

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe MAUPAS »

Année 2021

N° 82

MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ETUDES SPÉCIALISÉES

Spécialité Biologie Médicale

TENANT LIEU DE THÈSE D'EXERCICE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Par

Coralie LEMAIRE née le 26 mai 1993 à CHARTRES (28)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 01/10/2021

**ETUDE DE LA REGULATION DU SYSTEME CRISPR-CAS9 CHEZ
*STREPTOCOCCUS AGALACTIAE***

JURY

Président : Monsieur le Professeur Denys Brand, PU, UFR de Pharmacie-Tours
Membres : Monsieur le Professeur Philippe Lanotte, PU-PH, UFR de Pharmacie, CHRU
de TOURS
Madame le Docteur Adeline Pastuszka, AHU, UFR de Médecine, CHRU de
TOURS
Monsieur le Professeur Laurent Mereghetti, PU-PH, UFR de Médecine, CHRU
de TOURS
Madame le Docteur Catherine Schouler, Docteur en sciences, INRAE, UMR
1282, Nouzilly

ANNEE : 2020 - 2021

Directrice : Pr Véronique MAUPOIL

Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS

Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN

ENSEIGNANTS

10 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
GIRAUDEAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

35 MAITRES DE CONFÉRENCES

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MUNNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
ODIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA
VIERRON	Emilie	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

3 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE

1 CONTRAT D'ENSEIGNEMENT

VANIER	Antoine	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
--------	---------	-----------------------------

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

2 CHARGÉS DE RECHERCHE

MEVELEC	Marie-Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE

1 PHARMACIEN D'OFFICINE – PAST (Enseignant Associé)

JOYEUX	VINCENT	Filière Pharmacie
--------	---------	-------------------

2 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

1 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

HEREDIA-MARQUEZ	Arturo Vladimir	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
-----------------	-----------------	--



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

***D'**honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

***D'**exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

***De** ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

***En** aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

***De** ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

***De** faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

***De** coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

***Que** les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

Date : 01/01/2021

L'étudiant

M^{me} LEMAIRE Coralie

Le Doyen de la Faculté

Professeur Véronique Maupoil

Remerciements

A Monsieur le Professeur Denys Brand

Je vous remercie pour la qualité de vos enseignements sur l'ensemble de mon parcours, que ce soit en ses débuts à la faculté de pharmacie ou par la suite, sur ce même lieu mais lors du Master 2. Vous me faites maintenant l'honneur de présider ce jury pour juger ce travail et je vous en remercie.

A Monsieur le Professeur Philippe Lanotte

Je vous remercie pour vos enseignements théoriques et pratiques à la faculté de pharmacie qui m'ont donné goût à la bactériologie. Pour votre confiance, votre suivi et vos conseils tout au long de mes études, en commençant par mon externat de pharmacie, en passant par la préparation du concours de l'internat puis les différents stages hospitaliers qui ont suivi, le stage de M2 qui m'a permis de débiter sur le sujet de cette thèse d'exercice et de le poursuivre aujourd'hui. Je suis ravie de pouvoir poursuivre un bout de mon avenir professionnel et continuer à apprendre à vos côtés.

A Madame le Docteur Adeline Pastuszka

Je te remercie pour ta disponibilité, ta patience, ta joie de vivre et tout le temps que tu m'as accordé au cours de la réalisation de ce travail et pendant mes précédentes années d'internat. Je te remercie également pour le partage de tes connaissances dans le domaine de la bactériologie et surtout sur ce sujet de thèse qui, je le sais, te passionne énormément. Au-delà du côté professionnel je te remercie d'être là, je suis très contente de t'avoir rencontré, tu es une très belle personne. Tu vas me manquer pendant cette année au Canada mais je sais que tu vas passer un super moment et de mon côté j'espère être à la hauteur. Et bien évidemment les mojitos seront prêts pour ton retour !!!

A Monsieur le Professeur Laurent Mereghetti

Je vous remercie pour votre accueil, votre disponibilité et votre confiance, que ce soit au laboratoire de bactériologie, à l'hôpital, ou au sein de l'équipe de recherche, mais aussi pour la qualité de vos enseignements et la pédagogie dont vous faites preuve au quotidien. Merci également de me permettre de continuer un peu le beau chemin de la bactériologie avec vous, j'en suis très heureuse.

A Madame le Docteur Catherine Schouler

Je vous remercie pour l'honneur que vous me faites de participer à ce jury et pour le temps que vous prenez pour juger mon travail.

Je tiens également à remercier l'ensemble du service de Bactériologie et Virologie de Tours pour tout le savoir que chacun a pu me transmettre au cours de ces quelques années. Merci pour votre bonne humeur et votre confiance et que cela continue !!!

Merci également à l'équipe, biologistes et techniciens, du laboratoire de microbiologie du CHR d'Orléans qui m'ont permis d'évoluer et de prendre de l'indépendance dans mes décisions biologiques. J'ai passé un super (court) semestre avec vous.

Un grand merci à l'ensemble de l'équipe « Bactéries et risque materno-fœtal » pour leur gentillesse, leur disponibilité, leur bonne humeur mais aussi leurs précieux conseils qui m'ont permis d'avancer dans ce travail. Merci notamment à Emilie Camiade qui a toujours su répondre à mes questions et m'aider à trouver des solutions aux problèmes et incompréhensions rencontrés, à Aurélia Hiron pour le temps passé à m'expliquer les démarches à suivre pour la mise en place du marquage de la protéine Cas9, à Eric Morello pour son aide, ses conseils tout au long de mon stage, à Philippe Gilot qui m'a guidé pour ne pas me précipiter et faire des erreurs sur des éléments auxquels je n'avais pas pensé, à Vanessa Rong qui m'a montré le déroulement et expliqué toutes les manipulations pour que je puisse réaliser mes expériences pour ce projet, à Daniel Niquet sans qui la réalisation pratique des expérimentations ne serait pas possible. Merci également aux doctorants qui ont partagé leurs expériences et les problèmes qu'ils ont pu rencontrer au cours de leurs années de recherche pour m'aider à résoudre les miens et merci à toute l'équipe dans sa globalité pour les conseils que ce soit lors de réunions d'équipe ou quotidiennement tout au long du stage.

Merci à mes co-internes pour ces belles années, Hugo, Gauvin, Wayne, Marion, Natacha... je ne continue pas la liste et vous ne m'en voudrez pas, elle est longue et j'aurai trop peur d'oublier quelqu'un si je la poursuivais.

Merci à mes pépites, les années passent, la fac est de plus en plus loin, chacun continue sa vie, son chemin mais je sais que vous êtes tous là et les retrouvailles sont toujours aussi belles.

Particulièrement un paragraphe qui me tient à cœur : merci à mes parents sans qui tout ça n'aurait jamais pu exister. Vous avez eu confiance en moi, vous m'avez suivi sur mes choix sans jamais douter de moi, vous m'avez soutenu dans les moments plus difficiles. Je ne sais même pas comment vous remercier, encore aujourd'hui mais MERCI et je ne le dis pas souvent mais je vous aime. Dans la continuité merci à mon PETIT frère, Victorien, tout le monde ne peut pas en dire autant mais notre relation s'est toujours extrêmement bien passée jusqu'à nos petites années colocations à Tours, je t'aime également. Merci à Soso d'être toujours là, depuis de nombreuses années maintenant, j'en suis ravie, tu es quelqu'un de formidable.

Et pour finir, à toi Brice, je te remercie d'être là au quotidien pour moi pour les moments magiques comme les moments moins agréables... ceux où je boude par exemple. Comme tu le disais, à nos projets, et ils avancent et seront encore nombreux, ce n'est que le début !!!!

Merci à tous et à ceux qui ne sont pas dans ce texte mais à qui je pense pourtant : MERCI !!!

Table des matières

1. Introduction.....	14
1.1. <i>Streptococcus agalactiae</i>	14
1.1.1. Pouvoir pathogène	14
1.1.2. Classification phylogénétique	16
1.2. Les systèmes CRISPR-Cas.....	18
1.2.1. Généralités.....	18
1.2.2. Le système CRISPR-Cas de type II-A chez <i>Streptococcus agalactiae</i>	19
1.2.3. Le système CRISPR-Cas9 comme outil génétique	23
1.2.4. Le système CRISPR comme outil de typage.....	23
1.2.5. Eléments de régulation des systèmes CRISPR-Cas.....	24
1.3. Travaux préalablement réalisés au sein de l'équipe	26
2. Objectifs.....	29
3. Matériels et méthodes.....	30
3.1. Souches bactériennes	30
3.2. Plasmides.....	30
3.3. Conditions de cultures et stimuli	31
3.3.1. Stimulation du système CRISPR-Cas en présence d'un stress acide	31
3.3.2. Stimulation du système CRISPR-Cas en présence d'un plasmide	31
3.3.3. Stimulation du système CRISPR-Cas en présence d'un stress antibiotique	33
3.4. Mesure de la transcription du gène <i>cas9</i> par RT-qPCR.....	34
3.4.1. Extraction des ARN totaux	34
3.4.2. Elimination de l'ADN génomique résiduel.....	35
3.4.3. Synthèse des ADN complémentaires	36
3.4.4. Quantification de la transcription de <i>cas9</i>	36
3.5. Mesure de la traduction de la protéine Cas9	38
3.5.1. Création des inserts	38

3.5.2.	Construction des plasmides	42
3.5.3.	Transformation chez <i>E. coli</i>	42
3.5.4.	Séquençage des plasmides obtenus.....	43
3.5.5.	Transformation chez <i>S. agalactiae</i>	44
3.5.6.	Application des différentes conditions de stress sur les souches mutées.....	46
3.5.7.	Extraction des protéines	46
3.5.8.	Réalisation des Western-Blots.....	47
4.	Résultats.....	50
4.1.	Mesure de l'expression du gène <i>cas9</i> par RT-qPCR en temps réel.....	50
4.1.1.	Evaluation de l'impact de la présence d'un stress acide sur l'expression du gène <i>cas9</i>	50
4.1.2.	Evaluation de l'impact de la présence d'un plasmide sur l'expression du gène <i>cas9</i>	53
4.1.3.	Evaluation de l'impact de la présence d'un stress antibiotique sur l'expression du gène <i>cas9</i>	57
4.1.4.	Pénicilline G	57
4.1.5.	Vancomycine	59
4.2.	Mesure de la traduction de la protéine Cas9 par Western-Blot.....	61
4.2.1.	Essai à l'INRAE	61
4.2.2.	Mise au point au laboratoire	64
5.	Discussion.....	66
6.	Conclusion	73
7.	Références bibliographiques.....	76

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

ADNg : ADN génomique

ARN : Acide ribonucléique

ARNd : ARN “DNasé”

Bsa : serum Albumine Bovine

Cas : CRISPR associated

CC : complexe clonal

CMI : concentration moyenne inhibitrice

CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

crRNA : ARN CRISPR

dNTP : Désoxyribonucléotide 5' triphosphate

DO : Densité optique

DTT : dithiothréitol

DR : Direct repeat

E : Efficacité

EGM : Elément génétique mobile

HCl : Acide chlorhydrique

HvgA : Hypervirulent group B Streptococcus Adhesin

IAA : Alcool isoamylique

LB : Lysogeny Broth

MLST : Multi Locus Sequence Typing

NCBI : National Center for Biotechnology Information

PAM : Protospacer Adjacent Motif

Pb : Paires de bases

PCR : Polymerase chain reaction

RBS : Ribosome Binding Site

Rpm : rotations par minute

RT : Reverse transcription

RT-qPCR : Reverse transcription quantitative Polymerase chain reaction

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

ST : Sequence Type

TBS : Tris Buffered Saline

TCS : système à deux composants

TH : Todd Hewitt

Tm : melting temperature ou temperature d'hybridation

tracrRNA : *trans*-activating CRISPR RNA

TSS : trypticase soja sheep blood

TSS : site d'initiation de la transcription

T+ : témoin positif

T- : témoin négatif

U : unité(s)

Liste des figures

Figure 1 : Physiopathologie de l'infection néonatale à streptocoque du groupe B.....	15
Figure 2 : Organisation générale d'un système CRISPR-Cas	19
Figure 3 : Organisation du système CRISPR-Cas de type II-A.....	20
Figure 4 : Représentation schématique du mécanisme d'action d'un système CRISPR-Cas de type II-A	22
Figure 5 : Modification de la réponse du système CRISPR-Cas par le quorum sensing	25
Figure 6 : Nombre moyen de spacers au sein du locus CRISPR1 de <i>S. agalactiae</i> en fonction des principales lignées phylogénétiques	27
Figure 7 : Représentation schématique de la région intergénique en amont de <i>cas9</i> de <i>S. agalactiae</i> , chez différentes lignées phylogénétiques majeures	28
Figure 8 : Représentation schématique du lieu d'insertion du 3X flag au sein du génome de <i>S.</i> <i>agalactiae</i> pour les mutants marqués en N-terminal.....	38
Figure 9 : Expression relative du gène <i>cas9</i> pour chaque souche dans les conditions « stress acide » à t = 5 minutes et t = 10 minutes, comparativement à la condition « pH neutre » prise comme référence.	52
Figure 10 : Expression relative du gène <i>cas9</i> chez A909 et BM110 par rapport à NEM316 pour le stimulus « stress acide ».....	53
Figure 11 : Expression relative du gène <i>cas9</i> pour l'ensemble des conditions testées concernant le stimulus « plasmide ».....	54
Figure 12 : Expression relative du gène <i>cas9</i> chez A909 et BM110 par rapport à NEM316 pour le stimulus « plasmide ».....	56
Figure 13 : Courbes de croissance de chacune des souches de <i>S. agalactiae</i> étudiées en fonction de la concentration en pénicilline G.....	58
Figure 14 : Effet de deux antibiotiques, la pénicilline G la vancomycine, sur la transcription du gène <i>cas9</i>	59
Figure 15 : Courbes de croissance de chacune des souches de <i>S. agalactiae</i> étudiées en fonction de la concentration en vancomycine.	60
Figure 16 : Image du gel de polyacrylamide après migration des protéines, coloré au bleu de Neuhoff.	62
Figure 17 : Image reconstituée, après révélation, de la membrane de nitrocellulose du western-blot du premier essai.....	63
Figure 18 : Image reconstituée, après révélation, de la membrane de nitrocellulose du western-blot du deuxième essai.....	64

Liste des tableaux

Tableau 1: Tableau des amorces utilisées pour amplifier les gènes de ménages <i>recA</i> , <i>gyrB</i> et <i>rpoB</i> et le gène <i>cas9</i>	37
Tableau 2 : Tableau des amorces utilisées pour créer les inserts pour marquer la protéine Cas9 en région N-terminale.....	40
Tableau 3 : Tableau des amorces utilisées pour la vérification par séquençage des mutants construits.	44

1. Introduction

1.1. *Streptococcus agalactiae*

Streptococcus agalactiae est un cocci à Gram positif de la famille des *Streptococcaceae* qui se présente sous forme de chainettes de longueur variable. Il appartient au groupe B de la classification de Lancefield basée sur les propriétés antigéniques d'un composant de la paroi bactérienne, le polyside C (Lancefield, 1933).

1.1.1. Pouvoir pathogène

Historiquement, cette bactérie a d'abord été décrite en pathologie animale et particulièrement pour son implication dans les mammites bovines (Nocard E., Mollereau R., 1887). C'est de là que lui vient son nom puisque « *agalactiae* » signifie « absence de lait ». Dans les années 1960, les premiers cas d'infection chez l'Homme sont décrits et il se voit qualifié de pathogène émergent.

D'une part, cette bactérie est connue principalement dans le domaine de la gynécologie-obstétrique comme étant responsable d'infections materno-fœtales précoces (de la naissance jusqu'à 7 jours de vie) et tardives (au-delà de 7 jours et jusqu'à 3 mois, Verani and Schrag, 2010). En effet, c'est une bactérie commensale de l'Homme, présente de manière asymptomatique au niveau digestif et au niveau du tractus génital. Environ 15 à 30% des femmes sont porteuses de *S. agalactiae* au niveau vaginal, de manière asymptomatique et parfois transitoire, y compris les femmes enceintes (Van der Mee-Marquet *et al.*, 2008). Ce portage constitue un facteur de risque important d'infection néonatale par la possible transmission des bactéries par voie ascendante (du vagin vers le liquide amniotique), ou au moment du passage de la filière génitale par le nouveau-né lors des accouchements par voie basse (Figure 1, Tazi *et al.*, 2011). En effet lors de ce passage, le nouveau-né peut inhaler les sécrétions vaginales et par conséquent les bactéries lorsque la mère est colonisée. Les bactéries iront alors se multiplier au niveau pulmonaire et pourront entraîner des infections précoces, principalement des pneumonies, qui pourront être accompagnées ou non de bactériémies. Les bactériémies, qu'elles soient consécutives à une pneumonie ou dues à une transmission ascendante, pourront engendrer secondairement une méningite chez le nouveau-né. Les infections tardives, quant à elles, semblent plutôt dues à un portage digestif persistant de la bactérie chez le nouveau-né. En présence de circonstances favorisantes et de certaines souches,

une translocation peut ensuite avoir lieu et pourra engendrer une bactériémie pouvant se compliquer, plus fréquemment que dans les infections précoces, d'une atteinte méningée. Les souches possédant certains facteurs de virulence, tels que l'adhésine HvgA, qui favorise l'attachement de la bactérie aux cellules et permet un passage plus aisé pour la bactérie de l'endothélium vasculaire ainsi que le franchissement de la barrière hémato encéphalique, sont particulièrement impliquées dans ces infections (Tazi *et al.*, 2010).

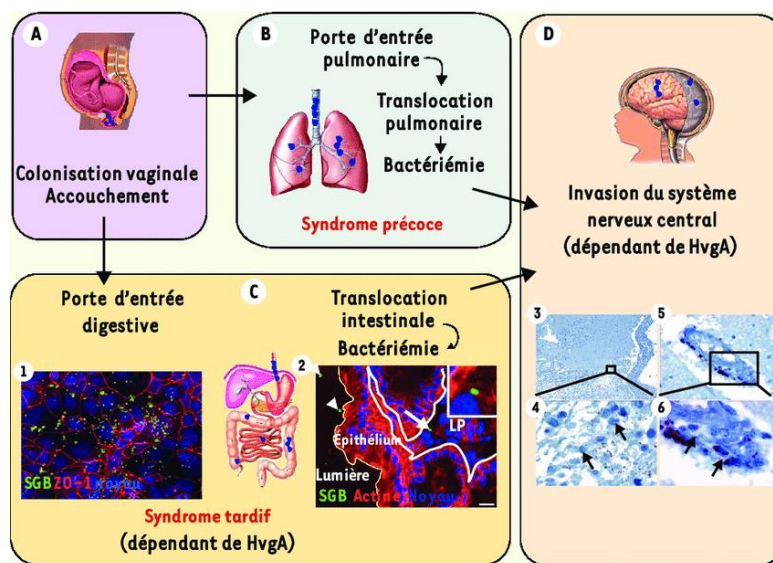


Figure 1 : Physiopathologie de l'infection néonatale à streptocoque du groupe B (Tazi *et al.*, 2011).

A. Le nouveau-né se contamine lors de l'accouchement par inhalation et ingestion des sécrétions vaginales ou du liquide amniotique contaminés de la mère.

B. Le syndrome précoce (au cours de la première semaine de vie) résulte d'une infection pulmonaire qui peut aboutir à une bactériémie et secondairement à une invasion du système nerveux central.

C. Le syndrome tardif (de 7 à 89 jours) est probablement dû à une colonisation intestinale précoce qui dépend de l'adhésine HvgA, suivie d'une translocation digestive, et secondairement d'une bactériémie avec invasion possible du système nerveux central. Les deux encadrés (1 et 2) illustrent la localisation digestive des streptocoques du groupe B (clone ST-17) *in vitro* (1) sur des cellules intestinales Caco2 et *in vivo* (2) sur des coupes de côlon de souris infectées par voie orale avec du streptocoque du groupe B. LP : lamina propria. Pointes de flèches : bactéries intraluminales. Flèche : bactéries dans la lamina propria.

D. L'invasion du système nerveux central par les bactéries circulantes (quel que soit le mode de contamination initial) est favorisée par l'adhésine HvgA. Le résultat de l'analyse immuno-histopathologique du système nerveux central d'un nouveau-né décédé d'un syndrome tardif avec méningite est présenté en 3, 4, 5, 6. Les méninges (3, 4) et les micro-vaisseaux cérébraux (5, 6) sont envahis de streptocoques du groupe B révélés à l'aide d'un anticorps polyclonal spécifique de SGB (flèches).

Le système immunitaire des nouveau-nés étant immature, ceux-ci sont plus susceptibles de développer une infection et la mortalité due à ces infections est importante. C'est pourquoi depuis 2001, en France, un dépistage systématique du portage de *S. agalactiae* chez la femme enceinte par écouvillonnage vaginal est recommandé entre la 34^{ème} et la 38^{ème} semaine d'aménorrhée, afin de pouvoir mettre en place une antibioprophylaxie au moment du travail si le dépistage est positif (Recommandations HAS, 2001). Cela a permis de diminuer le nombre d'infections néonatales précoces mais n'a eu que peu d'impact sur les infections tardives (Jourdan-Da Silva N. *et al.*, 2008; Phares *et al.*, 2008). Les infections précoces restantes sont dues soit à une absence de dépistage, soit à un dépistage faussement négatif, le portage vaginal étant intermittent et transitoire.

D'autre part, *S. agalactiae* émerge dans d'autres domaines puisqu'il cause également des infections invasives chez le sujet âgé et chez l'immunodéprimé dans les pays développés, pouvant entraîner des infections urinaires, des infections de la peau et des tissus mous, des infections ostéo-articulaires ou plus rarement des atteintes méningées ou cardiaques (Farley *et al.*, 1993). Ces différentes infections sont aujourd'hui de plus en plus nombreuses par rapport aux infections materno-fœtales et différentes lignées phylogénétiques de *S. agalactiae* sont impliquées (Ballard *et al.*, 2016). En effet, grâce aux différentes méthodes de typage existantes, il a été montré que selon la pathologie, les souches impliquées étaient de lignées génétiques différentes. La virulence et la pathogénicité de la bactérie semblent donc variables selon la souche impliquée.

1.1.2. Classification phylogénétique

Pour étudier l'épidémiologie des infections à *S. agalactiae*, différentes techniques de typage des souches ont été développées. Historiquement, la première méthode utilisée était basée sur la composition des polysaccharides formant la capsule et ainsi 10 sérotypes de *S. agalactiae* ont été définis (Ia, Ib, et de II à IX). Les sérotypes les plus impliqués en pathologie humaine sont les sérotypes Ia, Ib, III et V. Parmi ceux-ci, le sérotype III a été identifié comme étant le plus impliqué dans les infections néonatales, qu'elles soient précoces ou tardives (Poyart *et al.*, 2008).

Par des techniques plus récentes de Multi-Locus Sequence Typing (MLST), les souches de cette espèce bactérienne ont pu être classées en divers sequence type (ST). Cette technique, plus discriminante, est la méthode de référence actuelle et repose sur le séquençage de 7 gènes de ménage dont chaque allèle obtenu porte un numéro spécifique et dont la combinaison des différents allèles donne le ST (Jones *et al.*, 2003). Par analyse phylogénétique, les ST peuvent être regroupés au sein de plus grands ensembles, les complexes clonaux (CC), lorsqu'ils possèdent au minimum 6 allèles en communs sur 7. Le numéro attribué au CC est celui du ST majoritaire au sein du CC soit, par exemple, le CC17 dont le ST fondateur est le ST17. Les CC les plus retrouvés dans les infections de l'Homme sont les CC1, CC10, CC17, CC19 et CC23. Ces souches dérivent de souches de colonisation, présentes en portage et il a été démontré que le caractère pathogène et les capacités invasives diffèrent selon le sequence type (ST) d'appartenance. Il a notamment été observé qu'un sequence type particulier, le ST17, a une implication majeure dans les infections néonatales et les atteintes méningées du nouveau-né (Jones *et al.*, 2003; Poyart *et al.*, 2008; Tazi *et al.*, 2010). Ces souches particulières de ST17, qualifiées d'hypervirulentes, sont significativement plus impliquées dans les infections néonatales précoces et tardives que dans les infections invasives de l'adulte. Ceci démontre une capacité d'adaptation des souches bactériennes à leur environnement et un pouvoir pathogène ainsi qu'une virulence variables selon les souches.

L'analyse des génomes a permis de montrer des différences d'organisation pouvant être responsables de ces observations. En effet, il existe une partie conservée au sein des génomes de chaque souche bactérienne nommée « core genome ». Il est également retrouvé, chez certaines souches, des îlots génomiques renfermant des séquences diverses et variées et notamment des séquences prophagiques ou provenant d'éléments génétiques mobiles (EGM) étrangers, acquises par transfert horizontal au cours du temps. Cette partie variable du génome entre les différentes souches de l'espèce est appelée « dispensable genome » (Tettelin *et al.*, 2005). Ces éléments acquis peuvent être associés à une virulence particulière de la bactérie, par exemple en codant pour une protéine de surface permettant à la bactérie d'adhérer à sa cible. Ils peuvent également contribuer à une résistance particulière par l'apport d'un gène de résistance aux antibiotiques ou avoir un impact sur la régulation de l'expression de certains gènes.

Les bactéries sont capables, de manière plus ou moins permissive, de lutter contre « l'attaque » de ces EGM via divers mécanismes de défense, pouvant expliquer les différences de virulence et d'implication en pathologie des différentes souches de *S. agalactiae*. En effet l'acquisition

de certains gènes à partir de ces EGM présente un intérêt majeur pour la bactérie mais certains d'entre eux, et particulièrement les phages, sont très virulents pour la bactérie et menacent grandement son intégrité, c'est pourquoi il est important de pouvoir les éliminer.

1.2. Les systèmes CRISPR-Cas

Afin de lutter contre ces EGM, la bactérie dispose d'un arsenal de mécanismes de défenses divers et variés. Différents systèmes peuvent être cités tels que les systèmes de défenses spécifiques vis-à-vis des phages, les systèmes de restriction-modification, les systèmes toxines-antitoxines, et, plus récemment découverts, les systèmes CRISPR-Cas.

1.2.1. Généralités

La découverte de ces systèmes date de 1987, lorsqu'une équipe décrit une alternance de courtes séquences répétées partiellement palindromiques et de séquences variables à proximité du gène *iap* chez *Escherichia coli* (Ishino *et al.*, 1987). Le terme CRISPR-Cas n'est employé qu'à partir de 2002 (Jansen *et al.*, 2002) après un essor concernant la recherche sur la compréhension et le fonctionnement de ces systèmes, depuis les années 2000.

Les systèmes CRISPR-Cas (pour Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats et Cas pour CRISPR associated proteins), présents chez environ 45% des bactéries, ont été décrits initialement comme impliqués dans la défense des bactéries vis à vis des phages et des plasmides (Barrangou *et al.*, 2007). Ils représentent le seul système de défense immunitaire adaptatif des bactéries. Ces systèmes jouent, de plus, un rôle dans l'évolution génétique bactérienne en intervenant dans les réarrangements, les recombinaisons et la régulation de l'expression de gènes pour certaines espèces bactériennes (Bikard and Marraffini, 2013; Louwen *et al.*, 2014).

Le locus CRISPR comprend une région alternant des séquences répétées conservées (Direct Repeats ou DR) et des séquences uniques intercalées (spacers) spécifiques. Les DR sont partiellement palindromiques ce qui leur confère une stabilité de structure et leur permet d'interagir avec des protéines essentielles au fonctionnement du système, les protéines Cas. Les spacers, pour la plupart, correspondent à des séquences d'origine extra-chromosomique puisque des homologues ont été retrouvés avec des séquences appartenant à des EGM (Bolotin *et al.*, 2005; Mojica *et al.*, 2005). En 5' du locus se trouve le leader, une région riche en Adénine et

en Thymine, qui contient le promoteur de transcription de ce locus. Associés à ce locus et organisés en opérons se trouvent les gènes *cas*, qui codent diverses protéines aux fonctions enzymatiques variées et qui sont indispensables pour le fonctionnement du système (Figure 2).

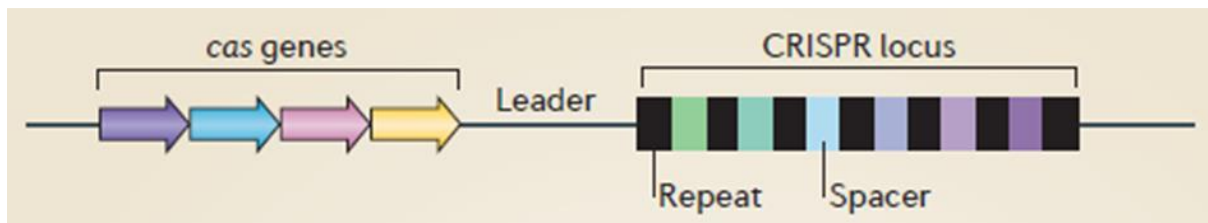


Figure 2 : Organisation générale d'un système CRISPR-Cas (d'après van der Oost *et al.*, 2014).

Les systèmes CRISPR-Cas sont composés du locus CRISPR qui consiste en une alternance de direct repeats (rectangles noirs) et de spacers (rectangles colorés) et de l'opéron *cas*, situé à proximité, constitué d'un nombre de gènes variables (représentés par les flèches colorées). Le leader contient le promoteur de transcription du locus CRISPR.

Il existe différents types de systèmes CRISPR-Cas, dont la classification, complexe, repose sur l'organisation des gènes *cas* (Makarova *et al.*, 2020). Chacun contient les protéines Cas1 et Cas2, puis chaque type possède une protéine Cas signature telle que Cas3 pour les types I, Cas9 pour les type II et Cas10 pour les types III.

1.2.2. Le système CRISPR-Cas de type II-A chez *Streptococcus agalactiae*

Chez *S. agalactiae*, il existe deux loci CRISPR. Le locus CRISPR2, qui renferme un système CRISPR-Cas de type I-C, est présent uniquement chez environ 20% des souches. Le locus CRISPR1, lui, se compose d'un système CRISPR-Cas de type II-A dont chaque DR comporte 36 pb et chaque spacer 30 pb et qui est retrouvé pour l'ensemble des souches (Figure 3). Le leader, long de 103 pb, est spécifique et très conservé au sein de cette espèce. En amont se trouve l'opéron *cas* constitué des gènes caractéristiques des systèmes CRISPR de type II-A, dans l'ordre *cas9*, *cas1*, *cas2* et *csn2*, dont *cas9* a un rôle primordial puisqu'il code pour l'endonucléase Cas9, élément central du système. Un autre élément, le *trans*-activating CRISPR RNA (tracrRNA), caractérise ce système et est indispensable à son bon fonctionnement. Ce système CRISPR-Cas9 est ubiquitaire et dynamique et pourrait également

jouer un rôle dans la régulation des EGM de cette espèce. En effet, le locus CRISPR1 de *S. agalactiae* se compose de spacers issus de séquences d'EGM tels que des phages et des plasmides, mais aussi d'acides nucléiques de *S. agalactiae* lui-même ou d'espèces proches. Il serait donc un système de défense immunitaire adaptatif mais également un système de régulation des gènes de la bactérie elle-même, de son « mobilome » (Lopez-Sanchez *et al.*, 2012).

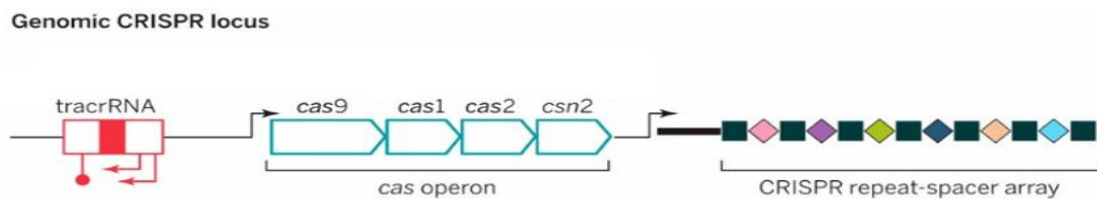


Figure 3 : Organisation du système CRISPR-Cas de type II-A (d'après Doudna et Charpentier, 2014).

Le système CRISPR-Cas de type II-A se compose de l'opéron *cas* avec l'enchaînement des gènes *cas9*, *cas1*, *cas2* et *csn2* ainsi que du locus CRISPR avec ses DR et spacers. Il comporte également le *tracrRNA* en amont de l'opéron *cas* et le leader en amont du locus CRISPR.

Ce système fonctionne en 3 étapes distinctes que sont l'acquisition, l'expression et l'interférence (Figure 4, Mali *et al.*, 2013). La première étape, l'acquisition, correspond à la première rencontre de la bactérie avec un EGM étranger, dont un fragment d'acide nucléique va être excisé pour former ce qui est appelé un pré-spacer pour ensuite être intégré au sein du locus CRISPR (Figure 4.A). Cette acquisition se fait de manière polarisée puisque les nouveaux spacers intégrés le sont du côté du leader, ce qui permet d'avoir une vision chronologique des rencontres de la bactérie avec les EGM. Vient ensuite l'expression, qui se définit comme la transcription des différents éléments du système CRISPR-Cas. Le locus CRISPR est en premier lieu transcrit en un long et unique ARN appelé le pré-crRNA qui sera ensuite, après une étape de maturation, clivé en crRNA (Figure 4.B). Ces crRNA matures sont des ARN CRISPR, correspondant chacun à un spacer associé à une partie de la DR adjacente. Un autre élément important de cette étape est la transcription du *tracrRNA* qui possède une homologie de séquence avec le DR du locus CRISPR et permet donc de s'hybrider tout d'abord avec le pré-crRNA puis les crRNA afin de les stabiliser (Deltcheva *et al.*, 2011). Divers acteurs, tels que la protéine Cas9 et la RNase III endogène, permettent la maturation du long pré-crRNA et le

clivent afin de former des couples tracrRNA/crRNA. Pour finir, l'interférence correspond à la reconnaissance par hybridation d'éléments étrangers préalablement rencontrés, grâce à la complémentarité des séquences de ces EGM avec les crRNA mais également, par la présence du protospacer adjacent motif (PAM), un di ou tri-nucléotide situé juste en aval du protospacer et reconnu spécifiquement par le système (Mojica *et al.*, 2009). Chez *S. agalactiae* il est constitué très majoritairement du dinucléotide NGG en position +2 et +3 (Lopez-Sanchez *et al.*, 2012). Cette hybridation permet à la protéine Cas9 d'exercer son activité endonucléase afin de dégrader l'EGM (Figure 4.B).

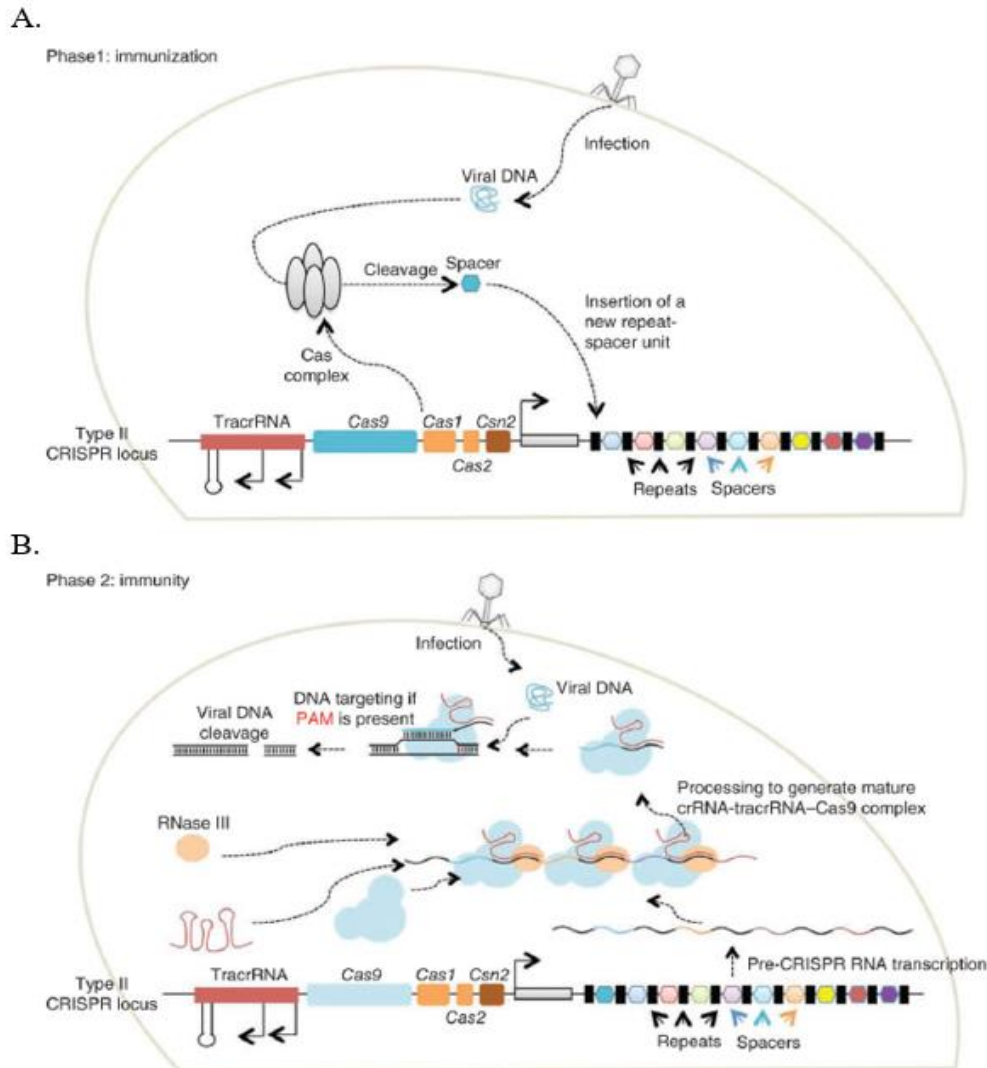


Figure 4 : Représentation schématique du mécanisme d'action d'un système CRISPR-Cas de type II-A (Mali *et al.*, 2013).

A. Etape d'adaptation. Après détection d'un acide nucléique étranger, ici un ADN phagique, par le système CRISPR-Cas, il y a excision d'un fragment de cet acide nucléique, appelé le pre-spacer. Ce dernier est ensuite intégré dans le locus CRISPR, en parallèle de la duplication d'un DR. Ceci permet l'acquisition d'une nouvelle unité repeat-spacer, du côté du leader.

B. Etape d'expression (bas de la figure B). Cette étape correspond à la transcription du locus CRISPR, à partir du promoteur présent dans le leader, en un long précurseur : le pre-crRNA. Divers acteurs permettent ensuite sa maturation, par clivage, en crRNA. Celui-ci se compose alors d'un spacer et d'un fragment du DR adjacent.

Etape d'interférence (haut de la figure B). Lors d'une nouvelle infection par le même phage, le crRNA, associé à Cas9 et au tracrRNA, va se lier à la séquence étrangère complémentaire de son spacer, après reconnaissance du PAM. Ceci entraîne alors la dégradation de la cible par la protéine Cas9.

Le système CRISPR-Cas9 de *S. agalactiae* est étudié au sein de l'équipe de recherche « bactéries et risque materno-fœtal », afin de comprendre quelle(s) implication(s) celui-ci pourrait avoir dans les différences de pouvoir pathogène observées entre les souches des différentes lignées phylogénétiques.

1.2.3. Le système CRISPR-Cas9 comme outil génétique

Depuis une dizaine d'années l'utilisation la plus recherchée du système CRISPR-Cas au plan international est son application dans le « genome editing » (Jiang *et al.*, 2013). Cet engouement scientifique est dû à la relative simplicité du fonctionnement de l'étape d'interférence du système CRISPR-Cas de type II-A, qui ne fait intervenir qu'un couple formé d'un duplex d'ARN et une protéine. En effet, grâce à l'activité endonucléase de la protéine Cas9, celle-ci peut être utilisée à des fins de modification génétique en la guidant pour cliver l'ADN et ceci dans le but de muter, insérer ou déléter des nucléotides au sein de séquences d'ADN préalablement ciblées (Barrangou and Horvath, 2017). Cela en fait un outil intéressant et prometteur dans la thérapie génique (Hsu *et al.*, 2013; Gori *et al.*, 2015). Le système CRISPR-Cas9 le plus utilisé est celui dérivant de *Streptococcus pyogenes* et, a encore été simplifié, puisque le duo d'ARN guides composé du crRNA et tracrRNA a été fusionné pour n'en former qu'un via une boucle reliant ces deux composants. Pour son utilisation, il ne reste alors plus qu'à designer une séquence complémentaire de l'ADN cible au sein de l'ARN guide (Jinek *et al.*, 2012).

1.2.4. Le système CRISPR comme outil de typage

L'acquisition de nouveaux spacers se faisant de manière polarisée, du côté du leader, le séquençage du locus permet de comprendre les rencontres, dans le temps, de la bactérie avec des EGM. Cela permet donc de caractériser les souches et d'établir les liens phylogénétiques qui les relient. En effet, il a été montré que les spacers ancestraux proviennent d'un ancêtre commun alors que les spacers les plus récemment acquis sont spécifiques de l'isolat, de ses rencontres (Lier *et al.*, 2015). De ce point de vue, cela semble un outil épidémiologique intéressant pour le typage moléculaire des souches bactériennes. Cet outil est d'ores et déjà utilisé chez certaines bactéries telles que *Mycobacterium tuberculosis* (Brudey *et al.*, 2006) ou *Yersinia pestis* (Pourcel, Salvignol and Vergnaud, 2005) et est également un outil très

performant, même s'il n'est pas encore utilisé comme méthode de référence, chez *Streptococcus agalactiae* (Beauruelle *et al.*, 2021).

1.2.5. Eléments de régulation des systèmes CRISPR-Cas

A l'état basal, les systèmes CRISPR-Cas des bactéries sont plus ou moins transcrits, mais il a été montré qu'ils pouvaient être stimulés selon les conditions environnementales dans lesquelles se trouve la bactérie et les stress auxquels elle peut être soumise (Young *et al.*, 2012). En effet, l'expression de ces systèmes est importante pour la défense de la bactérie et assurer sa survie et sa croissance dans les différents milieux, mais elle représente également un coût énergétique non négligeable d'où l'importance d'une régulation fine (Vale *et al.*, 2015).

Il a tout d'abord été montré que certains éléments génétiques étrangers, tels que les bactériophages et les plasmides, étaient capables d'activer les systèmes CRISPR-Cas. C'est notamment le cas chez *Streptococcus thermophilus*, pour lequel il a été mis en évidence une transcription constitutive de certains éléments composant ces systèmes, ainsi qu'une augmentation importante de cette transcription lors de l'infection de la souche bactérienne par un phage connu de celle-ci (Young *et al.*, 2012).

Par la suite, il a également été décrit que les bactéries, par l'action de leur système CRISPR-Cas, étaient capables de réguler des éléments de leur propre génome, selon les conditions dans lesquelles elles se trouvaient. C'est le cas chez *Francisella novicida*, qui est notamment capable, lorsque les conditions sont favorables à l'infection, de diminuer la transcription d'une lipoprotéine de surface, pour échapper au système immunitaire et pouvoir survivre dans les macrophages, afin de se multiplier et progresser dans l'infection (Louwen *et al.*, 2014; Ratner *et al.*, 2019).

De plus, il a été montré que selon les conditions environnementales dans lesquelles se trouvent les bactéries, la transcription des systèmes CRISPR-Cas pouvait être différente. C'est notamment le cas lorsque la densité cellulaire augmente. En effet, les bactéries peuvent alors se retrouver, de manière plus importante, au contact de virus et autres éléments pathogènes pouvant porter atteinte à leur intégrité. Ce phénomène a été décrit chez *Serratia sp.* ATCC39006 et il a été montré que lorsque la densité cellulaire augmente, le quorum sensing de la bactérie est stimulé et engendre une augmentation de la transcription des systèmes CRISPR-Cas (Figure 5), dans le but d'activer les mécanismes de défense immunitaire pour assurer sa protection (Patterson *et al.*, 2016).

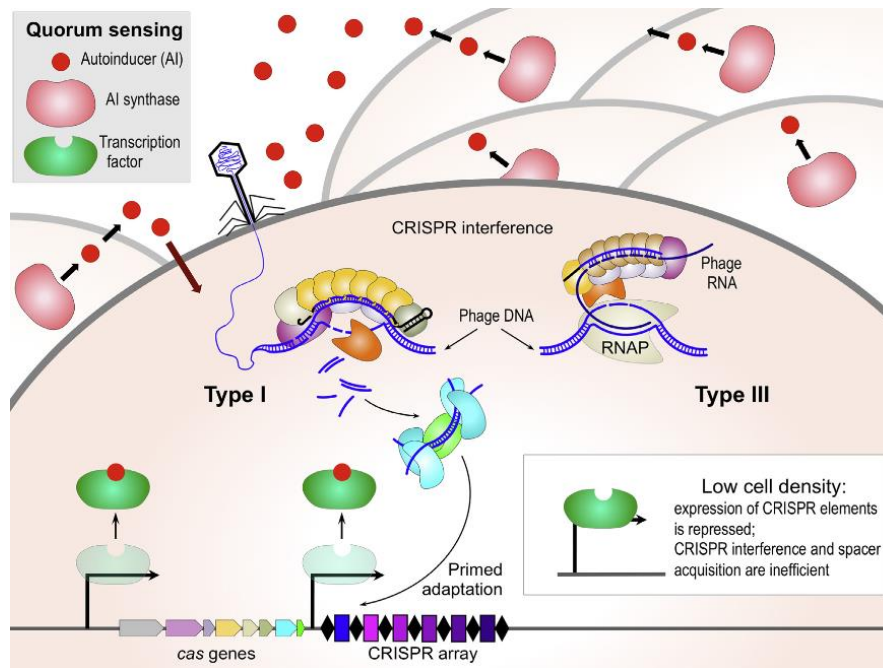


Figure 5 : Modification de la réponse du système CRISPR-Cas par le quorum sensing (d'après Patterson *et al.*, 2016).

Sont représentées schématiquement des cellules bactériennes produisant l'auto-inducteur (AI). À l'intérieur de la cellule, l'AI se lie à un régulateur de transcription conduisant, directement ou indirectement, à une augmentation de la transcription des systèmes CRISPR-Cas. La transcription de l'ensemble du locus CRISPR est donc activée par l'AI. L'augmentation de transcription des différents effecteurs des systèmes CRISPR-Cas de type I augmentent la capacité d'interférence (dégradation de l'ADN étranger) et par conséquent, stimulent l'acquisition de nouveaux spacers au sein du locus CRISPR. L'augmentation de transcription des différents effecteurs des systèmes CRISPR-Cas de type III empêche l'activation d'éléments génétiques mobilisables tels que les prophages qui pourraient engendrer un cycle lytique.

L'existence de divers éléments de régulation des systèmes CRISPR-Cas a donc été décrite chez plusieurs espèces bactériennes et dans des conditions environnementales particulières. C'est pourquoi il nous semble intéressant d'identifier ces éléments chez *S. agalactiae*, qu'ils soient similaires ou différents, car ils pourraient apporter des éléments explicatifs sur les différences de pouvoir pathogène observées selon les lignées phylogénétiques.

1.3. Travaux préalablement réalisés au sein de l'équipe

Le système CRISPR-Cas9 de *S. agalactiae* a déjà fait l'objet de plusieurs travaux au sein de l'équipe de recherche, afin de mieux comprendre son fonctionnement et connaître l'impact qu'il pourrait avoir sur les différences de virulence observées entre les différentes souches.

Il a d'ores et déjà été montré au laboratoire que la composition en certains spacers était corrélée aux grands groupes phylogénétiques de cette espèce bactérienne, définis par MLST (Lier *et al.*, 2015), ce qui le place comme un outil de typage très efficace. De plus, les DR sont très conservées, à l'exception de la DR terminale, ce qui permet de relier leur analyse au typage MLST. Il a également été montré que le système fonctionnait *in vivo* avec l'acquisition de séquences phagiques ou plasmidiques (Beauruelle *et al.*, 2017) et qu'il permettait d'étudier la diversité des populations de *S. agalactiae* en portage (Beauruelle *et al.*, 2018). Dans des travaux plus récents, il a été mis en évidence des différences de structure au niveau de l'organisation du locus CRISPR1 et de son fonctionnement selon les lignées phylogénétiques. En effet, les souches hypervirulentes de ST17, possèdent significativement moins de spacers que les autres ST (Figure 6).

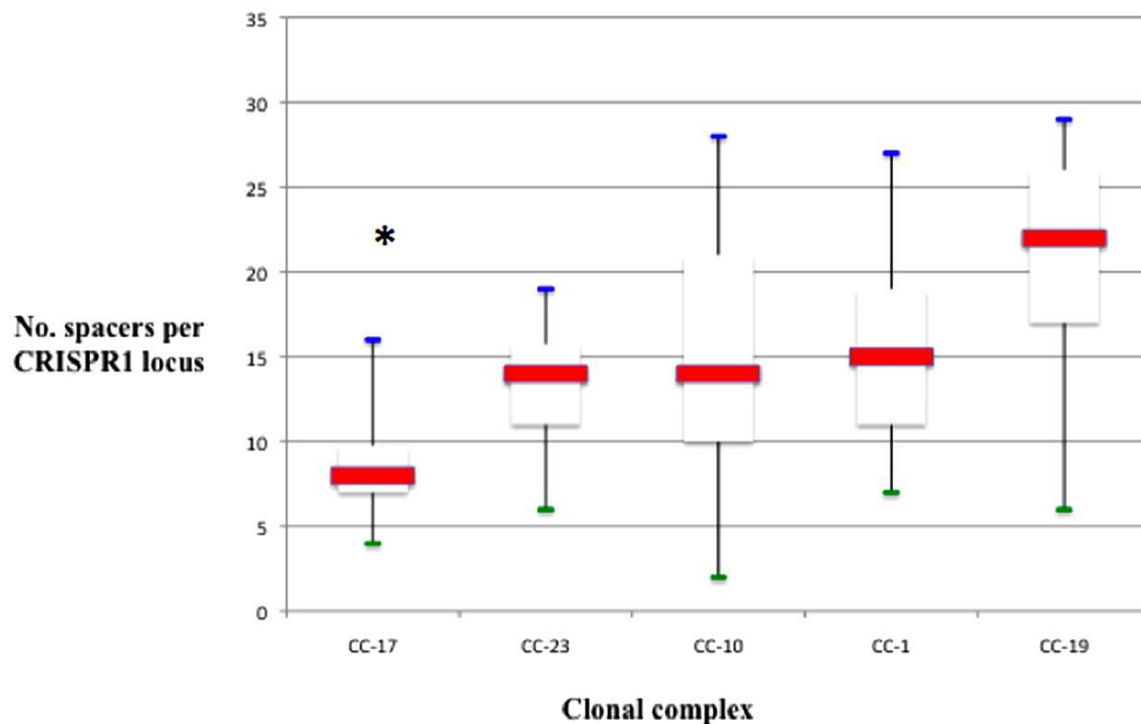


Figure 6 : Nombre moyen de spacers au sein du locus CRISPR1 de *S. agalactiae* en fonction des principales lignées phylogénétiques (Lier *et al.*, 2015).

Les rectangles de couleur rouge représentent la médiane. Les lignes bleues et vertes représentent, respectivement, les valeurs maximales et minimales. Les extrémités basses et hautes des rectangles blancs représentent les premiers et troisièmes quartiles.

Chez ces souches, une délétion de 103 pb en amont des gènes *cas*, renfermant le promoteur de transcription de l'opéron, a été objectivée (Figure 7, Pastuszka *et al.*, 2021). L'hypothèse d'un système moins fonctionnel qui expliquerait alors en partie la virulence de ses souches a été émise. En effet si la bactérie ne se défend pas vis-à-vis des EGM elle peut alors potentiellement acquérir des facteurs de virulence via ces EGM. Il a d'ailleurs déjà été mis en évidence, chez des espèces bactériennes variées, un lien entre ce système et la virulence des souches (Louwen *et al.*, 2014). Les travaux réalisés ont montré que malgré cette délétion, une faible transcription du gène *cas9* existe et que le système reste fonctionnel et capable d'interférer avec des EGM connus.

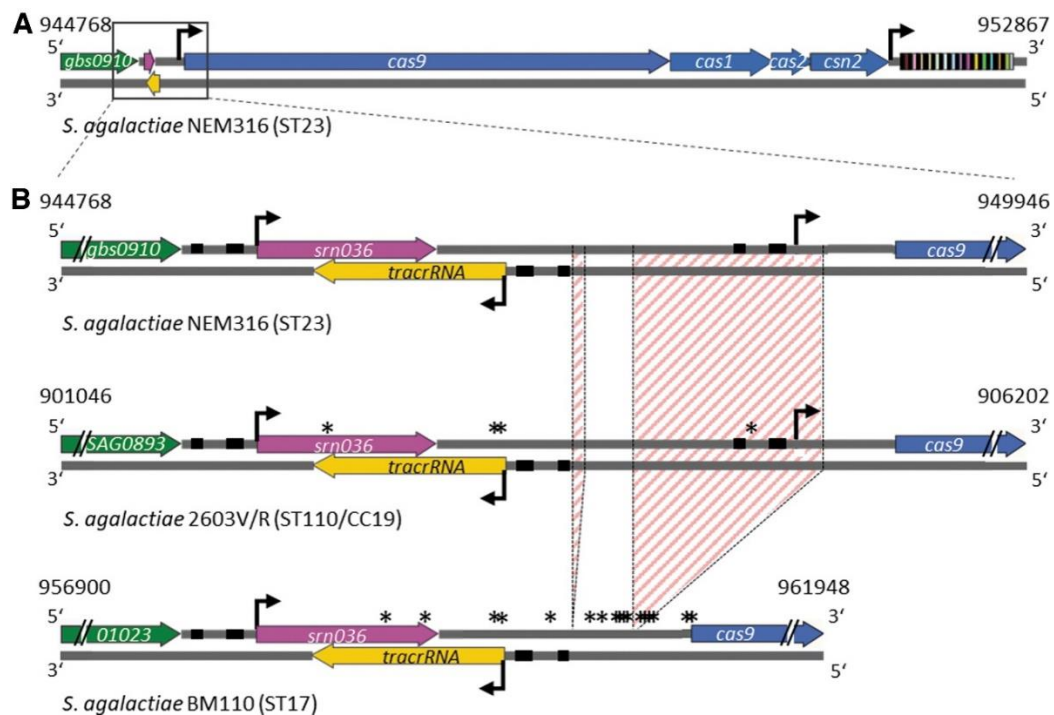


Figure 7 : Représentation schématique de la région intergénique en amont de *cas9* de *S. agalactiae*, chez différentes lignées phylogénétiques majeures (Pastuszka *et al.*, 2021).

A. Organisation du locus système CRISPR1-Cas chez la souche *Streptococcus agalactiae* NEM316. Les gènes *cas* sont représentés par des flèches bleues, le gène en amont du système CRISPR1-Cas en vert, le *tracrRNA* antisens en jaune et *srn036* en rose. Le leader est situé en aval des gènes *cas* et en amont du locus CRISPR. Le locus CRISPR1 contient 14 alternances de DR et spacers, représentées respectivement par des rectangles noirs et colorés. Les TSS du promoteur du gène *cas* et du promoteur du locus CRISPR1 sont représentés par des flèches noires orientées vers la droite.

B. Agrandissement de la région intergénique en amont de l'opéron *cas* de trois souches représentatives de trois lignées majeures. Les promoteurs ont été cartographiés par RNA-Seq. Ils sont représentés en noir : les flèches noires représentent les TSS, et les cases noires représentent les box -10 et -35 prédites. Les étoiles noires indiquent les SNP observés dans les souches appartenant aux CC1, CC10, CC19 et ST17 par rapport aux souches du CC23. Les cases hachurées en rouges indiquent les deux régions délétées chez les souches de ST17. (CCs : complexes clonaux ; SNP : single nucleotide polymorphism ; TSS : site d'initiation de la transcription).

Le système CRISPR-Cas pourrait donc jouer un rôle clé dans la régulation de l'intégration d'EGM chez *S. agalactiae*, participant ainsi à la virulence des souches et à l'évolution de l'espèce. C'est pourquoi il apparaît important et intéressant d'améliorer la compréhension du fonctionnement de ce système et notamment, chez les souches hypervirulentes du ST17.

2. Objectifs

Le système n'étant que peu ou pas transcrit à l'état basal et restant néanmoins fonctionnel dans certaines conditions, les objectifs de cette thèse, poursuite du travail réalisé en Master 2, ont donc été d'étudier son fonctionnement, en comparant cet état basal à l'application de divers stimuli, afin d'identifier des éléments qui activent le système et permettre une meilleure compréhension de sa régulation. Les stimuli testés ont été la présence de plasmides pour mimer les « attaques » auxquelles la bactérie peut être soumise, mais également diverses conditions environnementales, telles que des variations de pH et particulièrement en pH acide pour mimer le pH vaginal, compris entre 3,8 et 4,2. Les souches de ST17 étant particulièrement impliquées dans les infections néonatales, l'acidité présente au niveau vaginal pourrait jouer un rôle.

Pour cela, la réponse quantitative de la transcription du gène *cas9* ainsi que l'expression de la protéine correspondante, préalablement marquée, ont été étudiées en présence des différents stimuli précités. En effet, la protéine Cas9 est un élément essentiel des systèmes CRISPR-Cas de type II-A, tant au niveau de l'intégration de nouveaux spacers que dans l'étape d'interférence. Ainsi, le suivi de Cas9 au niveau génétique et protéique devrait permettre d'apporter des éléments de compréhension à propos de la régulation du système CRISPR-Cas chez *S. agalactiae*.

3. Matériels et méthodes

3.1. Souches bactériennes

Pour l'ensemble des expériences qui seront décrites par la suite, trois souches de *S. agalactiae* ont été utilisées : BM110 qui appartient au sequence type d'intérêt, le ST17, A909 qui appartient au ST7, proche phylogénétiquement du ST17, et NEM316, une souche de ST23, qui est plus éloignée phylogénétiquement du ST17. Ces souches sont toutes les trois des souches de référence dont le génome complet est disponible sur la base de données du National Center for Biotechnology Information (NCBI). Elles appartiennent au sérotype III pour BM110 (Brochet *et al.*, 2006) et NEM316 (Glaser *et al.*, 2002) et au sérotype Ia pour A909 (Tettelin *et al.*, 2005) et ont été isolées au cours d'infections invasives. Plus précisément, NEM316 et A909 ont été isolées d'hémocultures de nouveau-nés et BM110 d'une méningite. Ces trois souches, conservées au laboratoire à -80°C, ont été cultivées sur gélose Trypticase Soja + 5% de sang de mouton (TSS, Biomérieux) en aérobiose à 37°C pendant 16 à 24h.

3.2. Plasmides

Quatre plasmides ont été utilisés et multipliés chez des souches d'*Escherichia coli* XL1-Blue (conservées au laboratoire à -80°C).

- pG1^{ts} : ce plasmide mime la présence d'un EGM étranger inconnu de la souche utilisée
- pG1^{ts}-protospacerBM110 : ce plasmide contient un protospacer homologue d'un spacer déjà intégré dans le locus CRISPR de la souche BM110 afin de mimer un EGM connu de cette souche
- pG1^{ts}-protospacerNEM316 : plasmide contenant un spacer déjà intégré dans le locus CRISPR de la souche NEM316 afin de mimer un EGM connu de cette souche
- pG1^{ts}-protospacerA909 : plasmide contenant un spacer déjà intégré dans le locus CRISPR de la souche A909 afin de mimer un EGM connu de cette souche

Les souches d'*E. coli* contenant ces différents plasmides ont été cultivées en bouillon LB (Lysogeny Broth) additionné d'érythromycine à 150µg/mL, sous agitation (230 rpm) à 37°C pendant une nuit. Les plasmides ont ensuite été extraits à l'aide du kit Nucleospin® plasmid (Macherey-Nagel), selon le protocole du fournisseur.

3.3. Conditions de cultures et stimuli

3.3.1. Stimulation du système CRISPR-Cas en présence d'un stress acide

Les trois souches testées ont été cultivées dans 55 mL de bouillon Todd Hewitt (TH) à 37°C. En mi-phase exponentielle de croissance, objectivée par la mesure d'une densité optique (DO) comprise entre 0,4 et 0,5 à une longueur d'onde de 600 nm, 50 mL de suspension ont été prélevés et répartis en deux tubes de 25 mL. Ces deux tubes ont été centrifugés 5 minutes à 7000 rpm à 4°C pour obtenir un culot bactérien et le surnageant a été éliminé. Le culot bactérien du premier tube, correspondant à la condition de référence, a été remis en suspension dans 25 mL de TH (pH 6,8). Le second culot, correspondant à la condition « stress acide », a été remis en suspension dans 25 mL de TH, dont le pH a été abaissé à 4 par l'ajout d'acide chlorhydrique (HCl) 10M. La mesure du pH a été réalisée à l'aide d'un pH-mètre préalablement étalonné. Les suspensions bactériennes ont été incubées à 37°C et un aliquot de 5 mL a été prélevé, pour chaque condition, après 5 et 10 minutes d'incubation. Les aliquots ont immédiatement été centrifugés 5 minutes à 7000 rpm à 4°C et les culots bactériens ont été récupérés pour extraire les ARN, de façon immédiate ou après congélation du culot à -80°C. Chacune des conditions a été réalisée en triplicata, pour chacune des trois souches.

3.3.2. Stimulation du système CRISPR-Cas en présence d'un plasmide

Nous avons choisi ce stimulus, car la présence d'un plasmide mime la rencontre de la bactérie avec un EGM étranger. Auparavant, il est nécessaire de préparer la bactérie. La première étape consiste à rendre les bactéries compétentes, afin de fragiliser leur membrane. La seconde, l'électroporation, consiste en l'application d'un choc électrique, en présence du plasmide, ce qui permet de perméabiliser de manière transitoire les membranes bactériennes et ainsi favoriser l'entrée du plasmide.

Les trois souches bactériennes ont été cultivées dans 15 mL de bouillon TH, incubés à 37°C. Après croissance des bactéries jusqu'en mi-phase exponentielle, 10 mL d'un mélange

glycine/saccharose ont été ajoutés à 10 mL de suspension bactérienne. Le mélange a été incubé pendant 1h à 37°C sous agitation douce, à 50 rpm. Les tubes ont ensuite été centrifugés 5 minutes à 7000 rpm à 4°C, afin de récupérer le culot bactérien et le remettre en suspension dans 1 mL de tampon d'électroporation. Les tubes ont ensuite été centrifugés 1 minute à 13 000 rpm. Après élimination du surnageant, le culot a été remis en suspension dans 1 mL de tampon. Ce lavage a été répété 3 fois, puis le culot a été repris dans 120 µL d'un mélange tampon d'électroporation/glycérol 10%. La suspension obtenue ainsi que 1500 ng de plasmide ont alors été transférés dans une cuve d'électroporation, préalablement refroidie dans la glace, puis un choc électrique a été appliqué sur les parois de la cuve (Bio-Rad MicroPulser electroporator). La suspension a ensuite été récupérée de la cuve et reprise dans 5 mL de bouillon TH, préchauffé à 30°C. Après une incubation de 15 minutes à 30°C, la suspension a été centrifugée 5 minutes à 7000 rpm à 4°C, pour récupérer le culot bactérien pour l'extraction des ARN, immédiatement ou après conservation à -80°C.

Afin de pouvoir objectiver l'action de chacune de ces étapes sur l'expression du système CRISPR-Cas9, plusieurs conditions ont été testées. La condition de référence, l'état basal, correspondait uniquement à la culture de chaque souche en bouillon TH, dont 10 mL ont été prélevés en mi-phase exponentielle et centrifugés comme indiqué précédemment. Une étape supplémentaire a ensuite été ajoutée pour chaque condition, afin de décomposer l'intégralité du protocole. Ainsi pour la deuxième condition, les bactéries ont été rendues électro-compétentes par l'ajout de la solution de glycine/saccharose. Cette deuxième condition a ensuite été divisée en deux conditions distinctes afin de visualiser l'effet de chaque composant du mélange individuellement, soit une solution de glycine d'une part et une solution de saccharose d'autre part. Pour la condition suivante, les bactéries ont en plus subi le choc électrique correspondant à l'électroporation permettant la perméabilisation des membranes bactériennes, en absence de plasmide. Pour la sixième condition, le plasmide pG1^{ts} vide a été ajouté à la suspension bactérienne, dans la cuve d'électroporation, pour appliquer le choc électrique en présence de ce plasmide. La septième et dernière condition correspond à la sixième condition mais pour laquelle le plasmide pG1^{ts} utilisé contenait le protospacer spécifique respectif des trois souches testées. Chacune de ces conditions a été réalisée en triplicata pour chacune des trois souches.

3.3.3. Stimulation du système CRISPR-Cas en présence d'un stress antibiotique

Les antibiotiques ayant pour objectif d'empêcher la croissance bactérienne, représentent, pour ces raisons, un stress pour les bactéries. Ici, deux antibiotiques ayant pour cible la paroi bactérienne, la pénicilline G et la vancomycine, ont été choisis et testés afin de voir leur impact potentiel sur l'expression du système.

Dans un premier temps, des courbes de croissance ont été réalisées afin de déterminer la concentration sub-inhibitrice pouvant être utilisée, sans impacter la croissance (à minima jusqu'en mi-phase exponentielle), pour chacun des antibiotiques et chacune des trois souches. Pour cela les différentes souches ont été cultivées en milieu liquide TH et une suspension à $DO_{600nm} = 0,05$ a été réalisée. Dans une microplaque de 96 puits à fond plat, 150 μ L de suspension bactérienne ont été ajoutés à 150 μ L d'antibiotique et cela pour chaque souche, avec chaque antibiotique, à différentes concentrations. Les concentrations à tester ont été déterminées selon la concentration moyenne inhibitrice (CMI) mesurée pour chacune de nos trois souches de référence utilisées. Une méthode de diffusion en milieu gélosé, utilisant des bandelettes E-test® a été effectuée à partir d'une suspension bactérienne à 0,5 McFarland en milieu salé. Pour la pénicilline G ont donc été testées des concentrations allant de 0,004 à 0,5 μ g/mL et pour la vancomycine de 0,008 à 1 μ g/mL. Afin de valider l'expérience des puits contrôles ont été réalisés, contenant uniquement du milieu liquide TH pour certains, de l'antibiotique pour chaque concentration pour d'autres et les suspensions bactériennes pour les derniers. Chaque condition testée a été déposée en triplicata. La microplaque a été incubée à 37°C sous agitation dans un spectrophotomètre Biotek™ et l'absorbance a été mesurée immédiatement, afin d'obtenir le bruit de fond, puis toutes les 20 minutes pendant 24h. Après 24h, les résultats d'absorbance ont été récupérés par l'intermédiaire du logiciel Gen5™, puis en effectuant la moyenne des triplicatas de chaque condition et en y retranchant la valeur du bruit de fond, les courbes de croissance ont été dessinées. Une fois les courbes obtenues, la première concentration n'affectant pas la croissance de nos souches, jusqu'en mi-phase exponentielle correspondant à la phase d'intérêt, a été choisie pour la réalisation des expériences.

Chaque souche a été cultivée dans 15 mL de milieu liquide TH pour mimer la condition de référence, sans stress, et en parallèle dans 15 mL de milieu liquide TH additionné d'antibiotique à la concentration déterminée, soit 0,008 μ g/mL pour la pénicilline G et 0,25 μ g/mL pour la vancomycine, pour la condition de stress. Lorsque les cultures bactériennes ont atteint la mi-phase exponentielle de croissance ($DO_{600nm} = 0,4-0,5$), 10 mL des suspensions ont

été centrifugés 5 minutes à 7000 rpm à 4°C et les culots bactériens récupérés pour extraction immédiate des ARN, ou conservés à -80 °C jusqu'à l'extraction.

3.4. Mesure de la transcription du gène *cas9* par RT-qPCR

Le niveau de transcription du gène *cas9* (Tableau 1) a été mesuré dans les différentes conditions décrites précédemment et pour chacune des trois souches, par une méthode de PCR quantitative (qPCR). Celle-ci était précédée d'une étape de reverse transcription (RT), pour obtenir les ADN complémentaires (ADNc) à partir des ARN messagers.

3.4.1. Extraction des ARN totaux

L'extraction a été réalisée selon une méthode d'extraction liquide-liquide phénol/chloroforme dans le but de séparer les ARN des protéines présentes dans l'échantillon. L'extraction a été réalisée sur les culots bactériens obtenus dans les diverses expériences.

Les culots bactériens ont été remis en suspension dans 400 µL de solution de re-suspension (glucose 20% + Tris 25 mM pH 7.6 + EDTA 10 mM) et 60 µL d'EDTA 0,5 M. Cette suspension a ensuite été transférée dans un tube contenant 500 µL de phénol acide (pH 4,5) et 0,4 g de billes de verre. Afin de lyser les bactéries, ces tubes ont été placés dans un Fastprep-24™ (ThermoFisher Scientific) 3 fois successivement à une vitesse de 6 mètres/secondes pendant 30 secondes, avec un temps de repos dans la glace de 1 minute à 4°C entre chaque passage. Les tubes ont ensuite été centrifugés 5 minutes à 13 000 rpm à 4°C, puis la phase aqueuse supérieure a été récupérée et additionnée de 500 µL de Trizol (thiocyanate de guanidium) afin de dénaturer les protéines. Après les avoir homogénéisés soigneusement par retournement, les tubes ont été laissés 5 minutes à température ambiante, avant d'y ajouter 100 µL d'un mélange chloroforme/alcool isoamylique (IAA) (24/1 v/v). Après les avoir mélangés par retournement et laissés 3 minutes à température ambiante, les tubes ont été centrifugés 5 minutes à 13 000 rpm à 4°C. Les ARN étant solubles dans la phase aqueuse supérieure, celle-ci a été transférée dans un nouveau tube dans lequel ont été ajoutés 200 µL du mélange chloroforme/IAA précédent. Après les avoir homogénéisés doucement par retournement et laissés 5 minutes à température ambiante, les tubes ont de nouveau été centrifugés 5 minutes à 13 000 rpm à 4°C. La phase aqueuse a de nouveau été récupérée et 500 µL d'éthanol 100% ont été ajoutés. Les tubes ont été placés pendant une nuit à -20°C afin de précipiter les ARN. Une centrifugation de 30 minutes à 13 000 rpm à 4°C a ensuite été réalisée et les culots ont été lavés

avec 1 mL d'éthanol à 70%. Une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 13 000 rpm à 4°C a été réalisée et l'éthanol restant a été éliminé. Une fois l'éthanol évaporé, les culots ont été remis en suspension dans 100 µL d'eau Milli-Q, pré-incubée à 37°C et les ARN extraits ont été dosés au Nanodrop Lite (ThermoFisher Scientific).

3.4.2. Elimination de l'ADN génomique résiduel

Afin d'éliminer les traces d'ADN génomique pouvant contaminer les ARN et perturber la suite des manipulations, l'ensemble des extraits d'ARN ont été traités à la Turbo-DNase™ (kit Turbo DNA-free™). Pour cela 10 µg d'ARN ont été traités avec 2U de Turbo-DNase™ et 1X de tampon (10X Turbo-DNase™ Buffer). Le volume a été ajusté à 50 µL avec de l'eau (DNA free water). Les tubes contenant ce mélange ont été incubés 30 minutes à 37°C, puis 2U de Turbo-DNase™ ont de nouveau été ajoutées et les tubes ont été réincubés 30 minutes à 37°C. Une fois cette incubation terminée, l'enzyme a été inactivée par ajout dans les tubes de 0,2 volumes de réactif d'inactivation. Ces tubes ont été laissés 5 minutes à température ambiante puis centrifugés 2 minutes à 10 000 rpm, afin d'éliminer le réactif d'inactivation qui s'est retrouvé au fond des tubes. Le surnageant a ensuite été récupéré et les ARN ont de nouveau été dosés au Nanodrop Lite. Afin de vérifier la qualité des ARN extraits, une migration en gel d'agarose 2% a été réalisée, l'intégrité des ARN se traduisant par la présence de trois bandes correspondant aux ARN ribosomiaux 23S, 16S et 5S.

Pour s'assurer de l'absence de contamination par de l'ADN génomique après ce traitement, une PCR permettant d'amplifier un gène de ménage de *S. agalactiae* a été réalisée. Le gène de ménage utilisé pour objectiver la contamination était *gyrB* (Tableau 1) car la taille de son amplicon est de 123 pb et permet donc une séparation correcte des produits de PCR en gel d'agarose. Le mélange réactionnel utilisé contenait pour chaque échantillon 1X de One Taq Standard Reaction Buffer 5X, 200 µM de dNTPs à 10 mM, 0,2 µM de chaque amorce du gène de ménage utilisé (Forward et Reverse), 0,625 U de One Taq® DNA polymerase (New England Biolabs), 50 ng d'ARN et le volume a été ajusté à 25 µL avec de l'eau Milli-Q. Le programme d'amplification utilisé comportait une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C puis 40 cycles d'amplification dont chaque cycle comportait 20 secondes à 94°C, 20 secondes à 58°C (Melting Temperature (Tm) ou température d'hybridation des amorces) et 20 secondes à 68°C et pour finir une étape d'élongation de 5 minutes à 68°C. Une migration sur gel d'agarose 2% a été effectuée pour vérifier l'absence de bande dans les puits correspondant aux échantillons, la présence d'une bande témoignant d'une contamination par de l'ADNg. Pour valider la PCR,

un témoin positif constitué d'ADNg d'une souche de *S. agalactiae* A909 a été utilisé (présence d'une bande), ainsi qu'un témoin négatif (eau + mélange réactionnel = absence de bande).

3.4.3. Synthèse des ADN complémentaires

Les ARN « DNasés » (ARNd) ont ensuite subi une étape de rétrotranscription pour obtenir les ADN complémentaires (ADNc). Pour cela, pour chaque échantillon, 1 µg d'ARNd a été mélangé avec 1 U d'iScript™ Reverse Transcriptase (Bio-Rad) et 1X d'iScript™ Reaction Mix 5X et le volume ajusté jusqu'à 20 µL avec de l'eau Milli-Q. Le programme utilisé comportait une étape de 5 minutes à 25°C puis 30 minutes à 42°C et 5 minutes à 85°C. Les ADNc obtenus ont été dilués (par l'ajout de 80 µL d'eau) afin d'avoir une concentration finale de 10 ng/µL dans chaque tube pour effectuer la PCR quantitative.

3.4.4. Quantification de la transcription de *cas9*

Pour mesurer le niveau de transcription du gène *cas9*, une PCR quantitative (qPCR) a été réalisée. Cette qPCR reposait sur une méthode utilisant du SYBR Green, un agent intercalant capable de se lier aux ADN double brins. Lors de cette intercalation entre les deux brins d'ADN, il va émettre une fluorescence qui est quantifiable et proportionnelle à la quantité de transcrits présents dans l'échantillon. Chaque extrait d'ARN a été traité en triplicata et les résultats obtenus ont été normalisés grâce à l'utilisation d'un gène de ménage, *recA* ou *rpoB* (Tableau 1), pour pouvoir comparer les niveaux de transcription de *cas9* entre les différentes souches et les différentes conditions testées. Le mélange réactionnel, pour chaque gène, était constitué de 1X de LightCycler® 480 SYBR GreenI Master 2X (Roche), 0,3 µM d'amorces sens et anti-sens 40 ng d'ADNc soit 4 µL et le volume ajusté à 15 µL avec de l'eau Milli-Q. Pour valider la technique, un témoin négatif composé du mix et d'eau a été utilisé pour chaque mélange réactionnel. Le protocole de RT-qPCR a été réalisé sur le thermocycleur LightCycler® 480 Instrument II (Roche) et comprenait une étape de dénaturation à 95°C pendant 5 minutes, puis 40 cycles de 10 secondes à 95°C, 20 secondes à 58°C et 20 secondes à 72°C. Après cette amplification, une courbe de fusion a été réalisée en augmentant progressivement la température jusqu'à 95°C.

Tableau 1: Tableau des amorces utilisées pour amplifier les gènes de ménages *recA*, *gyrB* et *rpoB* et le gène *cas9*. (F = amorce sens ; R = amorce antisens)

Amorces	Gène cible	Séquence 5'-3'	Taille de l'amplicon (pb)
OLM_021 (F)	<i>gyrB</i>	GCTCACATCAGAACTTTACTTTTAACTC	123
OLM_022 (R)	<i>gyrB</i>	TTTAATCTCACTTCCTACTTTGACACC	123
OLM_319 (F)	<i>recA</i>	ATTCAGGCGCAGTTGATTTAGTT	67
OLM_320 (R)	<i>recA</i>	TCAATCTCAGCACGAGGAACA	67
OPL_12 (F)	<i>cas9</i>	CCATATTCAATAGGYCTYGACATC (Y=T/C)	155
OPL_13 (R)	<i>cas9</i>	CCATCAAAAAGCAGAGCACCTAT	155
OLM_019 (F)	<i>rpoB</i>	TATTGAAAAAGACATTCATAAAAAATCCA	137
OLM_020 (R)	<i>rpoB</i>	CAAAGAAACGTGCAACTAAAAGACTAC	137

Le calcul de l'efficacité (E) du couple d'amorce *rpoB* a été effectué et validé lors de ce travail, alors que l'efficacité des couples d'amorces *recA* et *cas9* avait déjà été déterminée lors de travaux antérieurs réalisés dans l'équipe. Pour calculer cette efficacité, une gamme de dilution d'ADNg a été utilisée (10ng/μL, 1ng/μL, 0,1ng/μL et 0,01 ng/μL) et chaque dilution a été testée en triplicata. Le mix et le protocole utilisés étaient les mêmes que pour le traitement de nos échantillons. Avec les résultats obtenus, une droite standard a été réalisée, représentant la valeur des Ct pour chaque dilution en fonction du logarithme de la concentration en ADNg. Avec la valeur de la pente obtenue sur cette droite, l'efficacité a pu être calculée grâce à la formule $E = 10^{-1/\text{pente}}$. L'efficacité doit être comprise entre 1,8 et 2,0 pour utiliser les amorces, ce qui équivaut au doublement du nombre d'amplicons à chaque cycle de PCR. La dérivée de la courbe de fusion obtenue a également été construite afin de s'assurer de la spécificité de la réaction. On doit alors observer un pic unique, à une température spécifique appelée température de fusion (T_m), qui est caractéristique du produit amplifié et représente la température pour laquelle la moitié de l'ADN double brin est dénaturé.

Une fois les résultats bruts obtenus, la moyenne ainsi que l'écart-type des Ct de chaque triplicata, selon la condition testée, ont été calculés. Afin de normaliser les résultats, l'expression relative du gène *cas9* (cible) par rapport au gène de ménage *recA* ou *rpoB* (gène de référence = GR) a été calculée par la méthode du $2\Delta\Delta Ct$. Dans un premier temps, la différence entre les Ct obtenus pour les deux gènes a été calculée, puis les conditions testées (CT) ont été normalisées par rapport à la condition de référence (CR). Voici le détail de ces calculs :

$$\Delta Ct = Ct(cible) - Ct(GR) ;$$

$$\Delta\Delta Ct = ((\Delta Ct(CR) - \Delta Ct(CT)))$$

Puis le fold change (FC) a été calculé. Celui-ci donne l'expression relative du gène cible en tenant compte de l'efficacité des amorces, selon la formule $FC = E^{\Delta\Delta Ct}$.

Un gène est alors considéré comme sous-exprimé si le FC est inférieur à 0,5 et sur-exprimé s'il est supérieur ou égal à 2 pour une condition de référence fixée à 1.

Afin de mettre en évidence la présence ou non d'une différence significative entre deux conditions, des tests statistiques de student sur séries appariées ont été réalisés à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5. Les résultats des tests ont été représentés sur les graphiques des résultats par des astérisques (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; ns : non significatif).

3.5. Mesure de la traduction de la protéine Cas9

Afin d'étudier la traduction de la protéine Cas9 dans l'ensemble des conditions décrites, des mutants ont été réalisés, pour chacune des trois souches étudiées, afin de marquer la protéine Cas9 par un 3X flag au niveau chromosomique.

Pour chaque souche, un mutant possédant le marquage par le 3X flag en N-terminal de la protéine Cas9, a été construit (Figure 8).

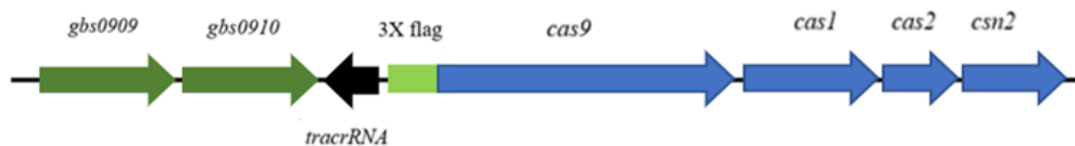


Figure 8 : Représentation schématique du lieu d'insertion du 3X flag au sein du génome de *S. agalactiae* pour les mutants marqués en N-terminal.

La figure représente la position d'insertion du 3X flag chez les mutants après construction des différents éléments nécessaires et transformation chez les différentes souches.

3.5.1. Création des inserts

Pour réaliser ces mutants, des inserts correspondant à la séquence de la protéine Cas9 associée à celle du 3X flag ont été construits pour chacune des trois souches étudiées. Le marquage a donc été réalisé en N-terminal de la protéine Cas9, soit juste en amont du gène.

Pour cela trois fragments ont été amplifiés :

- un fragment A d'environ 500 pb, juste en amont de *cas9* et débutant au gène *0910*
- un fragment B d'environ 500 pb également, correspondant au début du gène *cas9*
- la séquence du 3X flag associé à un morceau d'ADN de *Salmonella* correspondant à un fragment global de 500 pb environ

Le 3X flag a été amplifié à partir d'ADN de *Salmonella* contenant ce flag et provenant d'une souche fournie par Mme Isabelle Virlogeux-Payant travaillant dans l'équipe de recherche « Signalisation, portage et virulence bactérienne » appartenant à l'Unité Mixte de Recherche (UMR) « Infectiologie et Santé Publique » (ISP, Abed *et al.*, 2014).

Pour amplifier ces trois fragments, des amorces différentes selon les souches ont été dessinées en fonction des séquences nucléotidiques de chacune (Tableau 2). Pour réaliser ces PCR, x µL d'ADNg de la souche correspondante (selon sa concentration) ont été mélangés avec 1X de Buffer Q5, 200 µM de dNTPs, 0,5 µM de chaque amorce (sens et antisens), 0,01 U d'enzyme Q5 et le volume a été ajusté à 50 µL avec de l'eau Milli-Q. Le même mix a été réalisé pour l'amplification du 3X flag mais avec x µL d'ADNg de *Salmonella* car celui-ci était moins concentré. Le programme utilisé comportait une étape de dénaturation de 30 secondes à 98°C, suivie de 30 cycles d'amplifications composés de 10 secondes à 98°C, 20 secondes à 55°C et 30 secondes à 72°C et se terminait par une étape finale de dénaturation de 5 minutes à 72°C. La taille des différents fragments a ensuite été vérifiée par migration des produits de PCR en gel d'agarose 1%. Une fois la taille vérifiée, les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit « Nucleospin® Gel and PCR Clean up » selon le protocole du fournisseur.

Tableau 2 : Tableau des amorces utilisées pour créer les inserts pour marquer la protéine Cas9 en région N-terminale. (F = amorce sens ; R = amorce antisens)

	Souches	Amorces	Gène cible	Séquence 5'-3'	Site de restriction	Taille de l'amplicon (pb)
Fragment A	NEM 316 & A909	OPL_56 (F)	<i>gbs0910</i>	CTAACGGAATTC GTAATTTGGATAC TTCCTGAAAC	<i>EcoRI</i>	550
	NEM 316 & A909	OPL_168 (R)	Intergénique -ATG <i>cas9</i>	CTTTGTAGTCCAT AACTTTTCTCCTT TTATTTAAA	Ø	550
	BM110	OPL_60 (F)	<i>gbs0910</i>	CCTATTGAATTC GTAGTATGTGCTT TTCTGTTGG	<i>EcoRI</i>	546
	BM110	OPL_174 (R)	Intergénique -ATG <i>cas9</i>	CTTTGTAGTCCAT AATTTATCTCCTT TTATTTAAAA	Ø	546
Fragment B	NEM 316 & A909	OPL_171 (F)	<i>cas9</i>	CGACGATAAAAA TAAGCCATATTCA ATAGGCC	Ø	550
	NEM 316	OPL_173 (R)	<i>cas9</i>	GTTTTTGGTACCC GGTATTCCTCACA TCAAATC	<i>KpnI</i>	550
	A909	OPL_172 (R)	<i>cas9</i>	TTGTTTGGTACC GTCTGTATTCCTG ACATCAAAG	<i>KpnI</i>	550
	BM110	OPL_177 (F)	<i>cas9</i>	CGACGATAAAAA CAAACCATATTCA ATAGGTCT	Ø	530
	BM110	OPL_178 (R)	<i>cas9</i>	CTCACACTGCAG CTATCATCCTCAA TTAGGAAATG	<i>PstI</i>	530
Coupure flag/ADN <i>Salmonella</i>	NEM316 & A909	OPL_170 (R)	3X flag	ATGGCTTATTTTT ATCGTCGTCATCT TTGTAG	Ø	619
	BM110	OPL_176 (R)	3X flag	ATGGTTTGTTTTT ATCGTCGTCATCT TTGTAG	Ø	615
3X flag & ADN <i>Salmonella</i>	NEM316 & A909	OPL_169 (F)	3X flag	GAAAAGTTATGG ACTACAAAGACC ATGACGG	Ø	~ 500
	BM110	OPL_175 (F)	3X flag	ATAAATTATGGA CTACAAAGACCA TGACGG	Ø	~ 500
	<i>Salmonella</i>	OAH283 (R)	ADN <i>Salmonella</i>	CGCGCTTGCTGCT TGGATGCC	Ø	~ 500

Les fragments ont ensuite été assemblés par la réalisation de deux PCR overlap. Tout d'abord, les fragments A de chacune des trois souches ont été réunis avec les fragments 3X flag/*Salmonella* correspondants. Pour cela les amorces sens utilisées pour amplifier le 3X flag et les antisens du fragment A ont été dessinées afin de posséder une dizaine de nucléotides supplémentaires à la fin de leurs séquences, créant ainsi des queues flottantes qui avaient la

capacité de se lier par complémentarité. Le fragment assemblé a ensuite été réamplifié avec les amorces sens des fragments A et des amorces antisens correspondant à la fin de la séquence nucléotidique du 3X flag afin d'éliminer toute trace d'ADNg de *Salmonella*. Pour cela x μ L d'un mélange de fragment A et de fragment 3X flag/ADN de *Salmonella* dont les proportions ont été calculées selon la taille et la concentration des différents fragments, ont été mélangé avec 1X de Buffer Q5, 2 μ M de chacune des amorces sens et antisens, 200 μ M de dNTPs, 0,02 U de Q5 et le volume a été ajusté à 100 μ L avec de l'eau Milli-Q. Le programme utilisé comportait une étape de dénaturation de 30 secondes à 98°C, suivie de 5 cycles d'amplifications composés de 10 secondes à 98°C, 60 secondes à 50°C et 60 secondes à 72°C afin d'avoir une bonne hybridation des queues flottantes par complémentarité, puis 25 cycles d'amplifications composés de 10 secondes à 98°C, 30 secondes à 50°C et 30 secondes à 72°C. Le programme se terminait par une étape finale d'élongation de 10 minutes à 72°C. La taille des différents fragments a ensuite été vérifiée par migration des produits de PCR en gel d'agarose 1%. Une fois la taille vérifiée, les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit « Nucleospin® Gel and PCR Clean up » selon le protocole du fournisseur.

Par la réalisation de la deuxième PCR overlap, ces fragments purifiés ont été assemblés aux fragments B respectifs de chacune des souches. Le fragment final a été amplifié avec les amorces sens des fragments A et les amorces antisens des fragments B. Pour cela x μ L d'un mélange de fragment A/3X flag et de fragment B dont les proportions ont été calculées selon la taille et la concentration des différents fragments, ont été mélangé avec 1X de Buffer Q5, 2 μ M de chacune des amorces sens et antisens, 200 μ M de dNTPs, 2 U de Q5 et le volume a été ajusté à 100 μ L avec de l'eau Milli-Q. Le programme utilisé comportait une étape de dénaturation de 30 secondes à 98°C, suivie de 5 cycles d'amplification composés de 10 secondes à 98°C, 60 secondes à 50°C et 90 secondes à 72°C, puis 25 cycles d'amplifications composés de 10 secondes à 98°C, 30 secondes à 50°C et 60 secondes à 72°C. Le programme se terminait par une étape finale d'élongation de 10 minutes à 72°C. La taille des différents fragments a ensuite été vérifiée par migration des produits de PCR en gel d'agarose 1%. Une fois la taille vérifiée, les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit « Nucleospin® Gel and PCR Clean up » selon le protocole du fournisseur.

3.5.2. Construction des plasmides

Afin d'intégrer nos différents inserts au sein du plasmide pG1^{ts}, les produits de PCR purifiés ont subi une double digestion enzymatique, grâce à la présence de sites de restriction sur les amorces utilisées (amorce sens des fragments A et antisens des fragments B). Les plasmides pG1^{ts} ont également subi cette double digestion, avec les mêmes enzymes de restriction. Pour cela 30 µL d'insert ou de pG1^{ts} ont été incubés pendant 1h à 37°C avec 1X de tampon CutSmart™ (New England Biolabs) et 20U de chaque enzyme de restriction (*EcoRI*-HF® et *KpnI*-HF® pour A909 et NEM316 et *EcoRI*-HF® et *PstI*-HF® pour BM110, New England Biolabs). Les produits de digestion obtenus ont été purifiés à l'aide du kit « Nucleospin® Gel and PCR Clean up » selon le protocole du fournisseur.

Une ligation a ensuite été effectuée selon un ratio 3:1, soit un mélange contenant trois fois plus d'insert que de plasmide. Ce mélange a été additionné de 1 U de T4 DNA ligase (New England Biolabs) et de x µL de T4 DNA Ligase Buffer (10X) et le tout incubé à 16°C. Après une nuit d'incubation, la ligase a été inactivée par chauffage à 65°C pendant 10 minutes et les produits de ligation ont été dialysés pendant 20 minutes sur une membrane de 0.025 µm (Merck Millipore) contre de l'eau Milli-Q.

3.5.3. Transformation chez *E. coli*

Les produits de ligation dialysés ont ensuite été électroporés chez *E. coli*. Pour cela 10 µL de produits ont été mélangés avec 50 µL d'*E. coli* XL1-Blue compétentes et les 60 µL finaux ont été transférés dans des cuves d'électroporation, préalablement refroidies dans la glace quelques minutes, afin d'appliquer le choc électrique. Le mélange présent dans la cuve d'électroporation a ensuite été repris dans 800 µL de milieu liquide LB et mis à incuber 2h à 37°C sous agitation à 230 rpm. Après cette incubation la suspension bactérienne a été étalée sur gélose LB additionnée de 150 µg/mL d'érythromycine pour sélectionner les bactéries ayant intégré le vecteur. Après 24 à 48h d'incubation à 37°C, une PCR sur colonie a été réalisée sur les clones ayant cultivé sur la boîte afin de vérifier la présence du plasmide au sein du clone. Pour cela des amorces situées de part et d'autre du site de clonage plasmidique, OPL_110 et OPL_111, ont été utilisées (Tableau 3). Pour réaliser ces PCR, chaque colonie a été prélevée et introduite dans un tube à PCR contenant 16,85 µL d'eau milli-Q et un mélange réactionnel contenant 1X de One *Taq* Standard Reaction Buffer 5X, 0,2 µM de chaque amorce, 200 µM de dNTP et 0,625 U de One *Taq*® DNA polymérase a été ajouté dans chaque tube. Le

programme de PCR comportait une première étape de dénaturation de 5 minutes à 94°C suivie de 30 cycles d'amplification de 10 secondes à 94°C, 20 secondes à 58°C puis 2 minutes à 68°C puis une étape d'élongation finale de 5 minutes à 68°C. La taille des fragments amplifiés a ensuite été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1%.

3.5.4. Séquençage des plasmides obtenus

Les clones dont la taille observée en gel d'agarose correspondaient au plasmide pG1^{ts} contenant l'insert ont été mis en culture dans du milieu liquide LB additionné d'érythromycine 150 µg/mL sous agitation à 230 rpm à 37°C pendant une nuit. La suspension bactérienne obtenue a été centrifugée 5 minutes à 7000 rpm à 4°C le lendemain et le plasmide a été extrait sur le culot bactérien avec le kit Nucleospin® Plasmid, selon le protocole du fournisseur. Les solutions de plasmide obtenues ont été dosées au Nanodrop Lite. Le séquençage des vecteurs a ensuite été réalisé. Pour cela, différentes amorces ont été utilisées afin de couvrir l'ensemble de la séquence nucléotidique composant l'insert, ici OPL_110, OPL_111, OPL_11 et OPL_15 (Tableau 3). Le mélange réactionnel final de 10 µL contenait 1 U de BigDyeTerminator® Mix v.3.1 (Applied Biosystems), 1X de tampon de séquençage 5X, 4 µM d'amorce et 300 ng d'extrait de plasmide. Le programme de réaction comportait une étape de dénaturation d'une minute à 96°C, suivie de 30 cycles constitués de 20 secondes à 96°C, 15 secondes à 50°C et 4 minutes à 60°C. Les produits obtenus ont ensuite été purifiés sur colonnes NucleoSEQ® (Macherey-Nagel), selon le protocole du fournisseur et déposés dans une plaque 96 puits afin d'être analysés par le séquenceur ABI PRISM® (Applied Biosystems).

Tableau 3 : Tableau des amorces utilisées pour la vérification par séquençage des mutants construits. (F = amorce sens ; R = amorce antisens)

Amorces	Gène cible	Séquence 5'-3'
OPL_010 (R)	<i>gbs0910</i>	TGATGAAACAATGGAGGAAAAA
OPL_015 (R)	<i>gbs0911</i>	CTCATCTTCTTAGCAGGTAC
OPL_011 (F)	<i>gbs0911</i>	ATAGGTGCTCTGCTTTTTGATGG
OPL_13 (R)	<i>gbs0911</i>	CCATCAAAAAGCAGAGCACCTAT
OPL_14 (F)	<i>gbs0910</i>	TTTTTCCTCCATTGTTTCATCA
OPL_39 (F)	<i>gbs0909</i>	CAACAGTTGAAGAAGTACCAG
OPL_72 (R)	<i>gbs0911</i>	CGCAGACTTGCTAATCTTATC
OPL_88 (F)	Région intergénique	AGGTGTTGTTTTTAGAATGGTG
OPL_86 (F)	Région intergénique	TTAGCAAAACTTTAAAGTTTGCG
OPL_110 (F)	Locus CRISPR	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC
OPL_111 (R)	Locus CRISPR	AGCGGATAACAATTCACACAGGA

3.5.5. Transformation chez *S. agalactiae*

Une fois les constructions vérifiées et validées par séquençage, les vecteurs plasmidiques correspondants ont été électroporés chez les différentes souches de *S. agalactiae*, soit A909, BM110 ou NEM316. Pour cela x μL de vecteur, correspondant à une quantité de 2000 ng, ont été ajoutés à 50 μL de la souche de *S. agalactiae* compétente correspondante et le tout a été transféré dans une cuve d'électroporation et laissé en contact dans la glace quelques minutes. Après cela, un champ électrique a été appliqué aux parois de la cuve pour perméabiliser de manière transitoire les membranes bactériennes et laisser entrer le vecteur. Le contenu de la cuve a été repris dans 800 μL de milieu liquide TH et mis à incuber pendant 2h à 30°C sans agitation. La suspension bactérienne a ensuite été étalée sur une gélose au sang TSS additionnée d'érythromycine à 10 $\mu\text{g/ml}$. Après 24 à 48h d'incubation à 30°C, les clones ayant cultivés ont été testés par une PCR sur colonie, afin de vérifier la présence du plasmide (cf paragraphe 2.5.3). Ensuite, à partir d'un clone ayant été validé, des changements de température ont été réalisés afin de favoriser l'intégration du plasmide au niveau chromosomique. Pour cela, une colonie a étéensemencée dans 5 mL de milieu liquide TH additionné d'érythromycine à 10 $\mu\text{g/mL}$ et la suspension a été mise à incuber à 30°C. Lorsqu'un léger trouble est apparu, le tube contenant la suspension bactérienne a été placé à 38°C sur la nuit. Le lendemain la suspension a été diluée au 1/100 dans 5 mL de milieu liquide TH additionné d'érythromycine 10 $\mu\text{g/mL}$ et mis a incubé à 38°C sur la journée. A la fin de la journée, les dilutions 10^{-1} et 10^{-2}

ont été étalées sur gélose au sang TSS additionnée d'érythromycine à 10 µg/mL et incubées à 38°C. Ensuite pour favoriser la perte du plasmide, des passages ont été effectués. Pour cela, 3 colonies ayant cultivées sur la gélose TSS ont été prélevées, mises en culture dans 10 mL de milieu liquide TH, sans antibiotique et incubées à 30°C sur la journée. Cela correspondait au passage 1. A la fin de la journée, ce passage a été dilué au 1/1000 dans 10 mL de milieu liquide TH et mis à incuber sur la nuit, ce qui correspondait au passage 2. Ceci a été répété sur plusieurs jours afin d'atteindre le passage 6. A partir du passage 3, les dilutions 10^{-5} de chaque passage ont été étalées sur gélose au sang TSS et mises à incuber à 30°C. Une centaine de colonies ont été repiquées sur gélose TH et gélose TH additionnée de 10 µg/mL d'érythromycine en parallèle et les géloses ont été mises à incuber à 37°C. Une PCR sur colonie a ensuite été réalisée sur les clones susceptibles d'avoir perdu le plasmide, c'est-à-dire les clones sensibles à l'érythromycine. Cette PCR a été réalisée à l'aide d'amorces situées juste en amont et en aval du lieu d'insertion du 3X flag, soit en amont de Cas9, ici les amorces OPL_13 et OPL_86 pour BM110 et OPL_13 et OPL_88 pour A909 et NEM316 (Tableau 3). La taille des produits de PCR a été contrôlée par une migration en gel d'agarose à 1%, la présence du 3XFlag se traduisant par une différence de taille de 60 nucléotides. Une nouvelle PCR a ensuite été réalisée sur les mutants objectivés afin de confirmer la présence du 3XFlag et de vérifier l'absence de mutation secondaire par séquençage de l'ADN. Pour cela chaque colonie a été prélevée et introduite dans un tube à PCR contenant 16,85 µL d'eau milli-Q et un mélange réactionnel contenant 1X de One *Taq* Standard Reaction Buffer 5X, 0,2 µM de chaque amorce (OPL_39 et OPL_72), 200 µM de dNTP et 0,625 U de One *Taq*® DNA polymerase a été ajouté dans chaque tube. Le programme de PCR comportait une première étape de dénaturation de 5 minutes à 94°C suivie de 30 cycles d'amplification de 10 secondes à 94°C, 20 secondes à 58°C puis 2 minutes à 68°C puis une étape d'élongation finale de 5 minutes à 68°C. La taille des fragments amplifiés a ensuite été vérifiée par migration sur gel d'agarose 1%. Les produits de PCR ont été purifiés à l'aide du kit « Nucleospin® Gel and PCR Clean up » selon le protocole du fournisseur, puis vérifiés par séquençage selon le protocole décrit précédemment (cf paragraphe 2.5.4). Les amorces utilisées pour la réaction de séquençage afin de couvrir l'ensemble de la région étaient OPL_39, OPL_10, OPL_14, OPL_13, OPL_11 et OPL_72 (Tableau 3).

3.5.6. Application des différentes conditions de stress sur les souches mutées

Les trois mutants ayant été validés (intégration du 3X flag en région N-terminale du gène *cas9* pour chacune des trois souches), les différentes conditions de culture et stimuli décrits dans les paragraphes 2.3.1 à 2.3.3 ont été (ou seront) réalisés chez ces trois mutants. Les suspensions bactériennes ont été centrifugées 5 minutes à 7000 rpm à 4°C et les culots ont été conservés au congélateur à -20°C jusqu'à extraction des protéines.

3.5.7. Extraction des protéines

Afin d'extraire les protéines des différents échantillons, les culots bactériens ont été re-suspendus dans 500 µL de tampon A. Ce tampon A correspondait à un mélange de 4,975 mL de tampon Z et 25 µL de dithiothréitol à 1M (DTT). Le tampon Z était lui-même un mélange de Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM et MgSO₄ 1 mM. Les culots repris dans 500 µL de tampon A ont été transférés dans des tubes contenant 0,4 g de billes en verre et trois passages de 30 secondes à une vitesse de 6 mètres/seconde ont été réalisés au Fastprep-24™, en laissant refroidir les tubes dans la glace pendant une minute entre chaque passage. Les tubes ont ensuite été centrifugés 5 minutes à 6000 rpm à 4°C et les surnageants ont été récupérés et transférés dans des tubes Eppendorf de 1,5 mL. 500 µL d'extrait ont été prélevés et mis à incubés 30 minutes à 37°C en présence de 0,5 µL de DNase. Les concentrations des extraits protéiques obtenus ont été mesurées par la méthode de Bradford. Cette méthode correspond à un dosage colorimétrique basé sur le changement de couleur du Bleu de Coomassie lorsqu'il se lie aux protéines. Pour cela 20 µl d'extrait protéique ont été ajoutés à 980 µl de réactif de Bradford dilué au 1/5 (Bio-Rad) dans une cuve pour mesure d'absorbance. Les cuves ont été vortexées puis incubées 5 minutes à l'obscurité avant de mesurer la DO_{595nm} à l'aide d'un spectrophotomètre. Afin d'obtenir la concentration en protéine de notre extrait, une gamme d'étalonnage a été réalisée à l'aide d'une protéine de référence de concentration connue, la protéine Bsa (sérum albumine bovine). La gamme a été réalisée pour des concentrations s'échelonnant de 0 à 500 µg/mL de protéine et 20 µL de chacune des dilutions ont été mélangés à 980 µl de réactif de Bradford dans une cuve. Après 5 minutes à l'obscurité la DO_{595nm} a été mesurée et la droite représentant l'absorbance à 595 nm en fonction de la concentration en protéine a été tracée. L'équation obtenue était : $y = 0,001x - 0,0243$ avec y l'absorbance à 595 nm et x la concentration protéique en µg/mL. La gamme étant stable jusqu'à environ 500

µg/mL, pour les absorbances correspondantes à des concentrations plus élevées, les extraits ont été dilués. Grâce à cette équation et aux valeurs d'absorbance mesurées pour chaque extrait, les concentrations protéiques ont pu être calculées.

Afin de déposer la même quantité de protéines lors de la réalisation des Western-Blot, les échantillons protéiques ont été dilués en tampon A à la plus faible concentration mesurée de l'ensemble des extraits dosés. Les extraits ont ensuite été repris dans du tampon de charge, Laemmli 5X, et chauffés 10 minutes à 95°C afin de finir l'extraction des protéines (soit 40 µL d'extrait pour 10 µL de tampon de charge). Le tampon de charge à 5X se composait de tampon Tris-HCl 250 mM à pH 6,8, 10% de SDS, 50% de glycérol, 25% de 2-bêta-mercaptoéthanol et d'une pincée de bleu de bromophénol. Après chauffage, les extraits ont été conservés au congélateur à -20°C jusqu'à la réalisation des Western-Blots.

3.5.8. Réalisation des Western-Blots

Pour la réalisation des Western-Blots, deux gels ont été réalisés en parallèle. Le premier, coloré au bleu de Coomassie (PageBlue™ Protein Staining Solution, Thermoscientific) selon le protocole du fournisseur, permettait de s'assurer que la quantité de protéines déposée était similaire dans chaque puits pour pouvoir ensuite comparer l'intensité des bandes obtenues, par l'intermédiaire du second gel. Le second gel permettait de révéler notre protéine Cas9, à l'aide d'un anticorps ciblant le 3X flag.

Pour réaliser la migration sur gel, les extraits protéiques ont été décongelés puis les tubes ont été de nouveau placés à 95°C pendant 5 minutes. Une quantité déterminée de protéines, correspondant ici à environ 5 µg, a ensuite été déposée dans chaque puit d'un gel de polyacrylamide 4–15% Mini-PROTEAN® TGX™ (Bio-Rad), placé dans une cuve de migration contenant un tampon de migration 1X. Le tampon de migration 5X contenait 30g de Trizma® Base, 144g de glycine et 10g de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide) pour un volume final de 2L de solution, ajusté avec de l'eau MilliQ. Dans un des puits, 5 µL d'un marqueur de taille ont été déposés pour visualiser la taille des protéines marquées après révélation. Un courant électrique de 150V a ensuite été appliqué pendant 1h30 environ, temps correspondant à la migration totale des échantillons dans le gel (migration visualisée par la couleur bleue du tampon de charge présent dans les extraits).

Pendant la migration, les papiers filtres Whatman™ ainsi que la membrane de nitrocellulose ont été découpés à la taille du gel et imbibés dans du tampon pour permettre, par

la suite, le transfert des protéines du gel de polyacrylamide vers la membrane de nitrocellulose. Le tampon de transfert été composé de 5,82g de Trizma® Base (soit 48 mM), 2,93g de glycine (soit 39 mM), 200 mL d'éthanol (soit 20%) et de 0,038g de SDS (soit 1,3 mM), ajusté à 1L avec de l'eau MilliQ. Pour réaliser ce transfert, une superposition de plusieurs éléments, composée de 2 papiers filtres, la membrane de nitrocellulose, le gel de polyacrylamide et 2 autres papiers filtres a été placée dans une cuve de transfert Fischerbrand™ et un courant de 150 mA a été appliqué pendant 1h15 environ. Pour que le transfert se déroule correctement, les différentes couches doivent être bien alignées et les bulles d'air éliminées. Le transfert a été interrompu lorsque les protéines été bien transférées du gel vers la membrane de nitrocellulose. L'indicateur permettant de le visualiser à l'œil était la présence nette du marqueur de taille coloré sur la membrane.

La membrane de nitrocellulose a ensuite été saturée à l'aide d'une solution de TBS (Tris Buffered Saline)-Tween 0,05%-3% de lait écrémé (solution de concentration protéique élevée) afin d'éviter les interactions non spécifiques qui pourraient avoir lieu par la suite entre la membrane et les solutions d'anticorps. Pour cela la membrane a été immergée dans 15 mL de cette solution pendant 1h sous agitation lente à température ambiante. Le mélange TBS-lait a été éliminé par retournement et trois lavages successifs de 5 minutes en TBS-Tween 0,05% ont été réalisés.

Le marquage des protéines par l'anticorps primaire, anticorps monoclonal de souris M2 anti-flag® (Sigma-Aldrich), a ensuite été réalisé. Pour cela les membranes ont été incubées sur la nuit à 4°C, sous agitation lente dans 15 mL d'une solution de TBS-Tween 0,05%-3% de lait écrémé contenant l'anticorps primaire dilué au 1/1000.

Le lendemain, trois lavages successifs de 5 minutes par une solution de TBS-Tween 0,05% ont été réalisés. Pour pouvoir détecter les signaux correspondant à notre protéine lors de la révélation, le marquage par l'anticorps secondaire, anticorps polyclonal de lapin anti-immunoglobuline de souris couplé à la peroxydase (Sigma-Aldrich), a été réalisé. Pour cela la membrane de nitrocellulose a été incubée 30 minutes à 4°C, sous agitation lente, dans 15 mL d'une solution de TBS-Tween à 0,05%-3% de lait écrémé contenant l'anticorps secondaire dilué au 1/5000. Trois lavages successifs de 5 minutes par une solution de TBS-Tween 0,05% ont ensuite été réalisés.

Pour l'étape de révélation, la membrane a été mise en contact avec le réactif de révélation SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate (Thermoscientific). Ce réactif se composait d'un mélange volume à volume de deux réactifs, l'un contenant du luminol et l'autre du peroxyde. La membrane de nitrocellulose a été incubée avec ce réactif de révélation

pendant 5 minutes, à l'abri de la lumière, puis l'acquisition des images a été réalisée dans l'imageur PXi (Syngene) via le logiciel GeneSys®. Lorsque les anticorps primaires et secondaires étaient fixés à la membrane de nitrocellulose, signant la présence de notre protéine marquée, la peroxydase présente sur les anticorps secondaires a permis de catalyser la réaction de chimiluminescence entre le luminol et le peroxyde et d'émettre un signal lumineux, visualisé à l'imageur.

4. Résultats

4.1. Mesure de l'expression du gène *cas9* par RT-qPCR en temps réel

Afin d'identifier d'éventuels éléments régulant l'activité du système CRISPR-Cas9, une mesure de l'expression du gène *cas9* face aux divers stimuli décrits précédemment a été réalisée par RT-qPCR. Cette technique a permis de quantifier les ARN messagers du gène cible et donc de refléter sa transcription. Ces mesures ont été effectuées sur les souches BM110, NEM316 et A909 et chacune des conditions a été réalisée en triplicata. Chaque extrait d'ARN obtenu a été déposé en triplicata sur la plaque de qPCR afin de garantir la reproductibilité des résultats obtenus. Pour cela, l'écart-type entre les trois valeurs de Ct obtenues pour chaque extrait devait être le plus faible possible et toujours inférieur à 0,25.

L'efficacité des couples d'amorces utilisées pour amplifier les gènes *cas9* et *recA* a été déterminée sur chaque souche étudiée dans des travaux antérieurs et celle de *rpoB* a été réalisée et validée. Elles étaient toutes comprises entre 1,8 et 2, ce qui permet d'affirmer une bonne amplification des gènes pour chacune des souches testées.

La mesure en condition de référence a été réalisée en mi-phase exponentielle de croissance bactérienne car des expériences antérieures ont montré une absence de différence significative de transcription du gène *cas9* en phase exponentielle comparativement à la phase stationnaire (Pastuszka *et al.*, 2021).

4.1.1. Evaluation de l'impact de la présence d'un stress acide sur l'expression du gène *cas9*

S. agalactiae est présent en portage vaginal chez un tiers des femmes environ, ce qui explique, en partie, son implication dans les infections materno-fœtales. Le pH vaginal étant compris entre 3,8 et 4,2, nous avons choisi d'appliquer un stress acide aux bactéries et d'en observer les effets sur la transcription de *cas9*. En effet il a été démontré chez d'autres bactéries que le système pouvait être stimulé selon les conditions environnementales, par exemple la température chez *Pseudomonas aeruginosa*, espèce chez laquelle est observée une augmentation d'activité du système pour des températures basses (Høyland-Kroghsbo, Muñoz and Bassler, 2018). Cela est expliqué par le fait que cette bactérie est une espèce environnementale et donc plus fréquemment soumise à la rencontre d'EGM dans ces conditions

par rapport à une condition où la température serait plus élevée, lors de l'infection chez l'homme par exemple. Etant donné la physiopathologie des infections néonatales nous avons donc choisi de tester, ici, le pH acide comme condition environnementale. Les expériences suivantes ont été réalisées, selon le protocole établi et décrit précédemment, dans l'objectif de voir si l'acidité présente au niveau vaginal pouvait avoir un impact sur le système CRISPR-Cas. Pour cela la condition « stress acide » a été comparée à des conditions de croissance classiques, à pH neutre.

Pour chaque extrait d'ARN, la valeur du Ct obtenue pour le gène *cas9* a été normalisée à celle obtenue pour *rpoB*, le gène de référence. Pour chaque condition, le $\Delta\Delta C_t$ a ensuite été calculé pour normaliser les résultats obtenus, que ce soit pour comparer les différentes souches entre elles ou les différentes conditions chez la même souche. Puis le « fold change » (FC), qui tient compte de l'efficacité des couples d'amorces, a été calculé pour obtenir l'expression relative du gène *cas9*. Par cette méthode les résultats de l'expression du gène étudié ont été normalisés par rapport à la condition de référence, correspondant à la valeur 100.

Le but était donc de déterminer si l'application du stress acide, mimant le pH vaginal, pouvait stimuler la transcription du gène *cas9* par rapport à une condition de croissance à pH neutre. La transcription des gènes a été mesurée sur des extraits obtenus après 5 minutes ($t=5$) et 10 minutes ($t=10$) d'incubation à 37°C suivant l'application du stress acide ou du milieu liquide neutre, représentant la condition de référence. Les résultats ont été représentés sur la figure 9.A, 9.B et 9.C pour NEM316, A909 et BM110 respectivement.

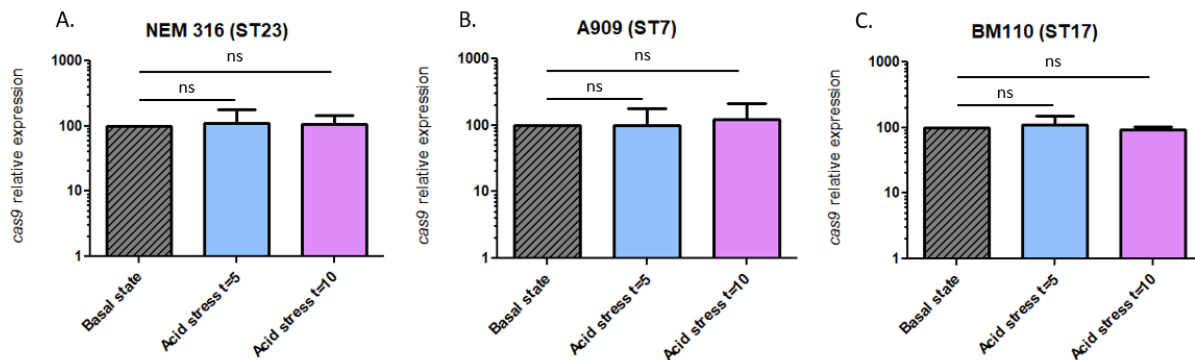


Figure 9 : Expression relative du gène *cas9* pour chaque souche dans les conditions « stress acide » à t = 5 minutes et t = 10 minutes, comparativement à la condition « pH neutre » prise comme référence.

La figure représente l'expression relative du gène *cas9* dans la condition « stress acide » à t=5 minutes (en bleu) et à t=10 minutes (en rose), chacune comparativement à la condition « pH neutre » (en gris hachuré) de la même souche prise comme condition de référence, chez NEM316 en **A.**, A909 en **B.** et BM110 en **C.** Les mesures ont été répétées 3 fois.

Des tests statistiques de student sur séries appariées ont été réalisés et représentés sur la figure (ns : non significatif).

Les résultats n'ont pas mis en évidence de différence significative de transcription du gène *cas9* lors de l'application du stress acide, que ce soit après 5 ou 10 minutes d'incubation suivant l'application du stress, comparativement à la condition de référence en milieu liquide à pH 6,8, et cela quelle que soit la souche.

Nous avons ensuite cherché l'existence de différences entre les souches pour chacune de ces conditions. Les résultats ont été représentés sur la figure 10.A et 10.B pour A909 et BM110 respectivement, dont la transcription du gène *cas9* a été comparée à celle de la souche NEM316.

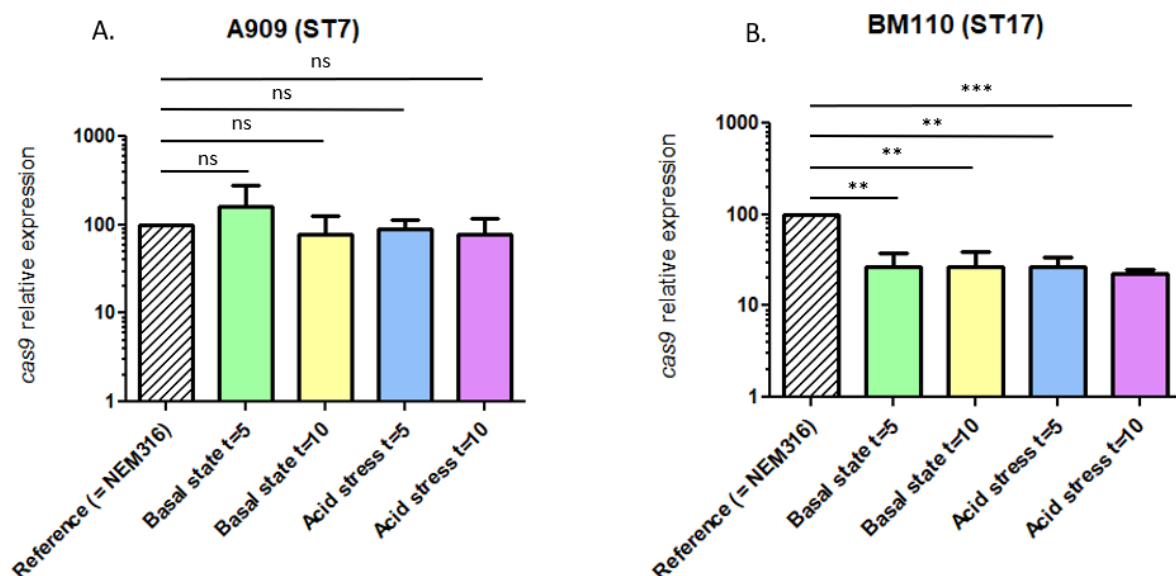


Figure 10 : Expression relative du gène *cas9* chez A909 et BM110 par rapport à NEM316 pour le stimulus « stress acide ».

La figure représente l'expression relative du gène *cas9* dans la condition de référence à t=5 minutes (en vert), référence à t=10 minutes (en jaune), « stress acide » à t=5 minutes (en bleu) et « stress acide » à t=10 minutes (en rose), chacune comparativement à la même condition chez NEM316, prise comme souche de référence et représentée sur la figure avec une valeur de référence fixe à 100 (en blanc hachuré), chez A909 en **A.** et BM110 en **B.** Les déterminations ont été répétées 3 fois.

Des tests statistiques de student sur séries appariées ont été réalisés et représentés sur la figure par des astérisques (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; ns : non significatif).

Les résultats montrent une différence significative de transcription entre NEM316 et BM110 et cela quelle que soit la condition. Cette différence est présente à l'état basal ce qui monte une différence de transcription chez ces souches. En revanche aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les souches NEM316 et A909.

4.1.2. Evaluation de l'impact de la présence d'un plasmide sur l'expression du gène *cas9*

Pour chaque condition, la valeur du Ct obtenue pour le gène *cas9* a été normalisée à celle obtenue pour *recA*, le gène de référence.

Les premières expériences ont été réalisées dans l'objectif de voir si l'apport d'un élément étranger, connu ou inconnu de la souche, pouvait stimuler le système CRISPR-Cas et donc augmenter la transcription du gène *cas9*. Pour cela, pour chaque souche, la transcription

de ce gène a été mesurée en présence d'un plasmide vide pG1^{ts} (élément étranger inconnu) ou en présence d'un plasmide contenant un protospacer spécifique de la souche testée (élément étranger connu). Les résultats ont été comparés à la transcription du gène *cas9* chez la même souche, ayant subi uniquement le choc électrique d'électroporation, en absence de plasmide, pour conserver des conditions les plus similaires possible. Les résultats obtenus ont été représentés sur les figures 11.A, 11.B et 11.C pour NEM316, A909 et BM110 respectivement.

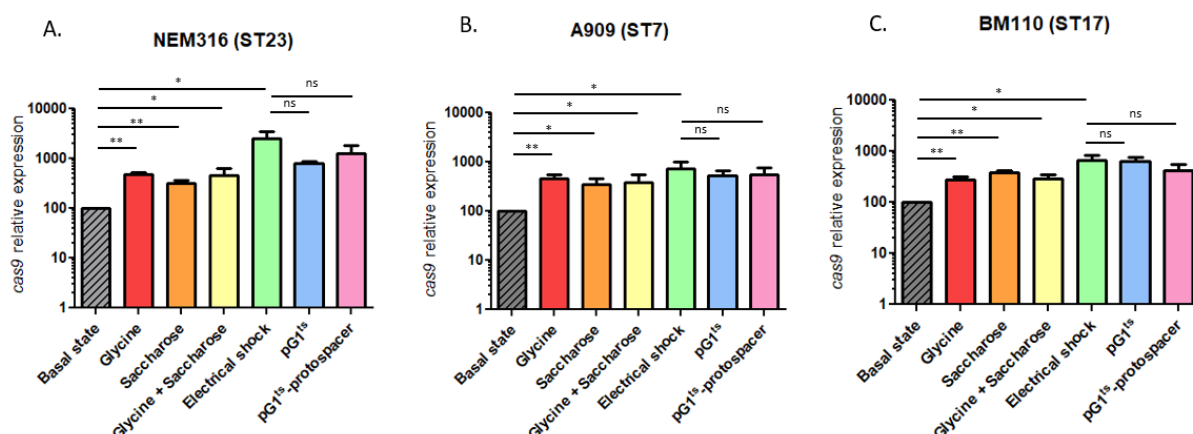


Figure 11 : Expression relative du gène *cas9* pour l'ensemble des conditions testées concernant le stimulus « plasmide ».

La figure représente l'expression relative du gène *cas9*, pour chaque souche, dans les conditions « glycine » (en rouge), « saccharose » (en orange), « glycine + saccharose » (en jaune) et « choc électrique » (en vert), comparativement à la condition « état basal » (en gris hachuré) de la même souche prise comme condition de référence, ainsi que les conditions « plasmide pG1^{ts} vide » (en bleu) et « plasmide avec protospacer spécifique » (en rose), comparativement à la condition « choc électrique » de la même souche prise comme condition de référence, chez NEM316 en **A.**, A909 en **B.** et BM110 en **C.** Les graphiques représentent la moyenne de 3 expériences.

Des tests statistiques de student sur séries appariées ont été réalisés et représentés sur la figure par des astérisques (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; ns : non significatif).

Ces résultats montrent que pour chacune des trois souches, il n'a pas été mis en évidence de différence significative d'expression du gène *cas9*, que la bactérie soit en contact avec un plasmide vide ou contenant un protospacer spécifique, en comparaison à l'application d'un choc électrique, condition prise ici comme référence. L'ajout d'un élément étranger, qu'il soit « connu ou non » de la souche utilisée, n'engendre donc pas d'augmentation de la transcription du gène *cas9*, dans les conditions testées.

Cependant, malgré l'absence de différence objectivée lors de l'ajout d'un plasmide, nous nous sommes demandé si cela était réellement le cas *in vivo*. En effet, *in vitro*, avant d'ajouter le plasmide, nous rendons les bactéries compétentes par un traitement chimique qui fragilise les membranes bactériennes puis nous appliquons un choc électrique qui les perméabilise. Ce traitement et le choc électrique ne sont pas présents *in vivo* et constituent une différence non négligeable entre nos expérimentations et la réalité. Pour prendre en compte ces éléments, nous avons cherché à déterminer si le traitement chimique ainsi que le choc électrique subi, pouvaient avoir un impact sur la transcription de *cas9*. Pour cela, nous avons comparé diverses conditions visant à décomposer chaque étape appliquée à la souche bactérienne au cours des expériences. Nous avons ainsi testé la condition « glycine + saccharose », lorsque la suspension bactérienne, en phase mi-exponentielle de croissance, a été mise en contact avec une solution contenant de la glycine et du saccharose. Cette solution est celle de référence permettant de rendre les bactéries compétentes et donc de les préparer à recevoir le choc électrique nécessaire au passage du plasmide. Cette condition a elle-même été décomposée en deux conditions, la condition « glycine » lorsque la souche n'a été mise en contact, après croissance, qu'avec une solution de glycine et la condition « saccharose » lorsque la solution utilisée ne contenait que du saccharose. Ces deux conditions ont été ajoutées afin de visualiser l'effet de chaque composé chimique présent dans la solution initiale. La condition « choc électrique » ainsi que les trois conditions décomposant l'étape permettant de rendre les bactéries compétentes ont été comparées par rapport la condition « état basal ». Cette dernière condition correspondait uniquement à la croissance de la bactérie en bouillon TH jusqu'en mi-phase exponentielle (condition de référence, sans stimuli quel qu'il soit). Les résultats ont été représentés sur la figure 11.A, 11.B et 11.C pour NEM316, A909 et BM110 respectivement.

Ces résultats mettent en évidence, pour chacune des souches, une différence significative entre chacune des conditions « glycine », « saccharose », « glycine + saccharose » et « choc électrique » comparativement à la condition de référence correspondant à l'état basal de la souche. Cela montre que le traitement chimique utilisé pour rendre les bactéries compétentes ainsi que le choc électrique appliqué pour perméabiliser les membranes, afin de faire pénétrer le plasmide par la suite, ont un impact sur la transcription du gène *cas9* puisque celle-ci est significativement plus importante. Le traitement pour rendre les bactéries compétentes et le choc électrique provoquent donc un stress chez la bactérie, plus remarquable proportionnellement pour le choc électrique, qui stimule la transcription du gène *cas9* de façon plus importante. Ces conditions ayant un impact important, il n'est pas possible de comparer

les conditions « plasmide vide » et « plasmide avec protospacer spécifique » avec la condition de référence « état basal », ces conditions étant trop éloignées.

Des résultats équivalents ayant été observés pour l'ensemble de nos trois souches, nous avons par la suite comparé l'expression du gène entre les souches, dans l'ensemble des conditions testées pour voir notamment si une différence était observée entre ces souches. Les résultats ont été représentés sur la figure 12.A pour A909 et 12.B pour BM110, comparativement à NEM316.

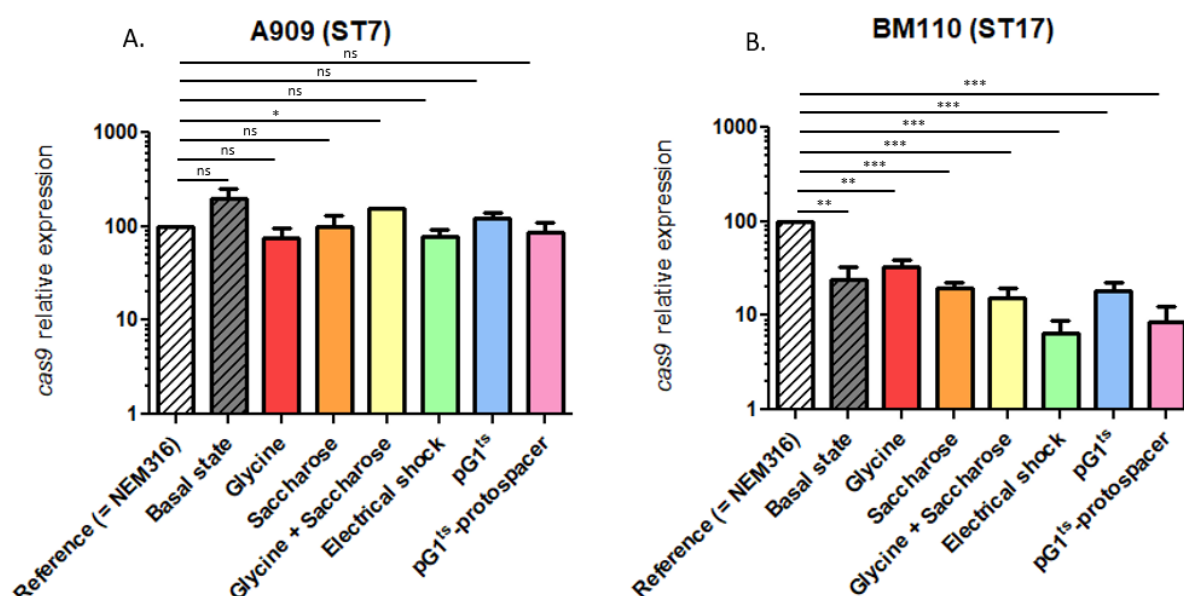


Figure 12 : Expression relative du gène *cas9* chez A909 et BM110 par rapport à NEM316 pour le stimulus « plasmide ».

La figure représente l'expression relative du gène *cas9* dans la condition de référence « état basal » (en gris hachuré), « glycine » (en rouge), « saccharose » (en orange), « glycine + saccharose » (en jaune), « choc électrique » (en vert), « plasmide pG1^{ts} vide » (en bleu) et « plasmide avec spacer spécifique » (en rose), chacune comparativement à la même condition chez NEM316, prise comme souche de référence et représentée sur la figure avec une valeur de référence fixe à 100 (en blanc hachuré), chez A909 (n = 3) en **A.** et BM110 (n = 3) en **B.**

Des tests statistiques de student sur séries appariées ont été réalisés et représentés sur la figure par des astérisques (* $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$; ns: non significatif).

Ces résultats, tout comme ceux de la condition « stress acide », montrent que quelle que soit la condition testée, aucune différence significative n'est mise en évidence entre les souches A909 (ST7) et NEM316 (ST23) (Figure 12.A). En revanche, pour chacune des conditions, le

gène *cas9* est significativement moins transcrit chez BM110 par rapport à NEM316 (Figure 12.B), en proportions différentes selon les conditions. Cette différence s'observant à la fois lorsque des stimuli sont appliqués mais également à l'état basal cela montre que, quelle que soit la condition, la transcription est plus faible chez la souche BM110 (ST17), comparativement aux souches NEM316 (ST23) et A909 (ST7). Cependant, malgré la faible transcription retrouvée à l'état basal pour BM110, le système peut-être stimulé puisque, comme montré précédemment et comme pour les deux autres souches, celle-ci augmente lors de l'application de stimuli.

4.1.3. Evaluation de l'impact de la présence d'un stress antibiotique sur l'expression du gène *cas9*

Le fait de rendre les bactéries compétentes par un traitement chimique et d'appliquer un choc électrique sur les membranes bactériennes a montré une stimulation de la transcription du gène *cas9*. Ces actions ayant en commun un stress au niveau de la paroi bactérienne, le troisième stimulus choisi a été la présence d'antibiotiques agissant sur cette paroi. Les antibiotiques ont été ajoutés au milieu de culture pendant la croissance de nos souches pour voir leurs impacts potentiels sur la transcription du gène *cas9*. Deux antibiotiques ont été testés, d'une part la pénicilline G et d'autre part la vancomycine, et comparés à la croissance des bactéries en condition de référence, c'est-à-dire sans antibiotique dans le milieu de culture.

4.1.4. Pénicilline G

La pénicilline G est une bêta-lactamine qui exerce son action en se liant à une enzyme, la transpeptidase. Cette enzyme est indispensable à la synthèse de la paroi bactérienne puisqu'elle permet la liaison de molécules formant le peptidoglycane. Ce peptidoglycane étant un élément majeur de la paroi, en se liant à la transpeptidase, la pénicilline G empêche son action enzymatique et inhibe donc la multiplication des bactéries en empêchant la fabrication du composant principal de la paroi.

Dans un premier temps afin de savoir quelle concentration d'antibiotique utiliser, des courbes de croissances ont été réalisées pour chacune de nos souches. Ces croissances ont été faites en présence de concentration croissante d'antibiotique afin de déterminer la plus forte concentration pouvant être utilisée sans affecter la croissance de nos souches et cela au moins

jusqu'en mi-phase exponentielle de croissance, phase étudiée dans nos expérimentations. Cette concentration correspondait donc à une dose sub-inhibitrice pour nos souches. Nous avons déterminé la CMI de nos souches qui était à 0,064 $\mu\text{g/mL}$ pour chacune de nos souches. Nous avons donc, pour nos courbes de croissance, testé une gamme de concentration assez large encadrant cette valeur. Les courbes ont été représentées sur la figure 13.A, 13.B et 13.C pour NEM316, A909 et BM110 respectivement.

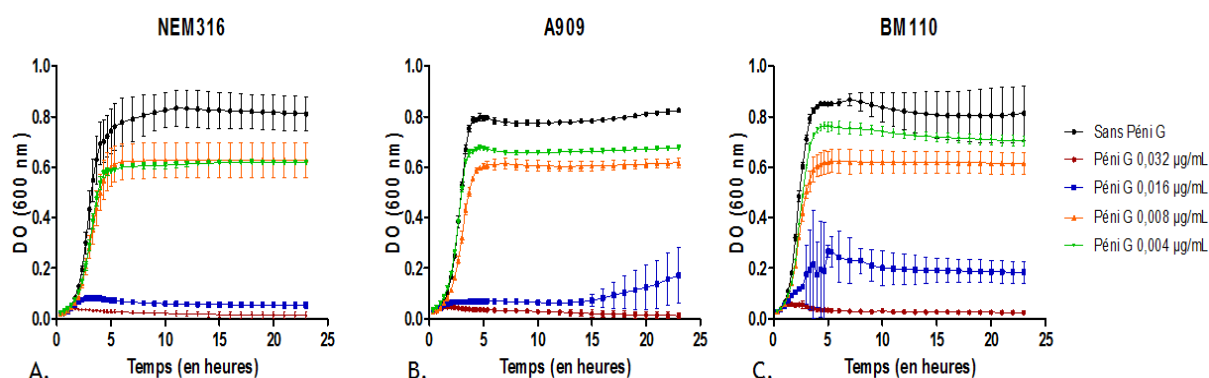


Figure 13 : Courbes de croissance de chacune des souches de *S. agalactiae* étudiées en fonction de la concentration en pénicilline G.

Les figures représentent les courbes de croissance de NEM 316 en **A.**, A909 en **B.** et BM110 en **C.** en fonction de concentrations croissantes en pénicilline G (allant de 0 pour la condition de référence sans antibiotique à 0,032 $\mu\text{g/mL}$).

Au vu des résultats la concentration sub-inhibitrice de pénicilline G retenue pour la condition de croissance en présence d'antibiotique a été fixée à 0,008 $\mu\text{g/mL}$. Les expériences suivantes ont été réalisées selon le protocole établi et décrit précédemment, dans l'objectif de voir si la présence d'un antibiotique à action sur la paroi bactérienne tel que la pénicilline G pouvait avoir un impact sur le système CRISPR-Cas et modifier la transcription du gène *cas9*.

Avec ces résultats et selon le protocole établi, nous avons voulu savoir si l'application du stress antibiotique, ici la pénicilline G, pouvait stimuler la transcription du gène *cas9* par son action au niveau de la paroi bactérienne comparativement à une condition de croissance de référence sans antibiotique. La transcription des gènes a été mesurée sur des extraits obtenus après croissance en milieu liquide TH à 37°C jusqu'en mi-phase exponentielle des souches, avec ou sans pénicilline G. Les résultats ont été représentés sur la figure 14.A, 14.B et 14.C pour NEM316, A909 et BM110 respectivement.

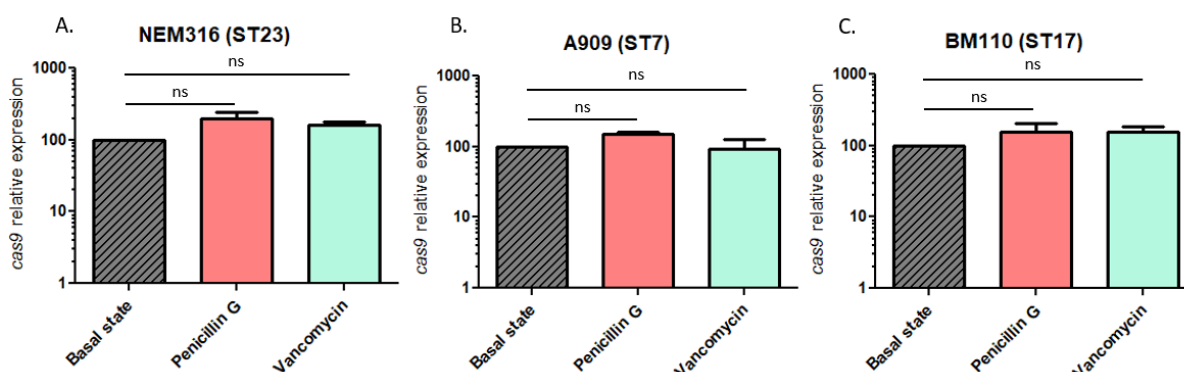


Figure 14 : Effet de deux antibiotiques, la pénicilline G la vancomycine, sur la transcription du gène *cas9*.

La figure représente l'expression relative du gène *cas9* dans la condition de croissance « Pénicilline G 0,008 $\mu\text{g/mL}$ » et « Vancomycine 0,25 $\mu\text{g/mL}$ » comparativement à la condition de croissance de référence, sans antibiotique chez NEM316 (n =3) en **A.**, A909 (n = 3) en **B.** et BM110 (n = 3) en **C.**

La comparaison des moyennes a été réalisée avec des tests statistiques de student sur séries appariées (ns : non significatif).

Les résultats ne montrent pas de différence significative de transcription du gène *cas9* lors de la croissance bactérienne en présence d'une dose sub-inhibitrice de pénicilline G par rapport à la condition de croissance de référence sans antibiotique et ce quelle que soit la souche.

4.1.5. Vancomycine

La vancomycine est un antibiotique de la famille des glycopeptides qui agit en se liant au dipeptide terminal formant le peptidoglycane de la paroi bactérienne. Elle empêche donc la formation de ce dernier et par conséquent empêche la formation de la paroi et donc la multiplication bactérienne.

Dans un premier temps, comme pour la pénicilline G, des courbes de croissances été réalisées afin de déterminer la plus forte concentration de vancomycine pouvant être utilisée sans affecter la croissance de nos souches. Nous avons déterminé la CMI de nos souches qui était à 0,50 $\mu\text{g/mL}$ pour chacune de nos souches. Nous avons donc, pour nos courbes de croissance, testé une gamme de concentration assez large encadrant cette valeur. Les courbes ont été représentées sur la figure 15.A, 15.B et 15.C pour NEM316, A909 et BM110 respectivement.

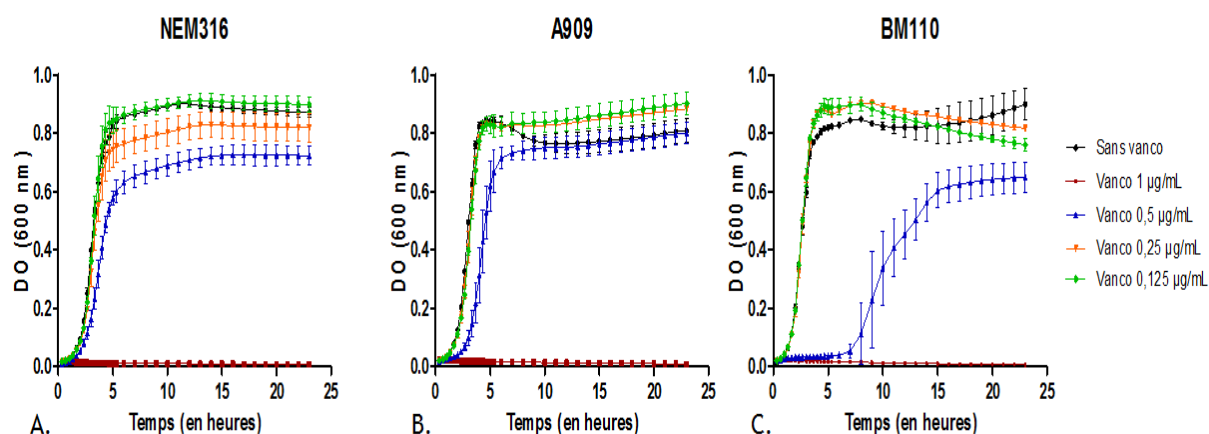


Figure 15 : Courbes de croissance de chacune des souches de *S. agalactiae* étudiées en fonction de la concentration en vancomycine.

Les figures représentent les courbes de croissance de NEM 316 en **A.**, A909 en **B.** et BM110 en **C.** en fonction de concentrations croissantes en vancomycine (allant de 0 pour la condition de référence sans antibiotique à 1 µg/mL).

Au vu des résultats la concentration sub-inhibitrice de vancomycine retenue pour la condition de croissance en présence d'antibiotique a été fixée à 0,25 µg/mL. Les expériences suivantes ont ensuite été réalisées selon le protocole établi et décrit précédemment, dans l'objectif de voir si la présence d'un autre antibiotique à action sur la paroi bactérienne, la vancomycine, pouvait avoir un impact sur le système CRISPR-Cas et modifier la transcription du gène *cas9*.

Avec ces résultats et selon le protocole établi, nous avons voulu savoir si l'application du stress antibiotique, ici la vancomycine, pouvait stimuler la transcription du gène *cas9* par son action au niveau de la paroi bactérienne comparativement à une condition de croissance de référence sans antibiotique. La transcription des gènes a été mesurée sur des extraits obtenus après croissance en milieu liquide TH à 37°C jusqu'en mi-phase exponentielle des souches, avec ou sans vancomycine. Les résultats ont été représentés sur la figure 14.A, 14.B et 14.C pour NEM316, A909 et BM110 respectivement.

Les résultats ne montrent pas de différence significative de transcription du gène *cas9* lors de la croissance bactérienne en présence d'une dose sub-inhibitrice de vancomycine par rapport à la condition de croissance de référence sans antibiotique et ce quelle que soit la souche.

4.2. Mesure de la traduction de la protéine Cas9 par Western-Blot

Afin de visualiser une éventuelle différence de traduction de la protéine Cas9 selon les diverses conditions et souches testées et permettre de montrer une possible différence de régulation des systèmes CRISPR-Cas9, la semi-quantification de notre protéine dans les différents échantillons a été estimée par la réalisation de Western-Blot. Pour le moment, seule la mise en place de la technique a été réalisée et les expériences restent à faire pour comparer la traduction de Cas9 selon les souches et les conditions.

4.2.1. Essai à l'INRAE

Le premier essai de Western Blot a été réalisé, sur le site de l'INRAE, avec Isabelle Virlogeux-Payant, dans l'équipe « Signalisation, portage et virulence bactérienne » pour qui la technique de révélation par le 3X flag était déjà en place et bien connue.

Pour ce premier essai plusieurs conditions concernant le stimulus « plasmide » ont été choisies et appliquées sur chacune de nos trois souches mutées, NEM316_{3Xflag-Cas9}, BM110_{3Xflag-Cas9} et A909_{3Xflag-Cas9}, c'est-à-dire dont la protéine Cas9 était marquée par le 3X flag. Les conditions testées étaient « état basal », « glycine + saccharose », « choc électrique », « plasmide pG1^{ts} vide » et « plasmide avec protospacer spécifique ». Comme décrit dans le protocole, deux gels ont été réalisés en parallèle, l'un pour la révélation du marquage de la protéine Cas9 via les anticorps primaire et secondaire et le second pour la coloration au bleu de Neuhoff (équivalent du bleu de Coomassie), pour visualiser la quantité de protéines déposée. Pour cet essai environ 7 µg de protéines ont été déposés soit 15 µL au vu des concentrations de nos extraits (750 µg/mL environ). Un extrait de protéines provenant de *Salmonella sp* dont la protéine pagN a été marquée par un 3X flag, fourni par Isabelle Virlogeux-Payant, a été déposé afin d'avoir un témoin positif et de valider la technique. La partie basse et haute de la membrane ont été découpées pour révéler le marquage 3X flag puisque pagN marquée pèse environ 27 kDa et Cas9 160 kDa. La partie intermédiaire, quant à elle, a été découpée pour réaliser un marquage de la protéine HSP 60 car cette protéine, constitutive chez *Salmonella sp* est utilisée comme référence et témoin de la quantité de protéines déposée. Ce marquage a également été réalisé sur nos extraits afin de savoir si cette protéine était présente chez *Streptococcus agalactiae* et pouvait être utilisée pour s'affranchir de la coloration au bleu de Neuhoff, moins précise. Les résultats ont été représentés pour les trois souches sur les figures 16 et 17 représentant respectivement la coloration de Neuhoff et le Western-Blot.

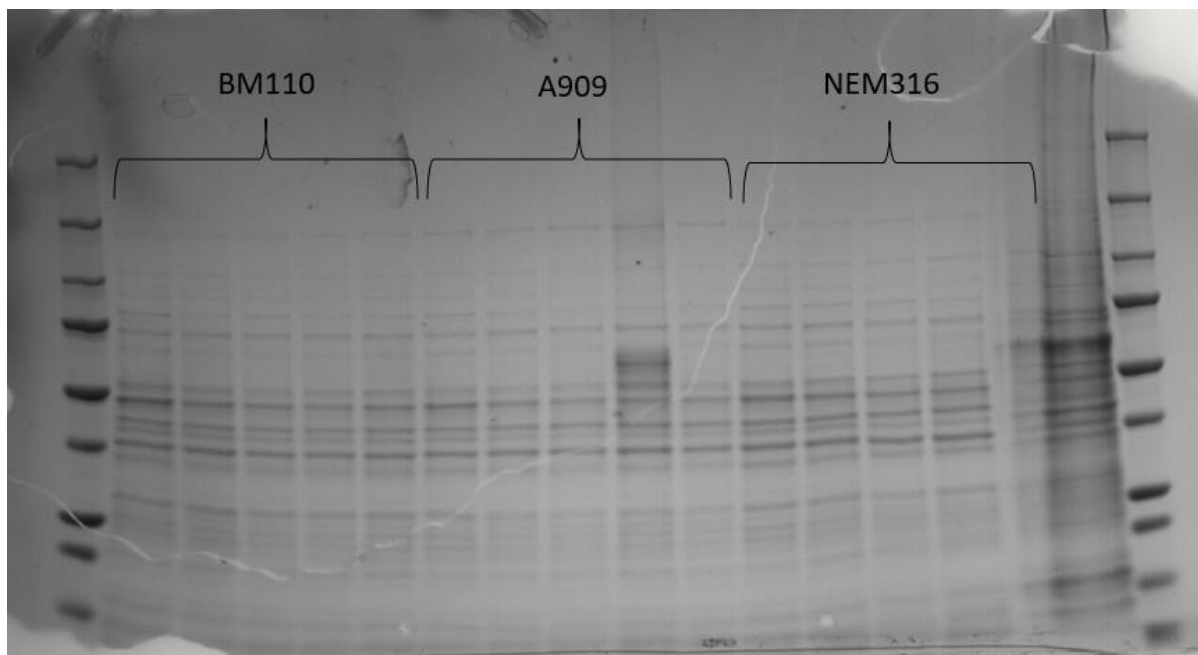


Figure 16 : Image du gel de polyacrylamide après migration des protéines, coloré au bleu de Neuhoff.

L'image représente la visualisation des bandes correspondant aux différentes protéines présentes dans les extraits, après coloration du gel au bleu de Neuhoff. De gauche à droite, les lignes de migration correspondent au marqueur de taille puis aux conditions « état basal », « glycine + saccharose », « choc électrique », « plasmide pG1^{ts} vide » et « plasmide avec protospacer spécifique » pour BM110, A909 et NEM319, puis l'extrait de *Salmonella sp* et enfin de nouveau le marqueur de taille.

Sur la figure 16, les quantités de protéines ne semblent pas totalement équivalentes puisque certains extraits tels que A909 « plasmide pG1^{ts} vide » ou BM110 « état basal », dans une moindre mesure, apparaissent plus concentrés, malgré un dosage rigoureux des extraits protéiques avant la migration.

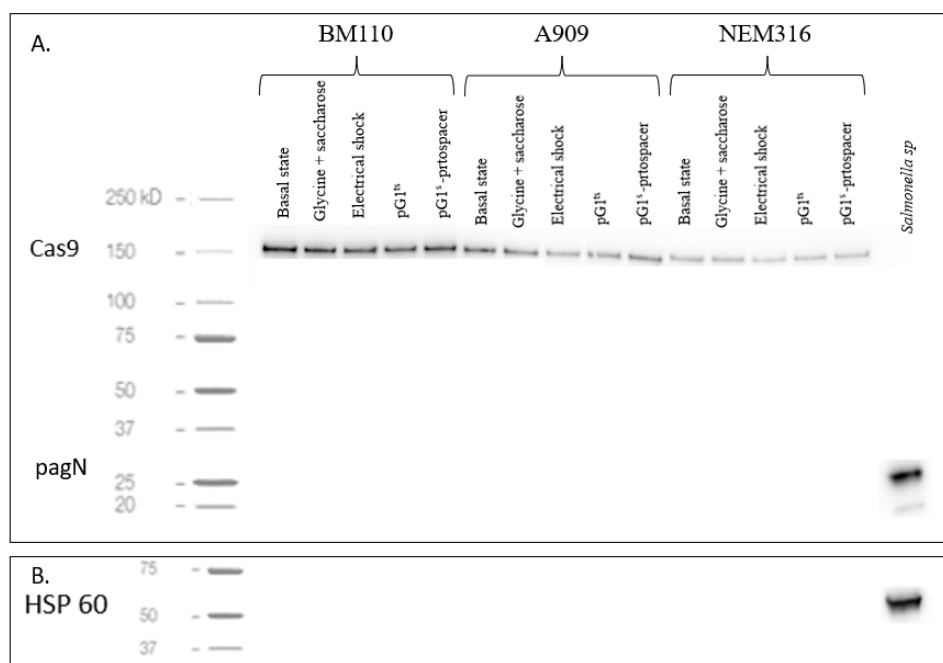


Figure 17 : Image reconstituée, après révélation, de la membrane de nitrocellulose du western-blot du premier essai.

L'image représente la visualisation des bandes correspondant aux différentes protéines marquées par un 3X flag en **A.** et HSP 60 pour *Salmonella sp* en **B.** De gauche à droite, les lignes de migration correspondent au marqueur de taille puis aux conditions « état basal », « glycine + saccharose », « choc électrique », « plasmide pG1^{ts} vide » et « plasmide avec spacer spécifique » pour BM110, puis A909 et NEM319, puis l'extrait de *Salmonella sp* et enfin de nouveau le marqueur de taille.

Sur la figure 17, le témoin positif, correspondant à la protéine pagN marquée par un 3X flag chez *Salmonella sp*, possède bien une bande révélée à la taille attendue, soit 27 kDa. Cela montre que les étapes du protocole de Western-blot ont bien été réalisées et que l'image est interprétable. Les résultats permettent également la visualisation de la protéine HSP 60 dans cet extrait, protéine constitutive de la bactérie et témoin de la quantité de protéines dans l'extrait. Concernant nos extraits, pour l'ensemble d'entre eux est mise en évidence une bande à environ 160 kDa, correspondant à notre protéine Cas9 marquée par le 3X flag. Le marquage, via la construction des mutants, a donc bien fonctionné. Il n'y a cependant pas de bande correspondant à HSP 60 et la protéine ne pourra donc pas être utilisée comme témoin de la quantité de protéines déposée. La comparaison de l'intensité des bandes paraît difficile ici puisque cet essai correspondait à l'apprentissage de la technique et des petites erreurs ont pu être commises. Par exemple, la quantité de protéines déposées semble différente ce qui ne permet pas une interprétation dans des conditions correctes. Il peut également être noté que l'intensité des

bandes à l'air plus forte sur la partie gauche de la membrane et décroît au fur et à mesure des extraits en allant vers la droite ce qui pourrait être lié à un artefact au moment de la capture de l'image.

4.2.2. Mise au point au laboratoire

Nous avons par la suite reproduit ces expériences au laboratoire, afin de pouvoir tester plus de conditions et surtout de vérifier la reproductibilité de nos résultats.

Dans un premier temps, nous avons testé les souches NEM316 et BM110 à l'état basal puisqu'un facteur compris entre 2 et 5 a été retrouvé concernant la transcription du gène *cas9* en qPCR. Deux témoins négatifs (T-), correspondant à ces deux mêmes souches dont la protéine Cas9 n'était pas marquée, ont été mis culture en condition basale et les extraits protéiques déposés afin de s'assurer de la spécificité des signaux visualisés après révélation. Un de nos extraits, BM110 « état basal », utilisé lors du premier Western-blot, a également été déposé en tant que témoin positif (T+) de l'expérimentation. Les résultats du Western-blot ont été représentés sur la figure 18.

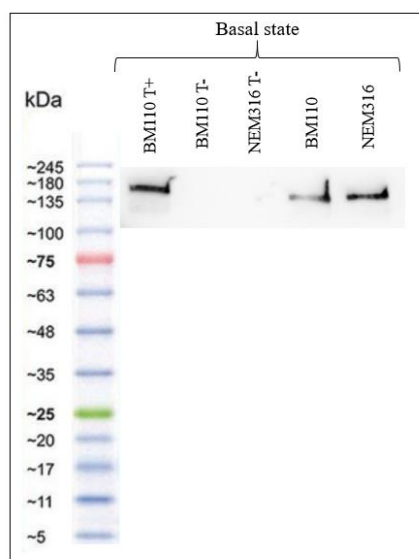


Figure 18 : Image reconstituée, après révélation, de la membrane de nitrocellulose du western-blot du deuxième essai.

L'image représente la visualisation des bandes correspondant à notre protéine Cas9 marquée par le 3X flag. De gauche à droite, les lignes de migration correspondent au marqueur de taille puis aux conditions « état basal » pour le témoin positif BM110, les témoins négatifs BM110 et NEM316 et nos extraits testés BM110 et NEM316 dont la protéine Cas9 est marquée par le 3X flag.

L'image reconstituée montre une bande à environ 160 kDa sur notre témoin positif et nos deux extraits testés. Aucune bande n'est visualisée sur nos deux témoins négatifs. Avec l'ensemble de ces observations nous pouvons dire que la bande visualisée est bien spécifique et correspond à notre protéine Cas9 marquée par le 3X flag. Il semblerait qu'il y ait une légère sous-expression de la protéine Cas9 chez BM110 par rapport à NEM316. Ce résultat reste à interpréter avec précaution car, malgré un dosage protéique de nos extraits et à priori une même quantité déposée, le gel coloré au bleu de Coomassie n'a pas été réalisé pour le confirmer.

Les expériences sont donc à poursuivre avec nos différentes conditions de cultures sur nos trois souches dont la protéine Cas9 est marquée par le 3X flag, en colorant un gel au bleu de Coomassie en parallèle, afin de pouvoir comparer l'intensité des bandes obtenues selon les conditions et semi-quantifier la traduction de notre protéine d'intérêt.

5. Discussion

Chez *S. agalactiae*, pathogène humain majeur impliqué dans les infections néonatales et de plus en plus, dans les infections invasives de l'adulte, une différence de pouvoir pathogène a été montrée en fonction de la lignée phylogénétique d'appartenance des souches. Bien que, de nos jours et de manière globale, *S. agalactiae* soit fréquemment retrouvé chez l'adulte, un ST particulier, le ST17, est quant à lui significativement associé aux infections néonatales, ce qui fait de lui un clone qualifié d'hypervirulent (Jones *et al.*, 2003; Poyart *et al.*, 2008). Ces observations sont en faveur de capacités d'adaptation et de virulence de la bactérie différentes selon les lignées phylogénétiques. Cette virulence est notamment, mais pas uniquement, due à l'intégration de nouveaux gènes au sein d'une souche par transfert horizontal à partir d'autres espèces, ou suite à la rencontre de divers éléments génétiques mobiles tels que des bactériophages. Pour lutter contre ces éléments et leur intégration au sein de leur génome, les bactéries disposent de divers mécanismes de défense. Un mécanisme majeur, identifié et étudié depuis plusieurs années, est le système CRISPR-Cas, système de défense immunitaire adaptatif dont l'implication a particulièrement été prouvée vis-à-vis des phages et des plasmides (Horvath and Barrangou, 2010). Le système de type II-A de *S. agalactiae* est caractérisé par un acteur majeur, l'endonucléase Cas9, indispensable au fonctionnement, que ce soit dans l'étape ultime d'interférence mais aussi dans l'étape précoce d'adaptation. Ce système permet à la fois une régulation vis-à-vis des éléments étrangers extérieurs, mais aussi une régulation endogène des gènes du « core genome » bactérien (Lopez-Sanchez *et al.*, 2012). Il a aussi été montré l'importance de la régulation du système en fonction des conditions dans lesquelles se trouve la bactérie, afin de maintenir son intégrité et/ou lui permettre d'infecter l'hôte de manière plus efficace (Louwen *et al.*, 2014). Cette régulation est donc cruciale puisque tous ces éléments montrent que selon la souche bactérienne en jeu et les conditions dans lesquelles elle se trouve, la virulence observée est différente. Dans des travaux antérieurs, il a été montré une différence de composition du locus selon les ST et notamment, un nombre moins important de spacers au sein du ST 17 (Lier *et al.*, 2015). Chez ces souches hypervirulentes, malgré une délétion de 103 pb retrouvée en amont du gène *cas9*, engendrant la perte du promoteur de cette région, il a été montré que le système restait fonctionnel *in vitro* (Pastuszka *et al.*, 2021). L'objectif de ce travail consistait donc à rechercher et identifier des éléments de régulation du système CRISPR-Cas9 afin de mieux comprendre son fonctionnement et apporter des éléments explicatifs aux différences de pouvoir pathogène observées, particulièrement chez les souches hypervirulentes

de ST17. Pour cela, divers stimuli ont été choisis afin d'étudier leur impact sur l'expression du système, pour chacune des trois souches étudiées, NEM316 (ST23), A909 (ST7) et BM110 (ST17).

Pour objectiver cet impact potentiel, dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la transcription du gène *cas9* dans diverses conditions de pH. Ce premier stimulus visait à comparer la transcription du système en pH neutre et pH acide afin de mimer une condition environnementale d'acidité pour la bactérie, correspondant au pH vaginal. En effet, *Streptococcus agalactiae* étant présent en portage au niveau vaginal et les clones hypervirulents étant impliqués principalement dans les infections néonatales, les conditions environnementales présentes au niveau de cette muqueuse pourraient potentiellement jouer un rôle. L'impact non négligeable engendré par l'application d'un stress acide a, de plus, déjà été montré chez d'autres bactéries et notamment chez *Staphylococcus aureus* (Bore *et al.*, 2007). Les études réalisées chez cette espèce ont montré une modification majeure de la transcription des gènes dans les 10 premières minutes qui suivent l'application du choc acide puis une stabilisation des transcrits. Il a notamment été objectivé une augmentation de la transcription des gènes codant pour des protéines impliquées dans la défense de la bactérie vis-à-vis de ce stress, telles que des pompes à protons ou des enzymes de réparation de l'ADN. A l'inverse, les gènes codant pour la synthèse ribosomale et nucléotidique apparaissent moins transcrits puisque le choc acide, représentant un milieu hostile, engendre une moindre croissance bactérienne.

Les souches de *S. agalactiae* appartenant au ST17 étant principalement impliquées dans les infections néonatales, cela montre qu'elles possèdent une virulence accrue et pourtant, elles ne sont pas les seules à être présentes en portage au niveau de la muqueuse vaginale, c'est pourquoi il était donc intéressant de savoir si cet environnement avait un impact particulier sur ces souches comparativement aux autres STs. Le protocole de stress acide a donc été établi et les expériences ont été réalisées pour voir l'impact de ce stress sur les différentes souches. Les résultats, contrairement à notre hypothèse de départ, n'ont pas montré de différence significative de la transcription du gène *cas9*, que ce soit 5 ou 10 minutes après l'application du stress acide, comparativement à l'état basal et ce qu'elle que soit la souche. Dans des expériences futures il pourrait être envisagé de refaire ce stress mais en prolongeant le temps d'incubation après application du stress acide pour voir si une différence pourrait apparaître.

Afin d'identifier d'autres éléments potentiels de régulation du système, nous nous sommes ensuite intéressés à un second stimulus qui consistait à mettre nos souches en présence d'éléments étrangers. En effet, les spacers étant acquis à partir de rencontres avec des EGM,

ces derniers pouvaient avoir un impact sur la stimulation du système. Ainsi, nous avons tout d'abord voulu voir si des différences existaient lorsque la bactérie était en contact avec un plasmide inconnu (pG1^{ts} vide) ou un plasmide possédant un protospacer « connu » (pG1^{ts} avec le protospacer spécifique de la souche), par rapport à l'absence de plasmide. Pour cela, il a été décidé de rendre la bactérie compétente et d'appliquer le choc électrique d'électroporation pour la condition « absence de plasmide » afin de s'affranchir d'un éventuel impact de ces actions. Cette condition « choc électrique » a donc été prise, à ce moment, comme base de comparaison. Les résultats ont montré une absence de différence significative que ce soit avec un plasmide connu ou inconnu et cela pour les trois souches testées. Le fait ici d'ajouter un élément étranger n'a donc pas augmenté la transcription du gène *cas9* comme nous aurions pu nous attendre à le voir. Nous nous sommes tout de même demandés si le fait d'appliquer le choc électrique aux parois bactériennes ne pouvait pas avoir un impact sur la transcription du système et peut-être masquer l'éventuelle augmentation de transcription engendrée par l'ajout d'un EGM. En effet, *in vivo* lorsque la bactérie rencontre un plasmide ou un autre EGM, cela se fait naturellement sans que la bactérie ne subisse de traitements physico-chimiques préalables comme nous pouvons le faire *in vitro*. Il a donc été décidé d'ajouter une nouvelle condition, prise comme référence, pour mesurer la transcription du gène à l'état basal. Cette condition, pour laquelle la suspension bactérienne a été prélevée en mi-phase exponentielle de croissance a été réalisée chez les trois souches et comparée à la condition qui comporte l'application du choc électrique. Les résultats obtenus montrent un impact important de l'application de ce choc puisque le gène *cas9* est 5 à 25 fois plus transcrit dans la condition « choc électrique » par rapport à la condition de référence selon les souches. La stimulation du système est retrouvée chez toutes nos souches, par rapport à son activité à l'état basal, mais de manière plus importante chez NEM316 et A909 comparativement à BM110. Cependant, avant l'application du choc électrique, une autre étape est nécessaire, l'étape de fragilisation des membranes par traitement chimique via une solution de glycine/saccharose. En effet, outre le choc électrique cette étape pouvait également avoir un impact sur la transcription du gène *cas9* c'est pourquoi cette condition « glycine + saccharose » a été ajoutée et également décomposée en deux autres conditions, « glycine » seule et « saccharose » seul. Les résultats ont montré que chacune de ces étapes avait un impact puisqu'une augmentation significative de la transcription du gène était observée. C'est donc l'ensemble de ces étapes jusqu'au choc électrique inclus, qui augmentent la transcription du gène et ce de manière plus importante chez NEM316 et A909 comparativement à BM110. La fragilisation puis la perméabilisation transitoire des membranes bactériennes s'apparentent donc à un stress pour la bactérie, puisqu'à l'origine d'une diminution de l'intégrité de sa paroi,

et nous montre qu'il a un impact sur l'expression du système CRISPR-Cas9. L'ajout du plasmide, par rapport à l'application du choc électrique seul, n'engendre pas d'augmentation supplémentaire de la transcription du système *in vitro*. Cependant, nous ne pouvons pas conclure de manière formelle que cette rencontre bactérie/plasmide *in vivo* ne stimule pas le système puisque le choc électrique peut potentiellement masquer cette stimulation.

Les souches montrant des résultats similaires nous les avons ensuite comparées entre elles pour chacune de ces conditions pour voir si des différences pouvaient exister. Pour cela nous avons comparé les souches A909 et BM110 par rapport à la souche NEM316. Les résultats ont montré une absence de différence significative, qu'elle que soit la condition, entre les souches A909 et NEM316. Cependant nous observons une différence significative entre BM110 et NEM316 puisque la transcription est 5 à 20 fois moins importante, selon les conditions, chez BM110. Il semble donc que le système CRISPR-Cas9 de la souche BM110, appartenant au ST17, soit de manière générale moins transcrit comparativement aux deux autres ST testés, ce qui confirme les résultats des travaux antérieurs réalisés au sein de l'équipe montrant que le système, à l'état basal, chez les souches hypervirulentes de ST17, était moins transcrit (Pastuszka *et al.*, 2021). Il existe donc bien une différence au niveau de la régulation du système, au moins entre certaines souches hypervirulentes par rapport à des souches d'autres STs, qualifiées de « moins virulentes » chez le nouveau-né. Ceci devra être confirmé sur un plus grand nombre de souches.

Pour ce stimulus « plasmide », même si le plasmide en lui-même n'a pas d'impact *in vitro*, nous avons pu observer que le système pouvait-être stimulé et donc régulé, par l'application d'un stress agissant au niveau de la paroi bactérienne. Du fait de ces observations, nous avons donc envisagé de tester un autre stimulus, celui de l'impact d'un antibiotique à action sur la paroi bactérienne. Nous avons donc choisi de tester deux antibiotiques, une bêta-lactamine, la pénicilline G, et un glycopeptide, la vancomycine, à dose sub-inhibitrice pour ne pas affecter la croissance des bactéries. Contrairement à ce que nous aurions pu attendre au vu des expériences précédentes les résultats n'ont montré aucune différence significative de transcription du gène *cas9* entre les conditions de croissance avec ou sans antibiotique, et ce qu'elle que soit la souche. Pour la suite, il pourrait être intéressant de tester ces mêmes molécules à dose plus importante pour voir si une différence pourrait apparaître mais également tester d'autres molécules ayant des mécanismes d'action différents. Le protocole pourrait également être modifié pour ajouter l'antibiotique après culture et non pas pendant la croissance et donc agir plus comme un stress à un instant donné pour la bactérie. Cependant cela reste

délicat puisque l'ajout de l'antibiotique pourrait avoir un impact trop important et tuer une majorité de la population bactérienne.

Le dernier stimulus envisagé à ce jour, car déjà connu pour son impact sur l'expression du système chez d'autres bactéries et notamment chez *Streptococcus thermophilus*, streptocoque possédant un système CRISPR-Cas de type II-A, est la présence de phages (Young *et al.*, 2012). Les expériences pour obtenir les phages de *S. agalactiae* sont à effectuer, sachant que les phages isolés à ce jour chez cette espèce sont lysogènes. Les génomes complets de plusieurs souches de *S. agalactiae* étant disponibles, il est possible de savoir dans quelles souches se trouvent des prophages, complets ou incomplets, afin d'utiliser préférentiellement ces souches pour l'obtention des phages. Une fois ces souches choisies, la mitomycine C sera utilisée pour induire un cycle lytique chez les phages et donc les exciser du génome bactérien dans lequel ils sont intégrés afin de les récupérer dans le surnageant de culture. Une fois filtré, le surnageant sera déposé sur des cultures bactériennes de *S. agalactiae* et si des phages spécifiques de l'espèce sont présents, des plages de lyse pourront être observées. Il faudra ensuite multiplier le phage dans la souche de *S. agalactiae* pour laquelle un maximum de plages de lyse ont été observées, cette souche est appelée souche de propagation, afin d'avoir des filtrats de phage en quantité suffisante pour réaliser les expériences. Une fois les phages obtenus, les expériences de mise en contact avec les différentes souches seront à effectuer pour étudier l'impact de leur présence sur la transcription de *cas9*.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à la traduction de la protéine Cas9. En effet la régulation pouvant être post-transcriptionnelle, il est important de quantifier la traduction de la protéine pour voir si des différences peuvent être observées, qu'elles confirment les résultats obtenus pour la transcription ou fassent apparaître de nouvelles différences.

Afin de réaliser ces expériences, des mutants ont été construits pour chacune de nos souches pour marquer la protéine Cas9 à l'aide d'un 3X flag au niveau chromosomique. Ce marquage a été réalisé en N-terminal. Le marquage en C-terminal a également été envisagé mais non obtenu à ce jour. Les deux constructions pouvaient être intéressantes car les gènes *cas* étant organisés en opéron et des sites de fixation du ribosome (ou RBS pour Ribosome Binding Site) étant présents tout au long de cet opéron, pour la traduction de chaque élément, l'ajout du flag entre deux de ces éléments pouvait avoir un impact sur le suivant. Différents impacts pouvaient être supposés tels que l'impossibilité de traduction de la protéine Cas1, qui serait engendrée par l'éloignement du RBS et du codon initiateur ATG par l'ajout du flag pour le mutant en C-terminal. Un autre impact possible était le changement conformationnel de

certaines structures, directement engendré par l'ajout du flag, empêchant le fonctionnement correct des autres éléments du système. Tous ces éléments sont importants pour la fonctionnalité du système mais ici non primordial puisque c'est la traduction de la protéine Cas9 et l'impact des différentes conditions testées sur la régulation du système qui est recherchée et non pas la fonctionnalité du système. Ces précautions ont donc été prises dans l'éventualité de la réalisation d'expérimentations futures nécessitant la fonctionnalité du système. Des expériences récentes ont montré une absence de fonctionnalité du système chez nos mutants en N-terminal et les constructions en C-terminal pourraient être réalisées si nécessaire pour la suite. Il pourrait également être envisager d'utiliser un peptide linker pour éloigner le 3x flag de la protéine et, par conséquent, ne pas entraîner d'encombrement stérique ou de recourir à des anticorps commerciaux anti Cas9. Cependant, ces anticorps étant dérivés de *Streptococcus pyogenes* il faut savoir si leur utilisation est possible chez *S. agalactiae*.

Une fois les mutants construits et vérifiés par séquençage, les différentes expériences réalisées pour mesurer la transcription de *cas9* dans la condition « plasmide » ont été refaites avec ces mutants afin de quantifier la protéine Cas9 et comparer son niveau de traduction. Pour cela, une méthode de Western Blot a été mise en place. Dans un premier temps un premier essai a été réalisé sur le site de l'INRAE avec une équipe qui avait préalablement mis au point la technique de révélation du 3X flag. Il a également permis de s'assurer que le marquage de Cas9 dans nos souches avait fonctionné. Pour valider l'expérimentation, un témoin positif correspondant à un extrait protéique de *Salmonella sp* dont la protéine pagN été marquée par un 3X flag, soit une bande visible à environ 27 kDa, a été utilisé. La partie moyenne de la membrane de nitrocellulose a été utilisée afin de visualiser la protéine HSP 60, constitutive chez *Salmonella sp*, utilisée comme témoin de la quantité de protéine déposée et permettant donc de comparer les intensités des bandes observées. Malheureusement cette protéine n'étant pas présente chez *Streptococcus agalactiae*, un gel coloré au bleu de Neuhoff était donc nécessaire afin de visualiser la quantité de protéines déposées et pouvoir comparer les bandes observées entre les différentes conditions testées. Concernant nos échantillons, les résultats ont montré la présence d'une bande à environ 160 kDa correspondant à notre protéine, ce qui a permis de valider le marquage réalisé. La quantité déposée pour ce premier essai, objectivée par la coloration au bleu de Neuhoff et les artefacts de capture d'image au moment de la révélation ont fait que l'interprétation de l'intensité des bandes observées n'a pas été possible. Cependant cela a validé la construction de nos mutants et la mise en place de la technique de Western-blot a donc par la suite été mise en place au laboratoire.

Pour le second essai, réalisé sur notre site, en plus du témoin positif correspondant à un de nos extraits préalablement testés et de nos échantillons, nous avons ajouté nos souches de référence BM110 et NEM316 à l'état basal. Ces extraits étaient présents en tant que témoins négatifs pour s'assurer que la bande visualisée à 160 kDa était bien spécifique de notre protéine marquée. Cela a été validé puisqu'aucune bande n'a été observée pour ces deux souches alors que pour la condition « état basal » sur nos deux souches marquées pour la protéine Cas9, une bande à 160 kDa environ a été visualisée. La technique étant maintenant en place au laboratoire, les expérimentations seront à poursuivre pour comparer les niveaux de traduction de la protéine Cas9 et notamment pour confirmer ou non la différence que semblerait montrer ce premier essai entre les souches BM110 et NEM316 à l'état basal. Les expériences réalisées pour la transcription du gène seront donc à refaire dans l'objectif d'extraire les protéines et comparer le niveau de traduction de la protéine Cas9.

6. Conclusion

Chez *S. agalactiae*, pathogène majeur en médecine humaine et en particulier en période néonatale, deux loci CRISPR ont été décrits mais un seul est ubiquitaire et dynamique, le locus CRISPR1, un système CRISPR-Cas de type II-A. Il a d'ores et déjà été montré dans des travaux antérieurs l'existence de différences dans l'architecture de ce système chez les souches hypervirulentes de ST17 comparativement aux souches appartenant aux autres lignées phylogénétiques. En effet, les souches de ST17 possèdent moins de spacers que les autres ST et une différence majeure existe dans l'organisation du locus. Cette différence consiste en la délétion de 103 pb en amont du gène *cas9*, entraînant la perte de son promoteur. Malgré cette différence, des expériences ont montré la fonctionnalité du système chez ces souches. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à la régulation de ces systèmes afin de mieux comprendre leur fonctionnement et apporter des éléments de réponse sur la virulence particulière de ces souches. Pour cela, deux approches complémentaires ont été étudiées qui sont d'une part, la transcription du gène *cas9* et d'autre part, la traduction de la protéine Cas9, la régulation pouvant s'effectuer à ces deux niveaux. Trois souches ont été étudiées, BM110, représentant le ST d'intérêt, A909, appartenant à un ST proche phylogénétiquement et NEM316, souche plus éloignée. Divers stimuli ont été choisis, sur la base de leur implication déjà démontrée au niveau de la régulation chez d'autres espèces bactériennes, ou sur la base de particularités environnementales des souches hypervirulentes ici étudiées. Les résultats obtenus concernant la transcription ont montré une activité du système CRISPR-Cas9 chez les souches hypervirulentes mais une différence majeure avec les souches des autres lignées. En effet, on retrouve une transcription moindre du système chez la souche BM110 comparativement aux deux autres, que ce soit à l'état basal ou après application d'un stimulus. Des éléments, tels qu'une action sur la paroi bactérienne pouvant être délétère pour la souche, ont été identifiés comme stimulant le système. Cela est en accord avec le principe même du système dont l'objectif est de défendre la bactérie vis-à-vis des différentes attaques auxquelles elle peut être soumise. Or la première étape lors de la rencontre de la bactérie avec un EGM est l'entrée dans la bactérie ce qui correspond à un stress pour la paroi bactérienne et représente donc un danger qui provoque une stimulation du système, comme montré dans nos résultats.

Les résultats obtenus confirment une activité du système CRISPR-Cas9 chez les souches hypervirulentes de ST17, malgré les différences présentes au sein du locus. Ils montrent également une stimulation de celui-ci lors de l'application de certains stress pouvant porter

atteinte à l'intégrité de la bactérie et notamment lors d'une action sur sa paroi. Cependant des différences sont observées comparativement aux autres ST et notamment une stimulation globale moins importante du système. Le système est donc fonctionnel mais transcrit à un taux plus faible ce qui peut avoir un impact sur la virulence observée de ces souches ST17. La poursuite de ce travail est nécessaire afin de mettre en évidence les différences entre les souches hypervirulentes de ST17 et les autres STs. Cela dans l'objectif d'identifier les éléments régulant le système CRISPR-Cas9 et de pouvoir établir un lien avec la virulence observée chez les souches de ST17 et leur capacité d'adaptation dans des milieux particuliers, tels que la muqueuse vaginale. Dans les expériences futures, concernant la transcription, les protocoles de certains stimuli vont être adaptés afin de voir si des différences peuvent apparaître, par exemple en augmentant le temps d'incubation pour le stress acide. D'autres stimuli sont également envisagés comme la présence de bactériophages, déjà cité précédemment.

Les stimuli sont des éléments importants à étudier puisque les bactéries possèdent de nombreux régulateurs qui leur permettent une adaptation selon l'environnement dans lequel elles se trouvent et les stress auxquels elles peuvent faire face. Une grande classe de régulateurs, par exemple, est celle des systèmes à deux composants (TCS) composés de deux protéines principales (Groisman, 2016). La première protéine, le senseur, capte les signaux de l'environnement et la seconde, l'effecteur, engendre la cascade moléculaire aboutissant à la régulation des éléments cibles. Ainsi si un stress est ressenti, au niveau de la paroi par exemple, ces systèmes vont s'activer pour déclencher une régulation permettant de protéger l'intégrité bactérienne. Ces mécanismes de régulation vont permettre à la bactérie de s'adapter à son environnement et peuvent engendrer une augmentation de leur virulence ou pathogénicité. Des travaux ont notamment montré que le régulateur CovR pourrait intervenir dans la virulence et pathogénicité chez *S. agalactiae* (Lamy *et al.*, 2004; Sullivan *et al.*, 2017). Il a en effet été observé que l'absence de ce régulateur chez les souches de sérotype III, incluant les souches hypervirulentes appartenant au ST17, entraînait une virulence moindre de ces souches. Ce régulateur, présent chez BM110, possède une action de répression sur la transcription du gène *cas9*. En effet, la transcription du gène a d'ores et déjà été mesurée chez des mutants délétés pour ce régulateur et les résultats ont montré une transcription plus importante du gène en l'absence de ce régulateur. Des mutants sont en cours de construction pour marquer la protéine Cas9 à l'aide d'un 3X flag chez BM110 délétée du régulateur CovR afin de réaliser des Western-Blots et comparer la traduction de la protéine entre cette souche et la souche BM110 sauvage. L'ensemble de ces expériences devront également être réalisées chez d'autres souches

appartenant au ST17, autre que BM110, afin de voir si les différences observées sont confirmées. Cela dans le but de pouvoir généraliser les conclusions faites à partir de ces résultats aux souches hypervirulentes de manière globale. En effet, CovR intervient sur la régulation du système CRISPR-Cas9 et semble être un régulateur majeur de la virulence des souches de ST17. Cela pourrait donc nous amener à montrer l'importance du système CRISPR-Cas9 dans la virulence observée chez les souches appartenant au ST17.

7. Références bibliographiques

Abed, N. *et al.* (2014) 'Direct regulation of the *pefI-srgC* operon encoding the Rck invasin by the quorum-sensing regulator SdiA in *Salmonella Typhimurium*', *Molecular Microbiology*, 94(2), pp. 254–271. doi:10.1111/mmi.12738.

Ballard, M.S. *et al.* (2016) 'The changing epidemiology of group B streptococcus bloodstream infection: a multi-national population-based assessment', *Infectious Diseases (London, England)*, 48(5), pp. 386–391. doi:10.3109/23744235.2015.1131330.

Barrangou, R. *et al.* (2007) 'CRISPR Provides Acquired Resistance Against Viruses in Prokaryotes', *Science*, 315(5819), pp. 1709–1712. doi:10.1126/science.1138140.

Barrangou, R. and Horvath, P. (2017) 'A decade of discovery: CRISPR functions and applications', *Nature Microbiology*, 2(7), p. 17092. doi:10.1038/nmicrobiol.2017.92.

Beauruelle, C. *et al.* (2017) 'CRISPR: A Useful Genetic Feature to Follow Vaginal Carriage of Group B Streptococcus', *Frontiers in Microbiology*, 8, p. 1981. doi:10.3389/fmicb.2017.01981.

Beauruelle, C. *et al.* (2018) 'Group B Streptococcus Vaginal Carriage in Pregnant Women as Deciphered by Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat Analysis', *Journal of Clinical Microbiology*, 56(6). doi:10.1128/JCM.01949-17.

Beauruelle, C. *et al.* (2021) 'CRISPR Typing Increases the Discriminatory Power of Streptococcus agalactiae Typing Methods', *Frontiers in Microbiology*, 12, p. 675597. doi:10.3389/fmicb.2021.675597.

Bikard, D. and Marraffini, L.A. (2013) 'Control of gene expression by CRISPR-Cas systems', *F1000Prime Reports*, 5. doi:10.12703/P5-47.

Bolotin, A. *et al.* (2005) 'Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin', *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 8), pp. 2551–2561. doi:10.1099/mic.0.28048-0.

Bore, E. *et al.* (2007) 'Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis', *Microbiology*, 153(7), pp. 2289–2303. doi:10.1099/mic.0.2007/005942-0.

Brochet, M. *et al.* (2006) 'Genomic diversity and evolution within the species *Streptococcus agalactiae*', *Microbes and Infection*, 8(5), pp. 1227–1243. doi:10.1016/j.micinf.2005.11.010.

Brudey, K. *et al.* (2006) 'Mycobacterium tuberculosis complex genetic diversity: mining the fourth international spoligotyping database (SpolDB4) for classification, population genetics and epidemiology', *BMC Microbiology*, 6(1), p. 23. doi:10.1186/1471-2180-6-23.

Deltcheva, E. *et al.* (2011) 'CRISPR RNA maturation by trans -encoded small RNA and host factor RNase III', *Nature*, 471(7340), pp. 602–607. doi:10.1038/nature09886.

Farley, M.M. *et al.* (1993) 'A population-based assessment of invasive disease due to group B Streptococcus in nonpregnant adults', *The New England Journal of Medicine*, 328(25), pp. 1807–1811. doi:10.1056/NEJM199306243282503.

Glaser, P. *et al.* (2002) 'Genome sequence of *Streptococcus agalactiae*, a pathogen causing invasive neonatal disease', *Molecular Microbiology*, 45(6), pp. 1499–1513. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.03126.x.

Gori, J.L. *et al.* (2015) 'Delivery and Specificity of CRISPR/Cas9 Genome Editing Technologies for Human Gene Therapy', *Human Gene Therapy*, 26(7), pp. 443–451. doi:10.1089/hum.2015.074.

Groisman, E.A. (2016) 'Feedback Control of Two-Component Regulatory Systems', *Annual review of microbiology*, 70, pp. 103–124. doi:10.1146/annurev-micro-102215-095331.

Horvath, P. and Barrangou, R. (2010) 'CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea', *Science (New York, N.Y.)*, 327(5962), pp. 167–170. doi:10.1126/science.1179555.

Høyland-Kroghsbo, N.M., Muñoz, K.A. and Bassler, B.L. (2018) 'Temperature, by Controlling Growth Rate, Regulates CRISPR-Cas Activity in *Pseudomonas aeruginosa*', *mBio*, 9(6), pp. e02184-18. doi:10.1128/mBio.02184-18.

Hsu, P.D. *et al.* (2013) 'DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases', *Nature Biotechnology*, 31(9), pp. 827–832. doi:10.1038/nbt.2647.

Ishino, Y. *et al.* (1987) 'Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product.', *Journal of Bacteriology*, 169(12), pp. 5429–5433.

Jansen, R. *et al.* (2002) 'Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes', *Molecular Microbiology*, 43(6), pp. 1565–1575. doi:10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x.

Jiang, W. *et al.* (2013) 'RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems', *Nature Biotechnology*, 31(3), pp. 233–239. doi:10.1038/nbt.2508.

Jinek, M. *et al.* (2012) 'A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity', *Science*, 337(6096), pp. 816–821. doi:10.1126/science.1225829.

Jones, N. *et al.* (2003) 'Multilocus sequence typing system for group B streptococcus', *Journal of Clinical Microbiology*, 41(6), pp. 2530–2536. doi:10.1128/jcm.41.6.2530-2536.2003.

Jourdan-Da Silva N. *et al.* (2008) 'Infections néonatales à streptocoque B en France : données d'incidence de 1997 à 2006 et pratiques de prévention en maternité'. Available at: http://beh.santepubliquefrance.fr/beh/2008/14_15/ (Accessed: 6 May 2020).

Koonin, E.V., Makarova, K.S. and Zhang, F. (2017) 'Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems', *Current Opinion in Microbiology*, 37, pp. 67–78. doi:10.1016/j.mib.2017.05.008.

Lamy, M.-C. *et al.* (2004) 'CovS/CovR of group B streptococcus: a two-component global regulatory system involved in virulence', *Molecular Microbiology*, 54(5), pp. 1250–1268. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04365.x.

Lancefield, R.C. (1933) 'A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci.', *The Journal of Experimental Medicine*, 57(4), pp. 571–595.

Lier, C. *et al.* (2015) 'Analysis of the type II-A CRISPR-Cas system of *Streptococcus agalactiae* reveals distinctive features according to genetic lineages', *Frontiers in Genetics*, 6. doi:10.3389/fgene.2015.00214.

Lopez-Sanchez, M.-J. *et al.* (2012) 'The highly dynamic CRISPR1 system of *Streptococcus agalactiae* controls the diversity of its mobilome: *Streptococcus agalactiae* CRISPR dynamics', *Molecular Microbiology*, 85(6), pp. 1057–1071. doi:10.1111/j.1365-2958.2012.08172.x.

Louwen, R. *et al.* (2014) 'The Role of CRISPR-Cas Systems in Virulence of Pathogenic Bacteria', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78(1), pp. 74–88. doi:10.1128/MMBR.00039-13.

Makarova, K.S. *et al.* (2020) 'Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants', *Nature reviews. Microbiology*, 18(2), pp. 67–83. doi:10.1038/s41579-019-0299-x.

Makarova, K.S. and Koonin, E.V. (2015) 'Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1311, pp. 47–75. doi:10.1007/978-1-4939-2687-9_4.

Mojica, F.J.M. *et al.* (2005) 'Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements', *Journal of Molecular Evolution*, 60(2), pp. 174–182. doi:10.1007/s00239-004-0046-3.

Mojica, F.J.M. *et al.* (2009) 'Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system', *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 3), pp. 733–740. doi:10.1099/mic.0.023960-0.

Nocard E., Mollereau R. (1887) '« Sur une mammite contagieuse des vaches laitières. »', p. Vol.1; 109-126.

Pastuszka, A. *et al.* (2021) 'Functional Study of the Type II-A CRISPR-Cas System of *Streptococcus agalactiae* Hypervirulent Strains', *The CRISPR Journal*, 4(2), pp. 233–242. doi:10.1089/crispr.2020.0145.

Patterson, A.G. *et al.* (2016) 'Quorum Sensing Controls Adaptive Immunity through the Regulation of Multiple CRISPR-Cas Systems', *Molecular Cell*, 64(6), pp. 1102–1108. doi:10.1016/j.molcel.2016.11.012.

Phares, C.R. *et al.* (2008) 'Epidemiology of invasive group B streptococcal disease in the United States, 1999-2005', *JAMA*, 299(17), pp. 2056–2065. doi:10.1001/jama.299.17.2056.

Pourcel, C., Salvignol, G. and Vergnaud, G. (2005) 'CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies', *Microbiology*, 151(3), pp. 653–663. doi:10.1099/mic.0.27437-0.

Poyart, C. *et al.* (2008) 'Invasive Group B Streptococcal Infections in Infants, France', *Emerging Infectious Diseases*, 14(10), pp. 1647–1649. doi:10.3201/eid1410.080185.

Ratner, H.K. *et al.* (2019) 'Catalytically Active Cas9 Mediates Transcriptional Interference to Facilitate Bacterial Virulence', *Molecular Cell*, 75(3), pp. 498-510.e5. doi:10.1016/j.molcel.2019.05.029.

Recommandations HAS (2001) 'Prevention antenatale du risque infectieux bacterien'. Available at: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/prevention_antenatale_du_risque_infectieux_bacterien_-_rec.pdf (Accessed: 6 May 2020).

Sullivan, M.J. *et al.* (2017) 'Effect of the Streptococcus agalactiae Virulence Regulator CovR on the Pathogenesis of Urinary Tract Infection', *The Journal of Infectious Diseases*, 215(3), pp. 475–483. doi:10.1093/infdis/jiw589.

Tazi, A. *et al.* (2010) 'The surface protein HvgA mediates group B streptococcus hypervirulence and meningeal tropism in neonates', *Journal of Experimental Medicine*, 207(11), pp. 2313–2322. doi:10.1084/jem.20092594.

Tazi, A. *et al.* (2011) 'Méningite néonatale à streptocoque du groupe B: Identification d'un facteur de virulence essentiel', *médecine/sciences*, 27(4), pp. 362–364. doi:10.1051/medsci/2011274010.

Tettelin, H. *et al.* (2005) 'Genome analysis of multiple pathogenic isolates of Streptococcus agalactiae: Implications for the microbial "pan-genome"', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(39), pp. 13950–13955. doi:10.1073/pnas.0506758102.

Vale, P.F. *et al.* (2015) 'Costs of CRISPR-Cas-mediated resistance in Streptococcus thermophilus', *Proceedings. Biological Sciences*, 282(1812), p. 20151270. doi:10.1098/rspb.2015.1270.

Van der Mee-Marquet, N. *et al.* (2008) 'Molecular Characterization of Human-Colonizing Streptococcus agalactiae Strains Isolated from Throat, Skin, Anal Margin, and Genital Body Sites', *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9), pp. 2906–2911. doi:10.1128/JCM.00421-08.

Verani, J.R. and Schrag, S.J. (2010) 'Group B streptococcal disease in infants: progress in prevention and continued challenges', *Clinics in Perinatology*, 37(2), pp. 375–392. doi:10.1016/j.clp.2010.02.002.

Young, J.C. *et al.* (2012) 'Phage-Induced Expression of CRISPR-Associated Proteins Is Revealed by Shotgun Proteomics in Streptococcus thermophilus', *PLoS ONE*, 7(5). doi:10.1371/journal.pone.0038077.

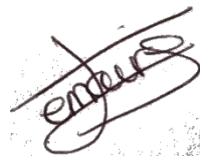
ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) ..Coralie LEMAIRE.....

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 21103563

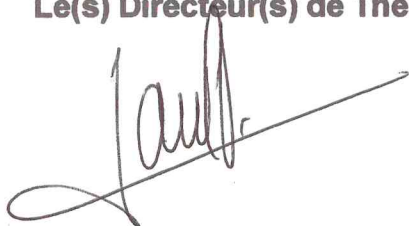
N° Thèse : 82

Nom et Prénom : LEMAIRE Coralie

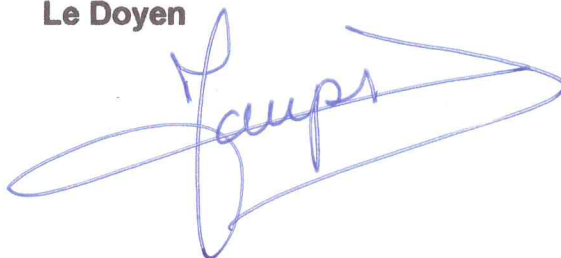
Sujet : ETUDE DE LA REGULATION DU SYSTEME CRISPR-CAS9 CHEZ
STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

Tours, le : 11 oct 2024

Le(s) Directeur(s) de Thèse :



Vu et Transmis :
Le Doyen



LEMAIRE Coralie

N° 82

ETUDE DE LA REGULATION DU SYSTEME CRISPR-CAS9 CHEZ
STREPTOCOCCUS AGALACTIAE

Il existe chez *Streptococcus agalactiae*, pathogène majeur en médecine humaine, un séquence type (ST) « hypervirulent », le ST17, qui est significativement associé aux infections néonatales. Il a été montré que le locus CRISPR-Cas9 de *S. agalactiae* des souches appartenant à ce ST17 est différent de celui des souches appartenant aux autres ST. L'objectif a été de mettre en évidence des éléments de régulation de ce système chez trois souches (ST17, ST23 et ST7) par la mesure de la transcription du gène *cas9* et la traduction de la protéine Cas9 suite à l'application de divers stimuli tels qu'un stress acide ou la présence de plasmides. Les résultats ont montré une transcription moindre de *cas9*, que ce soit suite à l'application de certains des stimuli mais également à l'état basal chez les souches de ST17 comparativement aux deux autres. Il a également été mis en évidence une augmentation de transcription, chez toutes les souches, lors de l'application d'un choc électrique sur la paroi bactérienne. Il existe donc bien des différences concernant le système CRISPR-Cas9 des souches hypervirulentes et les travaux concernant la transcription et la traduction seront à poursuivre afin de mieux comprendre le lien entre ce système et les différentes capacités d'adaptation ainsi que la virulence des souches.

Streptococcus agalactiae, système CRISPR-Cas9, régulation, ST17

JURY

PRÉSIDENT : Professeur Denys Brand, PU, UFR de Pharmacie - Tours

MEMBRES : Professeur Philippe Lanotte, PU-PH, UFR de Pharmacie, CHRU de Tours

Professeur Laurent Mereghetti, PU-PH, UFR de Médecine, CHRU de Tours

Docteur Adeline Pastuszka, AHU, UFR de médecine, CHRU de Tours

Docteur Catherine Schouler, Docteur en Sciences, INRAE, UMR1282, Nouzilly

Soutenue publiquement le 1er octobre 2021 à la faculté de pharmacie de Tours