

Titre : Utiliser le génie génétique pour quantifier l'étendue de l'épistasie génomique chez les clones de *Escherichia Coli*

Résumé: L'Organisation mondiale de la santé (OMS) considère l'augmentation spectaculaire de la résistance aux antibiotiques comme une menace majeure pour la santé publique. À cet égard, l'espèce *Escherichia coli* joue un rôle important. Cette espèce est commensale de l'intestin des vertébrés, mais c'est aussi un pathogène polyvalent impliqué dans des maladies intra et extra-intestinales. Elle entraîne la mort d'environ un million de personnes par an, avec des souches de plus en plus résistantes aux antibiotiques. De manière surprenante, bien que les approches génomiques et expérimentales aient révélé que la résistance aux antibiotiques peut se propager très efficacement par le transfert de plasmides ou les échanges génétiques, la résistance aux antibiotiques chez *E. coli* n'est pas distribuée de manière aléatoire dans l'espèce et est principalement associée à quelques clones tels que le clone à succès ST131. Cela soulève une question générale : comment les clones dans les espèces d'*E. coli* émergent, acquièrent et maintiennent certaines spécificités étant donné le taux élevé d'échanges génétiques que nous observons ?

Une explication possible pour expliquer le maintien de clones présentant certaines spécificités phénotypiques est que les fonctions à l'origine de ces spécificités ne reposent pas sur des gènes ou des mutations uniques mais sur des combinaisons de gènes/mutations en interaction. Comme les différents éléments à l'origine de la fonction sont répartis sur le chromosome, ils ne peuvent pas être facilement transférés d'un clone à l'autre. Comme ce phénomène, que nous nommons l'épistasie génomique, semble émerger assez rapidement en laboratoire au cours de l'évolution expérimentale, l'objectif de cette thèse était de développer des outils pour étudier l'épistasie génomique.

Pour étudier ces interactions génétiques, une étape essentielle consiste à perturber ou à réassembler la combinaison de mutations/gènes qui interagissent ensemble pour permettre la pleine expression d'une fonction. Ceci peut être réalisé en imposant l'échange de matériel génétique entre des souches divergentes d'*E. coli*. J'ai donc développé une méthodologie pour réaliser à haut débit en laboratoire des croisements génétiques entre des souches d'*E. coli*. La méthode repose sur plusieurs étapes pour assurer l'insertion d'un plasmide conjugatif à une position aléatoire du chromosome et le transfert ultérieur de matériel génétique par conjugaison. Les différentes méthodologies que j'ai développées m'ont permis de montrer que l'utilisation de CRISPR/cas9 pour assister l'intégration du plasmide pouvait améliorer considérablement l'efficacité du processus.

En utilisant le transfert d'un marqueur sélectif, j'ai pu étudier la diversité des fragments recombinés dans le génome des souches réceptrices. Une impressionnante diversité de longueur a été observée avec des fragments allant de quelques kilobases à une mégabase. Il est intéressant de noter que cette distribution de taille dépendait du fond génétique des souches réceptrices, ce qui suggère un rôle de la modification par restriction qui reste à tester.

Les outils que j'ai développés vont maintenant permettre de quantifier la contribution de l'épistasie génomique à l'émergence de clones dans l'espèce *E. coli* et pourraient également être utilisés pour les biotechnologies afin d'améliorer les souches. A long terme, cela permettra de mieux comprendre l'émergence et la propagation des clones de résistance aux antibiotiques dans une espèce préoccupante à cet égard.

Mots clefs : recombinaison, ingénierie génétique, CRISPR cas 9, conjugaison bactérienne.

Title: Using genetic engineering to quantify the wide genome epistasis in *Escherichia coli* clones

Abstract: The World Health Organization considers the dramatic increase of antibiotic resistance as a major threat for public health. In that regard, *Escherichia coli* species plays an important role. This species is a commensal of the gut of vertebrates but is also a versatile pathogen involved in intra and extra-intestinal diseases. It leads to the death of about one million person per year involving more and more antibiotic resistant strains. Surprisingly, though genomic and experimental approaches have revealed that antibiotic resistance can spread very efficiently through plasmid transfer or genetic exchanges, antibiotic resistance in *E. coli* is not distributed randomly in the species and is dominantly associated with a few clones such as the successful clone ST131. This raises a general question: how clones in *E. coli* species emerge, acquire and maintain some specificities given the high rate of genetic exchanges we observe?

One possible explanation for the maintenance of clone with some phenotypic specificities is that the functions making these specificities rely not on single genes or mutations but on combinations of interacting genes/mutations. As the various elements at the source of the function are spread on the chromosome, they cannot easily be transferred from one clone to another. As this phenomenon, we name Genome Wide Epistasis (GWE), seem to emerge quite rapidly in the laboratory during experimental evolution, the objective of this PhD was to develop tools to study GWE.

To study these genetic interactions an essential step is to disrupt or reassemble the combination of mutations/gene that interact together to allow the full expression of a function. This can be achieved by enforcing exchange of genetic material between diverged strains of *E. coli*. I therefore developed a methodology to perform with high throughput in the laboratory some genetic crosses between strains of *E. coli*. The method relies on multiple steps to ensure the insertion of a conjugative plasmid at a random position of the chromosome and the later transfer of genetic material through conjugation. The different methodologies I developed allowed me to show that the use CRISPR/cas9 to assist the integration of the plasmid could dramatically improve the efficiency of the process.

Using the transfer of a selective marker, I could study the diversity of fragments recombined in the genome of the recipient strains. An impressive diversity of length was observed with fragments ranging from a few kilobases to a whole megabase. Interestingly, this size distribution depended on the genetic background of the recipient strains suggesting a role of restriction modification that remains to be tested.

The tools I have developed will now allow to quantify the contribution of genome wide epistasis to the emergence of clones in the *E. coli* species and could also be used for biotechnologies to improve strains. In the long term, it will provide a better understanding of the emergence and propagation of antibiotic resistance clones in a worrying species in that regard.

Key words: recombination – genetic engineering – CRISPR cas 9 – bacterial conjugation