

CBRS
Rue du Pr Bernard Descotttes
87 025 Limoges Cedex, France
Tél : (33) (0) 519 564 260
Mél : resinfit@unilim.fr

Proposition de stage M2

Encadrement du stage

Nom/prénom/fonction : Da Re Sandra, chercheuse Inserm et Sophie Raherison, maître de conférences.

Laboratoire : UMR Inserm 1092 (RESINFIT)

Adresse complète: CBRS, rue du Pr Bernard Descotttes, 87025 Limoges Cedex.

tel : 05 19 56 42 63

courriel : sandra.da-re@unilim.fr et sophie.raherison@unilim.fr

Description du sujet : Evolution expérimentale d'intégrons de résistance en présence de concentrations subinhibitrices d'antibiotiques et en mode de vie biofilm.

Les intégrons de résistance (IR) sont des éléments génétiques bactériens qui contribuent à l'acquisition et à l'expression de gènes de résistance aux antibiotiques au sein de cassettes de gènes CG. Ils comportent une intégrase qui permet l'insertion de CG au sein d'un réseau de cassettes ainsi que la réorganisation de celui-ci. L'expression des gènes des CG est contrôlée par un promoteur unique Pc, elle dépend de la force de ce promoteur (variant fort PcS ou variant faible PcW) et de la position des cassettes dans le réseau. Par ailleurs, le variant faible PcW est considéré comme étant le Pc ancestral à l'origine des autres variants de Pc ayant émergé sous l'influence du stress antibiotique. D'autre part, le mode de vie biofilm est le mode de vie privilégié des bactéries dans les écosystèmes naturels. Au sein de celui-ci, des bactéries subissent des stress locaux qui peuvent induire l'expression de l'intégrase d'IR.

Ce sujet de Master s'inscrit dans le cadre du projet DIVIN dont l'objectif est d'évaluer l'effet du mode de vie bactérien (biofilm ou planctonique) et de doses sub-inhibitrices d'antibiotiques sur la dynamique évolutive des IR. Différentes souches bactériennes seront utilisées pour initier des expériences d'évolution expérimentale effectuées en mode de vie planctonique ou biofilm. Ces souches (*E. coli* pré-adaptée aux conditions d'évolution) contiennent un IR chromosomique synthétique, contenant 1 CG (aacA4+mCherry) ou 3 CG (dfrA15-aadA1-aacA4+mCherry) sous le contrôle du Pc faible PcW. L'évolution expérimentale sera réalisée en microplaqué sur une période de 1 mois. Les niveaux de fluorescence (analyse en FACS) et de résistance (concentration minimale inhibitrice et numération bactérienne) des populations bactériennes en cours d'évolution seront régulièrement suivis, l'évolution d'un PcW vers un PcS devant se traduire par une augmentation de ces 2 critères phénotypiques. Les populations bactériennes évoluées seront ensuite séquencées par NGS et analysées.

L'étudiant en Master prendra en charge la mise en œuvre et le suivi des expériences d'évolution expérimentale en mode de vie biofilm en présence de concentrations sub-inhibitrices d'antibiotiques, la caractérisation physiologique (niveau de résistance du biofilm, fluorescence mCherry, capacité d'adhésion et de formation de biofilm) des souches initiales et des populations bactériennes évoluées, et l'analyse des séquençages NGS si le temps le permet.

Principales techniques utilisées: culture bactérienne en microplaqué, concentration minimale inhibitrice (CMI), numération bactérienne, cytométrie en flux, PCR et séquençage Sanger.

Mots clés : *Escherichia coli*, intégrase d'intégron de résistance, biofilm, évolution expérimentale.

Références bibliographiques :

- Gillings MR. IMicrobiol Mol Biol Rev MMBR 2014;78:257–77. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>.
Strugeon E, Tilloy V, Ploy M-C, Re SD. MBio 2016;7:e00868-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00868-16>.
Tlili L, Ploy M-C, Da Re SD. 2021:2021.11.03.467100. <https://doi.org/10.1101/2021.11.03.467100>.

CBRS

Rue du Pr Bernard Descotttes

87 025 Limoges Cedex, France

Tél : (33) (0) 519 564 260

Mél : resinfit@unilim.fr

M2 Internship proposal

Supervision

Name/first name/function: Da Re Sandra, Researcher Inserm and Sophie Raherison, Assistant professor

Laboratory : UMR Inserm 1092 (RESINFIT)

Address: CBRS, rue du Pr Bernard Descotttes, 87025 Limoges Cedex.

tel : 05 19 56 42 63

email : sandra.da-re@unilim.fr; sophie.raherison@unilim.fr

Subject description : Experimental evolution of resistance integrons in the presence of subinhibitory concentrations of antibiotics and in biofilm lifestyle

Resistance integrons (RIs) are bacterial genetic elements that contribute to the acquisition and expression of antibiotic resistance genes within CG gene cassettes. They contain an integrase that allows CG insertion within a cassette network and the network reorganisation. The expression of CG genes is controlled by a single *Pc* promoter and depends on the strength of this promoter (strong variant *PcS* to weak variant *PcW*) and the position of the cassettes in the network. Furthermore, the weak variant *PcW* is considered to be the ancestral *Pc* from which other *Pc* variants have emerged under the influence of antibiotic stress. On the other hand, the biofilm lifestyle is the preferred lifestyle of bacteria in natural ecosystems. Within this ecosystem, bacteria undergo local stresses that can induce the expression of IR integrase.

This Master's thesis is part of the DIVIN project, which aims to evaluate the effect of bacterial lifestyle (biofilm or planktonic) and sub-inhibitory doses of antibiotics on the evolutionary dynamics of IRs. Different bacterial strains will be used to initiate experimental evolution experiments carried out in planktonic or biofilm lifestyle. These strains (*E. coli* pre-adapted to evolutionary conditions) contain a synthetic chromosomal IR, containing 1 CG (*aacA4+mCherry*) or 3 CGs (*dfrA15-aadA1-aacA4+mCherry*) under the control of the weak *PcW* promoter. Experimental evolution will be carried out in microtiter plates over a period of one month. The fluorescence levels (FACS analysis) and resistance (minimum inhibitory concentration and bacterial counts) of the evolved bacterial populations will be monitored regularly, as the evolution from *PcW* to *PcS* should result in an increase in these two phenotypic criteria. The evolved bacterial populations will then be sequenced by NGS and analysed.

The Master's student will be responsible for i) implementing and monitoring experimental evolution experiments in biofilm lifestyle in the presence of sub-inhibitory concentrations of antibiotics, ii) physiological characterisations (level of biofilm resistance, mCherry fluorescence, adhesion and biofilm formation capacity) of the initial strains and evolved bacterial populations, and iii) the analysis of NGS sequencing if time permits.

Main techniques used: bacterial culture in microplates, minimum inhibitory concentration (MIC), bacterial counting, flow cytometry, PCR and Sanger sequencing.

Keywords: *Escherichia coli*, resistance integron integrase, biofilm, experimental evolution.

References:

- Gillings MR. IMicrobiol Mol Biol Rev MMBR 2014;78:257–77. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>.
 Strugeon E, Tilloy V, Ploy M-C, Re SD. MBio 2016;7:e00868-16. <https://doi.org/10.1128/mBio.00868-16>.
 Tlili L, Ploy M-C, Da Re SD. 2021:2021.11.03.467100. <https://doi.org/10.1101/2021.11.03.467100>.