

Ecole doctorale Environnements-Santé
Dossier de projet de thèse « Contrat doctoral Etablissements »
ANNEE 2025

1) Renseignements administratifs sur la direction de thèse¹ (1 page maximum) :

Directeur de thèse HDR

Nom : LLANES

Prénom : Catherine

Section CNU : 65

Grade : PU

HDR : Date de soutenance : 2009 Discipline : Microbiologie

L'HDR devra être soutenue, ou sa soutenance autorisée, au moment du dépôt du projet.

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : **adresse** : UFR Santé, 19, rue Ambroise Paré, 25000 Besançon ; **@** : cllanesb@univ-fcomte.fr ; **tel** : (+33) 3 63 08 22 76

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : **UMR 6249** Chrono-environnement ; **directrice** : Emilie Gauthier

Co-directeur de thèse

Nom : Hocquet

Prénom : Didier

Section CNU : 81

Grade : PU-PH

HDR : Date de soutenance : 2008 Discipline : Microbiologie

Coordonnées (adresse, courriel, téléphone) : **adresse** : UFR Santé, 19, rue Ambroise Paré, 25000 Besançon ; **@** : dhocquet@chu-besancon.fr ; **tel** : (+33) 3 70 63 21 34

Unité d'appartenance (intitulé, label, n°, directeur) : **UMR 6249** Chrono-environnement ; **directrice** : Emilie Gauthier

2) Descriptif du projet de thèse (devra inclure les rubriques suivantes) :

- Nom et label de l'unité de recherche

UMR 6249 Chrono-environnement (Agents Pathogènes)

- Localisation

UFR Santé, 19 rue Ambroise Paré, 25000 Besançon

- Nom du directeur de thèse et du co-directeur

Catherine Llanes / Didier Hocquet

- Adresse courriel du contact scientifique :

cllanesb@univ-fcomte.fr / dhocquet@chu-besancon.fr

- Titre du projet

Impact des systèmes de défense anti-phage sur la résistance et la diffusion du clone épidémique ST235 de *Pseudomonas aeruginosa*

- Description du projet (2 pages maximum)

Les bactériophages (ou phages) sont des virus naturels qui infectent les bactéries en injectant leur matériel génétique et provoquent la lyse cellulaire ; ils jouent par conséquent un rôle majeur dans la régulation des populations bactériennes cliniques et environnementales. Très

répandus dans les environnements telluriques, aqueux et dans les égouts, ils sont spécifiques d'une espèce, voire d'une population clonale. En réponse à ces virus, certaines bactéries ont développé de véritables systèmes de défense ; il s'agit généralement de systèmes de restriction-modification qui clivent l'ADN exogène et peuvent conférer aux bactéries une véritable immunité adaptative contre les signatures génétiques des phages précédemment rencontrés (Smith et al., 2023, Nat Rev Microbiol). Plus récemment, des systèmes de suicide programmés ont été mis en évidence, basés sur l'induction de carences ou sur la production de toxines, provoquant la mort cellulaire avant que le virus ait pu achever son cycle (Hampton et al., 2020, Nature). Cette co-évolution phages/bactéries a finalement conduit à la sélection de clones plus résistants que d'autres à la prédation des phages (Markwitz et al., 2022, The ISME Journal).

Le clone ST235 de *P. aeruginosa*, dont la diffusion est mondiale, fait partie des clones à haut risque épidémique. Particulièrement virulent en raison de la production de la phospholipase ExoU, ce clone est associé à une faible chance de succès thérapeutique en raison de son profil hautement résistant aux antibiotiques, résultat de l'acquisition de gènes par transfert horizontal. Des travaux préliminaires menés au laboratoire Chrono-environnement ont montré que ce clone pourrait devoir sa capacité accrue de survie dans l'environnement en échappant à la prédation des bactériophages (données non publiées) car (1) il est beaucoup plus résistant aux phages que la souche de référence *P. aeruginosa* PAO1, (2) il présente un cluster de 10 gènes (*cluster 2*) prédit pour coder des systèmes de défense anti-phages en particulier les systèmes Gabija (clivage de l'ADN exogène) et PsyrT/PsyrA (système suicide toxine/antitoxine), et (3) l'inactivation de ce cluster 2 rend ce clone sensible aux phages.

Dans ce contexte, le doctorant devra donc : (i) étudier l'impact sur la défense anti-phage des systèmes Gabija (clivage de l'ADN exogène) et PsyrT/PsyrA (toxine/antitoxine) présents chez le clone épidémique H27244 (ST235), (ii) étudier la répartition de ces systèmes dans d'autres ST de *P. aeruginosa* épidémiques et non-épidémiques, (iii) mesurer le niveau d'expression de ces systèmes chez différents ST, (iv) étudier la nature des phages ciblés par ces systèmes de défense, et (v) étudier la compatibilité des systèmes entre eux et déterminer s'ils peuvent avoir un effet synergique.

1. Isolement et purification de phages. Dans ce projet, les phages utilisés seront ceux purifiés à partir d'échantillons du bassin d'aération de la station d'épuration Port Douvot (Besançon). Ils seront amplifiés par incubation en présence de différentes souches de *P. aeruginosa* (clone ST235 H27244, clones de différents ST (CRB, CHU Besançon) et souches de référence PAO1 et PA14). La technique de plages de lyse en double agar sera ensuite utilisée pour isoler les phages et les extraire pour les conserver dans du *phage buffer* à 4°C. Tous les extraits de phages seront quantifiés en déterminant leur titre exprimé en PFU (Plaque Forming Unit)/mL. Les phages les plus intéressants pourront être séquencés afin de déterminer à quelle famille ils appartiennent (en majorité *Myoviridae*, *Podoviridae*, ou *Siphoviridae*) et d'identifier les stratégies de prédation anti-*Pseudomonas* développées par ces virus.

2. Étude de l'impact des systèmes Gabija et PsyrT/PsyrA sur la défense anti-phage. Les deux systèmes, codés par des gènes organisés en 2 opérons (*gajAB* et *psyrTA*), seront inactivés chez la souche parentale H27244 (CRB, CHU Besançon) par recombinaison homologue en utilisant la technologie *NEBuilder* (New England Biolabs) et le plasmide suicide pKNG101 (Kaniga et al. 1991, Gene), donnant les mutants *knock-out* H27244Δ*gajAB* et H27244Δ*psyrTA*. La sensibilité des mutants sera comparée par un test de plages de lyse vis-à-vis de phages isolés de station d'épuration. Pour estimer et visualiser la cinétique de lyse des populations bactériennes, des mesures de croissance bactérienne seront effectuées en microplaque en présence de solutions phagiques à différentes MOI (*Multiplicity Of Infection*, correspondant

au ratio particules virales/bactéries) par le spectromètre-incubateur Spark (Tecan, Männedorf) capable d'incuber à 37°C et de mesurer l'absorbance (A_{600nm}) toutes les 30 min pendant 18h sous agitation. Le système Gabija étant basé sur la reconnaissance d'une séquence d'ADN phagique spécifique de 15 nucléotides (5'-AATAACCCGGATATT-3'), cette séquence sera clonée dans le plasmide pMF230 (don de Karen Moreau, CIRI, université Lyon 1), porteur du gène de la GFP (*green fluorescent protein*), puis transférée dans *P. aeruginosa*. L'activation du système Gabija et la lyse de l'ADN plasmidique pourront être suivies au cours du temps par la perte de fluorescence de la souche recombinante.

3. Étude de la répartition des systèmes anti-phages chez les autres ST de *P. aeruginosa* et mesure de leur niveau d'expression. Les gènes des systèmes Gabija et PsyrT/PsyrA contenus dans le cluster de 10 gènes spécifique du clone ST235 ont été ponctuellement identifiés chez d'autres clones de *P. aeruginosa*. Afin de comprendre pourquoi ces systèmes sont particulièrement actifs chez la souche H27244, nous étudierons le transcriptome de la souche H27244 et de son mutant *knock-out* H27244 Δ cluster2 (Microsynth, Balgach, Suisse) ; par la suite nous mesurerons les niveaux d'expression des gènes *gajAB* et *psyrTA* par RTqPCR chez différents clones appartenant à d'autres ST épidémiques et non-épidémiques et qui possèdent le cluster 2 (par exemple, ST3002, ST1290, ST760). La toxine GajA induisant la mise en place de la réponse SOS (qui permet aux bactéries de maintenir la réplication de leur génome), le niveau d'expression des gènes du système SOS (*lexA*, *recA*...) sera également évalué.

4. Identification des phages visés par les systèmes de défense du clone ST235. Les systèmes de défense étant souvent spécifiques de certains types de phages, nous chercherons à identifier ceux ciblés par les systèmes Gabija et PsyrT/PsyrA du clone ST235. Pour cela, en testant une collection de 35 phages anti-*Pseudomonas* (collaboration avec G. Resch, CHUV de Lausanne) sur la souche H27244 et ses mutants dérivés H27244 Δ cluster2, H27244 Δ gajAB et H27244 Δ psyrTA, nous identifierons ceux (phages à ADN simple brin, double brin, circulaire ou linéaire) actifs sur le clone ST235 et au contraire, ceux visés par les systèmes de défense codés par le cluster 2. La recherche de la signature nucléique propre au système Gabija peut déjà donner des indices sur les types de phages ciblés par ce système.

5. Synergie des systèmes de défense anti-phage. Afin de mesurer si l'accumulation de plusieurs systèmes de défense peut avoir un effet synergique sur la résistance aux phages, les systèmes *gajAB* et *psyrTA* seront clonés séparément dans le plasmide pSW196 puis complétés dans la souche H27244 dépourvue de cluster 2 (H27244 Δ cluster2). L'avantage de ce plasmide (don de Sylvie Elsen, IBS Grenoble) est qu'il est non seulement intégrable dans le chromosome de *P. aeruginosa*, permettant une expression naturelle des gènes clonés, mais également inductible par l'arabinose, permettant leur surexpression. Des tests de lyse, effectués sur la souche complétée par les deux systèmes, seuls ou combinés, permettra d'indiquer si les mécanismes de défense anti-phage peuvent agir de façon synergique. En parallèle, nous rechercherons *in silico* dans les génomes des différents ST de *P. aeruginosa*, si ces systèmes de défense peuvent coexister avec d'autres, tels que ceux de la famille CrispR-Cas, et si cela bn être relié au caractère épidémique des clones.

Ce projet, basé sur l'expertise en biologie moléculaire et microbiologie fondamentale du laboratoire Chrono-Environnement, l'expertise épidémiologique du CRB (CHU Besançon), et les capacités d'analyse bio-informatique de la plateforme 2B2S (CHU/UFR Santé, Besançon), devrait permettre de comprendre si la différence de sensibilité aux phages peut modifier la distribution des clones de *P. aeruginosa* dans l'environnement, leur persistance et leur plus grande diffusion.

- Financement du projet

Type de financement	Montant	Acquis/Soumis/Prévu
HARMI	28.000 €	soumis (janvier 2025 - réponse juin 2025)
Chrysalide UFC	9.000 €	prévu (septembre 2025)
CHU Besançon	3.000 € 5.000 €	acquis (AAP CELIA) prévu
Chrono-environnement	3.000 €	acquis (informatique, soutenance, budget thèmes)
Ecole doctorale ES	1.500 €	acquis sur 3 ans (congrès)
TOTAL	49.500 €	

- Connaissances et compétences requises

Connaissances pratiques et théoriques en microbiologie et biologie moléculaire.

Bases solides en bio-informatique.

Pratique de l'anglais écrit et lu.

Capacité à communiquer à l'oral et à l'écrit.

Bonne intégration dans le groupe de recherche Agents Pathogènes.

Résumé en français et anglais (limité chacun à 1800 caractères)

Résumé en français

Objectif. Ce projet a pour objectif de montrer l'impact des virus bactériens (phages) dans la sélection, le maintien et la diffusion planétaire de certains clones de la bactérie pathogène opportuniste *Pseudomonas aeruginosa*. Des travaux préliminaires effectués au laboratoire Chrono-environnement ont montré que la quasi-totalité des génomes du clone ST235 de *Pseudomonas aeruginosa*, un clone épidémique à haut-risque multi-résistant, possède un cluster de gènes spécifiques qui permettent à la bactérie de résister aux phages. Il s'agira dans ce projet d'étudier les 10 gènes de ce cluster et de comprendre individuellement leur rôle dans la défense aux phages (en particulier les systèmes PsyrTA et Gabija) afin de valider l'hypothèse que la meilleure diffusion de ces clones épidémiques est potentiellement liée à leur capacité à résister à destruction médiée par les phages.

Réalisation. Pour réaliser cet objectif, nous utiliserons à la fois des approches de biologie moléculaire et de bio-informatique. Les 10 gènes spécifiques du ST235 seront inactivés un par un puis complétés par insertion chromosomique afin d'évaluer leur rôle dans la capacité des bactéries résister à la lyse par les phages. Une première partie du travail sera faite avec des phages collectés et purifiés à partir de boues de station d'épuration ; puis nous utiliserons 35 phages issus de collections et caractérisés pour leur activité anti-*Pseudomonas* grâce à une collaboration avec Gregory Resch (CHUV de Lausanne). Grâce à l'appui du Centre de Ressources Biologique – Filière Microbiologique du CHU de Besançon (ayant à disposition > 2000 isolats de *P. aeruginosa* appartenant à > 200 ST différents), et des collections de génomes disponibles sur les bases publiques NCBI et EBI, la distribution des principaux systèmes de défense PsyrTA et Gabija sera évaluée dans les souches cliniques et environnementales ; ce travail permettra d'évaluer si ces systèmes peuvent coexister avec d'autres, tels que ceux de la famille CrispR-Cas, et si cela peut améliorer la diffusion de clones de *P. aeruginosa*.

Résumé en anglais

Objectives. This project aims to investigate the influence of bacterial viruses (phages) on the selection, maintenance and global spread of specific clones belonging to the opportunistic pathogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Preliminary studies at the Chrono-environnement laboratory have shown that almost all genomes of the *P. aeruginosa* ST235 clone - a high-risk, multidrug-resistant epidemic clone - contain a specific gene cluster of genes that enables the

bacterium to resist phages. This project will focus on studying the 10 genes of this cluster and understanding individually their roles in phage defence (in particular the *PsyRTA* and *Gabija* systems); this should allow to test the hypothesis that the superior dissemination of some epidemic clones may be related to their ability to resist phage-mediated destruction.

Achievement. To achieve this goal, we will use both molecular biology and bioinformatics approaches. The 10 specific ST235 genes will be inactivated one by one and then complemented by chromosomal insertion to assess their role in conferring bacterial resistance to phage-mediated lysis. The first part of this work will involve phages collected and purified from sewage treatment plant sludge. Subsequently, we will use 35 phages from collections known for their activity against *Pseudomonas* (collaboration with Gregory Resch, CHU Lausanne). With the support of the Biological Resource Center – Microbiological branch of the CHU Besançon (having access to > 2000 isolates of *P. aeruginosa* belonging to > 200 different STs), as well as genome collections available in public databases such as NCBI and EBI, we will study the distribution of the main *PsyRTA* and *Gabija* defence systems in clinical and environmental strains. We will also determine whether these defence systems can coexist with others, such as those of the CRISPR-Cas family, and the impact of this coexistence on the spread of such clones.

Préciser le domaine de compétence dans la liste ci-dessous (2 choix possibles maximum)

[Santé, médecine humaine, vétérinaire](#)

Mots clés : *Pseudomonas aeruginosa* épidémique, résistance aux antibiotiques, résistance aux phages