

Proposition de stage M2

Encadrement du stage

Nom/prénom/fonction : Da Re Sandra, chercheuse Inserm et Couvé-Deacon Elodie, MCU-PH.

Laboratoire : UMR Inserm 1092 (RESINFIT)

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

tel : 05 19 56 42 63

courriel : sandra.da-re@unilim.fr et elodie.couve-deacon@unilim.fr

Description du sujet : Etude de la régulation des intégrons chez *Acinetobacter* spp

Les intégrons de résistance de classe 1 (IR1) sont des structures permettant aux bactéries de s'adapter rapidement à la pression antibiotique et qui jouent un rôle majeur dans la propagation de la résistance aux antibiotiques parmi les bactéries Gram négatif. Les intégrons sont des plateformes génétiques capables de capturer, d'échanger et d'exprimer des gènes de résistance intégrés dans des cassettes de gènes (CG). Ces gènes sont exprimés à partir d'un promoteur commun Pc [1]. Il existe plusieurs variants de Pc de force variable (de faible PcW à fort PcS) chez les IR1, dont un retrouvé majoritairement – PcS – chez *Acinetobacter baumannii* (Ab) [2]. L'intégrase, IntI1, est l'élément clé des IRs, elle catalyse l'insertion et l'excision des CG par recombinaison spécifique de site. Chez *E. coli*, l'expression de *intI1* est sous le contrôle du répresseur LexA, le régulateur principal de la réponse SOS bactérienne [3]. Cette dernière est une réponse de défense bactérienne aux dommages à l'ADN qui peut être induite par différents stress dont certains antibiotiques [4]. Le genre *Acinetobacter* ne possédant pas le gène *lexA*, la réponse aux dommages à l'ADN chez ces espèces bactériennes dépend de deux régulateurs spécifiques du genre *Acinetobacter* : UmuDAb et DdrR [5].

Des travaux préliminaires, réalisés au laboratoire, indiquent que la régulation de l'expression de l'intégrase d'intégron ainsi que celle des cassettes de gène de résistance, serait régulée, entre autres, par la protéine UmuDAb chez Ab. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons construit des mutants de délétion *umuDAb* et *ddrR* dans une souche de Ab clinique et nous étudions la régulation des promoteurs de l'intégrase et des CG dans les différents fonds génétiques. Nous avons aussi montré que la protéine UmuDAb pouvait se fixer *in vitro* sur la région promotrice de *intI1*.

Le stage proposé consistera donc à étudier la régulation de l'expression de l'intégrase et des CG des intégrons chez *Acinetobacter* spp. par des approches de RT-qPCR. Des expériences de gels retard seront aussi réalisées pour déterminer si la protéine DdrR jouerait un rôle dans la fixation de UmuDAb la région promotrice de *intI1*.

Principales techniques utilisées : Purification de protéine ; Extraction d'ARN ; RT-qPCR ; Culture bactérienne ; Détermination de CMI ; Retard sur gel, extraction plasmidique, transformation.

Mots clés : *Acinetobacter baumannii*, intégrase d'intégron, intégron de résistance, régulation, réponse aux dommages de l'ADN.

Références bibliographiques :

- [1] Gillings MR. Microbiol Mol Biol Rev 2014;78:257–77. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>.
- [2] Couvé-Deacon E et al. Int J Antimicrob Agents 2019; 53:491–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.012>.
- [3] Guerin É et al. Science 2009;324:1034–1034. <https://doi.org/10.1126/science.1172914>.
- [4] Baharoglu Z, Mazel D. FEMS Microbiol Rev 2014;38:1126. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>.
- [5] Aranda J, et al. Bacteriol 2013;195:5577–82. <https://doi.org/10.1128/JB.00853-1>

M2 Internship proposal

Supervision

Name/first name/function: Da Re Sandra, chercheuse Inserm and Couvé-Deacon Elodie, MCU-PH

Laboratory : UMR Inserm 1092 (RESINFIT)

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

tel : 05 19 56 42 63

email : sandra.da-re@unilim.fr; elodie.couve-deacon@unilim.fr

Subject description : Study of integron regulation in *Acinetobacter* spp

Class 1 resistance integrons (IR1) are structures that enable bacteria to adapt rapidly to antibiotic pressure and play a major role in the spread of antibiotic resistance among Gram-negative bacteria. Integrons are genetic platforms capable of capturing, exchanging and expressing resistance genes integrated into gene cassettes (GC). These genes are expressed from a common promoter Pc [1]. There are several variants of Pc of varying strength (from weak PcW to strong PcS) in IR1s, one being found predominantly in *Acinetobacter baumannii* (Ab), PcS [2]. The integrase, *IntI1*, is the key element of IRs, catalysing the insertion and excision of GCs by site-specific recombination. In *E. coli*, the expression of *intI1* is under the control of the LexA repressor, the main regulator of the bacterial SOS response [3]. The latter is a bacterial defense response to DNA damage that can be induced by various stresses, including some antibiotics [4]. As the genus *Acinetobacter* does not possess the *lexA* gene, the response to DNA damage in these bacterial species depends on two regulators specific to the genus *Acinetobacter*: UmuDAb and DdrR [5].

Preliminary work carried out in the laboratory indicates that the regulation of integrase expression in integron, as well as that of resistance gene cassettes, is regulated, among other things, by the UmuDAb protein in Ab. To test this hypothesis, we have constructed *umuDAb* and *ddrR* deletion mutants in a clinical Ab strain to study the regulation of integrase and GC promoters in these different genetic backgrounds. We have also shown that the UmuDAb protein can bind *in vitro* to the *intI1* promoter region.

The proposed internship will therefore consist in studying the regulation of integrase and CG expression in *Acinetobacter* spp. using RT-qPCR approaches. Gel shift experiments will also be carried out to determine whether the DdrR protein plays a role in the binding of UmuDAb to the *intI1* promoter region.

Main techniques used: Protein purification; RNA extraction; RT-qPCR; Bacterial culture; MIC determination; Gel retardation, plasmid extraction, transformation.

Keywords: *Acinetobacter baumannii*, integron integrase, resistance integron, regulation, DNA damage response.

References:

- [1] Gillings MR. Microbiol Mol Biol Rev 2014;78:257–77. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00056-13>.
- [2] Couvé-Deacon E et al. Int J Antimicrob Agents 2019; 53:491–9. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.012>.
- [3] Guerin É et al. Science 2009;324:1034–1034. <https://doi.org/10.1126/science.1172914>.
- [4] Baharoglu Z, Mazel D. FEMS Microbiol Rev 2014;38:1126. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12077>.
- [5] Aranda J, et al. Bacteriol 2013;195:5577–82. <https://doi.org/10.1128/JB.00853-1>