne aux antibiotiques est un phénomène très connu, posant un énorme problème de santé publique. En effet, depuis quelques années, on remarque que les bactéries pathogènes, habituellement éliminées avec un simple traitement aux antibiotiques sont de moins en moins sensibles à ces antibiotiques. Souvent, elles deviennent même totalement résistantes à plusieurs antibiotiques de la pharmacopée : on parle alors de bactéries multi-résistantes (MRB). Ce problème à l'échelle mondiale devient de plus en plus important au fil du temps et la moindre infection provoquée par ces bactéries pathogènes devient extrêmement difficile à combattre.

Les causes liées à cette multi-résistance sont multiples, mais principalement dues à la consommation intensive d'antibiotiques par l'homme. Pour aggraver la situation, les bactéries possèdent plusieurs moyens pour s'échanger les gènes de résistance aux antibiotiques entre souches de la même espèce ou entre souches d'espèces différentes. Parmi ces moyens, on retrouve par exemple la transformation bactérienne (la capacité de récupérer de l'ADN présent dans l'environnement), la transduction (la capacité d'acquérir de l'ADN par l'intermédiaire d'un virus) ou encore par conjugaison (transfert d'ADN entre deux bactéries en contact).

Heureusement, de nombreux moyens et de nombreuses études sont mis en œuvre afin de trouver des solutions pour combattre les bactéries pathogènes multi-résistantes.

Afin de mieux comprendre le but et la technique du travail réalisé lors de ce mémoire, nous allons détailler différents sujets dans cette introduction : (1) la problématique mondiale liée aux bactéries multi-résistantes, (2) le principe général de la conjugaison bactérienne chez les bactéries Gram-négatives comme moyen de transfert d'ADN et brièvement (3) le principe de base des manipulations du génome par le système de défense Crispr/Cas9.

1.1 La multi-résistance bactérienne aux antibiotiques

1.1.1 Situation actuelle

Depuis la découverte de la pénicilline par Alexander Fleming en 1928, les **antibiotiques** ont considérablement fait reculer les décès associés aux maladies de type bactériennes. Les antibiotiques sont des molécules, naturelles ou synthétiques, permettant de combattre les infections provoquées par les bactéries. Plusieurs familles d'antibiotiques existent, telles que par exemple les β -lactamines, les aminosides, ou les sulfamides (Etebu et al., 2016). Les antibiotiques, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, peuvent agir différemment selon leur composition et leur **mode d'action**. Ils peuvent agir par exemple en affectant l'intégrité de la membrane cytoplasmique de la bactérie, en inhibant la synthèse d'ADN ou de protéines, en inhibant la synthèse de la paroi, ou encore en bloquant certaines voies du métabolisme (Walsh & Wencewicz, 2016).

La **résistance bactérienne aux antibiotiques** se produit lorsqu'une bactérie survit à la présence d'un antibiotique, alors que celui-ci aurait dû l'éliminer ou bloquer sa croissance. Il en résulte que cette bactérie survivante va continuer à croître et à s'étendre en bénéficiant de l'absence de compétition de la part des autres bactéries de l'environnement. Cette résistance aux antibiotiques arrive naturellement au fil du temps, soit par des mutations génétiques, soit par l'acquisition de matériel génétique étranger. (Voir section 1.1.3)

Il arrive de plus en plus souvent que des bactéries soient résistantes à plus d'un antibiotique : on parle alors de **bactéries multi-résistantes (MRB)**. Il arrive même que certaines souches deviennent insensibles à pratiquement tous les antibiotiques connus de la pharmacopée. Les équipes médicales sont parfois forcées d'utiliser des antibiotiques « de la dernière chance », autrefois évités à cause de leurs mauvais effets secondaires. C'est le cas pour la colistine et les carbapénèmes qui sont utilisés en dernier recours lors d'infections par des bactéries Gram-négatives. Malgré tout, des souches résistantes à ces antibiotiques ont émergé récemment et tendent à se répandre au niveau planétaire (Velkov et al., 2016). La bactérie multi-résistante la plus connue et qui pose énormément de problèmes dans le secteur hospitalier est *Staphylococcus aureus*. On retrouve parfois jusqu'à 45% de cette bactérie sous sa forme multi-résistante (MRSA) dans les hôpitaux (Chaoui et al., 2019).

Ces bactéries multi-résistantes posent donc actuellement un problème de santé mondial dont l'alerte a été lancée dans un rapport de l'OMS de 2014. De nos jours, un peu moins d'un million de personnes meurent chaque année des suites d'une infection par une bactérie résistante. Cependant, les projections de l'OMS indiquent que si aucune solution n'est trouvée, en 2050 les bactéries multi-résistantes pourraient provoquer plus de dix millions de décès par an, c'est-à-dire plus que les décès provoqués par les cancers ou les maladies cardio-vasculaires (O'Neill, 2014).

En 2017, l'OMS a également listé trois catégories de souches bactériennes représentant une urgence à l'échelle mondiale : un niveau d'urgence **critique** car ces bactéries sont résistantes à un très grand nombre d'antibiotiques (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobacters*), un niveau d'urgence **élevé** (*S. aureus*, *H. pylori*, *Salmonella*, *N. gonorrhoeae*) et un niveau d'urgence **modéré** (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *Shigella spp.*).

Malgré l'urgence de la situation, depuis quelques années, il y a de moins en moins de nouveaux antibiotiques qui sont découverts et mis sur le marché. Cela est dû principalement au manque d'investissements de la part des sociétés pharmaceutiques qui considèrent que le retour sur investissement est trop faible (Review on Antimicrobial Resistance, 2016). En effet, la durée d'un traitement aux antibiotiques est relativement courte, et le coût de ces médicaments est assez faible. Par conséquent, très peu de nouveaux antibiotiques sont actuellement découverts.

1.1.2 Origine et causes de la multi-résistance

L'apparition de résistances aux antibiotiques est un processus évolutif naturel, provoqué par l'exposition des bactéries à ces molécules. Elles peuvent mettre en place différents mécanismes de survie comme (i) la production d'enzymes pour dégrader l'antibiotique, (ii) empêcher l'entrée ou faciliter l'exportation de l'antibiotique, ou encore (iii) modifier la cible de l'antibiotique.

Malgré le fait que le développement de ces résistances peut se faire de manière naturelle par mutation génétique, c'est principalement le mauvais usage de ces antibiotiques dans la médecine moderne qui a accéléré l'apparition et la diversification de bactéries résistantes à ces antibiotiques (Holmes et al., 2016). En effet, la surutilisation d'antibiotique par la médecine a exposé le microbiote à des doses considérables de molécules antibiotiques, provoquant le développement de nouvelles résistances (Elliott et al., 2006). De par la mondialisation, la propagation des souches bactériennes résistantes peut se faire facilement entre humains.

Le secteur agroalimentaire et vétérinaire est également en grande partie responsable de cette propagation. En effet, l'utilisation intensive d'antibiotiques chez le bétail a permis la sélection et le développement de bactéries résistantes qui, au final, peuvent être transmises à l'homme via la chaîne alimentaire (Fig. 1). De plus, de par leurs déjections, l'homme et l'animal rejettent des bactéries résistantes dans les cours d'eau, en aval des villes et des nappes phréatiques (Falgenhauer et al., 2019 ;

Squadrone S., 2020). En bout de chaîne, ces bactéries finissent par se retrouver même dans les hôpitaux, ou chaque patient est susceptible d'être « infecté » par une telle bactérie (Sib et al., 2019) (Fig. 1).

En fin de compte, à cause de la mauvaise utilisation des antibiotiques et grâce aux mutations naturelles et transferts génétiques, on se retrouve avec des bactéries qui sont résistantes à plusieurs antibiotiques.

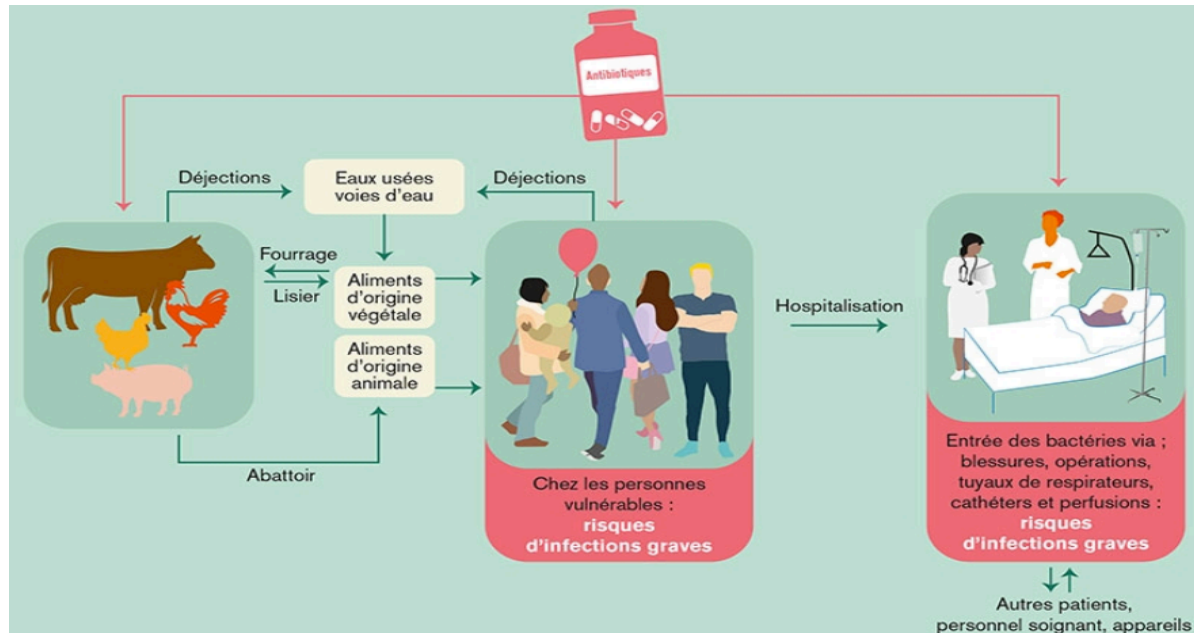


Figure 1 : Représentation schématique des modes de circulation des antibiotiques (flèches rouges) et des bactéries résistantes (flèches vertes) (source : Inserm/Koulikoff, Frédérique)

1.1.3 Modes de transmission

Lorsqu'une modification génétique permettant de résister à un antibiotique est acquise par une bactérie, ce gène de résistance peut malheureusement être disséminé vers d'autres bactéries. On parle de transfert génétique vertical lorsque l'ADN est hérité du parent, et de **transfert horizontal** quand l'ADN est acquis d'un organisme étranger.

Ce mode d'acquisition de matériel génétique étranger peut se faire de différentes façons : soit par transformation naturelle de morceaux d'ADN présent dans le milieu environnant (Fig. 2A) (Overballe-Petersen et al., 2013), soit par transduction via l'intermédiaire d'un bactériophage (Fig. 2B) (Tenover F.C., 2006), soit par conjugaison (Fig. 2C). La transmission des résistances aux antibiotiques se fait en majorité par conjugaison bactérienne de plasmides.

Lorsque du matériel génétique est acquis par une bactérie, celle-ci peut le garder si il lui confère un avantage sélectif, ce qui est le cas pour la résistance aux antibiotiques dans des conditions de traitement. Il n'est également pas rare que cet ADN soit intégré dans le chromosome de la bactérie, via des mécanismes naturels tels que la transposition ou la recombinaison homologe (Tenover F.C., 2006).

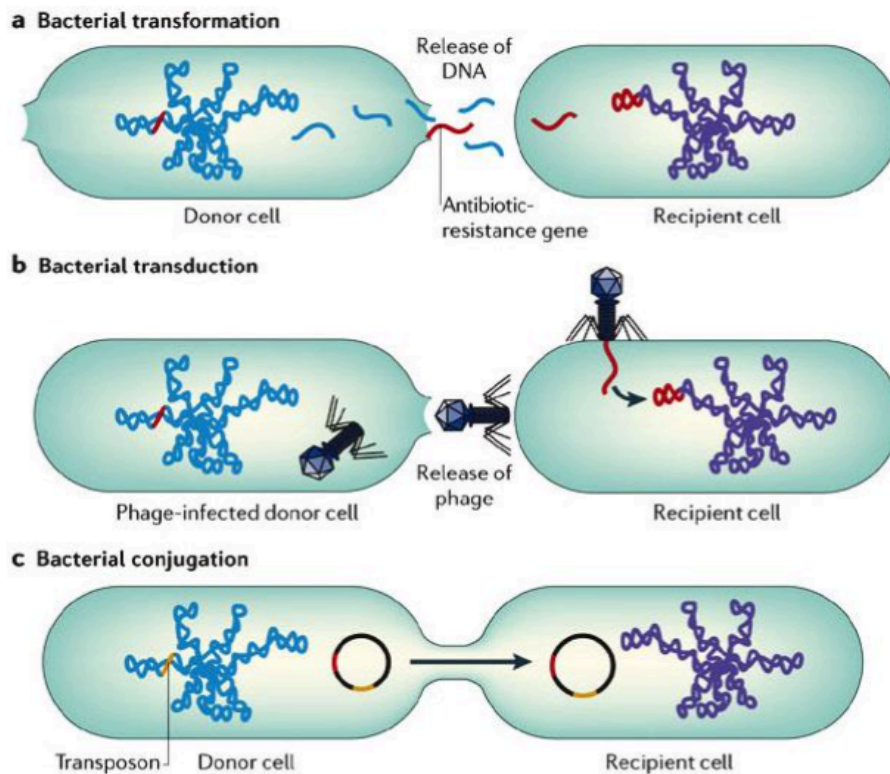


Figure 2 : Modes de transfert horizontal de matériel génétique chez les bactéries. A : Transformation bactérienne. B : Transduction bactérienne. C : Conjugaison bactérienne.

1.1.4 Quelles solutions ?

A présent que le monde est de plus en plus conscient du problème, il est urgent de **limiter la consommation d'antibiotiques** et de les utiliser uniquement lorsque cela s'avère nécessaire. Par exemple, en cas d'infections bactériennes, les antibiotiques à large spectre doivent être évités lorsque des antibiotiques à spectre réduit, tout aussi efficaces, sont disponibles (Ruppé et al., 2018). De plus, le monde médical, vétérinaire, industriel et politique doit être sensibilisé à ce problème et prendre toutes les mesures globales nécessaires afin d'éviter autant que possible les infections, telles que des mesures d'assainissements ou simplement d'hygiène (Silva et al., 2020).

Pour lutter contre la multi-résistance bactérienne, de nombreuses recherches sont développées et plusieurs pistes sont déjà explorées.

La **recherche de nouveaux antibiotiques** est toujours en cours, mais le nombre d'antibiotiques découverts chaque année a diminué, en partie à cause du manque d'investissement de la part des laboratoires pharmaceutiques. Quelques nouvelles molécules ont cependant été découvertes récemment, tel que le tazobactam, le ceftolozane ou encore le delafloxacin qui cible les infections de la peau par *S. aureus* (O'Riordan et al., 2018). Les recherches actuelles se concentrent surtout sur l'inhibition des β -lactamases, qui rendent sensibles les bactéries initialement résistantes aux antibiotiques de la famille des β -lactamines (Bush, K., 2018 ; Bush & Bradford, 2019). En effet, ces antibiotiques ont l'avantage de présenter peu d'effets secondaires. L'utilisation de bactériocines est également une piste explorée et a déjà montré de bons résultats avec les MRSA (Nascimento et al., 2006). On recherche également de nouvelles substances parmi les nombreuses bactéries marines encore peu connues (Wiese & Imhoff,

2019). Sachant qu'environ 99% des bactéries nous sont encore inconnues ou demeurent incultivables en laboratoire, il y a là un réservoir énorme de molécules potentiellement intéressantes.

Une autre solution consiste à utiliser la **phagothérapie**, c'est-à-dire l'utilisation des bactériophages, ennemis naturels des bactéries. Cette technique a été imaginée très tôt dans l'histoire mais a malheureusement été laissée de côté depuis la découverte des antibiotiques, sauf dans quelques pays de l'ex-union soviétique. Néanmoins, depuis l'arrivée des souches bactériennes multi-résistantes et la difficulté à les combattre avec des antibiotiques classiques, les recherches en phagothérapie ont repris un peu partout dans le monde (Lin et al., 2017) suite notamment aux premiers résultats encourageants obtenus dans les années 80' (Slopek et al., 1987). Cette technique a l'avantage de permettre le ciblage des bactéries pathogènes en utilisant un cocktail de phages spécifiques à cette bactérie. En effet, un bactériophage est capable de reconnaître un récepteur membranaire ou le pilus de sa bactérie cible, ce qui lui confère sa spécificité. Cela permet donc la mise au point d'un médicament « sur mesure ». Lorsque la bactérie est infectée, le virus injecte son matériel génétique afin de poursuivre son cycle de réplication. Celui-ci sera soit de type lysogénique, soit lytique, entraînant la mort de la bactérie. Cette stratégie a déjà montré de bons résultats et est toujours en cours de développement (Brown et al., 2017 ; Kortright et al., 2019) malgré le fait que les bactéries développent également, comme pour les antibiotiques, des résistances aux phages. Malheureusement, la recherche en phagothérapie en Europe est encore lente à cause notamment d'un manque de législation appropriée concernant l'utilisation de virus en thérapie humaine.

D'autres solutions envisageables ?

Une autre solution à explorer serait d'utiliser le mécanisme de **Crispr/Cas9** (Voir section 1.3) afin de cibler et couper les gènes de résistances aux antibiotiques. Le gros avantage de ce système est sa spécificité. En effet, il a été montré que Crispr/Cas9 pouvait cibler et tuer des bactéries en choisissant comme cible des gènes chromosomiques essentiels (Gomaa et al., 2014).

Un tel système offre de nombreuses perspectives et pourrait être véhiculé dans la bactérie cible via des phages, des nanoparticules ou encore par conjugaison au départ d'une autre bactérie (Gholizadeh et al., 2020)

L'utilisation thérapeutique de **Crispr/Cas9 en phagothérapie** est encore débattue en raison des lacunes que propose la phagothérapie telles que (i) la faible efficacité d'administration, (ii) la gamme étroite de l'hôte et surtout (iii) le transfert potentiel du génome viral. Cependant, la preuve de concept d'un tel système a été démontrée *in vitro* et *in vivo* avec l'utilisation de Crispr/Cas9 véhiculé par le phage ϕ NM1 (Bikard et al., 2014), le phage λ (Yosef et al., 2015) ou encore le phage ϕ SaBov (Park et al., 2017). Le système Crispr/Cas9 a été introduit dans un plasmide, puis intégré dans une région non codante d'un phage tempéré (Fig. 3). Malgré une faible efficacité, ce système a bien réussi à cibler et tuer spécifiquement les *S. aureus* indésirables sans affecter les autres bactéries présentes. Associer la phagothérapie avec Crispr/Cas9 semble donc déjà une solution très prometteuse (LeMieux J., 2019)

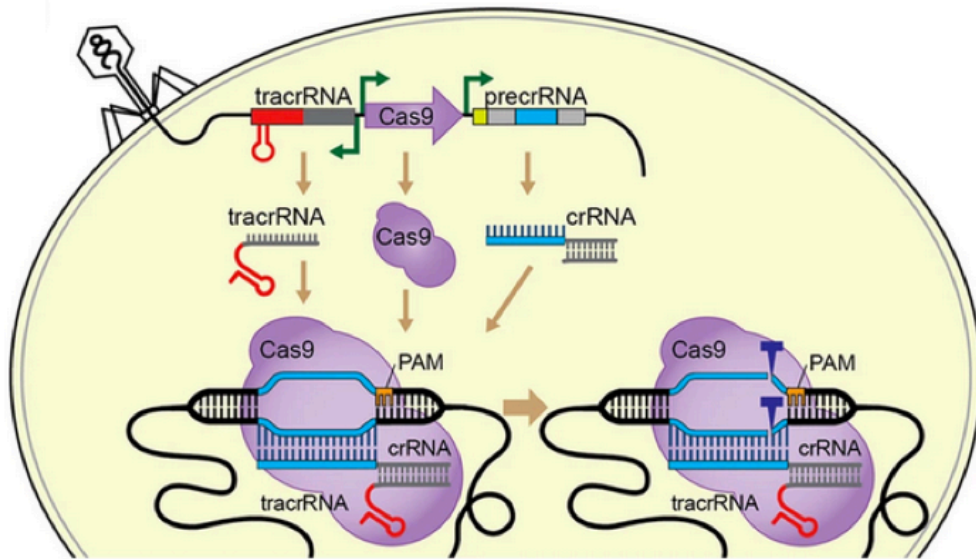


Figure 3 : Le système CRISPR/Cas9 programmé pour cibler *S. aureus*. Il est induit et délivré par un phage tempéré ϕ SaBov optimisé. Le système CRISPR/Cas9 (tracrRNA, crRNA et Cas9) est exprimé, scanne la séquence PAM et reconnaît la séquence cible dans l'ADN chromosomique, ce qui entraîne le clivage de l'ADN chromosomique et la mort de la bactérie (Park et al., 2017).

Une autre idée serait de véhiculer **Crispr/Cas9 par conjugaison bactérienne**. Ce système présente des avantages car certains plasmides de conjugaison ont un large spectre d'action. Ils sont également plus résistants que les phages, en partie parce qu'ils sont moins facilement dégradés par la machinerie cellulaire de la bactérie cible. C'est un tel système que nous allons tenter de mettre en place dans le cadre de ce projet.

1.2 La conjugaison bactérienne

1.2.1 Principe général

Découverte en 1946 par Lederberg et Tatum, la conjugaison bactérienne est un phénomène naturel d'échange de matériel génétique entre deux bactéries. La bactérie dite « donneuse » établit un contact physique avec la bactérie dite « receveuse » par l'intermédiaire d'un pilus. Une fois le contact établi, du matériel génétique sous forme de plasmide simple-brin est alors transféré de manière unidirectionnelle vers la bactérie receveuse. En fin de processus, les deux bactéries se retrouvent avec la même copie d'ADN et vont chacune pouvoir re-synthétiser le brin complémentaire. (Fig. 4)

Le **début de la conjugaison** chez les bactéries Gram-négatives se produit lorsque l'enzyme relaxase reconnaît une région particulière du plasmide conjugatif appelée « **origine de transfert** ou **oriT** ». Elle forme avec d'autres protéines un complexe appelé « **relaxosome** » – qui va initier le transfert de l'ADN. La relaxase effectue une cassure simple-brin au niveau d'oriT, ce qui libère une extrémité 3'OH à partir de laquelle démarre la synthèse complémentaire du brin non transféré dans la cellule donneuse (Fig. 4). Le relaxosome se lie également à une **protéine de « couplage »** (T4CP, type IV coupling protein) qui elle-même interagit avec le **complexe d'un système de sécrétion de type IV** (T4SS, type IV secretion system), qui traverse la paroi bactérienne. La relaxase qui est liée de manière covalente à l'extrémité 5' du brin transféré est alors « **secrétée** » dans la cellule receveuse (Fig. 4). Ensuite, grâce à l'activité ATPase de T4CP, l'ADN attaché à la relaxase est « **pompé** » depuis la cellule donneuse vers la receveuse (Fig. 4). Une fois que l'ADN simple brin est transféré vers la bactérie cible, il peut être

circularisé à nouveau et recopié sous forme double-brin par la machinerie de réplication de la bactérie hôte (Smillie et al., 2012). Par conséquent, la bactérie receveuse contient la copie exacte du plasmide conjugatif de la bactérie donneuse.

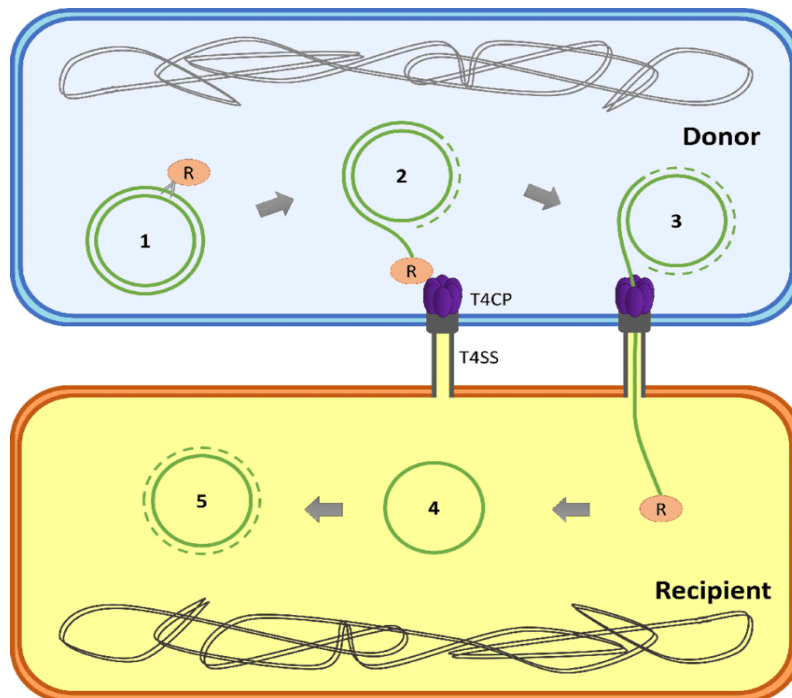


Figure 4 : Principe général de la conjugaison. 1 : la relaxase (R) reconnaît l'oriT et clive l'ADN en simple brin. 2 : la relaxase se fixe sur le simple brin d'ADN et se lie avec la protéine T4CP qui interagit alors sur le complexe protéique T4SS. Il y a également formation d'un pilus entre les deux bactéries. 3 : En partie grâce à l'activité ATPase de T4CP, l'ADN est tiré hors de la cellule et se déplace vers la bactérie cible. 4 : le plasmide simple brin se recircularise. 5 : le brin complémentaire est synthétisé. (Source : Getino & De la cruz, 2019)

La bactérie donneuse contient l'ensemble des gènes nécessaires à la conjugaison, tels que ceux impliqués dans la formation du pilus, dans le contact cellule-cellule et pour le transfert de l'ADN entre les bactéries (Clewell, 2013). Ces gènes sont disposés, selon les cas, de deux façons différentes : ils peuvent être situés (i) en partie dans le chromosome de la bactérie et en partie dans le plasmide ou (ii) entièrement dans le plasmide de conjugaison. Dans le premier cas, on parle de plasmide « **mobilisable** » car il ne contient que les gènes *minimum* pour la conjugaison, le reste des gènes étant présents dans le génome de la bactérie hôte. Dans le second cas, on parle de plasmide « **autonome** » car il possède tous les gènes nécessaires et peut donc conjuguer de manière autonome, indépendamment de sa bactérie hôte (voir sections 1.2.3 et 1.2.4).

L'efficacité de transfert de ces plasmides conjugatifs est variable. On classe les plasmides conjugatifs en plusieurs **groupes d'incompatibilités** (*Inc*), en fonction de leurs aptitudes à coexister dans la même souche bactérienne. Deux plasmides appartenant au même groupe *Inc* sont incompatibles (Gregory et al., 2008). Différents facteurs influencent cette incompatibilité: la présence d'origines de réplication multiple ou de structures différentes, la structure de l'origine de transfert, ou encore la présence d'enzymes de dégradation de l'ADN étranger dans la bactérie cible (Jain & Srivastava, 2013). Des facteurs externes influencent également l'efficacité de transfert, comme la température, le taux d'oxygène, la disponibilité en nutriment ou encore la phase de croissance (Frost et al., 2009). Bien que la plupart des conjugaisons puissent se faire sur milieu solide, certains plasmides tel que les membres de la famille *IncF* conjuguent très bien en milieu liquide. Cela est dû en partie à la nature des gènes Mpf (Mating-Pair Formation), responsables de la formation du pilus. En effet, s'ils sont épais et flexibles, la conjugaison pourra se faire en milieu liquide. S'ils sont de nature rigide, tel que le RP4 de la famille *IncPa*, il faudra effectuer la conjugaison en milieu solide pour une bonne efficacité (Frost et al., 2009)

Il existe de **nombreux types de plasmides conjugatifs** dont l'efficacité de transfert varie selon les espèces. Chez les bactéries Gram-négatives on a identifié deux grandes classes de plasmides conjugatifs : le type F (*IncF*), dont les plus étudiés sont les plasmides F, R100-1, R1 et le type P (*IncP*), tels que RP4 et R751. On peut également citer les plasmides du type *IncII* (tel que R64), *IncN* (pCU1, pKM101), *IncW* (R388) et bien entendu le plasmide Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (Frost et al., 2009). Chez *E. coli*, le plasmide de fertilité (Plasmide F ou F-Factor) a été étudié pendant de nombreuses années et a été utilisé pour établir les premières cartes génétiques. Il a également été souvent utilisé, ainsi que d'autres plasmides du même type, pour transférer des gènes lorsque les souches bactériennes n'étaient pas naturellement transformables, ou bien lorsque la transformation artificielle était de faible efficacité. Les plasmides conjugatifs chez les bactéries Gram-positives sont moins bien étudiés, mais on peut citer par exemple le pAD1 et le pIP501 chez *Streptococcus* et les plasmides SCP1 et SCP2 chez les *Streptomyces* (Frost et al., 2009)

1.2.2 Structure génétique des plasmides

On peut prendre comme exemple le plasmide autonome RP4 ou RK2 (GenBank : L27758.1), qui possède une taille de 60099 pb (voir carte génétique complète, annexe 6), car la majorité de ses gènes ont été décrits (Pansegrau et al., 1994). Ce plasmide comporte au moins 74 gènes, en majorité sous forme d'opérons, et environ 40 kb de sa séquence est indispensable pour la conjugaison.

La partie essentielle la plus étudiée de RP4 est l'**origine de transfert - oriT^{RP4}** - et ses gènes adjacents. L'origine de transfert, d'une taille de 250 pb, est le point de départ de la conjugaison et est l'endroit où se situe le site de clivage simple brin initié par le **relaxosome**. Bien entendu, il existe plusieurs variantes de l'oriT suivant le plasmide de type *IncP* considéré, comme par exemple l'oriT^{R6K} du plasmide R6K (Avila et al., 1996).

Autour de la région oriT se trouve la **région Tra1** (« tra » pour transfert). On y retrouve trois gènes indispensables pour le transfert de l'oriT : deux gènes qui participent à la formation du relaxosome, ainsi qu'un gène qui code pour la relaxase (Clewell D.B., 2013) (Fig.5).

En amont de l'oriT, une autre région importante est la **région Tra2**. Elle contient les gènes Mpf (Mating Pair Formation) qui sont impliqués dans la biosynthèse et l'assemblage du pilus, la stabilisation de l'interaction entre les cellules partenaires, la formation du pore de conjugaison, ainsi que deux gènes essentiels pour le transfert intra spécifique (Fig. 5).

Un clonage des régions Tra1 et Tra2 montre que ces deux régions, avec l'oriT, sont suffisantes pour un transfert de plasmide.

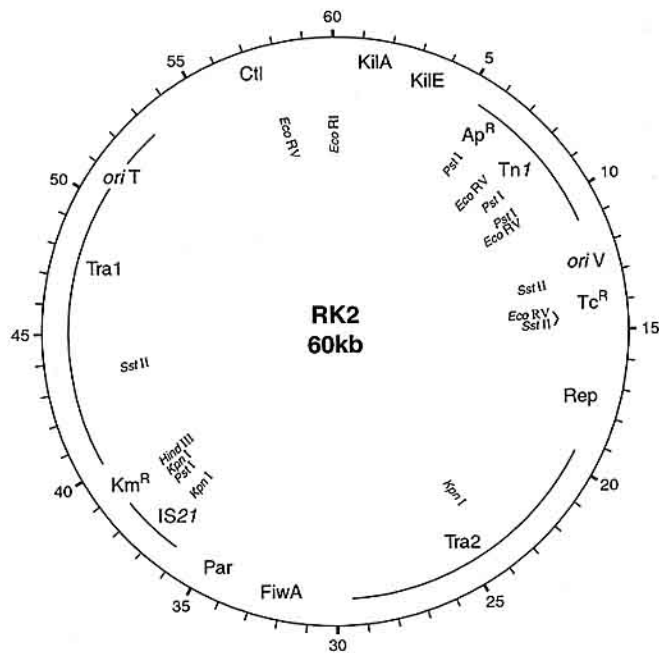


Figure 5 : Structure générale du plasmide conjugatif RK2/RP4. Dans la région Tra 1, TraJ et TraK participe à la formation du relaxosome et TraI code pour l'enzyme qui coupe et se fixe à l'extrémité 5' de la cassure simple brin (Clewel D.B., 2013). TraI code pour la relaxase et les gènes TraH et TraK jouent un rôle important pour le relaxosome en se liant à proximité de la coupure de l'oriT. La primase est codée par le gène TraC. La région Tra2, est disposée aussi en opérons. Ces six gènes, ainsi que les gènes Mpf (Mating Pair Formation), sont impliqués dans la biosynthèse et l'assemblage du pilus. Les gènes TrbB à TrbL sont essentiel pour le transfert intra spécifique. Les gènes, tel que KorA, KorB, ParA, TrbA agissent comme régulateur. D'autres séquences sont aussi très spécifique tel que la resolvase (ParA, TnpR), la transposase (IS21, TnpA), ou l'activateur de l'origine de répliation (TrfA)

1.2.3 Plasmides conjugatifs autonomes

On parle de **plasmide conjugatif autonome** lorsque tous les gènes nécessaires à la conjugaison se situent dans le plasmide. Il n'est donc pas dépendant de la bactérie hôte. Lorsque ce plasmide a conjugué vers une bactérie cible, il peut conjuguer à nouveau vers une autre bactérie. Les bactéries receveuses ayant reçu le plasmide conjugatif, deviennent donc à leur tour des bactéries donneuses, ce qui améliore fortement le taux de propagation du plasmide (Hamilton et al., 2019). Ces plasmides sont donc autotransmissibles et ont une taille moyenne d'environ 100 kb (Smillie et al., 2010).

On peut classifier la plupart des plasmides conjugatifs par le **spectre d'action**, c'est-à-dire par leur capacité à conjuguer, à se répliquer et à se maintenir dans des espèces distantes d'un point de vue taxonomique. Plusieurs essais ont déjà été menés pour évaluer l'étendue du spectre d'action des principaux plasmides de conjugaison vers des familles différentes de bactéries cibles (Thomas & Smith, 1987 ; Trieu-Cuot et al, 1987). Lorsque c'est possible, on classe généralement les plasmides en trois groupes selon l'étendue de leur spectre d'action : les **plasmides à large spectre** (*Broad Host Range* ou **BHR**), à moyen et à faible spectre. Les plasmides de type HBR contribuent de manière significative au transfert horizontal de traits bénéfiques dans les populations bactériennes, comme la résistance aux antibiotiques, aux métaux lourds, à la dégradation de composés organiques complexes (comme les herbicides) etc... Les eaux usées sont le principal réservoir des plasmides conjugatifs qui proviennent de l'activité humaine (Akiyama et al., 2010). Le concept de spectre d'action (*Host Range*) résulte des tentatives de transfert des premiers plasmides dans différentes souches gram-négatives. Par exemple, de nombreux plasmides issus de souches d'*Enterobacteriaceae* peuvent être transférés par conjugaison vers tous les membres de cette famille, et quelques-uns peuvent également être transférés vers des bactéries du genre *Pseudomonas*.

Les plasmides BHR peuvent également être très intéressants d'un point de vue pratique, selon l'application visée, car ils peuvent servir de vecteur très utile pour les technologies d'ADN recombinant (Simon R., 1984; Quandt et al., 2004).

Un des plasmides BHR typique est le **plasmide RP4** de la famille *IncPa*. Ce plasmide porte plusieurs noms selon les études, mais il s'agit en fait du même plasmide (Pansegrau, 1994). Il peut être conjugué et peut transférer du matériel génétique dans un grand nombre de souches Gram-négatives, telles que *Pseudomonas* ou *Vibrio* (Thomas & Smith, 1987) ainsi que quelques Gram-positives telles que des *Streptococcus*, *Bacillus*, ou *Staphylococcus* (Trieu-Cuot et al, 1987). Il a très tôt été observé que ce plasmide contient peu de sites de restriction courants, ce qui empêche la dégradation de l'ADN par les bactéries receveuses. Cela explique en partie la possibilité de passage vers une large variété d'hôtes (Meyer et al., 1977 ; Jain & Srivastava, 2013).

1.2.4 Plasmides conjugatifs mobilisables

On parle de plasmides conjugatifs mobilisables lorsqu'une partie des gènes nécessaires à la conjugaison ne se trouvent pas sur le plasmide mais se situent dans le génome de la bactérie hôte, soit sur un autre plasmide, soit sur le chromosome. Un tel plasmide est donc totalement dépendant de la bactérie qui l'héberge pour pouvoir être transféré (Clewell D.B., 2013). Il ne contient que quelques éléments et gènes essentiels et par conséquent, ils ont une taille moyenne réduite - généralement entre 5 à 10 kb. Ils existent à l'état naturel ou sont fabriqués artificiellement au départ de plasmides autonomes. Des mécanismes tels que la transposition et la recombinaison homologue ont permis l'intégration d'une partie des gènes de conjugaison dans le chromosome.

Les **plasmides mobilisables** possèdent tous une origine de transfert (*oriT*), qui est nécessaire pour démarrer la conjugaison. Ils possèdent également le gène de la relaxase, protéine essentielle pour la reconnaissance du site *oriT* et l'initiation de la coupure simple brin. Certains contiennent également le gène d'une protéine T4CP (Fig.4), impliqué dans la connexion entre le canal de transport et le relaxosome. Le complexe T4SS, composé de 15 à 30 protéines essentielles pour la conjugaison, est quant à lui situé sur un autre plasmide ou sur le chromosome (Smillie et al., 2010). Comme tous les plasmides, ils contiennent également une origine de réplication. Le reste des séquences nécessaires à la conjugaison, tel que par exemple la formation du pilus, est intégré dans le génome de la bactérie hôte.

Comme pour les plasmides autonomes, le concept de spectre d'action s'applique également en fonction de la nature et de l'origine des gènes présents (Jain & Srivastava, 2013). De tels plasmides peuvent donc aussi être utilisés pour transférer une séquence d'ADN vers une bactérie cible. L'avantage principal de ce type de plasmide est qu'il possède une plus petite taille, ce qui permet de le manipuler plus facilement (Quandt et al., 2004). Il est également utile si, selon les besoins, on souhaite transférer une séquence ADN une seule fois vers une bactérie qui ne contient pas les gènes de conjugaison et ainsi garder un certain contrôle sur la propagation du vecteur (Frost et al., 2009)

1.3 Le système Crispr/Cas9

Tous les organismes cellulaires ont développé des stratégies pour combattre l'invasion d'ADN parasites. Chez de nombreuses bactéries et archées, le système **CRISPR** (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) associé aux protéines **CAS** (CRISPR-associated protein) a été découvert comme un système adaptatif de défense contre l'ADN étranger provenant de bactériophages ou de plasmides (Barrangou et al., 2007). Il s'agit donc en quelque sorte d'une forme d'immunité acquise bactérienne, qui confère une protection contre des infections de phages ou des transferts de plasmides étrangers.

Ce système naturel de défense est donc composé, dans la plupart des cas, d'une protéine – la protéine Cas – et une ou plusieurs régions CRISPR. Celles-ci sont constituées de plusieurs courtes séquences nucléotidiques séparées par des espaceurs (« spacer ») répétées qui seront transcrites en ARN (crRNA) ciblant des ADN étrangers spécifiques (Fig. 6). Cette séquence d'ARN est complémentaire à l'ADN cible et s'associe à la nucléase Cas. Le complexe est capable de « scanner » l'ADN et si une région complémentaire est reconnue, l'ADN sera clivé, à proximité d'une séquence PAM (« *Protospacer Adjacent Motif* », constituée d'un trio de nucléotides NGG dans le cas du système CRISPR/Cas9 le plus étudié) qui est également nécessaire pour que la cassure ait lieu (Fig.6). Ce système Crispr/Cas a évolué chez les bactéries, principalement sous la forme de différentes versions de la **protéine Cas**. A l'heure actuelle, on connaît quatre familles de protéines Cas différentes, comprenant jusqu'à plus de 40 protéines différentes (Haft et al., 2005). La plus connue étant Cas9, de la famille II-A et issue de la bactérie *S. pyogenes*.

Depuis la découverte de ce système, de nombreuses applications ont vu le jour pour l'édition et la manipulation des génomes (Doudna & Charpentier, 2014) comme la cassure double-brin ou encore la répression de gènes particuliers. En effet, une variante de Cas9 sans activité catalytique (dCas9) est utilisée pour effectuer de l'interférence (CRISPRi) et empêcher l'expression de certains gènes par encombrement stérique. Cependant, l'application la plus connue du système Crispr/Cas9 consiste en la possibilité de clivage de l'ADN par la protéine Cas9, ciblé par le guide ARN de Crispr. La cassure double brin associée à des mécanismes de réparation par recombinaison homologue permet d'insérer de l'ADN étranger dans un chromosome et facilite grandement la construction d'organismes génétiquement modifiés.

Des études phylogénétiques, *in vitro* ou *in vivo*, indiquent que, naturellement, le système Crispr/Cas9 utilise deux ARN distincts comme guides : le tracrRNA et le crRNA (Deltcheva et al., 2011 ; Jinek et al., 2012) (Fig. 6A). Néanmoins, pour faciliter l'utilisation du système en une seule séquence, on peut également utiliser un seul guide ARN (appelé sgRNA) en reliant les deux ARN crRNA et tracrRNA (Fig. 6B)

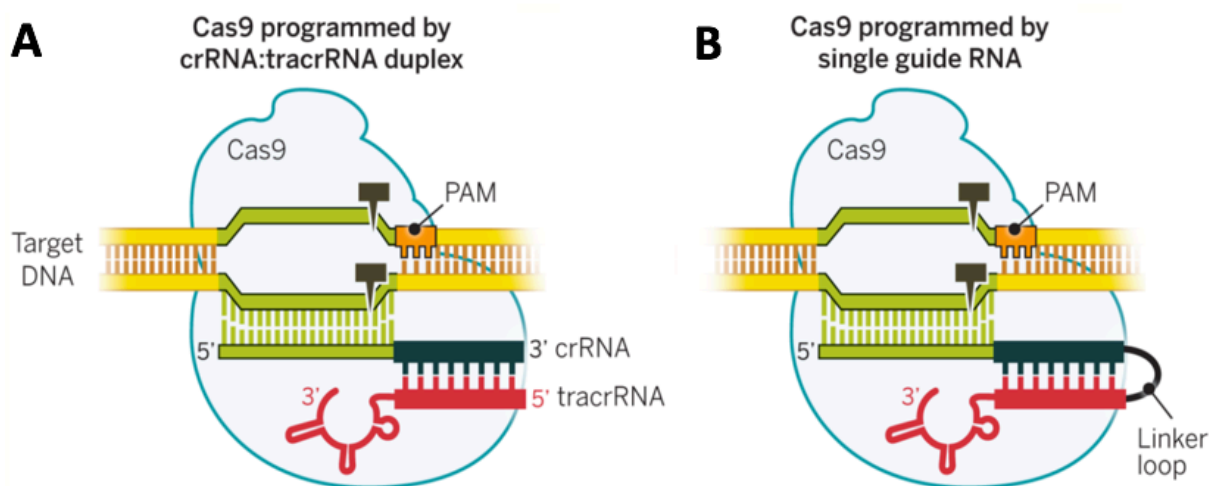


Figure 6 : schéma représentant le système Crispr/Cas9 chez *S. pyogenes*. (A) Le guide ARN est naturellement composé de deux séquences crRNA et tracrRNA ou (B) est constitué artificiellement d'une seule séquence appelée sgRNA.

Certaines études ont démontré et optimisé la construction d'un guide RNA d'une seule séquence (Jinek et al., 2012) (Fig. 6B) C'est sur ce principe que nous nous sommes basés pour la construction de notre guide ARN dans ce travail.

2. Objectifs et stratégies

Objectif du projet

Mon travail de mémoire est à l'initiation d'un projet plus général visant à développer un nouveau système de lutte contre les bactéries multirésistantes en combinant la conjugaison bactérienne et la technologie CRISPR/Cas. L'objectif sera de réaliser une preuve de concept en équipant un plasmide conjugatif avec un système Crispr/Cas9 programmé pour inactiver un gène de résistance à un antibiotique, dans une bactérie cible (Fig. 7).

Ce projet est prévu en plusieurs grandes étapes :

- Construire et tester l'efficacité d'un plasmide conjugatif de type « mobilisable » et de type « autonome » comprenant un système Crispr/Cas9 ciblant un gène de résistance à un antibiotique.
- Optimiser l'efficacité de conjugaison de ces plasmides et tester différentes cibles.
- Tester l'étendue de l'efficacité de ces plasmides pour des conjugaisons interspécifiques.

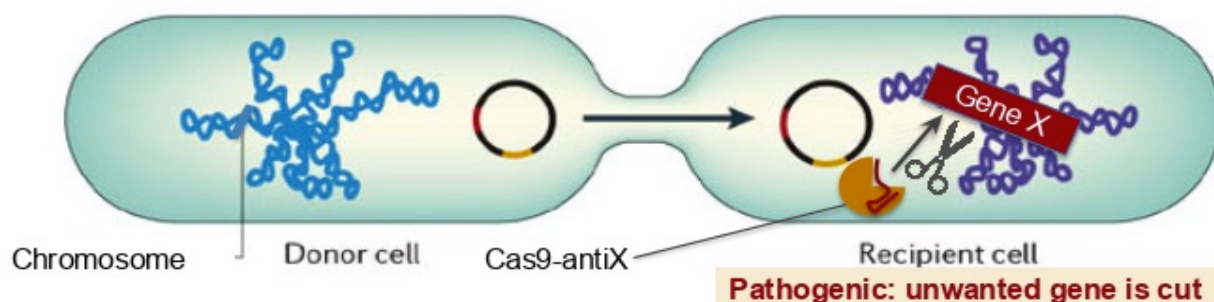


Figure 7 : Représentation schématique du projet. Le système Crispr/Cas9 (en orange) est inséré dans un plasmide de conjugaison porté par une bactérie donneuse (à gauche). Une fois qu'il a été transféré à sa bactérie cible par conjugaison (à droite), Crispr/Cas9 coupe le gène X de résistance à un antibiotique.

Stratégie

Choix du plasmide conjugatif

Le choix de notre plasmide mobilisable s'est fait sur base des plasmides à notre disposition, reçus amicalement du Centre d'étude de l'Énergie Nucléaire (CEN). Le plasmide conjugatif mobilisable utilisé dans ce travail et qui a donné de bons résultats est le plasmide ATCC[®] 87095 **pK18mob** (Fig. 8). Il est de petite taille et facile à manipuler. Ce plasmide mobilisable, dépendant des autres gènes présents dans le génome, permet en théorie la conjugaison vers une large gamme de bactéries Gram-négatives (et quelques Gram-positives). Il est dérivé du plasmide pK18 de *E.coli* (Pridmore, R.D., 1987) et contient l'oriT de RP4. Le plasmide pK18mob contient également le gène de résistance à la Kanamycine, l'origine de répllication pMB1, le site de clonage multiple (MCS) du pUC18 placé dans le gène de la β -galactosidase (*lacZ*), entouré de deux régions permettant un séquençage avec les amorces standards M13 (Schäfer et al., 1994).

Construction du plasmide conjugatif

Pour la construction du plasmide, nous avons utilisé la protéine Cas9 et son promoteur constitutif à partir du plasmide pCAS9 (Jiang et al., 2013), et nous avons dessiné et commandé les guides RNA optimisés (Jinek et al., 2012).

Dans un premier temps nous avons choisi deux guides RNA pour Crispr/Cas9 : un guide pour cibler le gène de la protéine fluorescente rouge (RFP) afin de pouvoir visualiser facilement les résultats, et un guide pour cibler le gène de résistance à l'ampicilline car nous avons des souches et de nombreux plasmides tests portant ce gène de résistance.

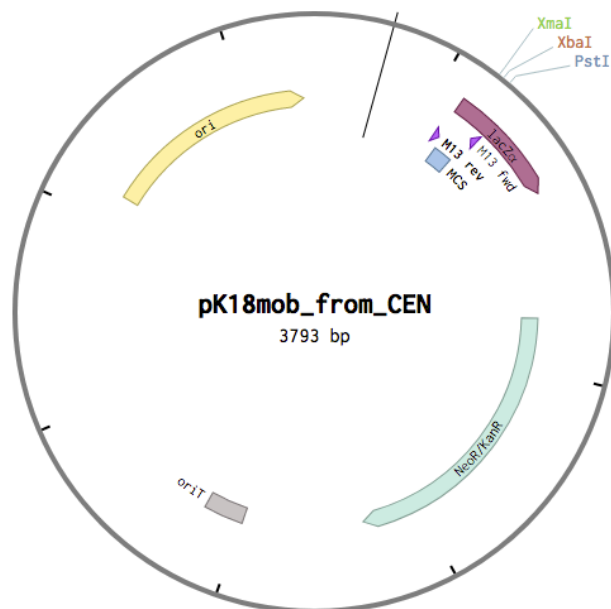


Figure 8 : Carte génétique du plasmide pK18mob. En vert, le gène de résistance à la Kanamycine, l'origine de transfert oriT (en gris), l'origine de réplication pMB1 (en jaune), le gène LacZ (en mauve) et le MCS (en bleu)

Choix des cibles

Le plasmide **pSB4A5** a été choisi pour servir de cible dans la bactérie receveuse DH5a. Il contient un gène codant pour la RFP ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline (AmpR). Son origine de réplication (pSC101) a été choisi pour être compatible avec celle du plasmide conjugatif pK18mob. Une souche *E.coli* **TEM1** contenant le gène de résistance à l'ampicilline dans son chromosome (AmpR^{CHR}) a également été choisie pour cible. De plus, une cassure double brin dans le chromosome est létal pour la bactérie.

La souche MFDpir

La souche bactérienne MFDpir (*E.coli*) utilisée dans ce travail est issue de la souche S17-1 contenant les gènes de la machinerie de conjugaison de RP4 dans son chromosome (Simon et al., 1983), et pour laquelle la séquence d'insertion du phage Mu a été retirée (Ferrière et al., 2010). Initialement, lors de la construction de la souche S17-1, l'intégration des gènes de conjugaison du RP4 dans le chromosome a été réalisée par transposition via le phage Mu (Dénarié et al, 1977) Cependant, il a été observé que la présence de la séquence Mu pouvait s'insérer de manière aléatoire dans le chromosome de la bactérie, et créer des phénotypes inattendus, rendant parfois les résultats difficiles à interpréter. Pour éviter ce genre de problème, une nouvelle souche a été créée sans la séquence Mu : MFDpir (Mu-Free-Donor). De plus, l'incapacité de cette souche auxotrophe à croître en l'absence de DAP (diaminopimelic acid) permet une analyse phénotypique facile (Ferrière et al., 2010). Après des premiers résultats incohérents obtenus avec la souche S17-1, nous avons choisi d'utiliser cette nouvelle souche dans le cadre de ce travail.

3. Matériel et méthodes

Protocoles standards

Les **digestions** ont été réalisées avec les enzymes de NEB[®], selon le protocole standard du fabricant. Les **ligations** ont été effectuées avec T4 Ligase de BioLabs[®], selon le protocole standard du fabricant. Pour une meilleure efficacité, les ligations ont été effectuées O/N à 4°C.

Les **PCR** ont été réalisées avec la polymérase Q5 de NEB[®], selon le protocole standard du fabricant.

Les **minipreps**, sauf avis contraire, ont été effectuées avec le kit « GeneElute Plasmid Miniprep » de SIGMA[®], selon le protocole standard du fabricant.

Tous les **milieux de culture** ont été préparés avec du LB standard (pour 1 litre : 10g de peptone, 5g d'extrait de levure, 5g NaCl et 12g Agar) + antibiotiques (Voir Table 1)

3.1 Design et construction d'un plasmide conjugatif mobilisable

3.1.1 Construction du plasmide mobilisable

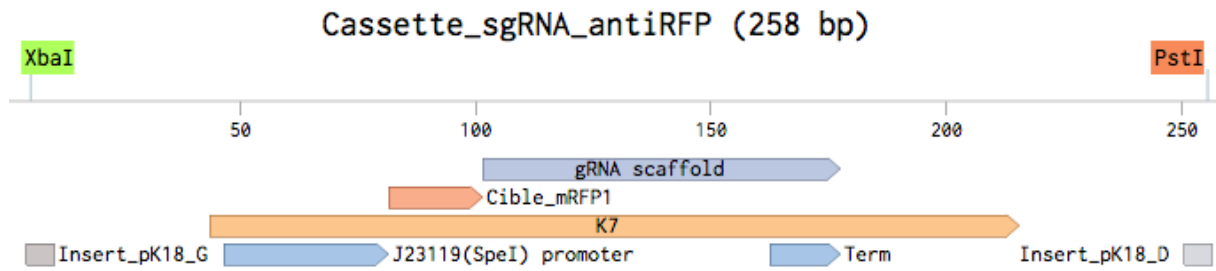
Le plasmide de départ est le pK18mob, d'une taille de 3793 paires de base (pb), que nous avons reçu du CEN. Il possède dans son site de clonage (MCS) deux sites uniques : PstI et XbaI qui seront utilisés pour l'insertion de notre cassette Crispr/Cas9.

Design de la cassette Crispr/Cas9

Dans un premier temps, il s'agit d'assembler le gène de la protéine Cas9 avec une séquence guide RNA permettant de cibler le gène d'intérêt (rfp ou bla, encodant respectivement la protéine fluorescente rouge et le gène de la β -lactamase).

Le gène de la **protéine Cas9** -ainsi que son promoteur constitutif- a été amplifié par PCR à partir de plasmide pCAS9 (Jiang et al., 2013). Les primers utilisés pour l'amplification de Cas9 et de son promoteur – Cas9-Fw et Cas9-Rev (voir liste des primers, Annexe 1) – ont été choisis de sorte à avoir le site de restriction PstI à l'extrémité 5' et le site XmaI à l'extrémité 3'. La taille du fragment obtenu, de 4480 pb, a été vérifiée sur gel. Ce fragment, de même que le plasmide pK18mob, ont été digérés par XmaI et PstI, puis ligués. La transformation a été effectuée par la technique de chimio compétence. Les bactéries recombinantes contenant le plasmide pK18mob_Cas9 ont été isolées sur boîte et cultivées dans un milieu LB avec Kanamycine. La présence de l'insert Cas9 a été vérifiée par digestion et visualisée sur gel (voir Résultats).

Le **guide ARN** utilisé pour Crispr/Cas9 a été choisi en une seule séquence, comme cela a déjà été décrit et utilisé dans d'autres études (Jinek et al., 2012). Les régions cibles (RFP et AmpR) ont été choisies à côté d'un site PAM et vérifiées par deux logiciels en ligne afin d'éviter un maximum « d'Off-Target ». Nous avons incorporé à cette séquence un site de restriction XmaI du côté 5' afin de pouvoir le liguer avec la séquence Cas9, ainsi qu'un site XbaI du côté 3' pour la ligation dans le plasmide cible. Deux séquences ont été dessinées : l'une contenant un guide RNA pour cibler le gène de la RFP, l'autre pour cibler le gène de résistance à l'ampicilline (AmpR) Cette séquence, d'une taille de 258 pb (Fig. 9), a été commandée et synthétisée chez IDT. Elle a ensuite été réamplifiée par PCR afin d'obtenir plus de matériel génétique.



ttaaTCTAGACTTATAGAAGCTTAAGGCGGCCGCTTGTACAGgtccttgacagctagct
 cagtcctaggtataaactagtc**catg**cg**tttcaa**ag**ttc**gtagtttagagctagaaatagcaagttaaa
 ataaggctagtcggttatcaacttgaaaaagtggcaccgagtcggtgcttttttgaatttcctagagtcg
 acctggagaagcttaACGTACGAGCGGCCGCTGGCGCGCCCTTCTTAAAGCTGCAG
 GCATGC

Figure 9 : structure et séquence complète du guide RNA anti-rfp. En rouge : la cible vers le gène de la RFP. En bleu : le promoteur J23119. En noir souligné : les sites de restriction XbaI (TCTAGA) et PstI (CTGCAG)

Ce fragment synthétisé ainsi que le nouveau plasmide pK18mob contenant déjà Cas9 ont été digérés par XbaI et PstI, puis ligués. La transformation a été effectuée par la technique de chimio compétence. Les bactéries contenant la cassette complète Crispr/cas9 (Fig. 10) ont été isolées sur boîte et cultivées dans un milieu LB avec Kanamycine. La présence de l'insert du guide RNA a été vérifié par PCR (voir Résultats). Les plasmides construits et contenant le sgRNA, ciblant soit le gène de la protéine fluorescente rouge (RFP) soit le gène de résistance à l'ampicilline, ont été dénommés **pIG-K1** et **pIG-K2** respectivement (voir résultats). Le plasmide ne contenant que le gène Cas9 a été dénommé **pIG-K0** et servira de contrôle négatif lors des conjugaisons.

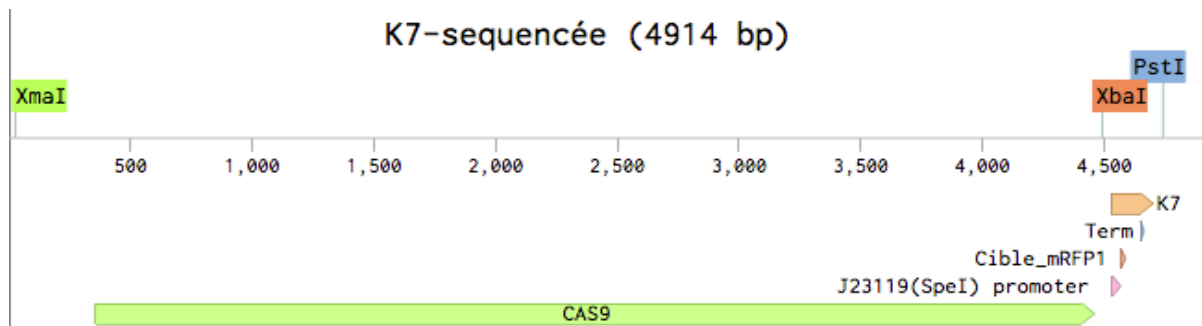


Figure 10 : Structure de l'insert utilisé pour la construction du plasmide. Il est composé de la séquence de la protéine Cas9 (en vert, entre les sites XmaI et XbaI) et du guide RNA (en orange, entre les sites XmaI et PstI)

Table 1 : concentration des antibiotiques et produits couramment utilisés.

Antibiotique/produit	Concentration finale
Ampicilline	100 µg/ml
Chloramphénicol	35 µg/ml
Kanamycine	50 µg/ml
DAP	0,3 mM
Thymidine	0,3 mM
Protéinase K	300 µg/ml

3.1.2 - Construction des plasmides des souches receveuses.

Les plasmides des souches receveuses ont été construits, par facilité, à partir des vecteurs et biobrick (iGem) à notre disposition. Le choix du marqueur de résistance (AmpR) a été fait de manière à pouvoir servir de cible pour Crispr/Cas9 et à être différent de celui du plasmide conjugatif (KanR). Le nombre de copies et le choix de l'origine de répllication ont été également pris en compte, afin d'assurer une compatibilité entre nos plasmides (voir tableau d'incompatibilité, Annexe 4). La souche utilisée est une *E.coli* DH5 α .

La souche receveuse **sJR07** a donc été obtenue après transformation de DH5 α avec le plasmide pSB4A5_BBa_J04450 (résistant à l'ampicilline et contenant le gène encodant la RFP) dont l'origine de répllication pSC101 (à faible copie, groupe d'incompatibilité B) est compatible avec l'origine de répllication pMB1 (groupe d'incompatibilité A) de nos plasmides conjugatifs.

Nous avons également utilisé la souche receveuse *E.coli* (appelée TEM1, voir génotype en annexe 3) contenant un gène de résistance à l'ampicilline (blaTEM-1) dans son chromosome, de même qu'une souche de *E.coli* TOP10 contenant le plasmide pSB4C5, résistant au chloramphénicol (voir génotype en annexe 3) pour la conjugaison avec RP4.

3.1.3 - Transformation du plasmide mobilisable dans la souche MFDpir chimio compétente

Préparation des bactéries MFDpir chimio compétentes :

Préparation du TSS (pour 10 ml) :

- 8,5 ml de LB
- 1g de PEG8000,
- 0,5 ml de DMSO,
- 0,5 ml de MgCl₂ 1M (pH 6,5)
- => filtrez à 0,22 μ m

Préparation des cellules :

- A partir d'une colonie, lancer la préculture dans 5 ml de LB+ DAP, incubé O/N à 37°C
- Ensemencer 20 ml de LB sans antibiotique avec 200 μ l de la préculture. Incuber à 37°C jusqu'à une D.O. de 0,5 (entre 2h et 4h)
- Aliquoter 1,5 ml dans des Eppendorfs, centrifuger 5 minutes à 3800 RPM, jeter le surnageant.
- Resuspendre dans 200 μ l de TSS refroidi à 0°C (sur glace). A ce stade les cellules sont compétentes et peuvent être stockées à -80°C

Transformation par chimio compétence :

- Mettre 100 μ l de cellules compétentes dans un Eppendorf et ajouter le plasmide (de 1 à 5 μ l) (environ 100 ng de vecteur si ligation)
- Incuber 25 minutes dans un bain de glace
- Choc thermique de 2 minutes à 42°C, et remettre sur glace au moins 5 minutes.
- Ajouter 1 ml de LB (+DAP) et incubé 1 heure à 37°C sous agitation.
- Étaler sur boîte LB (+antibiotique +DAP) 500 μ l, 250 μ l, 100 μ l de la culture et incubé O/N à 37°C

3.2 Sélection et vérification des bactéries recombinantes

Une souche de *E.coli* MFDpir a été transformée avec notre plasmide conjugatif par la méthode du type chimio compétente. Les bactéries transformées ont été sélectionnées sur Kanamycine, gène rapporteur

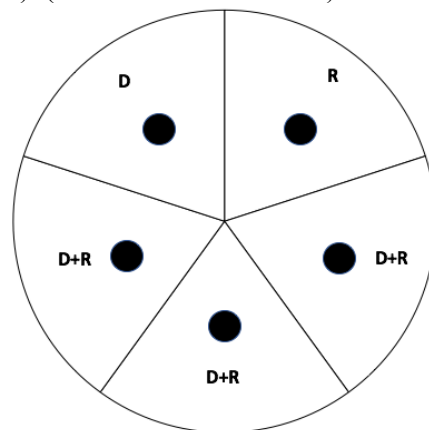
du plasmide pK18mob. Parmi les colonies obtenues, nous avons vérifié par PCR la présence de notre insert de taille d'environ 4900 pb.

3.3 Conjugaison bactérienne

Les conjugaisons entre la souche donneuse (D) contenant le plasmide de conjugaison avec notre cassette Crip/Cas9 et la souche receveuse (R) ont été réalisées soit en duplicat, soit en triplicat. Comme contrôle négatif, la même opération a été réalisée avec une souche donneuse contenant le plasmide de conjugaison, avec Cas9 mais sans le guide RNA. Nous avons utilisé et adapté un protocole par contact sur boîte de pétri, en utilisant un ratio d'environ une bactérie donneuse pour une bactérie receveuse (ratio 1/1) :

Protocole général de conjugaison

- Étalement sur deux boîtes (+antibiotique) O/N de la bactérie receveuse et donneuse à partir du stock glycérol
- Préculture d'une colonie dans 5ml de LB + antibiotique, et incubation à 37°C O/N
- Resuspension de 200 µl de la préculture dans 15 ml de LB + antibiotique, et incubation à 37°C environ 3 heures jusqu'à une D.O. (600nm) d'environ 0,500
- Lavages (x2):
 - o Centrifugation à 3800 RPM pendant 5 minutes. Suppression du surnageant.
 - o Resuspension du culot dans 1 ml de PBS 1x dans un Eppendorf.
- Centrifugation à 3800 RPM pendant 5 minutes. Suppression du surnageant.
- Resuspension du culot dans 500 µl de LB, et incubation à 37°C pendant 30 minutes.
- Conjugaison :
- Dépôt sur boîte de Pétri LB (sans antibiotique + DAP si nécessaire) de 15 µl de la souche receveuse (R), de la souche donneuse (D) et en triplicat de 15 µl de receveuse + 15 µl de donneuse par-dessus (D+R). (voir schéma ci-dessous)



- Incubation des boîtes (une boîte avec conjugaison contrôle et une boîte avec conjugaison Crispr/Cas9) pendant 18 heures à 37°C
- Décrochage des bactéries et resuspension dans 1 ml de LB.
- Lavage (optionnel, selon les cas) :
- Centrifugation à 3800 RPM pendant 5 minutes. Élimination du surnageant et resuspension du culot dans 1 ml de LB. Centrifugation à nouveau et resuspension dans 250 µl de LB.
- Incubation avant lecture des résultats :
- Dilution de chaque suspension de 10^{-1} à 10^{-6} et étalement sur boîte de LB (+ antibiotique) de 100 µl de culture. Incubation O/N à 37°C.
- Comptage et observation des colonies et calcul de l'efficacité de conjugaison.
Remarque : les ratios 1/1, 1/10, 10/1 entre la souche donneuse et receveuse ont parfois été testés.

Calcul de l'efficacité de conjugaison

Les bactéries receveuses sont sélectionnées facilement car en enlevant le DAP du milieu, les bactéries donneuses sont éliminées. Le taux d'efficacité de conjugaison peut ensuite s'exprimer par le rapport entre le nombre de bactéries receveuses ayant reçu le plasmide conjugatif et le nombre total de bactéries receveuses total.

Formule :

$$\text{Efficacité de conjugaison} = \frac{\text{\# de bactéries receveuses ayant reçu le plasmide}}{\text{\# de bactéries receveuses}}$$

On peut également déterminer le taux d'efficacité de Crispr/Cas9 en comparant les résultats entre les souches conjuguées et les souches contrôles.

3.4 Début de construction d'un plasmide conjugatif autonome

La première possibilité testée pour insérer notre cassette Crispr/Cas9 dans le plasmide RP4 de 60kb, est la digestion/ligation classique. Nous avons associé à cette cassette un gène de résistance au chloramphénicol pour la sélection des bactéries recombinantes.

Tentative de construction d'un RP4 par digestion/ligation

La cassette Cas9_guideRNA de notre plasmide pIG-K1 a été utilisée et réamplifiée avec les amorces JR-K7-Fw et JR-K7-Rev (voir annexe 1) afin d'obtenir un site de restriction BglII à son extrémité 5' et PstI en 3'. Nous avons également amplifié par PCR, avec les amorces JR-Cm-Fw et JR-Cm-Rev (voir annexe 1), le gène de résistance au chloramphénicol du plasmide pSW23T afin d'avoir un site PstI à l'extrémité 5' et un site BglIII à l'extrémité 3'.

Après ligation, la cassette Cas9_guideRNA+ chloramphénicol (voir résultats) sera réamplifiée par PCR avec les amorces JR-K7-Bgl-Fw et JR-K7-Bgl-Rev pour pouvoir ensuite être insérée dans le plasmide RP4 par le site unique BglIII (Fig. 11)

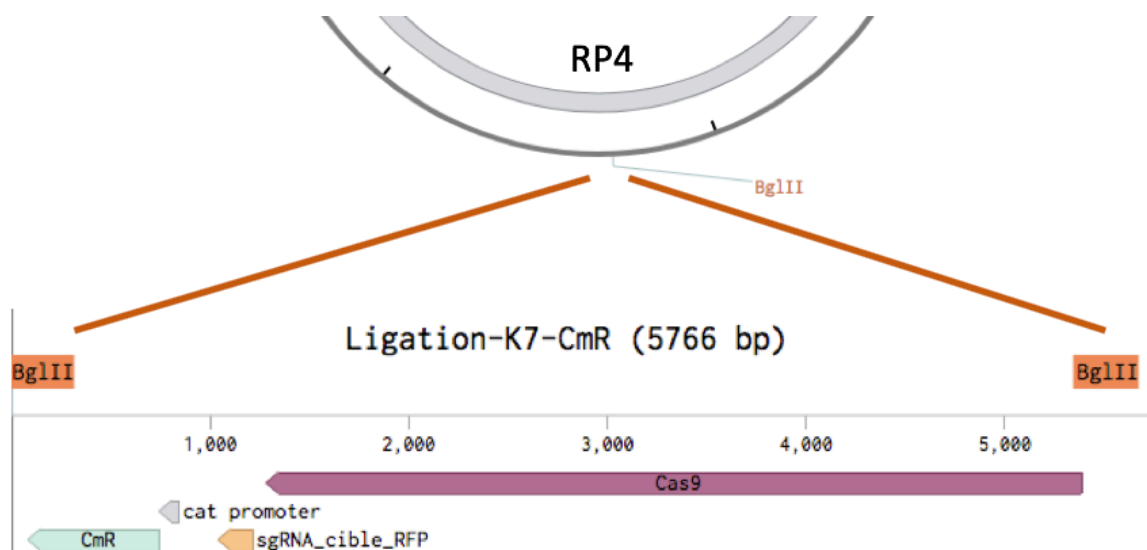


Figure 11 : Schéma de la construction à réaliser pour l'insertion de la cassette Crispr/Cas9 et CmR (en vert), dans le plasmide RP4. Le site BglIII (en orange) servira de point d'insertion.

Miniprep « old school » du plasmide RP4 (60kb)

Étant donné les mauvais résultats, probablement dus à la grande taille du plasmide RP4, obtenus par les kits commerciaux, nous avons utilisé une technique de miniprep à l'ancienne, adaptée d'un protocole prévu pour BACs, à partir de la souche *E.coli* CM140 (voir génotype en annexe 3)

Préparation des solutions :

Solution 1 : 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8

Solution 2 : 1% SDS, 0,2 M NaOH

Solution 3 : Acétate de potassium 3M, pH 5,5

Protocole :

- A partir d'une colonie, préculture dans 5 ml LB de la souche contenant le plasmide RP4 et incubation à 37°C O/N
- Centrifugation de la préculture 1 minutes à 13500 RPM
- Retirer le surnageant et ajouter 200 µl de Solution 1, resuspendre et placer le contenu dans un Eppendorf
- Ajout de 200 µl de Solution 2 fraîchement préparée et inverser les tubes 5 ou 6 x
- Ajout de 20 µl de Solution 3 refroidie sur glace et inverser les tubes 5 ou 6 x
- Centrifuger 7 minutes à 13500 RPM
- Transférer 500 µl de surnageant dans un nouvel Eppendorf
- Ajout de 1 ml d'Éthanol 100% (froid à -20°C). Bien mélanger en inversant les tubes et incuber 20 minutes à -20°C
- Centrifuger 15 minutes à 13500 RPM
- Retirer le surnageant et ajout de 100 µl d'Éthanol 70% (froid à -20°C)
- Centrifuger 2 minutes à 13500 RPM
- Retirer tout l'éthanol délicatement. Laisser le tube ouvert environ 5 minutes pour bien sécher.
- Ajout d'environ 25 µl (à adapter en fonction de la concentration voulue) d'H₂O MilliQ pour redissoudre le plasmide.

Vérification de la présence du site BglIII dans RP4

Le plasmide RP4 a été isolé et purifié par miniprep « old school ». La vérification de la présence du site de restriction BglIII a été réalisée en s'appuyant sur la séquence disponible et nous avons amplifié par PCR une région de 3000 pb du RP4 avec les amorces JR-Rp4-bgl-fw et JR-Rp4-bgl-rev (voir annexe 1). Ensuite, une digestion a été effectuée par BglIII sur cette amplification PCR. Le résultat a été placé sur gel pour vérification (voir résultats).

4. Résultats expérimentaux

4.1 Construction et vérification du plasmide de conjugaison

La construction du plasmide de conjugaison mobilisable a été réalisée en deux temps : insertion du gène Cas9 par digestion ligation par XmaI et XbaI dans le plasmide pK18mob, suivi de l'insertion du guide RNA par XbaI et PstI. Le plasmide ne contenant que le gène Cas9 servira comme plasmide de contrôle négatif. (Voir Matériel et méthodes)

Vérification de la présence de l'insert Cas9 :

Après purification et linéarisation du plasmide par digestion avec XmaI, nous avons vérifié les tailles sur gel. Le plasmide n'ayant pas reçu l'insert doit avoir une taille de 3793 pb. Si il a reçu l'insert Cas9, il doit avoir une taille de 8262 pb.

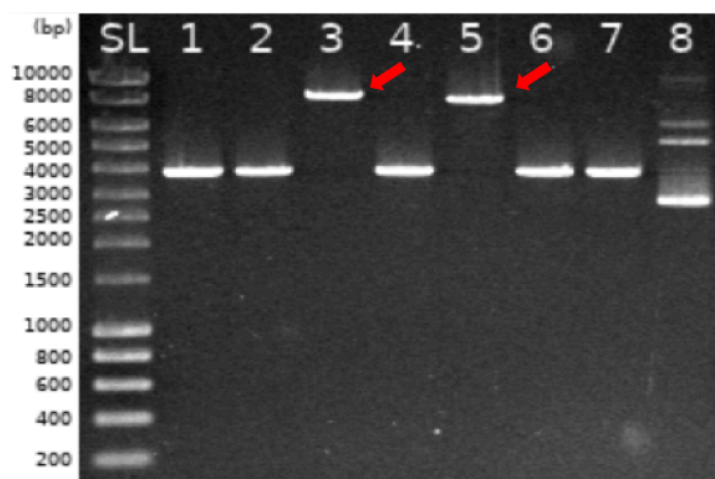


Figure 12 : Vérification de la présence de l'insert Cas9 dans le plasmide conjugatif. SL : SmartLadder, 1,2,4,6,7 : plasmide sans l'insert, 3 et 5 : plasmide avec insert Cas9, 8 : plasmide non-digéré.

On peut observer sur le gel (Fig. 12) que deux plasmides (#3 et #5) ont une taille d'environ 8000 pb. Ces deux clones semblent donc avoir bien reçu l'insert Cas9 dans le plasmide pK18mob après ligation. Ces deux clones ont été placés à -80°C en stock glycérol 25%.

Le plasmide final issu de pK18mob avec l'insert Cas9 a été dénommé : **pIG-K0**

Vérification de la présence de l'insert sgRNA :

Après l'insertion du guide RNA par ligation, nous avons fait une amplification par PCR et vérifié la taille de l'insert (Voir Matériel et méthodes). La présence du guide RNA devrait donner une taille de 857 pb, et sans l'insertion, une taille de 637 pb.

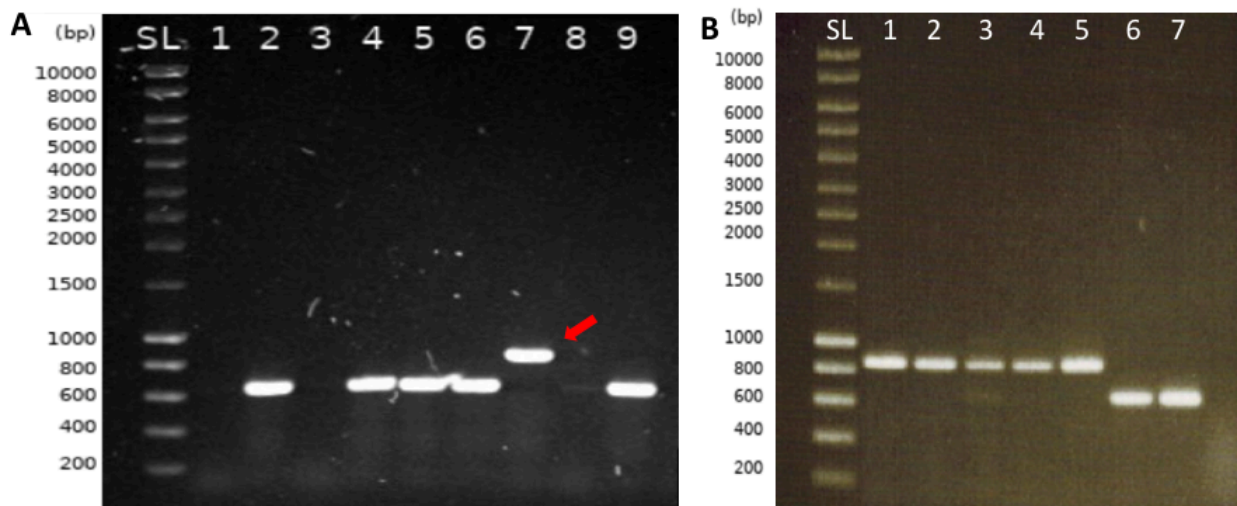


Figure 13 : Vérification de la présence du guide RNA. (A) dans le plasmide pIG-K1. SL : SmartLadder, 1 à 6 et 8 à 9 : plasmide sans l'insert ou non présent. 7 : plasmide ayant reçu l'insert. (B) dans le plasmide pIG-K2. SL : SmartLadder, 1 à 5 : plasmide ayant reçu l'insert. 6 et 7 : plasmide sans l'insert

On peut observer sur le gel (Fig. 13) que le fragment amplifié au départ du plasmide #7 a bien la taille PCR attendue d'environ 850 pb. Ce clone a donc bien reçu le guide RNA anti-RFP dans le plasmide pK18mob_Cas9 après ligation. De même, cinq clones (#1 à #5) ont reçu le guide RNA anti-Amp après ligation (Fig. 13 B). Ces clones ont été placés à -80°C en stock glycérol 25%.

Le plasmide final issu de pK18mob avec l'insert Cas9 et le guide RNA ont été dénommés :

- **pIG-K1** (pour le guide RNA ciblant le gène de la RFP)
- **pIG-K2** (pour le guide RNA ciblant le gène de résistance à l'ampicilline)

Transformation

Les souches de *E. coli* MFDpir ont été transformées par chimio compétence (Voir Matériel et méthodes). Les clones de *E. coli* MFDpir ayant reçu nos plasmides pIG-K1 et pIG-K2 ont été mis en stock glycérol à -80°C .

Ces souches ont été dénommées :

- **sJR012** (MFDpir contenant le plasmide pIG-K1 anti-Amp)
- **sJR013** (MFDpir contenant le plasmide pIG-K2 anti-RFP)
- **sJR014** (MFDpir contenant le plasmide contrôle pIG-K0 sans sgRNA)

Séquençage de l'insert Cas9 et sgRNA

Le séquençage a été effectué par la société Macrogen. L'analyse du séquençage n'a montré aucune mutation et montre les séquences attendues.

4.2 Test de conjugaison et vérification

Contrôle de la croissance des souches sur antibiotiques

Il faut avant tout s'assurer que les antibiotiques vont bien pouvoir sélectionner nos différentes souches bactériennes avant et après la conjugaison. Nous avons donc vérifié, avant chaque manipulation, la

croissance de nos souches sur les différents antibiotiques utilisés pour la sélection des transconjugants. (voir récapitulatif Table 2)

Table 2 : récapitulatif des contrôles de croissance sur antibiotiques avant les conjugaisons

Souche	Résistance	Milieu de culture	CFU
Donneuse sJR14	KanR (DAP ⁻)	DAP/Kan	>1000
“	“	Kan	0
“	“	Amp	0
“	“	Amp/Kan	0
“	“	DAP	0
Donneuse sJR12	KanR (DAP ⁻)	DAP/Kan	>1000
“	“	Kan	0
“	“	Amp	0
“	“	Amp/Kan	0
“	“	DAP	0
Donneuse sJR13	KanR (DAP ⁻)	DAP/Kan	>1000
“	“	Kan	0
“	“	Amp	0
“	“	Amp/Kan	0
“	“	DAP	0
Receveuse sJR07	AmpR	Amp	>1000
“	“	Amp/Kan	0
“	“	Kan	0
Receveuse TEM1	AmpR ^{CHR}	Amp	>1000
“	“	Kan	0
“	“	Amp/Kan	0
Receveuse Top10 pSB4C5	CmR	Cm	>1000
“	“	Amp	0
“	“	Kan	0

Les contrôles effectués sont corrects. Les antibiotiques vont pouvoir effectuer une sélection post-conjugaison entre les bactéries donneuses et receveuses. Les souches donneuses ne poussent pas sans DAP. L'absence de DAP dans le milieu pourra donc servir à ne sélectionner que les bactéries receveuses après conjugaison.

Essai de conjugaison

Les essais de conjugaison ont été réalisés avec la souche donneuse MFDpir (DAP⁻) portant le plasmide conjugatif : soit avec l'insert Cas9 comme contrôle (sJR14), soit avec l'insert Cas9 et un des deux guides RNA cibles (sJR12 et sJR13).

Avant de tester l'efficacité de Crispr/Cas9, nous avons effectué des tests afin de trouver un protocole et de s'assurer que la conjugaison s'effectue correctement. Plus important : pouvoir compter et estimer l'efficacité de la conjugaison. Le premier bon résultat a permis de valider le protocole de conjugaison mis en place (voir matériel et méthodes).

La souche donneuse (**D**) (sJR14) DAP⁻ contient le plasmide conjugatif pK18mob+Cas9 résistant à la kanamycine et la souche receveuse (**R**) (sJR07) contient le gène RFP dans un plasmide résistant à l'ampicilline.

Comptage du nombre de bactéries donneuses et receveuses :

Souche	Milieu de culture	Dilution	CFU
Receveuse sJR07	Amp	10 ⁻³	214
Receveuse sJR07	Amp	10 ⁻⁴	29
Donneuse sJR14	DAP/Kan	10 ⁻³	24

Résultats post-conjugaison (Duplicat):

Souche (D+R)	Milieu de culture	Dilution	CFU
(1) sJR14 + sJR07	Kan	10 ⁻⁰	54
(1) sJR14 + sJR07	Amp/Kan	10 ⁻⁰	36
(2) sJR14 + sJR07	Kan	10 ⁻⁰	31
(2) sJR14 + sJR07	Amp/Kan	10 ⁻⁰	51

Le nombre de bactéries, après conjugaison et sélection par antibiotique, nous indique que la bactérie receveuse sJR07 a bien reçu le plasmide conjugatif (à résistance KanR) et monte également qu'elle a gardé les deux plasmides (conjugatif à résistance Kan, et son propre plasmide RFP à résistance Amp). L'absence de DAP dans le milieu nous permet de ne sélectionner que les bactéries receveuses. On peut estimer un taux d'efficacité de la conjugaison à $\approx 1,2 \times 10^{-4}$

Ce premier résultat nous permet de valider le protocole de conjugaison. Celui-ci sera bien entendu à optimiser.

Vérification moléculaire de la conjugaison par PCR

Nous avons effectué une vérification par PCR de la présence du plasmide conjugatif dans la souche receveuse en utilisant les amorces 499 et 500 (Voir annexe). La taille attendue devrait être un fragment d'environ 250 pb.

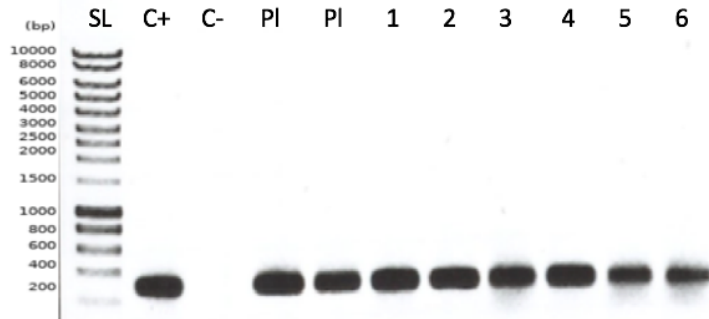


Figure 14 : Vérification de la présence du plasmide de conjugaison dans le souche receveuse. SL : SmartLadder, C+ : contrôle positif avec la souche donneuse sJR14, C- : contrôle négatif avec la souche receveuse sJR07, PI : Contrôle positif avec le plasmide issu de sJR14, 1 à 6 : souches receveuses ayant reçu le plasmide de conjugaison.

La PCR confirme bien la présence du plasmide conjugatif dans les six bactéries receveuses testées (Fig. 14, de 1 à 6) par l'amplification d'un fragment attendu de 250 pb. Les contrôles positifs (C+ sur la souche sJR14) ainsi que sur le plasmide purifié (PI) sont également corrects. Le contrôle négatif sur la souche receveuse non conjuguée (C-) est correct.

4.3 Test visuel de l'efficacité Crispr sur le gène RFP plasmidique

Nous allons à présent vérifier le bon fonctionnement de la conjugaison et de Crispr/Cas9 par un test visuel. La bactérie receveuse contient un plasmide encodant la RFP. Si le système fonctionne correctement, Crispr/Cas9 devrait couper le gène de la RFP post-conjugaison. Un contrôle est effectué en parallèle avec une souche donneuse, sans guide RNA, ne contenant que Cas9.

Paramètres de conjugaison : durée de contact : 21 heures, Ratio D/R : 1/1, D.O. : env. 0,500
 Souche donneuse D: sJR13 (KanR, DAP⁻) Souche donneuse contrôle D: sJR14 (KanR, DAP⁻)
 Souche receveuse R: sJR07 (AmpR)

Comptage des bactéries receveuses et donneuses :

Souche	Milieu de culture	Dilution	CFU
Receveuse sJR07	Amp	10 ⁻⁴	≈ 600 rouges
Receveuse sJR07	Amp	10 ⁻⁵	39 rouges
Donneuse sJR13	DAP/Kan	10 ⁻²	18 blanches

Résultats post-conjugaison (duplicat):

Souches (D+R)	Milieu de culture	Dilution	CFU transconjugants
sJR13 + sJR07	Kan	10 ⁻⁰	296 blanches
sJR13 + sJR07	Kan/Amp	10 ⁻⁰	420 blanches
sJR13 + sJR07	Kan	10 ⁻⁰	332 blanches
sJR13 + sJR07	Kan/Amp	10 ⁻⁰	616 blanches
Contrôles (D+R)			
sJR14 + sJR07	Kan	10 ⁻⁰	72 rouges (*)
sJR14 + sJR07	Kan/Amp	10 ⁻⁰	42 rouges (*)
sJR14 + sJR07	Kan	10 ⁻⁰	76 rouges (*)
sJR14 + sJR07	Kan/Amp	10 ⁻⁰	99 rouges (*)

Le nombre de bactéries, après conjugaison, nous indique que la bactérie receveuse a bien reçu le plasmide conjugatif (KanR). Comme il n'y a pas de DAP dans le milieu, seules les bactéries receveuses sont sélectionnées. Le taux d'efficacité de la conjugaison est estimé à $\approx 1,4 \times 10^{-4}$. La perte de coloration rouge de la RFP monte également que Crispr/Cas9 a bien fonctionné en coupant le gène de la RFP.

(*) On observe également le présence de 1 à 5 colonies blanches. Ce point sera discuté ci-dessous. (Voir discussion)

4.4 Test de l'efficacité Crispr sur le gène AmpR plasmidique

Nous allons à présent vérifier le bon fonctionnement de la conjugaison et de Crispr/Cas9 contenant le guide RNA ciblant le gène AmpR. La bactérie receveuse contient un plasmide RFP AmpR. Si le système fonctionne correctement, Crispr/Cas9 devrait couper le gène AmpR post-conjugaison. Un contrôle est effectué en parallèle avec une souche donneuse, sans guide RNA, ne contenant que Cas9.

Paramètres de conjugaison : durée de contact : 20 heures, Ratio D/R : 1/1, D.O. : env. 0,500
 Souche donneuse D: sJR12 (KanR, DAP⁻) Souche donneuse contrôle D: sJR14 (KanR, DAP⁻)
 Souche receveuse R: sJR07 (AmpR)

Comptage des bactéries receveuses et donneuses :

Souches (D+R)	Milieu de culture	Dilution	CFU
Receveuse sJR07	Amp	10 ⁻⁴	178
Receveuse sJR07	Amp	10 ⁻⁵	61
Donneuse sJR14	DAP	10 ⁻¹	Tapis
Donneuse sJR14	DAP	10 ⁻²	≈ 800

Résultats post-conjugaison (duplicat)

Souches (D+R)	Milieu de culture	Dilution	CFU transconjugants
sJR12 + sJR07	Kan	10 ⁻⁰	374 blanches → 0 (*)
sJR12 + sJR07	Kan/Amp	10 ⁻⁰	333 blanches → 0 (*)
sJR12 + sJR07	Kan	10 ⁻⁰	232 blanches → 0 (*)
sJR12 + sJR07	Kan/Amp	10 ⁻⁰	269 blanches → 0 (*)
Contrôles (D+R)			
sJR14 + sJR07	Kan	10 ⁻⁰	83 rouges → Tapis (‡)
sJR14 + sJR07	Kan/Amp	10 ⁻⁰	131 rouges → Tapis (‡)
sJR14 + sJR07	Kan	10 ⁻⁰	197 rouges → Tapis (‡)
sJR14 + sJR07	Kan/Amp	10 ⁻⁰	294 rouges → Tapis (‡)

Le nombre de bactéries, après conjugaison, nous indique que la bactérie receveuse a bien reçu le plasmide conjugatif (KanR). Comme il n'y a pas de DAP dans le milieu, seules les bactéries receveuses sont sélectionnées. Le taux d'efficacité de la conjugaison pour sJR12 est estimé à $\approx 1,7 \times 10^{-4}$

La perte de coloration rouge de la RFP indique que Crispr/Cas9 a fonctionné en coupant le plasmide au niveau du gène de résistance à l'ampicilline. Malgré tout, comme pour l'expérience précédente avec la RFP, les premiers transconjugants poussent toujours avec de l'ampicilline. Néanmoins, si on les recultive sur ampicilline à nouveau, les bactéries sJR07 ayant été coupées dans le gène de résistance à l'ampicilline par Crispr/Cas9 ne poussent plus (*) tandis que les bactéries receveuses n'ayant pas été coupées dans le plasmide continuent à pousser sur ampicilline (‡). (Test effectué sur 10 colonies). L'explication de ce résultat est dû à la présence résiduelle des β -lactamases malgré la disparition du plasmide (Voir Discussions). On observe toujours la présence de quelques bactéries blanches (entre 1 et 5 %) parmi les bactéries rouges après conjugaison contrôle de sJR14 avec sJR07. Cela est probablement dû, en partie, à une perte de plasmide ou d'expression de la RFP (Voir discussion)

Une vérification moléculaire par PCR a confirmé la présence de plasmide de conjugaison dans la souche receveuse.

4.5 Test de l'efficacité Crispr sur le gène AmpR chromosomique

Nous allons à présent vérifier le bon fonctionnement de la conjugaison et de Crispr/Cas9 contenant le guide RNA ciblant le gène AmpR introduit dans le chromosome d'une bactérie receveuse (AmpR^{CHR}). Si le système fonctionne correctement, Crispr/Cas9 devrait couper le gène AmpR^{CHR} post-conjugaison et la bactérie ne devrait plus survivre sur ampicilline. Un contrôle est effectué en parallèle avec une souche donneuse, sans guide RNA, ne contenant que Cas9.

Paramètres de conjugaison : durée de contact : 19 heures, Ratio D/R : 1/1, D.O. : env. 0,500
Souche donneuse D: sJR12 (KanR, DAP⁻) Souche donneuse contrôle D: sJR14 (KanR, DAP⁻)
Souche receveuse R: TEM1 (AmpR^{CHR})

Comptage des bactéries receveuses et donneuses :

Souche	Milieu de culture	Dilution	CFU
Receveuse TEM1	Amp	10 ⁻⁴	tapis
Receveuse TEM1	Amp	10 ⁻⁵	≈ 1000

Résultats post-conjugaison (duplicat)

Souche (D+R)	Milieu de culture	Dilution	CFU transconjugants
sJR12 + TEM1	Kan/Amp	10 ⁰	14
sJR12 + TEM1	Kan	10 ⁻¹	0
sJR12 + TEM1	Kan/Amp	10 ⁻¹	1
sJR12 + TEM1	Kan	10 ⁻³	0
sJR12 + TEM1	Kan/Amp	10 ⁻³	0
sJR12 + TEM1	Kan	10 ⁻¹	0
sJR12 + TEM1	Kan/Amp	10 ⁻¹	1
sJR12 + TEM1	Kan	10 ⁻³	0
sJR12 + TEM1	Kan/Amp	10 ⁻³	0
Contrôles :			
sJR14 + TEM1	Kan	10 ⁻¹	960
sJR14 + TEM1	Kan/Amp	10 ⁻¹	1200
sJR14 + TEM1	Kan	10 ⁻³	8
sJR14 + TEM1	Kan/Amp	10 ⁻³	6
sJR14 + TEM1	Kan	10 ⁻¹	1360
sJR14 + TEM1	Kan/Amp	10 ⁻¹	2240
sJR14 + TEM1	Kan	10 ⁻³	13
sJR14 + TEM1	Kan/Amp	10 ⁻³	18

Les contrôles effectués avec la souche donneuse sJR14 nous montrent que la bactérie receveuse a bien reçu le plasmide conjugatif, résistant à la Kanamycine. Comme il n'y a pas de DAP dans le milieu, seules les bactéries receveuses sont sélectionnées. Les résultats avec la souche donneuse contenant le système Crispr/Cas9 montrent que le gène chromosomique de résistance à l'ampicilline a bien été coupé. Les bactéries receveuses ne poussent plus (Voir photo, annexe 5). Le taux d'efficacité de la conjugaison est estimé à $\approx 1,3 \times 10^{-4}$ et le taux d'efficacité de Crispr/Cas9 est estimé à 99,999 %. Ces résultats nous indiquent que notre système fonctionne également pour des gènes présents dans le chromosome et que le plasmide conjugatif devient alors un plasmide « tueur ».

4.6 Construction d'un plasmide autonome : 1ère partie

La souche utilisée pour cette construction est une *E.coli* CM140 (voir génotype en annexe), qui contient le plasmide RP4.

4.6.1 – Vérification de la présence du plasmide RP4

Le kit miniprep commercial étant peu efficace pour la récupération de plasmides de grande taille, nous avons effectué une miniprep à l'ancienne (voir matériel et méthodes). La mise sur gel nous montre que nous pouvons utiliser cette technique pour récupérer le plasmide RP4. La taille du plasmide, difficile à estimer sur le gel (Fig. 15) est nettement supérieure à 20 kb.

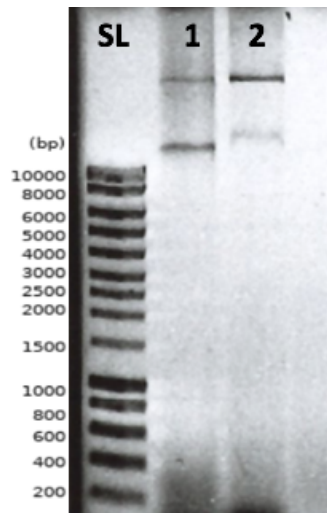


Figure 15 : Miniprep du plasmide RP4. S : SmartLadder, 1 et 2 : plasmide RP4 sous différentes formes.

4.6.2 – Vérification de la conjugaison du RP4 à différents ratios

Avant d'effectuer la construction génétique sur le RP4, il est nécessaire de vérifier que ce plasmide conjugue correctement. Nous avons testé cette conjugaison avec la souche CM140 (contenant le RP4 qui porte des marqueurs de résistance à l'ampicilline, à la tétracycline et à la kanamycine) et une souche receveuse Top10 (contenant un plasmide pSB4C5 résistant au chloramphénicol). Trois ratios donneuses/receveuses ont été testés : 10/1, 1/1, 1/10.

Remarque : des résultats similaires ont été obtenus avec la souche receveuse DS984 (voir génotype en annexe) contenant un gène de résistance au chloramphénicol dans son chromosome.

Paramètres de conjugaison : durée de contact : 16 heures, Ratio D/R : 1/1, 1/10, 10/1

Souche donneuse : CM140-RP4 (KanR, AmpR, TetR)

Souche receveuse : Top10-pSB4C5 (CmR)

Vérification de contrôle de croissance sur antibiotique :

Souche	Milieu de culture	Dilution	CFU
Donneuse CM140	Kan	10^{-0}	>1000
Donneuse CM140	Amp	10^{-0}	>1000
Donneuse CM140	Cm	10^{-0}	0
Receveuse Top10	Kan	10^{-0}	0
Receveuse Top10	Amp	10^{-0}	0
Receveuse Top10	Cm	10^{-0}	>1000

Les résultats des contrôles sont bien corrects. Les antibiotiques vont pouvoir effectuer une sélection post-conjugaison entre les bactéries donneuses et receveuses.

Comptage des bactéries receveuses et donneuses :

Souche	Milieu de culture	Dilution	CFU
Receveuse Top10	Cm	10^{-3}	480
Receveuse Top10	Cm	10^{-4}	42
Receveuse Top10	Cm	10^{-5}	3

Résultats post-conjugaison (duplicat)

Souche (D+R)	Milieu de culture	Dilution	CFU transconjugants
Ratio 1/1			
CM140 + Top10	Cm/Kan	10 ⁻³	146
CM140 + Top10	Cm/Kan	10 ⁻⁴	22
Ratio 1/10			
CM140 + Top10	Cm/Kan	10 ⁻³	160
CM140 + Top10	Cm/Kan	10 ⁻⁴	26
Ration 10/1			
CM140 + Top10	Cm/Kan	10 ⁻³	81
CM140 + Top10	Cm/Kan	10 ⁻⁴	4

Ces résultats nous indiquent le bon fonctionnement de la conjugaison du plasmide RP4. La comparaison entre le nombre total de bactéries receveuses et le nombre de transconjugants ayant acquis le RP4 permet d'estimer la **grande efficacité de conjugaison du RP4** : environ 52 % pour un ratio 1/1, 62% pour le ration 1/10 mais curieusement, seulement 9% pour le ration 10/1 (Voir discussion).

4.6.3 - Vérification de la présence du site BglII dans RP4

Avant de lancer la construction génétique dans le RP4, nous avons validé la présence d'un site de restriction unique (BglII) dans la séquence du RP4 qui pourrait convenir pour l'insertion de notre cassette Crispr/Cas9. Nous avons amplifié par PCR une région d'environ 3000 pb autour de ce site. Nous l'avons ensuite digérée par BglII pour vérifier qu'il y a bien sa présence dans le plasmide RP4. BglII doit couper et donner deux fragments d'environ 1500 pb chacun.

Après digestion par BglII, on peut observer les deux fragments de ≈ 1500 pb (Fig. 16). On a bien la présence du site BglII dans cette région du RP4.

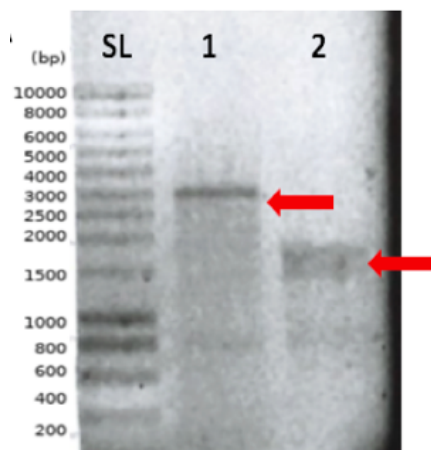


Figure 16 : Vérification de la présence du site BglII dans le RP4. SL : SmartLadder, 1 : fragment PCR, 2 : fragments digérés par BglII

4.6.4 -Amplification et ligation de la cassette Crispr/Cas9 avec le gène CmR

Afin de pouvoir effectuer une sélection efficace de notre insert, nous avons fusionné par ligation notre cassette Crispr/Cas9 avec le gène de résistance au chloramphénicol (CmR). Le gène CmR ainsi que son promoteur ont été amplifiés à partir du plasmide pSW23T (Voir matériel et méthodes) La taille attendue est de 1007 pb. Le résultat montre une amplification correcte du gène de résistance au chloramphénicol (Fig. 17 A). Ensuite, la cassette Crispr/Cas9 a été récupérée a parti du plasmide pIG-

K1 puis liguée avec le gène CmR (Voir matériel et méthodes). Après ligation, la réamplification de cette nouvelle cassette doit donner une taille de 5766 pb.

Le résultat montre bien l'amplification d'une taille de ≈ 6 kb (Fig. 17 B) mais avec néanmoins une forte bande inattendue à 1kb. Il faudra découper et purifier la bande de 6 kb ou recommencer l'opération avec d'autres amorces.

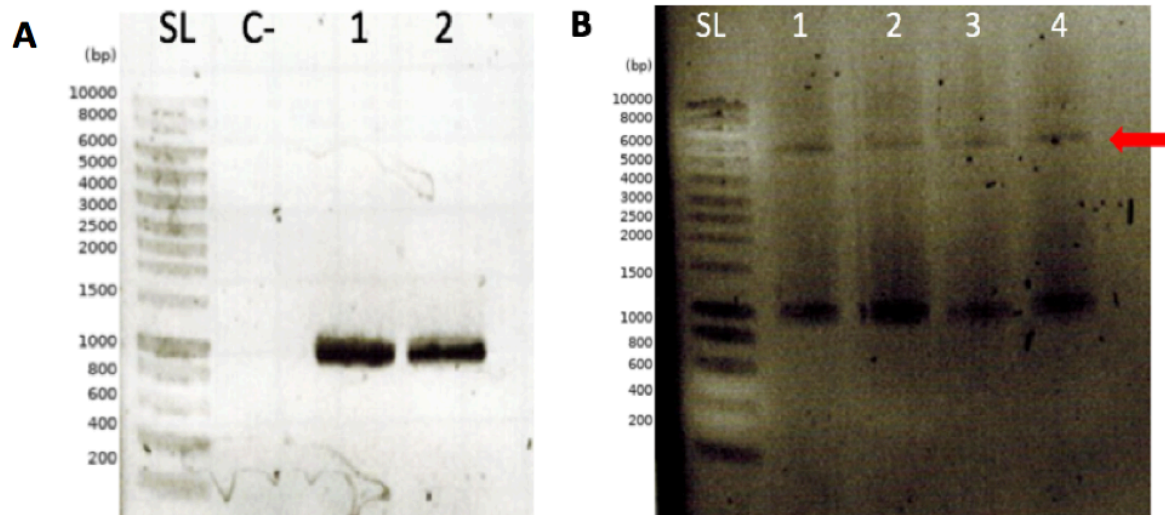


Figure 17 : (A) Amplification du gène de résistance au chloramphénicol. SL : SmartLadder, C- : Contrôle négatif, 1 et 2 : fragment PCR (B) Amplification de la cassette Crispr/Cas9 avec CmR. SL : SmartLadder, de 1 et 4 : fragments PCR après ligation

Finalement, il restera à insérer cette nouvelle cassette (Fig. 18) dans le plasmide RP4, via digestion et ligation par son site unique BglIII (Voir matériel et méthodes)

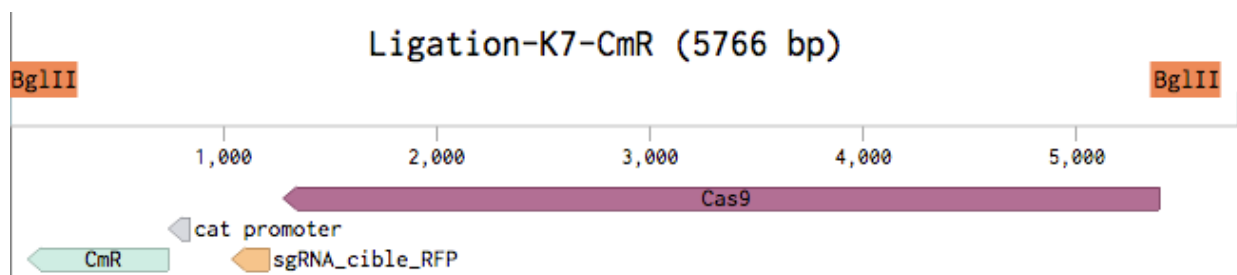


Figure 18 : structure de la cassette Cas9, sgRNA, CmR destinée à être insérée dans le plasmide RP4 par le site BglIII.

5 Discussion et perspectives

Après plusieurs essais, notre système a montré son bon fonctionnement. Il est donc possible d'utiliser la conjugaison bactérienne avec notre plasmide comme moyen pour véhiculer un système Crispr/Cas9 vers une bactérie cible, afin d'y couper un gène de résistance à un antibiotique. Bien que dans l'ensemble ce système fonctionne, il serait important de l'améliorer à plusieurs niveaux.

Choix et construction du plasmide

Le choix de notre plasmide s'est basé sur les différentes informations trouvées dans la littérature mais aussi en fonction des plasmides et séquences disponibles au laboratoire. Le plasmide de conjugaison de type mobilisable – pK18mob - que nous avons utilisé nous a été fourni par le CEN et nous avons concentré nos efforts sur ce plasmide avec la souche *E.coli* MFDpir. C'est avec ce duo que nous avons réussi à mettre au point un protocole de conjugaison fonctionnel et sommes restés concentrés sur celui-ci.

La construction du plasmide avec l'insertion d'une cassette comprenant le promoteur constitutif et le gène de Cas9, couplé avec un guide RNA ciblant le gène désiré (RFP ou AmpR), a été initié lors du concours iGem. Malheureusement nous ne sommes jamais parvenus lors de ce concours à faire conjuguer correctement ce plasmide avec la souche choisie (S17-1) de manière à pouvoir observer et calculer l'efficacité. En effet, il semble que certains plasmides soient modifiés après conjugaison par la souche S17-1, et cela est dû en partie à un co-transfert d'ADN à partir du chromosome (Akkvik et al., 2014). Nous avons donc, dans le doute, refait la construction génétique et essayé avec une autre souche bactérienne : MFDpir (voir génotype en annexe). Cette souche portant la machinerie de conjugaison RP4 dans son chromosome s'est avérée très efficace lors de nos essais. Elle a aussi l'avantage d'être auxotrophe pour le DAP, ce qui permet une sélection efficace, après conjugaison, entre les bactéries « donneuses » et les bactéries « receveuses ».

La **séquence de Cas9** que nous avons utilisée provient de la séquence du plasmide pCAS9 (Jiang et al., 2015). Nous avons donc utilisé le gène Cas9 de *S. pyogenes* ainsi que son promoteur constitutif. Nous pourrions envisager de modifier le promoteur afin d'optimiser notre système. Par exemple, un promoteur plus fort pourrait l'améliorer mais ne semble pas nécessaire pour deux raisons : (i) le système tel quel montre déjà une efficacité de Crispr proche de 100 % et (ii) la (sur)production de Cas9 n'est pas optimale pour la bactérie. En effet, on peut constater sur nos boîtes de culture que les souches portant notre plasmide de conjugaison Crispr/cas9 ont du mal à pousser, en comparaison avec cette même souche sans Cas9. Le fitness de la bactérie est affecté et Cas9 semble montrer une certaine « toxicité » comme l'ont déjà montré d'autres études (Misra et al., 2019). Pour contrer ce phénomène, nous pourrions envisager l'utilisation d'un promoteur faible et/ou inductible.

La **séquence du guide RNA** pour le système Crispr a été choisie en tenant compte de différents facteurs. La séquence de 20 pb autour de la séquence PAM, destinée à cibler l'ADN que l'on souhaite couper, a été choisie et vérifiée via un logiciel en ligne afin d'éviter trop d'« Off-Target ». Pour plus d'efficacité, nous avons également choisi ces séquences (anti-RFP et anti-Amp) pour matcher avec un maximum de variantes de séquences cibles. Ainsi, par exemple, notre guide RNA anti-RFP pourrait couper les variantes RFP, RFP1, et mCherry. Le promoteur j23119 et le terminateur utilisé ont été choisis car ils ont déjà montré leur efficacité et ne contenaient pas de site de restriction XbaI, XmaI et PstI dont nous avons besoin pour la construction de notre plasmide. Il serait intéressant de pouvoir **optimiser notre séquence** au maximum. Par exemple, le choix d'un promoteur inductible pourrait nous permettre d'avoir un meilleur contrôle sur l'expression du guide RNA (ou du gène Cas9). Nous pourrions aussi optimiser la séquence même du guide RNA. En effet, plusieurs séquences sont possibles comme guide Crispr et, bien que leurs efficacités théoriques soient proches, certains sont peut-être concrètement plus efficaces que d'autres. Le plus intéressant serait d'avoir une **combinaison de guide RNA**. En effet, notre guide RNA ne cible qu'une seule région de notre ADN. On pourrait par exemple, comme cela a déjà été testé dans d'autres études (Cong et al., 2013) utiliser deux (ou plus) guides ARN

afin de cibler et couper plusieurs cibles en même temps. On pourrait alors cibler le gène de résistance de plusieurs antibiotiques, ce qui est finalement le but à atteindre dans le cas de bactéries multi-résistantes. Il serait également envisageable, d'un point de vue **biosécurité**, d'y ajouter un guide RNA qui cible son propre plasmide afin de s'autodétruire, pour avoir ainsi un meilleur contrôle du plasmide et éviter la propagation d'un plasmide artificiel. D'autres systèmes sont également possible afin d'avoir un plasmide de type « suicide ».

Si le but final est d'éliminer des bactéries résistantes aux antibiotiques, il est sans doute préférable d'avoir la meilleure efficacité de propagation et le plus large spectre d'hôtes possibles afin d'atteindre un maximum de bactéries cibles.

Optimisation de la conjugaison

La première conjugaison relativement efficace a été réalisée par la souche donneuse MFDpir. Cette souche portant notre plasmide de conjugaison avec seulement Cas9 (sJR14) a servi pour les conjugaisons de contrôle, car elle ne contient pas le guide RNA, vers la cible. La souche MFDpir portant le plasmide de conjugaison ciblant le gène AmpR (sJR012) ou ciblant le gène RFP (sJR013) ont été utilisées pour tester l'efficacité de notre système Crispr/Cas9.

La mise au point d'un **protocole de conjugaison** a été longue et fastidieuse. Elle a consommé beaucoup de temps avant d'obtenir un résultat correct. De plus, l'étalement sur boîte, la préculture, la mesure de la densité optique, les lavages des souches, la mise en contact, l'étalement, la remise en culture et le comptage des bactéries prend au minimum trois à quatre jours. Sans compter les nombreuses dilutions et le nombre incroyable de boîtes de Pétri consommées.

Il est malheureux de constater que les protocoles de nombreux articles scientifiques portant sur la conjugaison restent souvent très évasifs sur les détails des manipulations effectuées. Pire, à force de faire référence à d'autres études, qui elles-mêmes font référence à d'autres études, il est extrêmement difficile de retrouver un protocole complet et précis. Malgré tout, les principes de base restent assez semblables mais, à mon avis, ils sont systématiquement à adapter en fonction des souches et des plasmides utilisés. Par exemple, certaines souches ne conjuguent que par contact en milieu liquide ou que par contact sur milieu solide, tel que des filtres de cellulose. Finalement, le succès de nos conjugaisons se base surtout sur la phase très importante qu'est le lavage au PBS (voir matériel et méthodes). En effet, un minimum de deux lavages sont nécessaires, avant (et parfois après) la conjugaison, afin d'enlever toute trace d'antibiotiques.

Lorsqu'un protocole correct a montré sa relative efficacité, nous n'avons pas cherché à l'optimiser, principalement à cause d'un manque de temps. Néanmoins, il serait essentiel d'**optimiser la conjugaison** afin d'obtenir de meilleurs résultats. Par exemple, pour chaque souche et plasmide utilisés, nous pourrions tester différents temps de mise en contact entre les bactéries donneuses et receveuses afin d'optimiser les rendements de conjugaison. Nous pourrions également tester différents ratios, entre le nombre de bactéries donneuses et le nombre de bactéries receveuses. Nous avons pu tester dans certains cas trois ratios différents : 1/1, 1/10 et 10/1. Nos résultats de conjugaison avec le plasmide RP4 (voir ci-dessous) ont montré une différence d'efficacité entre ces différents ratios. Curieusement, certaines conjugaisons ont montré une meilleure efficacité lorsqu'il y avait plus de bactéries receveuses que de bactéries donneuses. Dans certain cas, il a fallu de grands ratios, tel que 300 pour 1, afin d'obtenir de bons résultats. Il faudrait donc idéalement tester plusieurs ratios afin de trouver l'efficacité optimale pour notre plasmide. Néanmoins, s'il est possible d'optimiser la conjugaison en laboratoire, le véritable challenge sera de développer un système fonctionnel en situation thérapeutique réelle, par exemple capable d'éliminer spécifiquement des bactéries ou des gènes de résistance dans la flore intestinale.

Un point essentiel, que nous n'avons pas eu le temps de tester mais qu'il serait intéressant d'évaluer, est la **conjugaison inter espèces**. En effet, il a été démontré que des plasmides mobilisables ou des plasmides autonomes du type RP4 peuvent conjuguer avec des bactéries d'espèces et de genre très

différents. Ils peuvent également conjuguer avec certaines bactéries Gram-positives. Cet aspect de la conjugaison est **un atout majeur**, en comparaison avec l'utilisation de bactériophages spécifiques. Dans le cas d'une potentielle utilisation d'un tel système en situation réelle, c'est-à-dire pour combattre des bactéries multi-résistantes, il faudrait tester l'efficacité de notre système Crispr/Cas9 entre différents genres et espèces. En principe, la conjugaison inter espèces a déjà été démontrée, ainsi que la grande efficacité de Crispr/Cas9. Il y a donc peu de chance que notre système ne fonctionne pas entre espèces différentes, mais il faudrait néanmoins le vérifier avec nos plasmides.

Test visuel de notre système conjugatif sur plasmide RFP

L'utilisation de la souche sJR013 permettant la conjugaison et la coupure dans le gène RFP par Crispr/Cas9 a montré son bon fonctionnement (voir Résultats). Le choix du gène de la RFP a été choisi comme cible Crispr pour son côté visuel. En effet, on a pu constater l'efficacité du système, après conjugaison, par la perte de la fluorescence rouge, une fois que le gène de la RFP a été coupé après la conjugaison (Fig. 19). Notre souche sJR14, sans guide RNA, a servi de contrôle et a permis de voir que la conjugaison s'est bien passée et que la protéine Cas9, faute de guide RNA, ne coupait pas le gène RFP (Fig. 19).

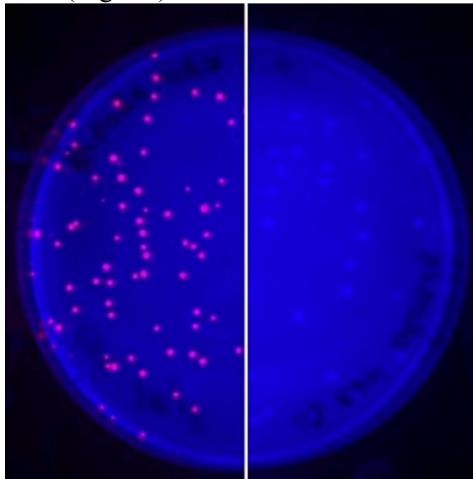


Figure 19 : Résultat de la conjugaison anti-RFP sous UV. A gauche : Les bactéries receveuses contenant le gène de la RFP ont été conjuguées par une souche donneuse portant uniquement Cas9 sur le plasmide conjugatif. A droite : Les bactéries receveuses contenant le gène de la RFP ont été conjuguées par une souche donneuse portant Cas9 et le guide ARN ciblant le gène RFP. Le gène de la RFP a été coupé par Crispr/Cas9 et on observe une perte de fluorescence rouge.

Néanmoins, les premiers résultats obtenus ont été assez perturbants. En effet, le plasmide de la souche receveuse est résistant à l'ampicilline et contient également le gène de la RFP. En principe, en coupant le gène de la RFP – et donc le plasmide – la bactérie receveuse ne devrait plus pousser sur ampicilline. Il est possible qu'une réparation du plasmide de type recombinaison homologue se produise mais c'est en principe assez rare. Or, nos résultats montrent bien une perte de la RFP, cependant les bactéries cibles, juste après la conjugaison, poussent encore sur ampicilline. En fait, ce phénomène est dû à la particularité des **β -lactamases**. En effet, l'ampicilline agit en inhibant la synthèse de la paroi cellulaire et la résistance de la bactérie est due aux β -lactamases qui vont dégrader l'antibiotique. Dans notre cas, la β -lactamase a été synthétisée avant que le gène ne soit coupé et elle ne se dégrade que très lentement. La concentration en β -lactames est donc diluée à chaque division cellulaire, ce qui permet aux bactéries de rester résistantes un certain temps, en l'absence du plasmide. De plus, la β -lactamase est sécrétée et peut se retrouver dans le milieu où elle diffuse et peut hydrolyser l'antibiotique jusqu'à son épuisement. En conséquence, après conjugaison, les premières bactéries présentes sont capables de survivre en présence d'ampicilline mais lorsqu'on remet ces transconjugants en culture sur ampicilline, elles ne poussent plus. Cela confirme bien le phénomène observé. Sans l'aspect visuel lié à la coloration rouge de la RFP, il est malheureusement fort probable qu'on n'aurait pas pu observer le bon fonctionnement du système dans ce cas précis. Dans les premiers essais de conjugaison et avant la prise de conscience

de ce phénomène, il est certain que plusieurs bons résultats ont été sans doute passés à la trappe, du fait de résultats incohérents observés.

D'autre part, après conjugaison avec notre plasmide contrôle, c'est-à-dire sans le guide RNA, nous avons observé quelques bactéries blanches (de 1 à 5%) parmi les transconjugants. Cela présuppose que dans certains cas, il y a une perte d'expression de la RFP, ou encore une perte de plasmide.

Test de notre système conjugatif sur plasmide AmpR

L'utilisation de la souche sJR012 permettant la conjugaison et la coupure dans le gène de l'ampicilline par Crispr/Cas9 a également montré son bon fonctionnement (voir Résultats). Le choix du gène AmpR a été effectué pour illustrer la possibilité de couper un gène de résistance à un antibiotique. Comme cela a été observé précédemment avec le gène de la RFP, il y avait toujours des bactéries qui poussaient en présence d'ampicilline. La remise en culture dans du milieu contenant de l'ampicilline, ainsi qu'une vérification par PCR, nous a confirmé qu'elles avaient bien perdu le gène de résistance à cet antibiotique. Ces résultats nous confirment la faisabilité du projet, à savoir l'utilisation de la conjugaison bactérienne, pour véhiculer Crispr/Cas9 afin de combattre la résistance des bactéries aux antibiotiques.

Test de notre système conjugatif sur AmpR chromosomique

Les très bons résultats obtenus avec notre système de conjugaison couplé à Crispr/Cas9 nous montre que c'est tout aussi efficace pour un **gène cible présent dans le chromosome** de la bactérie. En effet, notre souche donneuse contrôle sJR14 a montré le fonctionnement de la conjugaison, et la souche donneuse sJR12 a montré le bon fonctionnement de Crispr/Cas9 en coupant le gène de résistance à l'ampicilline présent dans le chromosome de la bactérie receveuse (voir résultats). Comme on pouvait s'y attendre, on constate également que l'efficacité de Crispr/Cas9 est proche de 100 %. Pratiquement plus aucune bactérie ne pousse sur boîte ampicilline après le passage de Crispr/Cas9 (voir photo, annexe 5). Ces résultats sont importants car nous avons à présent confirmation que l'on peut utiliser notre système pour cibler un gène par conjugaison, qu'il soit dans un plasmide ou dans un chromosome. Il serait néanmoins utile de tester le système avec d'autres souches portant le gène de résistance à l'ampicilline dans le chromosome, comme par exemple des bactéries d'une autre espèce que *E.coli*. Bien qu'une cassure double brin dans le chromosome soit généralement létale pour la bactérie, il faudrait tester d'autres guides RNA afin de vérifier le bon fonctionnement du système contre d'autres gènes de résistance.

Utilisation d'un plasmide autonome de type RP4

La mise au point d'un plasmide de conjugaison autonome à partir du RP4 n'en est qu'à ses débuts. Après avoir vu le bon fonctionnement relatif de notre plasmide mobilisable, l'utilisation d'un tel système avec le plasmide RP4 laisse entrevoir de nombreuses possibilités. En effet, les premiers essais de conjugaison avec le RP4 nous montrent une **grande efficacité de conjugaison** (environ 50 % dans notre essai) et il est fort probable qu'en optimisant le protocole ou le plasmide lui-même, on puisse encore augmenter cette efficacité.

L'utilisation d'un tel plasmide permettrait d'augmenter la dispersion – et donc l'efficacité du système Crispr/Cas9 – de manière exponentielle dans une population de bactéries cibles. Un autre grand avantage de ce type de plasmides est qu'il a un large spectre d'action (BHR). En effet, il est en théorie capable de conjuguer avec toutes les bactéries de type *Enterobacters*, de même qu'avec un très grand nombre de bactéries gram-négatives et quelques gram-positives (Schmidhauser & Helinski, 1985). Dans le cadre de notre projet – à savoir la lutte contre les bactéries résistantes -, une telle propriété est un gros avantage pour combattre une large gamme de bactéries pathogènes.

D'un point de vue concret, la **manipulation du plasmide RP4** – comme tous les plasmides de grande taille – n'est pas aisée. Si ces plasmides de conjugaison – en particulier le plasmide F - ont été très étudiés dans les années 70' et 80', peu nombreuses sont les études actuellement sur le sujet. De plus, comme c'est souvent le cas pour les anciennes études, le nom de certains gènes a été modifié au cours

du temps, rendant la compréhension de certains articles difficile. Les techniques utilisées à cette époque sont peu courantes de nos jours. Les protocoles habituels et les kits commerciaux d'usage courant ne sont pas optimisés pour de grands plasmides. La manipulation de tel plasmide se rapproche davantage des protocoles utilisés pour les BACs (Bacterial Artificial Chromosome), que la majorité des laboratoires de biologie moléculaire ne maîtrisent pas. Par exemple, le kit utilisé pour effectuer une miniprep classique donne de très mauvais résultats (concentration inférieure à 5 ng/μl) avec le RP4. Il a fallu utiliser une ancienne méthode de miniprep (voir matériel et méthodes) pour finalement obtenir une concentration en plasmide satisfaisante. De même, la taille de ces plasmides ne rend pas la digestion par enzyme et les ligations aisées. De par sa taille, le plasmide est également plus fragile et est à manipuler avec précaution. Finalement, avec de tels plasmides, la transformation par méthode chimique est presque impossible. Seul une électroporation adaptée permet l'insertion de grands plasmides (Sheng et al., 1995)

Néanmoins, l'obtention d'un plasmide RP4 avec notre système Crispr/Cas9 semble plus que prometteuse quant à son efficacité d'action. Nous n'en sommes qu'au début de la **phase de construction**. Dans ce but, plusieurs façons de procéder sont possibles. Nous avons commencé par analyser la séquence du RP4 et avons trouvé un site de restriction unique – BglII – qui pourrait être utilisé pour y insérer notre cassette Crispr/Cas9. Nous avons associé notre cassette Crispr/Cas9 avec le gène de résistance au chloramphénicol (CmR) afin de faciliter la sélection. Ensuite nous avons choisi deux amorces pour amplifier cette nouvelle cassette Crispr/Cas9 et CmR de manière à avoir aux deux extrémités le site de restriction BglII. Il restera à présent à vérifier cette séquence et à tester une digestion et ligation de cette cassette dans le RP4, suivi par une électroporation.

De par la difficulté de manipulation de grands plasmides, il sera important de ne pas y passer trop de temps en cas de complications. En effet, d'autres techniques sont possibles pour arriver à nos fins, telles que la méthode Gibson, la recombinaison homologue λ-red, avec des vecteurs du type pCas/pTarget (Jiang et al., 2015) ou encore l'utilisation de transposons (Ulrich et al., 2015). Malheureusement, la quarantaine liée à la crise du coronavirus a bloqué l'accès au laboratoire pendant 4 mois et a empêché l'avancée de cette partie du projet.

Une idée de projet novatrice

Un projet tel que le nôtre, basé sur la conjugaison bactérienne et l'utilisation de Crispr/Cas9, est assez novateur. En effet, alors que nous obtenions nos premiers résultats, trois articles portant sur le même sujet ont été publiés en 2019.

La première étude (Peters et al., 2019) a été rapportée en utilisant la conjugaison comme vecteur de transfert de Crispr/Cas9 et ce dans le but de pouvoir étudier le fonctionnement de certains gènes particuliers. En effet, dans cette étude, l'utilisation de CRISPRi, permettant de bloquer l'expression de gènes par l'utilisation de la protéine Cas9 inactive (dCas9), avait pour but d'étudier la fonction des gènes essentiels et non-essentiels. Le principe a fonctionné correctement et cela a indiqué que la conjugaison peut donc bien servir à véhiculer Crispr/dCas9 dans une bactérie cible.

Une autre étude (Ruotsalainen et al., 2019) a eu pour but d'aller couper par Crispr/Cas9 un gène de résistance à l'ampicilline présent sur un plasmide cible, par conjugaison. Le système consiste en deux plasmides (Fig. 20) : un plasmide conjugatif de « livraison » basé sur RP4 et un plasmide pCRISPR contenant la protéine Cas9 ainsi que la cible Crispr, composé du guide RNA en deux parties (tracrRNA et crRNA). La cible de Crispr est une région conservée des gènes de résistances β-lactamases. Ils ont également rajouté sur ce plasmide l'oriT du RP4, lui permettant d'être co-transféré grâce au relaxosome du premier plasmide. Ces deux plasmides sont donc tous les deux capables de conjuguer. Le système a montré son bon fonctionnement entre souches de *E.coli* et on observe une diminution des bactéries résistantes avec une efficacité de Crispr égale à la nôtre. Cependant, l'inconvénient de cette méthode est que, souvent, seul le plasmide « delivery » est transféré. Les auteurs de cette étude suggèrent l'idée de mettre toute la machinerie de conjugaison sur un seul plasmide.

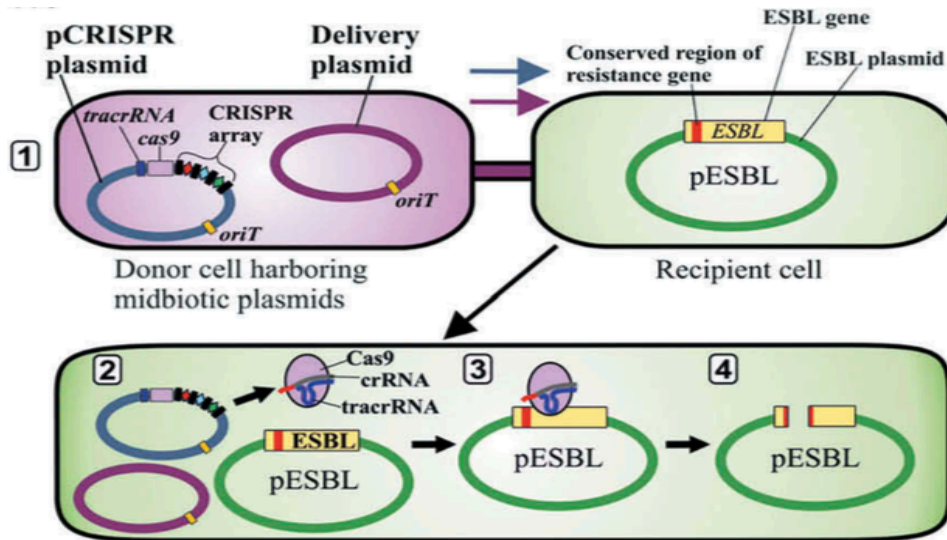


Figure 20 : système de conjugaison Crispr/Cas9 en deux plasmides. (1) La bactérie donneuse (en mauve) comporte le plasmide pCRISPR et le plasmide « delivery » qui seront transférés par conjugaison vers la bactérie cible (en vert). (2) Le système Crispr/cas9 se met en place et (3) va cibler une région conservée des gènes de résistance à l'ampicilline (ESBL). (4) Le gène de résistance est finalement coupé par Crispr/Cas9. (Source Ruotsalainen et al., 2019)

Une troisième étude publiée dans Nature communication (Hamilton et al., 2019) a également montré qu'un plasmide de conjugaison pNuc, dérivé du pTA-mob (Aakvik et al., 2014), basé sur la machinerie RP4, peut être utilisé pour livrer Crispr/Cas9 dans une bactérie cible. Le gène *TevCas9* a été placé sous contrôle d'un promoteur inductible, et les guides RNA ont pour cibles différents gènes de *S. enterica*. Deux plasmides ont été créés (Fig. 21 A) : le pNuc-cis autonome (ou l'*oriT* et Crispr/Cas9 ont été clonés dans le plasmide pTA-mob qui code pour tous les gènes de conjugaison), et le pNuc-trans (qui ne contient que Crispr/Cas9 et l'*oriT*, la relaxase étant codée en *trans* par un plasmide « helper »). Ils ont d'abord montré dans cette étude que le système est plus efficace en *cis* qu'en *trans*. En effet, en *cis*, l'efficacité de conjugaison atteint 1% alors qu'en *trans*, elle atteint 1×10^{-5} . Ils ont également montré que les transconjugants sont devenus eux-mêmes des donneurs du plasmide *cis*, ce qui améliore fortement la fréquence de conjugaison au cours du temps (Fig. 21 B). De plus, en augmentant le nombre de donneurs (ratio 10/1), en diminuant la concentration en NaCl, ou en utilisant une conjugaison sur milieu solide plutôt que liquide, ils obtenaient de meilleurs résultats et augmentaient l'efficacité. La cible sgRNA a été testée sur 65 gènes essentiels et non essentiels de *S. enterica*. Les résultats ont été variables : entre 1 et 100% de mort bactérienne selon le gène cible visé et le nombre de cibles sgRNA utilisées.

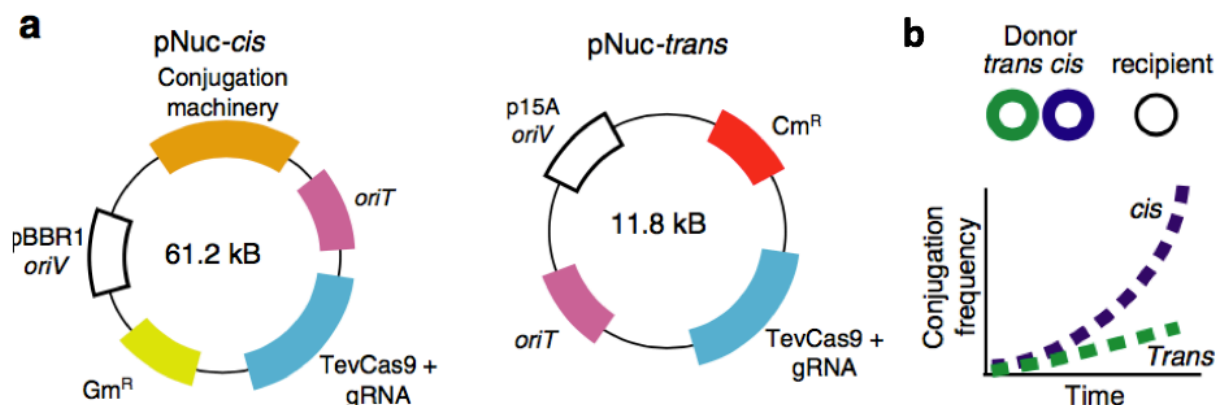


Figure 21 : Système de conjugaison autonome Crispr/Cas9. (A) Structure du plasmide pNuc-cis autonome (à gauche) et pNuc-trans mobilisable. (B) Evolution de la fréquence de conjugaison au cours de temps. Les plasmides autonomes pNuc-cis (en bleu) peuvent circuler de proche en proche entre les bactéries, rendant l'efficacité de propagation de ces plasmides plus efficaces, en comparaison avec les plasmide mobilisables pNuc-trans (en vert). (Source : Hamilton et al., 2019)

Biosécurité et applications

L'utilisation de notre plasmide Crispr/Cas9 conjugatif, dans l'état actuel des choses, n'a pas de sens. En effet, un des aspects les plus importants d'un tel système en situation réelle est **l'aspect de la biosécurité**. Il n'est pas concevable d'utiliser un plasmide RP4 pour combattre les gènes de résistances aux antibiotiques puisqu'il comporte déjà lui-même trois gènes de résistance (Ampicilline, Kanamycine, Tétracycline). De plus, ces gènes pourraient, via transpositionss ou recombinaison, s'intégrer dans le chromosome de la bactérie cible. Si un tel système devait être utilisé dans un cadre « médical », il faudrait au minimum nettoyer complètement cette séquence de ses gènes de résistances. Ce projet de longue haleine pourrait être envisagé, par exemple, par une réamplification des séquences du RP4, sans les gènes de résistance, suivie d'un réassemblage. Ou encore, par synthèse complète via une société spécialisée comme IDT ou Eurogentec. Pour éviter la propagation de notre plasmide dans l'environnement, on pourrait également envisager l'utilisation d'un RP4 autonome, dont la survie dépend d'une molécule chimique non toxique peu ou pas présente dans l'environnement.

Le système de conjugaison, véhiculant Crispr/Cas9 a montré son bon fonctionnement, que ce soit pour couper un plasmide ou un chromosome, et **différentes applications** sont déjà possibles. Malgré le manque d'efficacité, ce système permet déjà de réduire la population bactérienne et de la garder sous un meilleur contrôle. Comme cela a déjà été testé avec des bactériophages, un système conjugatif avec Crispr/Cas9 pourrait aussi servir à la décontamination de surfaces avec biofilms, environnement propice à la conjugaison bactérienne et à la propagation d'un plasmide conjugatif (Ghigo JM., 2001). De nombreuses infections humaines s'expriment sous forme de biofilm, tel que *Clostridium difficile* (Dapa et al., 2013). Comme la conjugaison s'effectue par contact, le système serait très efficace dans de telles conditions. Une bactérie issue du biofilm, équipée d'un plasmide autonome Crispr, pourrait facilement se propager dans ce biofilm en passant de proche en proche, à l'inverse d'autres molécules qui ont du mal à diffuser dans un tel milieu. Au final, toutes les applications offertes par les systèmes Crispr/Cas sont possibles, avec l'avantage que la conjugaison se produit « naturellement » et n'a pas besoin de transformation artificielle en laboratoire. En outre, le ciblage précis de Crispr/Cas9 permet l'élimination d'une espèce bactérienne précise, laissant les autres intactes. Cela peut s'avérer extrêmement pratique lorsqu'il faut atteindre des cellules dans un microbiote, ou encore pour des cellules dont la transformation artificielle est compliquée.

De manière générale, de longues semaines de travail sont encore nécessaires pour améliorer les systèmes actuellement mis en place.

6 Conclusion

Avec l'utilisation d'un plasmide de conjugaison mobilisable, notre système a montré son bon fonctionnement. Il est donc possible d'utiliser la conjugaison bactérienne comme moyen pour véhiculer l'outil moléculaire Crispr/Cas9 vers une bactérie cible, afin d'y couper un gène cible.

Notre premier système mis en place utilise un plasmide conjugatif de type mobilisable. La souche « donneuse » contenant ce plasmide est donc la seule à pouvoir transmettre le ciseau moléculaire Crispr/Cas9 vers sa bactérie cible « receveuse ». Nos résultats ont montré que notre plasmide conjuguait correctement avec sa bactérie cible et que le système Crispr/Cas9 était fonctionnel pour couper le gène plasmidique de la RPF, ainsi que le gène plasmidique et chromosomique de la résistance à l'ampicilline.

Ainsi donc, notre plasmide est capable de conjuguer et couper à la fois un gène plasmidique ou un gène chromosomique. Nos résultats ont également montré que si l'efficacité de Crispr/Cas9 est proche de 100%, l'efficacité de la conjugaison est relativement faible avec notre plasmide mobilisable (environ 10^{-4}) mais pourrait atteindre plus de 50% avec un plasmide autonome de type RP4.

Les plasmides mobilisables tels que le nôtre, bien que dépendant de sa bactérie hôte en ce qui concerne la conjugaison, pourraient également avoir d'autres applications et être très utiles pour, par exemple, véhiculer le système Crispr/Cas9 vers une bactérie cible dans un biofilm, ou encore lorsque la transformation artificielle en laboratoire est difficile ou impossible.

D'autres études ayant montré l'efficacité de ce type de plasmide à conjuguer avec des bactéries d'espèces très différentes, indiquent qu'il est plus que probable que notre système fonctionne également avec de telles bactéries. Des tests de conjugaison supplémentaires sur d'autres espèces de bactéries pourront confirmer cette efficacité.

L'utilisation de la conjugaison bactérienne liée avec le système Crispr/Cas9 semble donc fonctionner. Pouvoir comprendre l'ensemble des mécanismes sous-jacents et arriver à optimiser son efficacité constitue un projet passionnant et d'un grand intérêt en ce qui concerne les problèmes de santé liés à la multi-résistance bactérienne. Ces bactéries tuent chaque année des milliers de personnes et ce nombre ne va faire qu'augmenter dans les prochaines décennies. De nombreuses tentatives ont été effectuées à travers le monde - telles que la recherche de nouveaux antibiotiques, l'utilisation de bactériocines ou de phages - afin de se débarrasser de ces bactéries indésirables. Dans cette perspective, l'utilisation de la conjugaison avec Crispr/Cas9 et le plasmide autonome RP4 donnerait probablement des résultats incroyables. Il serait utile de pouvoir continuer ces expériences afin de voir toute l'étendue de l'efficacité que pourrait apporter le RP4 dans le ciblage de gènes, en véhiculant Crispr/Cas9.

Les études récentes publiées en 2019, en même temps que nos premiers résultats sur la même thématique, montrent bien le côté innovant de notre travail et l'intérêt grandissant dont ce système fait l'objet dans la lutte contre les multi-résistances bactériennes.

Bibliographie

- Aakvik, T., Lale, R., Degnes, K. F., Lando, M., & Valla, S. (2014). A new and improved host-independent plasmid system for RK2-based conjugal transfer.
- Akiyama, T., Asfahl, K. L., & Savin, M. C. (2010). Broad-host-range plasmids in treated wastewater effluent and receiving streams. *Journal of environmental quality*, 39(6), 2211-2215.
- Avila, P., Núñez, B., & de la Cruz, F. (1996). Plasmid R6K Contains Two Functional oriT's which can Assemble Simultaneously in Relaxosomes in vivo. *Journal of molecular biology*, 261(2), 135-143.
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Brown, R., Lengeling, A., & Wang, B. (2017). Phage engineering: how advances in molecular biology and synthetic biology are being utilized to enhance the therapeutic potential of bacteriophages. *Quantitative Biology*, 5(1), 42-54.
- Bush, K. (2018). Game changers: new β -lactamase inhibitor combinations targeting antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *ACS infectious diseases*, 4(2), 84-87.
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2019). Interplay between β -lactamases and new β -lactamase inhibitors. *Nature Reviews Microbiology*, 17(5), 295.
- Burkardt, H. J., Riess, G., & Pohler, A. (1979). Relationship of group P1 plasmids revealed by heteroduplex experiments: RP1, RP4, R68 and RK2 are identical. *Microbiology*, 114(2), 341-348.
- Citorik, R. J., Mimee, M., & Lu, T. K. (2014). Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature biotechnology*, 32(11), 1141-1145.
- Chaoui, L., Mhand, R., Mellouki, F., & Rhallabi, N. (2019). Contamination of the Surfaces of a Health Care Environment by Multidrug-Resistant (MDR) Bacteria. *International Journal of Microbiology*, 2019.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., ... & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819-823.
- Dapa, T., & Unnikrishnan, M. (2013). Biofilm formation by *Clostridium difficile*. *Gut microbes*, 4(5), 397-402.
- Demarre, G., Guérout, A. M., Matsumoto-Mashimo, C., Rowe-Magnus, D. A., Marlière, P., & Mazel, D. (2005). A new family of mobilizable suicide plasmids based on broad host range R388 plasmid (IncW) and RP4 plasmid (IncP α) conjugative machineries and their cognate *Escherichia coli* host strains. *Research in microbiology*, 156(2), 245-255.
- Dénarié, J., Rosenberg, C., Bergeron, B., Boucher, C., Michel, M., & De Bertalmio, M. B. (1977). Potential of RP4:: Mu plasmids for in vivo genetic engineering of gram-negative bacteria. In *DNA Insertion Elements, Plasmids and Episomes* (pp. 507-520). Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY.
- Clewell, D. B. (Ed.). (2013). *Bacterial conjugation*. Springer Science & Business Media.

- Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C. M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z. A., ... & Charpentier, E. (2011). CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, *471*(7340), 602-607.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213).
- Elliott, E., Brink, A. J., van Greune, J., Els, Z., Woodford, N., Turton, J., ... & Livermore, D. M. (2006). In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum β -lactamase. *Clinical infectious diseases*, *42*(11), e95-e98.
- Etebu, E., & Ariekpar, I. (2016). Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives. *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res*, *4*(2016), 90-101.
- Falgenhauer, L., Schwengers, O., Schmiedel, J., Baars, C., Lambrecht, O., Heß, S., ... & Imirzalioglu, C. (2019). Multidrug-resistant, clinically relevant Gram-negative bacteria are present in German surface water samples. *Frontiers in microbiology*, *10*, 2779.
- Ferrières, L., Hémerly, G., Nham, T., Guérout, A. M., Mazel, D., Beloin, C., & Ghigo, J. M. (2010). Silent mischief: bacteriophage Mu insertions contaminate products of *Escherichia coli* random mutagenesis performed using suicidal transposon delivery plasmids mobilized by broad-host-range RP4 conjugative machinery. *Journal of bacteriology*, *192*(24), 6418-6427.
- Frost, L. S., & Schaechter, M. (2009). Conjugation, bacterial. *Desk Encyclopedia of Microbiology*. San Diego, CA, 294-308.
- Getino, M., & De la cruz, F. (2019). Natural and artificial strategies to control the conjugative transmission of plasmids. *Microbial Transmission*, 33-64.
- Ghigo, J. M. (2001). Natural conjugative plasmids induce bacterial biofilm development. *Nature*, *412*(6845), 442-445.
- Gregory, R., Saunders, J. R., & Saunders, V. A. (2008). Rule-based modelling of conjugative plasmid transfer and incompatibility. *Biosystems*, *91*(1), 201-215.
- Haft, D. H., Selengut, J., Mongodin, E. F., & Nelson, K. E. (2005). A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput Biol*, *1*(6), e60.
- Hamilton, T. A., Pellegrino, G. M., Therrien, J. A., Ham, D. T., Bartlett, P. C., Karas, B. J., ... & Edgell, D. R. (2019). Efficient inter-species conjugative transfer of a CRISPR nuclease for targeted bacterial killing. *Nature communications*, *10*(1), 1-9.
- Haugan, K., Karunakaran, P., Tøndervik, A., & Valla, S. (1995). The host range of RK2 minimal replicon copy-up mutants is limited by species-specific differences in the maximum tolerable copy number. *Plasmid*, *33*(1), 27-39.
- Holmes, A. H., Moore, L. S., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., ... & Piddock, L. J. (2016). Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *The Lancet*, *387*(10014), 176-187.
- Jain, A., & Srivastava, P. (2013). Broad host range plasmids. *FEMS microbiology letters*, *348*(2), 87-96.
- Jiang, W., Bikard, D., Cox, D., Zhang, F., & Marraffini, L. A. (2013). RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems. *Nature biotechnology*, *31*(3), 233-239.

- Jiang, Y., Chen, B., Duan, C., Sun, B., Yang, J., & Yang, S. (2015). Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system. *Applied and environmental microbiology*, *81*(7), 2506-2514.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science*, *337*(6096), 816-821.
- Kortright, K. E., Chan, B. K., Koff, J. L., & Turner, P. E. (2019). Phage therapy: a renewed approach to combat antibiotic-resistant bacteria. *Cell host & microbe*, *25*(2), 219-232.
- LeMieux, J. (2019). Phage Therapy: Turning the Tables on Bacteria: When engineered to incorporate CRISPR components, phages may overwhelm bacterial defenses or transform bacterial functions. *Genetic Engineering & Biotechnology News*, *39*(3), 20-22.
- Lin, D. M., Koskella, B., & Lin, H. C. (2017). Phage therapy: An alternative to antibiotics in the age of multi-drug resistance. *World journal of gastrointestinal pharmacology and therapeutics*, *8*(3), 162.
- Meyer, R., Figurski, D., & Helinski, D. R. (1977). Physical and genetic studies with restriction endonucleases on the broad host-range plasmid RK2. *Molecular and General Genetics MGG*, *152*(2), 129-135.
- Nascimento, J. S., Ceotto, H., Nascimento, S. B., Giambiagi-deMarval, M., Santos, K. R. N., & Bastos, M. C. F. (2006). Bacteriocins as alternative agents for control of multiresistant staphylococcal strains. *Letters in applied microbiology*, *42*(3), 215-221.
- O'Neill, J. (2014). Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on antimicrobial resistance. *Review on Antimicrobial Resistance, London, United Kingdom: <https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper>*.
- O'Riordan, W., McManus, A., Teras, J., Poromanski, I., Cruz-Saldariagga, M., Quintas, M., ... & Cammarata, S. (2018). A comparison of the efficacy and safety of intravenous followed by oral delafloxacin with vancomycin plus aztreonam for the treatment of acute bacterial skin and skin structure infections: a phase 3, multinational, double-blind, randomized study. *Clinical Infectious Diseases*, *67*(5), 657-666.
- Overballe-Petersen, S., Harms, K., Orlando, L. A., Mayar, J. V. M., Rasmussen, S., Dahl, T. W., ... & Inselmann, S. (2013). Bacterial natural transformation by highly fragmented and damaged DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(49), 19860-19865.
- Pansegrau, W., Lanka, E., Barth, P. T., Figurski, D. H., Guiney, D. G., Haas, D., ... & Thomas, C. M. (1994). Complete nucleotide sequence of Birmingham IncPα plasmids: compilation and comparative analysis. *Journal of molecular biology*, *239*(5), 623-663.
- Park, J. Y., Moon, B. Y., Park, J. W., Thornton, J. A., Park, Y. H., & Seo, K. S. (2017). Genetic engineering of a temperate phage-based delivery system for CRISPR/Cas9 antimicrobials against *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, *7*, 44929.
- Peters, J. M., Koo, B. M., Patino, R., Heussler, G. E., Hearne, C. C., Qu, J., ... & Harden, M. M. (2019). Enabling genetic analysis of diverse bacteria with Mobile-CRISPRi. *Nature microbiology*, *4*(2), 244-250.
- Pridmore, R. D. (1987). New and versatile cloning vectors with kanamycin-resistance marker. *Gene*, *56*(2-3), 309-312.

Quandt, J., Clark, R. G., Venter, A. P., Clark, S. R., Twelker, S., & Hynes, M. F. (2004). Modified RP4 and Tn5-Mob derivatives for facilitated manipulation of large plasmids in Gram-negative bacteria. *Plasmid*, *52*(1), 1-12.

Review on Antimicrobial Resistance. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. Review on antimicrobial resistance.

Ruotsalainen, P., Penttinen, R., Mattila, S., & Jalasvuori, M. (2019). Midbiotics: conjugative plasmids for genetic engineering of natural gut flora. *Gut microbes*, *10*(6), 643-653.

Ruppé, E., Burdet, C., Grall, N., De Lastours, V., Lescure, F. X., Andremont, A., & Armand-Lefèvre, L. (2018). Impact of antibiotics on the intestinal microbiota needs to be re-defined to optimize antibiotic usage. *Clinical Microbiology and Infection*, *24*(1), 3-5.

Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., & Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the Escherichia coli plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of Corynebacterium glutamicum. *Gene*, *145*(1).

Schmidhauser, T. J., & Helinski, D. R. (1985). Regions of broad-host-range plasmid RK2 involved in replication and stable maintenance in nine species of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, *164*(1), 446-455.

Sheng, Y., Mancino, V., & Birren, B. (1995). Transformation of Escherichia coli with large DNA molecules by electroporation. *Nucleic acids research*, *23*(11), 1990-1996.

Sib, E., Voigt, A. M., Wilbring, G., Schreiber, C., Faerber, H. A., Skutlarek, D., ... & Geiser, F. (2019). Antibiotic resistant bacteria and resistance genes in biofilms in clinical wastewater networks. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, *222*(4), 655-662.

Silva, H. R., Rocha, Á. S. C., Rocha, M. V. S., Veras, D. M., de Sousa, O. M. C., da Costa Sousa, G., ... & Pereira, N. M. (2020). Reflection of environmental imbalance in health: multi-resistant bacteria in hospital environment. *Research, Society and Development*, *9*(8).

Simon, R. U. P. A. P., Prierer, U., & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/technology*, *1*(9), 784-791.

Simon, R. (1984). High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the in vitro constructed Tn5-Mob transposon. *Molecular and General Genetics MGG*, *196*(3), 413-420.

Slopek, S., Weber-Dabrowska, B., Dabrowski, M., & Kucharewicz-Krukowska, A. (1987). Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981-1986. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, *35*(5), 569-583.

Smillie, C., Garcillán-Barcia, M. P., Francia, M. V., Rocha, E. P., & de la Cruz, F. (2010). Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 434-452.

Squadrone, S. (2020). Water environments: metal-tolerant and antibiotic-resistant bacteria. *Environmental Monitoring and Assessment*, *192*(4), 1-12.

Srivastava, S. (2013). *Genetics of bacteria*. Springer.

Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *The American journal of medicine*, *119*(6), S3-S10.

Thomas, C. M., & Smith, C. A. (1987). Incompatibility group P plasmids: genetics, evolution, and use in genetic manipulation. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 77-101.

Trieu-Cuot, P., Arthur, M., & Courvalin, P. (1987). Origin, evolution and dissemination of antibiotic resistance genes. *Microbiological sciences*, 4(9), 263.

Ulrich, A., Becker, R., Ulrich, K., & Ewald, D. (2015). Conjugative transfer of a derivative of the IncP-1 α plasmid RP4 and establishment of transconjugants in the indigenous bacterial community of poplar plants. *FEMS microbiology letters*, 362(23), fnv201.

Urry, L. A., Cain, M. L., Wasserman, S. A., Minorsky, P. V., & Reece, J. B. (2017). *Campbell biology*. Pearson Education, Incorporated.

Velkov, T., Roberts, K. D., Thompson, P. E., & Li, J. (2016). Polymyxins: a new hope in combating Gram-negative superbugs?. *Future Medicinal Chemistry*, 8(10), 1017-1025.

Walsh, C., & Wencewicz, T. (2016). *Antibiotics: challenges, mechanisms, opportunities* (Vol. 30). John Wiley & Sons.

Wiese, J., & Imhoff, J. F. (2019). Marine bacteria and fungi as promising source for new antibiotics. *Drug development research*, 80(1), 24-27.

World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance global report on surveillance: 2014 summary* (No. WHO/HSE/PED/AIP/2014.2). World Health Organization.

Yosef, I., Manor, M., Kiro, R., & Qimron, U. (2015). Temperate and lytic bacteriophages programmed to sensitize and kill antibiotic-resistant bacteria. *Proceedings of the national academy of sciences*, 112(23), 7267-7272.

Sites web:

World Health Organization - <https://www.who.int/health-topics/antimicrobial-resistance>

Lexique & Index des figures

Lexique

AmpR	Gène de résistance à l'ampicilline
BHR	Broad-Host Range
CEN	Centre d'étude de l'énergie nucléaire
CmR	Gène de résistance au chloremphenicol
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamase
KanR	Gène de résistance à la kanamycine
kb	1000 paires de bases
kDa	kilo Dalton
LacZ	Gène de la β -galactosidase
μ g	micro gramme
μ M	micro Molaire
mM	milli Molaire
MCS	Multiple Cloning Site
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>
ng	nano gramme
NHEJ	Non-Homologous End-Joining
pb	Paire de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction
O/N	Over Night
oriV	Origine de replication
oriT	Origine de transfert
RFP	Red Fluorescent Protein
RPM	Rotation Par Minute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

Index des figures

- Figure 1 : représentation schématique des modes de propagation des antibiotiques
- Figure 2 : mode de transfert horizontal de matériel génétique chez les bactéries
- Figure 3 : système CRISPR/Cas9 programmé pour cibler *S. aureus*
- Figure 4 : principe général de la conjugaison
- Figure 5 : structure générale du plasmide conjugatif RK2/RP4
- Figure 6 : structure de Crispr/Cas9
- Figure 7 : représentation du schématique du projet
- Figure 8 : carte génétiques du plasmide pK18mob
- Figure 9 : structure et séquence complète du guide RNA
- Figure 10 : structure de l'insert utilisé pour la construction du plasmide
- Figure 11 : schéma de la cassette RP4 à réaliser
- Figure 12 : vérification de la présence de l'insert Cas9 dans notre plasmide
- Figure 13 : vérification de la présence du guide RNA dans notre plasmide
- Figure 14 : vérification de la présence du plasmide de conjugaison dans le souche receveuse
- Figure 15 : miniprep du plasmide RP4
- Figure 16 : vérification de la présence du site BglIII
- Figure 17 : (A) Amplification de la cassette Crispr/Cas9 avec CmR (B) Amplification du gène CmR
- Figure 18 : structure de la cassette Cas9, sgRNA, CmR
- Figure 19 : photo du résultat de la conjugaison anti-TFP
- Figure 20 : système de conjugaison Crispr/Cas9 en deux plasmides
- Figure 21 : système de conjugaison autonome Crispr/Cas9

Annexes

Annexe 1 : liste des amorces utilisés dans cette étude

Annexe 2 : liste des plasmides utilisés dans cette étude

Annexe 3 : liste des souches utilisées dans cette étude

Annexe 4 : groupes d'incompatibilités des ORIs

Annexe 5 : photo du résultat de conjugaison

Annexe 6 : carte du plasmide RP4/RK2

Annexe 7 : carte du plasmide pIG-K1

Annexe 1

liste des principales amorces utilisées dans cette étude

Primer	Séquence (5' => 3')	T_m (°C)
JR-Amp-Fw	CGTGTCGCCCTTATTCCCTT	56
JR-Amp-Rev	ACGATACGGGAGGGCTTACC	57
JR-K7-Fw	ctaAGATCTcccggggacgtcaagttgat	62
JR-K7-Rev	ctaCTGCAGCTTTAAGAAGGGCG	58
JR-K7K1-Fw	ctaAGATCTCCCGGGGACGTCgctgtttt	65
JR-K7K1-Fw2	CTAAGATCTAGGAAACAGCTATGACCAT	56
JR-RP4-Bgl-F	GGGATTTGAACATCAGTCATCG	54
JR-RP4-Bgl-R	GGAAATTGAGGCCGTTCAAG	53
JR-Cm-Fw	CCCagatctAAAACGATCTCAAGAAGATC	53
JR-Cm-Rev	CTActgcagCAATTCGCCCTATAGTGAGT	60
Cas9-Xma1-Fw	CTTTAAGAAGCCCGGGGACGTCgctgttttgaattaacggttcc	68
499-Fw	AGTCTTTCTCAATCATCTCCC	53
500-Rev	CCAGCATTTCTTTCAGGTGAAC	54
M13-Fw	tgtaaacgacggccagt	53
M13-Rev	caggaaacagctatgaccatg	53

Annexe 2

liste des principaux plasmides utilisés dans cette étude

Plasmide	Gène(s) important(s)	Taille (kb)	Résistance
pIG-K1	Cas9 sgRNA	8,5	KanR
pIG-K2	Cas9 sgRNA	8,5	KanR
pCas	Cas9	8,7	KanR
RP4	(voir section 2)	60,1	AmpR, KanR, TetR
pK18mob	oriT mob	3,8	KanR
pSB4A5	RFP, pSC101	4,9	AmpR

Annexe 3

liste des principales souches utilisées dans cette étude

Souche	Espèce	Génotype	Plasmide(s)
MFDpir	<i>E. coli</i>	MG1655 RP4-2-Tc::[ΔMu1::aac(3)IV-ΔaphA-Δnic35-ΔMu2::zeo] ΔdapA::(erm-pir) ΔrecA	N/A
DH5	<i>E. coli</i>	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	N/A
TOP10	<i>E. coli</i>	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻	N/A
TEM1	<i>E. coli</i>	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str ^R) endA1 λ ⁻ AmpR	N/A
DS984	<i>E. coli</i>	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, CmR, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	N/A
sJR07 *	<i>E. coli</i> DH5	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻	pSB4A5_BBa_J04450
sJR12 *	<i>E. coli</i> MFDpir	MG1655 RP4-2-Tc::[ΔMu1::aac(3)IV-ΔaphA-Δnic35-ΔMu2::zeo] ΔdapA::(erm-pir) ΔrecA	pIG-K2
sJR13 *	<i>E. coli</i> MFDpir	MG1655 RP4-2-Tc::[ΔMu1::aac(3)IV-ΔaphA-Δnic35-ΔMu2::zeo] ΔdapA::(erm-pir) ΔrecA	pIG-K1

Annexe 4

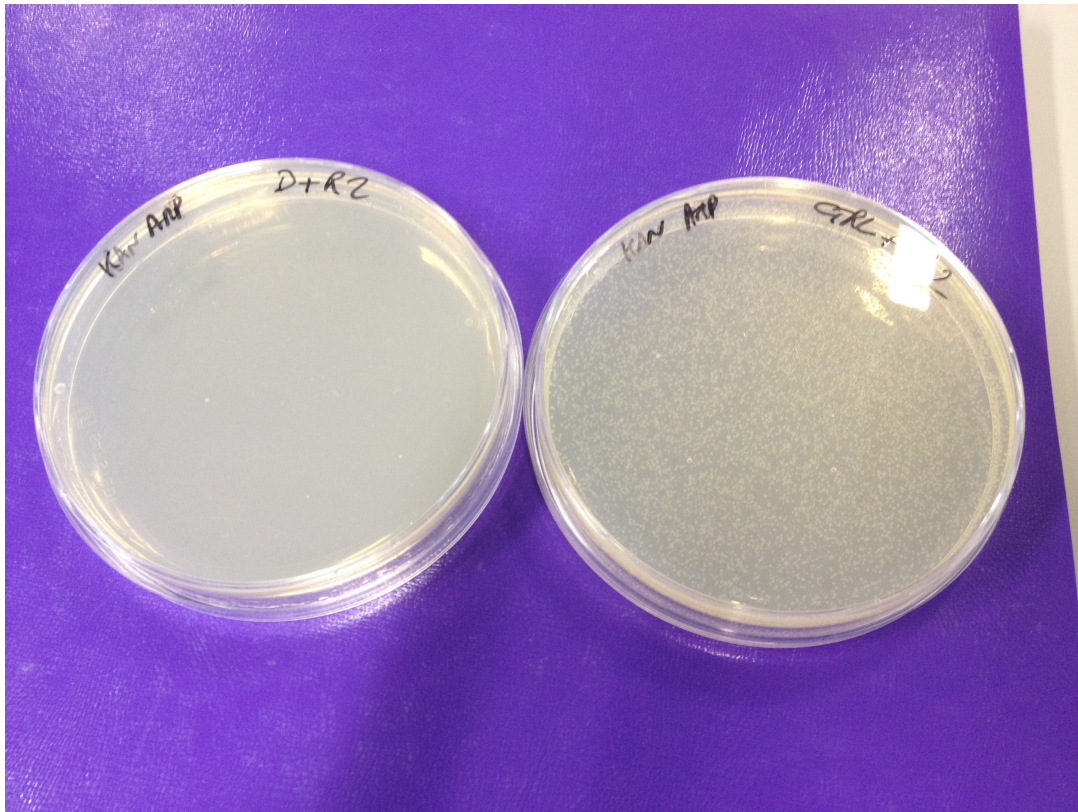
Différentes origines de répllication et groupes d'incompatibilités de quelques plasmides types

Common Vectors	Copy Number*	ORI	Incompatibility Group	Control
pUC	~500-700	pMB1 (derivative)	A	Relaxed
pBR322	~15-20	pMB1	A	Relaxed
pET	~15-20	pBR322	A	Relaxed
pGEX	~15-20	pBR322	A	Relaxed
pColE1	~15-20	ColE1	A	Relaxed
pR6K	~15-20	R6K*	B	Stringent
pACYC	~10	P15A	B	Relaxed
pSC101	~5	pSC101	B	Stringent
pBluescript	~300-500	ColE1 (derivative) and F1**	A	Relaxed
pGEM	~300-500	pUC and F1	A	Relaxed

(Source : addgene.org).

Annexe 5

Photo du résultat de conjugaison



Résultats de la conjugaison Crispr/Cas9 anti-Amp, sur une souche TEM1 résistante à l'ampicilline dans le chromosome. A gauche : avec Crispr/Cas9 ciblant le gène de résistance AmpR, plus aucune bactérie n'a survécu en présence d'ampicilline dans le milieu. A droite : contrôle. Sans Crispr/Cas9, les bactéries ont conjuguées mais poussent encore sur ampicilline.

Annexe 7

Carte génétique du plasmide pIG-K1

