



Comment déceler la conjugaison à l'œil nu ?

Sur un tapis de bactéries réceptrices, les 'pocks', ces figures circulaires (4-5 mm), révèlent les événements de conjugaison avec la donneuse (au centre du pock). Le pock résulte du retard de croissance induit par la diffusion d'un élément conjugatif de la donatrice vers la réceptrice. Le circo traduit la cartographie des transferts (formation de 'pocks') au sein de la population de *Streptomyces*, et révèle que seuls certains isolats donnent et/ou reçoivent les éléments conjugatifs : la population n'est pas panmictique.

Interplay between lateral gene transfer in bacteria and rhizosphere functioning

Responsables scientifiques : Cyril BONTEMPS/Pierre LEBLOND, UMR Dynamique des génomes et adaptation microbienne (DynAMic) 1128

Partenaire Labex : Claire FOURREY, UMR Interactions Arbres/Micro-organismes (IAM) 1136

Collaboration : Michiel VOS (Uni. Exeter)

Actions thématiques concernées : WP2 (principal) et WP1

Contexte —

Le microbiote des plantes a un rôle majeur sur la santé des arbres en participant, par exemple, à leur croissance ou à la défense contre des pathogènes. D'une manière générale, plus un microbiote est divers, plus il est efficace pour son hôte. Des résultats suggèrent qu'un niveau d'organisation de cette diversité pourrait se situer au niveau des populations bactériennes, c'est-à-dire chez des souches sœurs qui interagissent entre elles dans la niche, mais avec potentiellement des capacités différentes. Ces fonctions variables, liées à la diversification génétique de la population, permettraient un partage du travail et d'avoir une action synergique. En retour, les exsudats racinaires de la plante influenceraient le microbiote en augmentant la fréquence de transferts de gènes et permettraient l'émergence de nouvelles fonctions au sein de la population.

Objectifs —

Le premier objectif de ce projet est de mesurer l'effet de la rhizosphère sur les phénomènes de transferts de gènes et leurs conséquences sur la diversification d'une population de *Streptomyces*. Le second est de comparer l'influence et l'efficacité de populations de *Streptomyces* par rapport aux isolats seuls pour des fonctions liées à la santé et à la croissance des arbres.

Démarche —

Une population de *Streptomyces* faisant partie du microbiote d'un arbre est disponible au laboratoire. Le génome de certaines souches est séquencé et leur comparaison a révélé une grande diversité génétique et potentiellement fonctionnelle. Des éléments conjugatifs ont été associés à la genèse de cette diversité (Tidjani *et al.*, 2019). Chez les *Streptomyces*, leur transfert se traduit par un retard de croissance de la souche réceptrice observable à l'œil nu en boîte de Pétri (cf illustration). Ce phénomène permettra de quantifier directement l'influence de la plante (rhizosphère, exsudats) sur l'intensité du transfert de gènes au sein de la population. Les éléments conjugatifs des *Streptomyces* pourraient transférer d'autres portions du génome concomitamment à leur propre transfert. Afin de voir si ce mécanisme est à l'origine de la grande diversité génétique observée au sein de notre population, des conjugaisons seront réalisées avec des souches marquées à différents loci chromosomiques et les transconjugants analysés par reséquençage. Concernant le second objectif, nos souches seront testées en interaction avec des systèmes racinaires ou mimant la rhizosphère pour la croissance directe ou indirecte de plantes modèles (développement racinaire, solubilisation de minéraux, inhibition de pathogènes). Nous comparerons pour ces différentes fonctions l'effet synergique potentiel de la population par rapport aux souches seules.

Résultats marquants —

- Un **inventaire complet des éléments conjugatifs** a été réalisé : plusieurs méthodes bio-informatiques basées sur la recherche d'étiquettes (profils HMM, Blast) ou encore d'outils dédiés (IceScreen produit au laboratoire) ont révélé la présence de 51 éléments pouvant être regroupés en 19 familles distinctes (sur la base de l'étiquette TraB). Aucun des éléments n'est partagé par l'ensemble des individus, et 14 d'entre eux ne sont présents que chez un individu. En outre 8 éléments défectifs (dépourvus de l'un des gènes étiquettes) ont été caractérisés. L'ensemble montre que les éléments sont très dynamiques au sein de la rhizosphère.

- **La population de *Streptomyces* n'est pas panmictique.** Une cartographie des souches séquencées capables de conjuguer entre elles (121 couples) a été réalisée. Quinze des 110 croisements sont visiblement productifs (formation de *pocks*) avec des efficacités de transfert variables (entre 20% et 100%, c'est-à-dire qu'entre 20 et 100% des donneuses forment un *pock*). Il semble qu'il existe des barrières au transfert au sein de la population ; barrières de transfert ou de maintien de l'ADN acquis ? L'analyse des génomes se poursuit pour rechercher des fonctions potentiellement impliquées dans ces barrières (systèmes restriction-modification, CRISPR, ...).

- **Identification d'ICE (*Integrative and conjugative element*).** Alors que les éléments conjugatifs caractéristiques des actinomycètes sont dépendants d'une protéine TraB unique pour leur transfert, nous avons identifié 2 éléments de type T4SS dépendant appelé ICE pour *Integrative and conjugative element* ; l'un plasmidique, l'autre chromosomique. Nous avons marqué et étudié l'élément chromosomique : il s'excise du chromosome montrant son caractère fonctionnel, mais aucun transfert n'a été détecté dans nos conditions expérimentale.

- **Transfert conjugatif massif d'ADN.** Différents couples de conjugaison productifs ont été sélectionnés et les souches donneuses et receveuses différenciellement marquées afin de mesurer l'ampleur du transfert de marqueur chromosomique lors du transfert conjugatif. La formation de recombinants a été obtenue à des fréquences de l'ordre de 10^{-5} (par donneuse) ; des recombinants sont en cours de validation pour un séquençage complet. Les résultats sont en cours d'exploitation. Cependant, l'analyse du génome des premiers recombinants (n=12) par la recherche des SNP (Single Nucleotide Polymorphism) spécifiques de l'une et l'autre des souches parentales le long du chromosome, permet de conclure à des transferts massifs d'ADN chromosomique entre une souche possédant un élément conjugatif et une souche qui en est dépourvue. Ainsi, dans le croisement étudié, le somme de la taille des fragments du génome de la donatrice identifiés dans le génome des recombinants varie entre 2% et 20%, soit entre 217 kb et 2190 kb, répartis entre 3 et 20 fragments d'ADN de taille significative (seuil utilisé, 1 kb). Ce phénomène rappelle la DCT, Distributive Conjugative Transfer, mise en évidence chez les Mycobactéries (Gray *et al.*, 2018), mais avec une ampleur exceptionnelle.

Principales conclusions incluant des points-clés de discussion —

Le système biologique original constitué par la population environnementale de *Streptomyces* est idéal pour tester plusieurs hypothèses sur les transferts dans le sol.

Un **premier article a été publié dans *Frontiers in Microbiology*** 'Prevalence and mobility of Integrative and Conjugative Elements within a *Streptomyces* natural population' Choufa C, Tidjani AR, Gauthier A, Harb M, Lao J, Leblond-Bourget N, Vos M, Leblond P, Bontemps C. *Front Microbiol.* 2022 Sep 13;13:970179. doi: 10.3389/fmicb.2022.970179. PMID: 36177458; PMCID: PMC9513070.

Nous travaillons également à l'exploitation des résultats de génomique comparée sur les transferts d'ADN chromosomique accompagnant celui d'éléments conjugatifs. Ces transferts trans sont massifs et n'avaient jamais été révélés autrement que par la génétique formelle par David Hopwood (1970).

Nous envisageons de publier ces données dans un journal de grande audience compte tenu de l'originalité et du caractère spectaculaire de ces flux d'ADN. Aucun transfert de cette ampleur n'a été décrite depuis celle accompagnant le transfert du facteur F chez *Escherichia coli*, décrit dans les années 1960 par F. Jacob et William Hayes.

L'article s'intitule 'Chromosome mosaicism results from conjugative transfer in *Streptomyces*' Choufa C., Leblond H., Gauthier A., Vos M., Bontemps C., Leblond P. Une première version de l'article sera publiée sous peu dans bioRxiv.

Perspectives —

La situation sanitaire a considérablement perturbé le déroulement des expériences, notamment le confinement de mars 2020 a entraîné la perte de matériel (souches en cours de construction), et le fonctionnement dégradé des laboratoires depuis la sortie du confinement ne favorise pas l'animation de la thèse. Enfin, le développement actuel de l'épidémie a réorienté les moyens de séquençage haut débit de la plate-forme de l'Institut Pasteur (IntegraGen) vers le séquençage des variants du covid-19 induisant un retard additionnel probable dans l'acquisition des données.

La collaboration avec Claire Fourrey (IAM) afin de tester l'influence potentielle de l'arbre (peuplier) sur les transferts et réciproquement l'impact des *Streptomyces* sur leur croissance est toujours un objectif du projet. La situation sanitaire a décalé cet objectif vers la fin du travail expérimental. *In fine*, ce projet permettra de mieux comprendre les interconnexions existantes entre les arbres et leur microbiote, paramètre crucial pour l'homéostasie de l'écosystème forestier et sa résilience.

La thèse de Caroline Choufa a pu se poursuivre en 5^{ème} année grâce à un poste d'ATER en microbiologie. Les travaux de Caroline, ont fait l'objet de plusieurs communications dans des congrès nationaux et internationaux, et une première publication est publiée, une seconde en cours de rédaction. La soutenance est prévue au plus tard à la fin de l'année universitaire 2023.

Gray TA, Derbyshire KM. Blending genomes: distributive conjugal transfer in mycobacteria, a sexier form of HGT. *Mol Microbiol.* 2018 Jun;108(6):601-613.

Tidjani A-R, Lorenzi J-N, Toussaint M, van Dijk E, Naquin D, Lespinet O, Bontemps C, Leblond P. 2019. Massive Gene Flux Drives Genome Diversity between Sympatric *Streptomyces* Conspecifics. *mBio* 10.

Tidjani A-R, Lorenzi J-N, Toussaint M, van Dijk E, Naquin D, Lespinet O, Bontemps C, Leblond P. 2019. Massive Gene Flux Drives Genome Diversity between Sympatric *Streptomyces* Conspecifics. *mBio* 10.

Valorisation (scientifique : publications, chapitre d'ouvrage, présentation lors de conférences, ... signaler d'éventuels prix) ; **économique** : enveloppe Soleau, brevet, licence, ... ; **diffusion** : communiqué de presse, interview, ...)

Articles :

Choufa C, Tidjani AR, Gauthier A, Harb M, Lao J, Leblond-Bourget N, Vos M, Leblond P, Bontemps C. Prevalence and mobility of integrative and conjugative elements within a *Streptomyces* natural population. *Front Microbiol.* 2022 Sep 13;13:970179. doi: 10.3389/fmicb.2022.970179. PMID: 36177458; PMCID: PMC9513070.

Choufa C., Leblond H., Gauthier A., Vos M., Bontemps C., Leblond P. Chromosome mosaicism results from conjugative transfer in *Streptomyces*'. bioRxiv. En preparation.

Présentation orale

Caroline Choufa, Abdoul Razak Tidjani, Michiel Vos, Cyril Bontemps, Pierre Leblond. Diversité et mobilité des éléments conjugatifs au sein d'une population de *Streptomyces* issue d'un micro-habitat rhizosphérique. 15ème congrès de la Société Française de Microbiologie, Sep 2019, Paris, France.

Caroline Choufa, Abdoul Razak Tidjani, Michiel Vos, Cyril Bontemps, Pierre Leblond. Diversity and mobility of Integrative and Conjugative Elements in a population of *Streptomyces* from a rhizospheric micro-habitat. Actino 2020. 7 & 8 dec. 2020.

Poster

Caroline Choufa, Abdoul Razak Tidjani, Claire Veneault-Fourrey, Michiel Vos, Cyril Bontemps, Pierre Leblond. Interplay between lateral gene transfer and rhizosphere functioning. Functional Ecology Conference. Nancy, France Dec 2018.

Effet levier du projet

Ce projet permet au laboratoire Dynamic d'étendre son champ de compétences en génétique et évolution bactériennes dans un cadre plus écologique et d'orienter notre recherche vers le fonctionnement de l'écosystème forestier. Il a permis dans ce sens d'initier une nouvelle collaboration avec le laboratoire laM pour voir notamment les interactions existant entre les arbres et leur microbiote. Que ce soit au niveau fondamental, voire avec des applications potentielles en lien avec la santé de l'arbre, ce projet devrait permettre d'apporter des pistes pour mieux comprendre l'homéostasie de l'écosystème forestier.

Le projet GENTHRI est également la base d'une collaboration durable (initiée en 2017) avec Michiel Vos de l'Université d'Exeter, expert reconnu en génomique évolutive et environnementale. Une publication commune a été réalisée en 2022. D'autres publications conjointes dont une revue sont en cours de rédaction.

Sur la base de notre travail commun, nous avons intégré un projet de réseau doctoral Marie Curie avec M. Vos comme collaborateur. Le projet de réseau a été déposé en novembre 2022.