

Proposition de stage

Parcours Master 2 « Microbiologie, Environnement Santé »

1. Laboratoire / Entreprise d'accueil :

Intitulé : Laboratoire de Biologie Intégrative des Modèles Marins-LBI2M-UMR8227
Adresse : Station Biologique de Roscoff, place Georges Teissier CS 90074, 29688 Roscoff cedex
Responsable du Laboratoire / Entreprise : Catherine Boyen
Responsable de l'équipe : Frédérique Le Roux
Responsable de l'encadrement : Yannick Labreuche
Téléphone : 02 98 29 56 47
E-mail : ylabreuche@sb-roscoff.fr
Co-encadrant éventuel : Frédérique Le Roux (frederique.le-roux@sb-roscoff.fr)

Perspectives de poursuite de thèse :

oui avec une bourse spécifique
 non

2. Titre, description du sujet, approches utilisées, références (2 pages maximum) :

TITRE : Développement d'une technique de transfert d'ADN par transformation chez différentes espèces de vibrios pathogènes d'invertébrés marins

Description du sujet :

Les vibrios sont des bactéries ubiquitaires, membres écologiquement et métaboliquement diversifiés des communautés planctoniques et/ou associés à des espèces marines (Thompson et al. 2004). Cette caractéristique « opportuni-trophe » est liée à des particularités physiologiques comme la mobilité et le chimiotactisme permettant une forte colonisation mais aussi à leur capacité à générer de la diversité génétique (Polz et al., 2006). Ceci implique au moins dans certains cas des mécanismes de transfert de gènes par transformation (ADN nu), par conjugaison (ADN plasmidique) ou par transduction (ADN phagique). En particulier il a été montré que des souches de *Vibrio cholerae*, *V. vulnificus* et *V. fischeri*, cultivées en milieu minimum additionné de chitine, étaient naturellement transformables ou compétentes (Meibom et al, 2005.) . Cette propriété a, par la suite, été utilisée en génie génétique : un fragment d'ADN généré par PCR peut être transféré dans ces bactéries et s'intégrer dans le génome par recombinaison au niveau de régions homologues de 250-500 pb. L'introduction d'un marqueur de sélection (cassette de résistance à un antibiotique) entre ces régions homologues permet une détection aisée des transformants générés.

L'étude des mécanismes impliqués dans la transformation naturelle chez *V. cholerae* a montré le rôle de différents régulateurs, en particulier le gène *tfoX* dont l'inactivation abolit la transformation chitine-dépendante. Par ailleurs, la sur-expression de ce gène permet d'accroître la capacité de transformation des cellules bactériennes indépendamment de la présence de chitine (Meibom et al., 2005). La mise en évidence d'homologues de *tfoX* dans tous les génomes de vibrios séquencés à ce jour, associée à une capacité commune des Vibrios à utiliser la chitine comme nutriment (Hunt et al., 2008), suggère que la transformation naturelle induite par la chitine apparaît être une caractéristique commune de cette famille de bactéries marines.

Les transferts de gènes jouent un rôle majeur dans l'émergence de vibrios pathogènes parmi lesquelles on trouve quelques pathogènes pour l'homme (par exemple *V. cholerae*), mais aussi, et surtout, un grand nombre d'espèces impliquées dans les infections d'animaux marins (Austin, 2010). Dans ce

contexte l'objectif de recherche de notre équipe est d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'émergence de vibrio pathogènes d'invertébrés marins (huître, crevette) par une approche intégrative liant de la génomique procaryote (populationnelle, comparative et fonctionnelle) et des études d'interaction hôte-pathogène. Nous avons ainsi identifié chez différentes espèces de vibrios des éléments génétiques spécifiques de souches pathogènes (Tableau 1) et nous avons entamé la démonstration de leur rôle dans la pathogénèse par mutagenèse et/ou expression en système hétérologue.

La manipulation génétique de ces souches de vibrios repose pour le moment uniquement sur le transfert de plasmide (réplicatif ou suicide) par conjugaison (Le Roux et al., 2007 ; Le Roux et al., 2011a). Cependant, certains problèmes comme la perte de plasmide endogène (Le Roux et al., 2011b), la faible fréquence de conjugaison ou d'intégration limitent la manipulation de certaines souches. Nous désirons donc tester la faisabilité de la transformation naturelle médiée par la chitine ou l'expression du gène *tfoX* dans nos modèles.

Objectif du stage: Développement d'une technique de transfert d'ADN exogène par transformation chez 4 espèces de *Vibrio* pathogènes d'huîtres (*V. crassostreae*, *V. aestuarianus*) ou de crevettes (*V. nigripulchritudo*, *V. penaeicida*).

Approches utilisées :

Etape 1 : préparation de l'ADN exogène par PCR assemblage (2X500 pb du gène cible bordant une cassette de résistance à un antibiotique)

Etape 2 : clonage de l'ADN exogène en vecteur suicide ; calcul de l'efficacité d'intégration après transfert par conjugaison ; calcul de l'efficacité de l'échange allélique après seconde recombinaison.

Etape 3 : culture en milieu minimum en présence ou non de chitine ; addition d'ADN exogène amplifié par PCR, calcul de l'efficacité d'échange allélique après transformation chitine dépendante.

Etape 4 : clonage du gène *tfoX* de chaque souche sous la dépendance d'un promoteur conditionnel (pBAD, induit par de l'arabinose, réprimé par du glucose) dans un plasmide réplicatif ; transfert par conjugaison et sélection; culture du transconjugant en présence de glucose/arabinose +/- ADN exogène amplifié par PCR, calcul de l'efficacité d'échange allélique après transformation TfoX dépendante.

Tableau 1 : éléments génétiques impliqués dans la virulence de souches pathogènes d'invertébrés marins

espèce	souche	gène
<i>V. crassostreae</i>	J2-9	R-5-.7
<i>V. aestuarianus</i>	12_016	varS
<i>V. nigripulchritudo</i>	SFn1	nigritoxin
<i>V. penaeicida</i>	AQ115	nigritoxin

Références bibliographiques :

- * Austin B.(2010) Vibrios as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol.*;140(3-4):310-7.
- * Hunt DE, Lawrence AD, Gevers D, Preheim S, Alm EJ, Polz MF (2008) Resource partitioning and sympatric differentiation among closely-related bacterioplankton. *Science*. 320: 1081-1085.
- * Meibom KL, Blokesch M, Dolganov NA, Wu CY, Schoolnik GK. (2005) Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science*. 16;310(5755):1824-7.
- * Le Roux F, Binesse J, Saulnier D, Mazel D. (2007). Construction of a *Vibrio splendidus* mutant lacking the metalloprotease gene *vsm* by use of a novel counterselectable suicide vector. *Appl Environ Microbiol*. 73(3):777-84.
- * Le Roux F, Davis B.M., Waldor M.K. (2011a) A conserved small RNA governs replication and incompatibility in diverse plasmids in marine bacteria. *Nucleic Acids Res*. 39 (3): 1004-13.
- * Le Roux F, Labreuche Y., Davis B.M., Iqbal N., Mangenot S., Goarant C., Mazel D., Waldor M.K. (2011b) Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependant on two plasmids. *Environ. Microbiol*. 13 (2):296-306.
- * Polz MF, Hunt DE, Preheim SP, & Weinreich DM (2006) Patterns and mechanisms of genetic and phenotypic differentiation in marine microbes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361(1475):2009-2021
- * Thompson FL, Iida T, Swings J. (2004) Biodiversity of Vibrios, *Microbiol Mol Biol Rev.*; 68(3): 403–431.

Présentation de l'équipe :

L'objectif de recherche de l'équipe Génomique des Vibrio est d'étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans l'émergence de vibrios pathogènes d'invertébrés marins. Nos principaux modèles d'études sont *V. splendidus* et *V. aestuarianus*, pathogènes de l'huître, *V. nigripulchritudo* et *V. penaeicida*, pathogènes de crevette. Les principaux atouts de l'équipe sont : a) la disponibilité de plusieurs génomes de vibrios ; b) la possibilité de cultiver aisément ces souches et de les mutagéniser ; c) la disponibilité de modèles d'infection ; d) la situation transverse entre la recherche fondamentale (évolution/adaptation de génomes bactériens) et appliquée (bactéries pathogènes d'espèces d'intérêt aquacole). L'équipe est composée de 2 chercheurs titulaires Ifremer, d'une assistante ingénieur CNRS, d'une ingénieur de recherche et d'un post-doctorant. Elle est installée au sein de la Station biologique de Roscoff, centre de recherche et d'enseignement en biologie et écologie marines situé sur la côte nord de la Bretagne. Elle dépend de l'Université Pierre et Marie Curie et du CNRS.

Publications récentes de l'équipe :

- Goudenège D, Labreuche Y, Krin E, Ansquer D, Mangenot S, Calteau A, Médigue C, Mazel D, Polz MF, Le Roux, F (2013) : Comparative genomics of pathogenic lineages of *Vibrio nigripulchritudo* identifies virulence-associated traits. The ISME Journal, 7(10):1985-96
- Labreuche Y, Pallandre L, Ansquer D, Herlin J, Wapotro B, Le Roux F. (2012) Pathotyping of *Vibrio* isolates by multiplex PCR reveals a risk of virulent strain spreading in New Caledonian shrimp farms. Microb Ecol. 63(1):127-38
- Le Roux F, Labreuche Y., Davis B.M., Iqbal N., Mangenot S., Goarant C., Mazel D., Waldor M.K. (2011) Virulence of an emerging pathogenic lineage of *Vibrio nigripulchritudo* is dependant on two plasmids. Environ. Microbiol. 13 (2):296-306.
- Le Roux F, Davis B.M., Waldor M.K. (2011) A conserved small RNA governs replication and incompatibility in diverse plasmids in marine bacteria. Nucleic Acids Res. 39 (3): 1004-13.