



HAL
open science

Construction d'un châssis bactérien viable, minimal et non pathogène grâce aux outils de biologie de synthèse

Estelle Ruiz

► To cite this version:

Estelle Ruiz. Construction d'un châssis bactérien viable, minimal et non pathogène grâce aux outils de biologie de synthèse. Génétique. Université de Bordeaux, 2019. Français. NNT : 2019BORD0132 . tel-02454257

HAL Id: tel-02454257

<https://theses.hal.science/tel-02454257>

Submitted on 24 Jan 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ MICROBIOLOGIE - IMMUNOLOGIE

Par Estelle RUIZ

**Construction d'un châssis bactérien viable, minimal et non
pathogène grâce aux outils de biologie de synthèse**

Sous la direction de Carole LARTIGUE et Yonathan ARFI

Unité Mixte de Recherche 1332 Biologie du Fruit et Pathologie
INRA – Bordeaux

Soutenue le 16 Septembre 2019

Membres du jury :

Mme BEBEAR, Cécile, PU-PH à l'Université de Bordeaux
M. FREY, Joachim, Professeur à l'Université de Berne, Suisse
Mme TARDY, Florence, Directeur de Recherche à l'Anses de Lyon
M. DOIGNON, François, Professeur à l'Université de Bordeaux
Mme PLANSON, Anne-Gaëlle, Chargée de Recherche à l'INRA de Jouy-en-Josas
M. ARFI, Yonathan, Maître de Conférences à l'Université de Bordeaux
Mme LARTIGUE, Carole, Chargée de Recherche à l'INRA de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Invité
Directeur de thèse

Construction d'un châssis bactérien viable, minimal et non pathogène grâce aux outils de biologie de synthèse

Un des objectifs de la biologie de synthèse est de concevoir et produire des organismes « à façon », pour des applications thérapeutiques et industrielles. Une des voies envisagées pour atteindre cet objectif repose sur des techniques de synthèse et de transplantation de génomes entiers, afin de créer des organismes mutants.

Le but de cette thèse est de développer des outils de biologie de synthèse qui permettront de construire une cellule minimale et non pathogène, à partir de *Mycoplasma pneumoniae*. Cette bactérie est l'un des plus petits organismes vivants, avec une taille inférieure au micron et un génome de 816 kpb. Ce mycoplasme est l'un des plus étudiés, avec une collection de données génétiques et multi-« omiques » disponibles. Ces caractéristiques font de cette cellule naturellement « quasi minimale » un point de départ idéal pour la construction d'un châssis bactérien. Néanmoins, la manipulation génétique de ce mycoplasme est difficile, en raison du nombre restreint d'outils disponibles.

Une approche récemment développée propose de contourner ces limitations en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme plateforme d'ingénierie du génome de *M. pneumoniae*. L'étape préliminaire à cette approche consiste à cloner le génome bactérien dans la levure. Pour ce faire, une cassette « éléments levure » est insérée dans le génome de *M. pneumoniae*, pour permettre son maintien comme chromosome artificiel. Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'insérer cette cassette par le biais d'un transposon, et de cloner ce génome marqué dans la levure. La stabilité du génome cloné a ensuite été étudiée, mettant en évidence que le chromosome bactérien est maintenu durant une dizaine de passages. Nous avons ensuite développé une nouvelle stratégie d'insertion des « éléments levure » en utilisant le système CRISPR-Cas9 pour cloner et éditer simultanément un génome de mycoplasme chez la levure : le CREasPy-cloning. Cette méthode a été utilisée pour supprimer trois loci différents contenant des gènes impliqués dans la virulence : *mpn372* (toxine CARDS), *mpn142* (protéine de cytoadhérence) et *mpn400* (protéine bloquant les IgG). Elle a ensuite été utilisée pour en cibler deux puis trois en une seule étape.

Une fois le clonage et l'ingénierie du génome bactérien réalisés dans la levure, il est nécessaire de pouvoir transférer le chromosome modifié dans une cellule receveuse, afin de produire une cellule mutante. Ce processus nommé transplantation de génome n'étant pas décrit pour *M. pneumoniae*, une part importante de cette thèse a été dédiée au développement de cet outil. Nous avons utilisé la transformation de plasmides comme mécanisme modèle pour étudier le processus d'entrée de l'ADN dans *M. pneumoniae* et tester l'utilisation du polyéthylène glycol, le réactif clé de la transplantation. Bien qu'ayant réussi à mettre au point un protocole de transformation de plasmides, nous n'avons pas réussi pour l'instant à réaliser la transplantation de génomes.

En parallèle, nous avons développé une stratégie alternative d'édition de génome qui ne dépend pas de la transplantation. Cette approche, nommée « Genomic Transfer - Recombinase-Mediated Cassette Exchange » (GT-RMCE), consiste à capturer dans un vecteur une section du génome bactérien édité présent dans la levure. Ce vecteur est transformé dans *M. pneumoniae*, et grâce au système Cre-Lox la section éditée est introduite dans le génome. Ce mécanisme permet de réaliser des modifications de grande ampleur, et est actuellement utilisé pour introduire chez *M. pneumoniae* les délétions $\Delta mpn372$, $\Delta mpn400$ et $\Delta mpn372\text{-}\Delta mpn400$ produites par CREasPy-cloning. Nous avons également utilisé le GT-RMCE pour générer une souche de *M. pneumoniae* portant deux copies de l'opéron ribosomal *s10*.

Au final, les outils d'ingénierie du génome de *M. pneumoniae* développés au cours de cette thèse permettent de réaliser un pas significatif vers la construction de nouveaux châssis bactériens.

Mots clés : *Mycoplasma pneumoniae*, Biologie de synthèse, Châssis bactérien, Ingénierie de génomes, CRISPR-Cas9

Construction of a viable, minimal and non-pathogenic bacterial chassis with synthetic biology tools

A goal of synthetic biology is to create and produce “custom” organisms, for therapeutic and industrial applications. One of the contemplated approaches to achieve this goal is based on synthesis techniques and transplantation of whole genomes, in order to create mutant organisms.

The aim of this thesis is to develop synthetic biology tools that will enable the construction of a minimal and non-pathogenic cell based on *Mycoplasma pneumoniae*. This bacterium is one of the smallest living organisms, with a size smaller than one micron and a genome of 816 kbp. This mycoplasma is one of the most studied, with a large set of genetic and multi- “omics” data available. These characteristics make this naturally “almost minimal” cell an ideal starting point for the construction of a bacterial chassis. Nevertheless, the genetic manipulation of this mycoplasma is difficult, due to the limited number of available tools.

A recently developed approach offers the possibility to circumvent these limitations by using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a genome engineering platform for *M. pneumoniae*. The preliminary step to this strategy is to clone the bacterial genome in yeast. To do so, a "yeast elements" cassette is inserted into the genome of *M. pneumoniae*, to allow its maintenance as an artificial chromosome. The work carried out during this thesis allowed us to insert this cassette through a transposon, and to clone this marked genome in yeast. Then, the stability of the cloned genome was studied, demonstrating that the bacterial chromosome is maintained during ten passages. We then developed a new strategy for the insertion of the "yeast elements", using the CRISPR-Cas9 system to simultaneously clone and edit a mycoplasma genome in yeast: the CREasPy-cloning. This method was used to remove three different loci containing genes involved in virulence: *mpn372* (CARDS toxin), *mpn142* (cytoadherence protein) and *mpn400* (IgG blocking protein). This method was also used to target two and then three different loci in one step.

Once in-yeast cloning and bacterial genome engineering is achieved, it is necessary to transfer the modified chromosome into a recipient cell, to produce a mutant organism. This process, called genome transplantation, is not described for *M. pneumoniae*, so a significant part of this thesis was dedicated to the development of this tool. We used plasmid transformation as a model mechanism to study the process of DNA entry into *M. pneumoniae* and to test the use of polyethylene glycol, the key reagent for transplantation. Although we succeeded in developing a plasmid transformation protocol, we have not yet been able to perform genome transplantation.

Concurrently, we have developed an alternative strategy for genome editing that does not depend on transplantation. This approach, named "Genomic Transfer - Recombinase-Mediated Cassette Exchange" (GT-RMCE), is used to capture in a vector a section of the edited bacterial genome borne by the yeast. This vector is then transformed into *M. pneumoniae*, and through to the Cre-Lox system the edited section is introduced into the genome. This mechanism allows to carry out large-scale modifications, and is currently used to introduce into *M. pneumoniae* the $\Delta mpn372$, $\Delta mpn400$ and $\Delta mpn372\text{-}\Delta mpn400$ deletions produced by CREasPy-cloning. We also used the GT-RMCE to generate a strain of *M. pneumoniae* carrying two copies of the *s10* ribosomal operon.

Overall, the *M. pneumoniae* genome engineering tools developed during this thesis constitute a significant step towards the construction of new bacterial chassis.

Keywords: *Mycoplasma pneumoniae*, Synthetic biology, Bacterial chassis, Genomic engineering, CRISPR-Cas9

UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie - Equipe Mollicutes
Centre INRA Bordeaux-Aquitaine, Bâtiment IBVM
71 Avenue Edouard Bourlaux, CS 20032
33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

REMERCIEMENTS

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans l'Unité Mixte de Recherche 1332 Biologie du Fruit et Pathologie (Institut National de la Recherche Agronomique et Université de Bordeaux), dans l'équipe Mollicutes dirigée par M. Alain Blanchard puis par M. Pascal Sirand-Pugnet, sous la direction de Carole Lartigue et de Yonathan Arfi.

Je tiens tout d'abord à remercier M. Alain Blanchard pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son laboratoire.

Je remercie Mme Cécile Bébéar de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je souhaite remercier M. Joachim Frey et Mme Florence Tardy pour avoir accepté d'examiner et de juger ce manuscrit.

Je remercie également M. François Doignon et Mme Anne-Gaëlle Planson d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je voudrais adresser un remerciement tout particulier à Mme Carole Lartigue, pour m'avoir accompagnée durant ces années de thèse. Merci infiniment pour le savoir que tu m'as transmis, pour le temps que tu as pu m'accorder à chaque instant de cette aventure. Merci pour ta confiance, ta patience, ta compréhension et ton soutien. Merci pour toutes ces discussions passionnantes que nous avons eues, qu'elles soient professionnelles ou plus personnelles. Je suis très fière d'avoir pu me former à tes côtés, et je souhaite pouvoir le faire encore aussi longtemps que possible.

Je remercie très sincèrement M. Yonathan Arfi pour avoir participé à l'encadrement de ma thèse. Merci pour ta pédagogie et ton dynamisme. Merci d'être toujours là pour répondre à mes questions et d'être toujours prêt à rendre service. Je suis également très fière d'avoir pu apprendre à tes côtés.

Je tiens également à remercier M. Pascal Sirand-Pugnet pour sa bienveillance et son implication. Merci pour l'intérêt que tu as porté à nos travaux durant ces années de thèse.

Un grand merci à M. Luis Garcia-Morales, pour m'avoir fait participer à de nombreuses expériences passionnantes. Merci pour ta gentillesse et ta confiance. Merci d'avoir partagé ton savoir et ta pédagogie.

Merci également à Mme Yanina Veronica Valverde Timana pour toute l'aide que tu as pu m'apporter au laboratoire. Merci pour tous ces moments de complicité que nous avons pu partager autour du centre de nos préoccupations... *Mycoplasma pneumoniae* !

Je remercie du fond du cœur toute l'équipe Mollicutes, une équipe géniale, au top !!! Merci de faire du laboratoire un endroit où on l'on vient travailler avec plaisir. Merci à Marie-Pierre pour toute l'aide que tu as pu m'apporter, pour ta bonne humeur et ta gentillesse, pour toutes nos petites discussions pendant les expériences de transformation de levure. Merci à Sybille de prendre soin de nous et veiller à notre sécurité. Merci à Christophe pour tous les échanges que nous avons pu avoir, et pour avoir participé à la confection de cookies multicolores !

J'adresse mes remerciements chaleureux à Géraldine pour tellement de choses. Merci pour ton soutien et ta gentillesse. Merci pour ton amitié. Merci pour toute l'aide que tu as pu m'apporter sur le plan scientifique, mais aussi sur le plan personnel.

Un remerciement spécial également pour Laure, pour ton soutien sans faille chaque jour de ces derniers mois d'écriture. Merci pour ton punch et ta bienveillance.

Merci à Vincent T. pour tous ces bons moments passés ensemble. Merci pour toutes les expériences que tu m'as montré au laboratoire. Merci aussi pour le temps que nous avons partagé en dehors du laboratoire, pour toutes les discussions que nous avons pu avoir, sur tout et sur rien, pour les barbecues, l'escalade et les balades canines.

Merci également à mes compagnons thésards, Thomas (un super collègue de bureau), Gabrielle et Claudia. Je vous souhaite plein de courage et de réussite. Je suis certaine que vous allez briller !

Merci à Fabien pour ta joie de vivre communicative et ton aide. Merci pour tous les conseils que tu as pu me donner. J'ai hâte de faire équipe avec toi pour les mois à venir !

Merci à Mamadou, Vincent B. et Flavie pour vos sourires et votre gentillesse.

Merci à Martine, Annie, Isabelle et Laurence pour toute l'aide que vous pouvez nous apporter au quotidien.

Merci à Suzanne pour toutes les petites pauses quotidiennes du soir, qui m'ont permises de m'aérer la tête durant quelques minutes au cours de ce travail de rédaction.

Enfin, je souhaiterais remercier toute ma famille. Je remercie mes parents, Didier et Anne, je leur suis reconnaissante de m'avoir permis d'en arriver là. J'espère vous rendre fiers. Un grand merci à mes frères et sœurs, Camille, Charlotte et Valentin, pour avoir toujours cru en moi, et pour l'intérêt que vous avez pu porter à mon travail. Merci pour votre soutien. Merci à mes grands-parents pour leur soutien, et leur volonté de comprendre notre recherche.

Une dernière fois, je remercie chaleureusement toutes les personnes que j'ai côtoyées durant cette thèse.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	- 2 -
TABLE DES MATIERES.....	- 6 -
AVANT PROPOS	- 12 -
CONTEXTE DES TRAVAUX REALISES	- 12 -
LE PROJET MINICELL.....	- 12 -
LE PROJET MYCOSYNVAC	- 13 -
LE LABORATOIRE D'ACCUEIL.....	- 14 -
OBJECTIFS DE LA THESE.....	- 16 -
ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES.....	- 21 -
1. GENERALITES SUR LES MYCOPLASMES.....	- 21 -
1. 1. Classification phylogénétique.....	- 21 -
1. 2. Classification taxonomique.....	- 23 -
1. 3. Evolution.....	- 23 -
1. 4. Habitat	- 24 -
1. 5. Structure	- 26 -
1. 6. Génome	- 26 -
1. 7. Les mycoplasmes comme organismes modèles	- 27 -
2. MYCOPLASMA PNEUMONIAE	- 27 -
2. 1. Epidémiologie et manifestations cliniques.....	- 29 -
2. 2. Caractéristiques génétiques	- 30 -
2. 3. Facteurs de virulence.....	- 34 -
2. 3. 1. Adhérence cellulaire.....	- 36 -
2. 3. 2. Toxine CARDS	- 38 -
2. 3. 3. Peroxyde d'hydrogène	- 40 -
2. 3. 4. Sulfure d'hydrogène.....	- 42 -
3. OUTILS GENETIQUES DISPONIBLES CHEZ MYCOPLASMA PNEUMONIAE.....	- 43 -
3. 1. Transformation.....	- 43 -
3. 2. Mutagenèse aléatoire par transposition	- 44 -
3. 3. Mutagenèse dirigée.....	- 46 -
3. 3. 1. Mutagenèse dirigée en utilisant un plasmide suicide	- 48 -
3. 3. 2. Mutagenèse dirigée en utilisant un plasmide réplcatif	- 50 -
4. OUTILS DE BIOLOGIE DE SYNTHÈSE POUR LA MODIFICATION DE GENOMES BACTERIENS.....	- 51 -

4. 1. La biologie de synthèse	- 51 -
4. 1. 1. Cellule minimale.....	- 53 -
4. 1. 2. Châssis bactérien.....	- 56 -
4. 2. Outils d'édition des génomes bactériens	- 57 -
4. 2. 1. Les systèmes lambda Red et RecET	- 59 -
4. 2. 2. Le système Cre-Lox.....	- 61 -
4. 2. 3. Le système CRISPR-Cas.....	- 63 -
4. 2. 3. 1. CRISPR-Cas : un système immunitaire naturel procaryote.....	- 65 -
4. 2. 3. 2. CRISPR-Cas : un outil d'ingénierie génomique	- 69 -
4. 3. Outils d'édition des génomes de mycoplasmes	- 70 -
4. 3. 1. Techniques de clonage des génomes de mycoplasme dans la levure.....	- 74 -
4. 3. 1. 1. Transformation dans la levure d'un génome bactérien pré-marqué par transposition... - 74 -	
4. 3. 1. 2. TAR cloning	- 75 -
4. 3. 1. 3. Fusion cellulaire bactérie-levure	- 77 -
4. 3. 2. Techniques d'ingénierie des génomes de mycoplasmes clonés dans la levure	- 79 -
4. 3. 2. 1. La méthode TREC	- 79 -
4. 3. 2. 2. La méthode TREC-IN	- 81 -
4. 3. 2. 3. La méthode CRISPR-Cas9	- 83 -
4. 3. 3. Transplantation des génomes de mycoplasmes dans une cellule receveuse.....	- 84 -

MATERIELS ET METHODES - 88 -

1. SOUCHES ET CONDITIONS DE CULTURE.....	- 88 -
1. 1. <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	- 88 -
1. 2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- 88 -
1. 3. <i>Escherichia coli</i>	- 89 -
2. BIOLOGIE MOLECULAIRE.....	- 91 -
2. 1 Plasmides.....	- 91 -
2. 1. 1. Plasmides commerciaux ou précédemment développés.....	- 91 -
2. 1. 2. Plasmides développés au cours de ces travaux.....	- 95 -
2. 1. 3. Mini-préparation de plasmides	- 103 -
2. 1. 4. Midi-préparation de plasmides	- 105 -
2. 1. 5. Séquençage Sanger des plasmides.....	- 105 -
2. 2. Réaction en chaîne par polymérase (PCR).....	- 107 -
2. 2. 1. PCR Simplex.....	- 107 -
2. 2. 2 PCR multiplex	- 108 -
2. 3. Production des matrices de recombinaison (« pansements »)	- 110 -
2. 3. 1. Pansements ARS-CEN-HIS-PSpuro et CEN-HIS-PSpuro	- 110 -
2. 3. 2. Pansements de 90 pb	- 110 -
2. 3. 3. Pansements de 1 kb	- 112 -
2. 4. Purification des ADN à partir des réactions enzymatiques	- 112 -

2. 5. Restriction enzymatique des ADN	- 113 -
2. 6. Quantification de l'ADN	- 113 -
2. 7. Electrophorèse sur gel d'agarose	- 113 -
2. 8. Extraction d'ADN génomique de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	- 114 -
2. 8. 1. Extraction au phénol-chloroforme	- 114 -
2. 8. 2. Extraction avec le kit « MagAttract HMW DNA » (Qiagen)	- 115 -
2. 8. 3. Extraction avec le kit « NucleoBond® AXG Columns – Buffer Set III » (Macherey -Nagel)	- 115 -
2. 8. 4. Extraction rapide	- 115 -
2. 9. Extraction d'ADN génomique de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- 116 -
2. 10. Préparation d'ADN génomique en blocs d'agarose	- 116 -
2. 10. 1. Blocs d'agarose contenant l'ADN de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- 117 -
2. 10. 2. Blocs d'agarose contenant l'ADN de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	- 118 -
2. 11. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)	- 119 -
2. 11. 1. PFGE des chromosomes de <i>S. cerevisiae</i> contenant un génome cloné de <i>M. pneumoniae</i> ..	- 119 -
2. 11. 2. PFGE des chromosomes de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	- 121 -
2.12 Digestion <i>in vitro</i> par la nucléase Cas9 de génomes bactériens inclus dans des blocs d'agarose	- 121 -
3. TRANSFORMATIONS MICROBIENNES	- 122 -
3. 1. Transformation de <i>Escherichia coli</i>	- 122 -
3. 1. 1. Transformation par électroporation	- 122 -
3. 1. 2. Transformation par choc thermique	- 122 -
3. 2. Transformation de <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	- 123 -
3. 2. 1. Transformation par électroporation	- 123 -
3. 2. 2. Transformation au PEG	- 123 -
3. 2. 3. Analyse des transformants de <i>M. pneumoniae</i>	- 124 -
3. 3. Transformation de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- 125 -
3. 3. 1. Transformation par le Lithium Acétate/ADN simple brin/PEG	- 125 -
3. 3. 2. Transformation de sphéroplastes par le PEG	- 126 -

**RESULTATS - CHAPITRE 1 : CLONAGE ET INGENIERIE DU GENOME DE M.
PNEUMONIAE DANS LA LEVURE** - 130 -

1. TRANSFORMATION DANS LA LEVURE D'UN GENOME BACTERIEN PRE-MARQUE	- 131 -
1. 1. Obtention des transformants levure contenant le génome de <i>M. pneumoniae</i>	- 133 -
1. 2. Analyse de la stabilité du génome de <i>M. pneumoniae</i> cloné dans la levure	- 139 -
2. CLONAGE CREASPY	- 143 -
2. 1. Clonage et édition d'un <i>locus</i> unique : CReasPy-cloning single target	- 145 -
2. 1. 1. Obtention des mutants « single target »	- 147 -
2. 1. 2. Utilisation d'un « pansement » sans séquence ARS	- 149 -

2. 1. 3. Détermination du nombre d'éléments génétiques pouvant être co-transformés en CReasPy-cloning	- 156 -
2. 1. 4. Conclusion	- 158 -
2. 2. Clonage et édition de plusieurs <i>loci</i> : CReasPy-cloning multiple target.....	- 158 -
2. 2. 1. Optimisation du protocole	- 159 -
2. 2. 2. Obtention des mutants « double target » et « triple target ».....	- 170 -
2. 2. 3. Conclusion	- 172 -
2. 3. CReasPy-cloning <i>in vitro</i>	- 178 -
3. DISCUSSION	- 179 -

**RESULTATS - CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE DE
TRANSPLANTATION DU GENOME DE *M. PNEUMONIAE* DANS UNE CELLULE RECEVEUSE..... -
185 -**

1. DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE DE TRANSFORMATION DE <i>M. PNEUMONIAE</i> AU PEG ...	- 185 -
1. 1. Optimisation de la culture de <i>M. pneumoniae</i> »	- 190 -
1. 1. 1. Conditions de culture	- 190 -
1. 1. 2. Quantité de cellules	- 192 -
1. 2. Optimisation des tampons de lavage	- 194 -
1. 3. Optimisation du traitement à la trypsine	- 195 -
1. 4. Optimisation de l'incubation dans le chlorure de calcium (CaCl ₂).....	- 198 -
1. 5. Optimisation du traitement au PEG	- 200 -
1. 6. Autres observations.....	- 202 -
1. 7. Protocole optimisé de transformation au PEG.....	- 204 -
2. TRANSPLANTATION DU GENOME DE <i>M. PNEUMONIAE</i>	- 206 -
2. 1. Choix des cellules receveuses et des génomes donneurs potentiels	- 206 -
2. 1. 1. Cellules receveuses	- 206 -
2. 1. 2. Génomes donneurs	- 207 -
2. 2. Essais de transplantation	- 208 -
3. DISCUSSION	- 208 -

**RÉSULTATS - CHAPITRE 3 : GENOMIC TRANSFER – RECOMBINASE-MEDIATED
CASSETTE EXCHANGE.....- 215 -**

1. PRINCIPE GENERAL DU GT-RMCE	- 217 -
2. CAPTURE D'UNE REGION GENOMIQUE DE <i>M. PNEUMONIAE</i> DANS LE VECTEUR PCC1YTRP .	- 218 -
2. 1. Capture de l'opéron <i>s10</i>	- 219 -
2. 1. 1. Contexte	- 219 -
2. 1. 2. Expérience de capture.....	- 220 -
2. 2. Capture de la région <i>mpn372-mpn400</i>	- 224 -

2. 3. Conclusion	- 226 -
3. AMPLIFICATION DU VECTEUR pCC1YTRP-GMR-X-CRE DANS <i>E. COLI</i>	- 227 -
4. TRANSFERT DE LA REGION D'INTERET DANS LE GENOME DE <i>M. PNEUMONIAE</i>	- 227 -
4. 1. Préparation des cellules receveuses : intégration de « landing pads » à proximité de la région à modifier	- 229 -
4. 1. 1. Landing pad pour la duplication de l'opéron ribosomique <i>s10</i>	- 229 -
4. 1. 2. Landing pads pour le remplacement de la région <i>mpn372-mpn400</i>	- 229 -
4. 1. 3. Conclusion	- 231 -
4. 2. Transformation du vecteur pCC1YTRP- <i>gmR-X-cre</i> dans <i>M. pneumoniae</i>	- 231 -
4. 2. 1. Duplication de l'opéron <i>s10</i>	- 231 -
4. 2. 2. Remplacement de la région <i>mpn372-mpn400</i>	- 233 -
4. 2. 3. Conclusion	- 239 -
5. DISCUSSION	- 239 -
DISCUSSION GENERALE.....	- 247 -
1. APPORTS DES OUTILS CREASPY-CLONING ET GT-RMCE A LA BIOLOGIE DE SYNTHESE	- 248 -
1. 1. Construction d'un châssis bactérien minimal	- 249 -
1. 2. Ajout de modules de charge utile à un châssis.....	- 253 -
2. APPORTS DES OUTILS CREASPY-CLONING ET GT-RMCE A LA BIOLOGIE	- 254 -
2. 1. Développement de la génétique inverse chez les mycoplasmes	- 254 -
2. 2. Capture d'ADN génomique d'organismes non-cultivables.....	- 258 -
3. LES BARRIERES POTENTIELLES A LA TRANSPLANTATION DE GENOMES.....	- 258 -
3. 1. Les nucléases membranaires.....	- 260 -
3. 2. Les systèmes de restriction-modification	- 261 -
3. 3. La machinerie de recombinaison.....	- 265 -
3. 4. Le cytosquelette	- 266 -
4. CONCLUSIONS	- 267 -
REFERENCES	- 270 -
ANNEXES	- 294 -
LISTE DES ABBREVIATIONS	- 294 -
COMMUNICATIONS	- 296 -
Publications	- 296 -
Communications lors de congrès	- 296 -

AVANT PROPOS

AVANT PROPOS

CONTEXTE DES TRAVAUX REALISES

Cette thèse a été effectuée dans le cadre de deux projets scientifiques européens : MiniCell (<http://www.minicell.org/>) et MycoSynVac (<https://www.mycosynvac.eu/>). Ces deux projets, qui partagent un certain nombre d'acteurs, de techniques et d'objets scientifiques, visent à construire un châssis bactérien viable, minimal et non pathogène sur la base de *Mycoplasma pneumoniae*. Cependant, les questions posées et les applications souhaitées diffèrent selon les projets, et sont détaillées ci-dessous. L'objectif de cette thèse, à savoir la mise en place d'outils de biologie de synthèse devant permettre la production de ce châssis, est donc un des enjeux majeurs ces deux projets

LE PROJET MINICELL

Le projet MiniCell a été financé par l'ERASynBio (ERA-NET pour la Biologie de Synthèse), un regroupement autonome d'agences de financement internationales travaillant ensemble pour promouvoir le développement de la Biologie de Synthèse et coordonner des programmes de financement. Il a été construit en réponse à l'appel à proposition de 2014 qui s'intitulait « Building Synthetic Biology capacity through innovative transnational projects ».

Ce projet, qui a été mené du mois d'Octobre 2015 au mois de Septembre 2018, regroupait quatre partenaires internationaux : (1) le laboratoire « Center for Regulatory Genomics » (CRG) à Barcelone en Espagne, groupe auquel appartiennent Luis Serrano et Maria Lluch-Senar (coordinateurs du projet) ; (2) l'équipe de Jonathan Karr au Mount Sinai, situé à New York aux Etats-Unis ; (3) l'équipe de Jörg Stülke de l'Université de Göttingen en Allemagne ; et (4) l'équipe d'Alain Blanchard de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), à Villenave d'Ornon en France.

Le projet MiniCell porte le sous-titre suivant : « Une approche guidée par un modèle pour l'ingénierie d'une cellule minimale pour la thérapie médicale ». Il propose de développer le premier modèle cellulaire bio-informatique complet du pathogène pulmonaire humain *M. pneumoniae*, et d'utiliser ce modèle pour concevoir un châssis réduit et non pathogène capa-

-ble de délivrer des molécules actives dans les poumons humains et/ou pouvant être utilisé comme vaccin. Le projet MiniCell est organisé en différents lots, ou « Work Packages » (WP). Le premier WP concerne la construction d'un modèle cellulaire dynamique de *M. pneumoniae*, et l'utilisation de ce modèle pour concevoir intégralement le futur châssis bactérien. L'objectif du WP suivant est de définir de manière expérimentale le génome minimal de *M. pneumoniae*, en étudiant l'essentialité des gènes, puis d'affiner le modèle bio-informatique en y implémentant les informations collectées. Le troisième WP porte sur l'identification des gènes impliqués dans le pouvoir pathogène de *M. pneumoniae*. Enfin, le dernier WP, dans lequel ce projet de thèse s'inscrit, consiste à construire puis tester des souches minimales et non pathogènes, prédites par le modèle bio-informatique, en utilisant des outils de biologie de synthèse.

LE PROJET MYCOSYNVAC

Le projet MycoSynVac bénéficie d'un financement par le programme de recherche et d'innovation de l'Union Européenne Horizon 2020 (H2020). Il a été élaboré en réponse à l'appel à projet « Synthetic biology – construction of organisms for new products and processes » émis par la Commission européenne.

Ce projet s'étale sur une durée de cinq ans, du mois d'Avril 2015 jusqu'au mois de Mars 2020. Il regroupe les huit partenaires européens suivants : (1) le laboratoire « Center for Regulatory Genomics » (CRG) à Barcelone en Espagne, groupe auquel appartiennent Luis Serrano et Maria Lluç-Senar (coordinateurs du projet) ; (2) l'équipe de Peter Sandøe de l'Université de Copenhague (UCPH) au Danemark ; (3) l'équipe de Markus Schmidt de l'entreprise Biofaction, à Vienne en Autriche ; (4) l'équipe de Vitor Martins dos Santos de l'Université de Wageningen aux Pays-Bas ; (5) l'équipe de Hubert Bernauer de l'entreprise ATG:biosynthetics, à Merzhausen en Allemagne ; (6) l'équipe de Mark Isalan de l'Imperial College de Londres, au Royaume-Uni ; (7) l'équipe de Paul Vermeij de l'entreprise MSD Animal Health, à Boxmeer aux Pays-Bas ; et (8) l'équipe d'Alain Blanchard de l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), à Villenave d'Ornon en France.

Ce projet concerne l'ingénierie de *M. pneumoniae* en tant que vaccin animal à large spectre. L'objectif de ce projet est de mettre au point un cycle de travail itératif, basé sur un modèle de cellule entière et s'appuyant sur une gamme d'outils d'édition, dans le but d'élabo-

-rer un châssis bactérien. Ce dernier doit être dépourvu de facteurs de virulence, optimisé pour croître rapidement dans un milieu de culture sans sérum, et permettre l'expression hétérologue d'antigènes provenant d'un ou plusieurs pathogènes (*Mycoplasmes* ou virus), afin de créer un vaccin. Une application envisagée serait le développement d'un vaccin atténué et/ou inactivé contre le pathogène porcin *Mycoplasma hyopneumoniae*, et le pathogène bovin *Mycoplasma bovis*. Les WP qui constituent le projet MycoSynVac ont pour objectif de mettre au point un modèle de cellule entière de *M. pneumoniae*, de se baser sur ce modèle pour la conception du châssis souhaité, de développer des outils d'ingénierie de génomes pour *M. pneumoniae*, de produire les souches vaccinales, et de les tester chez l'animal.

LE LABORATOIRE D'ACCUEIL

Ces travaux de thèse ont été effectués au sein de l'équipe Mollicutes de l'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie (INRA, Université de Bordeaux), sous la direction du Dr. Carole Lartigue-Prat et du Dr. Yonathan Arfi. Les recherches réalisées par cette équipe ont pour objectif la production de connaissances fondamentales sur l'évolution des génomes de *Mollicutes* et sur les mécanismes moléculaires qui gouvernent l'interaction entre ces bactéries minimales et leurs hôtes eucaryotes. Elles s'articulent autour de quatre axes : (1) l'étude de l'étiologie, du diagnostic et de l'épidémiologie des bactérioses phloémiennes, (2) l'étude des interactions des *Mollicutes* phytopathogènes avec leurs plantes hôtes et leurs insectes vecteurs, (3) le développement d'approches de biologie de synthèse chez les *Mollicutes*, et (4) l'étude de la biochimie et de la biophysique des membranes de *Mollicutes*.

Le travail de recherche réalisé dans le cadre de mon doctorat s'inscrit dans le troisième axe thématique du laboratoire. En effet, les compétences du laboratoire dans le domaine de la biologie de synthèse, en particulier chez les *Mollicutes*, justifient son implication dans les projets MiniCell et MycoSynVac. J'ai ainsi pu acquérir les connaissances ainsi que les outils disponibles au laboratoire pour mener à bien mon projet de thèse, tout en participant au développement de nouveaux outils d'édition de génomes.

OBJECTIFS DE LA THESE

OBJECTIFS DE LA THESE

Un des objectifs de la biologie de synthèse est de concevoir et produire des organismes « à façon », pour les utiliser dans des applications thérapeutiques et industrielles. Une des voies envisagées pour atteindre cet objectif repose sur de nouvelles techniques impliquant la synthèse et la transplantation de génomes entiers, afin de créer des organismes dotés de fonctions nouvelles.

Le projet de cette thèse est de développer des outils de biologie de synthèse qui permettront de construire une cellule bactérienne viable, minimale et non pathogène, à partir de l'agent infectieux humain *M. pneumoniae*. À l'avenir, ce châssis cellulaire doit être complété par l'ajout de fonctions spécifiques qui lui permettront de synthétiser et d'administrer *in situ* de petites molécules et/ou des thérapies cellulaires au niveau des tissus pulmonaires, ou encore d'exprimer des antigènes pour servir de vaccin.

M. pneumoniae est une bactérie appartenant à la classe des *Mollicutes*. Ce groupe phylogénétique est composé d'organismes caractérisés par l'absence de paroi cellulaire, une taille réduite (1-2 μm de long et 0,1-0,2 μm de large pour *M. pneumoniae*), un génome composé d'un seul chromosome circulaire et ayant un faible pourcentage en GC (bien que celui de *M. pneumoniae* soit de 40%). Les *Mollicutes* sont également caractérisés par la forme en œuf au plat de leurs colonies.

M. pneumoniae est un micro-organisme capable d'adhérer à certaines surfaces solides, telles que le verre ou le plastique, et qui est pourvu d'une motilité par glissement. Ces propriétés lui sont conférées par la présence d'une structure appelée organelle d'attachement, localisée à l'extrémité avant des cellules en forme de fuseau. Cette capacité à adhérer aux cellules épithéliales des voies respiratoires humaines est une composante essentielle de sa pathogenèse. *M. pneumoniae* est impliqué principalement dans la pneumonie atypique primaire, mais aussi dans de nombreuses maladies respiratoires ainsi que certaines infections extra-pulmonaires (asthme, troubles auto-immuns, ...).

M. pneumoniae est le mycoplasme humain le plus étudié. Il est également l'un des plus petits organismes autorépliatifs. Son génome est petit (816 Kpb) et bien annoté. Une riche collection de données est disponible, comprenant son transcriptome, son méthylome, son protéome et son métabolome. Toutes ces caractéristiques font de cette cellule naturellement

« quasi-minimale » un point de départ idéal pour la construction d'un châssis bactérien.

Néanmoins, la manipulation génétique de ce mycoplasme se révèle difficile, en raison du nombre restreint d'outils moléculaires disponibles. Une approche récemment développée pour d'autres mycoplasmes propose de contourner cette limitation en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* et ses outils génétiques comme plateforme d'édition du génome de *M. pneumoniae*.

Notre premier objectif était donc de cloner et de modifier le génome de *M. pneumoniae* dans la levure. Pour y répondre, nous avons choisi d'utiliser en premier lieu une stratégie déjà développée, la transformation dans *S. cerevisiae* d'un génome bactérien pré-marqué par transposition, afin de confirmer que nous sommes capables de cloner ce génome bactérien dans la levure. Nous nous sommes également intéressés à la stabilité du chromosome bactérien cloné dans la levure, dans le but de nous assurer de la possibilité d'éditer ce génome dans cet hôte sans que celui-ci ne soit perdu ou ne subisse des réarrangements chromosomiques. Nous avons ensuite pour objectif de développer un nouvel outil plus puissant et polyvalent, permettant de cloner et d'éditer simultanément le génome de *M. pneumoniae* dans la levure. Nous avons étudié les capacités de cet outil, dénommé CREasPy-cloning, à réaliser plusieurs modifications génomiques en une seule et même étape. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le chapitre I « Clonage et ingénierie du génome de *Mycoplasma pneumoniae* dans la levure ».

Notre objectif suivant était de mettre au point un protocole de transplantation de génome pour *M. pneumoniae*, de la levure vers une cellule receveuse, dans le but d'obtenir une souche bactérienne éditée. Pour y parvenir, nous avons travaillé à l'élaboration d'un protocole de transformation de plasmides au polyéthylène glycol. Nous avons ensuite essayé d'appliquer ce protocole à la transplantation de génomes entiers. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le chapitre II « Développement d'un protocole de transplantation du génome de *Mycoplasma pneumoniae* dans une cellule receveuse ».

Développer la technique de transplantation de génomes sur une espèce à croissance lente, comme *M. pneumoniae*, requiert du temps. Les résultats issus des premières expériences n'étant pas concluants, nous avons été contraints de trouver une alternative afin

d'atteindre nos objectifs dans le temps escompté. Nous avons concentré nos efforts sur la mise au point d'une nouvelle méthode, le GT-RMCE, permettant le transfert, non pas de génomes entiers de *M. pneumoniae*, mais seulement de portions de ce génome, d'un hôte (*S. cerevisiae* ou *Escherichia coli*) vers la cellule à éditer. Les résultats de ces travaux sont présentés dans le chapitre III « Genomic Transfer – Recombinase-Mediated Cassette Exchange (GT-RMCE) ».

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

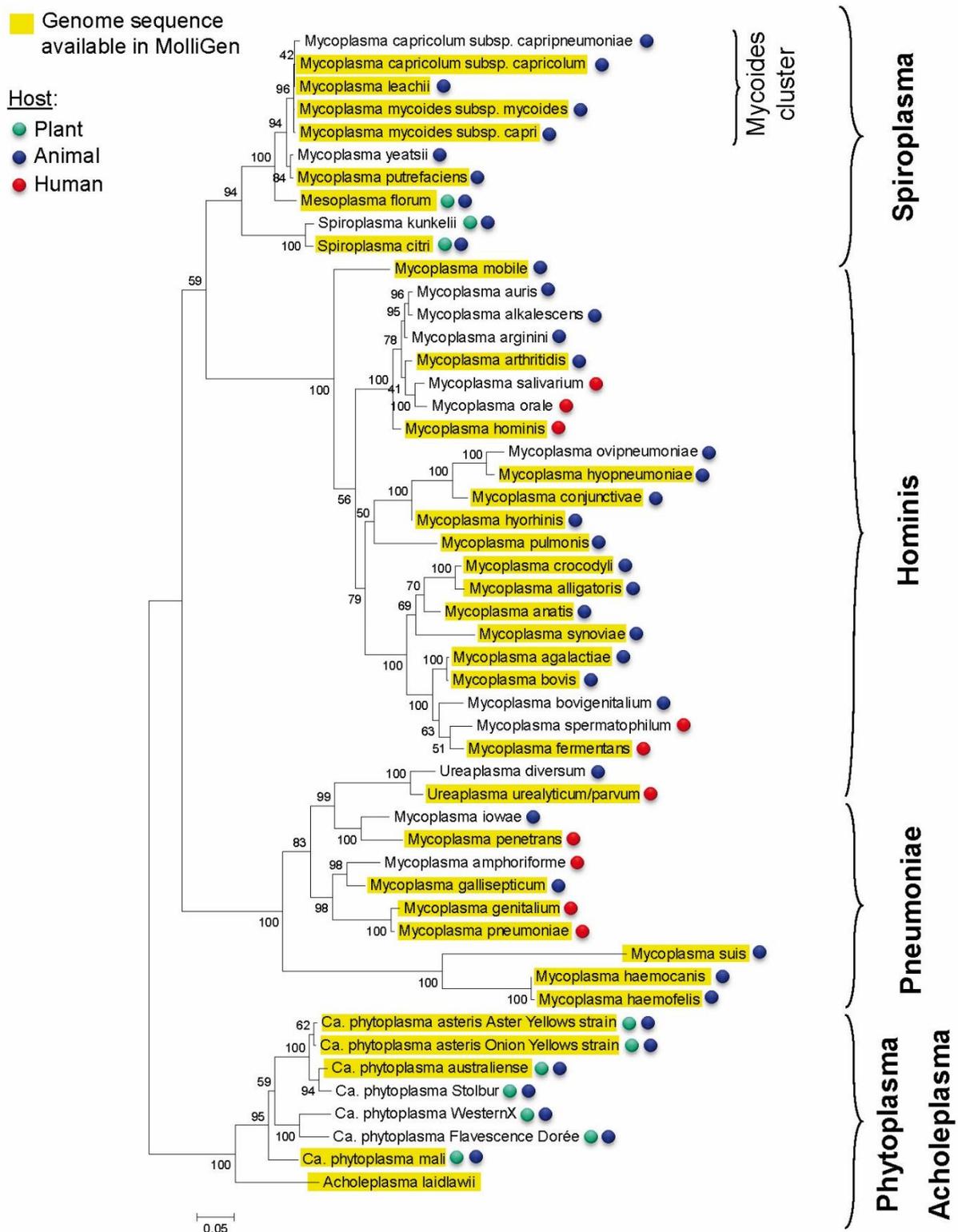


Figure 1. Arbre phylogénétique des *Mollicutes*. Il est composé de la branche SEM, qui contient les groupes *Spiroplasma*, *Hominis* et *Pneumoniae*, et de la branche AAP, qui contient le groupe *Acholeplasma*-*Phytoplasma*. L'arbre a été construit à partir de l'analyse des séquences des ADNr 16S. La figure est issue de la base de données MolliGen (Barré *et al*, 2004).

ETUDES BIBLIOGRAPHIQUES

1. GENERALITES SUR LES MYCOPLASMES

Le terme « mycoplasme » est apparu en 1956, il provient du grecque « mykes » qui signifie champignon et « plasma » qui signifie forme (Waites and Talkington, 2004). Les mycoplasmes sont des bactéries dépourvues de paroi cellulaire, qui appartiennent à la classe des *Mollicutes* (du latin « mollis » : mou et « cutis » : peau, terme apparu en 1967) (Razin, 2006).

1. 1. Classification phylogénétique

L'étude des séquences d'ADN ribosomiques (ADNr) 16S indique que les *Mollicutes* auraient évolués à partir d'un ancêtre commun aux bactéries Gram-positif présentant un génome à faible teneur en bases guanine et cytosine (G+C moles %), et appartenant à la division des *Firmicutes* (Grosjean *et al.*, 2014). Cet ancêtre commun serait partagé avec des bactéries du genre *Clostridium*, et aurait divergé de la branche *Streptococcus* il y a 605 millions d'années (Woese, 1987; Weisburg *et al.*, 1989). D'après ces analyses, l'arbre phylogénétique des *Mollicutes* serait constitué de deux branches. La branche AAP aurait donné naissance aux familles *Acholeplasmataceae* (genre *Acholeplasma*) et *Anaeroplasmataceae* (genres *Anaeroplasma* et *Asteroleplasma*), ainsi qu'aux phytoplasmes. La branche SEM, quant à elle, se serait détachée de la branche AAP il y a 470 millions d'années. Elle regrouperait les familles *Spiroplasmataceae* (genre *Spiroplasma*), *Entomoplasmataceae* (genres *Entomoplasma* et *Mesoplasma*), et *Mycoplasmataceae* (genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma*). La naissance de la branche SEM serait corrélée à l'apparition de nouvelles propriétés caractéristiques des mycoplasmes, telles que la nécessité de stérols pour la croissance, ou encore l'utilisation du codon stop UGA en codon tryptophane (Dybvig and Voelker, 1996; Maniloff, 2002; May, Balish and Blanchard, 2014). La branche SEM regroupe trois groupes phylogénétiques : Hominis, Pneumoniae, Spiroplasma (Figure 1).

Table 1: Classification taxonomique des mollicutes et caractéristiques des genres

Ordre	Famille	Genre	Nombre d'espèces	Taille des génomes (kpb)	Pourcentage en G+C	Hôte
<i>Mycoplasmatales</i>	- <i>Mycoplasmataceae</i>	- <i>Mycoplasma</i>	107	580 – 1350	23-40	Homme, animaux
		- <i>Ureaplasma</i>	7	760 – 1170	27-30	Homme, animaux
<i>Entomoplasmatales</i>	- <i>Entomoplasmataceae</i>	- <i>Entomoplasma</i>	6	790 – 1140	27-29	Insectes, plantes
		- <i>Mesoplasma</i>	12	870 – 1100	27-30	Insectes, plantes
	- <i>Spiroplasmataceae</i>	- <i>Spiroplasma</i>	34	780 – 2220	24-31	Insectes, plantes
<i>Acholeplasmatales</i>	- <i>Acholeplasmataceae</i>	- <i>Acholeplasma</i>	14	1500 – 1650	26-36	Surface des plantes, animaux
		- <i>Candidatus Phytoplasma</i> ^a	6	530 – 1185	23-29	Insectes, plantes
<i>Anaeroplasmatales</i>	- <i>Anaeroplasmataceae</i>	- <i>Anaeroplasma</i>	4	1500 – 1600	29-43	Panse des ovins et bovins
		- <i>Asteroleplasma</i>	1	1500	40	Panse des ovins et bovins

^a les phytoplasmes n'ont jamais été obtenus en culture pure jusqu'à présent. Leur position taxonomique reste donc incertaine. Cependant des études phylogénétiques basées sur l'analyse de l'ADN ribosomique 16S ont montré leur proximité avec les acholeplasmes.

1. 2. Classification taxonomique

En ce qui concerne la classification taxonomique, les *Mollicutes* appartiennent à la division des *Tenericutes*. Ils sont divisés en quatre ordres : les *Mycoplasmatales*, les *Entomoplasmatales*, les *Acholeplasmatales*, et les *Anaeroplasmatales* (Table 1)(Dybvig and Voelker, 1996; Johansson and Pettersson, 2002; May, Balish and Blanchard, 2014). L'ordre des *Mycoplasmatales* contient la famille des *Mycoplasmataceae* (genres *Mycoplasma* et *Ureaplasma*). Il regroupe la majorité des organismes pathogènes de l'homme et des animaux. Les bactéries du genre *Ureaplasma* sont capables d'hydrolyser l'urée. L'ordre des *Entomoplasmatales* comprend les familles *Entomoplasmataceae* (genres *Entomoplasma* et *Mesoplasma*) et *Spiroplasmataceae* (genre *Spiroplasma*). Les organismes qui le composent sont présents chez les arthropodes et à la surface de certaines plantes. Le genre *Spiroplasma* est caractérisé par une morphologie cellulaire hélicoïdale et une motilité. L'ordre *Acholeplasmatales* est constitué de la famille *Acholeplasmataceae* (genres *Acholeplasma* et *Phytoplasma*). Les bactéries qui le composent utilisent le code génétique universel, c'est-à-dire que le codon UGA correspond à un codon stop. Les organismes du genre *Acholeplasma* colonisent les animaux et les plantes. Les phytoplasmes se multiplient dans les insectes ainsi que dans les tubes criblés du phloème des plantes. A l'heure actuelle, il est impossible de les cultiver dans un milieu acellulaire. Enfin, l'ordre des *Anaeroplasmatales* est formé de la famille *Anaeroplasmataceae* (genres *Anaeroplasma* et *Asteroleplasma*). Il regroupe des *Mollicutes* qui vivent en conditions anaérobiques strictes et qui ont été isolés de la panse de ruminants.

Dans ce manuscrit, le terme « mycoplasme » désigne uniquement les bactéries appartenant à l'ordre des *Mycoplasmatales*, et non l'ensemble des *Mollicutes*.

1. 3. Evolution

Les mycoplasmes sont les plus petits organismes vivants capables de se multiplier dans un milieu acellulaire. Leur évolution est caractérisée par une réduction massive de leurs génomes (Grosjean *et al.*, 2014). En effet, ces derniers sont de très petites tailles, pouvant aller de 580 kpb (*Mycoplasma genitalium*) à 2200 kpb (*Spiroplasma ixodetis*) (Razin, Yogev and Naot, 1998). Bien que les mécanismes sous-jacents à cette perte importante d'information gé-

-nétique ne soient pas clairement élucidés, il est probable que ces évènements soient liés à une coévolution des mycoplasmes avec leurs cellules hôtes eucaryotes. En effet, au cours de leur évolution, ces micro-organismes ont perdu progressivement des gènes codant les enzymes permettant la synthèse de la paroi cellulaire, mais aussi des gènes codant des enzymes impliquées dans la production de nombreux métabolites essentiels tels que les acides aminés, les nucléotides et les lipides, ceux-ci étant disponibles chez leur hôte. Les mycoplasmes semblent compenser cette absence de voies anaboliques par la production d'enzymes de dégradation, telles que des nucléases et des protéases, afin de récupérer les nutriments dont ils ont besoin depuis leurs cellules hôtes (Dybvig and Voelker, 1996). La culture *in vitro* de ces organismes n'est donc possible que dans des milieux riches, semblables à ceux utilisés pour la culture de certains tissus biologiques. Toutes ces caractéristiques sont étroitement liées au fait que la majorité des mycoplasmes ont un mode de vie parasitaire.

1. 4. Habitat

Il existe un très grand nombre d'espèces de mycoplasmes, qui colonisent une large gamme d'hôtes : les mammifères, les oiseaux, les reptiles, les arthropodes, les poissons et les plantes (Dybvig and Voelker, 1996). Seize espèces ont été isolées chez l'homme, infectant principalement les muqueuses respiratoires et urogénitales (Blanchard and Bébéar, 2002). Environ 200 espèces ont été identifiées chez les animaux, mais seul un petit nombre sont pathogènes. La majorité des espèces pathogènes infectent les bovins, les ovins, les caprins, la volaille, les porcins, les équidés, les canidés, les félidés et les petits rongeurs (Frey, 2002). De manière générale, les mycoplasmes colonisent les tissus en restant à l'extérieur des cellules, mais il a été observé que certains sont capables de pénétrer et de survivre à l'intérieur des cellules (Razin, Yogevev and Naot, 1998; Blanchard and Bébéar, 2002). C'est le cas notamment de *Mycoplasma pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium* et *Mycoplasma penetrans*. Un autre habitat, cette fois-ci non naturel, que peuvent coloniser ces micro-organismes sont les cultures cellulaires, ce qui est à l'origine de nombreux problèmes de contaminations (Fraser *et al.*, 1995).

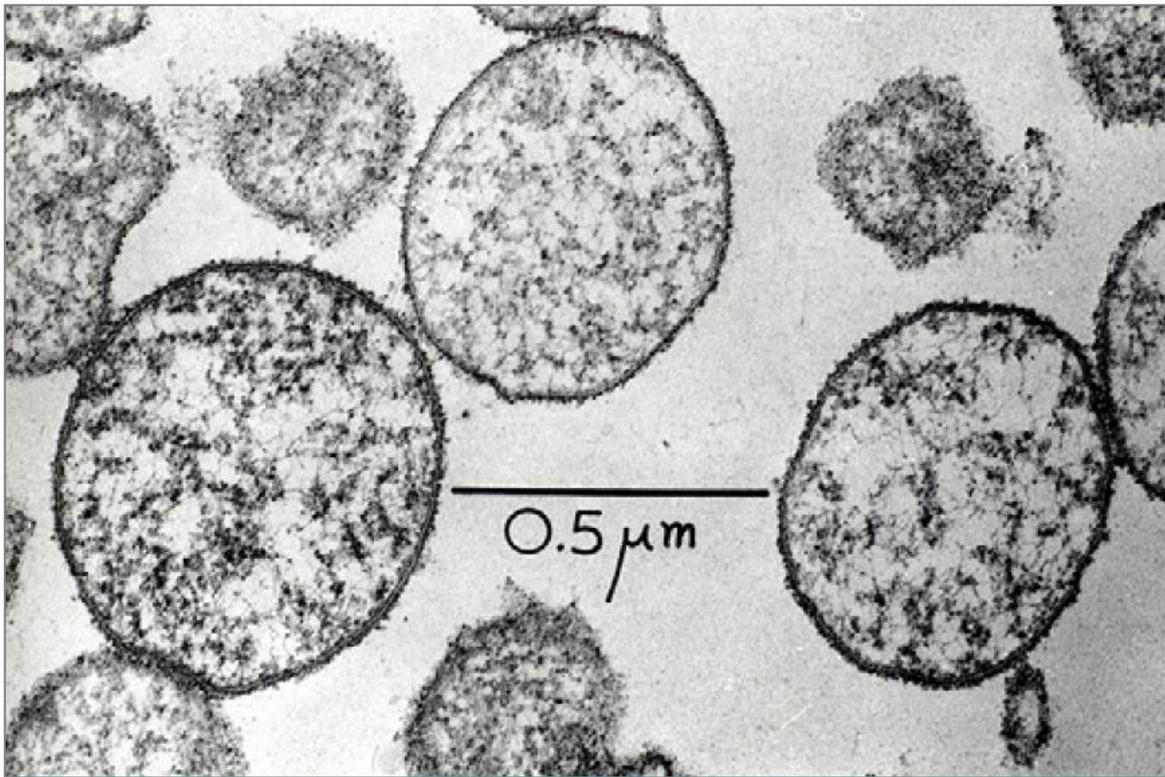


Figure 2. Image de cellules de mycoplasmes observées en microscopie électronique. Les cellules sont entourées d'une seule membrane, leur cytoplasme contient un chromosome (représenté par les fils fins) et des ribosomes (représentés par les granules foncés). Cette image est issue de la publication Razin & Hayflick, 2010.

1. 5. Structure

D'un point de vue structural, ces bactéries sont principalement constituées d'une membrane, d'un chromosome compacté et de ribosomes (Figure 2) (Razin and Hayflick, 2010). Au niveau morphologique, elles sont caractérisées par leur taille extrêmement réduite, ainsi que par l'absence de paroi. La plupart sont pléiomorphes (May, Balish and Blanchard, 2014), et peuvent se présenter sous la forme de cocci irrégulières ou bien de filaments multicellulaires (Balish, 2006). La forme la plus représentée est celle d'une sphère de 0,3 à 0,8 µm de diamètre. Selon les espèces concernées, elles peuvent également présenter une forme de poire, une forme allongée avec la présence d'une structure terminale (*Mycoplasma pneumoniae*), ou bien une forme de filament hélicoïdal (*Spiroplasma citri*) (Razin and Hayflick, 2010). Le maintien d'une morphologie cellulaire en l'absence de paroi sous-entend la présence d'un cytosquelette (Balish and Krause, 2006). Celui-ci est plus ou moins bien caractérisé selon les espèces. Il serait impliqué dans la division cellulaire, et dans la motilité par glissement chez les mycoplasmes qui en sont capables (Balish, 2006). L'absence de paroi cellulaire entraîne également une sensibilité aux chocs osmotiques et aux détergents, une résistance aux pénicillines, et une forme caractéristique en œuf au plat des colonies formées par les mycoplasmes (Razin and Hayflick, 2010).

1. 6. Génome

L'information génétique des mycoplasmes est contenue sous la forme d'un unique chromosome d'ADN circulaire double brin (Dybvig and Voelker, 1996). Les génomes des mycoplasmes sont caractérisés par un faible pourcentage en GC, allant de 23,7% (*Mycoplasma leachii*) à 40% (*Mycoplasma pneumoniae*) (May, Balish and Blanchard, 2014), avec des régions intergéniques qui sont souvent plus riches en AT que les régions codantes. La plupart des mycoplasmes n'utilisent pas le code génétique universel, le codon stop UGA étant utilisé pour coder l'acide aminé tryptophane. Une autre caractéristique de ces micro-organismes est la présence d'éléments répétés dispersés dans le génome (Dybvig and Voelker, 1996; Rocha and Blanchard, 2002). Ceux-ci permettraient le réarrangement de régions codantes, et maximiseraient le potentiel codant de ces génomes réduits. Les mycoplasmes exploitent ce

système afin de faire varier leurs protéines de surfaces (antigènes). Il s'agit d'une propriété faisant partie de leur pathogénèse, leur permettant de survivre dans différentes niches et d'échapper aux systèmes de défenses de l'hôte qu'ils colonisent (Ruland, Wenzel and Herrmann, 1990; Dybvig and Voelker, 1996; Himmelreich *et al.*, 1996, 1997).

1. 7. Les mycoplasmes comme organismes modèles

Les mycoplasmes ont longtemps été décrits comme des organismes simples, du fait de leurs génomes réduits et du nombre limité de fonctions cellulaires qu'ils possèdent. Cette vision des choses a progressivement évolué, au fur et à mesure de l'accumulation de données expérimentales, qui tendent à démontrer leur capacité à réaliser des fonctions complexes malgré un génome limité (Grosjean *et al.*, 2014).

Etant les organismes vivants auto-réplicatifs possédant les plus petits génomes, ils ont été parmi les premiers à voir leurs génomes séquencés (Barré, de Daruvar and Blanchard, 2004; May, Balish and Blanchard, 2014). Ils sont également utilisés comme organismes modèles pour la caractérisation des fonctions élémentaires qui gouvernent une cellule, et donc la vie (Gibson *et al.*, 2010; Hutchison *et al.*, 2016).

2. *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

M. pneumoniae est un des organismes modèles de la mycoplasmologie, et est à ce titre un des mycoplasmes les plus étudiés (Waites and Talkington, 2004). Cet intérêt particulier pour cette espèce est lié notamment à sa pathogénicité pour l'Homme, ainsi qu'à sa prévalence (Kumar, 2018).

M. pneumoniae a été isolé pour la première fois en 1944 par le microbiologiste Monroe Davis Eaton à partir d'expectorations d'un patient atteint de pneumonie atypique primaire (Saraya, 2016), lui valant la dénomination « agent Eaton ».

Comme tous les mycoplasmes, les cellules de *M. pneumoniae* présentent une taille réduite, mesurant de 1 à 2 µm de long, et de 0,2 à 0,5 µm de large. De plus, les colonies qu'elles

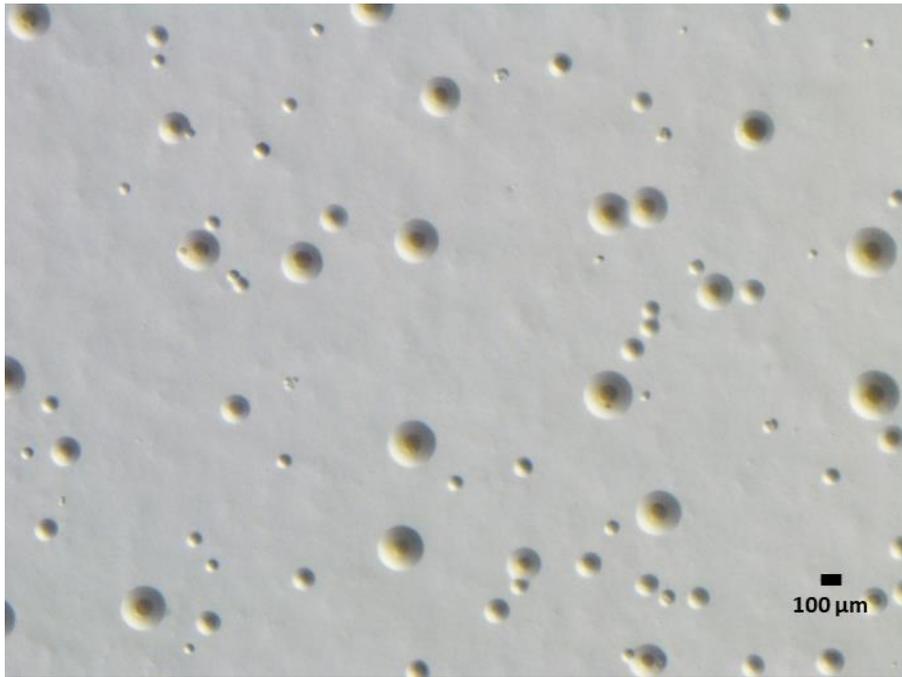


Figure 3. Aspect visuel des colonies de *M. pneumoniae*. Les colonies de *M. pneumoniae* (souche FH) sur un milieu agar présentent une forme caractéristique d'œuf au plat. Elles sont observées avec une loupe binoculaire, barre d'échelle de 100 μm (grossissement X20).

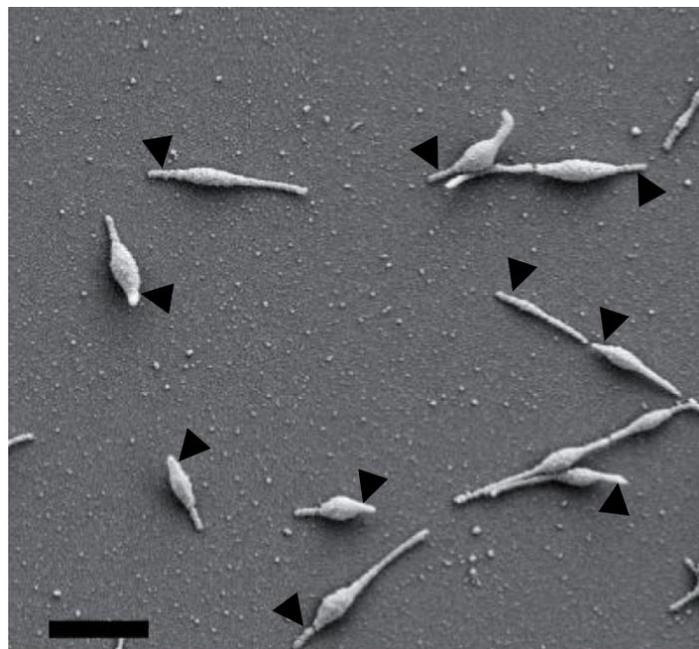


Figure 4. Photographie en microscopie électronique à balayage de *M. pneumoniae*. La morphologie des cellules est caractéristique de l'espèce. Les organelles d'attachement, indiquées par des flèches noires, sont situées à l'extrémité avant de la cellule. Le renflement au milieu de la cellule correspond au corps cellulaire. Barre d'échelle de 1 μm . (Image issue Waites *et al*, 2008).

forment sur un milieu riche solide n'excèdent pas 100 µm de diamètre, leur observation nécessitant donc une loupe binoculaire (Figure 3) (Atkinson, Balish and Waites, 2008).

A l'inverse de la plupart des autres mycoplasmes, les cellules de *M. pneumoniae* présentent une morphologie caractéristique en forme d'épingle (Figure 4). Le corps cellulaire constitue la partie la plus large, et est encadré par deux structures allongées. Celle située à l'avant de la cellule est nommée « tip », ou « organelle terminale », et contient plusieurs éléments distinguables en microscopie électronique. De l'arrière vers l'avant, on peut décrire 3 structures principales : le bol (« bowl »), les tiges (« paired plates ») et le bouton terminal (« terminal button »), chacune constituée de plusieurs protéines. La surface membranaire du « tip » est quant à elle recouverte d'adhésines, formant la « nap structure ». Ces effecteurs ont été pour la plupart caractérisés, et sont impliqués dans l'adhérence et la motilité de cette bactérie (Balish, 2014). En effet, *M. pneumoniae* est capable d'adhérer à de nombreuses surfaces, y compris le verre et le plastique, et peut se déplacer par « glissement ». Ces deux propriétés occupent une place centrale dans les mécanismes de pathogénicité de *M. pneumoniae*, en permettant notamment à la bactérie d'envahir les cellules ciliées des alvéoles pulmonaires (Krause *et al.*, 2018).

2. 1. Épidémiologie et manifestations cliniques

M. pneumoniae est impliqué dans de nombreuses infections respiratoires touchant des personnes de tout âge, des nourrissons aux personnes âgées (Hammerschlag, 2001). Les infections causées par ce pathogène sont présentes partout dans le monde, aussi bien de manière endémique qu'épidémique (Waites *et al.*, 2017). Il ne semble pas y avoir d'influence du climat, des saisons, ni de la géographie sur l'apparition de ces épidémies. Celles-ci peuvent s'étaler sur de longues périodes. Ceci s'explique par l'existence d'une longue phase d'incubation de *M. pneumoniae*, pouvant aller jusqu'à trois semaines, avant l'apparition de symptômes, un taux de transmission faible, et une persistance du pathogène dans l'organisme pour des durées variables (Atkinson, Balish and Waites, 2008). Les épidémies ont un caractère cyclique, elles réapparaissent environ tous les quatre à sept ans (Atkinson and Waites, 2014). Elles ont été majoritairement décrites dans des environnements confinés, tels que des bases

militaires, des hôpitaux, des communautés religieuses et des écoles. En effet, des contacts proches entre les personnes sont nécessaires pour la transmission de *M. pneumoniae*. Ce dernier semble être transmis d'un individu à un autre par l'intermédiaire de gouttelettes issues de sécrétions de l'appareil respiratoire (Atkinson, Balish and Waites, 2008).

Les infections à *M. pneumoniae* ont un degré de sévérité très variable. Elles sont rarement mortelles, mais elles sont parfois impliquées dans des maladies aiguës pouvant entraîner la mort. Elles touchent le tractus respiratoire (voies respiratoires inférieures et supérieures), et sont souvent asymptomatiques. Les manifestations cliniques les plus courantes sont les trachéobronchites, les pharyngites, les congestions sinusales, l'asthme et les otites. Ces infections peuvent évoluer vers des maladies plus graves, principalement vers la pneumonie atypique primaire (Atkinson, Balish and Waites, 2008; Waites, Balish and Atkinson, 2008; Waites *et al.*, 2017). De nombreuses complications extra-pulmonaires ont également été décrites. La plus courante touche le système nerveux central, et entraîne des céphalées. *M. pneumoniae* peut aussi être à l'origine de troubles dermatologiques, cardiaques, gastro-intestinaux, de conjonctivites, d'arthrites, et même d'anémie hémolytique auto-immune chez les personnes ayant un système immunitaire affaibli (Atkinson, Balish and Waites, 2008; Waites, Balish and Atkinson, 2008; Narita, 2010; Waites *et al.*, 2017).

2. 2. Caractéristiques génétiques

Le génome de *M. pneumoniae* est l'un des plus petits génomes de la classe des *Mollicutes*. Il est composé d'un seul chromosome d'ADN circulaire double brin de 816 394 pb. Il est caractérisé par un pourcentage en bases guanine et cytosine de 40%, largement plus élevé que celui trouvé chez les autres mycoplasmes (Waites and Talkington, 2004). Ce génome a été séquencé en 1996 par Himmelreich *et al.*, puis ré-annoté en 2000 par Dandekar *et al.* (Himmelreich *et al.*, 1996; Dandekar *et al.*, 2000). Depuis, de nombreuses données de transcriptomiques et de protéomiques ont été collectées pour cet organisme, permettant d'affiner encore cette annotation. Ainsi, le génome de *M. pneumoniae* contiendrait 694 séquences codantes, 311 séquences d'ARN non codants, et 43 séquences codant des ARN fonctionnels (dont 37 codant des ARN de transfert). Les gènes codant les ARN ribosomiques sont regroupés en un seul opéron (Lluch-Senar, Delgado, *et al.*, 2015).

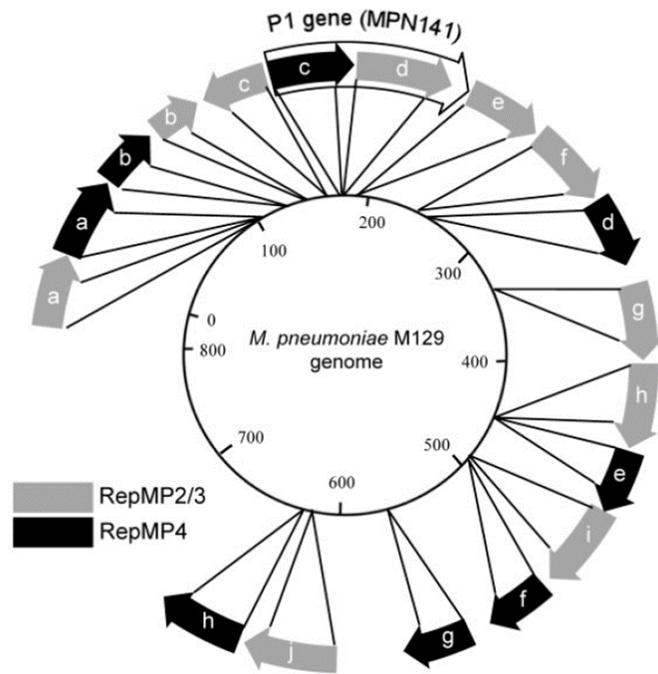


Figure 5. Schéma de la distribution des éléments RepMP2/3 et RepMP4 au sein du génome de *M. pneumoniae*. (Schéma issu de Spuesens *et al*, 2009).

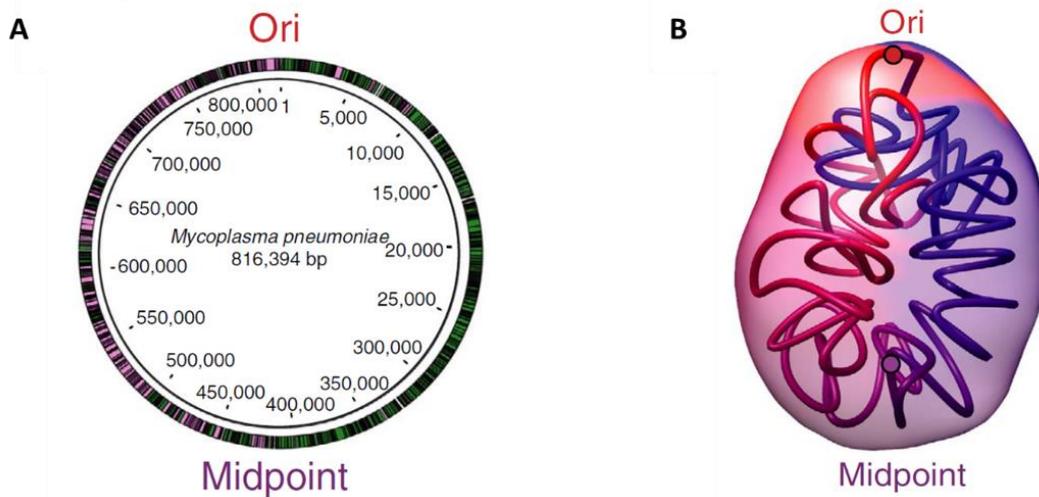


Figure 6. Schéma illustrant la structure tridimensionnelle prédite du chromosome de *M. pneumoniae*. (A) Carte simplifiée du génome de *M. pneumoniae*. Les lignes noires délimitent les gènes. La couleur rose désigne le brin – et la couleur verte le brin +. (B) Modèle 3D du génome de *M. pneumoniae*. Le chromosome présente une symétrie globale, avec l'origine de répllication (Ori) et le point à mi-parcours (midpoint) localisés aux deux extrémités opposées. (Image issue de Trussart *et al*, 2017).

Le métabolisme de *M. pneumoniae*, à l'instar de celui des autres *Mollicutes*, ne lui permet pas de croître en l'absence de son hôte du fait de la déficience de certaines voies essentielles. Ce parasite est incapable de synthétiser *de novo* les purines et les pyrimidines nécessaires à la synthèse d'ADN, de réaliser le cycle de l'acide carboxylique, et ne possède pas de chaîne de transport des électrons (contenant des cytochromes) complète. En revanche, il possède la voie complète de la glycolyse. Il est également capable de générer de l'ATP via la fermentation du glucose, du glycérol, du fructose ou du mannose, en acide lactique et en acide acétique (Atkinson, Balish and Waites, 2008).

Le génome de *M. pneumoniae* est caractérisé par la présence de nombreuses séquences répétées, appelées RepMPs. Ces séquences représentent 8% du génome, et correspondent majoritairement à de multiples copies de quatre RepMPs. Trois de ces quatre RepMPs sont présentes dans le gène codant pour l'adhésine P1 (gène *mpn141*) : RepMP2/3 (1910 pb) localisées dans la région 3' du gène, et RepMP4 (1622 pb) localisée dans la région 5' (Musatovova, Kannan and Baseman, 2012). Ces trois RepMPs sont également retrouvées à d'autres endroits du génome (Figure 5). Des événements de recombinaison peuvent avoir lieu (par un mécanisme inconnu) entre un RepMP présent dans le gène *mpn141* et un RepMP présent ailleurs dans le génome, entraînant une modification de la séquence du gène. Ces variations de séquences sont à l'origine de la variation antigénique de l'adhésine P1 (Spuesens *et al.*, 2009). Elles permettent aussi de classer les souches de *M. pneumoniae* en deux sous-types (les sous-types 1 et 2), puisque qu'il existe deux variantes du gène *mpn141*. Par exemple, la souche M129 appartient au sous-type 1, et la souche FH au sous-type 2 (Xiao *et al.*, 2015). Néanmoins, *M. pneumoniae* est quand-même considéré comme un organisme stable génétiquement car il existe très peu de variations entre les différentes souches, en dehors de cet exemple (Spuesens *et al.*, 2009).

Des études récentes se sont intéressées à l'organisation tridimensionnelle du chromosome de *M. pneumoniae*. Grâce à l'utilisation de la technologie Hi-C (une combinaison de méthodes de biologie moléculaire dérivées de la technique 3C, pour chromosome conformation capture) combinée à de la microscopie à super-résolution, la structure du génome bactérien a pu être explorée (Figure 6). Ainsi, le chromosome de *M. pneumoniae* présente une symétrie entre deux bras, dont les extrémités sont connectées au niveau de l'origine de réplication et à mi-parcours. De même, il est organisé en domaines de 15 à 33 kpb.

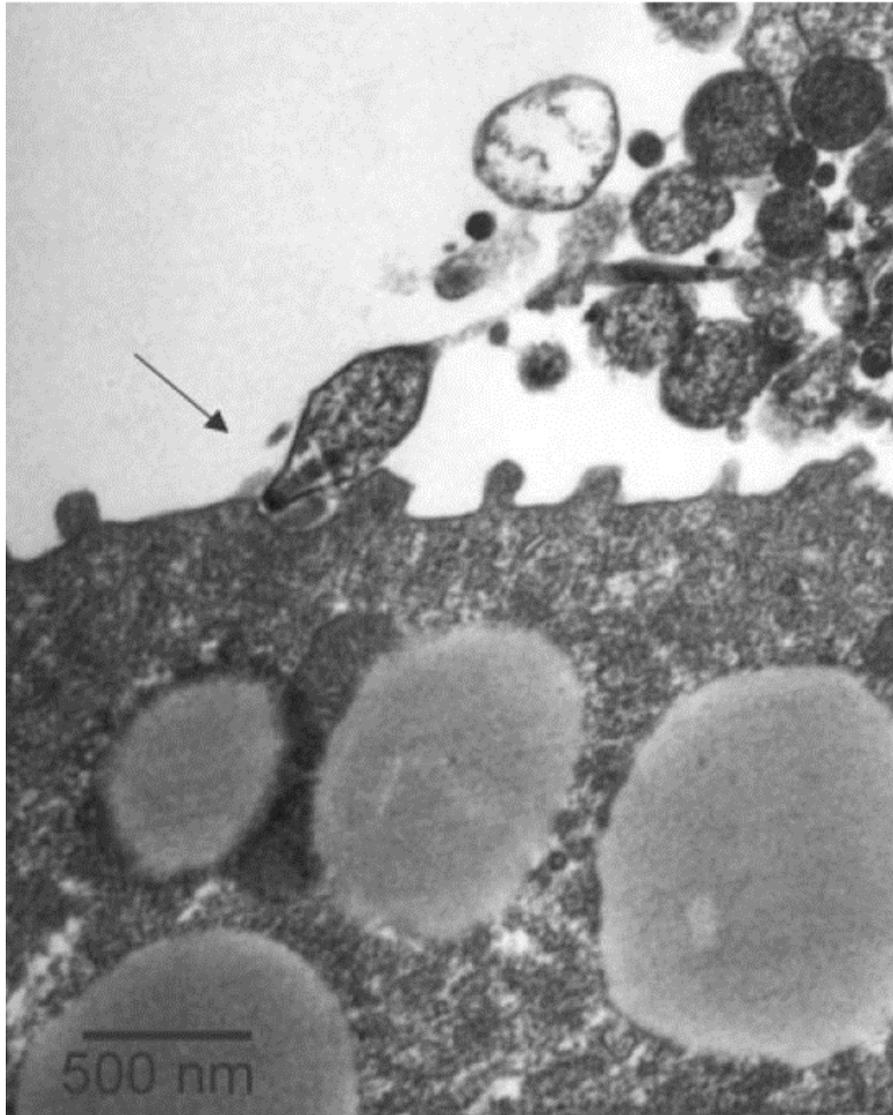


Figure 7. Photographie en microscopie électronique à transmission de cellules de *M. pneumoniae* infectant des cellules de la trachée d'un hamster. L'association entre *M. pneumoniae* et une cellule de l'épithélium trachéal est réalisée par le biais de l'organelle terminale de la bactérie, indiquée par une flèche. (Image issue de Waites & Talkington, 2004).

Les gènes appartenant à un même domaine seraient co-régulés, ce qui suggère que l'organisation du chromosome influencerait sa régulation transcriptionnelle (Trussart *et al.*, 2017).

2. 3. Facteurs de virulence

Une fois inhalé dans les voies respiratoires de l'organisme hôte, *M. pneumoniae* se lie aux cellules du tractus respiratoire (Figure 7) (Atkinson and Waites, 2014). Il s'agit de la première étape de sa pathogénèse. Afin de pouvoir survivre et se propager, la bactérie va ensuite exprimer différents facteurs de virulences et produire différentes molécules toxiques telles que la toxine CARDS (Kannan and Baseman, 2006; Kannan *et al.*, 2010; Medina *et al.*, 2012), le peroxyde d'hydrogène (Hames *et al.*, 2009; Schmidl *et al.*, 2011; Elkhal *et al.*, 2015) ou le sulfure d'hydrogène (Großhennig *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2019), dans le but d'endommager les cellules hôtes.

La pathogénicité de ce micro-organisme est également étroitement liée à sa capacité à échapper au système immunitaire de l'organisme qu'il infecte. Des mécanismes permettant la variation des antigènes présents à la surface des cellules ont été décrits, ainsi que la capacité à s'internaliser dans les cellules hôtes (Waites and Talkington, 2004). *M. pneumoniae* est également capable de former des biofilms, ce qui lui permet de renforcer son adhérence aux cellules de l'hôte et de limiter le contact avec les cellules du système immunitaire de l'hôte (Kornspan, Tarshis and Rottem, 2011; Waites *et al.*, 2017).

Un autre facteur de virulence décrit dans la littérature est l'expression d'enzymes, essentiellement glycolytiques, à la surface de *M. pneumoniae* (Thomas, Jacobs and Dumke, 2013). Ces protéines, aussi appelée « moonlighting proteins », ont une fonction primaire dans le cytosol (telle que la glycolyse), mais sont transportées à la surface des cellules par un mécanisme inconnu. Elles interagissent avec des composants de la matrice extracellulaire humaine, ce qui favorise l'invasion des tissus, et encore une fois l'échappement au système immunitaire (Balasubramanian, Kannan and Baseman, 2008; Dumke, Hausner and Jacobs, 2011; Gründel, Jacobs and Dumke, 2016; Hagemann *et al.*, 2017). Ces protéines participent à la virulence, mais ne suffisent pas à elles seules à provoquer la pathogénicité. De ce fait, bien que largement étudiées, elles ne sont pas toujours considérées comme des facteurs de virulence (Henderson *et al.*, 2014).

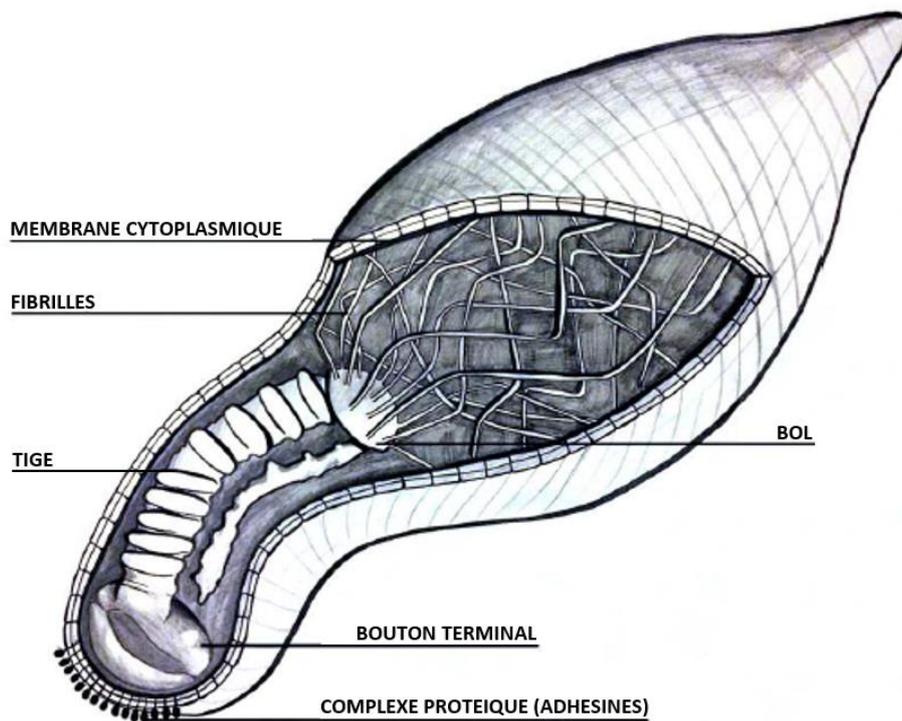


Figure 8. Schéma représentant l'architecture cellulaire de *M. pneumoniae*. L'organelle terminale est composée de plusieurs complexes protéiques, formant trois structures distinctes et connectées : le « bol », la « tige » et le « bouton terminal ». Ces structures sont reliées aux fibrilles constituant le reste du cytosquelette et occupant le cytoplasme de la cellule. (Image issue de Parrott *et al*, 2016).

Ces mécanismes de pathogénicité induisent chez l'homme une hyper-activation des réponses inflammatoires et immunitaires, via notamment une stimulation de la production de cytokines pro-inflammatoires, telles que les interleukines IL-8, IL-6, IL-10 et IL-1- β , du facteur de nécrose tumorale (TNF- α), ainsi que de neutrophiles, lymphocytes, macrophages et mastocytes. Ceci a pour conséquence d'accroître les dommages déjà causés aux cellules humaines, renforçant ainsi la pathogénicité de *M. pneumoniae* (Waites *et al.*, 2017).

Au niveau cellulaire, ces dommages se traduisent par une « ciliostase » (blocage du fonctionnement des cils) et une apoptose des cellules épithéliales, entraînant une desquamation de l'épithélium respiratoire. Ces dégradations permettent à *M. pneumoniae* d'acquérir les nutriments dont il a besoin pour sa survie (Atkinson, Balish and Waites, 2008; Waites *et al.*, 2017).

2. 3. 1. Adhérence cellulaire

L'adhérence cellulaire apparaît indispensable à la propagation et la pathogénèse de *M. pneumoniae*, une perte de cette fonction étant généralement associée à une perte de la virulence. (He *et al.*, 2016, 2017; Waites *et al.*, 2017). L'adhérence aux cellules ciliées de l'épithélium respiratoire humain se fait grâce à une structure particulière : l'organelle terminale. Celle-ci fait partie intégrante du cytosquelette de *M. pneumoniae*, et est également impliquée dans la motilité par glissement et la division cellulaire (Krause *et al.*, 2018). Il s'agit d'une extension de la membrane contenant une structure dense aux électrons, elle-même composée de trois sous-structures principales: (1) une « tige » (ou « paired plates ») orientée le long de l'axe de la cellule, et qui s'étire à l'extrémité de l'organelle terminale pour former (2) un « bouton terminal » qui interagit avec la face interne de la membrane plasmique, et (3) à l'extrémité opposée un « bol » (Figure 8) (Miyata and Hamaguchi, 2016; Parrott, Kinjo and Fujita, 2016).

La membrane entourant l'organelle terminale est tapissée au niveau de sa face externe par un réseau d'adhésines et de protéines accessoires. La protéine majoritairement responsable de l'adhérence est l'adhésine P1. Celle-ci est concentrée au niveau de l'organelle terminale, mais elle est également localisée en concentration plus faible dans le reste de la cellule (Krause and Balish, 2001; Waites and Talkington, 2004; Willby *et al.*, 2004). Bien qu'elle

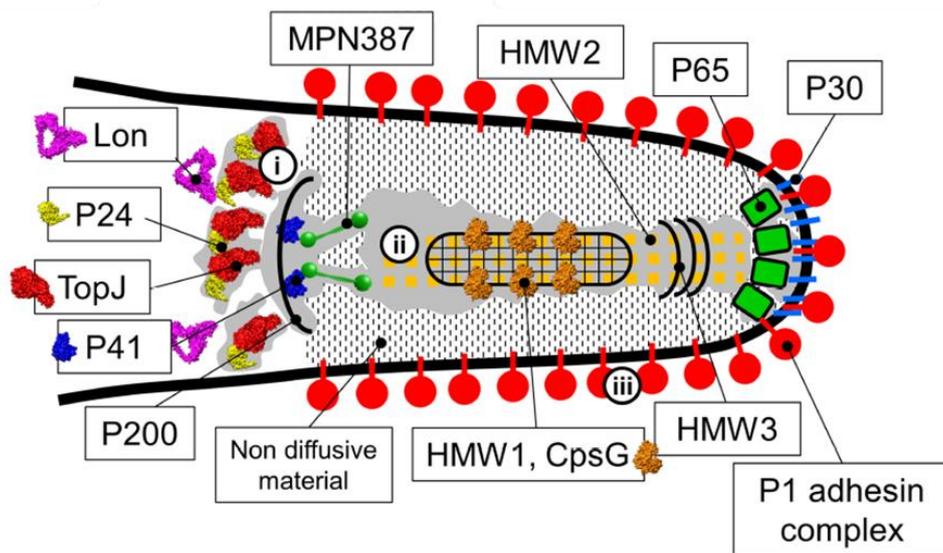


Figure 9. Schéma de l'organelle terminale de *M. pneumoniae*. La localisation des différentes protéines impliquées dans les structures visibles de l'organelle terminale est indiquée. (Image issue de Miyata & Hamaguchi, 2016).

soit la cible de la plupart des anticorps du système immunitaire humain, elle est impliquée dans l'évasion de ce dernier. En effet, les trois gènes codant l'adhésine P1 contiennent des séquences répétées qui sont à l'origine de réarrangements chromosomiques qui permettent une variation de la séquence en acides aminés de la protéine, et donc le changement de ses propriétés antigéniques (Kenri *et al.*, 2019).

L'adhésine P1 à elle seule ne suffit pas à permettre l'adhérence aux cellules de l'organisme hôte. Elle nécessite l'assistance de nombreuses protéines accessoires faisant partie du cytosquelette : HMW1, HMW2, HMW3, P30, P40, P65, P90 (Figure 9). Les protéines P1, P40 et P90 forment un complexe indépendant au niveau de l'extrémité de l'organelle terminale (Seto *et al.*, 2001; Chaudhry, Varshney and Malhotra, 2007; Nakane *et al.*, 2015; He *et al.*, 2016).

Les adhésines localisées à la surface des cellules de *M. pneumoniae* se lieraient à des récepteurs présentant des motifs syalo-glycoconjugués et à des glycolipides sulfatés présents au niveau de la membrane des cellules humaines (Waites and Talkington, 2004).

2. 3. 2. Toxine CARDS

La protéine CARDS (pour « Community-Acquired Respiratory Distress Syndrom ») est une « ADP ribosylating and vacuolating » cytotoxine. Elle présente une homologie dans sa structure en acides aminés avec la toxine cholérique et la toxine pertussique. La toxine CARDS est un facteur de virulence majeur (Medina *et al.*, 2012). En effet, elle est suffisante pour induire les effets inflammatoires et histo-pathologiques associés à *M. pneumoniae*. Par exemple, il a été mis en évidence sur des modèles murins ou primates exposés à cette toxine, qu'elle induit la production des protéines majeures de l'inflammasome (cytokines, interleukines) et l'activation de lymphocytes, provoquant ainsi l'apparition des principaux symptômes associés à *M. pneumoniae* (Hardy *et al.*, 2009; Maselli *et al.*, 2018).

La synthèse de la toxine CARDS augmente lors de l'infection d'un organisme hôte, dénotant une probable influence des facteurs cellulaires de l'hôte sur la régulation de son expression (Kannan *et al.*, 2010). Cette protéine est majoritairement localisée dans le cytoplasme de *M. pneumoniae*. En fin de phase exponentielle de croissance, une petite pro-

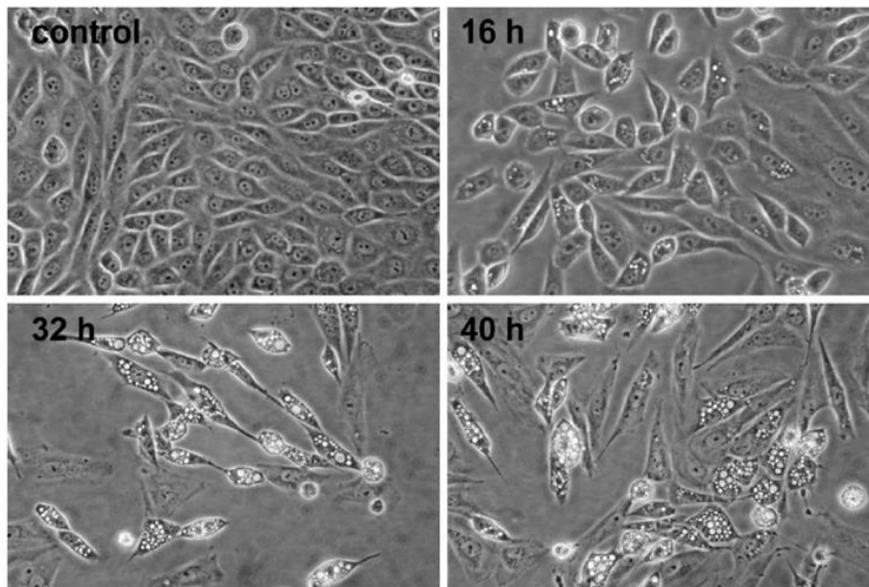
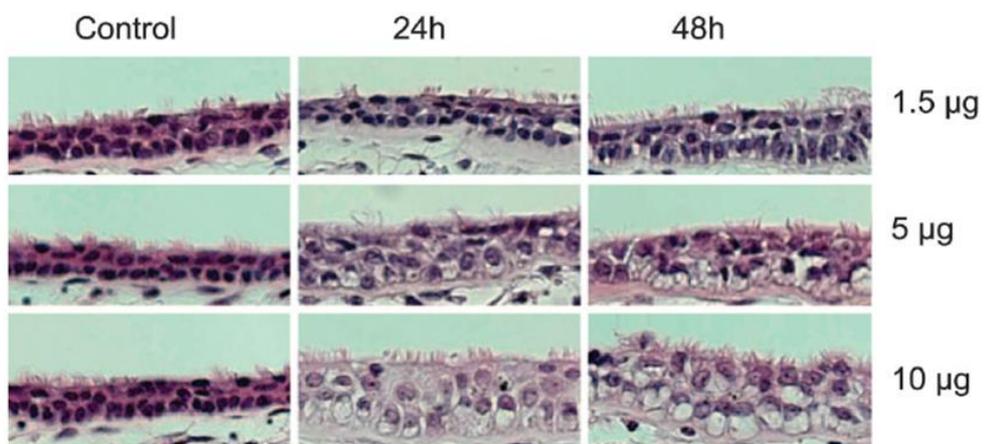
A**B**

Figure 10. Illustration des effets de la toxine CARDS sur des cellules eucaryotes. (A) Effet de la toxine CARDS sur la morphologie de cellules CHO. Une culture *in vitro* de cellules CHO est mise au contact de la toxine CARDS. Au cours du temps, une vacuolisation des cellules devient visible, ainsi qu'une disruption de l'intégrité cellulaire. **(B)** Effet de la toxine CARDS sur l'épithélium trachéal de babouin. Des coupes cellulaires sont incubées en présence de la toxine CARDS active ou inactive (contrôle). Au cours de l'incubation, sont observables un épaississement marqué de la couche épithéliale dû à la vacuolisation cytoplasmique, un élargissement nucléaire, une perturbation de la polarité cellulaire, et une désorganisation des cellules épithéliales. (Images issues de Kannan & Baseman, 2006).

-portion (7%) est localisée au niveau de la membrane plasmique. Ces protéines ne sont jamais sécrétées, ce qui sous-entend la nécessité d'un contact très étroit entre les cellules de l'épithélium respiratoire et celles de *M. pneumoniae* (Kannan and Baseman, 2006). La toxine CARDS se lierait à des récepteurs présents sur la membrane plasmique des cellules de l'hôte, tels que la protéine A du surfactant (collectine du système immunitaire inné), l'annexine A2, la phosphatidylcholine et la sphingomyéline. Elle serait ensuite endocytée par la voie faisant intervenir la clathrine. Très récemment, il a été mis en évidence que ces endosomes suivent une voie de transport dite rétrograde, circulant de la membrane plasmique vers l'appareil de Golgi, puis vers la périphérie nucléaire, et finissant par rejoindre le réticulum endoplasmique de la cellule (Ramasamy *et al.*, 2018).

La toxine CARDS entraîne la vacuolisation et l'apoptose des cellules de l'épithélium respiratoire. Ceci provoque la « ciliostase » et l'exfoliation des cellules de la muqueuse, entraînant ainsi la désorganisation et la disruption de l'intégrité de l'épithélium respiratoire (Figure 10) (Kannan and Baseman, 2006; Ramasamy *et al.*, 2018).

2. 3. 3. Peroxyde d'hydrogène

La production de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) est un déterminant majeur de la virulence de *M. pneumoniae*. En effet, elle est responsable d'un effet cytotoxique direct sur les cellules de l'épithélium respiratoire. Elle dérive du métabolisme du glycérol (May, Balish and Blanchard, 2014; Blötz and Stülke, 2017). Il est intéressant de souligner que les gènes impliqués dans le métabolisme du glycérol sont exprimés de manière constitutive chez *M. pneumoniae*, et ne semblent pas faire l'objet d'une régulation génétique particulière lors de l'infection. Il s'agit d'un exemple unique chez les bactéries métabolisant le glycérol (Hames *et al.*, 2009).

Chez *M. pneumoniae*, la majorité du peroxyde d'hydrogène est généré par l'enzyme GlpO (une L-a-glycérophosphate oxydase dépendante du FAD, anciennement appelée GlpD pour glycérol-3-phosphate déshydrogénase) (Figure 11) (Elkhal *et al.*, 2015). GlpO permet la transformation du glycérol-3-phosphate (G3P) en dihydroxyacétone phosphate, un intermédiaire de la voie glycolytique. Le G3P peut être importé depuis l'extérieur de la cellule par le transporteur UgpA/C/E. Il peut aussi dériver du glycérol, qui est transféré dans le cytoplasme par le transporteur GlpF puis phosphorylé par l'enzyme GlpK (glycérol kinase).

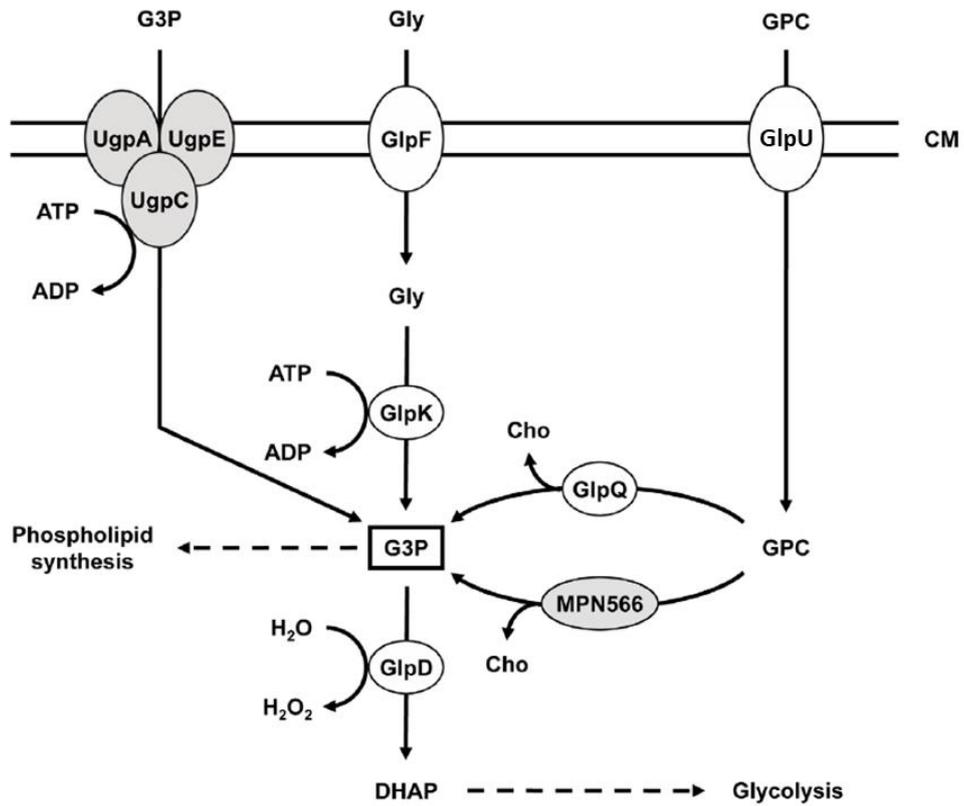


Figure 11. Schéma illustrant les mécanismes d'import et de conversion de glucides en glycérol-3-phosphate chez *M. pneumoniae*. CM, membrane cellulaire ; DHAP, dihydroxyacétone ; G3P, glycérol-3-phosphate ; GPC, glycérophosphocholine ; Gly, glycérol ; Cho, choline. (Schéma issu de Schmidl *et al*, 2011).

Enfin, le G3P peut également provenir de l'action de l'enzyme GlpQ (une glycérolphosphodiesterase) sur la glycérophosphocholine (GPC), importée par le transporteur GlpU. Le GPC le plus abondant dans l'épithélium respiratoire est la lécithine, qui est de ce fait le principal substrat de GlpQ (Schmidl *et al.*, 2011; Waites *et al.*, 2017).

La production de peroxyde d'hydrogène engendre un stress oxydatif au sein de l'épithélium respiratoire, ce qui peut conduire à la lyse des cellules (Waites and Talkington, 2004; Hames *et al.*, 2009). Il a également été démontré que cette molécule toxique pouvait avoir une activité hémolytique contre les érythrocytes (Somerson, Walls and Chanock, 1965; May, Balish and Blanchard, 2014).

2. 3. 4. Sulfure d'hydrogène

La production de sulfure d'hydrogène (H₂S) est issue de l'activité de l'enzyme HapE. Chez *M. pneumoniae*, il s'agit d'une enzyme bi-fonctionnelle, dotée à la fois d'une activité cystine désulfurase, qui permet la production d'alanine, et d'une activité de cystéine désulfhydrase (activité de dégradation de la cystéine), qui permet la production de pyruvate et de sulfure d'hydrogène (Großhennig *et al.*, 2016).

Tout comme le peroxyde d'hydrogène, le sulfure d'hydrogène engendre un stress oxydatif au niveau des tissus de système respiratoire. Ce n'est que récemment que la production de sulfure d'hydrogène a été qualifiée de facteur de virulence, lorsqu'il a été mis en évidence sa capacité à provoquer une hémolyse (Großhennig *et al.*, 2016) Depuis, il a été démontré, sur des cellules NHBE (modèle cellulaire utilisé pour l'étude de l'épithélium respiratoire), que l'enzyme HapE a un effet cytostatique et cytotoxique. Elle est aussi responsable d'une perturbation du cycle cellulaire, inhibant la prolifération des cellules NHBE en phase S ce qui favorise la prolifération et la survie de *M. pneumoniae* (Li *et al.*, 2019).

Le sulfure d'hydrogène agit également sur les cellules de l'organisme hôte en induisant une diminution de la sécrétion des facteurs inflammatoires, ainsi qu'une augmentation de la production de médiateurs anti-inflammatoires. Ceci a pour conséquences de favoriser la prolifération de *M. pneumoniae* au sein des tissus infectés, et de faciliter l'échappement au système immunitaire.

Depuis quelques années, de nombreuses données concernant *M. pneumoniae* ont été accumulées et ouvertes à la communauté scientifique : génome, transcriptome, protéome, métabolome et méthylome. Cette riche collection de données fait de ce micro-organisme un modèle intéressant pour la biologie des systèmes (Himmelreich *et al.*, 1996; Dandekar *et al.*, 2000; Weiner III, Herrmann and Browning, 2000; Guell *et al.*, 2009; Kuhner *et al.*, 2009; Maier *et al.*, 2011; Yus *et al.*, 2012; Lluch-Senar *et al.*, 2013; Lluch-Senar, Cozzuto, *et al.*, 2015). La faible complexité de son protéome et l'absence de nombreuses voies métaboliques font également de *M. pneumoniae* un organisme idéal pour l'étude des fonctions métaboliques basiques et pour la compréhension du métabolisme énergétique (Wodke *et al.*, 2014). Enfin, son génome réduit est également un atout majeur pour l'étude de l'essentialité des gènes, dont l'objectif est de déterminer un ensemble de gènes nécessaires et suffisants pour permettre la vie. Ce dernier aspect est étroitement lié à la notion de cellule minimale, un concept clé du domaine de la biologie de synthèse.

3. OUTILS GENETIQUES DISPONIBLES CHEZ *MYCOPLASMA PNEUMONIAE*

L'étude poussée d'un organisme vivant requiert de disposer d'outils permettant d'en manipuler le contenu génétique. La capacité à réaliser des délétions, des insertions ou des remplacements permet d'obtenir des mutants dont les phénotypes peuvent être analysés, afin d'en déduire des corrélations éventuelles entre gènes et fonctions.

Chez les mycoplasmes, les outils génétiques disponibles sont relativement rares, bien qu'au cours du temps un nombre grandissant de techniques aient été mises au point. Chez *M. pneumoniae*, ces outils sont : la mutagenèse aléatoire par transposition, la mutagenèse ciblée via l'utilisation de plasmides réplicatifs ou encore par recombinaison homologue. Un prérequis à l'utilisation de ces différents outils est la maîtrise d'un protocole de transformation pour l'organisme concerné.

3. 1. Transformation

Deux techniques existent pour transformer les mycoplasmes : l'électroporation et/ou une méthode de transformation au polyéthylène glycol (PEG), et le choix de l'une ou de l'autre

dépend principalement de l'espèce à transformer (Renaudin, Breton and Citti, 2014). D'après la littérature, *M. pneumoniae* se transforme uniquement par électroporation (Hedreyda, Lee and Krause, 1993; Hutchison *et al.*, 1999). Quatre marqueurs peuvent être utilisés pour la sélection des bactéries transformées. Du fait de l'absence de paroi, les mycoplasmes sont naturellement résistants aux β -lactamines (dont les pénicillines) ainsi qu'à tous les antibiotiques ciblant la paroi. De même, la présence d'une mutation conservée dans le gène codant la sous unité beta de l'ARN polymérase entraîne une insensibilité à la rifampicine (Atkinson, Balish and Waites, 2008). Les marqueurs de sélection disponibles pour *M. pneumoniae* sont donc le marqueur *tet*(M) (gène de résistance à la tétracycline) (Dybvig and Voelker, 1996), le marqueur *cat* (gène de résistance au chloramphénicol) (Hahn *et al.*, 1999), le marqueur *aacA-aphD* (gène de résistance à la gentamycine) (Hutchison *et al.*, 1999), et le marqueur *pac* (gène de résistance à la puromycine) (Algire *et al.*, 2009). Ce dernier a été décrit plus récemment, et est depuis largement utilisé, du fait d'une apparition de mutants résistants spontanés plus rare avec le marqueur *pac*.

Ces marqueurs peuvent être placés sous le contrôle de différents promoteurs, en fonction des constructions génétiques employées. Le promoteur classiquement utilisé chez les mycoplasmes est le promoteur du gène codant la spiraline (promoteur PS), une protéine majoritaire de la membrane de *Spiroplasma citri*. Il s'agit d'un promoteur fort constitutif (Lartigue *et al.*, 2002; Duret, André and Renaudin, 2005). Deux exemples d'utilisation des promoteurs du gène codant pour l'adhésine P65 et des gènes *tuf* ont été rapportés chez *M. pneumoniae*, pour réguler l'expression de protéines de fusion fluorescentes (Balish *et al.*, 2003; Kenri *et al.*, 2004). Plus récemment, une région régulatrice synthétique nommée « SynMycORR » a été conçue puis testée pour réguler l'expression de la transposase et de marqueurs de sélection chez quatre mycoplasmes dont *M. pneumoniae*. Les efficacités de transformation ont été augmentées de 30, 980 et 1036 fois pour *M. gallisepticum*, *M. feriruminatoris* et *M. agalactiae* respectivement (Montero-Blay *et al.*, 2019).

3. 2. Mutagenèse aléatoire par transposition

Ce type de mutagenèse consiste en l'introduction aléatoire dans un génome d'un transposon portant un marqueur de résistance, afin d'inactiver des gènes par disruption de la

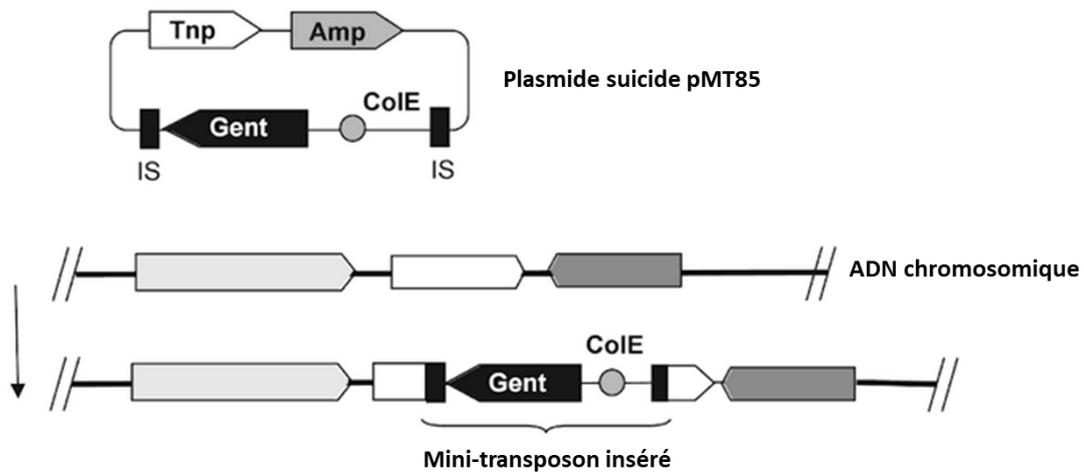


Figure 12. Schéma représentant le plasmide pMT85 et l'intégration du transposon dans le génome. Le plasmide pMT85 porte un transposon composé d'un marqueur de sélection à un antibiotique encadré par deux éléments IS (séquences d'insertion). Le gène codant pour la transposase (TnP) a été placé à l'extérieur des éléments IS. CoIE, origine de réplication d'*E. coli* ; Amp, marqueur de résistance à l'ampicilline ; Gent, marqueur de résistance à la gentamycine. (Image issue de Renaudin *et al*, 2014).

séquence codante ou des séquences de régulation. Une banque de mutants peut être obtenue, contenant probablement un ou plusieurs clones mutants pour le gène souhaité (Halbedel and Stülke, 2007). Les transposons les plus utilisés chez les mycoplasmes sont les transposons Tn916 (18 kbp, porte le marqueur *tet(M)*), et Tn4001 (4,7 kpb, porte le marqueur *aacA-aphD*), originaires d'*Enterococcus faecalis* et *Staphylococcus aureus*, respectivement (Lyon, May and Skurray, 1984; Clewell and Gawron-Burke, 1986; Hedreyda, Lee and Krause, 1993; Hutchison *et al.*, 1999; Lluch-Senar, Delgado, *et al.*, 2015). Le transposon Tn4001 a notamment été utilisé chez *M. pneumoniae* pour étudier l'essentialité de ses gènes, afin de déterminer le jeu de gènes minimal nécessaire au maintien de la vie d'une cellule. Plus de 2200 insertions ont été obtenues (Hutchison *et al.*, 1999).

La mutagenèse aléatoire par transposition présente quelques inconvénients : (i) elle n'est applicable qu'à des gènes non essentiels, et (ii) elle est associée à un problème de stabilité du transposon. En effet, celui-ci peut s'exciser spontanément de son *locus* initial et intégrer un nouveau site dans le génome. Face à ce problème, un nouveau plasmide suicide (pMT85) a été développé. Il contient un mini-transposon Tn4001 dont le gène codant la transposase se trouve à l'extérieur du transposon. Ce plasmide étant non répliatif, la transposase est rapidement perdue, ce qui permet une insertion stable du transposon chez *M. pneumoniae* (Figure 12) (Zimmerman and Herrmann, 2005; Hutchison *et al.*, 2019). Cependant, il a récemment été démontré que la disruption d'un gène par ce transposon peut induire des effets polaires sur l'expression des gènes adjacents (Hutchison *et al.*, 2019).

3. 3. Mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée permet de modifier ou d'inactiver des gènes candidats de manière spécifique. Chez les mycoplasmes, elle est liée à la capacité de l'organisme à réaliser la recombinaison homologe. Celle-ci peut se faire par l'intermédiaire d'un simple crossing-over (mutagenèse par insertion-duplication), ce qui entraîne l'intégration complète du plasmide dans le chromosome et ainsi la disruption du gène cible. Elle peut aussi se faire via un double crossing-over (échange allélique), ce qui entraîne le remplacement et donc la délétion du gène candidat. Le substrat de recombinaison est généralement composé d'un

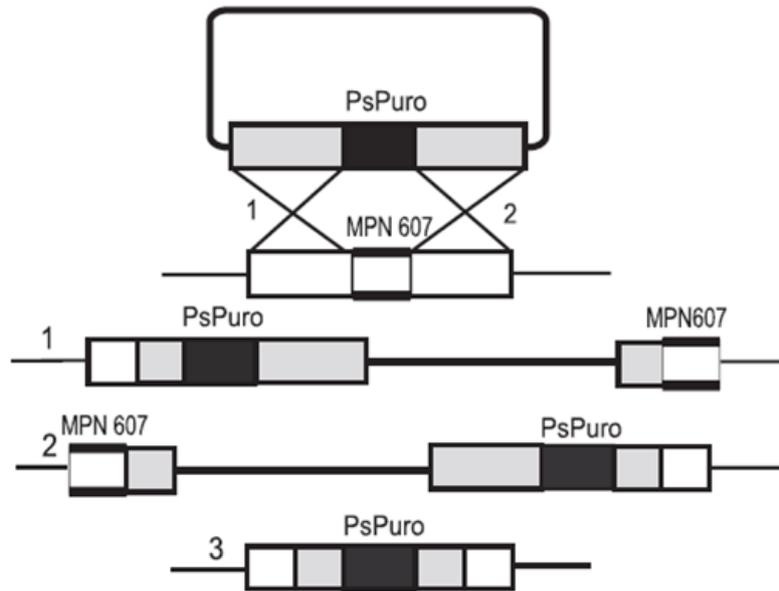


Figure 13. Schéma illustrant les évènements de recombinaison pouvant avoir lieu entre le plasmide et l'ADN chromosomique. Il s'agit d'un exemple d'inactivation du gène *MPN607* de *M. pneumoniae*. Les numéros 1 et 2 illustrent la réalisation d'un simple crossing-over. Le numéro 3 illustre la réalisation d'un double crossing-over. (Image issue de Krishnakumar *et al*, 2010).

marqueur de sélection entouré de deux régions identiques à la zone du génome à modifier. La taille de ces séquences dépend de l'efficacité des systèmes de recombinaison homologue intrinsèque à l'organisme étudié.

Ce type de mutagenèse peut être effectuée en utilisant des plasmides réplicatifs ou non réplicatifs (plasmides suicides).

3. 3. 1. Mutagenèse dirigée en utilisant un plasmide suicide

Un plasmide suicide est un plasmide non réplicatif, c'est-à-dire qu'il ne contient pas d'origine de répllication fonctionnelle chez l'espèce dans laquelle il est introduit. Le plasmide est donc perdu au fur et à mesure des divisions cellulaires.

Un seul exemple de mutagenèse dirigée en utilisant un plasmide suicide a été rapporté dans la littérature pour *M. pneumoniae*. Les auteurs ont utilisé un plasmide portant un marqueur de résistance à la puromycine, entouré de deux régions de 1 kpb identiques à la zone du génome à modifier (Figure 13). Ils ont obtenu, avec une efficacité relativement faible, des transformants *M. pneumoniae* pour deux souches différentes, les souches M129 et FH (Krishnakumar *et al.*, 2010). Ce type de mutagenèse est très souvent employé chez *M. genitalium*, une espèce qui dispose d'un système de recombinaison efficace (Dhandayuthapani, Rasmussen and Baseman, 1999). Le principal inconvénient de cette technique réside dans le fait que chez certains mycoplasmes la fréquence des évènements de recombinaison est faible voire nulle. Le plasmide étant perdu rapidement, cela ne laisse pas toujours le temps nécessaire pour que des évènements de recombinaison homologue aient lieu. Dans le cas de *M. pneumoniae*, bien que les protéines RecA et SSB impliquées dans la recombinaison homologue semblent fonctionner normalement, les protéines RuvA et RuvB seraient quant à elles moins actives. *M. pneumoniae* serait également incapable de produire une protéine RecU fonctionnelle, ce qui pourrait expliquer son taux relativement faible de recombinaison homologue (Sluijter *et al.*, 2012).

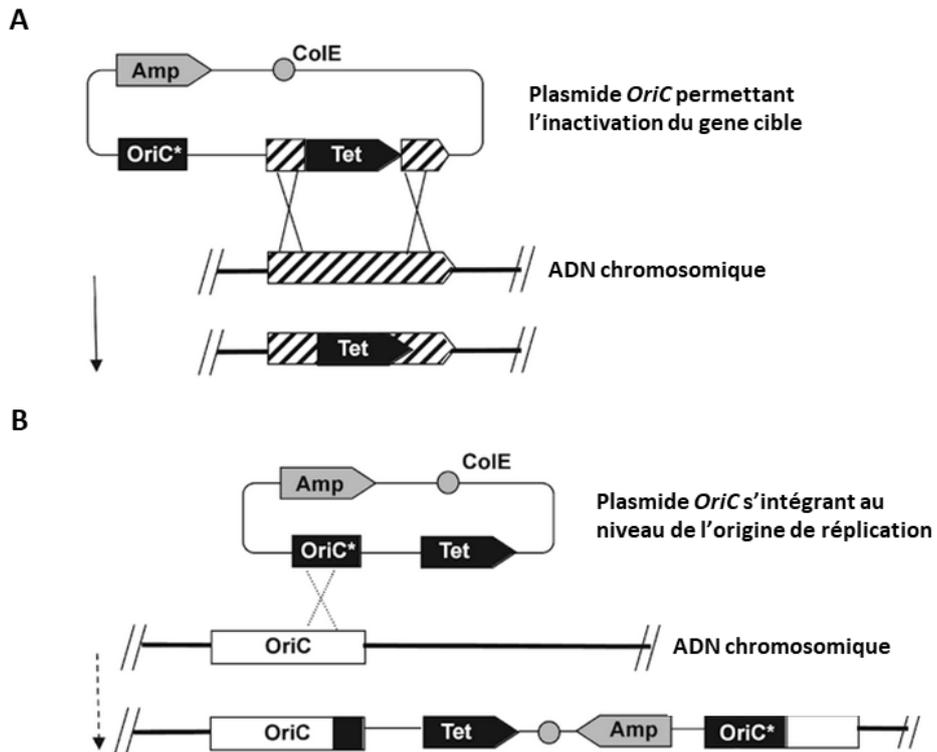


Figure 14. Schéma illustrant la recombinaison homologue entre un plasmide *OriC* et l'ADN chromosomique. **(A)** Inactivation d'un gène par insertion d'un marqueur de résistance à la tétracycline (Tet). **(B)** Intégration du plasmide *OriC* au niveau de l'origine de réplication chromosomique. ColE, origine de réplication d'*E. coli*; Amp, marqueur de résistance à l'ampicilline. (Image issue de Renaudin *et al*, 2014).

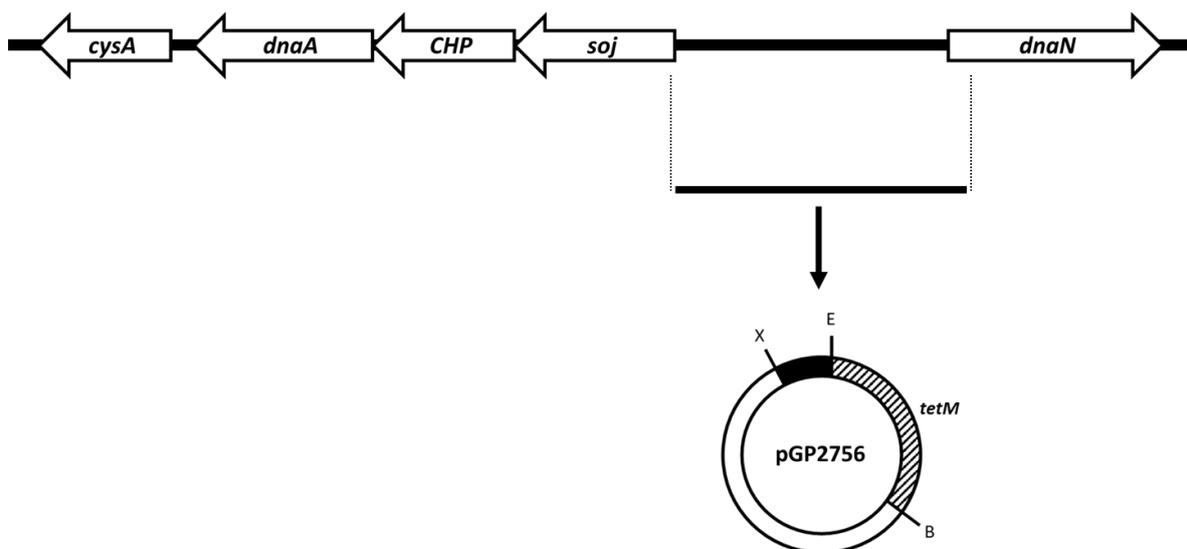


Figure 15. Schéma illustrant l'organisation de l'origine de réplication de *M. pneumoniae*, ainsi que la région sélectionnée pour la construction du pGP2756 (*pOriC*). (Image issue de Blötz *et al*, 2018).

3. 3. 2. Mutagenèse dirigée en utilisant un plasmide répliatif

Un plasmide répliatif possède une origine de répliation fonctionnelle dans les cellules transformées, ce qui lui permet d'être répliaté indépendamment du chromosome et d'être transmis aux cellules filles au cours des divisions cellulaires. Contrairement au plasmide suicide, il laisse le temps pour que des événements de recombinaison homologue aient lieu, entre le plasmide et l'ADN chromosomique.

Les plasmides répliatifs les plus utilisés chez les *Mollicutes* sont les plasmides *oriC*, des plasmides artificiels contenant l'origine de répliation chromosomique complète (~2kpb) de l'espèce à transformer ainsi qu'un fragment interne du gène à inactiver. La région *oriC*, siège de l'initiation de la répliation, inclue le gène *dnaA* codant la protéine DnaA ainsi que les régions bordantes 5' et 3' portant les boîtes DnaA sur lesquelles la protéine DnaA vient se fixer pour amorcer la répliation. Les plasmides *oriC* sont généralement maintenus comme des éléments extra-chromosomiques au cours des premiers passages, puis finissent par s'intégrer au chromosome au cours de la propagation des cellules. Cette intégration peut avoir lieu soit au niveau de l'*oriC*, soit au niveau du gène cible (Figure 14) (Renaudin *et al.*, 1995; Duret *et al.*, 1999; Cordova *et al.*, 2002; Lartigue *et al.*, 2002, 2003; Chopra-Dewasthaly, Zimmermann, *et al.*, 2005; Janis *et al.*, 2005; Lee, Browning and Markham, 2008; Maglennon *et al.*, 2013; Nieszner *et al.*, 2013; Shahid *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Ishag *et al.*, 2016, 2017; Matteau *et al.*, 2017). La construction de vecteurs *oriC* avec une origine de répliation réduite aux séquences minimales permettant la répliation a permis d'augmenter la fréquence de recombinaison au gène cible (Lartigue *et al.*, 2002).

Un plasmide *oriC* a récemment été développé pour *M. pneumoniae*, il s'agit du plasmide pGP2756. Son efficacité et son utilité ont été démontrées au cours d'essais de complémentation fonctionnelle. Ainsi, ce nouveau plasmide répliatif a permis de compléter un mutant pour le gène *glpQ*, restaurant la capacité de *M. pneumoniae* à produire du peroxyde d'hydrogène. Contrairement aux autres plasmides *oriC*, celui-ci contient une extrémité du gène *soj*, une extrémité du gène *dnaN*, et la région intergénique comprise entre ces deux gènes (Figure 15). Le pGP2756 est maintenu de manière stable chez *M. pneumoniae*, pendant au moins cinq passages. Il peut être utilisé chez *M. genitalium*, mais pas chez les espèces *M. gallisepticum* et *M. capricolum* (Blötz *et al.*, 2018).

L'utilisation des plasmides *oriC* présente un certain nombre de limitations. En effet, il n'existe pas de plasmide réplcatif fonctionnel utilisable pour l'ensemble des mycoplasmes, il est donc nécessaire d'en construire un pour chaque espèce. Ces plasmides sont parfois extrêmement compliqués à développer. En effet, il peut être parfois difficile d'identifier les régions *oriC* de certains organismes. De même, certaines espèces ne les maintiennent pas au cours des divisions cellulaires. Tout comme pour l'utilisation des plasmides suicides, l'utilisation des plasmides *oriC* est dépendante de l'efficacité de recombinaison de l'organisme concerné, or de nombreux mycoplasmes ont une efficacité de recombinaison faible.

Tous les outils de mutagenèse aléatoire et dirigée cités ci-dessus s'avèrent inefficaces sur des espèces réfractaires à la transformation. De plus, ces techniques permettent l'obtention de mutant individuels, mais pas de modifier un génome de mycoplasme à grande échelle. Face à ces limitations, des outils de biologie de synthèse ont été développés, permettant ainsi d'élargir le champ de la recherche concernant ces bactéries.

4. OUTILS DE BIOLOGIE DE SYNTHESE POUR LA MODIFICATION DE GENOMES BACTERIENS

4. 1. La biologie de synthèse

La première mention du terme « biologie synthétique » peut être retracée à un manuscrit écrit en 1912 par le chimiste français Stéphane Leduc (Leduc, 1912). Dans cet ouvrage, intitulé « La Biologie Synthétique », l'auteur mentionne que « La biologie est une science comme les autres [...] elle doit être successivement descriptive, analytique et synthétique. ». Cette notion de synthèse indique que grâce à l'accumulation de connaissances dans un champ de science, il est à terme possible de recréer *de novo* les objets que l'on y étudie. Ce concept est décrit en des termes plus abordables dans une citation attribuée au physicien Richard Feynman « What I cannot create, I do not understand. »; la capacité à produire des systèmes biologiques servant donc de validation à notre compréhension des mécanismes du vivant.

Du fait de l'avancement continu de nos connaissances, le concept de biologie de synthèse est en perpétuelle évolution. Sa définition exacte varie en fonction de la période, et des objectifs fondamentaux ou appliqués dévolus à la biologie. Cependant, deux grandes idéologies complémentaires se dessinent : la re-conception et la fabrication de composants et

de systèmes biologique existants dans la nature ; et la conception et la fabrication de composants et de systèmes biologiques non-naturels.

L'émergence pratique de la biologie de synthèse remonte aux années 1960-1970, avec la mise en avant des théories fondamentales de la biologie moléculaire, et les premières expériences de production d'ADN recombinant (Mertz and Davis, 1972). Au cours des décennies suivantes, la biologie de synthèse voit son développement renforcé par la volonté d'appliquer au vivant les principes de l'ingénierie et de l'informatique. La discipline devient de plus en plus transversale, et s'enrichit de la collaboration entre biochimistes, mathématiciens, chimistes, physiciens, informaticiens et ingénieurs.

Ceci permet une grande progression des outils de biologie moléculaire, notamment dans le domaine de la génétique classique et de la génétique inverse, permettant ainsi une meilleure compréhension du monde biologique. Dans les années 1990, les techniques standards de biologie moléculaire sont devenues des outils indispensables aux sciences biologiques. De même, l'essor des méthodes de synthèse chimique de l'ADN font que la synthèse d'ADN prend une part de plus en plus importante dans les outils de biologie moléculaire. La synthèse de petits génomes viraux, et éventuellement bactériens et de quelques chromosomes eucaryotes devient alors possible. Par exemple, il a été rapporté la première construction d'un chromosome entier de levure (Annaluru *et al.*, 2014), d'un génome bactérien et d'un génome bactérien réduit (Gibson, Benders, Andrews-Pfannkoch, *et al.*, 2008; Hutchison *et al.*, 2016). Ainsi, la biologie de synthèse inclut la « génomique synthétique » mais ne s'y restreint pas. Elle implique classiquement la conception et l'assemblage de systèmes biologiques, à des fins de recherche ou d'applications pratiques. Les principales marques de la biologie de synthèse actuelle sont la synthèse d'ADN, le développement d'outils d'édition de génome, et le développement d'outils de modélisation informatique (Nesbeth, 2016; Gibson *et al.*, 2017).

La biologie de synthèse est donc une discipline à l'interface entre la biologie moléculaire et la bio-ingénierie. Elle se détache des autres approches comme les biotechnologies, la biologie systémique ou l'ingénierie métabolique (qui elles aussi font intervenir de nombreuses disciplines telles que la bio-informatique, la modélisation mathématique, la chimie, ...) par ses objectifs. Son but est de prouver que la compréhension moléculaire de la biologie peut être exploitée et définie par des cadres archétypiques d'ingénierie. Ainsi, une définition possible de la biologie de synthèse pourrait être l'ensemble

des approches dont l'objectif est l'étude et l'ingénierie de systèmes biologiques, dans le but d'utiliser ces approches pour (i) la recherche fondamentale (découvrir et comprendre les phénomènes biologiques naturels), et (ii) des applications pratiques (construire de nouveaux objets utiles pour l'homme ou l'environnement et qui répondent à des besoins) (Nesbeth, 2016).

La biologie de synthèse est un domaine en pleine expansion. Ses ambitions sont de résoudre les problèmes mondiaux tels que la pollution, la crise énergétique, le réchauffement climatique et les maladies. Elle fait aujourd'hui partie de la culture populaire, depuis la publicité qui a été faite autour de l'annonce de « la première cellule sous le contrôle d'un génome synthétisé chimique », par John Craig Venter en 2010 (Gibson *et al.*, 2010).

4. 1. 1. Cellule minimale

Le concept de cellule minimale est très présent dans le domaine de la biologie de synthèse (Cordova *et al.*, 2016). Cette notion est née dans les années 1930, lorsqu'un groupe de physiciens, chimistes et biologistes ont émis l'idée que la compréhension de la vie cellulaire pourrait se faire via l'étude du système biologique le plus simple, à savoir les cellules. Ils adoptèrent une approche réductionniste qui vise à penser que la compréhension du fonctionnement de la vie se fait en identifiant et en déterminant comment fonctionne chaque élément essentiel d'une cellule vivante (Morange, 2000).

Par définition, une cellule minimale contient seulement les gènes nécessaires et suffisants pour croître de manière autonome dans des conditions de laboratoire optimales (en absence de stress et en présence de tous les nutriments nécessaires). Les gènes d'une cellule minimale sont donc qualifiés d'essentiels (Glass *et al.*, 2017).

En 1984, Morowitz indique que les mycoplasmes sont les cellules les plus simples capables de croissance autonome, et propose que ces bactéries soient utilisées comme modèle pour la compréhension des principes de base de la vie (Morowitz, 1984). En effet, les mycoplasmes sont des cellules quasi-minimales, du fait de l'absence de paroi, de la simplicité de leur métabolisme, et de leur génome réduit. De plus, leur mode de vie parasitaire et leur évolution réductive font de ces organismes des bases idéales pour l'étude du jeu minimal de gènes nécessaires à la vie.

Une étape préliminaire à la construction d'une cellule minimale est l'identification du jeu de gènes essentiels. En effet, les gènes sont classés en trois catégories : (i) les gènes essentiels (E), c'est-à-dire les gènes dont l'inactivation entraîne la mort de la cellule, (ii) les gènes non essentiels (NE), il s'agit des gènes dont l'inactivation n'a aucun effet sur la viabilité ou la croissance des cellules, et (iii) les gènes quasi-essentiels (QE) qui sont des gènes dont l'inactivation altère la croissance des cellules, mais qui ne sont pas strictement essentiels (Lluch-Senar, Delgado, *et al.*, 2015; Hutchison *et al.*, 2016). L'identification des gènes essentiels a d'abord été réalisée de manière bio-informatique. En effet, l'année 1995 marque le début du séquençage de génomes, permettant ainsi la naissance de l'ère de la génomique puis de la génomique comparative. En 1996, une comparaison des gènes orthologues entre une bactérie dérivant d'un ancêtre commun aux bactéries Gram-positif (*Mycoplasma genitalium*) et une bactérie Gram-négatif (*Haemophilus influenzae*) a permis de déterminer un jeu de 256 gènes responsable des fonctions principales d'une cellule minimale (Mushegian and Koonin, 1996). Quelques années après, il a été identifié un jeu de 206 gènes codants pour des protéines, qui seraient hautement conservés chez des organismes minimaux (tels que *M. genitalium* et *Buchnera aphidicola*), mais également chez des organismes comme *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis* (Gil *et al.*, 2004). Un autre moyen de déterminer quels sont les gènes essentiels d'un organisme est de les identifier expérimentalement, par inactivation de gènes individuels. Une première approche de mutagenèse globale par transposition a été réalisée en 1999 sur *M. genitalium* et *M. pneumoniae*. La combinaison des résultats obtenus indiqua qu'il y aurait entre 265 et 350 gènes essentiels chez *M. genitalium* (Hutchison *et al.*, 1999). Le même type d'analyse a également été réalisé chez *M. pulmonis*, pour lequel 468 gènes seraient essentiels ou quasi-essentiels (French *et al.*, 2008). Concernant *M. pneumoniae*, une analyse de mutagenèse encore plus poussée a été réalisée, et a permis d'identifier 332 gènes essentiels, 259 gènes non essentiels et 93 gènes quasi-essentiels (Lluch-Senar, Delgado, *et al.*, 2015). Ce type d'approche a aussi été menée sur la cellule synthétique *M. mycoides* JCVI-Syn1.0 (1080 kpb, 901 gènes). Il s'agit de la copie exacte du génome naturel de *M. mycoides* subsp. *capri* (Gibson *et al.*, 2010). Les premières expériences de mutagenèse ont conduit à l'identification de 432 gènes non essentiels. Sur la base de ces résultats, un nouveau génome a été conçu et synthétisé (576 kpb, 516 gènes), pour lequel la majorité des 432 gènes non essentiels sont absents. De nouvelles expériences de mutagenèse sur la cellule *M. mycoides* JCVI-Syn2.0 permirent cette fois-ci l'identification de 90 gènes non essentiels. Comme précé-

-demment, un nouveau génome fut synthétisé (JCVI-Syn3.0, 531 kpb, 473 gènes) à partir de ces données (Hutchison *et al.*, 2016). Si nous revenons aux quatre espèces citées dans ce paragraphe (*M. genitalium*, *M. pneumoniae*, *M. mycoides* et *M. pulmonis*), il semblerait de manière générale que le nombre de gènes essentiels se situe aux environs de 400, et que le nombre de gènes non essentiels varie selon la taille des génomes (Glass *et al.*, 2017).

Une fois les gènes essentiels identifiés, la construction de la cellule minimale peut être envisagée. Deux approches permettent d'y parvenir : l'approche « top-down » et l'approche « bottom-up ». Le principe de l'approche « top-down » est de partir d'une cellule « naturelle » viable et de lui enlever des gènes afin de réduire son génome. La viabilité de la cellule est testée à chaque étape, et le processus est répété jusqu'à impacter le fonctionnement de la cellule (Glass *et al.*, 2017). Cette stratégie a été utilisée au cours du projet de minimisation du génome JCVI-Syn1.0 (dans le but de construire JCVI-Syn3.0): 22 cycles consécutifs de délétions ont été réalisés, ce qui aboutit à l'élimination de 255 gènes soit 357 kpb, correspondant à 28% soit 33% du génome, respectivement (Hutchison *et al.*, 2016). A l'inverse, l'approche « bottom-up » comprend le design, la synthèse et l'installation dans une nouvelle cellule d'un génome minimal ou réduit (Lartigue *et al.*, 2007, 2009). Elle fut utilisée pour construire la première cellule contrôlée par un génome synthétique *M. mycoides* JCVI-Syn1.0 ainsi que la cellule minimale *M. mycoides* JCVI-Syn3.0 (Gibson *et al.*, 2010; Hutchison *et al.*, 2016). Elle fût également utilisée dans le but d'obtenir la cellule *M. genitalium* JCVI-1.0, mais pour cette dernière les techniques de transplantation de génome n'étant pas disponible seul le génome synthétique *M. genitalium* JCVI-1.0 a été obtenu (Gibson, Benders, Andrews-Pfannkoch, *et al.*, 2008; Gibson, Benders, Axelrod, *et al.*, 2008).

L'étude de la fonction des gènes d'une cellule minimale permet d'alimenter des modèles bio-informatiques. L'objectif de ces modèles est de mimer le comportement de la cellule, ainsi que de prédire sa réponse suite à un changement dans son génome ou son environnement. De cette manière, ils contribuent eux-mêmes à améliorer la compréhension du fonctionnement cellulaire de base inhérent à la vie (Karr *et al.*, 2012).

Une des applications de ces cellules minimales est la construction de cellules plus complexes, par ajout de gènes et/ou de voies métaboliques.

4. 1. 2. Châssis bactérien

En biologie de synthèse, le terme de « châssis » fait référence à un organisme qui sert d'hôte d'accueil pour héberger physiquement des composants génétiques, et qui les rend actifs en leur fournissant les ressources nécessaires à leur fonctionnement, tels que les machineries de transcription et de traduction (Adams, 2016).

Un châssis permet l'expression et la régulation de circuits génétiques pouvant lui conférer de nouvelles fonctions. Sa conception est possible grâce à la combinaison de techniques de synthèse chimique de l'ADN, d'édition de génome et d'assemblage d'ADN. Ce champ de la biologie de synthèse est souvent lié à l'ingénierie métabolique, une discipline qui combine des approches de biologie moléculaire, de biochimie, de biophysique et de bio-informatique, dans le but d'implémenter de nouvelles voies de biosynthèse (Gibson *et al.*, 2017).

Pour qu'un châssis soit considéré comme un idéal, un certain nombre de conditions doivent être remplies, à savoir : (i) il est nécessaire de disposer de connaissances suffisantes sur le micro-organisme ciblé afin d'avoir une base pour l'élaboration d'un milieu de culture et de bioprocédés, et (ii) d'avoir à disposition des outils de manipulation génétiques pour pouvoir faire de l'ingénierie. L'organisme en question doit (iii) avoir des besoins nutritionnels simples, (iv) être capable de croître rapidement, (v) de résister à des stress physico-chimiques et (vi) à certaines conditions extrêmes (température, pH, ...), et également (vii) posséder un système de sécrétion efficace (naturel ou apporté par ingénierie) pour permettre la production de molécules d'intérêt. Les organismes capables de remplir toutes ces fonctions sont essentiellement *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, diverses espèces de *Streptomyces*, *Pseudomonas putida* et *Corynebacterium glutamicum*. Ils sont principalement utilisés pour la production d'antibiotiques, d'acides aminés (glutamate et lysine), d'acides organiques et de diamides. Les châssis présentent de nombreuses applications dans le domaine de la médecine, de l'agriculture et de l'industrie (Ro *et al.*, 2006; Ajikumar *et al.*, 2010; Paddon and Keasling, 2014; Calero and Nickel, 2019).

En termes d'exemples de châssis bactériens, nous pouvons citer l'utilisation de bactéries comme véhicules pour la thérapie génique contre le cancer. Leur rôle est de délivrer des molécules thérapeutiques telles que de l'ADN, de l'ARN ou des « nanobodies » directement au sein des tumeurs (Baban *et al.*, 2010; Chowdhury *et al.*, 2019). De même, la

bactérie *Lactobacillus jensensii* a été modifiée de manière à sécréter deux domaines protéiques CD4, ce qui lui permet de se lier aux particules virales du VIH de type 1 et ainsi d'empêcher ce dernier d'entrer dans des cellules cibles, diminuant son infectiosité (Chang *et al.*, 2003). Un autre exemple est le châssis ActoBiotics™, la seule thérapie bactérienne en cours de développement commercial. Ce châssis est basé sur la bactérie *Lactococcus lactis* qui a été modifiée de façon à sécréter des peptides ou des protéines thérapeutiques dans le tractus gastro-intestinal. Par exemple, elle peut délivrer de l'interleukine-10 dans l'intestin pour lutter contre l'inflammation.

La construction d'un châssis bactérien pourrait également être réalisée à partir d'une cellule minimale, notamment afin de réduire au maximum les interférences possibles entre les circuits génétiques et les voies métaboliques intégrés, et ceux déjà présents dans le châssis.

4. 2. Outils d'édition des génomes bactériens

Ces dernières années, de nouveaux outils permettant une ingénierie génétique à grande échelle ont été développés. Ils sont abordés ici dans le contexte de la biologie de synthèse, mais il s'agit avant tout d'outils de biologie moléculaire, et plus précisément d'édition de génome, qui sont utilisés dans d'autres approches telles que la génétique inverse, les biotechnologies, ou encore la biologie intégrative.

Les outils cités ici sont des outils d'édition génétique basés sur la recombinaison homologue. En effet, la recombinaison est une technologie *in vivo* rapide, précise, efficace et plus pratique que les méthodes de modification classiques *in vitro*, telles que la restriction enzymatique et la ligature. Elle permet de réaliser des insertions, délétions ou remplacements de séquences d'ADN sans dépendre de la présence d'un site de restriction (Thomason *et al.*, 2014). Parmi les outils les plus employés, figurent les systèmes lambda Red, RecET, Cre-Lox et CRISPR-Cas9 (Jinek *et al.*, 2012; Krishnakumar *et al.*, 2014; Casjens and Hendrix, 2015; Song and Palmiter, 2018).

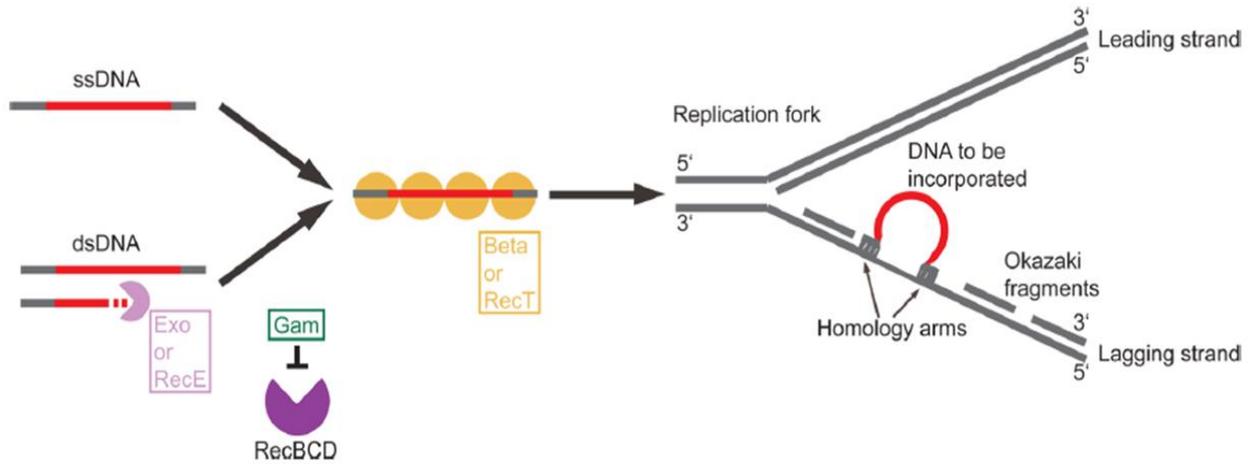


Figure 16. Schéma illustrant le fonctionnement des systèmes lambda Red (Exo, Beta, Gam) et RecET (RecE et RecT). Gam empêche la nucléase RecBCP de dégrader l'ADN double brin linéaire. Exo et RecE ont une activité exonucléase 5'-3' sur l'ADN double brin, ce qui génère de l'ADN simple brin. Beta et RecT se lient à l'ADN simple brin, favorisent l'hybridation des ADN simples brins entre eux, et favorisent la recombinaison. L'ADN entrant s'hybride au brin antisens et se comporte comme un fragment d'Okasaki. (Image issue de Pines *et al*, 2015)

4. 2. 1. Les systèmes lambda Red et RecET

Les premières publications décrivant l'utilisation des systèmes lambda Red et RecET remontent à 1998 (Murphy, 1998; Zhang *et al.*, 1998; Casjens and Hendrix, 2015). Ces deux outils ont été développés chez *Escherichia coli*, et sont transférables à d'autres espèces bactériennes. Ils permettent de réaliser un certain nombre de modifications génétiques, telles que des insertions, délétions et des substitutions. Ces modifications peuvent être réalisées aussi bien sur le chromosome d'*E. coli*, que sur les plasmides qu'elle maintient (Yu *et al.*, 2000). Il s'agit donc d'outils puissants qui permettent de faire de la génétique ciblée, via de la recombinaison « site-spécifique » (Mosberg, Lajoie and Church, 2010). Ils présentent également l'avantage de ne pas dépendre de la présence d'un site de reconnaissance pour la recombinaison (Pines *et al.*, 2015). Un autre avantage de ces techniques est qu'elles ne laissent pas de « cicatrices » dans le génome édité.

Le système lambda Red est issu du phage lambda, et le système RecET du prophage Rac, tous deux ayant été isolés à partir d'*E. coli*. Les gènes du système lambda Red (*gam*, *exo* et *beta*) font partie des premiers gènes de recombinaison décrits, ils sont regroupés au sein de l'opéron P_L (Poteete, 2001). La protéine Gam a pour fonction de prévenir la dégradation de l'ADN linéaire par les nucléases RecBCD ou sbcCD (Figure 16). Pour y parvenir, elle se lie à ces nucléases et inhibe ainsi leurs activités enzymatiques. Elle permet donc de préserver *in vivo* l'ADN linéaire transformé. La protéine Exo présente quant à elle une activité exonucléasique 5'-3', qui lui permet de générer des fragments linéaires d'ADN à extrémités sortantes 3' simple brin. Enfin, la protéine Beta se lie à ces régions simples brins afin de les protéger et de faciliter la recombinaison, en favorisant l'hybridation de l'ADN exogène à la région génomique homologue au niveau du site cible (Sharan *et al.*, 2009). Il est proposé que les régions d'ADN simples brins liées à la protéine Beta s'hybrident avec l'ADN simple brin complémentaire au niveau de la fourche de réplication, pendant la réplication de l'ADN (Figure 16) (Court *et al.*, 2002). Le système RecET fonctionne de la même manière (Figure 16). Il est composé des protéines RecE et RecT, qui ont des fonctions analogues aux protéines Exo et Beta, respectivement (Thomason, Costantino and Court, 2016).

Les outils lambda Red et RecET ont pour substrat de l'ADN linéaire simple brin ou double brin. Ils sont capables de réaliser la recombinaison de séquences homologues très courtes (entre 35 et 50 bases), ce qui permet d'utiliser des oligonucléotides synthétiques com-

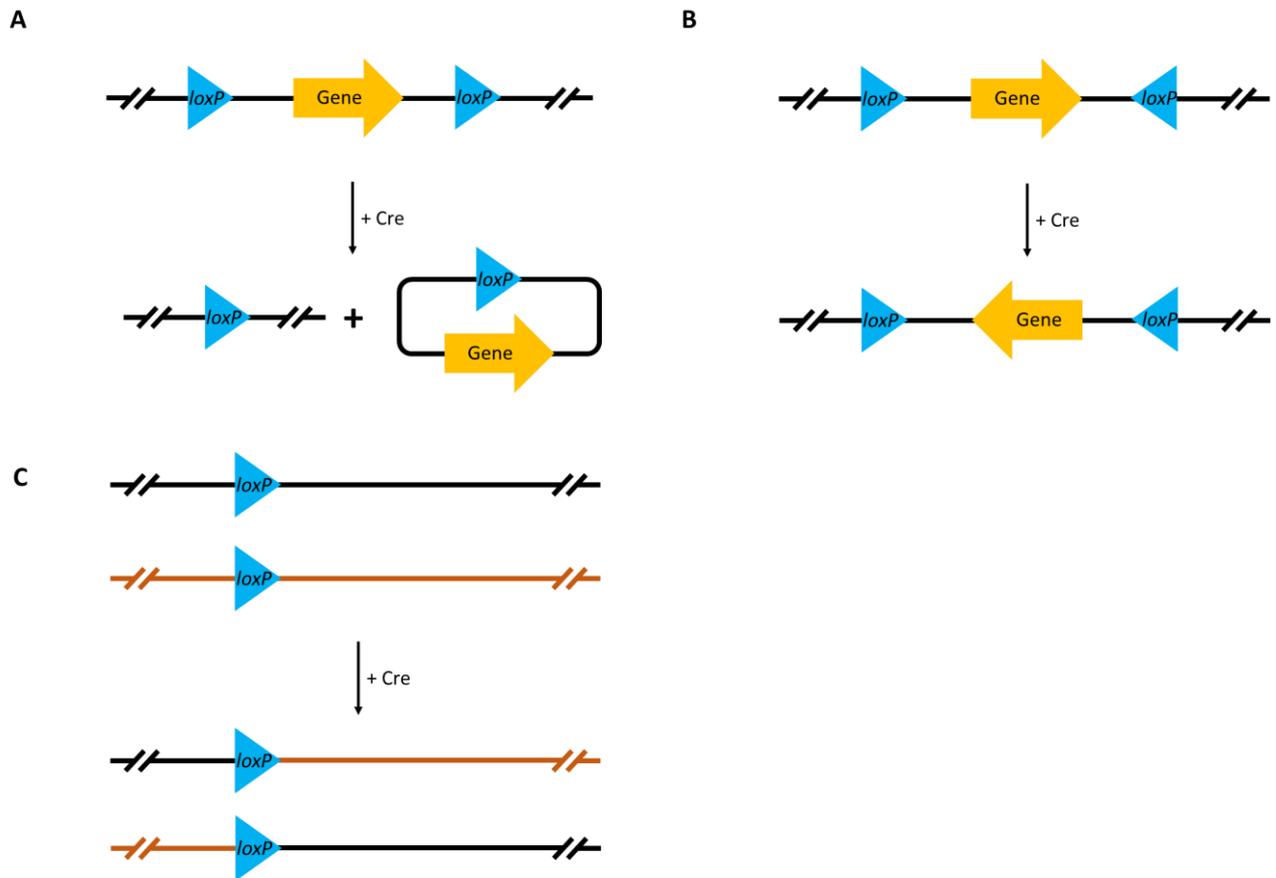


Figure 17. Schéma illustrant les trois modifications possibles en utilisant le système Cre-Lox, en fonction de l'orientation des sites *loxP*. A, Excision ; B, Inversion ; C, Translocation.

-me substrats (Thomason *et al.*, 2014). De même, il est nécessaire que l'expression des gènes *gam*, *exo* et *beta* soient régulée via l'utilisation d'un promoteur inductible (promoteur *lac*), du fait de la toxicité de la protéine Gam, mais aussi afin de minimiser les réarrangements indésirables qui peuvent avoir lieu entre des séquences d'ADN répétées (Sharan *et al.*, 2009).

4. 2. 2. Le système Cre-Lox

Le système Cre-Lox est issu du bactériophage P1, isolé à partir d'*E. coli*, et a été découvert dans les années 1980 (Sternberg and Hamilton, 1981). Il est composé d'une recombinase, appelée Cre, et de sites de reconnaissances pour la recombinase appelés sites *loxP*. Les sites *loxP* sont des séquences d'ADN spécifiques de 34 pb, composées de deux séquences répétées inversées de 13 pb chacune, séparées par un « spacer » de 8 pb. Ce dernier participe à l'échange de brins d'ADN pendant la recombinaison. Les séquences des sites *loxP* ont été retrouvées exclusivement dans le génome du phage P1, ce qui les rend utilisables pour des manipulations génétiques spécifiques dépourvues d'effets indésirables (Song and Palmiter, 2018).

Ce système fonctionne selon le mécanisme suivant : généralement deux sites *loxP* sont présents sur la molécule d'ADN à modifier, un de chaque côté du gène d'intérêt. Au niveau de chaque site *loxP*, un dimère constitué de deux protéines *cre* va se former et se lier à l'ADN. Les deux sites *loxP* se retrouvent ainsi orientés de manière opposés, en présence d'un tétramère de protéines *cre*. Cette conformation favorise le clivage de l'ADN au centre des sites *loxP*, et donc l'évènement de recombinaison. Selon l'orientation des sites *loxP*, trois modifications sont possibles (Figure 17). En effet, deux sites *loxP* présents sur un même fragment d'ADN et orientés dans la même direction conduisent à l'excision du fragment d'ADN de manière irréversible. La présence de deux sites *loxP*, toujours sur la même molécule d'ADN, mais cette fois-ci orientés dans des directions opposées, provoque l'inversion du fragment d'ADN compris entre les deux sites *loxP*. Au cours de ce type de modification, l'orientation des sites *loxP* reste inchangée, le gène peut donc subir une inversion de manière réversible. La troisième modification envisageable est la translocation. Dans ce cas-là, des sites *loxP* sont présents sur deux molécules d'ADN différentes (Tronche *et al.*, 2002).

Table 2. Sites lox mutants. (Tableau issu de Missirlis *et al*, 2006).

loxP site	Left inverted repeat sequence	Spacer (5'→3')	Right inverted repeat sequence
Wild-type	ATAACTTCGTATA	ATGTATGC	TATACGAAGTTAT
lox 511	ATAACTTCGTATA	ATGTATaC	TATACGAAGTTAT
lox 5171	ATAACTTCGTATA	ATGTgTaC	TATACGAAGTTAT
lox 2272	ATAACTTCGTATA	AaGTATcC	TATACGAAGTTAT
m2	ATAACTTCGTATA	AgaaAcca	TATACGAAGTTAT
m3	ATAACTTCGTATA	taaTAcca	TATACGAAGTTAT
m7	ATAACTTCGTATA	AgaTAgaa	TATACGAAGTTAT
m11	ATAACTTCGTATA	cgaTAcca	TATACGAAGTTAT
lox 71	taccgTTCGTATA	ATGTATGC	TATACGAAGTTAT
lox 66	ATAACTTCGTATA	ATGTATGC	TATACGAAcgga

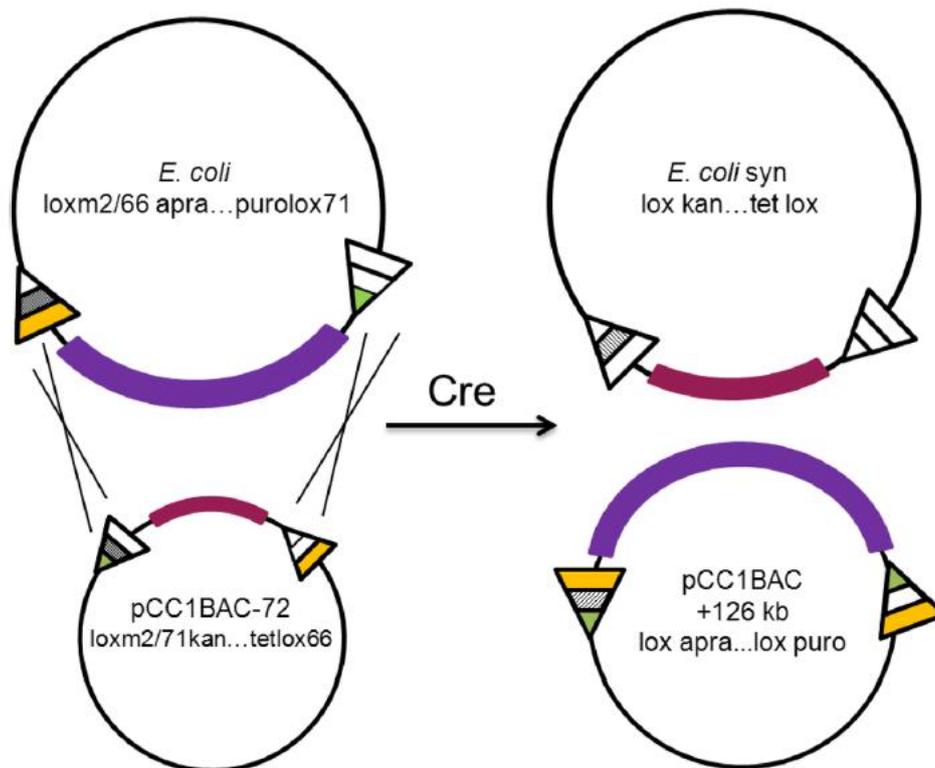


Figure 18. Schéma illustrant la méthode RMCE. Il s'agit d'un exemple de recombinaison, effectué par la recombinase Cre, entre une région d'ADN située sur le génome d'*E. coli* et un fragment d'ADN présent sur le plasmide pCC1BAC. La recombinaison homologue a lieu entre les sites *loxm2/66* et *loxm2/71* en 5' de la séquence d'ADN cible, et entre les sites *lox71* et *lox66* du côté 3'. Elle aboutit à l'échange des régions d'ADN entourées des sites *lox*. Ceci génère de nouveaux sites *lox* ne pouvant plus recombiner, permettant ainsi l'intégration stable de la cassette d'ADN dans le génome d'*E. coli*. (Image issue de la publication Krishnakumar *et al*, 2014)

Récemment, des modifications ont été apportées au système afin d'utiliser de nouveaux sites *lox* synthétiques qui ne recombinent pas entre eux, ni avec les sites *loxP* sauvages (Table 2). Ces sites *lox* synthétiques ont été modifiés au niveau des séquences de reconnaissance de 13 pb, via l'insertion d'une combinaison de mutations inversées et répétées (ce sont les sites *lox* 66 et 71). Une autre modification réalisée a été la mutation des 8 pb du spacer (ce sont les sites *lox* m2, m3, m7, m11, 511, 5171 et 2272). Enfin, des sites *lox* combinant ces deux types de modifications ont également été conçus (ce sont par exemple les sites *lox*m2/66 et *lox*m2/71). Ils présentent l'avantage de pouvoir orienter l'insertion d'une cassette dans un sens ou dans un autre, via l'utilisation de site *lox* mutés différents de part et d'autre de la cassette d'intérêt (Langer *et al.*, 2002; Missirlis, Smailus and Holt, 2006).

L'utilisation des sites *lox* est à l'origine du développement du RMCE (Recombinase-Mediated Cassette Exchange). Cette technique consiste en une réaction de recombinaison qui permet l'échange d'une cassette d'ADN par une autre. En effet, elle permet l'intégration unilatérale d'un fragment d'ADN depuis un plasmide donneur vers un *locus* génomique prédéterminé. Elle implique deux événements de recombinaison entre deux sites *lox* hétérospécifiques, présents au niveau du site cible sur le génome et au niveau du plasmide donneur (Figure 18) (Langer *et al.*, 2002; Noskov *et al.*, 2015).

Le système Cre-Lox peut être combiné à l'utilisation d'autres recombinaisons, telles que le système FLP/FRT ou les recombinaisons R4, lambda, phi31, HK022 et TP901-1, ce qui permet d'étendre la complexité des modifications génétiques envisagées. Cet outil est également utilisé chez de nombreuses espèces bactériennes autres que les espèces modèles *E. coli* et *B. subtilis* (Tronche *et al.*, 2002).

4. 2. 3. Le système CRISPR-Cas

Le système CRISPR-Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated proteins) est un outil d'édition génomique extrêmement puissant (Brooks and Gaj, 2018) dérivé d'un système naturel de défense contre l'invasion par de l'ADN exogène (notamment l'ADN viral), trouvé dans de nombreux génomes procaryotes.

Initialement, il a été découvert chez *E. coli* l'existence de séquences palindromiques répétées entre lesquelles s'intercale une autre séquence d'ADN (Ishino *et al.*, 1987). Ces ré-

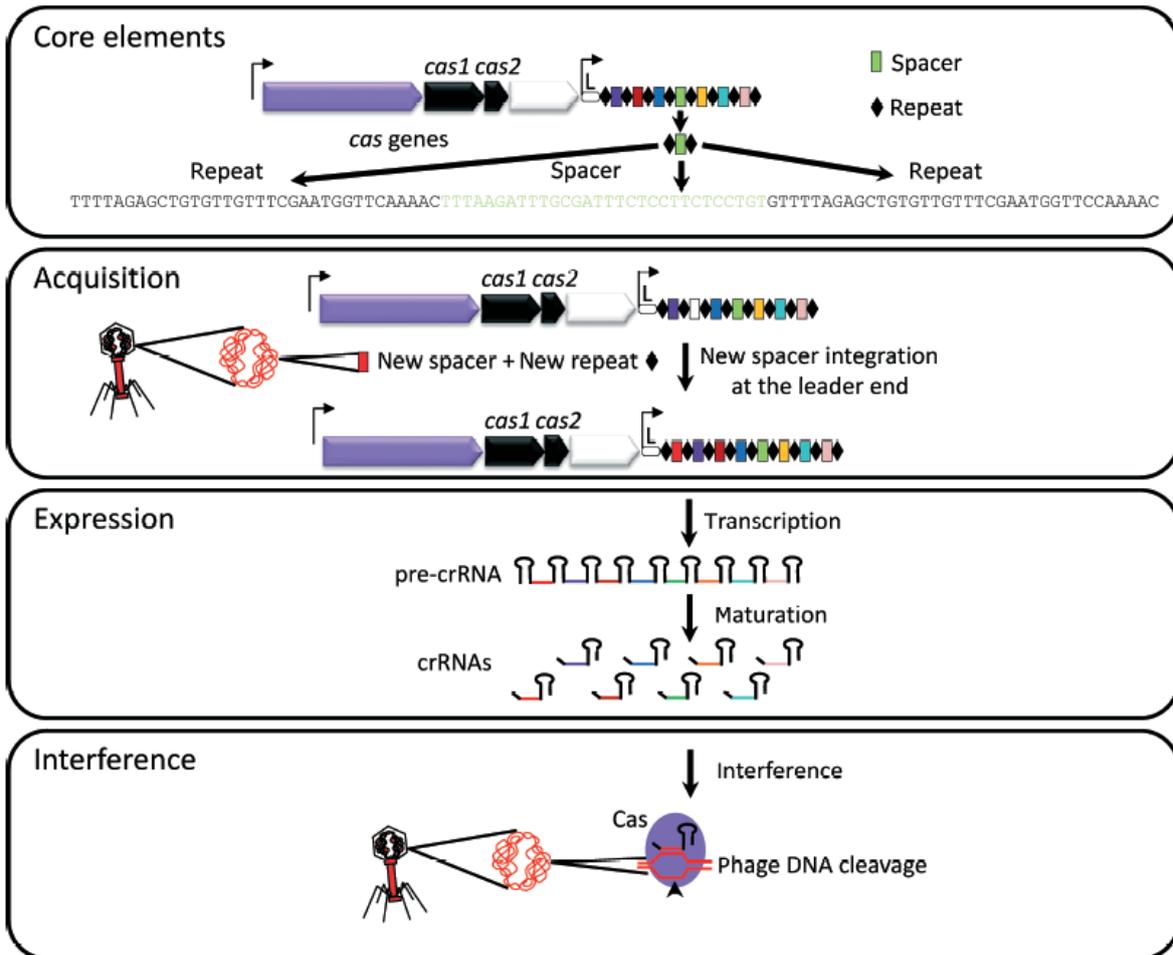


Figure 19. Schéma illustrant le fonctionnement du système CRISPR-Cas naturel. L'immunité adaptative est construite par acquisition de nouveaux spacers, dérivés de l'ADN invasif (ici, l'ADN d'un phage). Dans la phase d'expression, la matrice est transcrite en un pré-crARN, qui est ensuite clivé en crARNs matures. Les crARNs matures forment alors un complexe ribonucléoprotéique avec les protéines Cas, pour permettre l'interférence en guidant les endonucléases vers des séquences d'acides nucléiques identiques. (Image issue de Barrangou *et al*, 2013)

-gions furent nommées séquences « CRISPR » en 2002 (Jansen *et al.*, 2002). En 2007, une fonction a été proposée pour le système CRISPR-Cas : la dégradation de l'ADN des bactériophages et la mise en mémoire génétique des infections dues à ces bactériophages (Barrangou *et al.*, 2007). En 2012, un outil d'édition génétique a été développé à partir du système CRISPR-Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (Jinek *et al.*, 2012). Depuis, cet outil est en constante évolution, et ne cesse de voir son champ d'application s'élargir.

4. 2. 3. 1. CRISPR-Cas : un système immunitaire naturel procaryote

Le système CRISPR-Cas est un mécanisme d'immunité adaptative décrit chez de nombreux procaryotes. Il serait présent chez 90% des archées et 40% des bactéries (Wang, La Russa and Qi, 2016; Le Rhun *et al.*, 2019). Il leur permettrait de se défendre contre l'invasion d'ADN viral ou plasmidique (Horvath and Barrangou, 2010; Marraffini and Sontheimer, 2010). Les *loci* CRISPR sont composés des gènes *cas* organisés en un opéron, et d'une série de séquences courtes répétées (20-50 pb), séparées par des séquences uniques appelées « spacer » (Figure 19) (Sorek, Lawrence and Wiedenheft, 2013).

Six types de systèmes ont été identifiés et sont regroupés dans deux classes différentes. La classe 1 contient les systèmes de type I, III et IV, et la classe 2 les systèmes de type II et V. Le système de type VI est très mal caractérisé (Makarova *et al.*, 2015; Koonin, Makarova and Zhang, 2017). Globalement ils fonctionnent de la même manière. Le mécanisme de défense *via* le système CRISPR-Cas est organisé en trois étapes (Figure 19). La première étape est celle de l'acquisition, au cours de laquelle les fragments d'ADN étrangers, appelés protospacers, sont intégrés entre les séquences répétées codant les CRISPR ARNs (crARNs), à une extrémité du *locus* CRISPR. Ensuite vient la phase d'expression, le *locus* CRISPR contenant les spacers est transcrit en pre-crARN (précurseur des crARNs). Le pre-crARN est ensuite clivé afin de produire un crARN mature, constitué d'un seul spacer. La dernière phase est celle de l'interférence. Les crARNs se lient aux protéines Cas pour former un complexe ribo-nucléoprotéique. Ce complexe se déplace librement dans la cellule tel un système de surveillance. Chaque fois qu'une séquence cible correspondant au spacer est identifiée, le complexe se fixe sur l'ADN et clive les deux brins (Jinek *et al.*, 2012; Sorek, Lawrence and Wiedenheft, 2013; Wang, La Russa and Qi, 2016). Pour les systèmes de la classe 1, c'est un

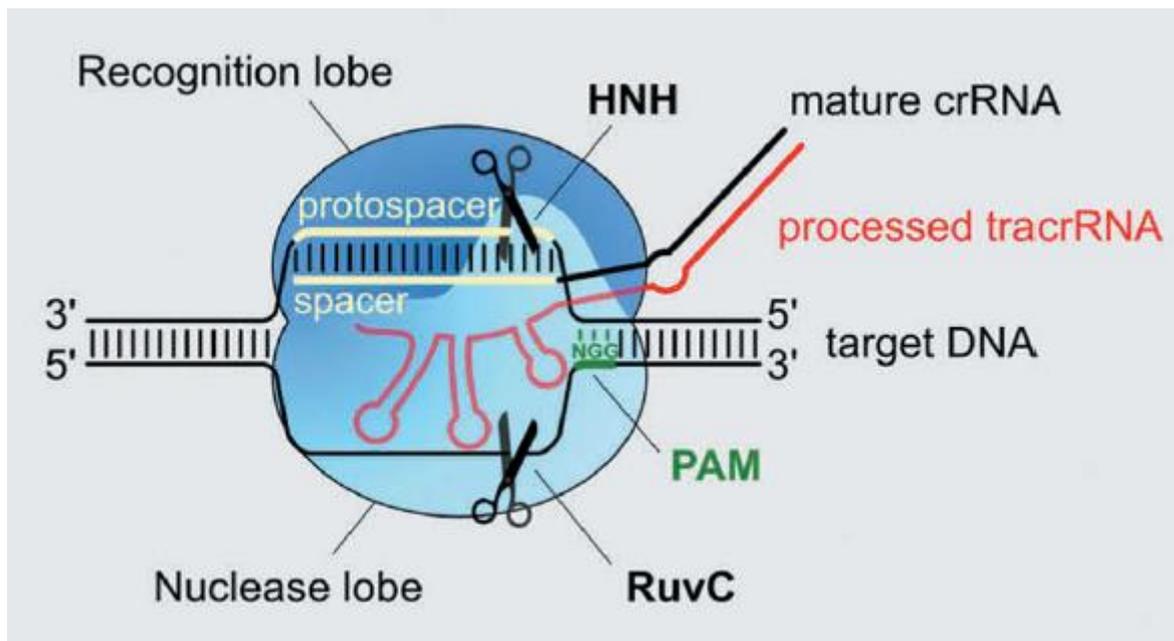


Figure 20. Schéma illustrant l'étape d'interférence du système CRISPR-Cas9. L'endonucléase Cas9 est guidée par le duplex mature tracrARN:crARN jusqu'à l'ADN cible. Suite à la reconnaissance, par le complexe ribonucléoprotéique, de la séquence PAM (NGG, en vert) présente en aval du protospacer sur le brin non complémentaire, le spacer crARN et sa cible (tous deux colorés en jaune) forment une boucle. Cela déclenche le clivage de l'ADN par les domaines nucléase de la Cas9 (HNH et RuvC, en bleu clair). Le domaine HNH clive le brin complémentaire, tandis que le domaine RuvC clive le brin non complémentaire, ce qui conduit à une coupure double brin de l'ADN cible. Le clivage a lieu 3 bases en amont de la séquence PAM. (Image issue de Le Rhun *et al*, 2019)

complexe protéique qui se lie au crARN et qui interfère avec la séquence génomique homologue au spacer, alors que pour les systèmes de la classe 2, une seule protéine assure ces mêmes fonctions (Makarova *et al.*, 2015). La reconnaissance par les protéines Cas nécessite la présence d'une séquence PAM (Protospacer Adjacent Motif, 5'-NGG-3' chez *S. pyogenes*) localisée immédiatement en aval du spacer dans le génome cible (Figure 20) (Jiang *et al.*, 2013; Hsu, Lander and Zhang, 2014). Cette séquence PAM permet au complexe protéique de reconnaître de manière spécifique les cibles à cliver, elle est présente dans l'ADN étranger mais absente du génome de la cellule (Sorek, Lawrence and Wiedenheft, 2013).

Le système le mieux caractérisé est le système CRISPR-Cas de type II. Il s'agit donc du premier à avoir été utilisé comme outil de biologie moléculaire (Jinek *et al.*, 2012; Le Rhun *et al.*, 2019). Contrairement aux systèmes de type I et III, il fait également intervenir un tracrARN (« trans-activating » crARN), codé en amont du *locus* CRISPR-Cas (Figure 21). Celui-ci est complémentaire aux séquences répétées présentes dans le pre-crARN. Un tracrARN va donc s'hybrider au niveau de chaque séquence répétée. Ceci entraîne la formation d'un ARN double brin, qui va activer la ribonucléase RNase III. La RNase III va cliver le duplex d'ARN pour donner des crARNs intermédiaires, composés d'un spacer entouré de deux séquences répétées, puis des crARNs matures, constitués d'un spacer et d'une seule séquence répétée. Le tracrARN et le crARN restent liés, formant ainsi un complexe tracrARN-crARN. Ce complexe recrute la protéine Cas9 et l'active, ce qui permet le clivage d'une séquence d'ADN spécifique par la Cas9 (Figure 21) (Jinek *et al.*, 2012; Sorek, Lawrence and Wiedenheft, 2013). Deux domaines distincts de l'endonucléase Cas9 seraient impliqués dans le clivage de l'ADN : le domaine « HNH » qui cliverait le brin complémentaire, et le domaine « RuvC-like » qui cliverait le brin non complémentaire (Makarova *et al.*, 2011) (Figure 20).

Au cours de ce processus immunitaire, de nombreuses protéines interviennent, notamment au cours des étapes de biogenèse des crARNs, de clivage de l'ADN cible, mais aussi lors de l'insertion des spacers au *locus* CRISPR ou encore pour réguler ce mécanisme dans sa globalité. Parmi ces protéines, certaines ont encore des fonctions inconnues et ne sont pas encore caractérisées. Notons également que des éléments de systèmes CRISPR-Cas ont été identifiés chez certains mycoplasmes, au cours d'études de génomique comparative menées au laboratoire. La fonctionnalité de ces systèmes, ainsi que leurs caractéristiques précises sont encore à l'étude (Sirand-Pugnet, communication personnelle).

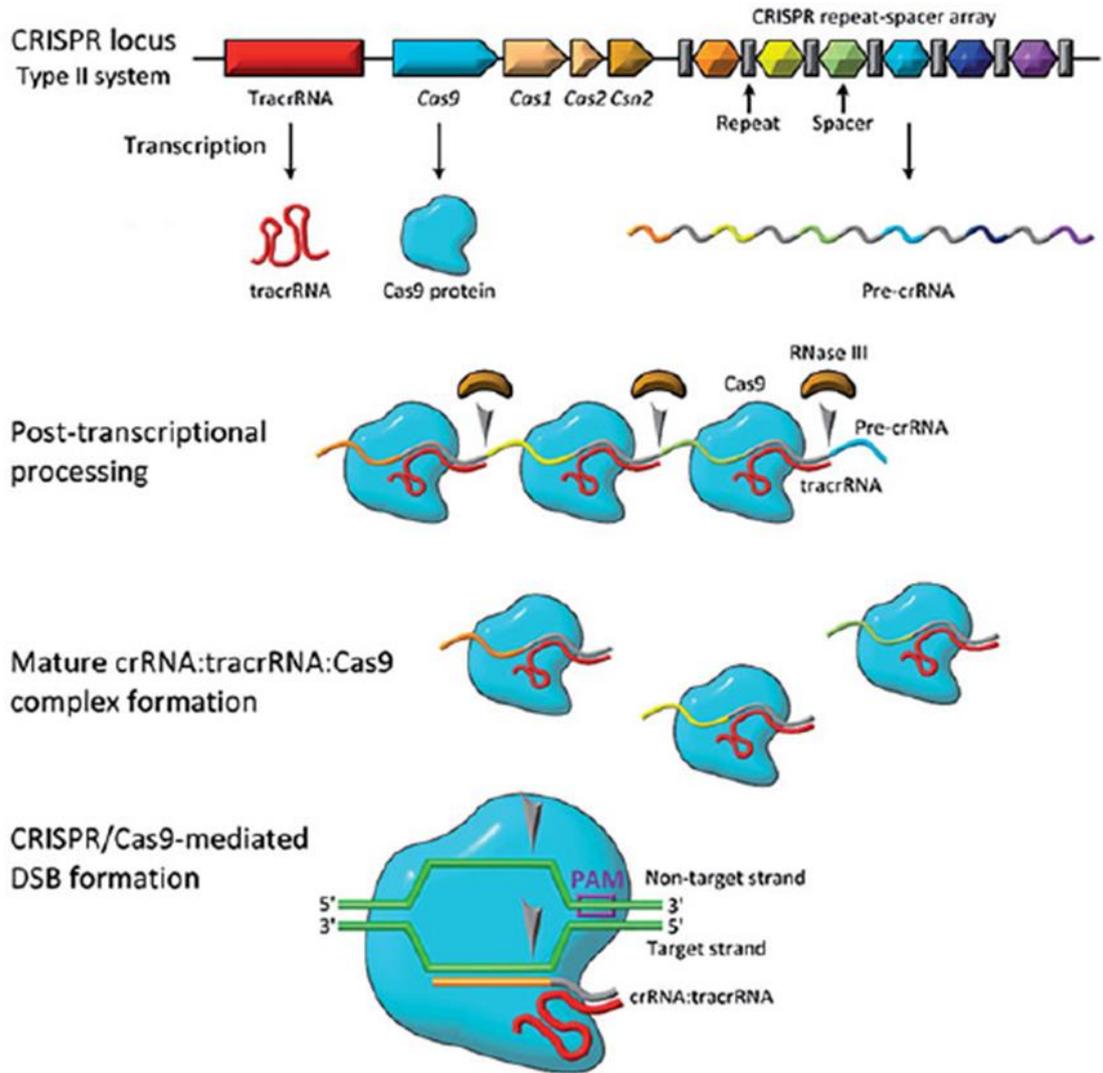


Figure 21. Schéma illustrant le fonctionnement du système CRISPR-Cas de type II. Sa particularité réside dans l'existence d'un *tracrARN* qui s'hybride au *crRNA* tout au long du processus. (Image issue de la publication Lino *et al*, 2018)

4. 2. 3. 2. CRISPR-Cas : un outil d'ingénierie génomique

Le système CRISPR-Cas fait partie des outils de modification génétique utilisant des nucléases, tout comme les ZFNs (Zinc Finger Nucleases) et les TALENs (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) (Javed *et al.*, 2018). Les ZFNs sont constituées de la fusion d'un domaine de liaison à l'ADN de type « doigt de zinc » (Cys_2-His_2) et d'un domaine catalytique de clivage de l'ADN de l'enzyme de restriction *FokI* (Carroll, 2011). Les TALENs sont composées du même domaine de clivage de l'enzyme *FokI* et d'un domaine de liaison à l'ADN composé de séquences hautement conservées dérivés des facteurs de transcriptions TALEs (Joung and Sander, 2013). Bien que largement utilisées lors de la décennie écoulée, ces deux nucléases présentent un certain nombre d'inconvénients, ce qui explique qu'elles aient été remplacées par le système CRISPR-Cas dans la majorité des études scientifiques poursuivies actuellement.

Dès l'année 2012, le système CRISPR-Cas est utilisé comme outil d'édition de génome. La première application de cet outil est liée à la création d'un ARN guide (ARNg) chimérique, constitué de la fusion des crARN et tracrARN du système CRISPR-Cas de type II de *S. pyogenes* (Jinek *et al.*, 2012). Cet ARNg est aujourd'hui couramment employé lors de travaux d'édition de génome avec le système CRISPR-Cas.

Pour utiliser l'outil CRISPR-Cas, il est nécessaire d'introduire dans la cellule à modifier la protéine Cas9 (la protéine Cas9 la plus utilisée étant celle de *S. pyogenes*), l'ARNg et éventuellement un ADN servant de matrice de recombinaison (Adli, 2018). En effet, la cassure double brin de l'ADN générée par CRISPR-Cas peut être réparée de deux façons : par NHEJ (Non Homologous End Joining) ou par HDR (Homology-Directed Repair). Dans le mécanisme NHEJ, les extrémités clivées sont raboutées, dans un processus qui entraîne souvent la suppression de quelques bases entraînant l'apparition de mutations de type INDEL. Pour le mécanisme HDR, la cassure double brin est réparée en utilisant un fragment d'ADN ayant des séquences identiques avec le *locus* clivé. Ainsi, en fournissant à la cellule une cassette d'ADN contenant des extrémités identiques aux séquences ciblées, il est possible de réaliser des insertions, des délétions ou des substitutions. Ces deux mécanismes de réparation de l'ADN sont donc exploités lors de l'utilisation du système CRISPR-Cas comme outil d'édition de génome (Rath *et al.*, 2015). Le NHEJ est utilisé principalement pour des expériences de production de mutants Knock-out, alors que le HDR est plus flexible et permet tout type d'édition.

Ce système d'ingénierie génétique est employé chez les bactéries, bien que son application soit limitée. En effet, peu de bactéries ont un système de recombinaison homologue ou de réparation des cassures de l'ADN efficace (contrairement à la levure par exemple qui dispose d'un système HDR très efficace). Un certain nombre de travaux ont été réalisés sur les bactéries *E. coli*, *Streptococcus pneumoniae*, chez quelques espèces *Streptomyces* et *Clostridium* (Sapranaukas *et al.*, 2011; Jiang *et al.*, 2013; Cobb, Wang and Zhao, 2015; Cho, Shin and Cho, 2018; Tao *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018). Des travaux réalisés chez *E. coli* ont permis d'améliorer l'efficacité de la recombinaison, via l'introduction du système lambda Red dans un procédé baptisé no-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) (Reisch and Prather, 2015).

Un des inconvénients liés à l'utilisation des systèmes CRISPR-Cas est l'existence de phénomènes de coupure de l'ADN à des *loci* non désirés, dit effet « off-target » (Roy *et al.*, 2018) et qui entraîne donc des mutations non spécifiques et non intentionnelles. Pour y remédier, plusieurs solutions ont été développées. Par exemple, de nouvelles Cas9 plus spécifiques ont été obtenues par mutagenèse dirigée, afin de produire des variantes dans lesquelles la Cas9 a moins d'interactions non-spécifiques avec son substrat, ce qui permettrait de diminuer son activité en dehors de la séquence ciblée (Kleinstiver *et al.*, 2016; Slaymaker *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2017; Casini *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2018). De même, une stratégie adoptée pour augmenter la spécificité de la Cas9 a été de créer des variantes ayant des domaines « nickase » (domaine nucléase muté) ne pouvant se lier qu'à un seul brin d'ADN. Deux Cas9-nickases sont alors nécessaires pour induire une coupure double-brin (Ran *et al.*, 2013). Des essais ont également visé à diminuer l'expression de la Cas9 et de l'ARN guide, à modifier la structure secondaire de l'ARNg en introduisant une « tige boucle », ou encore d'utiliser des ARNg tronqués (Fu *et al.*, 2014; Wu, Kriz and Sharp, 2014; Kocak *et al.*, 2019).

4. 3. Outils d'édition des génomes de mycoplasmes

Plusieurs outils permettant la modification des génomes de mycoplasmes sont décrits dans la littérature, notamment des systèmes basés sur l'utilisation des plasmides *oriC*, et un exemple basé sur le système Cre-Lox. L'utilisation de plasmides *oriC* a été démontrée chez de nombreuses espèces de mycoplasmes pour des études soit d'inactivation de gènes, de surex-

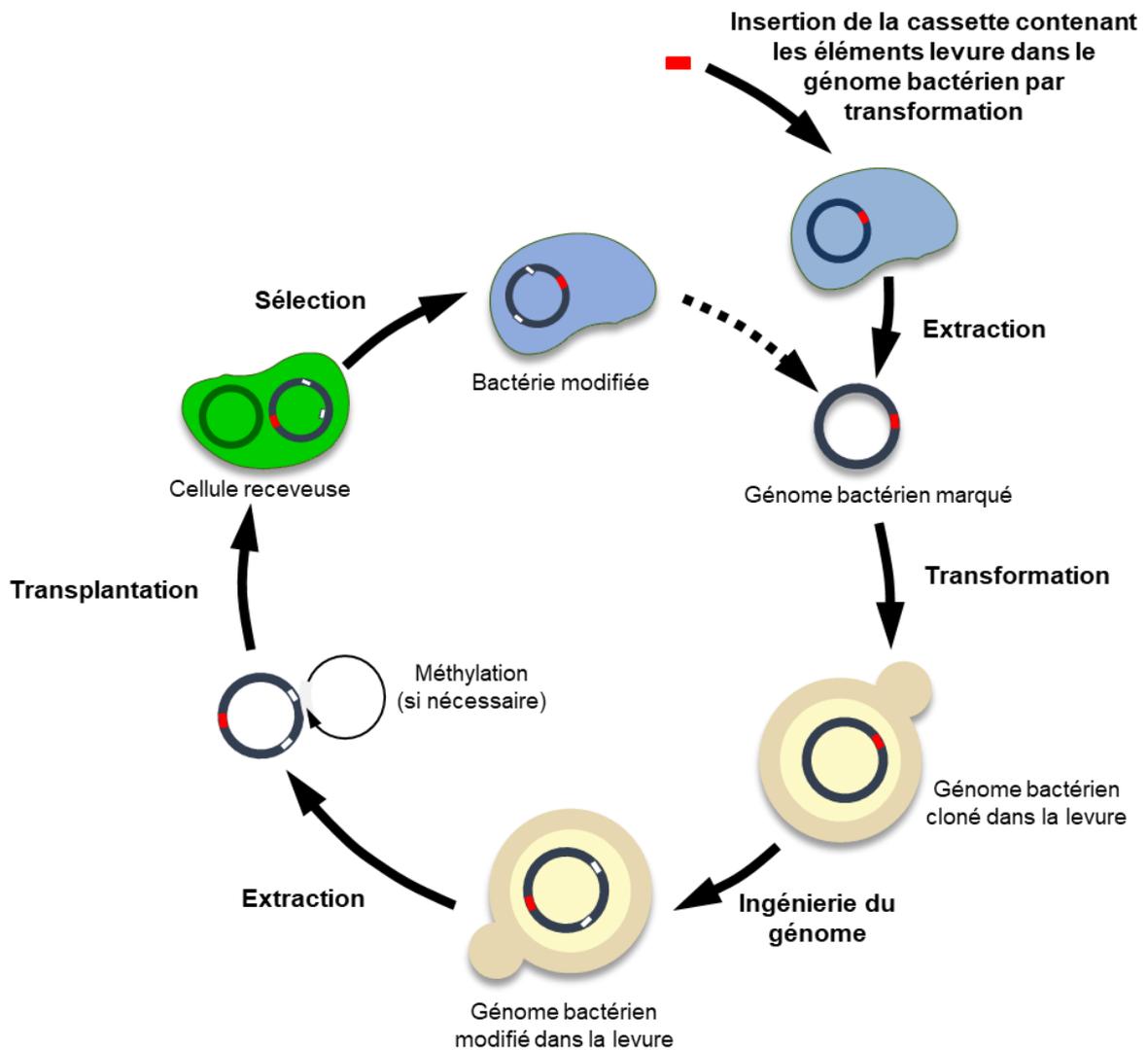


Figure 22. Schéma illustrant le cycle d'ingénierie d'un génome de mycoplasme. Le génome bactérien est d'abord cloné dans la levure, ensuite il est modifié en utilisant les outils d'édition de génomes disponibles dans la levure, puis il est transplanté dans une cellule receveuse, ce qui conduit à l'obtention d'une cellule modifiée. (Image issue Lartigue *et al*, 2009)

-pression de protéines ou encore de complémentation. Cependant, avec ce type d'outil, l'obtention de mutants prend beaucoup de temps, ceux-ci doivent ensuite être cultivés sur plusieurs passages, et il est nécessaire d'analyser beaucoup de clones afin de pouvoir isoler un mutant (Renaudin *et al.*, 1995; Duret *et al.*, 1999; Cordova *et al.*, 2002; Lartigue *et al.*, 2002, 2003; Chopra-Dewasthaly, Marena, *et al.*, 2005; Janis *et al.*, 2005; Lee, Browning and Markham, 2008; Maglennon *et al.*, 2013; Nieszner *et al.*, 2013; Shahid *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015; Ishag *et al.*, 2016, 2017; Matteau *et al.*, 2017).

La technologie Cre-Lox a été implémentée chez *M. genitalium*, et utilisée pour supprimer le gène *MG_217*, dont le produit est impliqué dans la morphologie de l'organelle terminale (Mariscal *et al.*, 2016). Il s'agit du seul exemple d'utilisation du système Cre-Lox chez les mycoplasmes. L'application de la méthode RMCE qui utilise le système Cre-Lox a également été rapportée dans la littérature. Elle a été utilisée pour éditer le génome de *M. mycoides*, mais elle a été menée dans la levure et non dans le mycoplasme directement (Noskov *et al.*, 2015).

Enfin, le système CRISPR-Cas a été manipulé récemment chez *M. pneumoniae* et *M. mycoides*, mais dans un objectif de régulation de l'expression de gènes (CRISPR interférence), et non d'édition génétique (Mariscal *et al.*, 2018). Dans le cadre du projet MycoSynVac, des travaux sont actuellement en cours pour implémenter les systèmes lambda Red, Cre-Lox et CRISPR-Cas chez *M. pneumoniae* (Serrano *et al.*, communication personnelle).

Les outils cités ci-dessus ne permettent pas d'éditer les génomes de mycoplasmes à grande échelle, c'est-à-dire de réaliser des mutations diverses et en grand nombre ou encore de réaliser des mutations impactant de grands fragments d'ADN génomique. De même, il existe encore de nombreuses espèces de mycoplasmes pour lesquelles aucun de ces outils n'a pu être développé.

Au cours des travaux du JCVI sur la construction d'un organisme gouverné par un génome synthétique, une approche alternative a été proposée, dans laquelle la levure *S. cerevisiae* est utilisée comme plateforme d'édition d'ADN. Cette approche est composée de trois étapes : (i) le clonage du génome bactérien à éditer, entier, dans la levure, (ii) l'édition de ce génome en utilisant les outils d'ingénierie génétique disponibles chez la levure, et (iii) la transplantation du génome modifié de la levure vers une cellule receveuse, afin d'obtenir une cellule mutée (Figure 22) (Lartigue *et al.*, 2009).

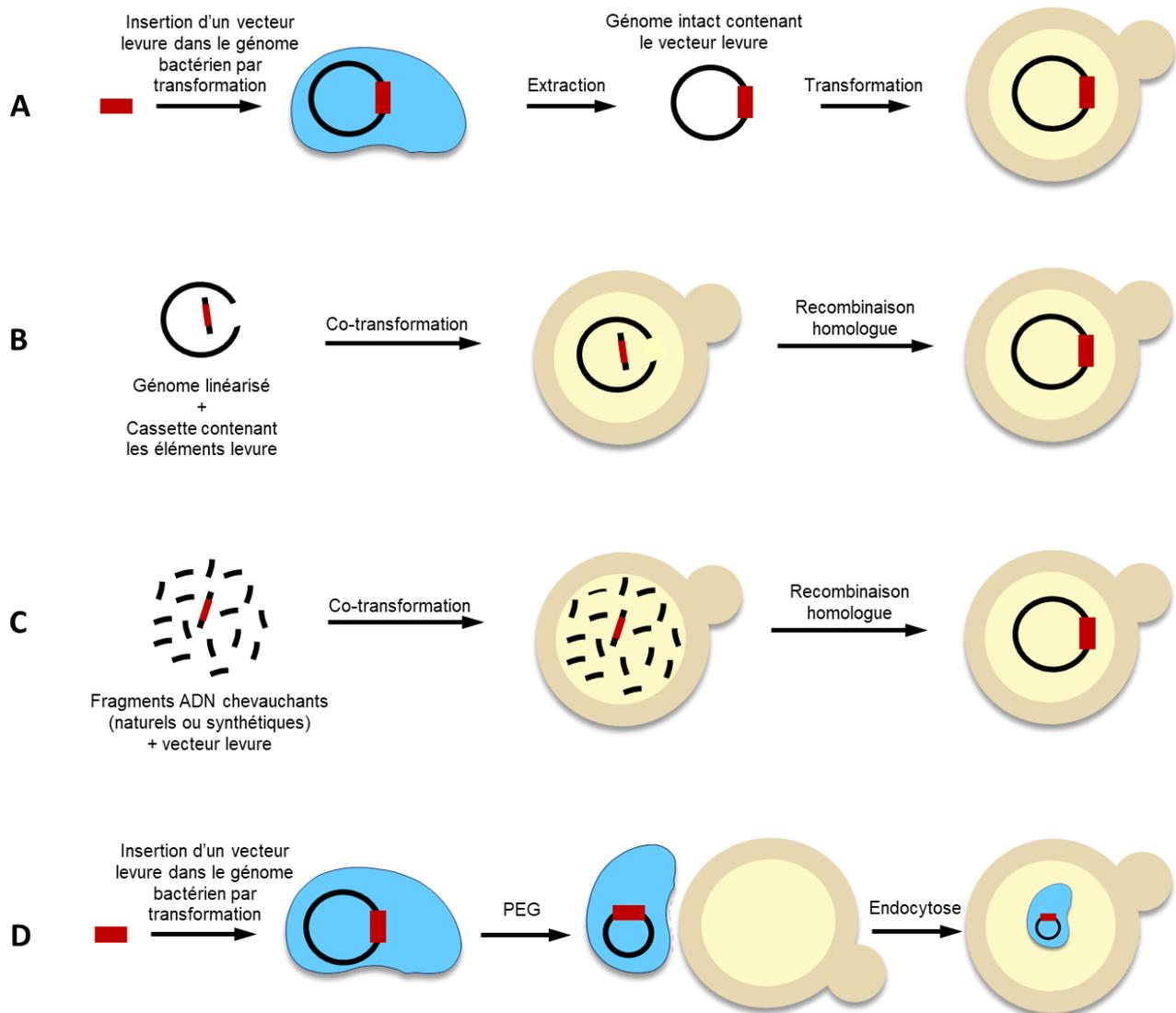


Figure 23. Schéma illustrant les différentes méthodes de clonage d'un génome de mycoplasme dans la levure. (A) Transformation dans la levure d'un génome bactérien pré-marqué par transformation. (B) TAR cloning. (C) TAR cloning en utilisant de multiples fragments d'ADN chevauchants. (D) Fusion bactérie – levure. (Image adaptée de Benders *et al*, 2010 ; Karas *et al*, 2013 ; Karas *et al*, 2014)

4. 3. 1. Techniques de clonage des génomes de mycoplasme dans la levure

Le clonage des génomes de mycoplasme dans la levure est possible grâce à l'absence de systèmes de restriction-modification, ainsi qu'à une toxicité limitée des gènes bactériens (Belfort and Roberts, 1997). En effet, les systèmes de régulation de l'expression des gènes sont différents entre les organismes eucaryotes (tel que la levure) et procaryotes (Kornberg, 1999; Kozak, 1999). De plus, l'utilisation du codon UGA en codon tryptophane chez les espèces du genre *Mycoplasma* offre un avantage supplémentaire : si les gènes bactériens sont exprimés dans la levure, beaucoup des protéines produites seront tronquées et donc inactives (Benders *et al.*, 2010).

4. 3. 1. 1. Transformation dans la levure d'un génome bactérien pré-marqué par transposition

Une des stratégies de clonage utilisée est la transformation dans la levure d'un génome bactérien pré-marqué (Figure 23 A). Dans cette approche, une cassette dite « éléments levure » doit être insérée dans le génome du microorganisme que l'on souhaite cloner (Kouprina *et al.*, 1998). La cassette « éléments levure » contient les séquences nécessaires au maintien et à la répllication par la levure du chromosome bactérien exogène : un centromère de levure (CEN), une origine de répllication levure (ARS), un marqueur de sélection (généralement un marqueur d'auxotrophie) (Benders *et al.*, 2010). Chez les mycoplasmes, cette cassette est classiquement insérée par transposition (Lartigue *et al.*, 2009). Cette stratégie de clonage permet de sélectionner les insertions qui n'interfèrent pas avec la viabilité de la bactérie, elle est donc utilisée préférentiellement lorsque l'on souhaite transplanter le génome dans une cellule receveuse, à l'issue des modifications réalisées dans la levure. Elle ne nécessite pas d'avoir connaissance de la séquence du génome cloné, mais implique que la bactérie étudiée soit transformable (Benders *et al.*, 2010).

4. 3. 1. 2. TAR cloning

La deuxième stratégie de clonage la plus largement utilisée est le « TAR cloning ». Elle est basée sur l'exploitation de la recombinaison associée à la transformation (ou TAR - Transformation-Associated Recombination). Initialement, le TAR cloning est une technique employée pour cloner des fragments d'ADN génomique (ADNg) humain dans la levure, afin de pouvoir les caractériser. Ces fragments d'ADNg, pouvant avoir une taille allant jusqu'à 300 kbp, sont clonés sous forme de YACs (Yeast Artificial Chromosomes) circulaires (Larionov *et al.*, 1996, 1997; Kouprina and Larionov, 2003; Kouprina, Noskov and Larionov, 2006). Le TAR cloning consiste en la co-transformation dans la levure, de l'ADN cible et d'un vecteur qui contient une séquence commune à l'ADN cible (Kouprina *et al.*, 1997, 1998). Cette technique exploite l'efficacité de recombinaison élevée de la levure pour assembler le vecteur et l'ADN cible, et ainsi former un YAC (Orr-Weaver, Szostak and Rothstein, 1981; Kouprina and Larionov, 2016). L'efficacité de recombinaison est bien plus élevée (20-30% supérieure) si des coupures doubles brins sont présentes à proximité des séquences cibles. En effet, les extrémités libres de l'ADN sont plus recombino-gènes que des séquences internes (Larionov *et al.*, 1996; Leem *et al.*, 2003). Le clonage de génomes bactériens entiers par TAR cloning s'effectue donc en transformant dans la levure le génome bactérien linéarisé, et une cassette contenant les éléments levure ainsi que des extrémités homologues à son site d'insertion dans le génome bactérien (Figure 23 B). Le génome bactérien et la cassette sont alors assemblés par recombinaison homologue.

La stratégie de TAR-cloning peut donner lieu à une stratégie équivalente réalisée avec de multiples fragments chevauchants (un des fragments contenant les éléments levure) (Figure 23 C) (Benders *et al.*, 2010). Cette stratégie de clonage a notamment été employée pour assembler le génome synthétique de *M. genitalium* JCVI-1.0 (~583 kpb), via la combinaison de méthodes enzymatiques de recombinaison *in vitro* et de TAR cloning *in vivo*. Plus précisément, 101 cassettes de 5-7 kbp contenant des extrémités chevauchantes de 80 pb ont été synthétisées chimiquement. Elles ont ensuite été assemblées *in vitro* par groupes de quatre, pour former des séquences d'environ 24 kpb. Les fragments de 24 kpb ont été assemblés par groupes de trois, pour donner des fragments d'environ 72 kpb (1/8 du génome), eux même assemblés par groupes de deux pour donner des fragments d'environ 144 kpb (1/4 du génome). Ces trois cycles d'assemblage ont été réalisés par recombinaison *in vitro* et clonés

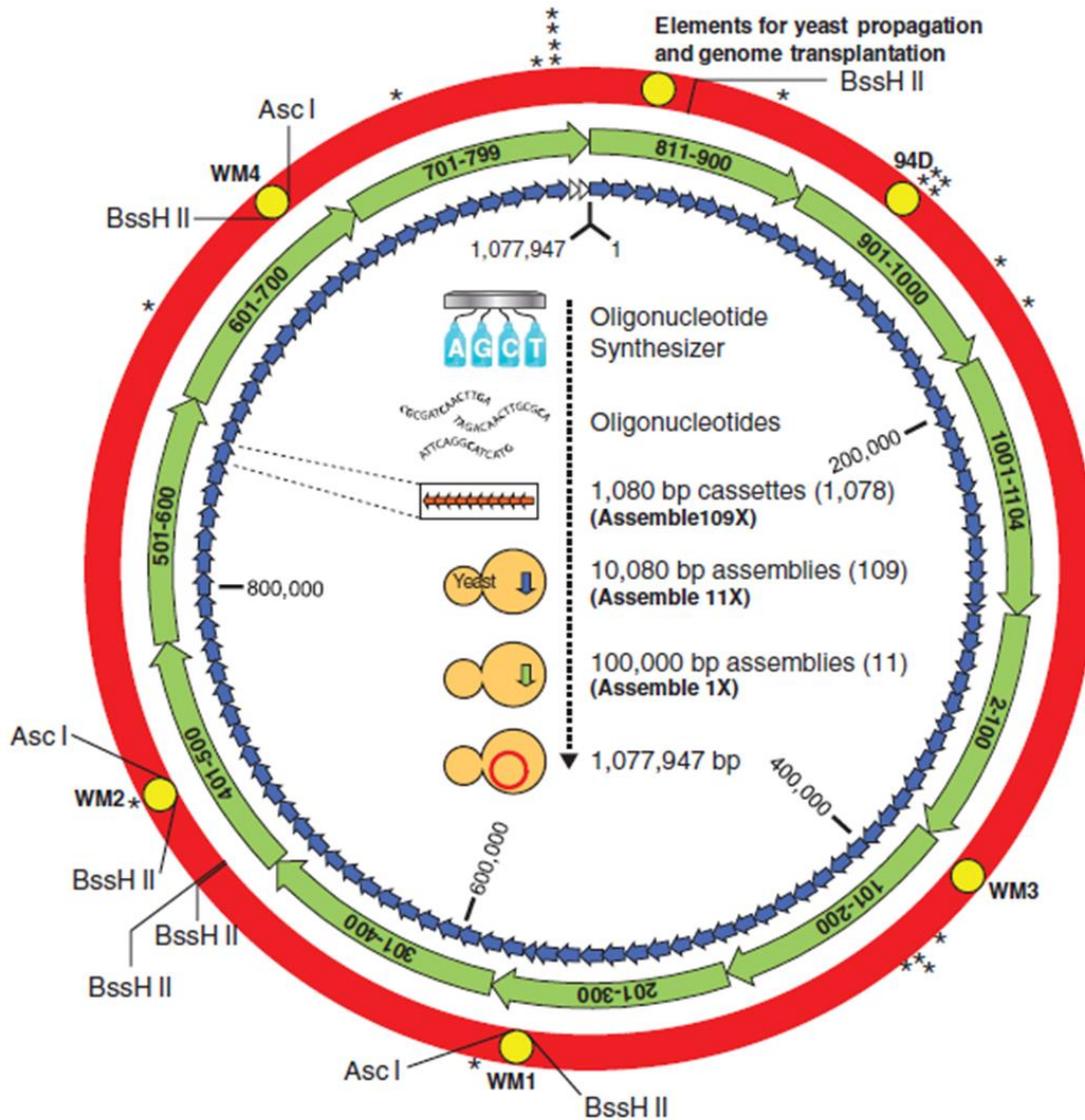


Figure 24. Schéma illustrant l'assemblage du génome synthétique *M. mycoides* JCVI-syn1.0 dans la levure. Les flèches oranges correspondent aux cassettes de 1080 pb synthétisées chimiquement. Les flèches bleues correspondent aux cassettes d'environ 10 kpb, chacune résultant de l'assemblage de 10 cassettes synthétiques de 1080 pb. Les flèches vertes correspondent aux cassettes de 100 kpb, chacune résultant de l'assemblage de 10 cassettes de 10 kpb. Le génome est symbolisé par la couleur rouge, il est issu de l'assemblage des 11 cassettes de 100 kpb. (Image issue de Gibson *et al*, 2010)

dans *E. coli*. Enfin, les quatre inserts de 144 kbp ont été assemblés dans la levure, d'abord par deux pour donner deux fragments d'environ 290 kbp, eux même assemblés pour former le génome complet d'environ 580 kbp (Gibson, Benders, Andrews-Pfannkoch, *et al.*, 2008). Suite à ces travaux, l'assemblage d'un génome synthétique de *M. genitalium* a été de nouveau réalisé. Cette fois-ci, ce sont 25 fragments synthétiques et chevauchants, de 17-35 kbp chacun, qui ont été assemblés dans la levure en une seule étape (Gibson, Benders, Axelrod, *et al.*, 2008). De la même façon, un génome synthétique *M. mycoides* JCVI-syn1.0 (1,08 méga paires de bases) a été construit (Figure 24). Pour cela, 1078 cassettes de 1080 pb ont été assemblées. Elles ont d'abord été regroupées par 10, pour donner 109 cassettes de 10 kbp, puis encore par 10 pour donner 11 cassettes de 100 kbp. Les 11 cassettes ont ensuite été assemblées en une seule fois pour former le génome complet (Gibson *et al.*, 2010). Cette stratégie de TAR cloning via l'utilisation de multiples fragments chevauchants offre la possibilité de travailler aussi bien avec des fragments d'ADN naturels qu'avec des fragments synthétiques (Benders *et al.*, 2010).

4. 3. 1. 3. Fusion cellulaire bactérie-levure

Enfin, une dernière stratégie de clonage décrite dans la littérature est une fusion, cellule à cellule, permettant le transfert du chromosome bactérien dans la levure (Figure 23 D). La réaction de transfert du génome bactérien marqué est réalisée par ajout de PEG, réactif qui favorise la fusion cellulaire. La faisabilité de cette technique a été démontrée avec les espèces *M. mycoides*, *M. capricolum* et *Haemophilus influenzae*. Ce procédé permet d'éviter d'isoler le génome bactérien, via une étape de purification en utilisant une matrice d'agarose, et ainsi de le protéger contre d'éventuelles fragmentations mécaniques (Karas *et al.*, 2013, 2014). Il a récemment été démontré que le processus de transfert du génome bactérien se ferait par l'intermédiaire de l'endocytose des bactéries intactes dans les sphéroplastes de levure (Karas *et al.*, 2019).

Ainsi, en utilisant les différentes stratégies de clonage évoquées ci-dessus, un certain nombre de génomes de mycoplasmes ont été clonés dans la levure. Ces génomes ont une taille comprise entre 0,6 et 1,8 Mpb, et un pourcentage en GC compris entre 24 et 40%. Les

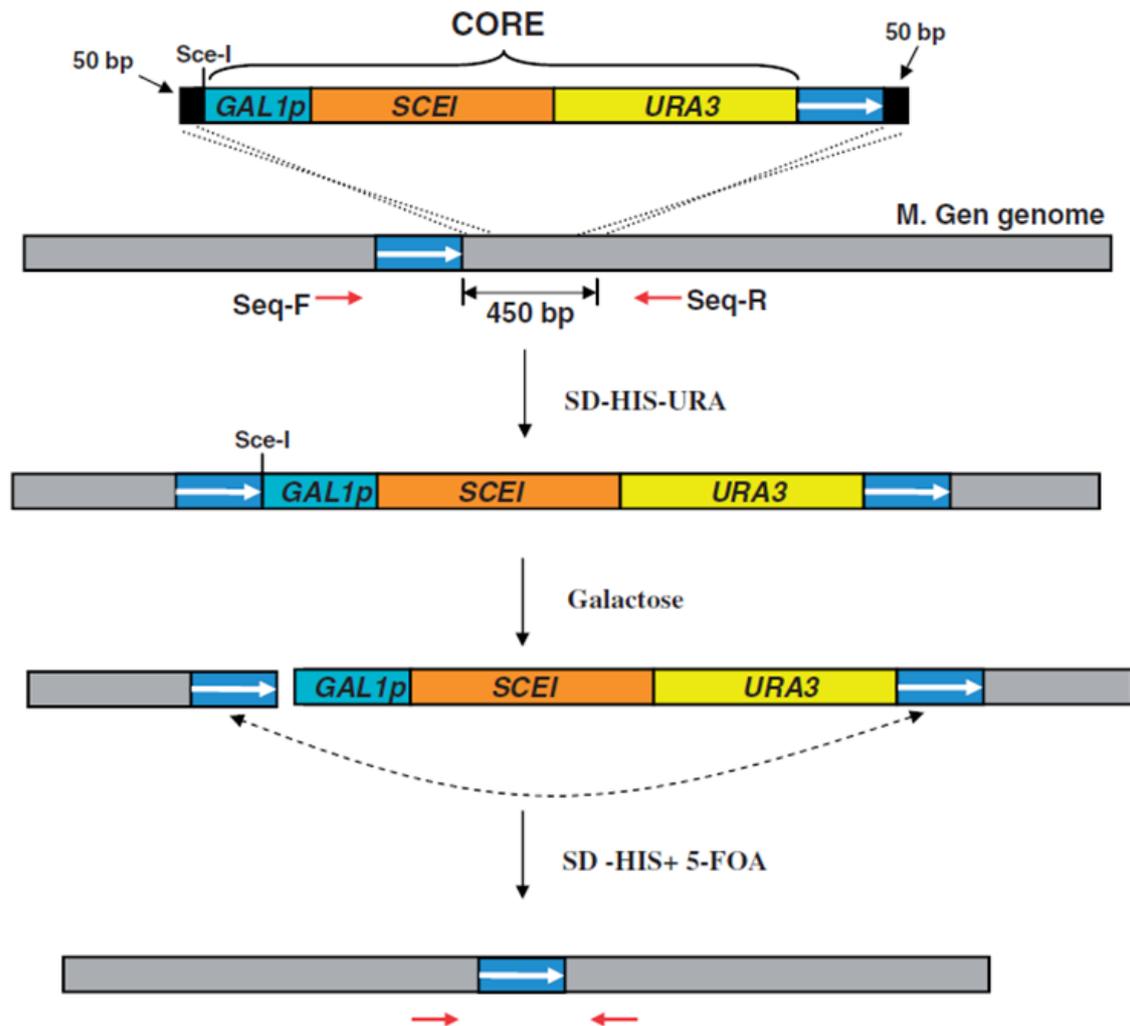


Figure 25. Schéma illustrant le fonctionnement de la méthode TREC. Il s'agit de l'exemple d'une délétion réalisée au locus *mg259* sur le génome de *M. genitalium*. Dans cet exemple, une région de 450 pb est remplacée, par recombinaison homologue, par une cassette de mutagenèse. La cassette de mutagenèse est constituée d'une région CORE (contenant le site de reconnaissance de l'enzyme I-SceI de 18 pb, le gène *sceI* sous le contrôle du promoteur GAL1, et le marqueur d'auxotrophie URA3) et d'un fragment (de 378 pb dans cet exemple) identique à la région située en amont du gène cible (indiqué par une flèche blanche). La recombinaison génère l'apparition de deux séquences répétées en tandem encadrant la région CORE. L'ajout de galactose induit, ensuite, l'expression du gène *sceI* et la production de l'endonuclease I-sceI, générant une coupure double brin au niveau du site I-SceI. Cette cassure double brin provoque des événements de recombinaison homologue intramoléculaires entre les séquences répétées, conduisant à l'excision du CORE à la délétion du gène cible sans laisser de trace. (Image issue de Noskov *et al*, 2010).

espèces concernées sont *M. genitalium* (Gibson, Benders, Andrews-Pfannkoch, *et al.*, 2008; Gibson, Benders, Axelrod, *et al.*, 2008; Benders *et al.*, 2010), *M. pneumoniae* (Benders *et al.*, 2010), *M. mycoides* (Lartigue *et al.*, 2009; Benders *et al.*, 2010; Gibson *et al.*, 2010; Karas *et al.*, 2013, 2014; Kannan *et al.*, 2016), *A. laidlawii* (BJ Karas IT Yonemoto, CA Hutchison III, HO Smith, 2012), *M. capricolum* (Karas *et al.*, 2013; Lartigue *et al.*, 2014), *M. hominis* (Rideau *et al.*, 2017) et *M. florum* (Baby *et al.*, 2018).

4. 3. 2. Techniques d'ingénierie des génomes de mycoplasmes clonés dans la levure

Il existe de nombreux outils d'édition de génomes chez la levure (Fraczek, Naseeb and Delneri, 2018). En revanche, ils ne sont pas forcément fonctionnels sur les génomes bactériens clonés dans la levure et certaines technologies ont dû être réadaptées pour cibler plus efficacement les génomes bactériens clonés dans la levure. Actuellement, les méthodes les plus utilisées pour faire de l'ingénierie des génomes de mycoplasmes dans la levure sont : la méthode TREC, la méthode TREC-IN et la méthode CRISPR-Cas9.

4. 3. 2. 1. La méthode TREC

La méthode TREC (Tandem Repeats Coupled With Endonuclease Cleavage) est une méthode de remplacement de gène qui a l'avantage de ne laisser ni trace ni marqueur suite à l'excision de la cassette de mutagenèse (Figure 25). Elle nécessite deux grandes étapes. Au cours de la première étape, une cassette de mutagenèse est introduite en lieu et place de la région cible. Cette cassette est composée d'un fragment « CORE », d'un fragment d'ADN identique à la séquence présentée en 5' du gène ciblé, et de deux extrémités de 50 pb identiques au site cible. Le fragment CORE est composé d'un site de restriction de l'enzyme I-SceI (site de 18 pb), du gène *I-sceI* sous le contrôle du promoteur inducible GAL1, et d'un marqueur d'auxotrophie (URA3). Le remplacement de la région cible par la cassette de mutagenèse génère l'apparition de séquences répétées en tandem encadrant la cassette CORE. Au cours de la deuxième étape, l'expression du gène *I-sceI* est induite en présence de galactose et l'endonucléase I-SceI est produite. Cette enzyme va induire une coupure double brin de l'ADN

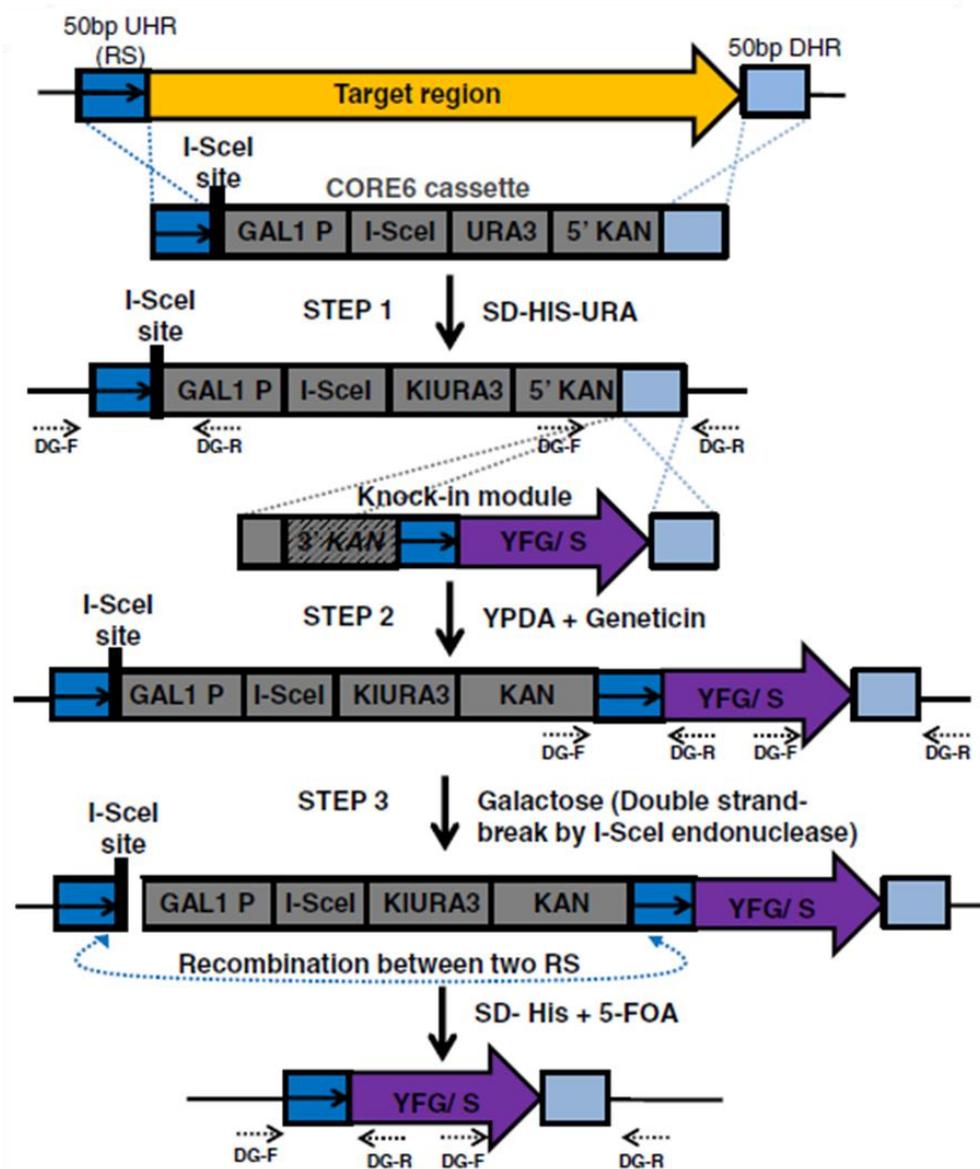


Figure 26. Schéma illustrant le fonctionnement de la méthode TREC-IN. Etape 1 : la région cible (flèche orange) est remplacée par la cassette CORE6, par recombinaison homologue via un double crossing-over. La cassette CORE6 possède à ses extrémités deux séquences de 50 pb identique aux régions encadrant le gène cible. Les cellules transformées sont sélectionnées pour leur prototrophie pour l'uracile. La cassette comprend le site de reconnaissance de l'enzyme I-SceI, le gène *sceI* sous le contrôle du promoteur GAL1, un marqueur d'auxotrophie URA3 et la région 5' du marqueur antibiotique à la généticine (5'KAN). Etape 2 : le module « knock-in », transformé dans les levures, est inséré au locus générant (1) la reconstitution du marqueur KAN et la sélection sur milieu riche plus généticine et (2) l'apparition d'une région répétée en tandem (carré bleu avec la flèche noire). Le module « knock-in », constitué du gène codant pour la protéine YFG (flèche violette dans cet exemple), de la région 3' du marqueur KAN, d'une région identique à la région présente en amont du gène cible (carré bleu avec la flèche noire) et à chaque extrémité de séquences de 50 pb (carré gris et carré bleu clair) permettant l'insertion du module par recombinaison homologue au site désiré. Etape 3 : l'ajout de galactose permet l'expression du gène *I-sceI*, ce qui produit une cassure double brin au site I-SceI, et favorise la recombinaison homologue entre les deux séquences répétées, entraînant l'excision des modules CORE6 et knock-in. (Image issue de Chandran et al, 2014)

au niveau de son site de reconnaissance. La présence simultanée d'une cassure double brin et d'une répétition en tandem stimule la machinerie de recombinaison de la levure qui excise le fragment situé entre les 2 séquences répétées générant ainsi une délétion sans trace du gène cible (Noskov, Segall-Shapiro and Chuang, 2010). Cette méthode a été appliquée pour réaliser des délétions de gènes ou groupes de gènes (Noskov, Segall-Shapiro and Chuang, 2010; Lartigue *et al.*, 2014; Schieck *et al.*, 2016).

4. 3. 2. 2. La méthode TREC-IN

La méthode TREC-IN (TREC-assisted gene knock-IN) dérive de la méthode TREC. Elle permet de réaliser des insertions de gènes ou remplacements de gènes et présente, tout comme la méthode TREC, l'avantage de ne laisser ni trace ni marqueur au site de modification (Chandran *et al.*, 2014; Lartigue *et al.*, 2019).

De nombreux travaux d'ingénierie de génome requièrent l'insertion et/ou le remplacement de gènes ou groupes de gènes. La méthode TREC s'est révélée inefficace pour réaliser ce type de modification à cause d'un bruit de fond trop important généré par la circularisation de la cassette de mutagenèse. Le développement de la méthode TREC-IN a permis de diminuer, de manière significative, le bruit de fond et d'augmenter ainsi la détection des évènements d'insertion au *locus* cible.

Cela a été rendu possible grâce au « redesign » complet de la méthode et notamment des cassettes de mutagenèse. La méthode TREC-IN compte trois étapes et requiert l'utilisation, non pas d'une, mais de deux cassettes de mutagenèse. La première cassette de mutagenèse, appelée « CORE 6 » est composée, comme auparavant, de site de restriction de l'enzyme I-SceI, du gène *I-sceI* sous le contrôle du promoteur inductible GAL1, et du marqueur d'auxotrophie (URA3), mais porte également la région 5' d'un marqueur de résistance à un antibiotique, le gène de résistance à la généticine (5' KAN). La deuxième cassette de mutagenèse, appelée « knock-in module », contient le gène à introduire accompagné de la région 3' du gène de résistance à ce même antibiotique (3' KAN) (Figure 26).

Les trois étapes de la méthode TREC-IN sont les suivantes: (1) délétion du gène cible par insertion de la cassette CORE 6 au *locus* cible. A cette étape, la sélection est réalisée via le marqueur d'auxotrophie URA3, (2) insertion au *locus* du « knock-in module », contenant le

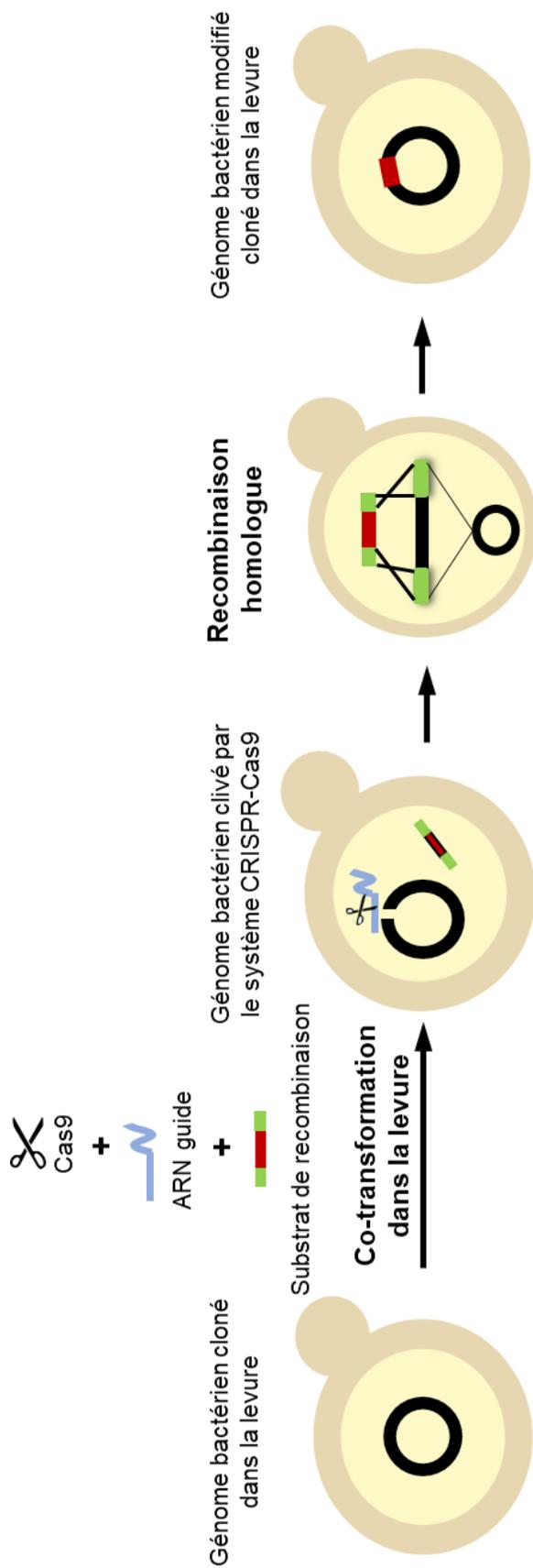


Figure 27. Schéma illustrant le fonctionnement de la méthode CRISPR-Cas9. La Cas9, guidée par l'ARNg, induit une cassure double brin dans le génome bactérien cloné dans la levure, au niveau du *locus* cible. Grâce au système de recombinaison homologue de la levure, cette cassure est réparée par insertion du substrat de recombinaison au niveau du locus cible.

gène à ajouter ou à remplacer. L'insertion de cette cassette par double crossing-over entraîne la reconstitution du gène de résistance à la généticine (KAN) permettant la sélection des transformants ainsi que l'apparition d'une séquence répétée en tandem et (3) l'excision des séquences surnuméraires (Figure 26). Comme pour la méthode TREC, l'induction de l'expression de l'endonucléase I-SCE1 permet de générer une cassure double brin en amont du promoteur GAL1. La présence simultanée d'une cassure double brin et d'une répétition en tandem dans le génome stimule la machinerie de recombinaison de la levure conduisant à l'excision du fragment situé entre les 2 séquences répétées et par conséquent au remplacement sans trace du gène cible par sa version mutée ou bien par un autre gène (Chandran *et al.*, 2014; Lartigue *et al.*, 2019).

4. 3. 2. 3. La méthode CRISPR-Cas9

Le système CRISPR-Cas9 peut être utilisé comme un outil efficace pour modifier des gènes présents sur un génome bactérien cloné dans la levure (Figure 27). Un exemple présent dans la littérature décrit la délétion du gène *glpO* (codant la glycérol-3-phosphate oxydase) dans le génome de *M. mycoïdes* subsp. *capri* GM12. Cette expérience est inspirée des travaux de modification du génome de la levure *S. cerevisiae*, réalisés à l'aide d'outils issus du système CRISPR-Cas9 de *S. pyogenes* (DiCarlo *et al.*, 2013). Cette méthode requiert trois partenaires : une nucléase Cas9, un ARN guide (ARNg) et un substrat de recombinaison. Dans le cadre des travaux réalisés chez *M. mycoïdes* subsp. *capri*, le substrat de recombinaison est composé de deux oligonucléotides hybridés entre eux, et de 90 pb chacun. Chaque oligonucléotide dispose alors de 45 pb homologues aux séquences encadrant le gène cible (Tsarmopoulos *et al.*, 2016). Une fois les trois partenaires introduits dans la levure, le génome bactérien est clivé par la Cas9, à un site défini par l'ARNg. Le système de recombinaison hautement efficace de la levure répare cette cassure double brin en utilisant le substrat de recombinaison. Ainsi, le gène ciblé est remplacé par le substrat de recombinaison fournit.

La méthode CRISPR-Cas9 ne laisse pas de trace dans le génome bactérien. De même, il n'est pas nécessaire d'utiliser un marqueur de sélection, ce qui permet de pouvoir réaliser des modifications génomiques de manière itérative sans avoir besoin d'enlever le marqueur de sélection à chaque cycle (Tsarmopoulos *et al.*, 2016).

4. 3. 3. Transplantation des génomes de mycoplasmes dans une cellule receveuse

La transplantation de génome bactérien est l'introduction d'un génome d'une espèce bactérienne (génome donneur) dans une cellule d'une autre espèce (cellule receveuse). Elle aboutit à la création d'une nouvelle cellule (transplant) ayant le génotype et le phénotype dictés par le génome donneur. Le processus de transplantation est réalisé en présence d'une sélection antibiotique, ce qui force la sélection des cellules hébergeant le génome donneur (Lartigue *et al.*, 2007, 2009).

Les premières expériences de transplantation de génome ont été développées et réalisées chez les mycoplasmes, en utilisant *M. capricolum* comme cellule receveuse et *M. mycoides*, comme espèce donneuse de génome. Il s'agit donc ici d'une transplantation de génome d'une bactérie vers une autre bactérie, appelée aussi transplantation bactérie-bactérie. Le protocole de transplantation nécessite une préparation particulière du génome donneur. Du fait de sa taille importante, il y a de fortes probabilités pour que le chromosome bactérien soit endommagé au cours de sa manipulation, notamment par des cassures dues aux forces mécaniques appliquées lors des différents pipetages. Afin d'être protégé, le génome donneur doit donc être isolé dans des blocs d'agarose. La transplantation est réalisée selon un protocole amélioré de transformation au PEG. Le séquençage des transplants obtenus a permis de confirmer l'absence de réarrangements chromosomiques entre le génome donneur et le génome de la cellule receveuse. Il y a donc bien un remplacement propre d'un génome par un autre (Lartigue *et al.*, 2007). Après le succès des premières expériences de transplantation, d'autres essais ont été réalisés, permettant de transplanter dans la cellule receveuse *M. capricolum* (1) le génome naturel de *M. mycoides* cloné dans la levure. Dans ses expériences, le génome donneur avait été modifié dans la levure, sa transplantation a donc conduit à l'obtention de cellules mutantes (Lartigue *et al.*, 2009), (2) le génome synthétique de *M. mycoides* assemblé dans la levure conduisant à la production des premières cellules vivantes contrôlées par un génome synthétique (Gibson *et al.*, 2010) et enfin (3) une version synthétique réduite du génome de *M. mycoides* construit dans la levure, conduisant à la production de cellules vivantes quasi-minimales en laboratoire (Hutchison *et al.*, 2016). Ces expériences de transplantations de génome dites « levure-bactérie » ont mis en évidence qu'il est nécessaire d'inactiver les systèmes de restriction-modification présents dans la cellule receveuse, pour éviter que le génome donneur ne soit dégradé par les enzymes

de restriction de la cellule receveuse. Une autre alternative possible est de méthyler les génomes bactériens extraits de la levure avec des extraits cellulaires de la cellule receveuse, ou bien avec des méthyltransférases purifiées (Lartigue *et al.*, 2009).

L'ensemble de ces travaux, que certains auteurs considèrent comme une véritable rupture dans le développement de la biologie moléculaire, ont permis de reprogrammer le fonctionnement d'une espèce bactérienne (*Mycoplasma capricolum*) en remplaçant son génome par la copie synthétique du génome d'une autre espèce bactérienne (*Mycoplasma mycoides*).

Récemment, des chercheurs de notre unité ont évalué le degré de parenté nécessaire entre des génomes donateurs et la cellule receveuse au cours d'une transplantation de génomes entiers, et mis en évidence les facteurs génétiques essentiels à cette compatibilité. Leurs résultats montrent que plus le génome donneur est proche de celui de la cellule receveuse, plus l'efficacité de transplantation est élevée (Labroussaa *et al.*, 2016). Les auteurs s'attachent maintenant à comprendre les différences entre les génomes de ces deux genres bactériens, notamment au niveau des fonctions essentielles de la cellule bactérienne (ex. : réplication, transcription) afin de comprendre ce qui permet ou empêche le processus de transplantation. En cherchant à évaluer l'impact de la distance phylogénétique sur la transplantation de génomes, les auteurs ont adapté l'ensemble de ces méthodologies (clonage de génome entier dans la levure, ingénierie de génome dans la levure, et transplantation de génomes) à de nombreuses autres espèces du groupe phylogénétique Spiroplasma, certaines ayant un intérêt dans le domaine vétérinaire mais aussi en biotechnologie, agronomie ou santé, ouvrant ainsi la voie aux études de génomique fonctionnelle pour ces espèces (Lartigue *et al.*, 2014, 2019; Kannan *et al.*, 2016; Labroussaa *et al.*, 2016; Schieck *et al.*, 2016; Tsarmpopoulos *et al.*, 2016; Baby *et al.*, 2018; Jores, Ma, *et al.*, 2019).

Le développement des outils de biologie de synthèse offre des perspectives totalement inédites pour l'étude des mycoplasmes. A l'heure actuelle, ils ne sont pas encore disponibles pour l'ensemble dans *Mollicutes*. L'objectif principal de cette thèse est d'adapter ces technologies de pointe au pathogène humain *Mycoplasma pneumoniae*.

MATERIELS ET METHODES

Table 3 : Composition du milieu SP4

Base autoclavée (20 minutes/120°C)	
PPLO Broth (Difco)	1,75 g
Bacto Tryptone (Difco)	5 g
Bacto Peptone (Difco)	2,65 g
D-(+)-Glucose (Sigma)	2,5 g
Agar noble (milieu solide)	2,4 g
pH	7,8
Qsp H ₂ O	300 mL
Complément	
Sérum de veau fœtal (Eurobio, décomplémenté 1h à 56°C)	85 mL
Yeastolate 2% (m/v)	50 mL
CMRL 1066 10X (Gibco)	25 mL
Extrait de levure 25% (m/v)	17,5 mL
Glutamine 200 mM	2,5 mL
NaOH 2M	1,3 mL
Rouge de phénol 1% (m/v)	0,7 mL
Ampicilline 100 mg/mL	0,5 mL

Table 4 : Composition du milieu SP5

Base autoclavée (20 minutes/120°C)	
Mycoplasma Broth Base (Fisher Scientific)	1,75 g
Bacto Tryptone (Difco)	5 g
Bacto Peptone (Difco)	2,65 g
Agar noble (milieu solide)	5 g
pH	7,5
Qsp H ₂ O	300 mL
Complément stérile (filtré sur 0.45 µm)	
Sérum de veau fœtal (Eurobio, décomplémenté 1h à 56°C)	85 mL
Yeastolate 2% (m/v)	50 mL
CMRL 1066 10X (Gibco)	25 mL
Extrait de levure (Gibco)	17,5 mL
Glucose 20% (m/v)	12,5 mL
Bicarbonate de sodium 7.5% (m/v)	7,3 mL
Glutamine 200 mM	2,5 mL
Rouge de phénol 1% (m/v)	1 mL
Ampicilline 100 mg/mL	0,5 mL

MATERIELS ET METHODES

1. SOUCHES ET CONDITIONS DE CULTURE

1. 1. *Mycoplasma pneumoniae*

Plusieurs souches de *M. pneumoniae* ont été utilisées au cours de ces travaux. Toutes ces souches nous ont été fournies par le groupe de Luis Serrano au « Centre for Genomic Regulation » de Barcelone, dans le cadre des projets européens MycoSynVac et MiniCell.

M. pneumoniae M129 ATCC 29342 et *M. pneumoniae* FH ATCC 15531. Ces deux souches sauvages sont des isolats cliniques collectés sur des patients atteints de pneumonie atypique. Elles se cultivent en flacons de culture cellulaire T-75 dans du milieu SP4 ou SP5 (Table 3 et 4) à 37°C, sans agitation.

M. pneumoniae M129 – tet(M). Cette souche a été obtenue par transformation de la souche sauvage *M. pneumoniae* M129 avec un transposon portant la cassette de résistance à la tétracycline *tet(M)*. Elle se cultive en flacons de culture cellulaire T-75 dans du milieu SP4 ou SP5 contenant 5 µg/mL de tétracycline (Table 3 et 4) à 37°C, sans agitation.

1. 2. *Saccharomyces cerevisiae*

Deux souches de la levure *S. cerevisiae* ont été utilisées au cours de ces travaux. Ces souches étaient disponibles au laboratoire, et sont décrites dans la littérature.

S. cerevisiae VL6-48N [*MAT α* , *his3- Δ 200*, *trp1- Δ 1*, *ura3-52*, *lys2*, *ade2-101*, *met14*].

S. cerevisiae W303-1a [*MAT α* , *his3-11*, *his3-15*, *trp11*, *leu2-3*, *leu2-112*, *ura3-1*, *ade2-1*, *can1-100*].

Ces deux souches sont auxotrophes pour certains acides aminés ou bases nucléiques (voir géotypes ci-dessus), ce qui permet d'utiliser plusieurs marqueurs de sélection basés

sur la complémentation fonctionnelle de ces auxotrophies. Ces souches sont cultivées en milieu riche YPDA (Yeast Peptone Dextrose Adenine, Clontech) à 30°C et sous agitation (190 rpm). Les levures transformées sont cultivées et sélectionnées sur milieu minimal SD (Synthetic Drop-out, Clontech) appauvri en un ou plusieurs acides aminés.

1. 3. *Escherichia coli*

Plusieurs souches commerciales de *E. coli* ont été utilisées afin de propager et d'amplifier les différents plasmides utilisés au cours de ces travaux. Elles sont toutes cultivées dans du milieu LB contenant l'antibiotique approprié (kanamycine 50 µg/mL, ampicilline 100 µg/mL, tétracycline 5 µg/mL, chloramphénicol 12,5 µg/mL) à 37°C sous agitation (220 rpm).

E. coli DH10B [F- *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74* *recA1 endA1 araD139* Δ(*ara, leu*)7697 *galU galK* λ⁻ *rpsL* (Str^R) *nupG*] (initialement fournie par Thermo Fisher, puis propagée au laboratoire). Elle a été utilisée pour le clonage des plasmides ARNg « single target » (pgRNAMPN372, pgRNAMPN142 et pgRNA400), ainsi que pour le clonage du plasmide pMT85puroM-PS*lacZ*-pRS313.

E. coli NEB®5-α [*fhuA2* (*argF-lacZ*)U169 *phoA glnV44 80* (*lacZ*)M15 *gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*] (NEB). Elle est utilisée pour le clonage du plasmide ARNg « double target » pgRNAMPN142-400.

E. coli NEB®10-β [*araD139* Δ(*ara-leu*)7697 *fhuA lacX74 galK* (Φ 80 Δ(*lacZ*)M15) *mcrA galU recA1 endA1 nupG rpsL* (Str^R) Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*)] (NEB). Elle est utilisée pour le clonage des plasmides ARNg double target pgRNAMPN372-142 et pgRNAMPN372-400, ainsi que pour le clonage du plasmide ARNg « triple target » (pgRNAMPN372-142-400).

E. coli TransforMax™ EPI300™ F⁻ *mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) (Str^R) φ80*lacZ*ΔM15 Δ*lacX74 recA1 endA1 araD139* Δ(*ara, leu*)7697 *galU galK* λ⁻ *rpsL nupG trfA dhfr*] (Lucigen). Cette souche est adaptée pour le clonage de grands plasmides (jusqu'à 145 kb). Elle dispose d'un système de contrôle du nombre de copies du plasmide pCC1FOS et de ses dérivés. Ce

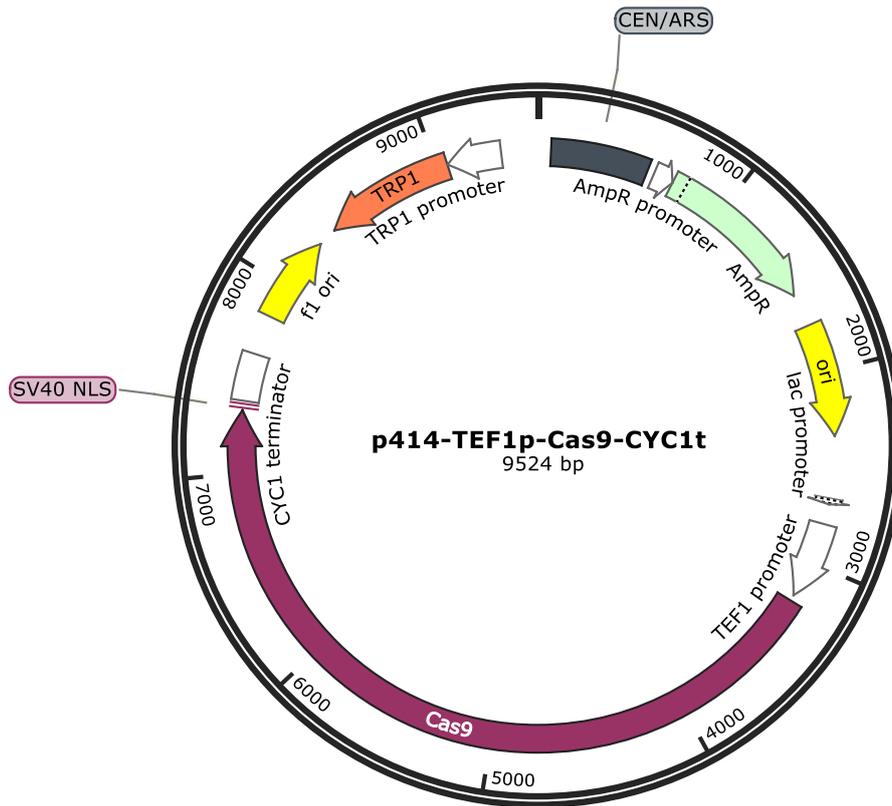


Figure 28 : Carte du plasmide p414-TEF1p-Cas9-CYC1t

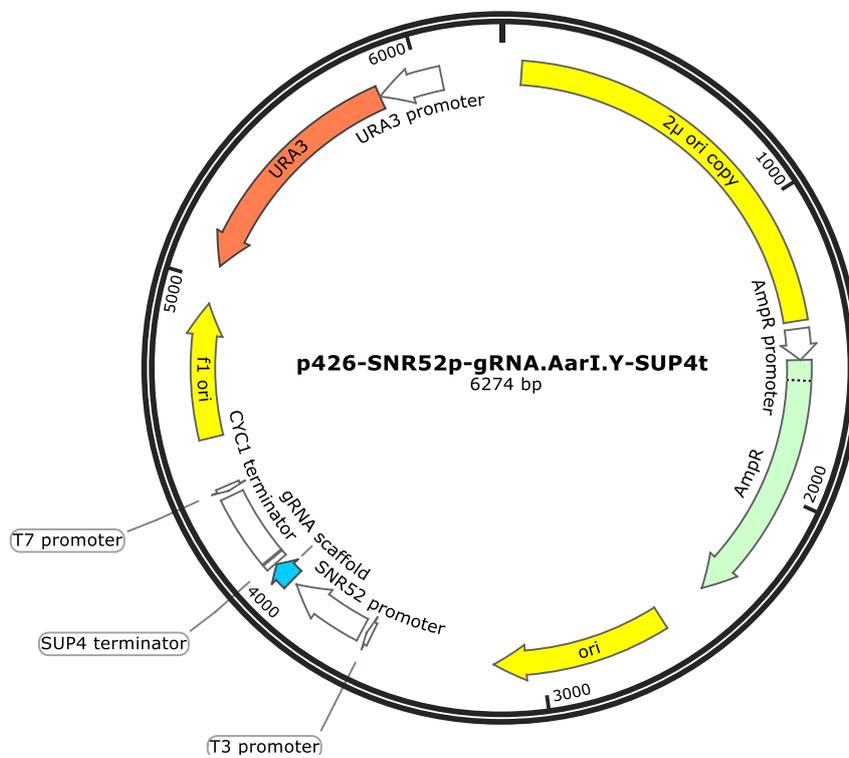


Figure 29 : Carte du plasmide p426-SNR52p-gRNA.AarI.Y-SUP4t

mécanisme permet de maintenir de manière stable de grands plasmides en gardant un nombre faible de copies, puis d'induire une forte augmentation du nombre de copies afin de pouvoir purifier de grandes quantités d'acides nucléiques. Au cours de nos travaux, cette souche a été utilisée pour amplifier le plasmide pCC1YTRP, ainsi que les plasmides pCC1YTRP-*gmR-X-cre* qui en dérivent.

2. BIOLOGIE MOLECULAIRE

2. 1 Plasmides

2. 1. 1. Plasmides commerciaux ou précédemment développés

Différents plasmides déjà conçus au laboratoire, ou disponibles commercialement ou par échanges académiques ont été utilisés au cours de ces travaux.

p414-TEF1p-Cas9-CYC1t : Ce plasmide permet l'expression constitutive chez la levure, d'une version codon optimisée de la Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (Figure 28). Ce plasmide dispose d'un centromère levure (CEN6), d'une origine de répllication levure (ARSH4), et d'un marqueur d'auxotrophie pour le tryptophane (TRP1). L'expression constitutive de la Cas9 est contrôlée par le promoteur constitutif TEF1P, et le tag SV40 en C-terminal lui confère une localisation nucléaire. Le plasmide p414-TEF1p-Cas9-CYC1t a été développé par DiCarlo *et al.*, 2013 et commercialisé par Addgene (#43802)(DiCarlo *et al.*, 2013).

p426-SNR52p-gRNA.AarI.Y-SUP4t : Ce plasmide permet l'expression chez la levure d'un ARN guide (ARNg) chimérique, composé d'une séquence de 20 bases spécifiques du gène cible (crARN ou « spacer ») qui est fusionnée avec un composant structural (tracrARN). L'expression de l'ARNg est constitutive, sous le contrôle du promoteur constitutif SNR52 (Figure 29). C'est un plasmide à grand nombre de copies disposant d'une origine de répllication 2 μ et d'un marqueur d'auxotrophie pour l'uracile (URA3). Ce plasmide est issu de la modification du plasmide p426-SNR52p-gRNA.CAN1.Y-SUP4t (DiCarlo *et al.*, 2013) et commercialisé par Addgene (#43803). Le spacer original ciblant le gène de levure CAN1.Y a été remplacé par un site de clonage comprenant deux sites de restriction de l'enzyme AarI (Tsarnpopoulos *et al.*,

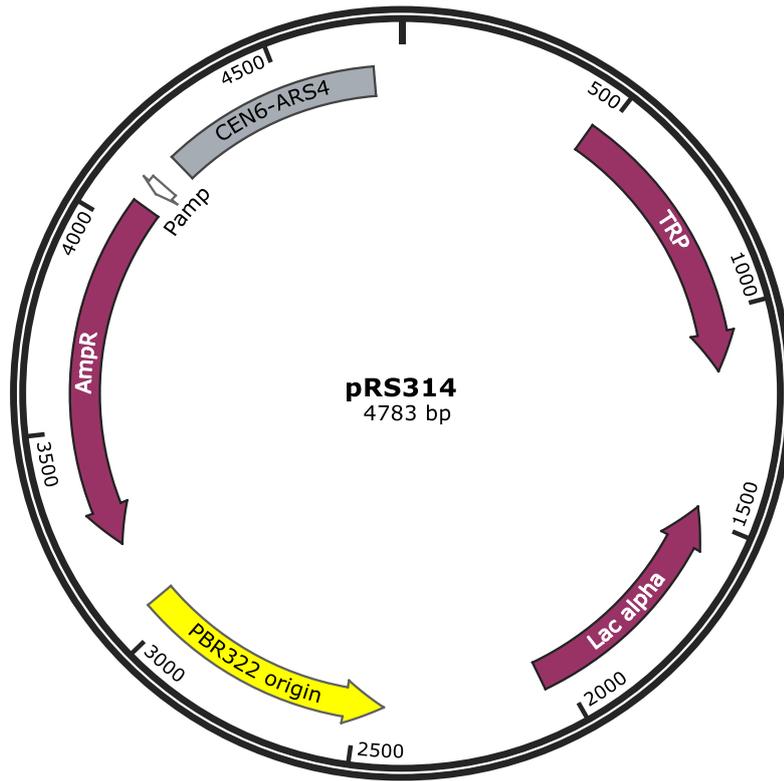


Figure 30 : Carte du plasmide pRS314

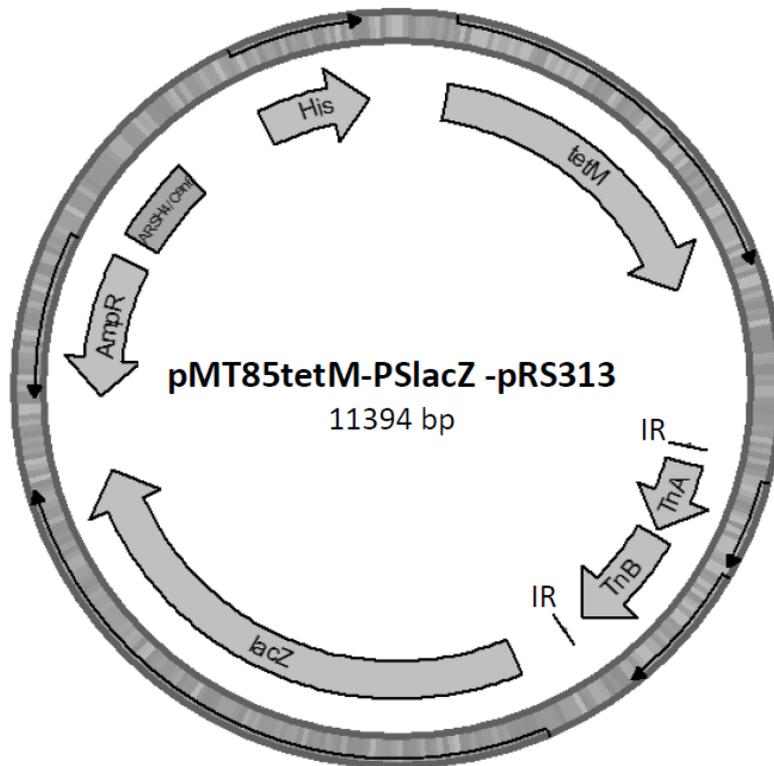


Figure 31 : Carte du plasmide pMT85PStetM-PSlacZ-pRS313

2016). Dans le plasmide résultant (p426-SNR52p-gRNA.AarI.Y-SUP4t), le spacer de clonage peut être remplacé par un spacer de notre choix, par restriction et ligature d'un duplex d'oligonucléotides.

pS314 : Ce plasmide contient les séquences dites « éléments levure », c'est-à-dire un centromère levure (CEN6), une origine de réplication levure (ARSH4) et un marqueur d'auxotrophie pour l'histidine (HIS3) (Figure 30).

pMT85tetM-PSlacZ-pRS313 : Ce plasmide intégratif chez les mycoplasmes a été développé par (Labroussaa *et al.*, 2016) (Figure 31). Il contient une cassette *PSlacZ*, composée du gène *lacZ* codant la β -galactosidase sous le contrôle du promoteur constitutif spiruline PS, une cassette contenant les éléments levure (CEN6, ARSH4, HIS3), ainsi qu'un système de transposition composé de séquences d'insertion répétées inversées (IR) et des gènes *TnA* et *TnB* codant une transposase. Il contient également le marqueur de sélection *tet(M)*, conférant la résistance à la tétracycline.

pMT85Genta : Ce plasmide a été développé par Zimmerman & Herrmann, 2005 (Figure 32) (Zimmerman and Herrmann, 2005). Il porte le marqueur de résistance à la gentamycine Gentr. Ce plasmide est utilisé comme matrice pour amplifier la cassette *gmR* qui est utilisée lors des expériences de GT-RMCE pour l'assemblage dans la levure du plasmide pCC1YTRP-*gmR-X-cre*.

pMiniTn4001PSpuro : Ce plasmide intégratif chez les mycoplasmes a été développé par Algire *et al.*, 2009 (Figure 33) (Algire *et al.*, 2009). Il porte le marqueur de sélection *PuroR* qui confère la résistance à la puromycine, sous le contrôle du promoteur spiruline PS, et encadré par des séquences d'insertion IS256. Il contient aussi un gène codant une transposase.

pCC1FOS : Ce plasmide est commercialisé par Epicentre (CCFOS110) et permet de cloner de grands fragments d'ADN (Figure 34). L'utilisation de la souche *E. coli* EPI300 permet de contrôler le nombre de copies de pCC1FOS et de ces dérivés. Ce plasmide a servi de base au développement du plasmide pCC1YTRP.

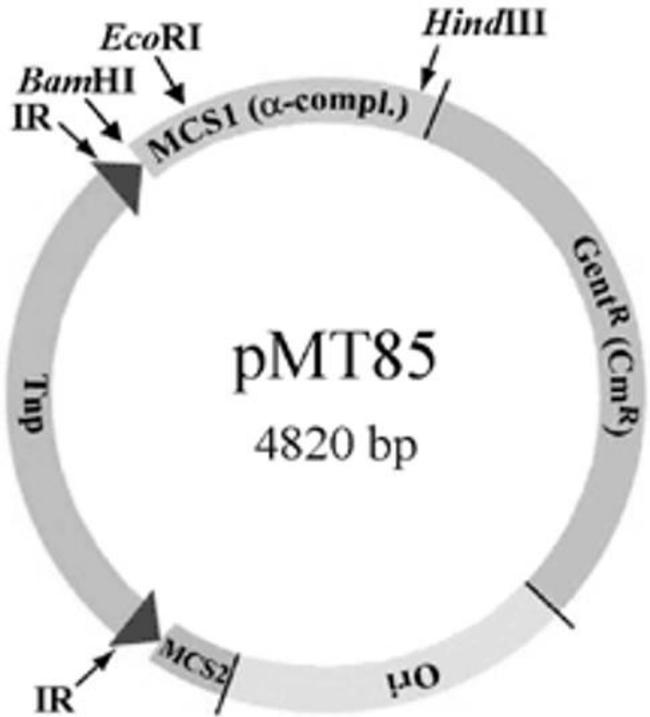


Figure 32 : Carte du plasmide pMT85Genta

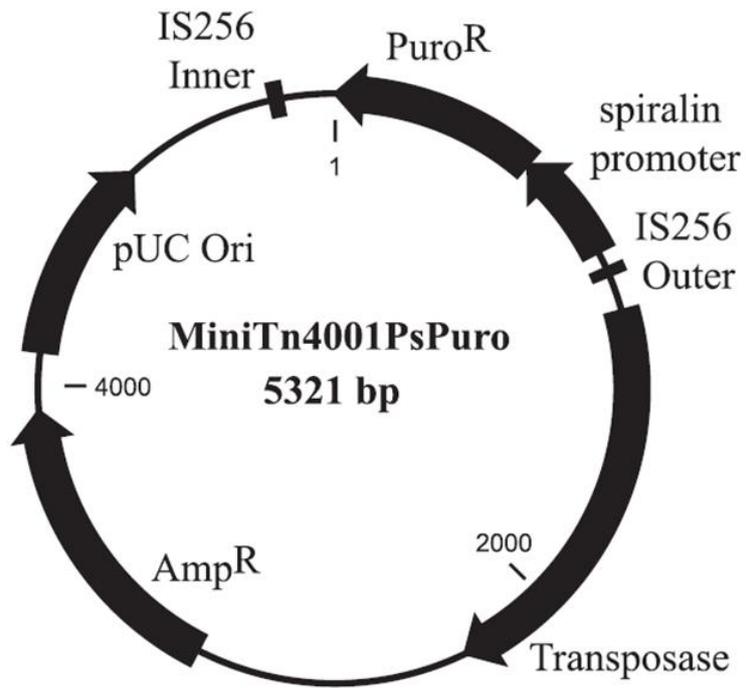


Figure 33 : Carte du plasmide pMiniTn4001PsPuro

pGmRSCre : Ce plasmide a été développé par Mariscal *et al.*, 2016 (Figure 35) (Mariscal *et al.*, 2016). Il contient le gène codant pour la recombinase Cre. Il sert de matrice pour amplifier la cassette *cre*, qui est utilisée lors des expériences de GT-RMCE pour l'assemblage dans la levure du plasmide pCC1YTRP-*gmR-X-cre*.

pBSK pad014, pBSK pad372 et pBSK pad400 : Ces trois plasmides ont été développés au laboratoire sur la base du plasmide pBluescript II SK commercialisé par Stratagene (Figures 36-37-38). Ils permettent l'insertion dans le génome de *M. pneumoniae* des séquences « landing pads ».

pBSK pad014 permet l'insertion de l'opéron *s10* dans le génome de *M. pneumoniae*. Il porte la cassette *cat* de résistance au chloramphénicol, entourée des séquences *lox71* et *loxm2/66*. De part et d'autre de la cassette *lox71-cat-loxm2/66*, se trouvent des séquences de 500 pb identiques aux régions en amont et en aval du *locus mpn014* de *M. pneumoniae*.

pBSK pad372 contient la cassette *tet(M)* conférant la résistance à la tétracycline juxtaposée à la séquence *lox71*. De part et d'autre de la cassette *lox71-tet(M)*, se trouvent des séquences de 500 pb identiques aux régions en amont et en aval du *locus mpn372* de *M. pneumoniae*.

pBSK pad400 contient la cassette *cat* de résistance au chloramphénicol juxtaposée à la séquence *lox2m/66*. De part et d'autre de la cassette *cat-lox2m/66*, se trouvent des séquences de 500 pb identiques aux régions en amont et en aval du *locus mpn400* de *M. pneumoniae*.

2. 1. 2. Plasmides développés au cours de ces travaux

Différents plasmides ont été développés et produits au cours de nos travaux. Ces plasmides dérivent de ceux décrits dans la section précédente, et ont été assemblés en utilisant des méthodes standards de biologie moléculaire décrites ci-après.

pMT85puroM-PSlacZ-pRS313 : Ce plasmide (Figure 39) dérive du plasmide pMT85tetM-PSlacZ-pRS313 (Labroussaa *et al.*, 2016), après remplacement du marqueur de sélection *tet(M)* par le marqueur *puroM*. Brièvement, la cassette *puroM* est amplifiée à partir du plasmide pMiniTn4001PsPuro (Algire *et al.*, 2009) en utilisant des amorces qui contiennent des sites de restriction pour les enzymes *AgeI* et *NsiI*. La PCR est réalisée avec la polymérase

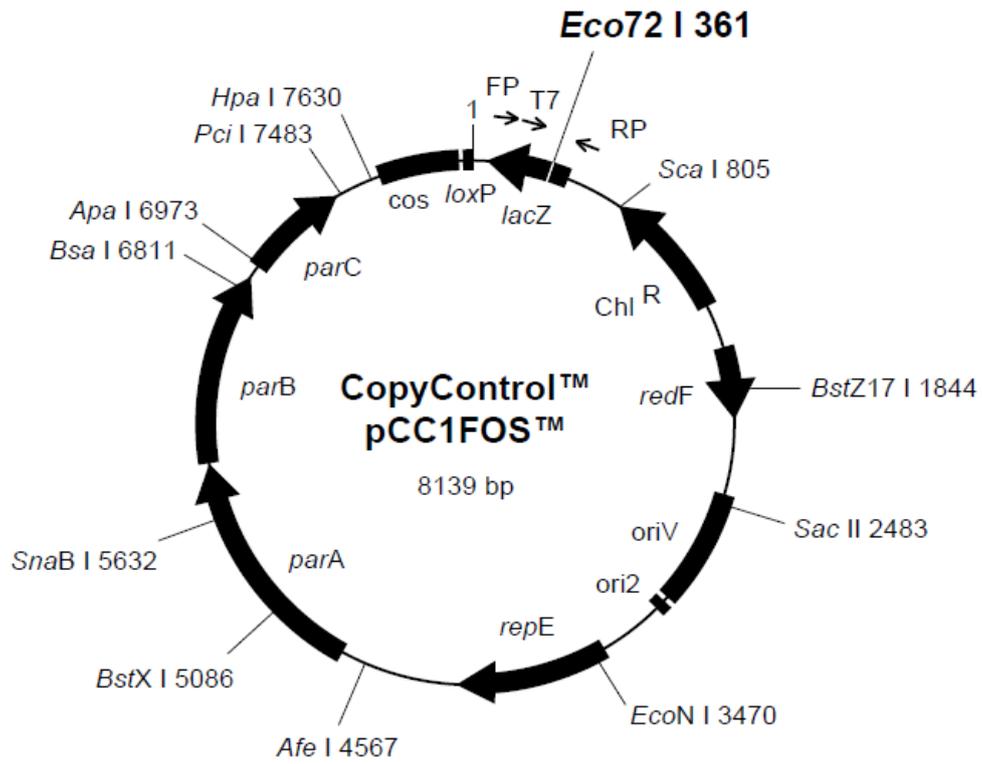


Figure 34 : Carte du plasmide pCC1FOS™

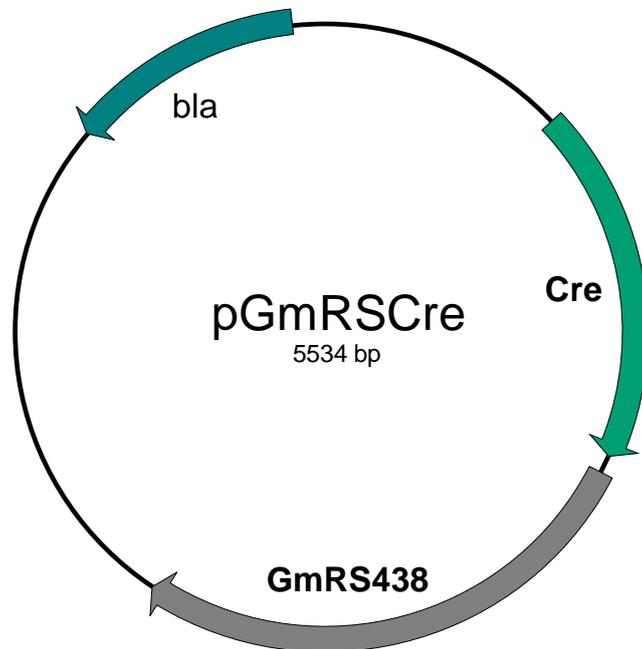


Figure 35 : Carte du plasmide pGmRSCre

Advantage 2 (Clontech). Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis purifiés et quantifiés. Le plasmide pMT85tetM-PSlacZ-pRS313 (1 µg) et la cassette puroM purifiée (1 µg) sont digérés avec les enzymes de restriction Agel-HF et Nsil-HF (NEB). Les produits de digestions sont ensuite purifiés et quantifiés. La ligature entre le plasmide pMT85-PSlacZ-pRS313 et la cassette puroM, tous deux digérés, est réalisée en utilisant la T4 DNA Ligase (Promega), selon les instructions du fournisseur (la nuit à 16°C). Le mélange de ligature (1 µL) est ensuite transformé par électroporation dans des bactéries *E. coli* DH10B. Après étalement des cellules transformées sur milieux de sélection, une colonie est isolée puis mise en culture liquide. Le plasmide est extrait par mini-préparation, quantifié, vérifié puis stocké à -20°C. La vérification du plasmide est réalisée par analyse du profil de restriction obtenu en électrophorèse après digestion par différentes enzymes de restriction (HincII, Agel/Nsil, PvuII), et par séquençage Sanger.

pgRNAMPN372, pgRNAMPN142 et pgRNAMPN400 : Ces trois plasmides sont construits selon le protocole décrit dans Tsarmopoulos *et al.*, 2015, à partir du plasmide p426-SNR52p-gRNA.AarI.Y-SUP4t (Tsarmopoulos *et al.*, 2016). Les ARNg permettant de cibler les *loci mpn372, mpn142* et *mpn400* sont conçus en utilisant l'outil en ligne Sequence Scan for CRISPR (<http://crispr.dfci.harvard.edu/SSC/>). Les séquences sélectionnées sont les suivantes: gRNAMPN372, CAACGTGAATGGTTACCGA ; gRNAMPN142, GGTATCAGTCGGTTCATCGG ; et gRNAMPN400, GGGTGCCAGTGCTTACGAAG.

Pour chaque gRNA, deux oligonucléotides complémentaires sont dessinés, composés de la séquence de l'ARNg, encadrée par des séquences complémentaires au site de restriction par l'enzyme AarI (Figure 40). Ces oligonucléotides sont phosphorylés à leurs extrémités en utilisant la T4 Polynucleotide Kinase (Promega). La réaction de phosphorylation est composée de 100 pmol de chaque oligonucléotide, 1X Kinase Buffer, 1 mM ATP et 20 unités de T4 Polynucleotide Kinase, dans un volume final de 40 µL. Le mélange est incubé pendant 30 minutes à 37°C dans un thermocycleur. Cette réaction est immédiatement suivie d'une incubation pendant 5 minutes à 95°C, afin de désactiver la kinase, puis d'une diminution de la température du thermocycleur à 16°C en paliers de 0.1°C par seconde, afin de permettre l'hybridation des oligonucléotides. Le vecteur p426-SNR52p-gRNA.AarI.Y-SUP4t est digéré avec l'enzyme de restriction AarI (Thermo Scientific). La réaction est composée de 1 µg du vec-

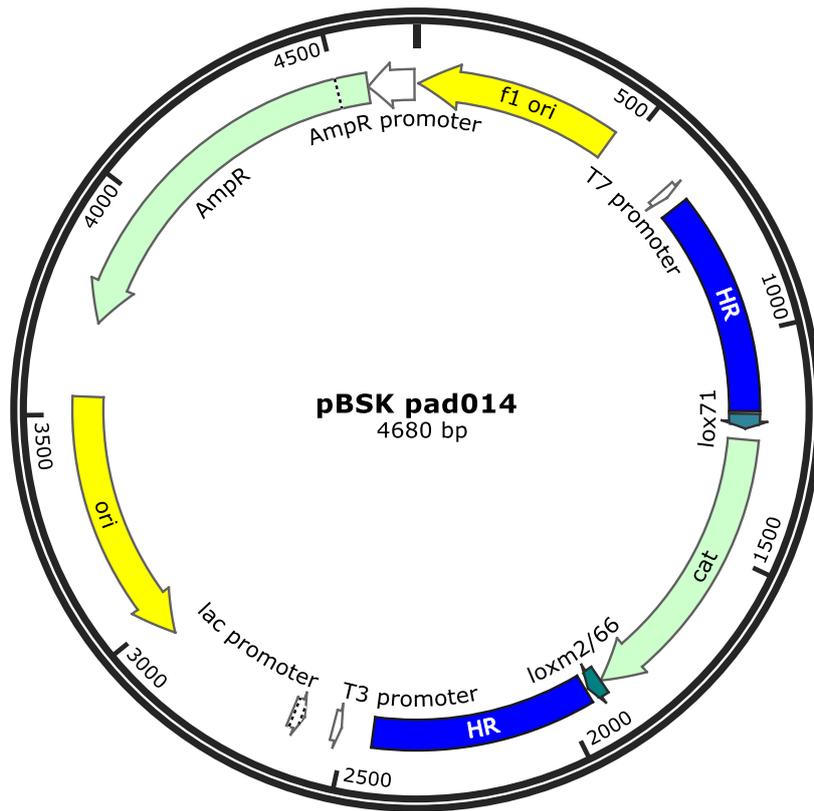


Figure 36 : Carte du plasmide pBSK pad014

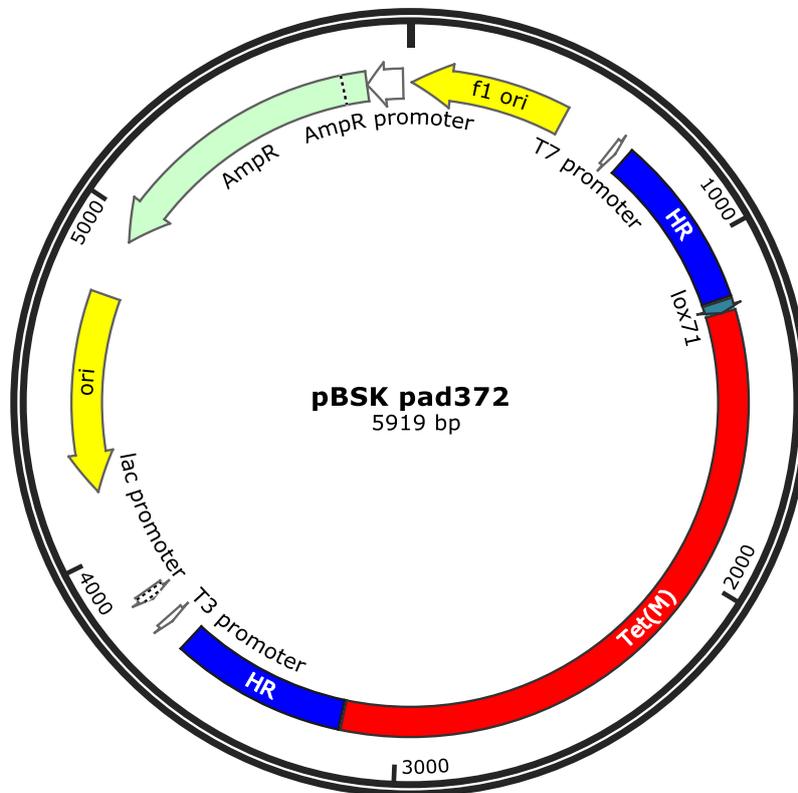


Figure 37 : Carte du plasmide pBSK pad372

-teur p426-SNR52p-gRNA.AarI.Y-SUP4t, 1X Buffer AarI, 1X oligonucléotide solution), 4 unités de l'enzyme AarI, dans un volume total de 20 µL. Le mélange est incubé pendant 5 heures à 37°C. Le vecteur digéré est ensuite déphosphorylé par ajout direct, dans la réaction de digestion, de 5 unités d'Antarctic Phosphatase (NEB) et 1X Antarctic Phosphatase Reaction Buffer. Le mélange est incubé pendant une heure à 37°C, puis pendant 5 minutes à 72°C afin d'inactiver la phosphatase. Le vecteur digéré déphosphorylé est ensuite purifié et quantifié. La ligation entre le vecteur p426-SNR52p-gRNA.AarI.Y-SUP4t et les oligonucléotides est réalisée avec la T4 DNA Ligase (Promega), selon les instructions du fournisseur, en utilisant 100 ng de vecteur déphosphorylé et 4 µL d'une dilution au 1/100ème des oligonucléotides hybridés, dans un volume final de 10 µL. Le mélange est incubé sur la nuit à 16°C. Le mélange de ligation (1 µL) est ensuite transformé par électroporation dans des bactéries *E. coli* DH10B. Après étalement des cellules transformées sur milieux de sélection, une colonie est isolée puis mise en culture liquide. Le plasmide est extrait par mini-préparation, quantifié, vérifié et stocké à -20°C. La vérification du plasmide est réalisée par analyse du profil de restriction obtenu en électrophorèse, après digestion par AarI. Le profil attendu est celui du vecteur non digéré (profil à plusieurs bandes correspondant aux différentes conformations du plasmide). En effet, si l'ARNg est cloné correctement, le site de restriction AarI est éliminé et remplacé par le spacer. Afin de vérifier la séquence de chaque ARNg, les plasmides pgRNA obtenus sont séquencés.

pgRNAMPN372-142, pgRNAMPN372-400 et pgRNA-triple-target : Le plasmide pgRNAMPN372-142 (Figure 41) est construit par ajout de l'ARNg permettant de cibler le gène *mpn142* au plasmide pgRNAMPN372. Le plasmide pgRNAMPN372-400 est construit par ajout de l'ARNg permettant de cibler le gène *mpn400* au plasmide pgRNAMPN372. Le plasmide pgRNA-triple-target (Figure 42) est construit par ajout des ARNg permettant de cibler les gènes *mpn142* et *mpn400* au plasmide pgRNAMPN372. Les cassettes gRNAMPN142 et gRNA400 sont amplifiées par PCR à partir des plasmides pgRNAMPN142 et pgRNAMPN400, respectivement. Le plasmide pgRNAMPN372 est linéarisé par PCR. Les PCRs sont réalisées avec la polymérase Advantage® 2 (Clontech) en suivant les recommandations du fournisseur. Les produits PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis purifiés et quantifiés. Les 50 µL de produit PCR purifiés sont ensuite traités avec 40 unités de l'enzyme de restriction DpnI (NEB), dans un volume final de 100 µL, afin d'éliminer le vecteur circulaire

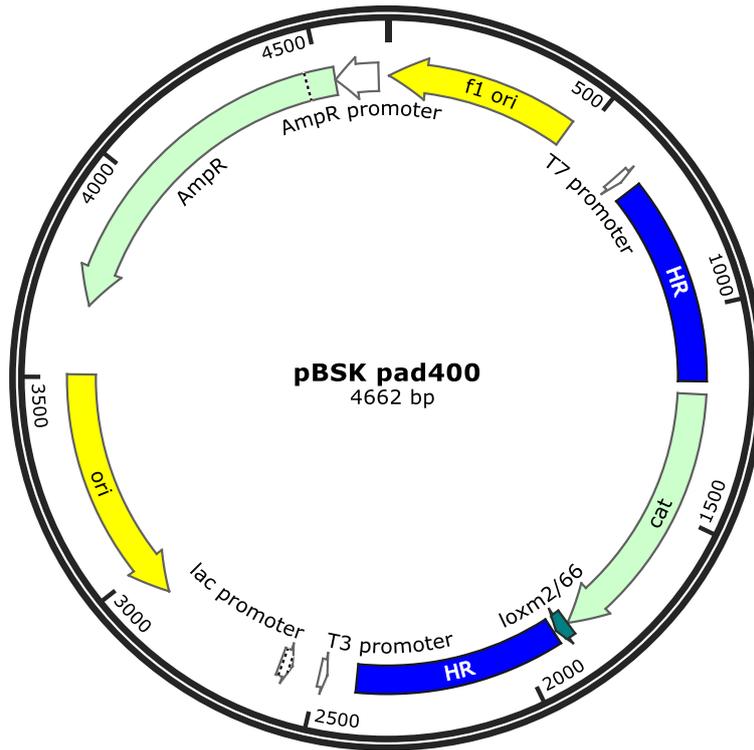


Figure 38 : Carte du plasmide pBSK pad400

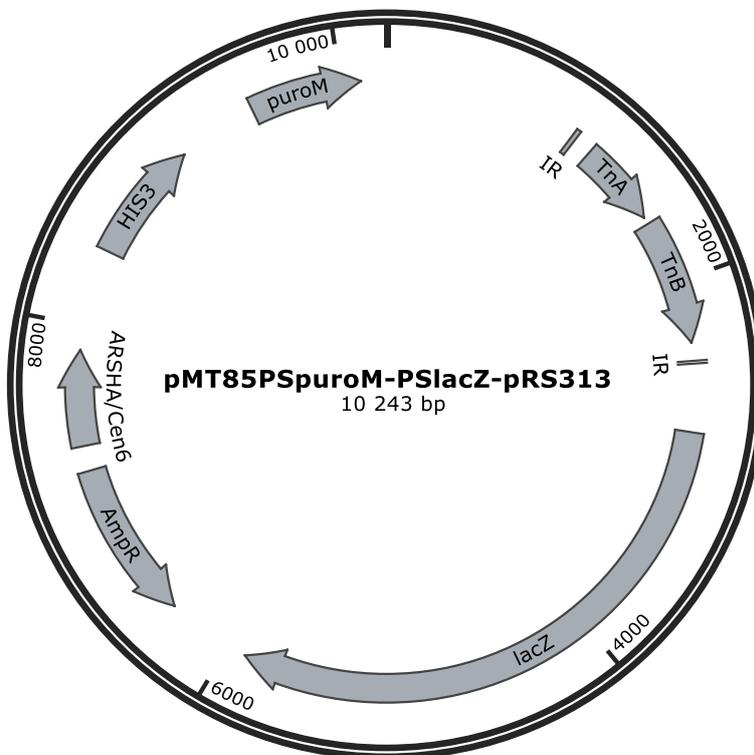


Figure 39 : Carte du plasmide pMT85puroM-PSlacZ-pRS313

ayant servi de matrice. Le mélange est incubé pendant 2 heures à 37°C. Les produits de digestion sont de nouveau purifiés et quantifiés. Les différents fragments d'ADN sont ensuite assemblés par Gibson Assembly (NEB). Chaque fragment (25 fmol) est ajouté dans un tube contenant un volume final de 5 µL d'eau. Ce mélange est ajouté à 15 µL de Gibson Assembly Master Mix (NEB), et incubé immédiatement pendant une heure à 50°C. Il est ensuite transformé par électroporation dans des bactéries *E. coli* NEB10-β (NEB). Après étalement des cellules transformées sur milieu de sélection, une colonie est isolée puis mise en culture liquide. Le plasmide est extrait par mini-préparation, quantifié vérifié et conservé à -20°C. Le plasmide est vérifié par analyse du profil de restriction obtenu en électrophorèse, après digestion par différentes enzymes de restriction (NotI/EcoRV ou XbaI). La présence de chaque ARNg est également vérifiée par PCR. Enfin, les plasmides obtenus sont séquencés afin de vérifier la séquence de chaque ARNg.

pgRNAMPN142-400 : Le plasmide pgRNAMPN142-400 (Figure 43) est construit en supprimant l'ARNg ciblant le *locus mpn372* du plasmide pgRNA-triple-target. Cette suppression est réalisée à l'aide du kit « Q5 Site-Directed Mutagenesis » (NEB). La réaction PCR est composée de 1X Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix, 0,5 µM de chaque amorce, et 10 ng de matrice d'ADN (plasmide pgRNA-triple-target), dans un volume final de 25 µL. Le cycle PCR comporte une étape de dénaturation initiale de 30 secondes à 98°C, de 25 cycles composés d'une phase de dénaturation de 10 secondes à 98°C, une phase d'hybridation de 30 secondes à 63°C, et une phase d'élongation de 4 minutes à 72°C, et se termine par une étape d'extension finale de 2 minutes à 72°C. Les produits PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis soumis à un traitement par les enzymes kinase, ligase et DpnI (réaction KLD, Kit Q5 Site-Directed Mutagenesis). La réaction est composée de 1X KLD Reaction Buffer, 1X KLD Enzyme Mix, et 1 µL de produit PCR, dans un volume final de 10 µL. La réaction est incubée pendant 5 minutes à température ambiante. Un volume de 5 µL de réaction KLD est ensuite transformé par choc thermique dans des bactéries chimio-compétentes *E. coli* NEB5-α (NEB). Après étalement des cellules transformées sur milieu de sélection, une colonie est isolée puis mise en culture liquide. Le plasmide est extrait par mini-préparation, quantifié, vérifié et conservé à -20°C. Le plasmide est vérifié par analyse du profil obtenu en électrophorèse, après digestion par les différentes enzymes de restriction NotI/EcoRV ou XbaI. Afin de vérifier la séquence de chaque ARNg, le plasmide pgRNAMPN142-

gRNAMPN372

ATGATCCAACGTGAATGGTTTACCGAGT
AGGTTGCACTTACCAAATGGCTCAAAT

Figure 40 : Spacer composé d'un duplex d'oligonucléotides correspondant au gRNAMPN372, encadré par les séquences complémentaires au site de restriction par l'enzyme AarI.

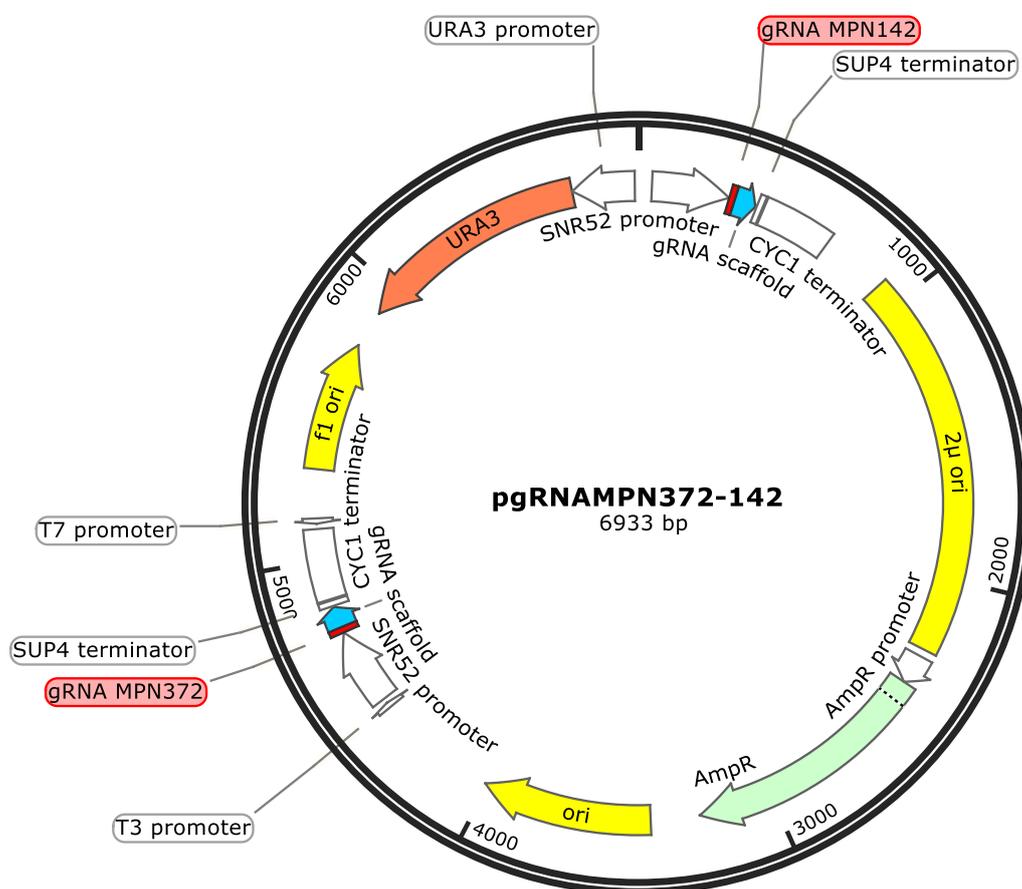


Figure 41 : Carte du plasmide pgRNAMPN372-142

-400 obtenu est séquencé.

pCC1YTRP : Le plasmide pCC1YTRP (Figure 44) est construit par assemblage dans la levure du plasmide pCC1FOS linéarisé et d'une cassette contenant les éléments levure (CEN6, ARSH4 et TRP1). La cassette CEN-ARS-TRP est obtenue par PCR à partir du plasmide pRS314. La PCR est réalisée avec la polymérase Q5 High-Fidelity (NEB). Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, purifiés et quantifiés. Le plasmide pCC1FOS, vendu linéarisé par l'enzyme de restriction Eco72I et déphosphorylé (Epicentre) et la cassette CEN-ARS-TRP sont co-transformés dans la levure *S. cerevisiae* VL6-48N, selon le protocole de transformation à l'acétate de lithium développé par Gietz et al., en 1995 (Gietz et al., 1995). Les levures transformées sont étalées sur milieu de sélection. Les colonies obtenues sont criblées afin d'identifier les clones comportant la construction désirée. Pour cela, une extraction d'ADN total est réalisée à partir d'une colonie, puis une PCR de contrôle est réalisée. L'ADN issu des clones positifs (1µL) est ensuite transformé par électroporation dans des bactéries *E. coli* EPI300 (Epicentre). Après étalement des cellules transformées sur milieu de sélection, une colonie est isolée puis mise en culture liquide. Le plasmide est extrait par mini-préparation, quantifié, vérifié et stocké à -20°C. Le plasmide est vérifié par analyse du profil de restriction obtenu en électrophorèse, après digestion par l'enzyme de restriction XbaI.

Dans les cellules *E. coli* EPI300, les plasmides sont maintenus à un faible nombre de copies. Pour obtenir la quantité de plasmides requises pour les expériences suivantes, la souche *E. coli* EPI300 portant le plasmide pCC1YTRP est mise en culture dans 30 mL de LB (chloramphénicol 12,5 µg/mL) durant une nuit à 37°C, sous agitation (190 rpm). Le lendemain, la totalité de la culture est inoculée dans un volume final de 300 mL de LB (chloramphénicol 12,5 µg/mL), supplémenté de 300 µL de solution d'induction (Epicentre). Cette solution permet d'induire l'augmentation du nombre de copies du plasmide. Après 4 heures d'incubation à 37°C, sous agitation (190 rpm), les plasmides sont extraits par midi-préparation, quantifié, vérifié et stocké à -20°C.

2 .1. 3. Mini-préparation de plasmides

La mini-préparation de plasmide permet d'extraire une petite quantité (100 ng à 5 µg) d'ADN plasmidique provenant de bactéries ayant subi une transformation, le plus souvent *E.*

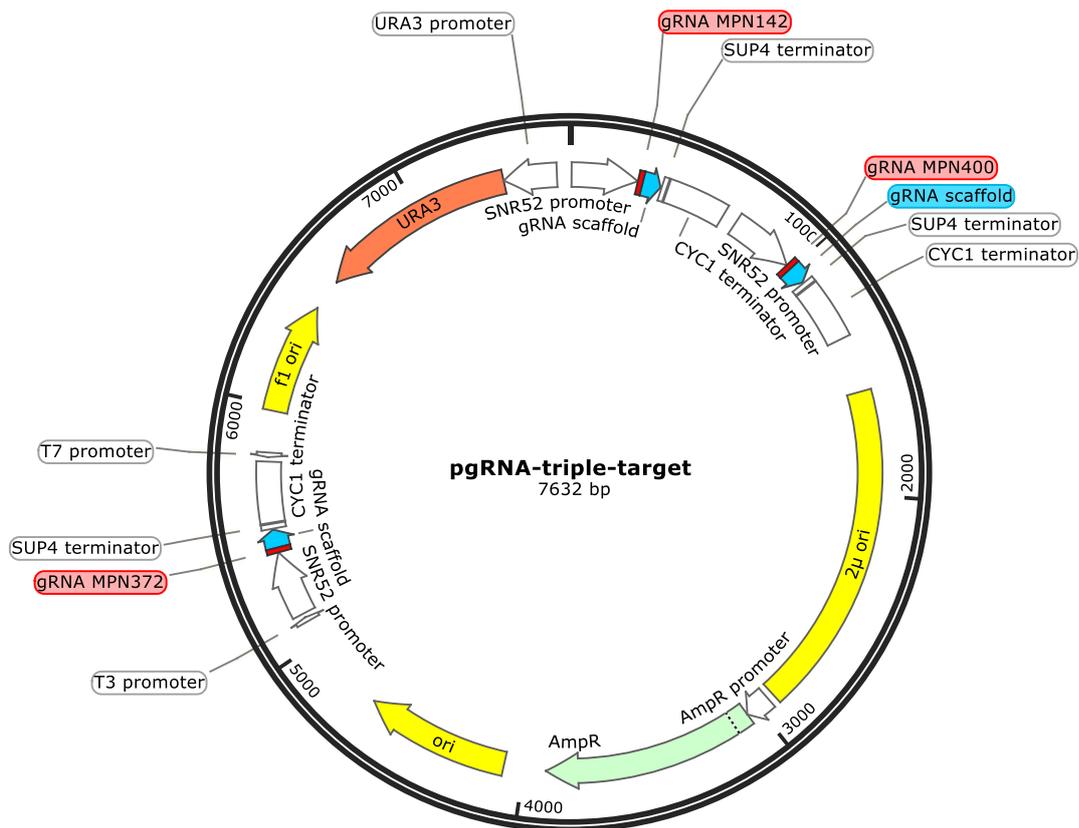


Figure 42 : Carte du plasmide pgRNA-triple-target

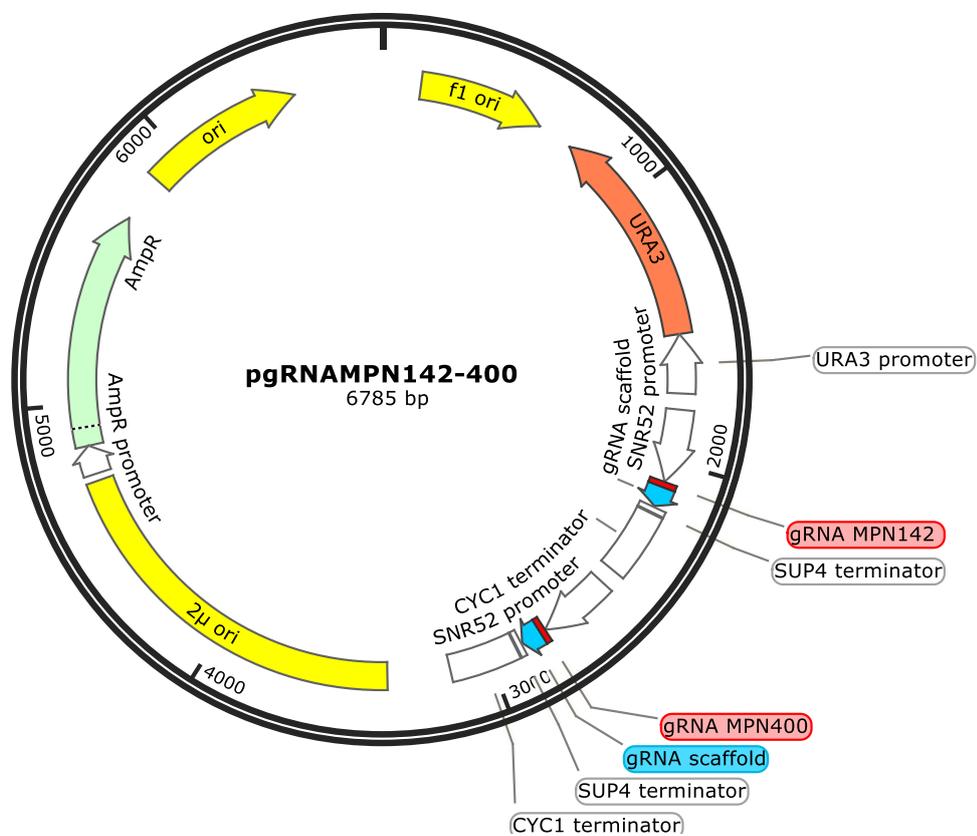


Figure 43 : Carte du plasmide pgRNAMPN142-400

coli. Brièvement, l'ADN total est libéré par lyse alcaline des cellules d'*E. coli*, puis ADNg et plasmides sont précipités différenciellement par neutralisation rapide du pH et séparés par centrifugation. Les plasmides restés dans la phase soluble sont adsorbés sur des colonnes de silice, lavés avec une solution alcoolique, puis élués. Les plasmides purifiés sont quantifiés et conservés à -20°C. Pour chaque mini-préparation, une colonie bactérienne est ensemencée dans 3 ml de milieu LB contenant l'antibiotique approprié. La culture est incubée toute la nuit à 37°C, sous agitation (220 rpm). Le lendemain 1,5 mL de culture est prélevé afin d'en extraire l'ADN plasmidique. Cette extraction est réalisée en utilisant le kit « NucleoSpin® Plasmid EasyPure » (Macherey-Nagel), en suivant les instructions du fournisseur.

2. 1. 4. Midi-préparation de plasmides

Le principe de la purification est le même que celui du kit de mini-préparation décrit ci-dessus. Lorsque de plus grandes quantités de plasmides sont requises, une colonie bactérienne est ensemencée dans 100 mL de milieu LB contenant l'antibiotique approprié. La culture est incubée toute la nuit à 37°C, sous agitation (190 rpm). L'ADN plasmidique est extrait de la totalité de la culture, en utilisant le kit « NucleoBond® Xtra Midi » (Macherey-Nagel) et en suivant les instructions du fournisseur. Après élution, les plasmides purifiés sont quantifiés et conservés à -20°C.

2. 1. 5. Séquençage Sanger des plasmides

Afin de confirmer que les plasmides produits comportent bien les séquences désirées, et sont exempts de mutation, un séquençage Sanger est effectué par la société prestataire GENEWIZ. Les régions d'intérêt sont analysées par 1 passe ou 2 passes sur les 2 brins complémentaires. Les résultats de séquençage (chromatogrammes) sont systématiquement étudiés manuellement, afin de valider la qualité du base-calling. Généralement, les 30-50 premières bases générées sont éliminées car considérées comme peu fiables. Les 600-900 bases suivantes sont considérées comme valides en fonction des résultats de l'observation des chromatogrammes.

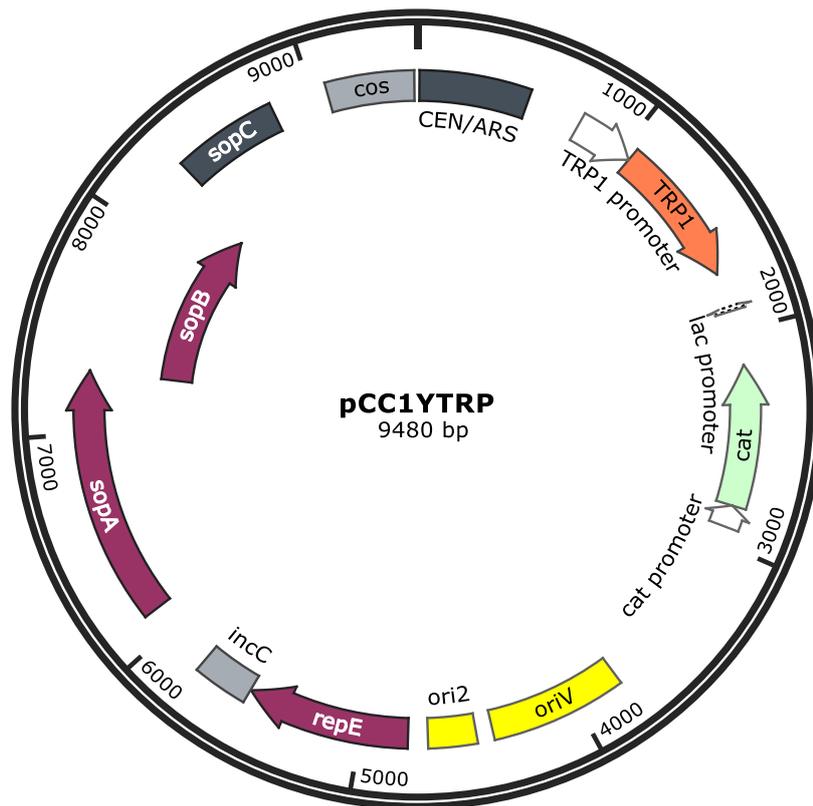


Figure 44 : Carte du plasmide pCC1YTrp

2. 2. Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

2. 2. 1. PCR Simplex

Différentes PCR ont été réalisées au cours de ces travaux, avec différents objectifs. La PCR a été utilisée soit comme un moyen de détection (afin de vérifier la présence d'un *locus* donné dans un échantillon), soit comme un moyen de production (afin de créer de grandes quantités d'un fragment ADN particulier). En fonction de l'application voulue, différentes ADN polymérases et kits associés ont été utilisés. Plusieurs facteurs ont été pris en compte lors du choix des systèmes à utiliser : le prix de réaction, la fidélité de la polymérase, la taille de l'amplicon et la capacité à amplifier de l'ADN matrice de faible qualité. Nous avons utilisé :

La polymérase Advantage 2 (Clontech) : Ce kit contient un mélange entre une Taq DNA Polymerase classique et la Titanium Taq DNA Polymerase (Takara). Ce système s'est notamment révélé particulièrement apte pour l'amplification de l'ADN contenu dans les extractions réalisées à partir des levures. La réaction PCR se compose de 1X Advantage 2 PCR Buffer, 500 μ M de chaque dNTP, 0,4 μ M de chaque amorce, 1X Advantage 2 Polymerase Mix et 1-50 ng de matrice d'ADN, dans un volume final de 25 μ L. Le cycle PCR comporte une étape de dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C, de 35 cycles composés d'une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C, d'une phase d'hybridation de 30 secondes à une température dépendant de la température de fusion des amorces utilisées, et d'une phase d'élongation d'une minute par kilo paires de bases à 68°C, et se termine par une étape d'extension finale de 10 minutes à 68°C.

La polymérase Q5 High-Fidelity (NEB): Cette ADN polymérase génétiquement modifiée présente la particularité d'être extrêmement processive grâce à la fusion à un domaine sso7d, et une activité de correction sur épreuve très élevée. Cette polymérase est un système de choix lorsque les amplicons à générer sont longs (>1 kpb) et doivent être sans erreur. Cette enzyme est notamment utilisée pour linéariser les plasmides. La réaction PCR se compose de 1X Q5 Reaction Buffer, 200 μ M de chaque dNTP, 0,5 μ M de chaque amorce, 0,5 unités de Q5 High-Fidelity DNA Polymerase, et 1-50 ng de matrice d'ADN, dans un volume final de 25 μ L. Le cycle PCR comporte une étape de dénaturation initiale de 30 secondes à 98°C, de 35 cycles composés d'une phase de dénaturation de 10 secondes à 98°C, d'une phase d'hybridation de

30 secondes à une température dépendant de la température de fusion des amorces utilisées (calculée en utilisant l'outil en ligne <https://tcalculator.neb.com>), et d'une phase d'élongation de 20 secondes par kilo-base à 72°C, et se termine par une étape d'extension finale de 2 minutes à 72°C.

La polymérase *Taq* (NEB) : Cette polymérase est la plus simple et la moins performante disponible commercialement. Elle est néanmoins extrêmement abordable et se révèle utile pour des PCR de routine sur des matrices de bonne qualité. La réaction PCR se compose de 1X Standard *Taq* Reaction Buffer, 200 µM de chaque dNTP, 0,2 µM de chaque amorce, 0,625 unités de *Taq* DNA Polymerase et 1-50 ng de matrice d'ADN, dans un volume final de 25 µL. Le cycle PCR comporte une étape de dénaturation initiale de 30 secondes à 95°C, de 30 cycles composés d'une phase de dénaturation de 30 secondes à 95°C, d'une phase d'hybridation de 30 secondes à une température dépendant de la température de fusion des amorces utilisées, et d'une phase d'élongation d'une minute par kilo paires de bases d'amplicon à 68°C, et se termine par une étape d'extension finale de 5 minutes à 68°C.

2. 2. 2 PCR multiplex

Ce type de PCR permet d'amplifier simultanément plusieurs fragments d'ADN. Nous utilisons cette technique principalement pour vérifier l'intégrité d'un génome bactérien ou d'un plasmide, grâce à l'utilisation de plusieurs couples d'amorces distribués de manière homogène tout au long de la molécule d'ADN à analyser. Les PCRs multiplex sont réalisées avec le kit Qiagen Multiplex PCR. La réaction PCR est composée de 1X Qiagen Multiplex PCR Master Mix, 0,025 µM de chaque amorce et 40 ng de matrice d'ADN, dans un volume final de 15 µL. Le cycle PCR comporte une étape de dénaturation initiale de 15 minutes à 95°C, de 35 cycles composés d'une phase de dénaturation d'une minute à 95°C, d'une phase d'hybridation de 2 minutes 30 secondes à 50°C, et d'une phase d'élongation d'une minute 30 secondes à 72°C, et se termine par une étape d'extension finale de 10 minutes à 68°C.

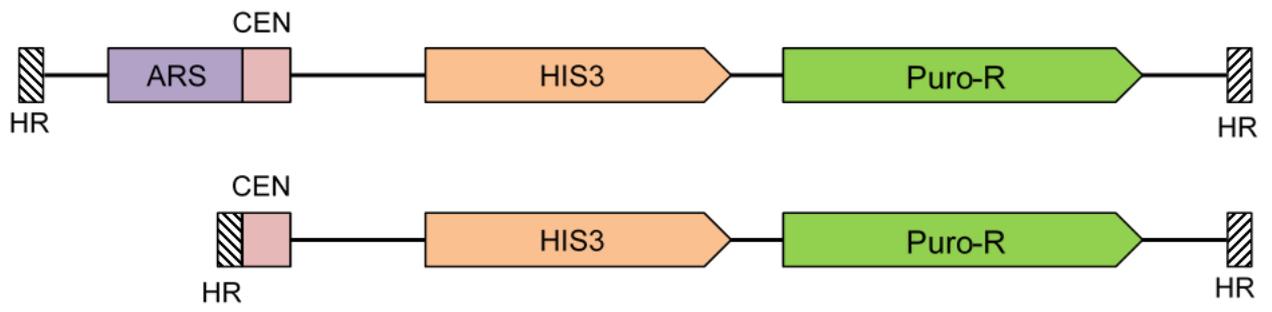


Figure 45 : Pansements de recombinaison ARS-CEN-HIS-PSpuro et CEN-HIS-PSpuro

2. 3. Production des matrices de recombinaison (« pansements »)

Les expériences d'ingénierie des génomes bactériens dans la levure sont basées sur l'utilisation du système de recombinaison homologue de la levure. Afin de favoriser le fonctionnement de ce système, il est important de fournir à la cellule un fragment d'ADN double brin linéaire qui peut être utilisé comme matrice de recombinaison. Cette matrice servant dans notre cas à réparer une cassure double brin que nous avons causée, elle est dénommée « pansement ».

2. 3. 1. Pansements ARS-CEN-HIS-PSpuro et CEN-HIS-PSpuro

Les pansements de recombinaison ARS-CEN-HIS-PSpuro et CEN-HIS-PSpuro (Figure 45) ont été obtenus par PCR à partir du plasmide pMT85puroM-PSlacZ-pRS313. Ces pansements sont composés d'une cassette contenant les éléments levure CEN6 et HIS3. Le pansement ARS-CEN-HIS-PSpuro contient également une origine de répllication levure ARSH4. Chaque cassette est entourée de séquences de 60 pb homologues à la séquence cible sur le génome de *M. pneumoniae*. Ces extrémités sont ajoutées aux cassettes lors de leur production par PCR, en utilisant des amorces ayant une queue flottante en 5'. Ces PCRs sont réalisées avec la polymérase Advantage 2 (Clontech). Les produits PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose. Les produits PCR sont purifiés, quantifiés et conservés à -20°C.

2. 3. 2. Pansements de 90 pb

Il s'agit de pansements de recombinaison composés uniquement de deux régions juxtaposées de 45 pb, encadrant les *loci* à éditer sur le génome de *M. pneumoniae*. Ces pansements ne contiennent donc pas d'élément levure. Ils sont obtenus par hybridation de deux oligonucléotides complémentaires de 90 nucléotides. La réaction est composée de 10 µL de chaque oligonucléotide concentré à 100 µM, et 2,5 µL de 10X Advantage 2 PCR Buffer. Le mélange est incubé pendant 5 minutes à 95°C dans un thermocycleur, puis la température est

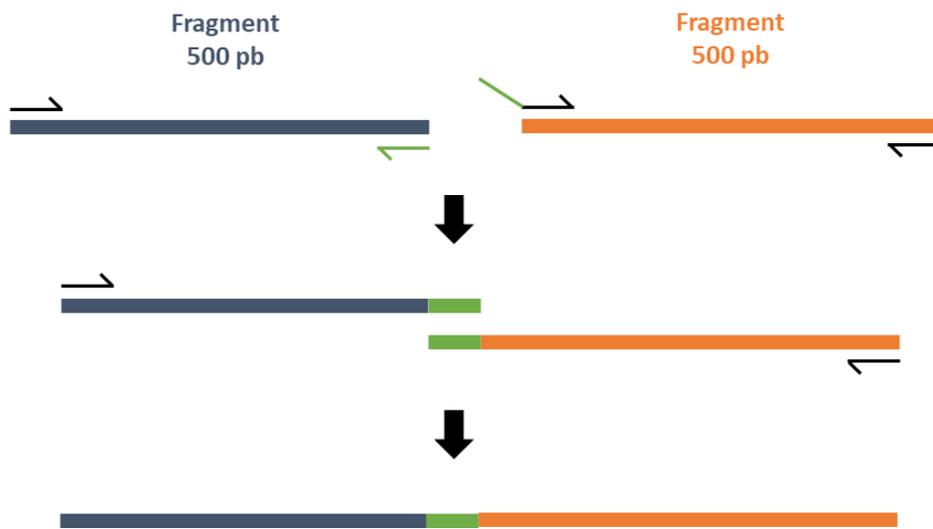


Figure 46 : Construction des pansements de 1 kpb par PCR chevauchante

diminuée jusqu'à 16°C à un rythme de 0,1°C par seconde, afin de permettre l'hybridation des oligonucléotides. Les oligonucléotides hybridés sont conservés à -20°C.

2. 3. 3. Pansements de 1 kb

Il s'agit de pansements de recombinaison composés uniquement de deux régions juxtaposées de 500 pb encadrant les *loci* à éditer sur le génome de *M. pneumoniae*. Ces pansements ne contiennent pas d'élément levure. Ils sont obtenus par PCR chevauchante, réaction qui permet de rabouter deux fragments d'ADN (Figure 46). Pour cela, les deux régions de 500 pb à juxtaposer sont amplifiées séparément. Les deux réactions PCR sont réalisées avec la polymérase Q5 High-Fidelity (NEB). Les produits PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis purifiés et quantifiés.

Ces deux fragments sont raboutés par une réaction de PCR chevauchante réalisées avec la polymérase Q5 High-Fidelity (NEB). La matrice d'ADN est constituée de 10-50 ng de chaque fragment de 500 pb purifié. Après une dénaturation initiale de 30 secondes à 98°C, le cycle PCR overlap débute par 10 premiers cycles qui favorisent l'hybridation des deux fragments de 500 pb. Ces 10 cycles sont composés d'une phase de dénaturation de 10 secondes à 98°C, d'une phase d'hybridation de 30 secondes à la température de fusion de la queue flottante, d'une phase d'élongation de 20 secondes à 72°C. Le programme se poursuit avec 30 cycles qui vont cette fois-ci favoriser l'amplification du pansement complet. Ces 30 cycles sont composés d'une phase de dénaturation de 10 secondes à 98°C, d'une phase d'hybridation de 30 secondes à la température de fusion des amorces utilisées, et d'une phase d'élongation de 40 secondes à 72°C, et se termine par une étape d'extension finale de 7 minutes à 72°C. Les produits de la PCR overlap sont analysés par électrophorèse, purifiés, quantifiés et conservés à -20°C.

2. 4. Purification des ADN à partir des réactions enzymatiques

L'ADN provenant des différentes réactions enzymatiques réalisées (PCR, restriction, phosphorylation, déphosphorylation) est purifié grâce au kit « Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit » (GE Healthcare), en suivant les instructions du kit.

2. 5. Restriction enzymatique des ADN

Les digestions enzymatiques sont systématiquement réalisées en suivant les recommandations des fournisseurs. Les réactions se déroulent dans un volume final de 20 µL, contenant le tampon approprié à 1X, 1-5 unité d'enzyme et 0,3-1 µg d'ADN à cliver. Le mélange est incubé 1h à la température appropriée à l'enzyme de restriction choisie.

2. 6. Quantification de l'ADN

La concentration en ADN des différents échantillons est estimée par spectrophotométrie, en mesurant la densité optique à 260 nm. Un Epoch (Biotek) est utilisé, en combinaison avec une plaque de lecture Take3 (Biotek). Les mesures sont réalisées sur des gouttes de 2 µL prises en sandwich entre 2 lamelles de quartz, correspondant à un trajet optique de 0,05 mm. La concentration en ADN est calculée à partir de la densité optique en utilisant les paramètres par défaut du logiciel Gen5 (Biotek) équipant le spectrophotomètre.

2. 7. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les différents ADN sont analysés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose 0,8-2,5% (m/v) dans du tampon TAE 1X (Tris-Acétate 40 mM ; EDTA 1 mM ; pH 8.0). Cinq volumes de solution d'ADN sont mélangés à un volume de tampon de charge 6X (NEB) et déposé dans chaque puit. Les marqueurs de taille utilisés sont le 1 kpb Plus (Invitrogen) et le 100 pb (Promega et NEB). L'électrophorèse est réalisée à 100 volts. Les acides nucléiques sont colorés par incubation des gels dans un bain de bromure d'éthidium (2 µg/mL). Après coloration, les fragments d'ADN sont visualisés par fluorescence, avec le système d'imagerie Vilbert Lourmat E-BOX VX2.

2. 8. Extraction d'ADN génomique de *Mycoplasma pneumoniae*

En fonction des expériences à réaliser, plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour extraire et purifier l'ADN génomique de *M. pneumoniae*. Le choix de la méthode employée dépend de divers paramètres, notamment la rapidité du protocole et la qualité et la pureté de l'ADN obtenu.

2. 8 .1. Extraction au phénol-chloroforme

Ce protocole est utilisé lorsque qu'une très bonne qualité d'ADN est nécessaire, comme par exemple pour réaliser le séquençage du génome ou pour capturer une région du génome bactérien pour des expériences de clonage par GT-RMCE. Une culture de *M. pneumoniae* est réalisée en milieu SP4, en flacon de culture cellulaire T-75. Le milieu de culture est éliminé et les cellules sont lavées 2 fois avec 20 mL de HBSS (Sigma, HBSS Modifié avec calcium, avec magnésium et sans rouge de phénol). Les cellules sont grattées mécaniquement dans 0,5 ml de Solution I (Tris-HCl 0,1 M, pH 8 ; NaCl 0,5 M ; EDTA 10 mM ; solution conservée à 4°C) et transférées dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. Un volume de 20 µL de SDS 20% (v/v) est ajoutée, le mélange est agité doucement par inversion. Un volume de 0,5 mL de « phenol-chloroform-isoamyl alcohol mix 25:24:1 » (Sigma) est ajouté, et le mélange est fortement agité. La solution est centrifugée (16000 g, 5 minutes) et la phase aqueuse supérieure est récupérée dans un nouveau tube. Un volume de 0,5 mL de « phenol-chloroform-isoamyl alcohol mix 25:24:1 » (Sigma) est de nouveau ajouté, le mélange est fortement agité puis centrifugé (16000 g, 5 minutes), et la phase aqueuse supérieure est récupérée. Un volume final de 500 µL de phase aqueuse est récupéré. 1 mL d'éthanol absolu est ajouté à la phase aqueuse, le mélange est agité doucement par inversion. L'ADN précipité est collecté par centrifugation (16000 g, 5 minutes), et lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol 70% (v/v) puis incubé 30 minutes à température ambiante afin de favoriser l'évaporation de l'éthanol restant. Le culot est réhydraté dans 100 µL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 ; EDTA 1 mM, pH 7.5) supplémenté avec 15 µg/mL de RNase A, et conservé à 4°C.

2. 8. 2. Extraction avec le kit « MagAttract HMW DNA » (Qiagen)

Ce kit permet la purification d'ADN de haut poids moléculaire (100-200 kb) d'une grande pureté, basé sur l'utilisation de billes de silices magnétiques pour la capture de l'ADN. Cette extraction est réalisée avec le portoir « MagAttract Magnetic Rack » (Qiagen), en suivant les instructions du fabricant. Cette extraction est réalisée à partir de deux flacons de culture de *M. pneumoniae*, et les volumes de réactifs préconisés par le kit sont tous doublés. L'ADN génomique purifié est élué dans de l'eau ultra-pure et conservé à 4°C.

2.8. 3. Extraction avec le kit « NucleoBond® AXG Columns – Buffer Set III » (Macherey -Nagel)

Ce kit permet la purification d'ADN de haut poids moléculaire, en utilisant résine échangeuse d'anions à base de silice. Cette extraction est réalisée avec les colonnes AXG 20, en suivant les instructions du fabricant. Cette extraction est réalisée à partir d'un demi-flacon de culture de *M. pneumoniae*, et les volumes de réactifs préconisés par le kit sont tous divisés par deux. L'ADN génomique purifié est élué dans de l'eau ultra-pure et conservé à 4°C.

2. 8. 4. Extraction rapide

L'extraction rapide est réalisée en vue d'analyser l'ADN par PCR ou PCR multiplex. Pour chaque clone à analyser, une culture de 4 mL en milieu SP4 en plaque 6 puits est réalisée. Le milieu de culture est éliminé et les cellules sont grattées dans 1 mL de sérum de veau fœtal. Un volume de 500 µL est prélevé et centrifugé (12000 g, 10 minutes, 4°C). Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension dans 100 µL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 ; EDTA 1 mM, pH 7.5). Les cellules sont lysées par incubation de la suspension à 95°C pendant 10 minutes. Les échantillons sont conservés à -20°C. Une dilution au 1/10ème de l'ADN issu de l'extraction rapide d'ADN de *M. pneumoniae* sert de matrice d'ADN pour l'analyse PCR. Les 500 µL de cellules restants sont conservés à -80°C pour des analyses ultérieures.

2. 9. Extraction d'ADN génomique de *Saccharomyces cerevisiae*

Ce protocole est dérivé de celui développé par Kouprina & Larionov, 2008. Il permet d'extraire l'ADN total contenu dans la levure, c'est-à-dire l'ADN de la levure elle-même ainsi que l'ADN extra-chromosomique qu'elle contient (plasmide ou génome bactérien). L'extraction d'ADN est réalisée à partir des repiquages effectués sur milieu sélectif, à l'issue du protocole de transformation de la levure. Après 2 jours d'incubation à 30°C, une petite quantité de cellules (environ 1 mm³) est prélevée et remise en suspension dans 90 µL de tampon Zymolyase (mélange de 100 µL d'eau, de 10 µL de solution de Zymolyase (Zymolyase 100-T, 10 mg/mL ; Glycérol 50% (v/v)) et de 1 µL de β-mercaptoéthanol). Ce traitement à la Zymolyase a pour but de dégrader la paroi cellulaire des levures afin de faciliter leur lyse. Les suspensions cellulaires sont incubées 1 heure à 37°C, puis mélangées avec 10 µL de SDS 2% (v/v), incubées 15 minutes à 70°C afin de solubiliser les membranes plasmiques et nucléaires. 11 µL de solution d'acétate de potassium 5M sont rajoutés et l'échantillon est incubé 15 minutes dans la glace afin de favoriser la précipitation des protéines. Les débris cellulaires sont collectés par centrifugation (14000 g, 10 minutes, 4°C), et 90 µL de surnageant contenant l'ADN sont prélevés et mélangés avec 90 µL d'isopropanol. L'ADN précipité est collecté par centrifugation (14000 g, 10 minutes, 4°C). Le surnageant est éliminé et les tubes sont incubés quelques minutes à 37°C afin de permettre l'évaporation de l'isopropanol restant et de sécher les culots. L'ADN est ensuite réhydraté dans 50 µL de tampon TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 ; EDTA 1 mM, pH 7.5), et conservé à -20°C.

2. 10. Préparation d'ADN génomique en blocs d'agarose

La manipulation de grands fragments d'ADN est rendue complexe par la relative fragilité de ces molécules. En effet, les étapes de pipetage et de mélange inhérentes aux protocoles de biologie moléculaire ont tendance à fragmenter l'ADN par action mécanique des fluides (« shearing forces »). De ce fait, il est nécessaire d'utiliser des techniques spécifiques pour garder intacts des chromosomes bactériens lors de leur manipulation.

Une de ces techniques repose sur l'encapsulation de l'ADN dans une matrice d'agarose. Cette matrice est appelée « bloc » du fait de la forme rectangulaire donnée au gel

d'agarose lors de l'étape de coulage. Cette matrice d'agarose étant poreuse, de nombreuses réactions enzymatiques et lavages peuvent être réalisés, tout en protégeant mécaniquement la molécule d'ADN. Afin d'encapsuler l'ADN dans l'agarose sans avoir à le manipuler, on encapsule d'abord les cellules dans la matrice, avant de réaliser une lyse cellulaire directement dans la matrice. Après lavage, seules les longues molécules d'ADN restent dans l'agarose, produisant ainsi des chromosomes nus et intacts. Ce processus est réalisé aussi bien sur les levures que les mycoplasmes, grâce au kit CHEF Mammalian Genomic DNA Plug (Bio-Rad) et en utilisant un protocole spécifique.

2. 10. 1. Blocs d'agarose contenant l'ADN de *Saccharomyces cerevisiae*

A partir d'une pré-culture de 5 mL de *S. cerevisiae*, 100 mL de milieu riche YPDA (Clontech) sontensemencés et cultivés sur la nuit à 30°C sous agitation (190 rpm). Lorsque l'absorbance à 600 nm est égale à 2, les cellules sont collectées par centrifugation (6000 g, 10 minutes, 4°C), puis remises en suspension dans 10 mL de tampon EDTA 50 mM (pH 8, 4°C). La concentration cellulaire est évaluée en utilisant une cellule de Malassez. Les blocs d'agarose réalisés doivent avoir une concentration finale de 6×10^9 cellules par mL de bloc. Un volume correspondant à 6×10^9 cellules est centrifugé (6000 g, 10 minutes, 4°C) afin de collecter les cellules, qui sont ensuite remises en suspension dans 500 µL de tampon de suspension cellulaire (Tris 10 mM, pH 7,2 ; EDTA 50 mM ; NaCl 2 mM). La suspension cellulaire est équilibrée à la température de 50°C pendant 10 minutes, puis mélangée rapidement à 5 mg de Zymolyase- 100T et 500 µL de Low Melt Agarose 2% chauffé à 50°C. Dix blocs de 100 µL chacun sont coulés en utilisant les moules fournis dans le kit, et incubés 30 minutes à 4°C afin qu'ils puissent solidifier correctement. Les blocs sont ensuite démoulés et incubés 2 heures à 37°C dans 2,5 mL d'un tampon Zymolyase (Tris-HCl 10 mM ; EDTA 50 mM ; pH 7,5 ; Zymolyase-100T, 5 mg/mL). Ce traitement Zymolyase a pour but de fragiliser la paroi cellulaire des levures, afin de faciliter la lyse cellulaire par la suite. Les blocs sont lavés deux fois dans 25 mL d'eau pendant 5 minutes, puis incubés 24 heures à 50°C sans agitation dans 2,5 mL de tampon Protéinase K (EDTA 100 mM ; Sodium déoxycholate 0,2% ; Lauryl sarcosinate de sodium 1%, pH 8 ; Protéinase K, 0,8 mg/mL). Cette incubation permet de solubiliser les membranes cellulaires et de dégrader les protéines. Au bout de 24 heures, le tampon est retiré et les blocs

sont de nouveau incubés à 50°C dans 2,5 mL de tampon Protéinase K, cette fois-ci pendant 2 à 3 jours. Les blocs sont finalement lavés six fois dans 25 mL de tampon de lavage (Tris-HCl 20 mM, EDTA 50 mM, pH 7,5) et conservés à 4°C dans 10 mL de tampon de lavage.

2. 10. 2. Blocs d'agarose contenant l'ADN de *Mycoplasma pneumoniae*

Pour chaque série de blocs, quatre flacons de culture cellulaire T-75 sont préparées. La veille de la préparation des blocs, du chloramphénicol est ajouté aux cultures à une concentration finale de 100 µg/mL. Les cultures sont incubées à 37°C toute la nuit. Le lendemain, le milieu de culture est éliminé, puis les cellules sont lavées deux fois avec 12 mL de tampon HEPES-Sucrose (HEPES 8 mM, Sucrose 272 mM, pH 7,4), et grattées mécaniquement dans 5 mL de tampon HEPES-Sucrose. Les cellules sont ensuite collectées par centrifugation (8000 g, 10 minutes, 10°C) et remises en suspension dans 1 mL de tampon HEPES-Sucrose. La suspension cellulaire est passée 20 fois à travers une aiguille de 26 Gauge à l'aide d'une seringue. Différentes dilutions sont réalisées (non dilué, 1/2, 1/4, 1/8 et 1/16) dans du tampon HEPES-Sucrose. Chaque dilution est équilibrée à 50°C pendant 15 minutes. Un volume de 500 µL de chaque dilution est rapidement mélangé à 500 µL de Low Melt Agarose 2%. Dix blocs de 100 µL chacun sont réalisés en utilisant les moules fournis dans le kit, et incubés 30 minutes à 4°C afin qu'ils puissent solidifier correctement. Les blocs sont ensuite démoulés et incubés 2 à 3 jours à 50°C sans agitation dans 2.5 mL de tampon Protéinase K (EDTA 100 mM ; Sodium déoxycholate 0,2% ; Lauryl sarcosinate de sodium 1%, pH 8 ; Protéinase K, 0,8 mg/mL). Cette incubation permet de solubiliser les membranes cellulaires et de dégrader les protéines. Les blocs sont ensuite lavés quatre fois dans 10 mL de tampon de lavage (Tris-HCl 20 mM, EDTA 50 mM, pH 7,5) et conservés à 4°C dans 10 mL de tampon de lavage. La qualité des blocs réalisés peut être vérifiée en soumettant ceux-ci à une électrophorèse en champ-pulsé.

Les blocs peuvent être soumis à un traitement avec l'enzyme β -Agarase I (NEB), qui va digérer l'agarose des blocs et ainsi permettre la remise en solution de l'ADN qu'ils contiennent. Pour cela, les blocs sont lavés deux fois 30 minutes dans 1 mL de tampon de lavage 0,1X (Tris-HCl 2 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5). Un volume de 10 µL de tampon de réaction (Tris-HCl 10 mM, pH 6,5 ; EDTA 1 mM) est ajouté sur chaque bloc. Les blocs sont ensuite incu-

-bés 5 minutes à 42°C, 8 minutes à 65°C, puis 10 minutes à 42°C afin de faire fondre l'agarose. Chaque bloc est digéré avec 3 unités de β -Agarase I sur la nuit à 42°C. La concentration en ADN des blocs peut maintenant être déterminée par spectrophotométrie. Les blocs digérés peuvent également être utilisés pour transformer la levure.

2. 11. Electrophorèse en champ pulsé (PFGE)

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) est une méthode qui permet la séparation de grands fragments d'ADN, de taille allant de l'ordre de la dizaine de kilos paires de bases à quelques mégas paires de bases. Son principe consiste à modifier régulièrement la polarité du champ électrique au cours du temps, ce qui a pour conséquence de réorienter à chaque fois la molécule d'ADN, et ainsi de permettre son passage au travers des mailles d'un gel d'agarose. Elle est réalisée sur des ADN contenus dans des blocs d'agarose contenant les fragments d'ADN à analyser. Le système d'électrophorèse en champ pulsé que nous utilisons est le CHEF-DR III (Bio-Rad).

2. 11. 1. PFGE des chromosomes de *S. cerevisiae* contenant un génome cloné de *M. pneumoniae*

Cette électrophorèse en champ pulsé est réalisée sur des demi-blocs d'agarose contenant l'ADN de levures transformées avec le génome de *M. pneumoniae*. La première étape consiste à éliminer l'ADN de la levure contenu dans les blocs, afin que celui-ci ne vienne pas masquer le profil de migration du génome bactérien. Les blocs d'agarose sont ensuite traités afin de fragmenter l'ADN de *M. pneumoniae* pour en analyser la taille.

Chaque demi-bloc est lavé une heure dans 1 mL de tampon de lavage 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 7.5 ; EDTA 50 mM, pH 7.5) contenant 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF). Les demi-blocs sont ensuite lavés une heure dans 1 mL de tampon de lavage 1X, puis deux fois une heure dans 1 mL de tampon de lavage 0,1X, et enfin une heure dans 0,5 mL de tampon R (Tris-HCl 10 mM, pH 8.5 ; MgCl₂ 10 mM ; KCl 100 mM ; Albumine de sérum bovin 0.1 mg/mL). Les demi-blocs sont digérés avec 50 unités de l'enzyme SgrDI (Thermo Scientific)

sur la nuit à 37°C. SgrDI est la seule enzyme de restriction commerciale qui permette de dégrader l'ADN levure sans digérer le génome de *M. pneumoniae*. Le lendemain, les demi-blocs sont lavés 30 minutes dans 1 mL de tampon de lavage 1X et soumis à un premier PFGE. Ils sont chargés sur un gel d'agarose 1% Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) réalisé avec du tampon TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, Acide borique 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3, Bio-Rad). Le PFGE est mené pendant 24 heures dans 2 litres de tampon TBE 0,5X à 14°C, avec les paramètres suivants : temps de pulsation de 50-90 secondes, voltage de 6 volts/cm, angle de 120°. Les standards de taille utilisés sont le Yeast Chromosome PFGE Marker (NEB) ou CHEF DNA Size Marker (Bio-Rad). Le gel est ensuite coloré au SYBR™ Gold (Invitrogen) et visualisé avec le système d'imagerie. Au cours de cette première électrophorèse, l'ADN levure est éliminé des blocs, car seul l'ADN linéaire peut migrer hors des blocs d'agarose et se propager dans le gel. Afin d'optimiser cette élimination de l'ADN levure, les blocs sont de nouveau lavés deux fois une heure dans 1 mL de tampon de lavage 0,1X, une fois une heure dans 0,5 mL de tampon de réaction (Tris-Acétate 33 mM, pH 7,5 ; Acétate de potassium 66 mM ; Acétate de magnésium 10 mM ; Dithiothréitol 0,6 mM ; Adénosine-Triphosphate 1 mM), et digérés avec 50 unités de l'enzyme Plasmid-Safe (Epicentre) sur la nuit à 37°C. Plasmid-Safe est une désoxyribonucléase qui digère exclusivement l'ADN double brin linéaire, ce qui permet d'éliminer l'ADN levure restant dans les blocs. Le lendemain, les demi-blocs sont lavés 30 minutes dans 1 mL de tampon de lavage 1X et soumis à une électrophorèse classique. Ils sont chargés sur un gel d'agarose 1% réalisé avec du tampon TAE 1X (Tris-Acétate 0,04 M ; EDTA 0,001 M ; pH 8.0). L'électrophorèse est menée à 120 volts pendant 2 heures. Le marqueur de taille utilisé est le 1 kpb Plus (Invitrogen). Les demi-blocs sont récupérés, et le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium et imagé afin de confirmer la sortie des fragments d'ADN de levure.

Les demi-blocs sont finalement traités afin de pouvoir analyser la taille du génome de *M. pneumoniae*. Ils sont lavés deux fois une heure dans 1 mL de tampon de lavage 0,1X, une fois une heure dans 0,5 mL de tampon CutSmart (Acétate de potassium 50 mM, Tris-Acétate 20 mM, Acétate de magnésium 10 mM, Albumine de sérum bovin 100 µg/mL, pH 7,9), et digérés avec 50 unités de l'enzyme NotI-HF (NEB) sur la nuit à 37°C. NotI-HF est une enzyme de restriction qui coupe deux fois le génome de *M. pneumoniae*. Le lendemain, les demi-blocs sont lavés 30 minutes dans 1 mL de lavage 1X et soumis à un second PFGE. Le PFGE est mené pendant 22 heures, avec les mêmes paramètres que précédemment. Le gel est ensuite coloré

au SYBR Gold, et imagé afin d'observer les 2 fragments générés par restriction du génome de *M. pneumoniae*.

2. 11. 2. PFGE des chromosomes de *Mycoplasma pneumoniae*

Cette électrophorèse en champ pulsé est réalisée sur des demi-blocs d'agarose contenant l'ADN de *M. pneumoniae*. Chaque demi-bloc est lavé une heure dans 1 mL de tampon de lavage 1X (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5 ; EDTA 50 mM, pH 7,5) contenant 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF). Les demi-blocs sont ensuite lavés une heure dans 1 mL de tampon de lavage 1X, puis deux fois une heure dans 1 mL de tampon de lavage 0,1X, et enfin une heure dans 0,5 mL de tampon CutSmart (Acétate de potassium 50 mM, Tris-Acétate 20 mM, Acétate de magnésium 10 mM, Albumine de sérum bovin 100 µg/mL, pH 7,9), et digérés avec 40 unités de l'enzyme NotI-HF (NEB) sur la nuit à 37°C. NotI-HF est une enzyme de restriction qui clive deux fois le génome de *M. pneumoniae*. Le lendemain, les demi-blocs sont lavés 30 minutes dans 1 mL de lavage 1X et soumis à un PFGE. Ils sont chargés sur un gel d'agarose 1% Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad) réalisé avec du tampon TBE 0,5X (Tris 44,5 mM, Acide borique 44,5 mM, EDTA 1 mM, pH 8,3, Bio-Rad). Le PFGE est mené pendant 22 heures dans 2 litres de tampon TBE 0,5X à 14°C, avec les paramètres suivants : temps de pulsation de 50-90 secondes, voltage de 6 volts/cm, angle de 120°. Les standards de taille utilisés sont le Yeast Chromosome PFGE Marker (NEB) ou CHEF DNA Size Marker (Bio-Rad). Le gel est ensuite coloré au SYBR™ Gold (Invitrogen) et visualisé avec le système d'imagerie.

2.12 Digestion *in vitro* par la nucléase Cas9 de génomes bactériens inclus dans des blocs d'agarose.

Les blocs d'agarose contenant le génome de *M. pneumoniae* sont traités avec 1µL de Cas9 Nucléase de *Streptococcus pyogenes* (M0386T, NEB®) et 21 µg d'ARNg transcrits (produits par transcription *in vitro* à partir d'oligonucléotides d'environ 75 bases incluant le promoteur T7 avec le kit HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis kit de chez NEB®), sur la nuit à 37°C. Les blocs sont ensuite incubés sur la nuit à 50°C, en présence de protéinase K, puis ils

sont lavés plusieurs fois dans de tampon Tris 20mM pH8, EDTA 50mM. Les blocs d'agarose sont finalement digérés par un traitement avec 3 unités/bloc de β -Agarase I (NEB).

3. TRANSFORMATIONS MICROBIENNES

3. 1. Transformation de *Escherichia coli*

3. 1. 1. Transformation par électroporation

Un volume de 40 μ L de bactéries électro-compétentes, maintenues sur glace, est mélangé avec 1 ng d'ADN contenu dans un volume inférieur à 4 μ L. Les paramètres utilisés pour l'électroporateur Gene Pulser Xcell (Bio-Rad) sont les suivants : cuvettes 2 mm, voltage de 2,5 kV, résistance de 200 Ω et capacitance de 25 μ F. Après transformation, les bactéries sont incubées une heure à 37°C dans 500 μ L de milieu SOC (NEB). 250 μ L de cette culture sont étalés sur boîtes LB agar contenant l'antibiotique approprié. Les boîtes sont incubées au moins une nuit à 37°C, jusqu'à apparition des colonies.

3. 1. 2. Transformation par choc thermique

Un volume de 50 μ L de bactéries chimio-compétentes commerciales, maintenues sur glace, est mélangé avec 100 ng d'ADN contenu dans un volume inférieur à 5 μ L. Le tube contenant le mélange est incubé pendant 30 minutes dans la glace, puis rapidement transféré 30 secondes dans un bain marie à 42°C, puis de nouveau dans la glace pour 5 minutes. Les bactéries transformées sont incubées une heure à 37°C dans 950 μ L de milieu SOC (NEB), puis 100 μ L de cette culture sont étalés sur boîtes LB contenant l'antibiotique approprié. Les boîtes sont incubées au moins une nuit à 37°C, jusqu'à apparition des colonies.

3. 2. Transformation de *Mycoplasma pneumoniae*

3. 2. 1. Transformation par électroporation

Ce protocole est dérivé de celui développé par Reddy *et al.*, 1995 (Reddy, Rasmussen and Baseman, 1995). Une culture de *M. pneumoniae* est réalisée dans 20 mL de milieu SP4, pendant plusieurs jours à 37°C. Au bout de quelques jours (généralement 3 jours), lorsque la culture apparaît confluyente et que le tapis cellulaire est bien visible à l'œil nu, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont collectées par grattage mécanique dans 1 mL de milieu SP4. Les cellules sont passées 10 fois à travers une aiguille de 26 Gauge à l'aide d'une seringue. Les cellules sont ensuite diluées dans 9 mL de milieu SP4, filtrées à l'aide d'un filtre Low Protein Binding 0,45 µm (Millipore), et sont utilisées pour ensemercer 10 mL de milieu SP4 frais dans un flacon de culture T-75. Les cultures sont incubées pendant une nuit à 37°C. Le lendemain, les cellules doivent de nouveau former un tapis visible à l'œil nu.

Le milieu de culture est alors éliminé, les cellules sont lavées 3 fois avec 10 mL de tampon d'électroporation (HEPES 8 mM, Sucrose 272 mM, pH 7,4), et grattées dans 1 mL de tampon d'électroporation. Les cellules sont ensuite passées 10 fois à travers une aiguille de 26 Gauge à l'aide d'une seringue, puis conservées dans la glace. Un volume de cellules (0,1 mL par transformation) de *M. pneumoniae* est mélangé avec 10 à 30 µg d'ADN (le volume d'ADN ne devant pas dépasser 20% du volume de cellule), et transféré dans une cuvette d'électroporation (largeur 2 mm). Les cuvettes sont incubées pendant 15 minutes dans la glace, puis soumises à un choc électrique de 2,5 kV, avec une résistance de 250 Ω et une capacitance de 25 µF. Après électroporation, les cuvettes sont de nouveau incubées 15 minutes dans la glace. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans 0,9 mL de milieu SP4 et incubées pendant 2 heures à 37°C. Les cellules sont étalées sur des boîtes SP4-Agar contenant l'antibiotique approprié (tétracycline 5 µg/mL, puromycine 3 µg/mL, gentamycine 100 µg/mL, ou chloramphénicol 50 µg/mL). Les transformants sont visibles et peuvent être dénombrés après 2 à 3 semaines d'incubation à 37°C.

3. 2. 2. Transformation au PEG

Une culture de *M. pneumoniae* est préparée comme indiqué dans la section précédente. Le milieu de culture est éliminé, puis les cellules sont lavées 2 fois avec 25 mL de

Hank's Balanced Salt Solution (Sigma, HBSS Modifié avec calcium, avec magnésium et sans rouge de phénol), et grattées mécaniquement dans 1 mL de tampon HBSS. Les cellules sont mélangées avec 1 mL de Trypsine 0,5% (m/v) préparée dans du tampon HBSS et incubées pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite collectées par centrifugation (8000 g, 15 minutes, 10°C) et remises en suspension dans 2 mL de tampon HBSS. Un volume de cellules (1 mL par transformation) est de nouveau centrifugé (8000 g, 15 minutes, 10°C), remis en suspension dans 250 µL de CaCl₂ 0,1 M et incubé pendant 45 minutes dans la glace. Les cellules sont ensuite passées 10 fois à travers une aiguille de 26 Gauge à l'aide d'une seringue. Les cellules de *M. pneumoniae* sont mélangées avec 5 µg d'ADN, 10 µg d'ARNt de levure, et 2 mL de solution de PEG (PEG 6000, 40% (m/v) dans du tampon HBSS), puis incubées 30 minutes à 37°C. Le contact avec le PEG est ensuite stoppé en ajoutant 20 mL de tampon HBSS, puis en les centrifugeant (12000 g, 15 minutes, 10°C). Les cellules sont remises en suspension dans 1 mL de milieu SP4 et incubées pendant 2 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite étalées sur des boîtes SP4-Agar contenant l'antibiotique approprié (tétracycline 5 µg/mL, puromycine 3 µg/mL, gentamycine 100 µg/mL, ou chloramphénicol 50 µg/mL). Les transformants sont visibles et peuvent être dénombrés après 2 à 3 semaines d'incubation à 37°C.

3. 2. 3. Analyse des transformants de *M. pneumoniae*

Les colonies issues de la transformation de *M. pneumoniae* sont repiquées à l'aide de pointes à bout large et déposées dans du milieu SP4 contenant l'antibiotique approprié. La quantité de milieu SP4 inoculé dépend du nombre d'échantillons traités. Pour un grand nombre de colonies piquées, les colonies sont déposées dans 200 µL de milieu SP4, dans une plaque de 96 puits. Une fois que le milieu change de couleur (passage du rouge à l'orange, indicatif de la croissance des cellules), chaque puit est gratté et les 200 µL récupérés sont utilisés pour ensemercer 4 mL de milieu SP4 frais, cette fois-ci dans des plaques 6 puits. Lorsque le nombre de colonies piquées est faible, les colonies sont déposées directement dans 4 mL de milieu SP4, en plaque 6 puits. Ces cultures en plaque 6 puits sont analysées par la suite afin d'identifier les transformants positifs.

3. 3. Transformation de *Saccharomyces cerevisiae*

3. 3. 1. Transformation par le Lithium Acétate/ADN simple brin/PEG

Ce protocole est dérivé de celui développé par Gietz *et al.*, 1995 (Gietz *et al.*, 1995). Il permet de transformer la levure *S. cerevisiae* avec de l'ADN plasmidique et de l'ADN double brin linéaire. Il s'agit d'une méthode de transformation au polyéthylène glycol (PEG) au cours de laquelle les levures sont traitées avec de l'acétate de lithium (AcLi) afin de fragiliser leurs parois, puis subissent un choc thermique en présence de PEG et d'ADN simple brin (appelé ADN « carrier », issu de sperme de saumon) favorisant l'entrée de l'ADN dans la levure.

A partir d'une pré-culture de 5 mL de *S. cerevisiae*, 20 mL de milieu riche YPDA (Clontech) sontensemencés et cultivés sur la nuit à 30°C sous agitation (190 rpm). Lorsque l'absorbance à 600 nm est égale à 1, la culture est diluée au ¼ dans un volume final de 20 mL de milieu YPDA, puis incubée pendant 4 heures à 30°C et 190 rpm. Lorsque l'absorbance à 600 nm est de nouveau égale à 1, les cellules (2,5 mL par réaction de transformation) sont collectées par centrifugation (6 000 g, 2 minutes). Le culot cellulaire est lavé avec 1 mL de solution AcLi/TE (AcLi 100 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5), en veillant à remettre les cellules en suspension à l'aide d'un vortex 3 secondes. Les cellules sont de nouveau collectées par centrifugation (6000 g, 2 minutes), dispersées dans 1 mL de solution AcLi/TE, puis incubées 1 heure à 30°C sans agitation.

En parallèle, l'ADNsb « carrier » (ADN de sperme de saumon, 10 mg/mL) est dénaturé à 100°C pendant 10 minutes, refroidi brusquement dans un bain de glace, puis conservé à 4°C jusqu'à utilisation. Après incubation, les cellules sont collectées par centrifugation (6000 g, 2 minutes) et remises en suspension dans 50 µL de solution AcLi/TE. Les cellules sont mélangées avec 5 µL, 1 µg d'ADN (plasmidique ou linéaire), 0,5 mL de solution PEG/AcLi/TE (PEG 3 350, 40% (m/v) ; AcLi 100 mM ; Tris-HCl 10 mM ; EDTA 1 mM ; pH 7,5) et 10% (v/v) de DMSO. Les tubes sont incubés 30 minutes à 30°C sans agitation, puis pendant 25 minutes à 42°C sans agitation. Les cellules sont finalement collectées par centrifugation (6000 g, 2 minutes), et le culot cellulaire, remis en suspension dans 200 µL d'eau stérile, est étalé sur milieu sélectif. Les transformants sont visibles et peuvent être dénombrés après 2 jours d'incubation à 30°C. Des colonies individuelles sont piquées puis striées sur milieu sélectif, et sont incubées 2 jours à 30°C. Une colonie isolée par strie est ensuite repiquée sur le même milieu sélectif et incubée 2 jours de plus à 30°C.

3. 3. 2. Transformation de sphéroplastes par le PEG

Ce protocole est dérivé de celui développé par Kouprina & Larionov, 2008 (Kouprina and Larionov, 2008). Cette méthode permet de transformer la levure *S. cerevisiae* avec des molécules d'ADN de grande taille (de l'ordre du méga paires de bases), telles que de grands plasmides et même des génomes entiers de mycoplasmes. Il s'agit d'une méthode de transformation au polyéthylène glycol (PEG) de sphéroplastes de levure, obtenus par un traitement à la zymolyase des cellules.

A partir d'une pré-culture de 5 mL de *S. cerevisiae*, 100 mL de milieu riche YPDA (Clontech) sontensemencés et cultivés sur la nuit à 30°C sous agitation (190 rpm). Lorsque l'absorbance à 600 nm est comprise entre 1,5 et 2, les cellules sont collectées par centrifugation (3000 g, 3 minutes). Le culot cellulaire est remis en suspension dans 20 mL de solution de sorbitol 1M, et conservé sur la nuit à 4°C. Le lendemain, les cellules sont de nouveau collectées par centrifugation (3000 g, 3 minutes) et remises en suspension dans 10 mL de solution SPE (sorbitol 1M ; sodium phosphate 10 mM ; Na₂EDTA 10 mM, pH 7,5). Les cellules sont mélangées avec 20 µL de solution de Zymolyase (Zymolyase 100-T, 10 mg/mL ; Glycérol 50% (v/v)) et 20 µL de β-mercaptoéthanol, et incubées 10 minutes à 30°C sous agitation douce. La génération des sphéroplastes est suivie dans le temps en comparant l'absorbance à 600 nm de la suspension cellulaire dans une solution de sorbitol 1M (sphéroplastes intacts) à celle de la même suspension cellulaire dans une solution de SDS 2% (sphéroplastes lysés). Les sphéroplastes sont prêts lorsque le rapport A_{600nm}sorbitol/ A_{600nm}SDS est compris entre 3 et 4. La réaction est alors stoppée en ajoutant 40 mL de solution de sorbitol 1M. Les cellules sont centrifugées (2500 g, 5 minutes, 4°C), lavées une nouvelle fois dans 50 mL de solution de sorbitol 1 M, centrifugées (2500 g, 5 minutes, 4°C), dispersées dans 1 mL de solution STC (sorbitol 1 M ; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 ; CaCl₂ 10 mM) et incubées 10 minutes à température ambiante. Les sphéroplastes (100 µL par réaction de transformation) sont mélangés avec 20 µL d'ADN génomique (bloc d'agarose contenant le génome entier de *M. pneumoniae*, préalablement digéré par l'enzyme β-Agarase) et incubés 10 minutes à température ambiante, sans agitation. Ils sont ensuite mélangés avec 0,5 mL de solution de PEG (PEG 8000, 20% (m/v) ; Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 ; CaCl₂ 10 mM) et incubés 20 minutes à température ambiante, sans agitation. Les sphéroplastes sont collectés par centrifugation (5000 g, 5 minutes), remis en suspension dans 0,7 mL de solution SOS (sorbitol

1 M, CaCl₂ 6,5 mM, extrait de levure 0,25 % (m/v), peptone 0,5% (m/v)) et incubés 2 heures à 30°C, sans agitation. Les cellules sont ensuite mélangées à 12 mL de Top-Agar (milieu sélectif contenant 1 M de sorbitol et 3% (m/v) d'agar, conservé à 55°C jusqu'à utilisation) et immédiatement étalées sur milieu sélectif contenant 1M de sorbitol. Les transformants sont visibles et peuvent être dénombrés après 5 jours d'incubations à 30°C.

Des colonies individuelles sont piquées puis striées sur milieu sélectif, et sont incubées 2 jours à 30°C. Une colonie isolée par strie est ensuite repiquée sur le même milieu sélectif et incubée 2 jours de plus à 30°C. Ces repiquages sont analysés par la suite afin d'identifier les transformants positifs.

RESULTATS

CHAPITRE 1

Clonage et ingénierie du génome de
M. pneumoniae dans la levure

RESULTATS - CHAPITRE 1 : CLONAGE ET INGENIERIE DU GENOME DE *M. PNEUMONIAE* DANS LA LEVURE

L'objectif principal des projets MiniCell et MycoSynVac est d'obtenir un châssis cellulaire viable, minimal et non pathogène à partir de la bactérie *M. pneumoniae*. La construction de ce châssis implique la délétion de certains gènes non essentiels, en particulier ceux codant pour des facteurs de virulence ou des antigènes de surface afin de rendre cet organisme avirulent, et également réduire la taille de son génome. L'intérêt d'obtenir un génome minimal réside dans notre volonté à (i) maîtriser l'information génétique qu'il contient et à (ii) le moduler, notamment en fonction du type d'application envisagée (vaccin, système de délivrance, thérapies...).

Pour obtenir ce châssis minimal et non pathogénique, nous devons être capables de modifier le génome de *M. pneumoniae* de façon précise, efficace et à grande échelle. Or, au début de cette thèse, le palette d'outils disponibles pour manipuler génétiquement cette espèce était assez réduite. Des travaux de mutagenèse aléatoire, réalisée à l'aide de transposons (Tn4001) s'insérant au hasard dans le génome et pouvant conduire à l'inactivation d'un gène, avaient été décrits pour cette espèce. L'utilisation de ces outils a permis d'inactiver les premiers gènes impliqués dans les mécanismes de pathogénie chez *M. pneumoniae* et également de connaître le jeu de gènes minimal nécessaire au maintien de la vie de la cellule *in vitro*. Cette approche est donc efficace pour *M. pneumoniae* qui peut être transformé avec des fréquences satisfaisantes avec ce type de transposons. Cependant, elle semblait peu adaptée à nos besoins pour plusieurs raisons : (i) sa mise œuvre ne permet d'inactiver qu'un gène à la fois, (ii) la recherche du mutant d'intérêt au sein d'une banque de mutants est chronophage (iii) elle mobilise les marqueurs de résistance aux antibiotiques (déjà peu nombreux pour *M. pneumoniae*) et enfin (iv) l'insertion d'un transposon peut avoir des effets polaires sur l'expression des gènes adjacents (Hutchison *et al.*, 2019). La mise en place de méthodes de mutagenèse dirigée, permettant l'inactivation de gènes cibles choisis par l'expérimentateur semblait plus appropriée pour atteindre nos objectifs, mais un seul exemple de mutagenèse dirigée avait été reporté dans la littérature pour cet organisme (Krishnakumar *et al.*, 2010). Au cours de ces travaux, les auteurs montrent que les gènes cibles *mpn345* et *mpn607* peuvent être supprimés grâce à l'utilisation d'un plasmide non répliatif

portant un marqueur de résistance à un antibiotique flanqué de séquences d'un kilo paires de bases (kpb) identiques aux séquences bordant le gène cible. Cependant, l'efficacité de la méthode est faible (peu de colonies après transformation et ratio clones positifs/clones analysés faible), et ne pouvait donc pas constituer une méthode de choix pour modifier le génome de *M. pneumoniae* à grande échelle.

Sur la base des compétences spécifiques du laboratoire d'accueil, il a finalement été proposé d'utiliser un procédé dans lequel la levure *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée comme plateforme d'ingénierie de génome bactérien (Lartigue *et al.*, 2009). Ce procédé s'est révélé particulièrement utile et efficace pour la construction de souches hautement modifiées de certains mycoplasmes (Jores, Ma, *et al.*, 2019; Lartigue *et al.*, 2019). Ce choix fut renforcé par notre possibilité d'accéder et de disposer d'outils génétiques « levure » toujours plus puissants pour réaliser des manipulations génétiques chez cet hôte (Noskov, Segall-Shapiro and Chuang, 2010; Chandran *et al.*, 2014; Tsarmopoulos *et al.*, 2016).

La première étape de ce cycle d'ingénierie génétique consiste à cloner le génome de *M. pneumoniae* dans la levure. Pour cela, le chromosome bactérien doit être inséré dans la levure, et maintenu dans celle-ci en tant que chromosome surnuméraire. Pour y parvenir, il est nécessaire de rajouter dans le génome bactérien une série d'éléments génétiques issus de la levure, afin de guider et de forcer la réplication du chromosome bactérien. Cette étape de « marquage » du génome bactérien a dans un premier temps été réalisée grâce à une stratégie déjà existante, puis nous avons choisi de développer une nouvelle méthode plus puissante et polyvalente.

1. TRANSFORMATION DANS LA LEVURE D'UN GENOME BACTERIEN PRE-MARQUE

L'utilisation d'un transposon pour marquer un génome de mycoplasme, en amont de son clonage dans la levure, est une stratégie bien établie dans la littérature (Lartigue *et al.*, 2009, 2014; Benders *et al.*, 2010; Baby *et al.*, 2018) (Figure 23 A). Nous avons donc décidé de l'utiliser lors des travaux initiaux de cette thèse, afin de valider la faisabilité du clonage du génome de *M. pneumoniae*, ainsi que la stabilité à long terme de ce chromosome surnuméraire dans la levure (stratégie 1).

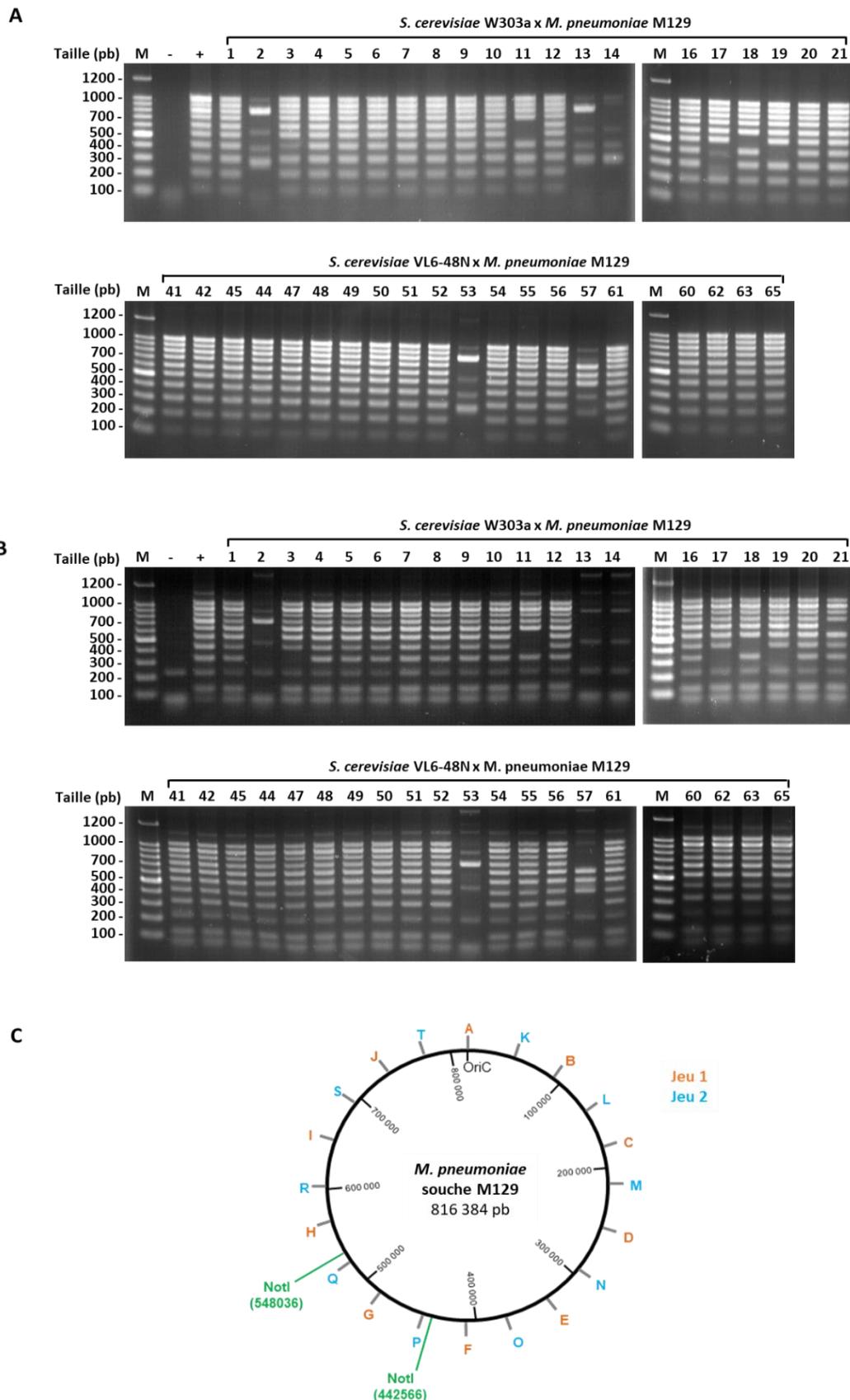


Figure 47. Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure avec la stratégie 1. (A et B) Deux jeux d'amorces ont été utilisés (A-le jeu 1 et B-le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant d'amplifier des loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (A-jeu 1) et de 125 à 1025 pb (B-jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; -, contrôle négatif sans ADN ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129. **(C)** Carte graphique du génome de *M. pneumoniae* M129, illustrant la localisation des deux jeux d'amorces de PCR multiplex (jeu 1 et jeu 2). La localisation des deux sites de restriction NotI utilisés en PFGE est également représentée.

1. 1. Obtention des transformants levure contenant le génome de *M. pneumoniae*

Nous avons obtenu, de la part de nos collaborateurs du laboratoire « Centre for Genomic Regulation » à Barcelone, un tube d'une culture congelée de *M. pneumoniae* étiquetée « *M. pneumoniae* M129 – *tet*(M) ». Cet échantillon correspond à la souche de référence *M. pneumoniae* M129 (ATCC 29342), transformée par électroporation avec le vecteur TnYES1L. Ce vecteur levure est issu de l'assemblage entre la cassette « éléments levure » (ARSH4, CEN6 et HIS3) et le transposon Tn4001 conférant la résistance à la tétracycline *tet*(M) pour la sélection des transformants. Après transformation, la suspension cellulaire a été propagée en milieu liquide puis stocké à -80°C. Il s'agit donc d'un « pool » de transformants et non d'une culture pure.

Des blocs d'agarose ont été préparés à partir d'une culture de *M. pneumoniae* M129 – *tet*(M), puis ont été traités afin d'obtenir des chromosomes bactériens purs et intacts. Ces chromosomes ont ensuite été transformés dans la levure *S. cerevisiae* en utilisant le protocole de transformation de sphéroplastes de levure au PEG. Deux souches de *S. cerevisiae* ont été utilisées en parallèle : W303a et VL6-48N. Ces souches ont des génotypes différents, mais elles ont été utilisées avec succès lors de précédents travaux de clonage et d'ingénierie de génome dans la levure (Lartigue *et al.*, 2009; Benders *et al.*, 2010; Labroussaa *et al.*, 2016).

Plusieurs centaines de colonies ont été obtenues pour les deux transformations, et vingt clones pour chacune des deux souches ont été isolés et analysés en PCR multiplex, afin d'évaluer l'intégrité des génomes bactériens clonés dans la levure (Figure 47). Les PCR multiplex sont basées sur deux jeux d'amorces, spécifiques du génome de *M. pneumoniae*, et permettant chacun l'amplification simultanée de dix fragments d'ADN répartis de façon homogène sur le chromosome. Un génome bactérien correctement cloné et intact est caractérisé par la présence de deux groupes de dix amplicons, tous identiques à ceux observés pour le contrôle positif réalisé sur une matrice d'ADN génomique purifié de *M. pneumoniae* M129. Au total, ce sont 11/20 clones qui ont été validés pour la souche W303a, et 18/20 pour la souche VL6-48N. Les résultats de ces PCR multiplex ne sont néanmoins pas suffisants pour garantir que les génomes clonés sont intacts. En effet, une région de plusieurs milliers de paires de bases peut avoir été perdue sans que cela ne soit détectable, si celle-ci se situe entre deux paires d'amorces de PCR multiplex. De plus, si des réarrangements chromosomiques ont eu lieu, sans perte d'ADN, ils seront impossibles à distinguer par PCR multiplex.

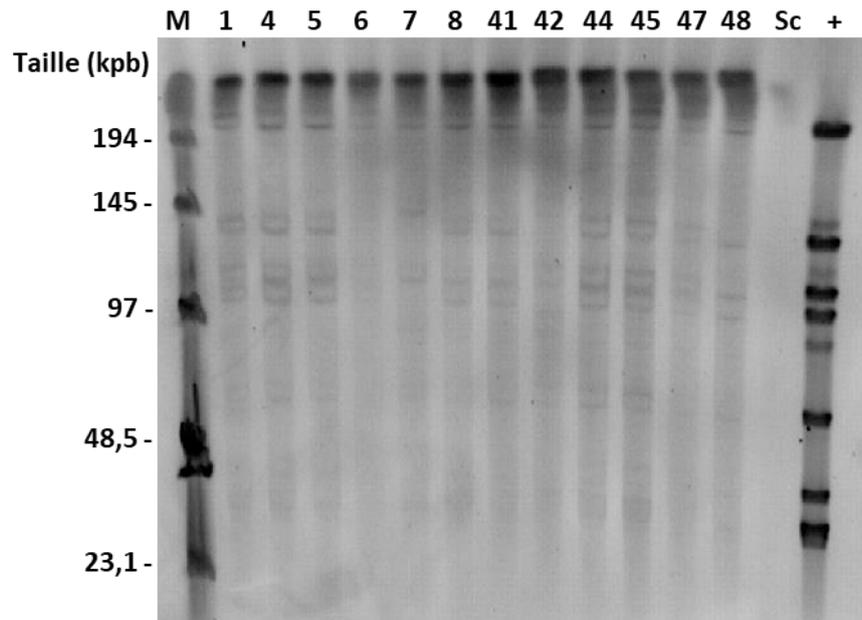


Figure 48. Vérification par PFGE de la taille des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure avec la stratégie 1. Les génomes bactériens ont été digérés avec l'enzyme de restriction AsiSI. Le profil attendu est composé de neuf fragments de 228 kpb, 138 kpb, 116 kpb, 96 kpb, 72 kpb, 49 kpb, 40 kpb, 39kpb et 37 kpb. M, marqueur de taille « Low Range PFG Marker » (NEB) ; Sc, *S. cerevisiae* W303a ; +, *M. pneumoniae* M129 – tet(M).

Une analyse complémentaire des chromosomes a donc été effectuée par électrophorèse en champs pulsés (PFGE). Cette technique permet la séparation de grands fragments d'ADN de plusieurs dizaines de kilobases sur gel d'agarose. Les résultats des PFGE informent sur la taille totale des chromosomes clonés et l'analyse de la taille des fragments de restriction peut nous permettre de détecter d'éventuels réarrangements chromosomiques. Parmi les clones validés en PCR multiplex, six clones de chaque souche de levure ont été analysés en PFGE. Il s'agit des clones 1, 4, 5, 6, 7 et 8 pour la souche W303a, et des clones 41, 42, 44, 45, 47 et 48 pour la souche VL6-48N.

Le protocole de préparation des échantillons, initialement utilisé, dérivait du protocole utilisé au laboratoire pour l'analyse d'autres génomes de mycoplasmes. Ce protocole était composé d'une étape de digestion en blocs d'agarose de l'ADN de levure avec l'enzyme de restriction SgrDI (le génome de *M. pneumoniae* ne possédant pas de site SgrDI), suivie d'un premier PFGE permettant l'élimination de l'ADN de levure, puis d'une étape de digestion du génome bactérien avec différentes enzymes de restriction, et d'un second PFGE permettant la visualisation du profil de digestion du génome de *M. pneumoniae*. Ce protocole s'est malheureusement montré particulièrement inadapté à l'analyse du génome de *M. pneumoniae* et il nous fut difficile de visualiser de manière claire ce génome bactérien. A titre d'exemple, les profils de digestion obtenus, lors de notre premier essai de PFGE, après digestion du génome bactérien avec l'enzyme AsiSI sont montrés Figure 48. Nous attendions un profil à neuf bandes (228 kpb, 138 kpb, 116 kpb, 96 kpb, 72 kpb, 49 kpb, 40 kpb, 39 kpb et 37 kpb) identique à celui du contrôle positif (bloc d'agarose réalisé à partir d'une culture de *M. pneumoniae* M129-*tet*(M)). Bien qu'un certain nombre de bandes soient visibles pour tous les clones, dont certaines aux tailles attendues, le profil n'était pas conforme à celui du contrôle positif. De plus, l'intensité des bandes était faible et couplée à un bruit de fond important. Des bandes parasites étaient également présentes dans la piste du contrôle positif, ce qui rendait toute conclusion difficile. À la vue des différences d'intensité des bandes entre les blocs issus des clones levure et le contrôle positif, il fut dans un premier temps décidé de réaliser une nouvelle préparation de blocs. Ces nouveaux blocs ont été réalisés pour les clones 12 et 16 pour la souche W303a, et pour les clones 63 et 65 pour la souche VL6-48N. Afin de s'assurer de la qualité du processus de préparation des blocs, des échantillons de l'espèce *Mycoplasma leachii* PG50 furent préparés en même temps. De plus, des enzymes de restriction alternatives furent utilisées afin de réduire le nombre de fragments générés et ob-

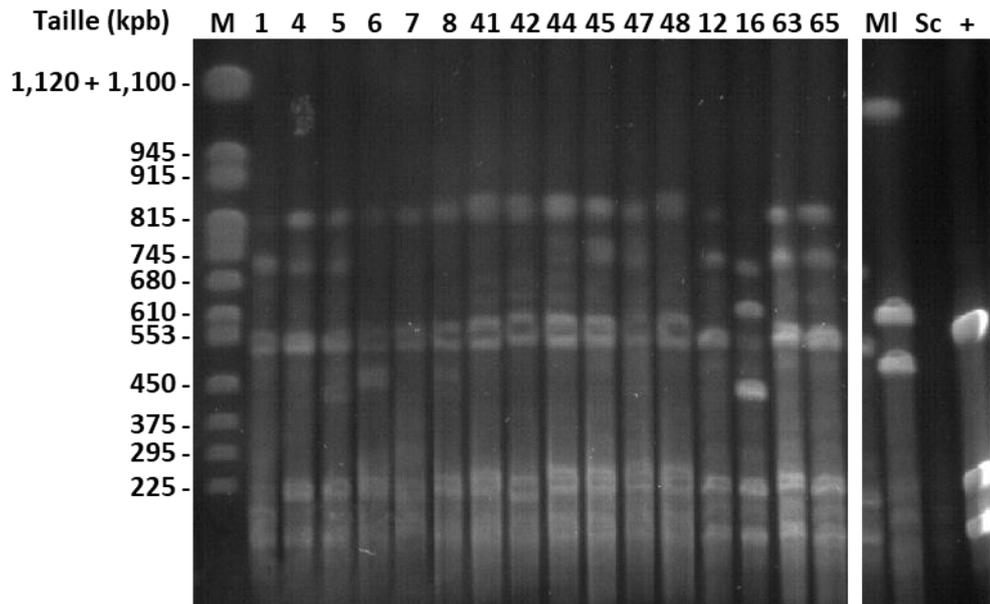


Figure 49. Vérification par PFGE de la taille des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure avec la stratégie 1. Les génomes bactériens ont été digérés avec les enzymes de restriction SbfI et NotI. Le profil attendu pour *M. pneumoniae* est composé de trois fragments de 528 kpb, 183 kpb et 105 kpb, et pour *M. leachii* PG50 de deux bandes, 569 kpb et 440 kpb. M, marqueur de taille « Yeast Chromosome PFG Marker » (NEB) ; MI, *M. leachii* PG50 ; Sc, *S. cerevisiae* W303a ; +, *M. pneumoniae* M129 – tet(M).

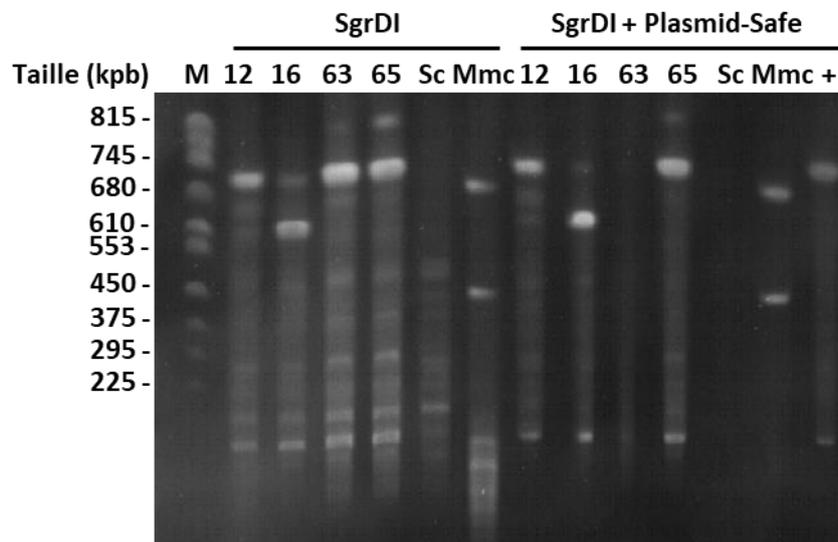


Figure 50. Vérification par PFGE de la taille des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure avec la stratégie 1. Comparaison du traitement des blocs avec l'enzyme SgrDI seule, ou bien avec l'enzyme SgrDI et l'enzyme Plasmid-Safe. Les génomes bactériens ont été digérés avec l'enzyme de restriction NotI. Le profil attendu pour *M. pneumoniae* est composé de deux fragments de 711 kpb et 105 kpb. Le contrôle *M. mycoides* subsp. *capri* GM12 (cloné dans la souche W303a) a été digéré avec l'enzyme BssHII, le profil attendu est composé de deux fragments de 668 kpb et 384 kpb. M, marqueur de taille « Yeast Chromosome PFG Marker » (NEB) ; Sc, *S. cerevisiae* W303a ; Mmc, *M. mycoides* subsp. *capri* GM12 ; +, *M. pneumoniae* M129 – tet(M).

-tenir ainsi des profils plus simples à analyser. Lors de ce deuxième essai de PFGE, réalisé après digestion du génome bactérien avec les enzymes SbfI et NotI (Figure 49), nous attendions un profil à trois bandes (528 kpb, 183 kpb, et 105 kpb). Les contrôles positifs présentent les profils attendus, avec des ratios signal/bruit très satisfaisant. Néanmoins, les résultats obtenus pour les clones levures de *M. pneumoniae* ne sont toujours pas satisfaisants. Si l'on peut observer des bandes aux tailles attendues, celles-ci semblent dédoublées, et un fort bruit de fond parasite toujours la lecture des résultats. Cependant, nous pouvons noter que les résultats obtenus sont les mêmes pour les nouveaux blocs (12, 16, 63, 65) et pour les anciens blocs utilisés dans le premier essai de PFGE. Ce résultat suggère que le problème ne vient pas de la production des blocs à proprement parler, mais plutôt du processus de traitement de ceux-ci en amont du PFGE. Ces éléments nous amenèrent à suspecter un problème d'élimination de l'ADN de levure, qui ne serait alors pas optimal. La présence de cet ADN de levure contaminant, qui migrerait en même temps que l'ADN bactérien, pourrait expliquer l'aspect « smear » observé dans chaque échantillon.

Nous avons donc réalisé plusieurs essais dans le but d'améliorer notre procédé de traitement des blocs levure. La principale modification consistât à ajouter, après le premier PFGE, une étape de traitement des blocs avec l'enzyme Plasmid-Safe (Figure 50). Cette enzyme est une désoxyribonucléase qui digère l'ADN double brin linéaire, et qui ne présente pas d'activité sur l'ADN circulaire. Cette enzyme permet donc de dégrader spécifiquement l'ADN de levure qui n'a pas été éliminé lors du premier PFGE. L'utilisation de l'enzyme Plasmid-Safe résultât en une très forte réduction du bruit de fond, permettant une bien meilleure lecture des profils de migration. En s'appuyant sur ces résultats, un protocole optimisé a été développé. Il est donc composé d'une étape de digestion de l'ADN de levure avec l'enzyme SgrDI, d'un premier PFGE permettant l'élimination de l'ADN de levure, d'une étape de traitement des blocs avec l'enzyme Plasmid-Safe, d'une électrophorèse classique pour éliminer les petits fragments d'ADN linéaires, d'une étape de digestion du génome bactérien avec l'enzyme NotI, et enfin d'un second PFGE. Le profil attendu à l'issue de cette expérience est composé de deux bandes, une à 711 kpb et une autre à 105 kpb. L'utilisation de ce protocole nous a permis de à valider les clones 1 et 12 pour la souche W303a, et les clones 63 et 64 pour la souche VL6-48N (Figure 51), confirmant ainsi qu'il est possible de cloner le génome de *M. pneumoniae* M129 dans la levure. Nous avons noté que la validation de certains clones levure hébergeant le génome *M. pneumoniae* restait encore parfois difficile,

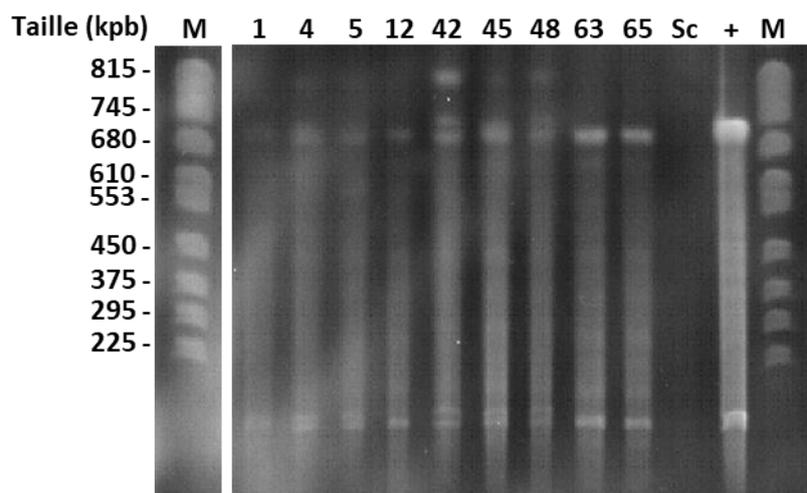


Figure 51. Vérification par PFGE de la taille des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure avec la stratégie 1. Les génomes bactériens ont été traités avec les enzymes SgrDI et Plasmid-Safe, puis digérés avec l'enzyme de restriction NotI. Le profil attendu est composé de deux fragments de 711 kpb et 105 kpb. M, marqueur de taille « Yeast Chromosome PFG Marker » (NEB) ; Sc, *S. cerevisiae* W303a ; +, *M. pneumoniae* M129 – tet(M).

avec des cas de bandes doublets, ou des intensités parfois trop faibles dans certaines pistes, mais dans l'ensemble, la lecture des résultats est grandement facilitée. Ce protocole optimisé a donc été adopté pour la suite des travaux.

1. 2. Analyse de la stabilité du génome de *M. pneumoniae* cloné dans la levure

Des travaux récents menés sur *Mycoplasma hominis* ont montré que les génomes de mycoplasmes ne sont pas toujours maintenus intacts dans la levure, et que des grandes sections du chromosome bactérien peuvent être perdues au cours du temps (Rideau *et al.*, 2017). Suite à ces résultats, nous nous sommes interrogés sur la stabilité du génome *M. pneumoniae* au cours de la propagation des levures. En effet, les génomes bactériens ne portent aucune information utile ou essentielle pour la levure, à l'exception du marqueur d'auxotrophie HIS. Étant donné le coût métabolique du maintien et de la réplication de ces chromosomes surnuméraires, il est envisageable que la levure ait tendance à perdre une partie de ce contenu non naturel au cours du temps et des cycles de division. Cette possibilité est renforcée par la présence de régions répétées dans le génome de *M. pneumoniae* (Wenzel and Herrmann, 1988; Himmelreich *et al.*, 1996; Musatovova, Kannan and Baseman, 2012) qui peuvent servir de sites de recombinaison.

Pour répondre à cette question, nous avons décidé de réaliser une étude de l'intégrité du chromosome bactérien *M. pneumoniae* M129 –*tet*(M) au cours du temps pour les clones levure 1, 2, 63 et 64 identifiés précédemment. Les clones ont été repiqués quotidiennement en milieu liquide sur une durée de 30 jours, correspondant ainsi à un total de 30 passages (soit ~180 générations). À l'issue des passages 1, 5, 10, 15, 20, 25 et 30, l'intégrité du génome bactérien des quatre clones a été analysée par PCR multiplex et PFGE en utilisant les techniques décrites dans la section précédente (Figure 52).

Pour la souche W303a, les profils de PCR multiplex sont identiques au contrôle positif pour les passages 1P, 5P et 10P. Au 15^{ème} passage (15P), nous observons une diminution de l'intensité de certaines bandes, et cela pour les deux clones sélectionnés. Au 25^{ème} passage, le profil des deux clones se détériore davantage et de façon identique, avec la disparition progressive de certaines bandes, notamment celles de plus faible taille. Nous observons le même comportement pour la souche VL6-48N, et de façon encore plus marquée. En effet, la

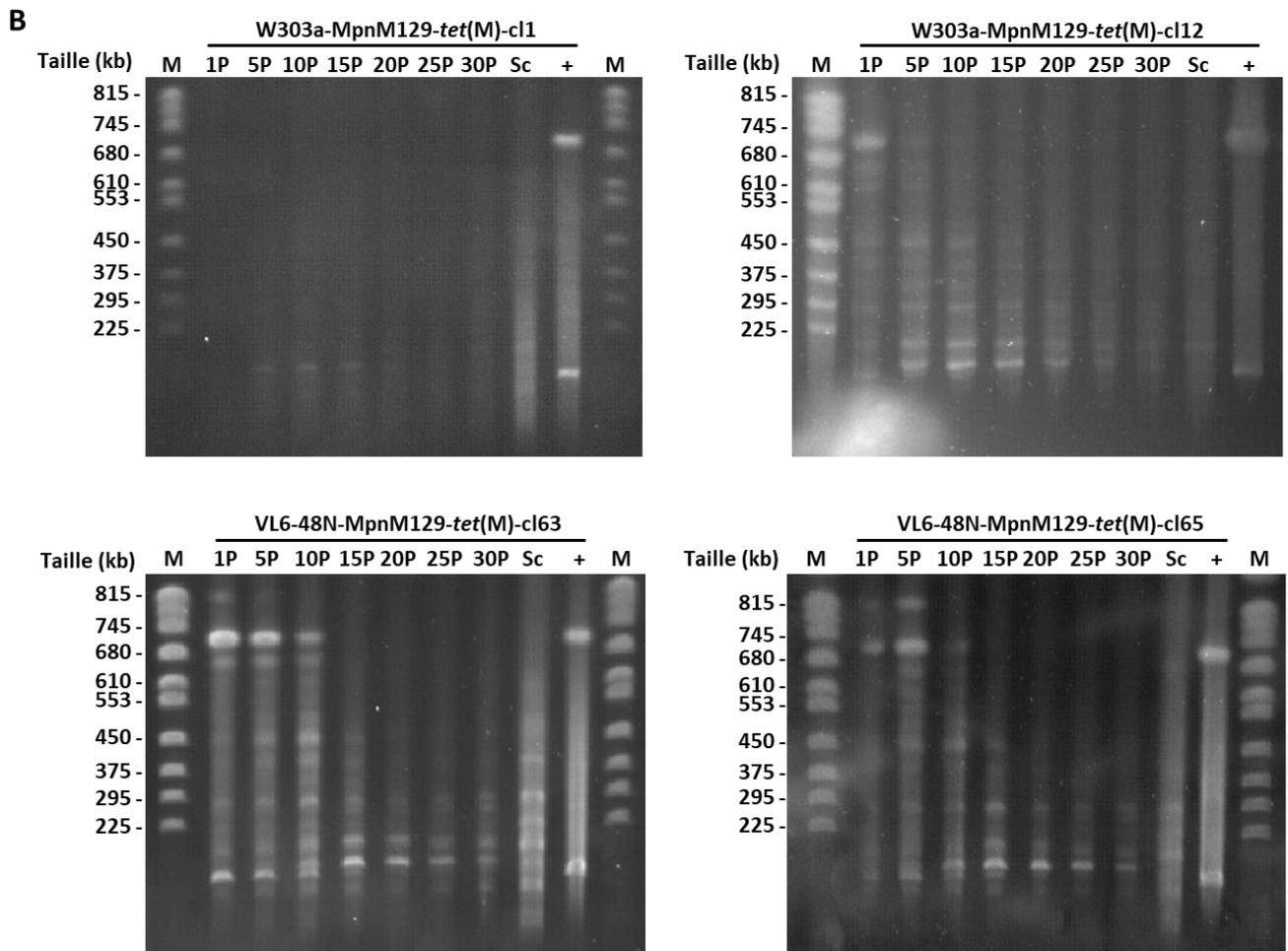
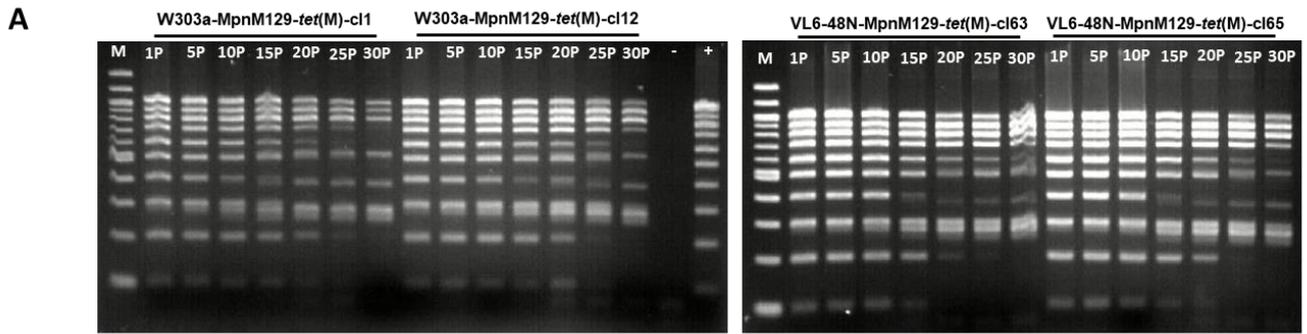


Figure 52. Analyse par PCR multiplex (A) et par PFGE (B) de la stabilité des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure avec la stratégie 1. (A) Le jeu d'amorces (jeu 1) utilisé est composé de dix paires d'amorces réparties de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, et permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb, avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; -, contrôle négatif sans ADN ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129. **(B)** Les génomes bactériens ont été digérés avec l'enzyme de restriction NotI. Le profil attendu est composé de deux fragments de 711 kpb et 105 kpb. M, marqueur de taille « Yeast Chromosome PFG Marker » (NEB) ; Sc, *S. cerevisiae* W303a (clones 1 et 12) ou VL6-48N (clones 63 et 65) ; +, *M. pneumoniae* M129 – *tet(M)*.

diminution de l'intensité de certaines bandes dès le 15^{ème} passage est plus franche, et la disparition de certaines bandes se confirme dès le 20^{ème} passage, et ici aussi pour les deux clones sélectionnés.

L'analyse des clones en PFGE (Figure 52 B) confirme les résultats observés en PCR multiplex. Le génome bactérien ayant été digéré avec l'enzyme NotI, le profil attendu est un profil à deux bandes, une à 711 kpb et une autre à 105 kpb. Avec la souche W303a, nous n'observons aucun profil visible pour le clone 1. Ce résultat est surprenant car nous avons réussi à valider ce clone lors de précédentes analyses en PFGE (voir section précédente). Ceci dénote un manque de reproductibilité des analyses en PFGE des clones levure W303a. Un profil est visible uniquement pour le 1^{er} passage du clone 12. En revanche, avec la souche VL6-48N, nous observons un profil correct et bien marqué pour les passages 1, 5 et 10 du clone 63. A partir du 15^{ème} passage, le profil disparaît. Le comportement observé est le même pour le clone 65, bien que les profils soient moins marqués. Nous observons quand même le profil attendu jusqu'au 10^{ème} passage inclus. Nous notons ainsi que la visualisation des résultats semble plus compliquée pour la souche W303a que pour la souche VL6-48N. Du fait de ces difficultés, et étant donnée notre capacité à cloner le génome de *M. pneumoniae* dans les deux souches, nous avons décidé de travailler avec la souche VL6-48N pour la suite de nos travaux.

Dans leur ensemble, les résultats obtenus indiquent que le génome de *M. pneumoniae* est maintenu de manière stable dans la levure pendant un nombre relativement limité de passages (environ une dizaine). Cette information est extrêmement importante dans le cadre des projets d'édition de génome à grande échelle, car elle signifie que nous disposons d'un nombre de cycles d'ingénierie successifs limités. De ce fait, il est important de disposer d'un système d'ingénierie génétique capable de générer les mutations voulues le plus rapidement possible, en réalisant le minimum d'étapes intermédiaires.

C'est dans ce cadre que nous avons commencé à réfléchir à la possibilité de réaliser les étapes d'édition du génome en même temps que l'étape de clonage. Cette réflexion, nourrie par l'essor des applications basées sur le système CRISPR/Cas9, a abouti à la mise au point d'une nouvelle stratégie, décrite ci-dessous.

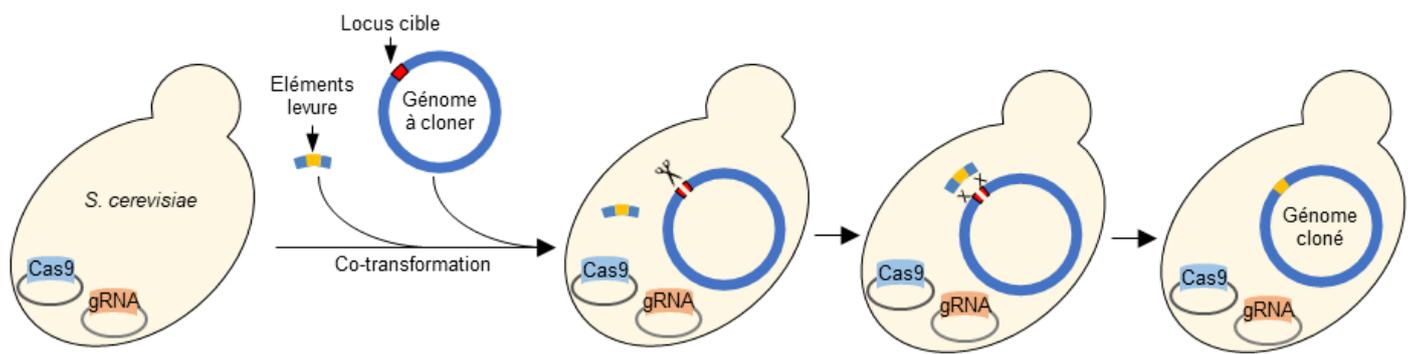


Figure 53. Schéma illustrant la stratégie CREasPy-cloning (stratégie 2). Une levure est préalablement transformée avec deux plasmides permettant l'expression de la nucléase Cas9 et d'un ARNg. Cette levure est ensuite transformée simultanément avec le génome à cloner et un fragment d'ADN linéaire contenant les éléments de levure flanqué de deux bras de recombinaison homologues de chaque côté du locus cible. Après son entrée dans la cellule, le génome cible est clivé par le complexe Cas9/ARNg, puis il est réparé par le système de recombinaison homologue de la levure, en utilisant le fragment d'ADN linéaire fourni en tant que matrice. Le génome bactérien comprend alors les éléments de levure insérés à un locus précis (ici, en déléant de manière précise le gène cible en rouge), et est maintenu par la levure en tant que chromosome artificiel.

2. CLONAGE CREASPY

Au cours de cette thèse, nous avons développé une nouvelle méthode de clonage des génomes bactériens dans la levure (stratégie 2), que nous avons nommée « CReasPy-cloning » et qui est basée sur le système CRISPR-Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (Le Rhun *et al.*, 2019). Ce dernier est fonctionnel dans la levure (DiCarlo *et al.*, 2013), et peut être utilisé pour modifier les génomes bactériens qui y sont clonés (Tsarmopoulos *et al.*, 2016). Le fonctionnement général de cette stratégie est le suivant (Figure 53) :

1) La levure est co-transformée avec le plasmide pCas9, permettant l'expression de la protéine Cas9, et avec le plasmide pgRNA, permettant l'expression d'un ARN guide (ARNg). L'ARNg utilisé ici est un ARNg chimérique, composé de la fusion du crARN (séquence spécifique du gène cible) et du tracrARN (composant structural) (Jinek *et al.*, 2012; DiCarlo *et al.*, 2013).

2) Après sélection, cette levure est co-transformée avec le génome bactérien purifié, nu et intact, et un fragment d'ADN linéaire. Cette molécule d'ADN, appelée « pansement », contient la cassette « éléments levure », un marqueur de sélection, et à ses extrémités deux régions homologues à un *locus* du génome bactérien.

3) Le complexe Cas9-ARNg présent dans la levure détecte son site de clivage dans le génome bactérien, et génère une coupure double brin qui linéarise le chromosome transformé.

4) Cette coupure est détectée par le système de réparation de l'ADN présent chez la levure, qui va alors tenter de la réparer. La présence du « pansement » va favoriser la réparation *via* le mécanisme de recombinaison homologue « HR ».

5) Après réparation, le chromosome bactérien est de nouveau circulaire, et porte à présent la cassette « éléments levure » insérée au *locus* précis défini par l'expérimentateur.

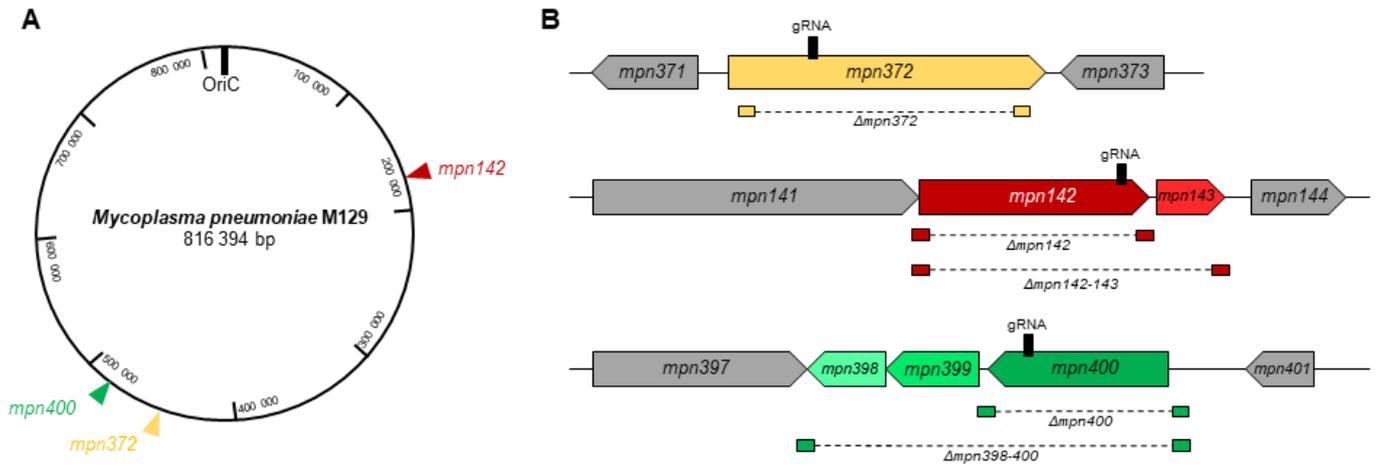


Figure 54. Application de la méthode CReasPy-cloning au génome de *M. pneumoniae* M129. (A) Carte du génome de *M. pneumoniae* M129. L'emplacement des trois loci ciblés (*mpn372*, *mpn142* et *mpn400*) est indiqué par des flèches de couleur. (B) Vue schématique des régions génomiques entourant les loci ciblés. L'emplacement de la séquence du protospacer de l'ARNg est indiqué par une barre noire. Les emplacements des bras de recombinaison sont indiqués par des rectangles verts reliés par une ligne pointillée.

L'intérêt de la méthode CReasPy-cloning, par rapport à la stratégie de clonage via marquage du génome bactérien par transposition, est triple. Il réside dans le fait que le *locus* d'insertion de la cassette « éléments levure » n'est pas aléatoire, que cette insertion peut se faire en échange d'une délétion d'une région chromosomique bien définie, et que l'édition du génome bactérien est possible dès l'étape de clonage.

2. 1. Clonage et édition d'un *locus* unique : CReasPy-cloning single target

Afin de tester la viabilité de la stratégie CReasPy-cloning présentée ci-dessus, nous avons réalisé une série d'expériences de clonage du génome de *M. pneumoniae* M129 en ciblant et supprimant différents gènes codant des facteurs de virulence. Ce choix est lié à l'objectif final des projets MiniCell et MycoSynVac, qui est de créer un châssis bactérien avirulent. Nous avons ciblé les *loci* suivants : *mpn372*, le gène codant la toxine CARDS (Lluch-Senar, Cozzuto, *et al.*, 2015); *mpn142*, un gène codant une protéine de cytoadhérence ; et *mpn400*, le gène codant une protéine se liant aux immunoglobulines « Protein M » (Figure 54). Dans le cas de *mpn142*, nous avons ciblé le gène seul mais aussi une portion de l'opéron dont il fait partie. Cette portion correspond au *locus mpn142-143*, les gènes *mpn141* et *mpn144* étant supposés être essentiels (Lluch-Senar, Delgado, *et al.*, 2015). Dans le cas de *mpn400*, nous avons également ciblé le gène seul et la totalité de l'opéron *mpn398-400* auquel il appartient.

En préparation au protocole de CReasPy-cloning, les ARNg contenant les protospacers ciblant les différents *locus* mentionnés ci-dessus (Figure 54) ont été conçus, clonés dans le plasmide pgRNA et validés par séquençage. En parallèle, les pansements de recombinaison correspondants ont été produits et purifiés.

Les expériences de co-transformations de la souche de levure VL6-48N avec [les plasmides pCas9 et pgRNA] ou avec [le pansement et le chromosome de *M. pneumoniae* M129] ont été réalisées en utilisant le protocole de transformation à l'acétate de lithium et le protocole de transformation de sphéroplastes de levure au PEG, respectivement

2. 1. 1. Obtention des mutants « single target »

Plusieurs centaines de colonies ont été obtenues pour chacune des cinq transformations ($\Delta mpn372$, $\Delta mpn142$, $\Delta mpn142-143$, $\Delta mpn400$ et $\Delta mpn398-400$). Pour chaque transformation, vingt clones ont été isolés et analysés. Pour chaque construction, l'ensemble des étapes de screening est présenté sur une seule figure (PCR, PCR multiplex, PFGE) :

- $\Delta mpn372$: Figure 55
- $\Delta mpn142$: Figure 56
- $\Delta mpn142-143$: Figure 57
- $\Delta mpn400$: Figure 58
- $\Delta mpn398-400$: Figure 59

Les clones ont d'abord été analysés en PCR en utilisant des amorces spécifiques du génome de *M. pneumoniae*, situées de part et d'autre du *locus* à supprimer. Cette PCR permet à la fois de confirmer la présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure, et le remplacement du gène ciblé par le pansement de recombinaison.

Nous avons validé 10/20 clones pour la mutation $\Delta mpn372$, qui présentaient le profil attendu d'une bande à 3595 pb (Figure 55 A). Le contrôle positif réalisé sur l'ADNg de *M. pneumoniae* M129 présente une bande à 2020 pb. Un total de 1/20 et 4/20 clones ont été validés pour les mutations $\Delta mpn142$ et $\Delta mpn142-143$, respectivement (Figure 56 A et Figure 57 A). Le profil correspondant à la mutation $\Delta mpn142$ est constitué d'une bande 3560 pb, et celui du contrôle positif d'une bande à 3919 pb. Le profil correspondant à la mutation $\Delta mpn142-143$ est constitué d'une bande à 3515 pb, et celui du contrôle positif d'une bande à 4598 pb. Le couple d'amorces utilisé sur les mutations $\Delta mpn142$ et $\Delta mpn142-143$ est différent, ce qui explique le fait qu'un contrôle positif ait été réalisé pour chaque mutation. Enfin, un total de 10/20 et 8/20 clones ont été validés pour les mutations $\Delta mpn400$ et $\Delta mpn398-400$, respectivement (Figure 58 A et Figure 59 A). Le profil correspondant à la mutation $\Delta mpn400$ est constitué d'une bande à 4841 pb, celui correspondant à la mutation $\Delta mpn398-400$ est constitué d'une bande à 3261 pb, et celui du contrôle positif d'une bande à 3480 pb.

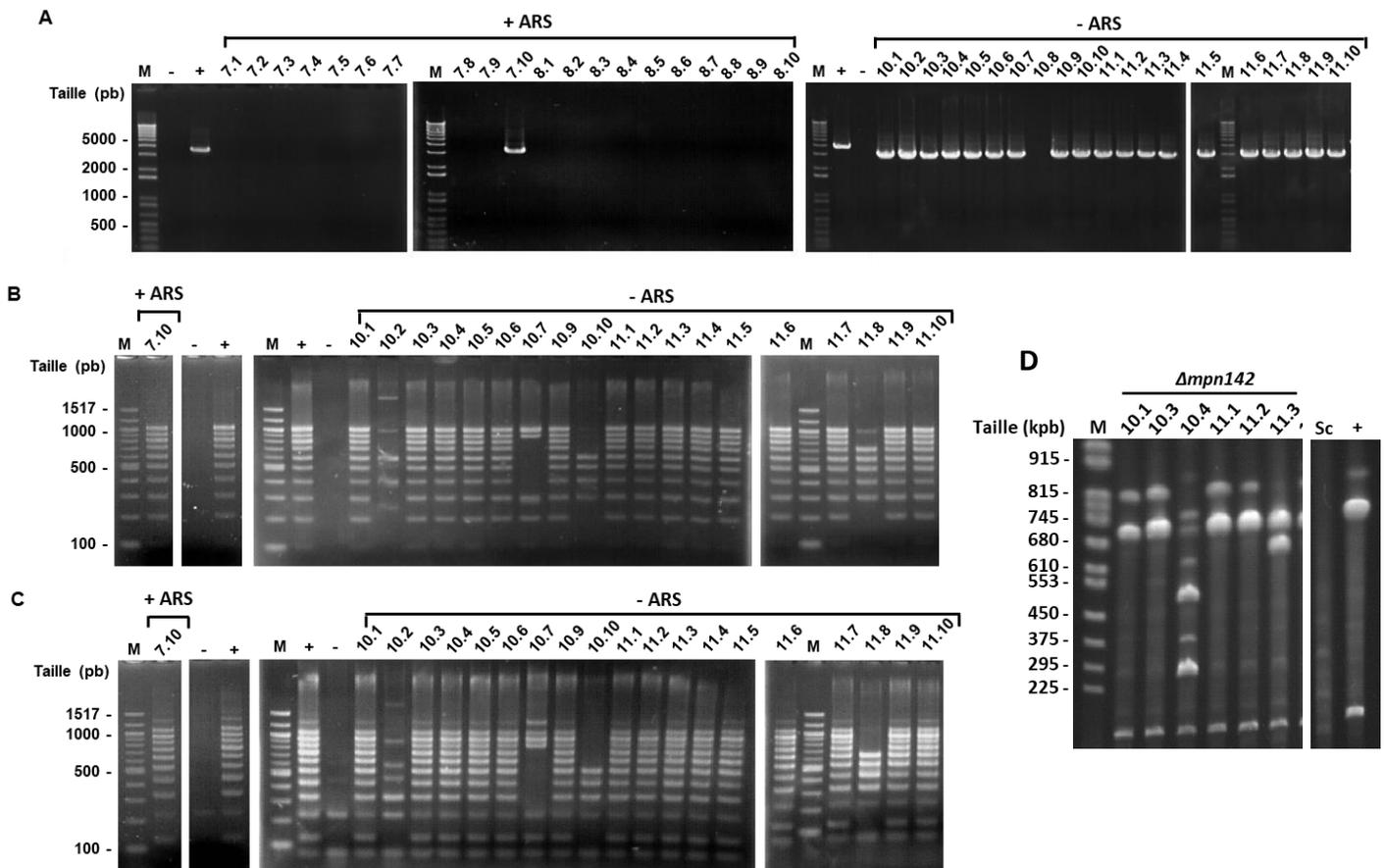


Figure 56. Analyse des génomes de *M. pneumoniae* M129 délétés pour le gène *mpn142*, clonés dans la levure avec la stratégie CREasPy-cloning (stratégie 2). Deux types de pansement de recombinaison ont été utilisés, un avec l'ARS (+ARS) et l'un sans ARS (-ARS). **(A)** La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible ont été vérifiés par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 3560 pb avec le pansement +ARS, et de 2979 pb avec le pansement -ARS. Une amplification de 3919 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. **(B et C)** Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (B-le jeu 1 et C-le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant d'amplifier des loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (B-jeu 1) et de 125 à 1025 pb (C-jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. **(D)** Les génomes bactériens ont été digérés avec l'enzyme de restriction *NotI* puis analysés en PFGE. Le profil attendu est composé de deux fragments de 711 kpb et 105 kpb. M, marqueur de taille « Yeast Chromosome PFG Marker » (NEB) ; Sc, *S. cerevisiae* VL6-48N ; +, *M. pneumoniae* M129

Afin d'évaluer l'intégrité des génomes bactériens clonés dans la levure, les clones validés en PCR ont ensuite été analysés en PCR multiplex, en utilisant les deux jeux d'amorces décrits dans la section précédente. Au total, 2/10 clones ont été validés pour la mutation $\Delta mpn372$ (Figure 55 B-C), 1/1 et 2/4 pour les mutations $\Delta mpn142$ (Figure 56 B-C) et $\Delta mpn142-143$ (Figure 57 B-C), respectivement, et 4/10 et 2/8 pour les mutations $\Delta mpn400$ (Figure 58 B-C) et $\Delta mpn398-400$ (Figure 59 B-C), respectivement.

Ces résultats nous ont permis de démontrer qu'il est possible de cloner le génome de *M. pneumoniae* dans la levure, tout en supprimant certains gènes ou groupes de gènes. Cependant, à l'issue des analyses en PCR multiplex, nous avons constaté que globalement nous obtenions peu de clones positifs (nous avons par exemple une meilleure « efficacité » avec la stratégie 1). A la vue du grand nombre de colonies présentes sur les boîtes de transformation, nous avons suspecté la présence d'un nombre non négligeable de clones « faux-positifs ». Nous nous sommes alors interrogés sur l'impact de la présence de la séquence ARSH4 (origine de répllication de la levure) dans nos pansements de recombinaison. En effet, il a déjà été observé lors d'expériences de TAR-cloning visant à isoler une région chromosomique dans un vecteur, que le vecteur contenant les éléments levure (dont la séquence ARS) peut se recirculariser sans avoir « capturé » la séquence d'ADN cible (Noskov *et al.*, 2001). En revanche, l'utilisation de vecteurs sans séquence ARS résultât en un isolement quasi-systématique du fragment chromosomique cible. Il semblerait donc qu'une molécule d'ADN contenant les éléments levure, dont la séquence ARS, soit capable de se répliquer de manière autonome. Cette réflexion nous a donc conduit à répéter des essais de CREasPy-cloning, en utilisant un pansement de recombinaison ne contenant pas de séquence ARS et contenant uniquement les éléments levure CEN6 et HIS3.

2. 1. 2. Utilisation d'un « pansement » sans séquence ARS

Une centaine de colonies a été obtenue pour chaque transformation soit moins que lorsque nous utilisons le pansement contenant une séquence ARS. Vingt clones ont été isolés puis analysés en PCR, PCR multiplex et PFGE pour chaque transformation (Table 5, et Figures 55-59). Pour les PCR, nous avons obtenus 20/20 clones positifs pour la mutation $\Delta mpn372$ (avec un profil présentant une bande à 3118 pb), 19/20 pour la mutation $\Delta mpn142$ (une bande

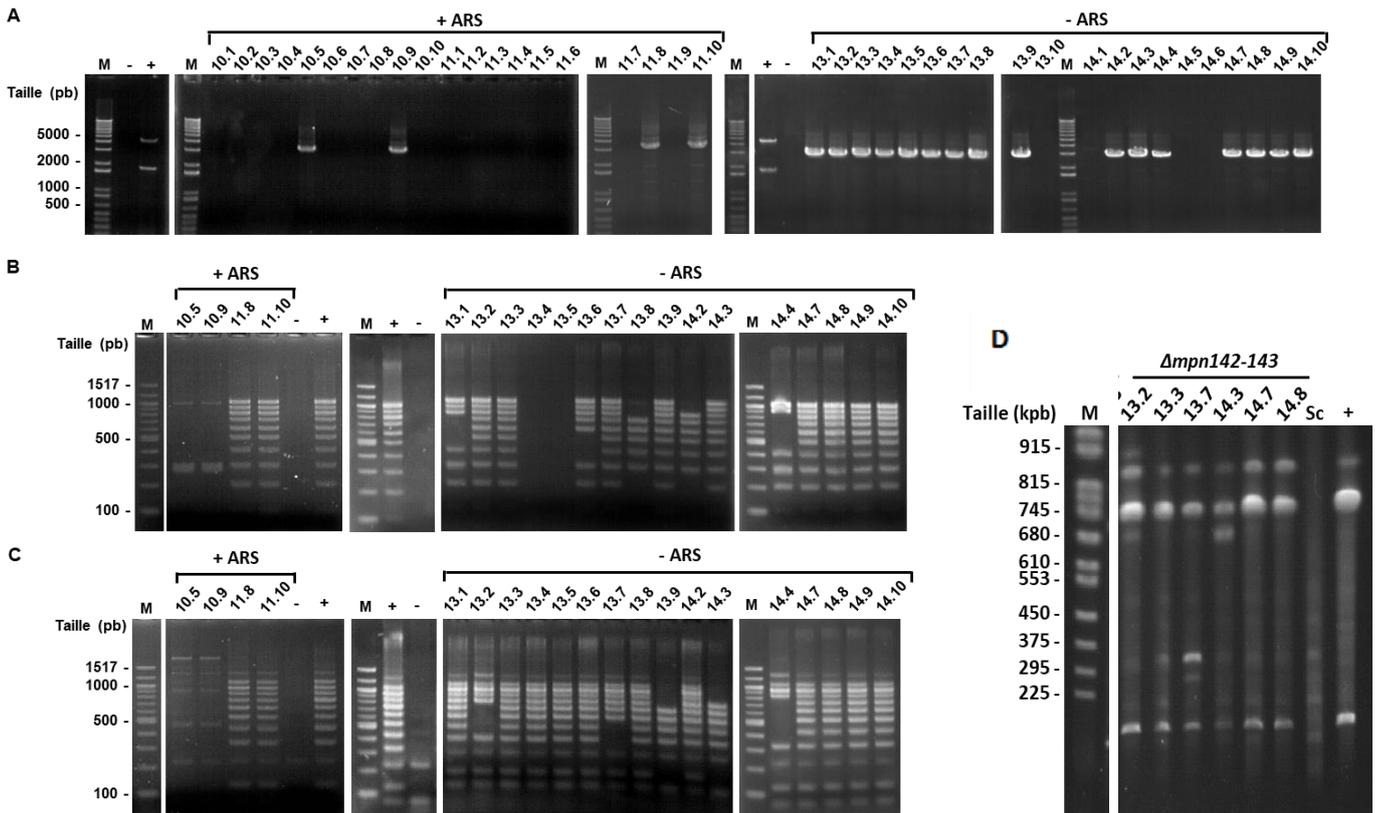


Figure 57. Analyse des génomes de *M. pneumoniae* M129 délétés pour les gènes *mpn142-143*, clonés dans la levure avec la stratégie CREasPy-cloning (stratégie 2). Deux types de pansement de recombinaison ont été utilisés, un avec l'ARS (+ARS) et l'un sans ARS (-ARS). **(A)** La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement des gènes cibles ont été vérifiés par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 3515 pb avec le pansement +ARS, et de 2935 pb avec le pansement -ARS. Une amplification de 4598 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. **(B et C)** Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (B-le jeu 1 et C-le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant d'amplifier des loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (B-jeu 1) et de 125 à 1025 pb (C-jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. **(D)** Les génomes bactériens ont été digérés avec l'enzyme de restriction NotI puis analysés en PFGE. Le profil attendu est composé de deux fragments de 711 kpb et 105 kpb. M, marqueur de taille « Yeast Chromosome PFG Marker » (NEB) ; Sc, *S. cerevisiae* VL6-48N ; +, *M. pneumoniae* M129

Table 5. Nombre de transformants levure contenant le génome de *M. pneumoniae* M129, obtenus par CReasPy-cloning. Comparaison de l'efficacité de la méthode CReasPy-cloning en fonction de l'utilisation d'un pansement de recombinaison contenant ou non une séquence ARS. N.A., non applicable.

Pansement de recombinaison	Nombre de clones positifs / Nombre de clones analysés			
	Locus cible	PCR	PCR multiplex	PFGE
+ ARS	<i>mpn372</i>	10/20	2/10	N.A.
	<i>mpn142</i>	1/20	1/1	
	<i>mpn142-143</i>	4/20	2/4	
	<i>mpn400</i>	10/20	4/10	
	<i>mpn398-400</i>	8/20	2/8	
- ARS	<i>mpn372</i>	20/20	16/20	5/6
	<i>mpn142</i>	19/20	15/19	4/6
	<i>mpn142-143</i>	16/20	11/16	4/6
	<i>mpn400</i>	20/20	10/20	5/6
	<i>mpn398-400</i>	20/20	14/20	5/6

à 2979 pb), 16/20 pour la mutation $\Delta mpn142-143$ (une bande à 2935 pb), 20/20 pour la mutation $\Delta mpn400$ (une bande à 4314 pb), et 20/20 pour la mutation $\Delta mpn398-400$ (une bande à 2785 pb).

Comme précédemment, les clones validés en PCR ont ensuite été analysés en PCR multiplex. Au total, 16/20, 15/19, 11/16, 10/20 et 14/20 clones positifs ont été identifiés pour les mutations $\Delta mpn372$, $\Delta mpn142$, $\Delta mpn142-143$, $\Delta mpn400$ et $\Delta mpn398-400$, respectivement. Nous avons donc observé, que pour un même nombre de clones analysés, il est plus facile de sélectionner des clones positifs en utilisant un pansement sans séquence ARS.

Enfin, parmi les clones validés en PCR multiplex, six clones pour chaque mutation ont été analysés en PFGE selon le protocole optimisé à l'issue de la stratégie 1 (Figure 55 D à 59 D). Le profil attendu est identique à celui du contrôle positif (bloc d'agarose réalisé à partir d'une culture de *M. pneumoniae* M129), il est composé de deux bandes, une à 711 kpb et une autre à 105 kpb. Un nombre de 5/6 clones ont présenté un profil correct en PFGE pour la mutation $\Delta mpn372$ (Figure 55 D), 4/6 pour chacune des mutations $\Delta mpn142$ (Figure 56 D) et $\Delta mpn142-143$ (Figure 57 D), et 5/6 pour chacune des mutations $\Delta mpn400$ (Figure 58 D) et $\Delta mpn398-400$ (Figure 59 D).

Ces résultats nous ont donc permis de confirmer que la stratégie CReasPy-cloning est une stratégie efficace pour cloner et éditer le génome de *M. pneumoniae* dans la levure en une seule étape. Cette stratégie a nécessité de revoir la construction des pansements de recombinaison utilisés, en enlevant la séquence ARS, afin d'optimiser l'identification des clones positifs. Cette optimisation permet d'obtenir facilement de nombreux clones positifs sans avoir besoin d'analyser plus de vingt transformants.

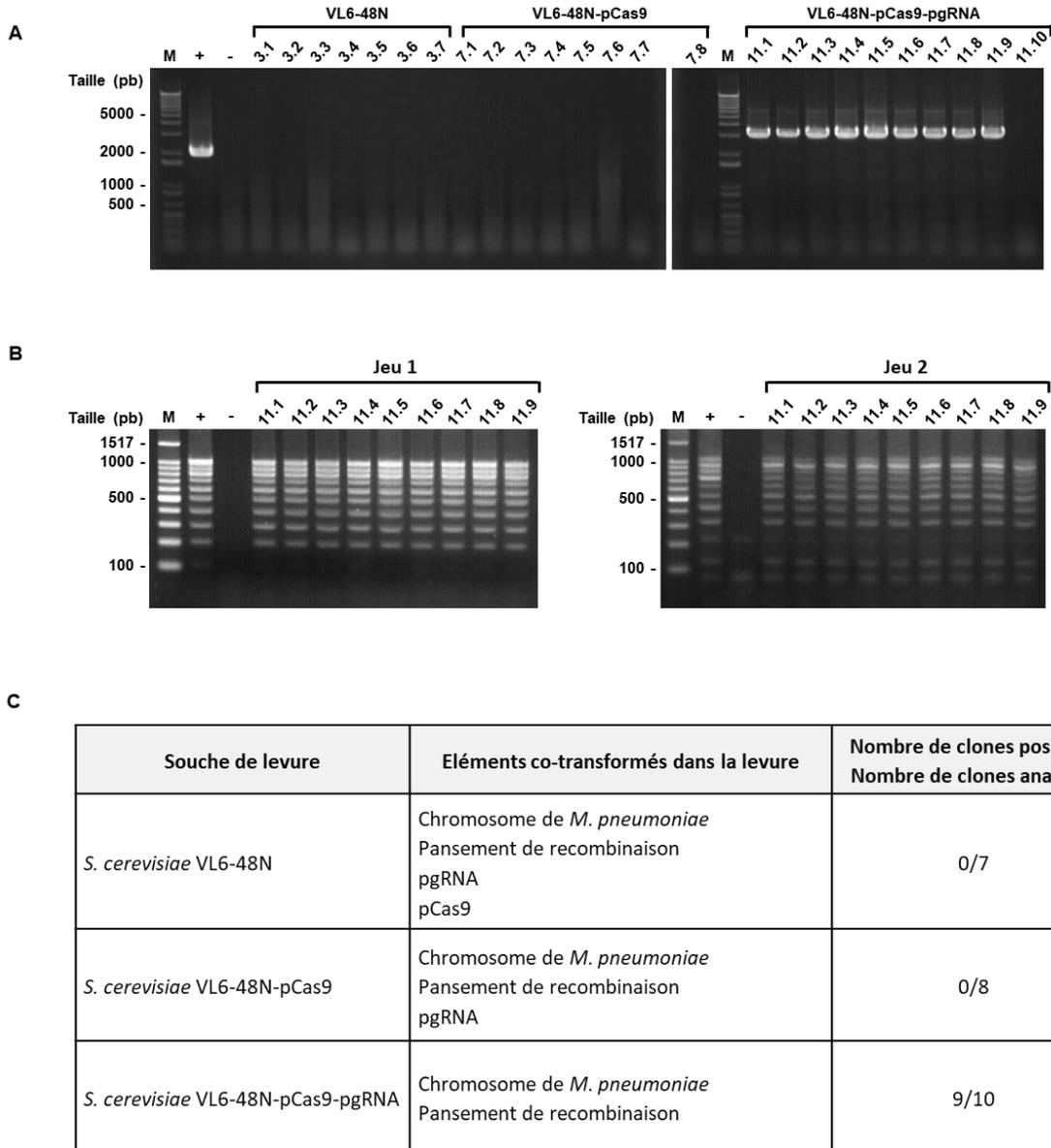


Figure 60. Détermination du nombre d'éléments génétiques pouvant être co-transformés en CREasPy-cloning. (A) La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible ont été vérifiés par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 3118 pb. Une amplification de 2020 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. **(B)** Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (le jeu 1 et le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant d'amplifier des loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (jeu 1) et de 125 à 1025 pb (jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. **(C)** Nombre de transformants levure contenant le génome de *M. pneumoniae* M129 obtenus par CREasPy-cloning en fonction du nombre d'éléments génétiques co-transformés dans la levure. Le nombre de clones positifs est le nombre de clones qui ont été validés après analyse en PCR et en PCR multiplex.

2. 1. 3. Détermination du nombre d'éléments génétiques pouvant être co-transformés en CReasPy-cloning

La stratégie CReasPy-cloning s'étant révélée particulièrement efficace pour cloner et modifier génétiquement le génome de *M. pneumoniae* dans la levure, il a été envisagé de réduire au maximum le nombre d'étapes nécessaires à la réalisation de la méthode. Cela permettrait d'optimiser encore la technique en réduisant sa durée dans le temps.

Pour rappel, jusqu'à présent la levure était transformée une première fois avec les plasmides pCas9 et pgRNA, puis une seconde fois avec le génome bactérien et le pansement de recombinaison approprié. Nous nous sommes alors demandé s'il était possible de co-transformer directement la levure avec ces quatre éléments (Figure 60).

La levure VL6-48N a été co-transformée simultanément avec les plasmides pCas9 et pgRNA, le génome de *M. pneumoniae* M129 et le pansement correspondant. Ce test a été réalisé en ciblant le gène *mpn372*. Sept colonies ont été obtenues, mais aucune n'a été validée en PCR (Figure 60 A et C).

Un second essai a alors été réalisé. Cette fois-ci la levure a été transformée dans un premier temps avec le plasmide pCas9, puis dans un second temps avec le plasmide pgRNA, le génome bactérien et le pansement de recombinaison. Huit colonies ont été obtenues mais aucune n'a pu être validée en PCR (Figure 60 A et C).

Un contrôle avait également été réalisé, en suivant le protocole initial de CReasPy-cloning. Sur les vingt-quatre colonies obtenues sur boîte, dix colonies ont été analysées en PCR, et 9/10 clones ont présenté un profil correct (une bande à 3118 pb) (Figure 60 A et C). Les neufs clones validés en PCR ont également été analysés en PCR multiplex, et 9/9 se sont révélés positifs (Figure 60 B et C).

Ces essais ont permis de conclure qu'il n'est pas possible de co-transformer directement la levure avec tous les éléments nécessaires pour la méthode CReasPy-cloning. Il est nécessaire que la levure contienne déjà les plasmides pCas9 et pgRNA lorsque le génome bactérien et le pansement de recombinaison lui sont fournis.

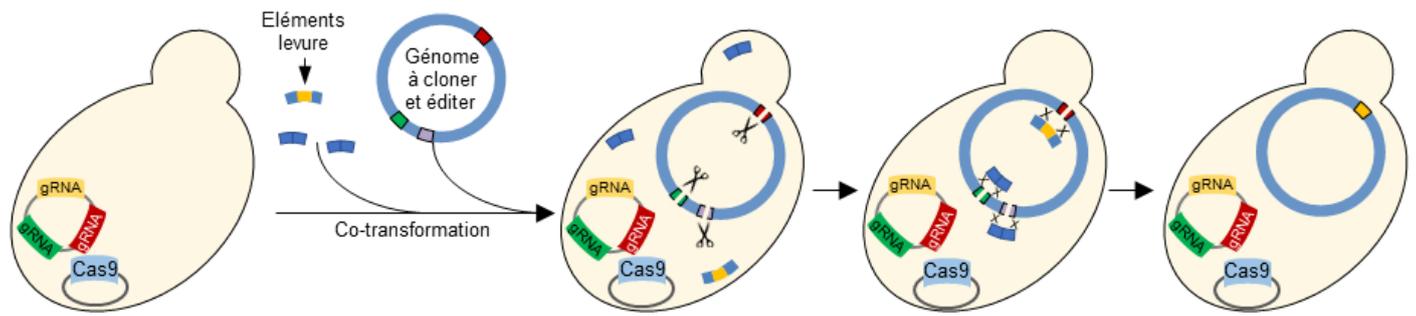


Figure 61. Stratégie CREasPY adaptée pour l'obtention de mutants multi-target. Une levure est préalablement transformée avec deux plasmides, permettant l'expression de la nucléase Cas9 et de plusieurs ARNg. La levure est ensuite transformée simultanément avec le génome cible et trois fragments d'ADN linéaires. Un fragment contient les éléments de levure (centromère, marqueur de sélection) flanqué de deux régions homologues du locus cible. Les deux fragments restants sont composés chacun de deux régions homologues au locus cible concaténées. Lors de l'entrée dans la cellule, le génome hétérologue est clivé au niveau de plusieurs locus par les complexes Cas9 / ARNg, puis réparé par le système de recombinaison homologue de la levure en utilisant les matrices d'ADN linéaires fournies. Le chromosome hétérologue porte ainsi les éléments levure insérés à un locus précis, et est porté par la levure en tant que chromosome artificiel. De plus, les deux autres locus sont édités, selon le choix de l'expérimentateur.

2. 1. 4. Conclusion

Le CReasPy-cloning est une stratégie qui permet de cloner et d'éditer le génome de *M. pneumoniae* M129 dans la levure. Différents mutants de délétion pour un gène ou groupe de gènes cibles ont été obtenus. Nous avons observé qu'il est préférable d'utiliser des pansements de recombinaison sans séquence ARS afin de pouvoir sélectionner facilement de nombreux transformants positifs sans avoir besoin d'analyser beaucoup de clones. Enfin, nous avons également déterminé qu'il est indispensable que cette stratégie soit réalisée en deux temps pour être effective. En effet, la levure doit d'abord être transformée avec les plasmides pCas9 et pgRNA, avant de pouvoir être co-transformée avec le génome de *M. pneumoniae* et le pansement de recombinaison.

A la vue de la facilité et de la rapidité avec laquelle le CReasPy-cloning permis l'obtention de ces mutants « single target », nous nous sommes interrogés sur les limites de ce système en termes de nombre de délétions possibles. Nous avons donc poursuivi notre étude en augmentant le nombre de *loci* ciblés en une seule étape de CReasPy-cloning.

2. 2. Clonage et édition de plusieurs *loci* : CReasPy-cloning multiple target

Nous avons employé le CReasPy-cloning pour supprimer deux ou trois *loci* différents en une seule étape. Nous avons pour objectif de réaliser les combinaisons de délétions suivantes : $\Delta mpn372^*/\Delta mpn142$, $\Delta mpn372^*/\Delta mpn142-143$, $\Delta mpn372^*/\Delta mpn400$, $\Delta mpn372^*/\Delta mpn398-400$, $\Delta mpn142^*/\Delta mpn400$, $\Delta mpn142-143^*/\Delta mpn398-400$, $\Delta mpn372^*/\Delta mpn142/\Delta mpn400$ et $\Delta mpn372^*/\Delta mpn142-143/\Delta mpn398-400$. Pour chaque construction, un *locus* a été remplacé par le pansement de recombinaison CEN6-HIS3 décrit dans la section précédente, encadré par deux régions de 60 pb homologues au *locus* dans le génome bactérien. Ce pansement est noté par le symbole « * » à côté du nom *locus* concerné. Les autres *locus* ont été supprimés en les remplaçant par de petits pansements de recombinaison composés uniquement des régions encadrant les *loci* ciblés sur le génome de *M. pneumoniae* (ne contenant donc pas d'éléments levure).

Le principe de la méthode est le même que celui décrit précédemment pour le CReasPy-cloning single target (Figure 61). Dans un premier temps, la levure *S. cerevisiae* VL6-

48N a été co-transformée avec les plasmides pCas9 et pgRNA multiple target (pgRNA double target ou triple target, plasmides permettant l'expression de deux ou trois ARNg distincts). Puis dans un second temps, cette levure a été co-transformée avec le génome de *M. pneumoniae* M129 et les différents pansements de recombinaisons appropriés, en suivant le protocole de transformation de sphéroplastes de levure au PEG.

2. 2. 1. Optimisation du protocole

Dans l'objectif de maximiser nos chances d'obtenir des mutants multi-targets, nous avons travaillé sur l'optimisation de différents paramètres. Nous avons utilisé différentes Cas9, et nous avons fait varier la taille et la quantité des pansements de recombinaison utilisés.

Concernant la Cas9, nous utilisons jusqu'à présent la Cas9 de *S. pyogenes* dénommée SpCas9 (Jinek *et al.*, 2012). Nous avons décidé d'utiliser deux autres Cas9 décrites dans la littérature comme produisant moins de mutations « off-target », la eSpCas9 (Slaymaker *et al.*, 2016) dont la spécificité a été augmentée via une modification de sa structure (par neutralisation de certaines charges positives), et la SpCas9-HF1 (Kleinstiver *et al.*, 2016) qui est « hautement fidèle » grâce à la rupture de certaines liaisons hydrogène entre la Cas9 et l'ADN ciblé, ce qui a pour conséquence d'altérer le complexe Cas9-ARNg et ainsi de le rendre moins favorable aux mésappariements.

Concernant les pansements de recombinaison, les essais ont concerné les pansements ne contenant pas les éléments levure. Des expériences de délétion en utilisant ce type de pansement ont déjà été reportées dans la littérature (DiCarlo *et al.*, 2013; Tsarmopoulos *et al.*, 2016). Les auteurs avaient utilisé une quantité de 50 µg d'un pansement de 90 pb (présentant donc 45 pb d'homologie avec chaque séquence encadrant le gène cible à supprimer). Nous nous sommes demandé si le fait d'augmenter la longueur des régions d'homologie des pansements de recombinaison pouvait améliorer l'efficacité de la méthode. Nous avons donc testé des pansements de tailles différentes : 90 pb et 1 kpb. Nous avons également pensé que la quantité d'ADN transformé (50 µg) était trop importante. Nous avons donc testé des quantités différentes de pansement : 50 µg, 20 µg, 10 µg, 1 µg et 0.5 µg pour

Table 6. Nombre de transformants levure contenant le génome de *M. pneumoniae* M129 délété pour les gènes *mpn372* et *mpn142*, obtenus par CReasPy-cloning. Comparaison de l'efficacité de la méthode CReasPy-cloning multiple target en fonction de la Cas9 utilisée, et de la taille et de la quantité du pansement de recombinaison ne contenant pas les éléments levure. Le numéro des clones correspondants à chaque condition est donné afin de pouvoir les identifier sur la figure illustrant les analyses en PCR et PCR multiplex de ces mêmes clones (Figures 62, 63 et 64). Les conditions pour lesquelles des clones positifs ont été validés sont écrites en gras. Les conditions écrites en bleu correspondent à celles conservées pour la suite des analyses.

Cas9	Pansement pour la cible $\Delta mpn142$		Nombre de clones positifs / Nombre de clones analysés			Numéro des clones correspondants
	Taille	Quantité (μ g)	PCR sur la cible $\Delta mpn372$	PCR sur la cible $\Delta mpn142$	PCR multiplex	
SpCas9	90 pb	50	1/10	0/10	0/10	3
		20	2/10	0/10	0/10	4
		10	6/10	0/10	0/10	5
		1	8/10	0/10	0/10	6
		0,5	5/10	0/10	0/10	7
	1 kpb	5	3/10	1/10	1/10	9
		1	10/10	5/10	5/10	10
		0,5	7/10	1/10	1/10	11
eSpCas9	90 pb	50	0/9	0/10	0/10	14
		20	1/9	0/10	0/10	15
		10	7/10	2/10	2/10	16
		1	10/10	0/10	0/10	17
		0,5	3/10	1/10	1/10	18
	1 kpb	5	0/10	0/10	0/10	20
		1	5/10	1/10	1/10	21
		0,5	7/10	3/10	3/10	22
SpCas9-HF1	90 pb	50	0/10	0/10	0/10	25
		20	0/10	0/10	0/10	26
		10	1/5	0/10	0/10	27
		1	7/10	0/10	0/10	28
		0,5	2/9	0/10	0/10	29
	1 kpb	5	1/10	1/10	1/10	31
		1	2/10	1/10	1/10	32
		0,5	9/10	2/10	1/10	33

le pansement de 90 pb, et 5 µg, 1 µg et 0.5 µg pour pansement de 1 kpb.

Au cours de notre premier essai de CReasPy-cloning double target, pour de l'obtention du mutant $\Delta mpn372^*/\Delta mpn142$, nous avons testé les différentes combinaisons des paramètres cités ci-dessus (**Table 6**). Des colonies ont été obtenues pour chaque transformation, et dix colonies ont été isolées pour chaque condition quand cela fût possible. En effet, pour certaines expériences, moins de dix colonies ont été obtenues, et ont toutes été analysées. Comme décrit dans les sections précédentes, les clones ont été d'abord analysés par PCR en utilisant des amorces spécifiques du génome de *M. pneumoniae*, et situées de part et d'autre de chaque *locus* à éditer afin de confirmer la présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure, mais aussi de confirmer le remplacement de chaque gène ciblé par le pansement de recombinaison correspondant. Pour la mutation $\Delta mpn372^*$, le profil attendu est composé d'une bande à 3118 pb, et celui du contrôle positif (ADN génomique de *M. pneumoniae* M129) présente une bande à 2020 pb (Figure 62). Les clones validés pour la délétion du gène *mpn372* ont ensuite été analysés par PCR pour la délétion du gène *mpn142* (Figure 63). En ce qui concerne cette seconde mutation, pour le pansement de 90 pb, nous attendions une bande à 307 pb et pour le pansement de 1 kpb une bande à 286 pb. Le profil du contrôle positif est composé d'une bande à 3919 pb.

Si nous regardons uniquement le paramètre du choix de la Cas9, pour la mutation $\Delta mpn372^*$ nous avons validé 42/80, 33/78 et 22/74 clones positifs, et pour la mutation $\Delta mpn142$, 7/42, 7/33 et 4/22 clones positifs, pour la SpCas9, eSpCas9 et SpCas9-HF1, respectivement. Les clones validés à l'issue de ces deux PCR ont ensuite été analysés en PCR multiplex, comme décrit dans les sections précédentes (Figure 64). Au total, 7/7, 7/7 et 3/4 clones positifs ont été identifiés pour la SpCas9, eSpCas9 et SpCas9-HF1, respectivement.

Si nous prenons en compte maintenant seulement le paramètre de la longueur des pansements de recombinaison, pour la mutation $\Delta mpn372^*$, 53/142 et 44/90 clones ont été validés pour les pansements de 90 pb et 1 kpb, respectivement. En ce qui concerne la mutation $\Delta mpn142$, 3/53 et 15/44 clones ont été validés pour les pansements de 90 pb et 1 kpb, respectivement. En PCR multiplex, 3/3 et 14/15 clones positifs ont été identifiés pour les pansements de 90 pb et 1 kpb, respectivement.

Enfin, si nous regardons les quantités de pansements utilisés pour le pansement de 90 pb, des clones ont été validés à l'issue des différentes analyses PCR uniquement pour les quan-

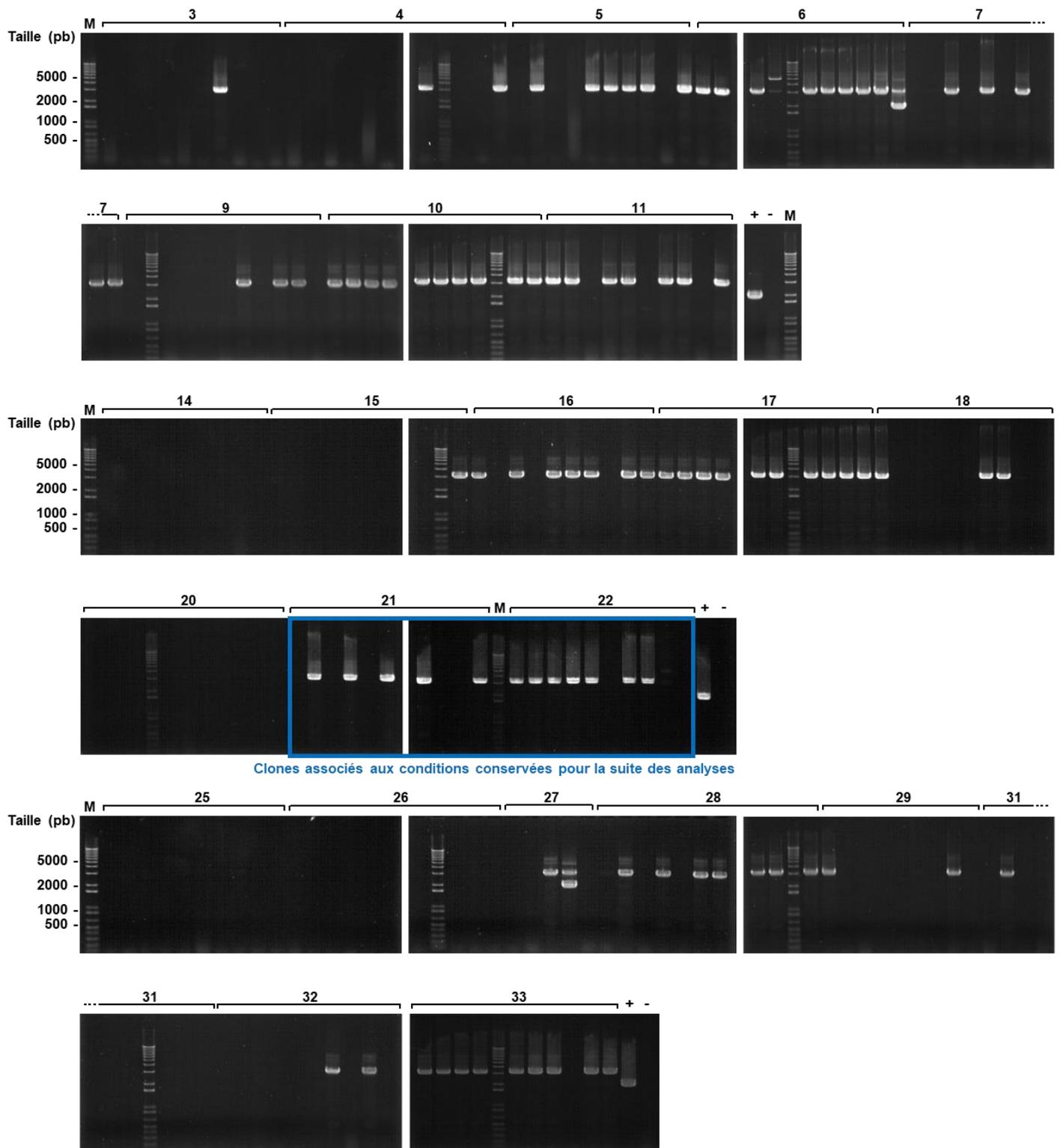


Figure 62. Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn372$ sur les génomes de *M. pneumoniae* M129 délétés pour les gènes *mpn372* et *mpn142*, obtenus par CReasPy-cloning. Comparaison de l'efficacité de la méthode CReasPy-cloning multiple target en fonction de la Cas9 utilisée, et de la taille et de la quantité du pansement de recombinaison ne contenant pas les éléments levure. La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible a été vérifié par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 3118 pb. Une amplification de 2020 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. La correspondance entre les numéros de clones et les paramètres associés sont renseignés dans la Table 6.

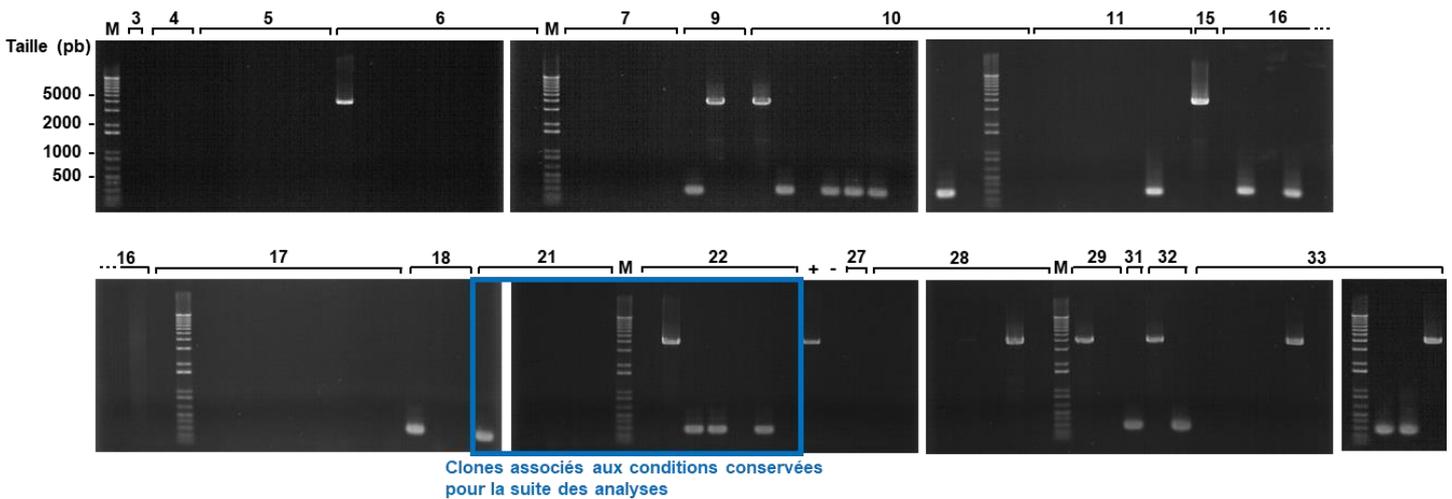


Figure 63. Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn142$ sur les génomes de *M. pneumoniae* M129 délétés pour les gènes *mpn372* et *mpn142*, obtenus par CREasPy-cloning. Comparaison de l'efficacité de la méthode CREasPy-cloning multiple target en fonction de la Cas9 utilisée, et de la taille et de la quantité du pansement de recombinaison ne contenant pas les éléments levure. La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible a été vérifié par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 307 pb avec le pansement de 90 pb, et de 286 pb avec le pansement de 1 kpb. Une amplification de 3919 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. La correspondance entre les numéros de clones et les paramètres associés sont renseignés dans la Table 6.

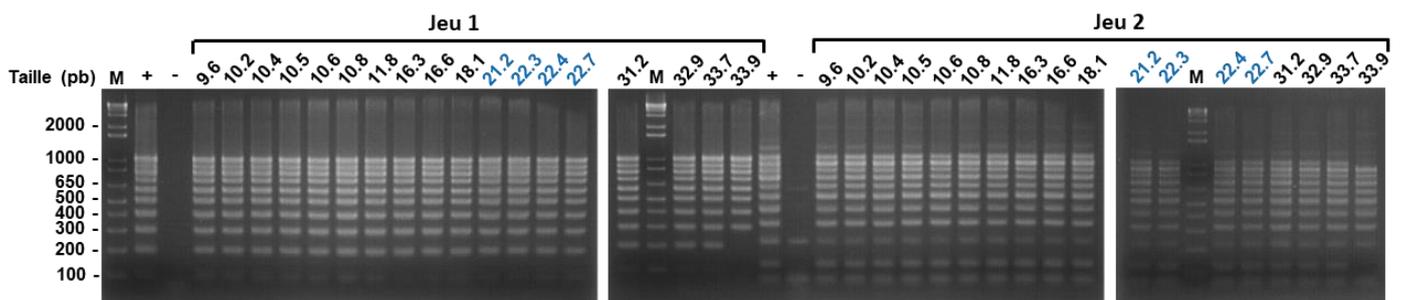


Figure 64. Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes de *M. pneumoniae* M129 délétés pour les gènes *mpn372* et *mpn142*, obtenus par CREasPy-cloning. Comparaison de l'efficacité de la méthode CREasPy-cloning multiple target en fonction de la Cas9 utilisée, et de la taille et de la quantité du pansement de recombinaison ne contenant pas les éléments levure. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (le jeu 1 et le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant d'amplifier des loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (jeu 1) et de 125 à 1025 pb (jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. La correspondance entre les numéros de clones et les paramètres associés sont renseignés dans la Table 6. Quatre clones sont numérotés en bleu, il s'agit des clones associés aux conditions conservées pour la suite des analyses.

Table 7. Nombre de transformants levure contenant le génome de *M. pneumoniae* M129 délété pour les gènes *mpn372* et *mpn400*, obtenus par CReasPy-cloning. Comparaison de l'efficacité de la méthode CReasPy-cloning multiple target en fonction de la Cas9 utilisée, et de la taille et de la quantité du pansement de recombinaison ne contenant pas les éléments levure. Le numéro des clones correspondants à chaque condition est donné afin de pouvoir les identifier sur la figure illustrant les analyses en PCR et PCR multiplex de ces mêmes clones (Figure 65). Les conditions pour lesquelles des clones positifs ont été validés sont écrites en gras. La condition écrite en bleu correspond à celle conservée pour la suite des analyses.

Cas9	Pansement pour la cible <i>Δmpn400</i>		Nombre de clones positifs / Nombre de clones analysés			Numéro des clones correspondants
	Taille	Quantité (μg)	PCR sur la cible <i>Δmpn372</i>	PCR sur la cible <i>Δmpn400</i>	PCR multiplex	
SpCas9	90 pb	10	0/8	0/8	0/8	3
		1	0/10	0/10	0/10	4
	1 kpb	1	3/10	3/10	1/10	6
		0,5	7/10	6/10	4/10	7
eSpCas9	90 pb	10	0/8	0/8	0/8	16
		1	0/8	0/8	0/8	17
	1 kpb	1	2/9	1/9	0/9	19
		0,5	5/10	5/10	3/10	20

Table 8. Nombre de transformants levure contenant le génome de *M. pneumoniae* M129 délété pour les gènes *mpn372* et *mpn398-400*, obtenus par CReasPy-cloning. Comparaison de l'efficacité de la méthode CReasPy-cloning multiple target en fonction de la Cas9 utilisée, et de la taille et de la quantité du pansement de recombinaison ne contenant pas les éléments levure. Le numéro des clones correspondants à chaque condition est donné afin de pouvoir les identifier sur la figure illustrant les analyses en PCR et PCR multiplex de ces mêmes clones (Figure 66). Les conditions pour lesquelles des clones positifs ont été validés sont écrites en gras. La condition écrite en bleu correspond à celle conservée pour la suite des analyses.

Cas9	Pansement pour la cible <i>Δmpn398-400</i>		Nombre de clones positifs / Nombre de clones analysés			Numéro des clones correspondants
	Taille	Quantité (μg)	PCR sur la cible <i>Δmpn372</i>	PCR sur la cible <i>Δmpn398-400</i>	PCR multiplex	
SpCas9	90 pb	10	0/9	0/9	0/9	9
		1	0/10	0/10	0/10	10
	1 kpb	1	4/10	3/10	2/10	12
		0,5	5/10	4/10	1/10	13
eSpCas9	90 pb	10	0/10	0/10	0/10	22
		1	0/9	0/9	0/9	23
	1 kpb	1	6/10	6/10	5/10	25
		0,5	7/10	6/10	3/10	26

-tités 10 µg et 0,5 µg. Concernant le pansement de 1 kpb, des clones ont été validés pour chacune des quantités testées. Au total, pour la mutation $\Delta mpn372^*$ 4/30, 17/30 et 23/30 clones ont été validés, et pour la mutation $\Delta mpn142$, 2/4, 7/17 et 6/23 clones pour les quantités 5 µg, 1µg et 0,5 µg, respectivement. En PCR multiplex, 2/2, 7/7 et 5/6 clones positifs ont été identifiés pour les quantités 5 µg, 1µg et 0,5 µg, respectivement.

Les résultats de ce premier test nous ont conduits à éliminer la SpCas9-HF1 de nos essais, qui visiblement n'a pas eu d'effet positif sur le nombre de transformants positifs obtenus. Nous avons également décidé de poursuivre nos essais avec les deux tailles de pansements (90 pb et 1 kbp), car il fût difficile de conclure s'il était préférable d'utiliser l'un ou l'autre à cette étape. Concernant les quantités de ces pansements de recombinaison, nous avons choisi de continuer avec 10 µg et 1 µg pour le pansement de 90 pb, et 1 µg et 0.5 µg pour le pansement de 1 kpb.

L'essai suivant a porté sur l'obtention des mutants $\Delta mpn372^*/\Delta mpn400$ et $\Delta mpn372^*/\Delta mpn398-400$ (**Tables 7 et 8**). Des colonies ont été obtenues pour chaque transformation, et dix colonies ont été isolées pour chaque condition quand cela fût possible. Comme décrit précédemment, les clones ont été d'abord analysés en PCR afin de valider la délétion de chaque *locus* cible. Les clones validés pour la délétion du gène *mpn372* (analyse PCR décrite dans le paragraphe précédent) (Figures 65 A et 66 A) ont ensuite été analysé en PCR pour la délétion du gène *mpn400* (Figure 65 B) ou de l'opéron *mpn398-400* (Figure 66B). En ce qui concerne la mutation $\Delta mpn400$, pour le pansement de 90 pb nous attendions une bande à 1679 pb et pour le pansement de 1 kpb une bande à 1588 pb. Le profil du contrôle positif est composé d'une bande à 3480 pb. Pour la mutation $\Delta mpn398-400$, avec le pansement de 90 pb nous attendions une bande à 672 pb et pour le pansement de 1 kpb une bande à 610 pb. Le profil du contrôle positif étant composé d'une bande à 4048 pb. Le couple d'amorces utilisé sur les mutations $\Delta mpn400$ et $\Delta mpn398-400$ est différent, ce qui explique le fait qu'un contrôle positif ai été réalisé pour chaque mutation. Les clones validés à l'issu de ces deux PCR ont ensuite été analysés en PCR multiplex (Figures 65 C et 66C). Pour plus de clarté dans l'explication des résultats, et la procédure de validation des clones ayant été expliquée en détail dans le paragraphe précédent, nous ne parlerons dans ce paragraphe que du nombre de clones validés en PCR multiplex.

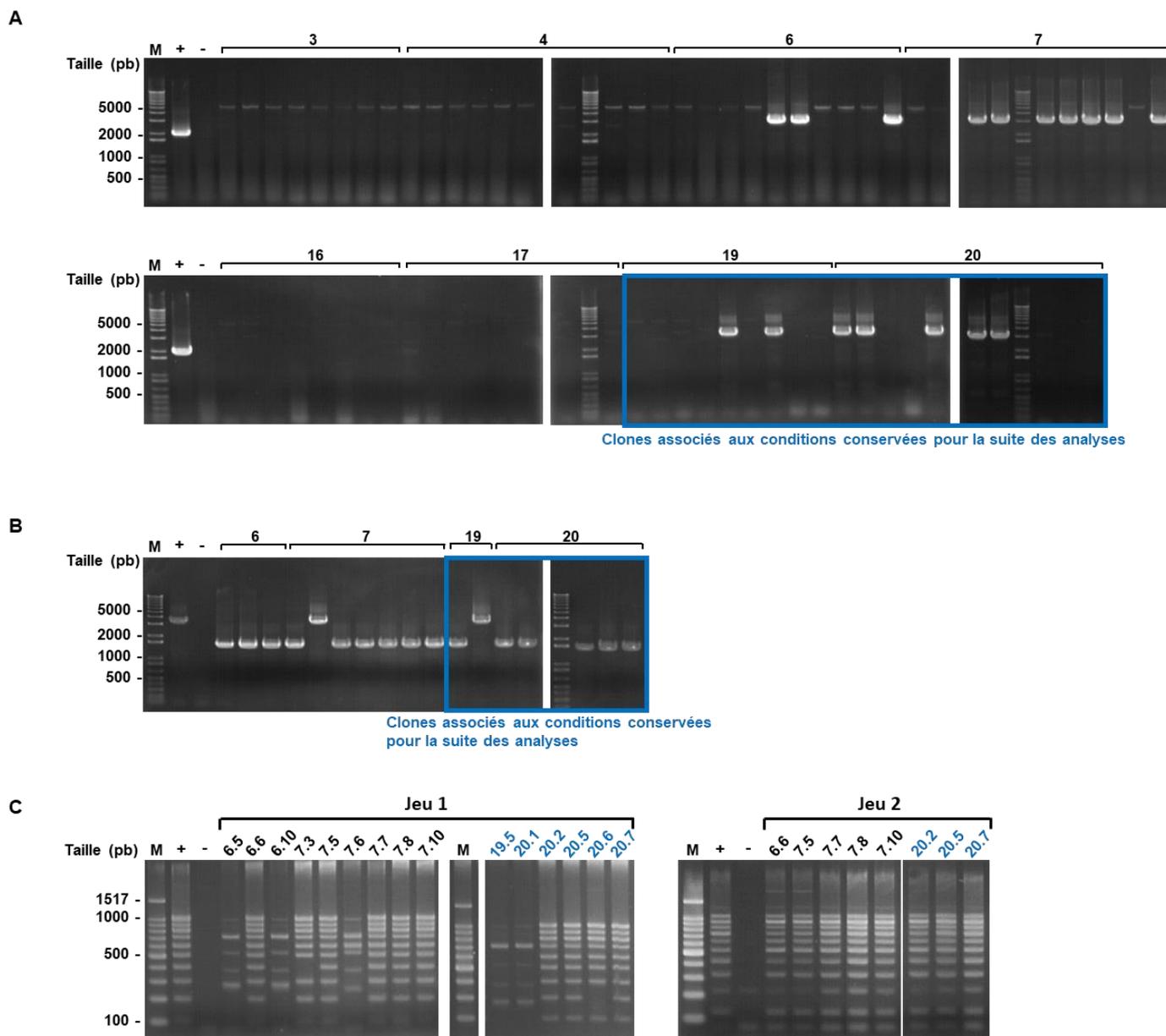


Figure 65. Analyse des génomes de *M. pneumoniae* M129 délétés pour les gènes *mpn372* et *mpn400*, obtenus par CREasPy-cloning. Comparaison de l'efficacité de la méthode CREasPy-cloning multiple target en fonction de la Cas9 utilisée, et de la taille et de la quantité du pansement de recombinaison ne contenant pas les éléments levure. La correspondance entre les numéros de clones et les paramètres associés sont renseignés dans la Table 7. **(A)** Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn372$. La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible a été vérifié par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 3118 pb. Une amplification de 2020 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. **(B)** Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn400$. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 1679 pb avec le pansement de 90 pb, et de 1588 pb avec le pansement de 1 kpb. Une amplification de 3480 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. **(C)** Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (le jeu 1 et le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant l'amplification de loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (jeu 1) et de 125 à 1025 pb (jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN.

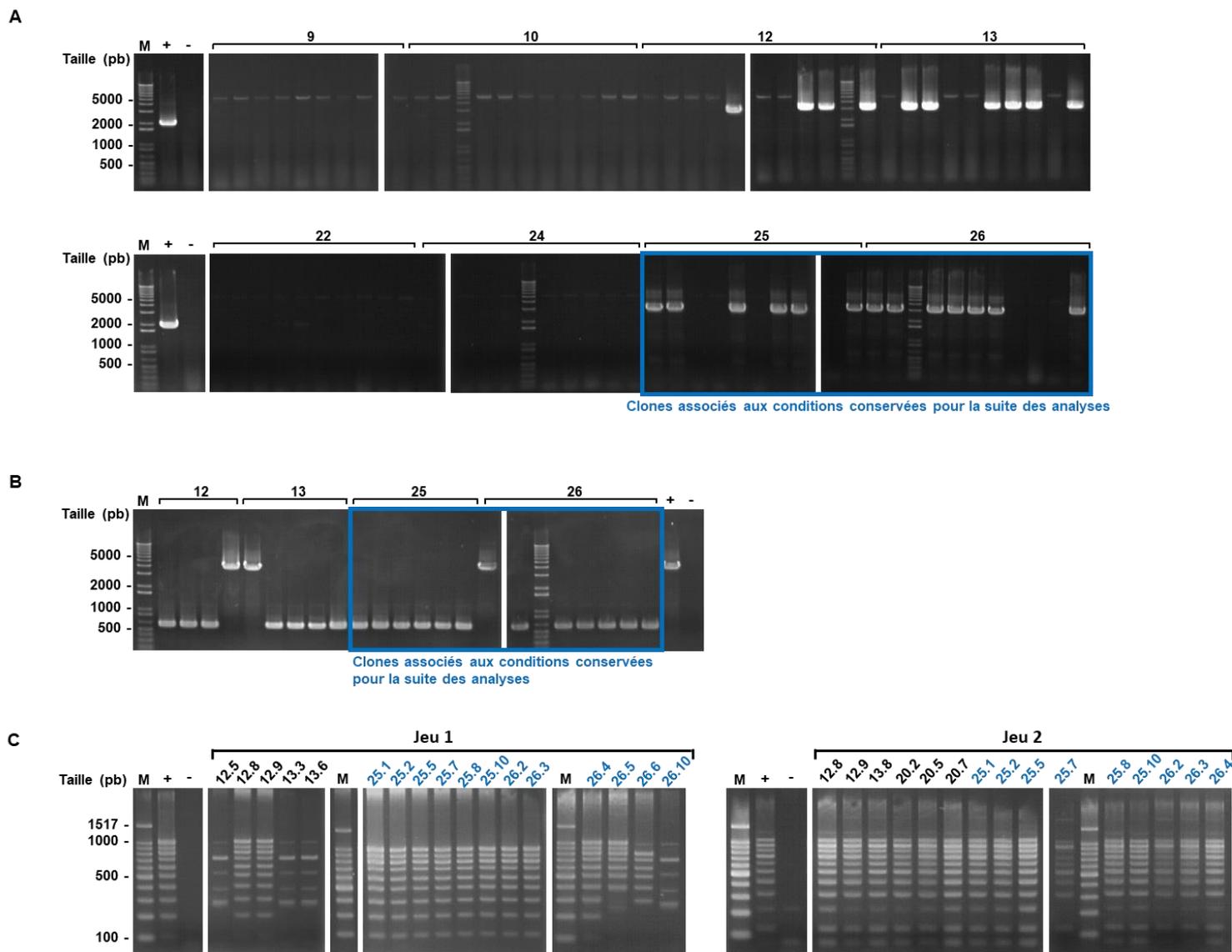


Figure 66. Analyse des génomes de *M. pneumoniae* M129 délétés pour les gènes *mpn372* et *mpn398-400*, obtenus par CREasPy-cloning. Comparaison de l'efficacité de la méthode CREasPy-cloning multiple target en fonction de la Cas9 utilisée, et de la taille et de la quantité du pansement de recombinaison ne contenant pas les éléments levure. La correspondance entre les numéros de clones et les paramètres associés sont renseignés dans la Table 8. **(A)** Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn372$. La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible a été vérifié par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 3118 pb. Une amplification de 2020 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. **(B)** Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn398-400$. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 672 pb avec le pansement de 90 pb, et de 610 pb avec le pansement de 1 kpb. Une amplification de 4048 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. **(C)** Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (le jeu 1 et le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant d'amplifier des loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (jeu 1) et de 125 à 1025 pb (jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. Des clones sont numérotés en bleu, il s'agit des clones associés aux conditions conservées pour la suite des analyses.

Concernant le choix de la Cas9, nous avons validé cinq clones pour le mutant $\Delta mpn372^*/\Delta mpn400$ et trois clones pour le mutant $\Delta mpn372^*/\Delta mpn398-400$ avec la SpCas9, et trois clones pour le mutant $\Delta mpn372^*/\Delta mpn400$ et huit clones pour le mutant $\Delta mpn372^*/\Delta mpn398-400$ avec la eSpCas9.

Si nous regardons uniquement la taille des pansements de recombinaison, aucun clone n'a été obtenu avec le pansement de 90 pb, alors que des clones ont été validés avec le pansement de 1 kpb.

Enfin, en ce qui concerne la quantité de pansement de 1 kpb utilisé, nous avons validé un clone pour le mutant $\Delta mpn372^*/\Delta mpn400$ et sept clones pour le mutant $\Delta mpn372^*/\Delta mpn398-400$ avec une quantité de 1 μ g, et sept clones pour le mutant $\Delta mpn372^*/\Delta mpn400$ et quatre clones pour le mutant $\Delta mpn372^*/\Delta mpn398-400$ avec une quantité de 0,5 μ g.

Encore une fois, il est difficile de déterminer quelle Cas9 semble être la plus appropriée au CReasPy-cloning multiple target. Ayant quand même obtenus quelques clones de plus avec la eSpCas9 (Slaymaker *et al.*, 2016), nous avons décidé de poursuivre nos expériences de clonage avec cette dernière. En revanche, ces résultats nous ont permis de déterminer clairement qu'il est préférable d'utiliser 0,5 μ g ou 1 μ g de pansement de recombinaison de 1 kpb. Ce sont ces paramètres, que nous avons définis comme étant optimaux lors de ces deux essais, qui ont été utilisés pour la suite des expériences de CReasPy-cloning multiple target.

Table 9. Nombre de transformants levure contenant le génome de *M. pneumoniae* M129, obtenus par CREasPy-cloning multiple target. NA, non applicable.

Locus cible	Nombre de clones positifs / Nombre de clones analysés				
	PCR sur la cible 1	PCR sur la cible 2	PCR sur la cible 3	PCR multiplex	PFGE
<i>mpn372*/mpn142</i>	12/20	4/12	NA	4/4	3/4
<i>mpn372*/mpn142-143</i>	9/13	1/9	NA	1/1	1/1
<i>mpn372*/mpn400</i>	7/19	6/7	NA	3/6	3/3
<i>mpn372*/mpn398-400</i>	13/20	12/13	NA	8/12	4/4
<i>mpn142*/mpn400</i>	47/51	22/47	NA	20/22	4/4
<i>mpn142-143*/mpn398-400</i>	26/28	4/26	NA	4/4	2/4
<i>mpn372*/mpn142/mpn400</i>	14/20	4/14	3/4	3/3	3/3
<i>mpn372*/mpn142-143/mpn398-400</i>	6/19	2/6	2/2	1/2	1/1

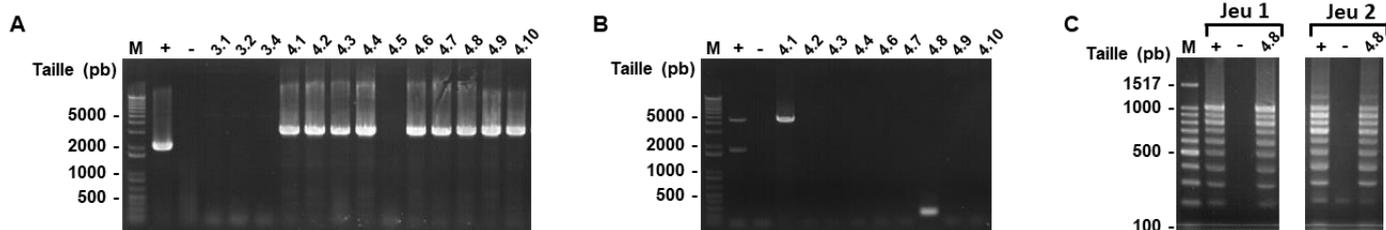


Figure 67. Analyse des génomes de *M. pneumoniae* M129 déléétés pour les gènes *mpn372* et *mpn142-143*, obtenus par CREasPy-cloning. (A) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn372$. La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible a été vérifié par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 3118 pb. Une amplification de 2020 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (B) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn142-143$. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 228 pb. Une amplification de 4598 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (C) Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (le jeu 1 et le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant d'amplifier des loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (jeu 1) et de 125 à 1025 pb (jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN.

2. 2. 2. Obtention des mutants « double target » et « triple target »

Nous avons réalisé différentes expériences de CReasPy-cloning, en utilisant le protocole optimisé décrit ci-dessus, dans le but d'obtenir les mutants $\Delta mpn372^*/\Delta mpn142$, $\Delta mpn372^*/\Delta mpn142-143$, $\Delta mpn372^*/\Delta mpn400$, $\Delta mpn372^*/\Delta mpn398-400$, $\Delta mpn142^*/\Delta mpn400$, $\Delta mpn142-143^*/\Delta mpn398-400$, $\Delta mpn372^*/\Delta mpn142/\Delta mpn400$ et $\Delta mpn372^*/\Delta mpn142-143/\Delta mpn398-400$.

Des colonies ont été obtenues pour chaque transformation, et un nombre variable de colonies ont été isolés selon les transformations (Table 9). Comme décrit précédemment, les clones ont été d'abord analysés en PCR afin de valider la délétion de chaque *locus* cible. Les profils attendus pour chaque PCR sont détaillés dans les figures illustrant les résultats des analyses PCR pour chaque construction réalisée (Figures 67-72). Les clones validés à l'issue des premières PCR ont ensuite été analysés en PCR multiplex puis en PFGE, afin de vérifier l'intégrité des génomes clonés.

Nous pouvons noter qu'à la vue du nombre de clones analysés pour chaque transformation, nous avons globalement obtenus moins de transformants positifs que lors des expériences de CReasPy-cloning single target. L'efficacité de la méthode diminue donc avec le nombre de *loci* ciblés. Nous avons également observé qu'aucune amplification par PCR n'est visible pour la majorité des clones négatifs, alors que ces derniers auraient dû présenter une amplification correspondant au *locus* sauvage. Ceci suggère une absence du *locus* cible dans le chromosome édité de ces clones négatifs, et potentiellement de larges remaniements chromosomiques.

Afin de vérifier si notre protocole de CReasPy-cloning a des effets mutagènes, le séquençage du génome a été effectué sur l'un des génomes clonés et édités avec notre méthode. Nous avons sélectionné le clone levure $\Delta mpn372^*\Delta mpn142-143$ (clone 4.8) issu de l'expérience de double target. L'ADN génomique total a été extrait et séquencé à l'aide des technologies de séquençage « short-reads » (Illumina) et de séquençage « long-reads » (Oxford Nanopore). Le génome de *M. pneumoniae* M129 qui a été utilisé comme base pour ces expériences de clonage CReasPy a été re-séquencé en utilisant la technologie Illumina, à titre de contrôle. L'assemblage *de novo* du génome du clone 4.8 a été réalisé à l'aide des « long-reads » et « short-reads », permettant de produire un seul contig. L'alignement global de l'assemblage du clone 4.8 sur la séquence attendue du génome édité a confirmé qu'il n'y a

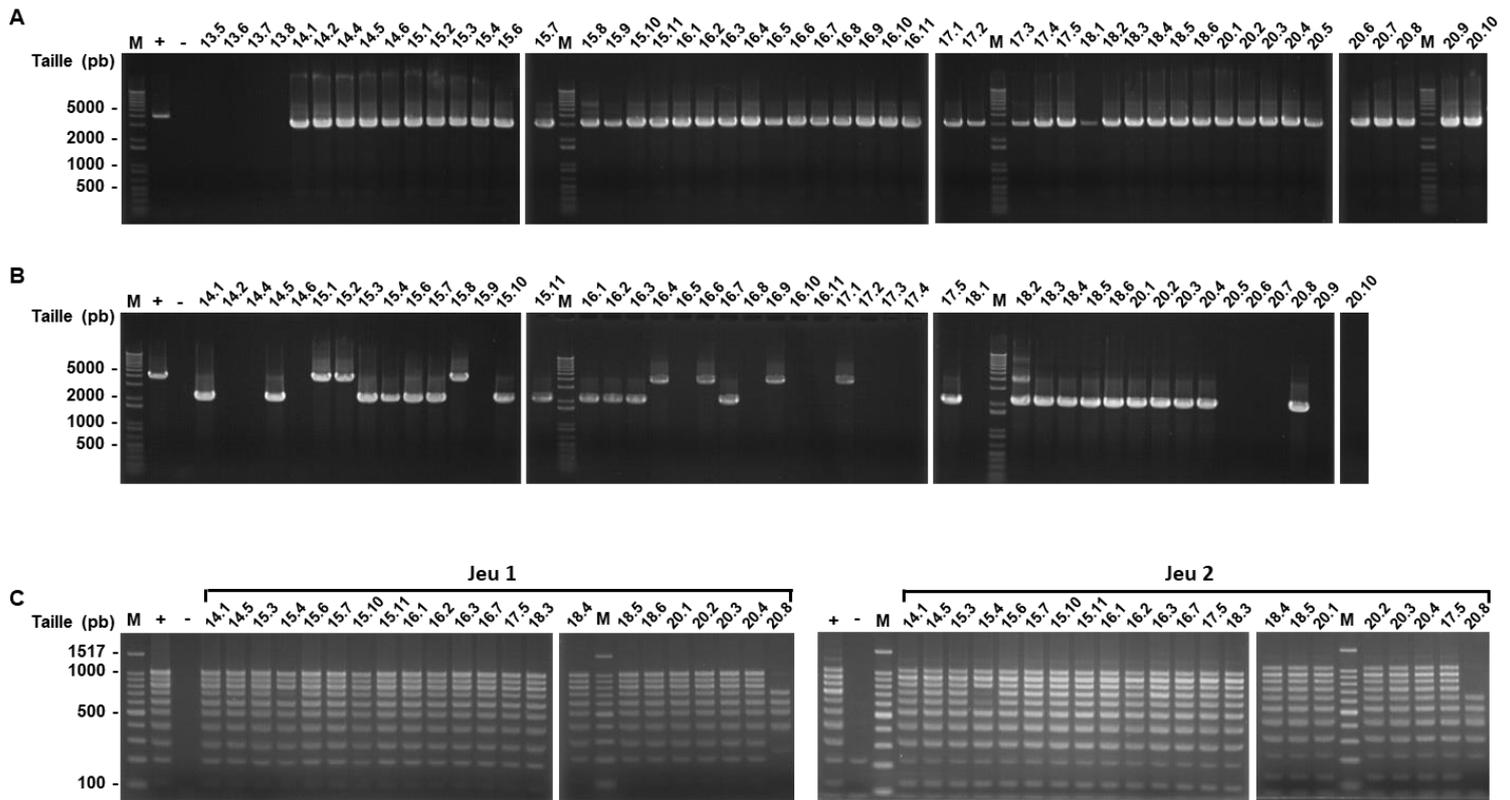


Figure 68. Analyse des génomes de *M. pneumoniae* M129 délétés pour les gènes *mpn142* et *mpn400*, obtenus par CREasPy-cloning. (A) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn142$. La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible a été vérifié par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 2979 pb. Une amplification de 3919 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (B) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn400$. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 2156 pb. Une amplification de 4048 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (C) Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (le jeu 1 et le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant l'amplification de loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (jeu 1) et de 125 à 1025 pb (jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN.

pas eu de délétion importante ni de remaniement chromosomique. Afin d'identifier les SNPs ou les INDELS présents dans ce génome, les « short-reads » Illumina du clone 4.8 et du témoin *M. pneumoniae* M129 ont été alignés sur la séquence du génome publiée de la souche M129 de *M. pneumoniae* (Genbank ID NC_000912.1). Le clone contrôle de *M. pneumoniae* M129 utilisé dans notre étude présente 105 SNP et 19 INDELSs par rapport au génome publié. Ces mutations ont également été identifiées dans le génome du clone 4.8, suggérant qu'elles se sont produites avant le processus de clonage CReasPy. Deux mutations supplémentaires ont été trouvées uniquement dans le clone 4.8. La première est une transversion AAG en AAU à la position 182216 du génome, conduisant à un changement d'acide aminé K en N dans la protéine *mpn141* (adhésine P1). La seconde est une insertion de ATGTTTG à la position 452508 du génome, dans une région supposée coder l'ARNc *mpnnc041*. La faible ampleur des mutations observées dans le clone 4.8 suggère que la méthode de clonage CReasPy n'a pas d'effet mutagène important. De plus, sont toujours attendus des SNPs résultant d'une dérive génétique naturelle lors du passage des cellules de mycoplasmes ou de levures au laboratoire.

2. 2. 3. Conclusion

Le CReasPy-cloning est une stratégie qui permet de réaliser simultanément plusieurs modifications génétiques dans le génome de *M. pneumoniae*. En effet, nous avons été capables d'éditer plusieurs gènes ou groupes de gènes en même temps. De plus, le CReasPy-cloning nous a également permis de diversifier le type de modifications apportées au génome bactérien cloné. Ainsi, nous avons réalisé un « remplacement », en échangeant le gène cible par la cassette contenant les éléments levure, mais nous avons aussi réalisé la délétion propre de plusieurs *loci*. Dans ce dernier cas, nous avons réussi à supprimer les gènes ciblés sans utiliser de marqueur de sélection. L'efficacité de la méthode s'est montrée plus faible lorsque nous avons édité plusieurs *loci* cibles, qu'en supprimant un seul *locus*, mais le nombre de clones à analyser pour identifier des clones positifs reste faible.

A la vue de ces résultats, nous avons voulu continuer à tester les limites de notre technique de clonage, notamment en développant un protocole de CReasPy-cloning dans lequel l'étape de digestion du chromosome bactérien se ferait *in vitro*.

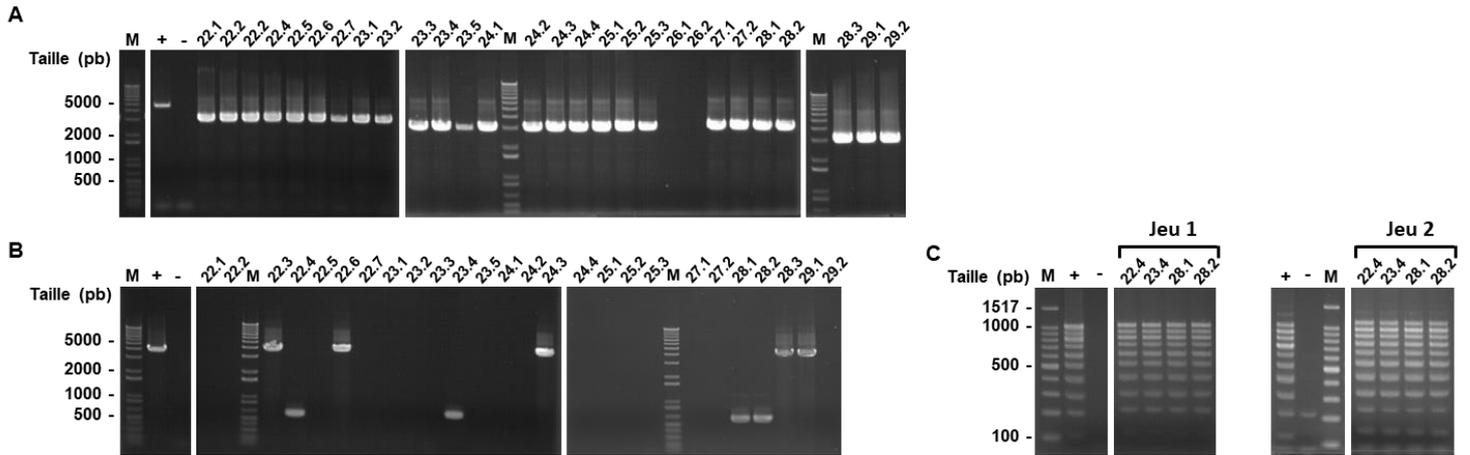


Figure 69. Analyse des génomes de *M. pneumoniae* M129 délétés pour les gènes *mpn142-143* et *mpn398-400*, obtenus par CREasPy-cloning. (A) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn142-143$. La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible a été vérifié par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 2935 pb. Une amplification de 4598 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (B) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn398-400$. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 610 pb. Une amplification de 4048 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (C) Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (le jeu 1 et le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant l'amplification de loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (jeu 1) et de 125 à 1025 pb (jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN.

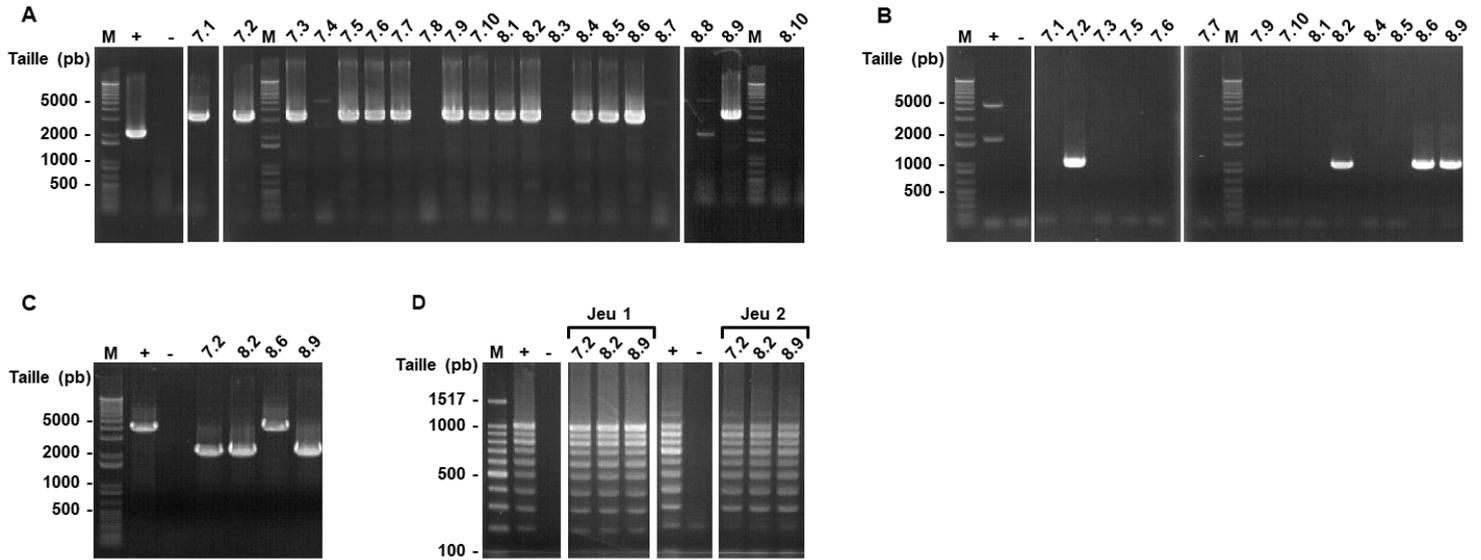


Figure 70. Analyse des génomes de *M. pneumoniae* M129 délétés pour les gènes *mpn372*, *mpn142* et *mpn400*, obtenus par CREasPy-cloning. (A) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn372$. La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible a été vérifié par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 3118 pb. Une amplification de 2020 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (B) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn142$. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 965 pb. Une amplification de 4598 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (C) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn400$. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 2156 pb. Une amplification de 4048 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (D) Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (le jeu 1 et le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant l'amplification de loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (jeu 1) et de 125 à 1025 pb (jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN.

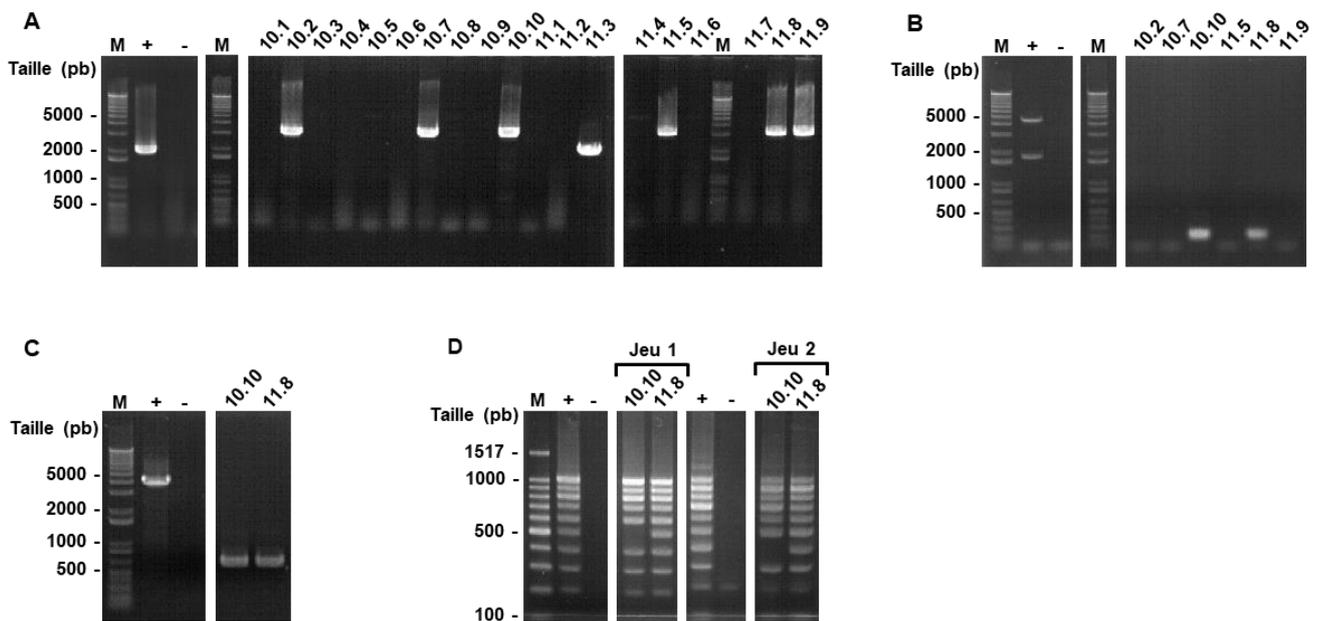


Figure 71. Analyse des génomes de *M. pneumoniae* M129 délétés pour les gènes *mpn372*, *mpn142-143* et *mpn398-400*, obtenus par CREasPy-cloning. (A) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn372$. La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible a été vérifié par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 3118 pb. Une amplification de 2020 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (B) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn142-143$. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 228 pb. Une amplification de 4598 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (C) Vérification par PCR de la délétion $\Delta mpn398-400$. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 610 pb. Une amplification de 4048 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (D) Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (le jeu 1 et le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant l'amplification de loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (jeu 1) et de 125 à 1025 pb (jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN.

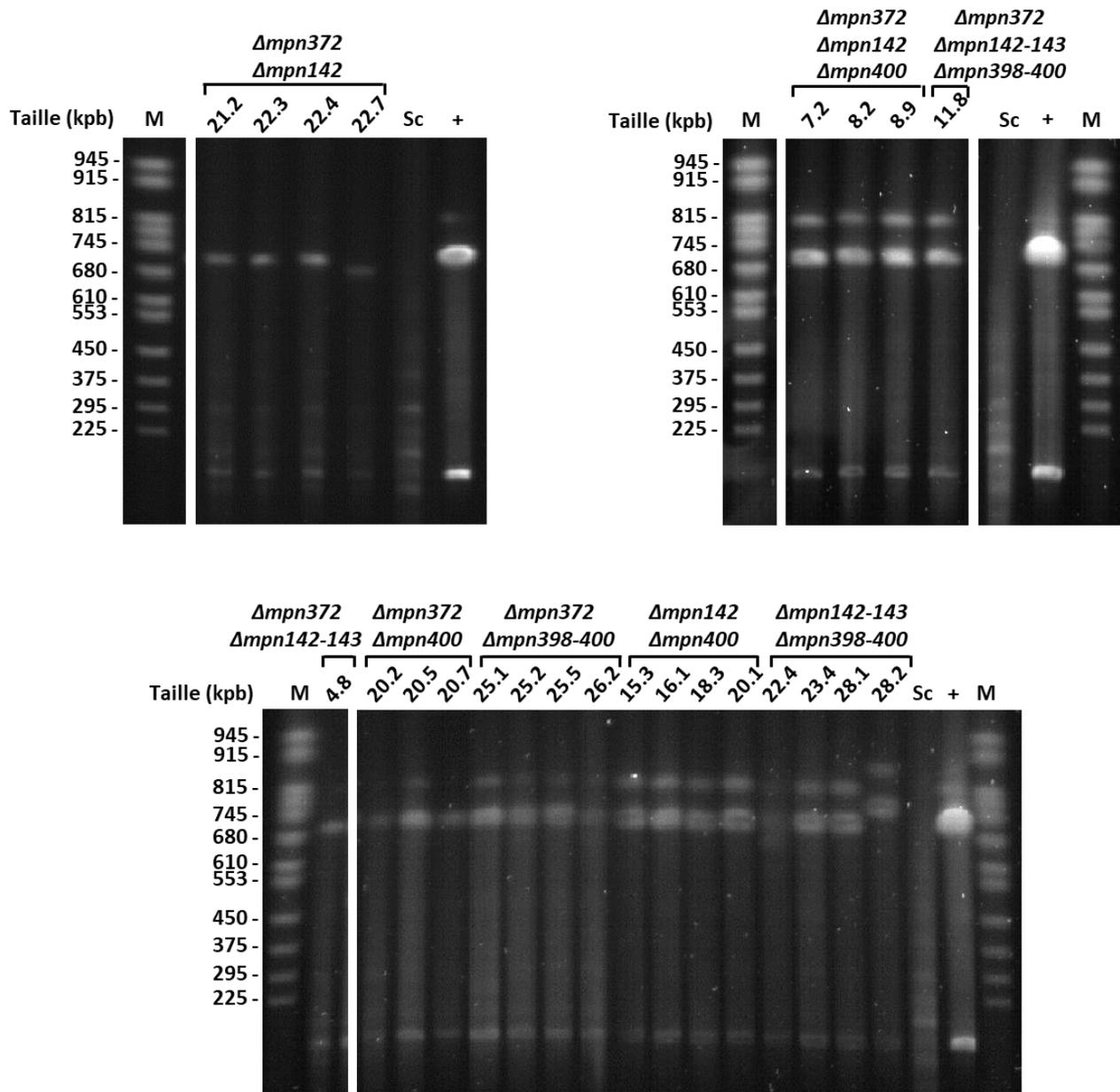


Figure 72. Vérification par PFGE de la taille des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure avec la stratégie CREasPy-cloning. Les génomes bactériens ont été digérés avec l'enzyme de restriction NotI. Le profil attendu est composé de deux fragments de 711 kpb et 105 kpb. M, marqueur de taille « Yeast Chromosome PFG Marker » (NEB) ; Sc, *S. cerevisiae* VL6-48N ; +, *M. pneumoniae* M129.

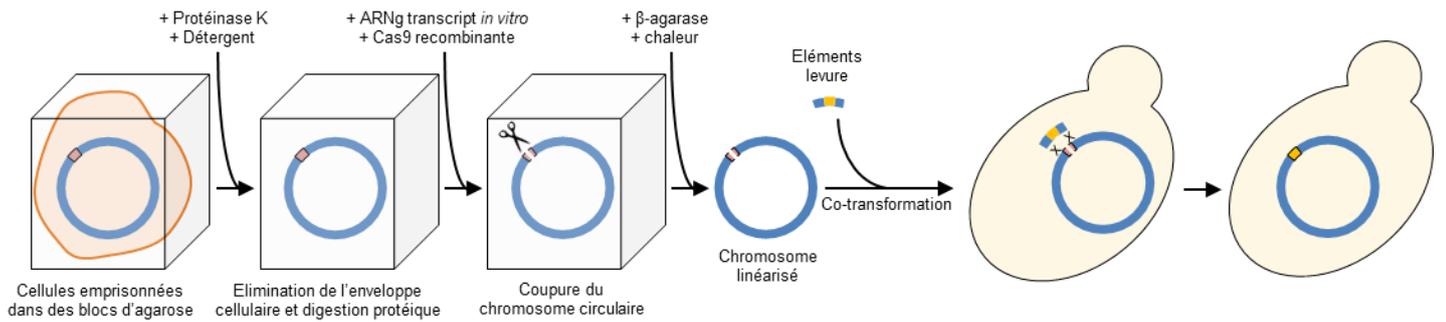


Figure 73. Schéma illustrant le protocole de CREasPy-cloning *in vitro*. Au départ, les cellules sont emprisonnées dans des blocs d'agarose. Elles sont digérées afin d'obtenir un ADN nu inclus dans des blocs d'agarose. L'ADN est ensuite incubé *in vitro* en présence de la Cas9 et d'un ARNg. L'ADN ainsi digéré et un pansement de recombinaison sont co-transformés dans la levure, ce qui induit la réparation du génome de *M. pneumoniae* par le système de recombinaison homologue hautement efficace de la levure.

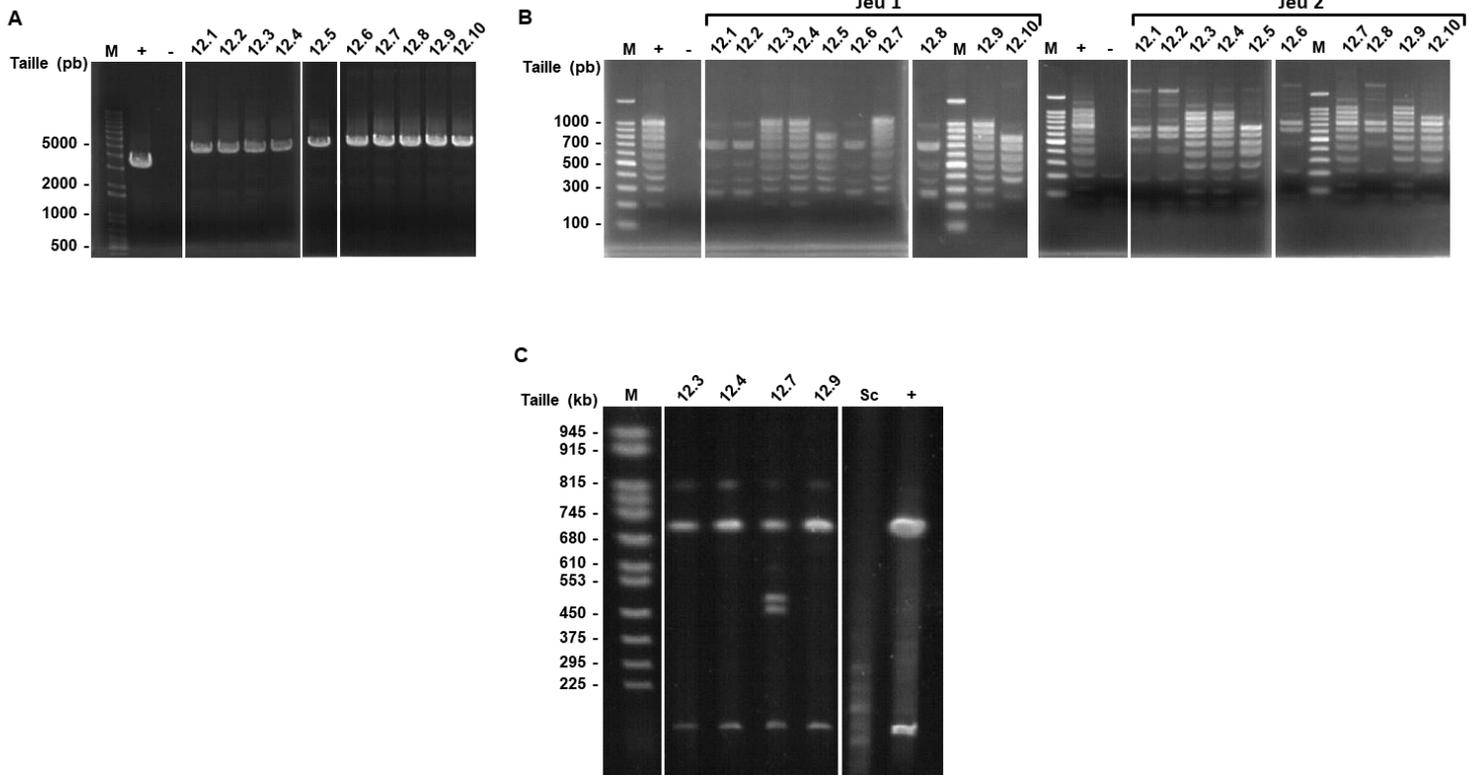


Figure 74. Analyse des génomes de *M. pneumoniae* M129 délévés pour le gène *mpn400*, clonés dans la levure avec la stratégie CREasPy-cloning *in vitro*. (A) La présence du génome de *M. pneumoniae* dans la levure et le remplacement du gène cible ont été vérifiés par PCR. L'utilisation d'amorces spécifiques de *M. pneumoniae* et encadrant le gène cible permet l'amplification d'un fragment de 4314 pb. Une amplification de 3480 pb est attendue pour les clones sauvages, profil identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (B) Vérification par PCR multiplex de l'intégrité des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure. Deux jeux d'amorces ont été utilisés (le jeu 1 et le jeu 2). Chaque jeu est composé de dix paires d'amorces permettant d'amplifier des loci répartis de manière homogène sur le génome de *M. pneumoniae*, permettant l'amplification simultanée de dix fragments de 100 à 1000 pb (jeu 1) et de 125 à 1025 pb (jeu 2), avec 100 pb d'incrément. Les clones contenant le génome de *M. pneumoniae* sans réarrangement majeur présentent un profil de dix bandes identique à celui du contrôle positif. M, Marqueur de taille 100 pb (Promega) ; +, ADNg de *M. pneumoniae* M129 ; -, contrôle négatif sans ADN. (C) Vérification par PFGE de la taille des génomes de *M. pneumoniae* M129 clonés dans la levure. Les génomes bactériens ont été digérés avec l'enzyme de restriction NotI. Le profil attendu est composé de deux fragments de 711 kpb et 105 kpb. M, marqueur de taille « Yeast Chromosome PFG Marker » (NEB) ; Sc, *S. cerevisiae* VL6-48N ; +, *M. pneumoniae* M129.

2. 3. CReasPy-cloning *in vitro*

Nous nous sommes intéressés au clivage *in vitro* du chromosome bactérien en CReasPy-cloning pour différentes raisons. En effet, cette approche permettrait : (1) de réduire le nombre d'étapes de transformation de la levure, puisqu'il n'est plus nécessaire de pré-transformer la levure avec les plasmides pCas9 et pgRNA, (2) d'employer les marqueurs de sélection initialement utilisés pour maintenir les plasmides pCas9 et pgRNA pour d'autres applications, (3) d'utiliser de nombreux ARNg en même temps sans avoir besoin de construire un plasmide multi-gRNA, et (4) d'éviter des mutations off-target sur le génome de la levure puisque la Cas9 ne serait pas présente dans la cellule.

Un essai de CReasPy-cloning *in vitro* du génome de *M. pneumoniae* M129 a donc été réalisé, en supprimant le gène *mpn400* (Figure 73). En préparation à cette expérience, des blocs d'agarose contenant le génome bactérien ont été digérés *in vitro*, en présence de la Cas9 purifiée de *S. pyogenes* et de l'ARNg transcrit *in vitro* permettant de cibler le gène *mpn400*. La souche de levure VL6-48N a ensuite été co-transformée avec le génome bactérien clivé *in vitro* et le pansement de recombinaison correspondant, en utilisant le protocole de transformation de sphéroplastes de levure au PEG. L'ARNg et le pansement de recombinaison utilisés ici sont les mêmes que ceux utilisés pour l'approche de CReasPy-cloning *in vivo*.

Une quinzaine de colonies ont été obtenues, et dix transformants ont été isolés. Les clones ont été analysés comme décrits précédemment, d'abord en PCR afin de confirmer le remplacement du gène cible par la cassette éléments levure (Figure 74 A), puis en PCR multiplex (Figure 74 B) et PFGE afin de confirmer l'intégrité des génomes clonés (Figure 74 C). Nous avons validé 10/10 clones pour la mutation $\Delta mpn400$, qui présentaient le profil attendu d'une bande à 4314 pb. Le contrôle positif réalisé sur l'ADN génomique de *M. pneumoniae* M129 présente une bande à 3480 pb. Un nombre de 4/10 clones ont été validés en PCR multiplex. Enfin, ces quatre clones ont été analysés en PFGE. Le profil attendu est identique à celui du contrôle positif (bloc d'agarose réalisé à partir d'une culture de *M. pneumoniae* M129), il est composé de deux bandes, une à 711 kpb et une autre à 105 kpb. Un nombre de 3/4 clones positifs ont ainsi été validés.

Ces premiers résultats sont encourageants et démontrent la faisabilité du protocole de CReasPy-cloning *in vitro* que nous avons développé lors de cette thèse. Malgré une efficacité

inférieure à celle de la stratégie *in vivo*, nous pensons pouvoir améliorer cette méthode en optimisant différents paramètres, tels que la quantité de Cas9 ou d'ARNg utilisés, la durée d'incubation du chromosome bactérien en présence de la Cas9 et l'ARNg, ou encore la quantité de génome bactérien digéré.

3. DISCUSSION

Avant ces travaux, les étapes de clonage et d'ingénierie d'un génome de mycoplasme dans la levure *S. cerevisiae* se faisaient en deux étapes successives et distinctes l'une de l'autre. En effet, le génome bactérien était préalablement cloné dans la levure, en utilisant des stratégies publiées dans la littérature (Benders *et al.*, 2010) telles que la transformation dans la levure d'un génome bactérien pré-marqué par transposition, la co-transformation dans la levure d'un génome bactérien linéarisé et d'un vecteur levure (approche de TAR-cloning), ou encore par transfert direct de cellule à cellule du génome bactérien dans la levure (Karas *et al.*, 2013, 2014). Ces techniques de clonage présentent différents inconvénients. Certaines nécessitent que l'espèce bactérienne en question soit transformable, pour pouvoir marquer son génome avant clonage dans la levure, ou bien d'autres la présence d'un site unique de restriction qui doit être localisé en dehors d'un gène essentiel, ce qui peut être difficile à trouver. Une fois cloné dans la levure, le chromosome bactérien pouvait ensuite être modifié génétiquement en utilisant les outils disponibles chez cet hôte, tel que le TREC, le TREC-IN, ou le CRISPR-Cas9.

Afin de palier à ces inconvénients, nous avons développé au cours de cette thèse une nouvelle stratégie : le CReasPy-cloning. Il s'agit d'une méthode originale et innovante basée sur le système CRISPR-Cas9 qui permet de réaliser en une seule et même étape le clonage et l'édition du génome de *M. pneumoniae* M129 dans la levure. Cette stratégie offre l'avantage de pouvoir choisir le site d'insertion de la cassette « éléments levure », et d'éditer simultanément un *locus* sur le chromosome bactérien.

Lors de la mise au point du CReasPy-cloning, nous avons observé qu'il était plus efficace d'utiliser des pansements de recombinaison ne contenant pas de séquence ARS. En effet, ces derniers peuvent se circulariser au lieu de s'intégrer dans le génome bactérien, et ainsi induire l'apparition de clones faux-positifs qui rendent l'identification des clones positifs

plus compliquée. Cette séquence ARS, qui se comporte comme l'origine de réplication du chromosome bactérien, doit contenir la séquence consensus 5'-WTTTAYRTTWTW-3' de 11 pb (Theis and Newlon, 1997; Newlon and Theis, 2002). Or, cette séquence est présente 19 fois au sein du génome de *M. pneumoniae* M129.

Ceci pourrait expliquer le fait que l'absence de la séquence ARS du pansement de recombinaison ne semble pas affecter le maintien et la réplication du chromosome de *M. pneumoniae* par la machinerie de la levure.

Un autre point que nous avons étudié fût le nombre d'éléments génétiques pouvant être co-transformés lors du CReasPy-cloning single target. Nous avons déterminé qu'il est nécessaire que la levure soit transformée en deux temps, une première fois avec les plasmides pCas9 et pgRNA, puis une seconde fois avec le génome bactérien et le pansement de recombinaison approprié. Ce résultat traduit *a priori* le fait qu'il est nécessaire de laisser à la levure un temps suffisant afin d'exprimer la Cas9 et l'ARNg avant de pouvoir réaliser le CReasPy-cloning en lui-même.

En utilisant ce nouvel outil d'ingénierie de génome, nous avons été capable de supprimer des fragments d'ADN de l'ordre du millier de paires de bases : *mpn372* (délétion de 1540 pb), *mpn142* (délétion de 3633 pb), *mpn142-143* (délétion de 4370 pb), *mpn400* (délétion de 1892 pb) et *mpn398-400* (délétion de 3438 pb). Dans le cadre des mutations « single target », ces délétions ont été réalisées par échange avec une cassette de 2638 pb. Cette méthode permet donc également d'insérer dans le génome bactérien de séquences d'ADN de plusieurs milliers de paires de bases. Cette stratégie est particulièrement efficace puisqu'elle permet l'obtention de nombreux transformants positifs pour un faible nombre de clones analysés.

Lors de l'analyse des transformants obtenus, nous avons remarqué que les clones négatifs en PCR multiplex présentent des profils incomplets, c'est-à-dire pour lesquels une ou plusieurs bandes attendues sont absentes. La Cas9 étant une enzyme connue pour avoir une activité « off-target », c'est-à-dire capable de cliver l'ADN en dehors du *locus* ciblé dans le génome, nous pensons qu'elle pourrait être à l'origine de coupures non désirées dans le génome de bactérien. Le génome de *M. pneumoniae* M129 contenant de nombreuses séquences répétées (Wenzel and Herrmann, 1988; Himmelreich *et al.*, 1996; Musatovova, Kannan and Baseman, 2012), il est possible qu'il soit ensuite réparé par le système de recom-

-binasion homologue de la levure de façon à maintenir le marqueur de sélection porté sur le chromosome surnuméraire.

Une autre amélioration que nous avons voulu apporter au protocole de CREasPy-cloning a été de développer un protocole de CREasPy-cloning *in vitro*. Des stratégies similaires, basées sur le clivage *in vitro* de l'ADN par le système CRISPR-Cas9 suivi de leur « capture » dans un vecteur, ont été développées par d'autres équipes (Jiang *et al.*, 2015; Lee, Larionov and Kouprina, 2015; Jiang and Zhu, 2016; Zhou *et al.*, 2016). Cependant, ces approches sont actuellement limitées à des fragments d'ADN inférieurs à 150 kpb, et ne sont pas adaptées pour être appliquées sur des génomes bactériens entiers. Le protocole de CREasPy-cloning *in vitro* que nous avons mis au point au cours de cette thèse correspond donc à une avancée significative dans ce domaine.

Un autre point fort de cette stratégie est qu'elle permet d'éditer plusieurs *loci* en même temps. En effet, nous avons réussi à supprimer deux, puis trois *loci* différents en une seule expérience de CREasPy-cloning.

Dans le cas du CREasPy-cloning multiple target, un autre type de modification génétique a été réalisé. En effet, en CREasPy-cloning single target, le *locus* cible a été supprimé par remplacement de sa séquence par le pansement de recombinaison contenant les éléments levure. En CREasPy-cloning multiple target, un des *loci* est supprimé de la même manière, mais les *loci* supplémentaires sont supprimés de façon propre. Il s'agit donc d'une délétion simple, réalisée grâce à l'utilisation d'un pansement de recombinaison constitué uniquement des régions homologues à son site d'insertion dans le génome bactérien. Ce pansement a été étudié, en termes de taille et de quantité, afin de déterminer les paramètres optimaux, dans le but d'obtenir la meilleure efficacité possible. Nous avons observé une augmentation de l'efficacité lorsque nous avons comparé l'utilisation de pansements de 1 kpb par rapport à ceux de 90 pb. Ceci met donc en évidence qu'une longueur d'homologie plus importante des pansements a un effet positif sur l'efficacité de la méthode.

Il est intéressant de noter que ces pansements de 1 kpb ne contiennent pas de marqueur de sélection. Le CREasPy-cloning est donc suffisamment efficace pour permettre l'obtention de clones édités pour plusieurs *loci*, même si ces délétions ne sont pas « sélectionnées » au cours du processus.

Au cours de l'analyse des transformants obtenus, nous avons cependant remarqué qu'un grand nombre de clones négatifs ne présentent aucune amplification en PCR, alors que

nous attendions une bande correspondant à l'amplification de la région sauvage. Pour que le CReasPy-cloning multiple target soit effectif, il faut que les cellules de levure reçoivent au moins une copie de chaque pansement de recombinaison. Nous pouvons envisager que ce n'est pas toujours le cas, certaines cellules de levure ne recevant parfois qu'un ou deux pansements. Dans ce cas, le chromosome bactérien est clivé au niveau du gène cible puisque l'ARNg correspondant est exprimé. Or, la levure ne dispose pas du pansement approprié pour effectuer la réparation par recombinaison homologue. La réparation de la cassure double brin s'effectue donc soit par NHEJ (jonction d'extrémités non homologues), soit par recombinaison entre des séquences répétées présentes sur le génome de *M. pneumoniae*. Ceci pourrait donc expliquer l'absence du *locus* cible observée lors de l'analyse en PCR. Ce raisonnement nous amène à penser qu'il pourrait alors être très complexe d'éditer un nombre plus important de *loci*.

Néanmoins, la délétion simultanée de trois cibles distinctes constitue une nette amélioration par rapport aux stratégies existantes. De plus, l'efficacité avec laquelle ces multiples délétions sont réalisables est très satisfaisante, puisqu'il est possible d'obtenir des transformants positifs en analysant un nombre limité de clones (environ une cinquantaine). Le CReasPy-cloning semble donc être un outil particulièrement adapté pour la construction de châssis bactériens.

Au regard de l'efficacité du CReasPy-cloning pour cloner et éditer le génome de *M. pneumoniae* M129, il a été décidé au laboratoire d'étendre cette méthode à d'autres espèces de mycoplasmes. En effet, ceci permettrait : 1) de confirmer que cet outil fonctionne pour des chromosomes plus grands que celui de *M. pneumoniae* ; 2) de re-cloner des génomes pour lesquels les éléments levure ont été insérés de manière aléatoire ; 3) de vérifier qu'il est possible de transplanter des génomes clonés en CReasPy-cloning. Ainsi, ce nouvel outil a été appliqué par d'autres membres de l'équipe à la souche *Mycoplasma leachii* PG50 (Manso-Silván *et al.*, 2009), dont le génome est d'environ 1 méga paires de bases (Mpb), en inactivant le gène *msb_0138* qui code pour une bêta-lactamase. Il a également été appliqué à la souche *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* Afadé (Yaya *et al.*, 2008), dont le génome est d'environ 1,2 Mpb, en supprimant le groupe de gènes *ts60_0301-0299* qui codent une alpha-glycérophosphate oxydase, une glycérol kinase et un transporteur de glycérol. Dans le cas de *M. leachii*, les génomes clonés dans la levure grâce à la stratégie CReasPy ont été efficacement

transplanté dans la souche *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*, permettant ainsi l'obtention de cellules *M. leachii* éditées.

Actuellement, nous ignorons si la taille du chromosome cible est un facteur limitant pour le processus de clonage dans la levure. Pour l'instant, les plus gros génomes clonés dans la levure en un seul morceau sont celui d'*Haemophilus influenzae* (Karas *et al.*, 2013, 2014), qui est de 1,8 Mpb, et le génome de *Spiroplasma citri* (Labroussaa *et al.*, 2016), qui est également de 1,8 Mpb. De plus, une expérience récente de concaténation de chromosomes chez *S. cerevisiae* a montré que la levure peut facilement répliquer un chromosome unique de 11,8 Mpb (Shao *et al.*, 2018). Ce résultat suggère que la limite pourrait ne pas être la taille du chromosome à cloner, mais plutôt la quantité totale d'ADN que la levure peut contenir (excès de 6,8% pour *M. pneumoniae*, et de 15% pour *H. influenzae*). L'avènement de souches synthétiques de *S. cerevisiae* pourrait offrir de nouvelles perspectives, car ces cellules ont un génome considérablement réduit (environ 1,1 Mpb ont été retirés de la souche de Sc2.0) (Richardson *et al.*, 2017) et pourraient donc permettre de cloner des chromosomes plus volumineux.

CHAPITRE 2

Développement d'un protocole de
transplantation du génome de
M. pneumoniae dans une cellule receveuse

RESULTATS - CHAPITRE 2 : DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE DE TRANSPLANTATION DU GENOME DE *M. PNEUMONIAE* DANS UNE CELLULE RECEVEUSE

A l'issue des travaux présentés dans le chapitre I, nous avons réussi à cloner et modifier dans la levure le génome de *M. pneumoniae* M129. Afin de « donner vie » à ce génome modifié, c'est-à-dire obtenir une cellule bactérienne mutante, il nous faut à présent transplanter le chromosome bactérien dans une cellule receveuse (Figure 22). Cette étape n'ayant encore jamais été réalisée pour *M. pneumoniae*, l'objectif de ce chapitre est donc de développer un protocole de transplantation pour ce mycoplasme.

Les protocoles de transplantation existants sont tous basés sur l'utilisation du polyéthylène glycol (PEG). Cette molécule a pour fonction de permettre la fusion entre différentes cellules, on dit qu'il s'agit d'un agent « fusogène » (Prakash and Gabridge, 1981; Tarshis, Salman and Rottem, 1991; Yang and Shen, 2006; Karas *et al.*, 2013). Les méthodes de transplantation utilisant le PEG sont également applicables pour réaliser la transformation de plasmides chez les mycoplasmes. En effet, transplantation et transformation partagent la caractéristique d'être des processus permettant l'entrée d'une molécule d'ADN (ici double brin et circulaire) dans une cellule. Il nous a donc semblé approprié de démarrer nos travaux par l'élaboration d'un protocole de transformation de plasmides de *M. pneumoniae* basé sur le PEG, et qui pourrait ensuite être appliqué pour réaliser des expériences de transplantation de génomes entiers.

1. DEVELOPPEMENT D'UN PROTOCOLE DE TRANSFORMATION DE *M. PNEUMONIAE* AU PEG

M. pneumoniae est un organisme qui se transforme classiquement par électroporation, et pour lequel aucun protocole de transformation au PEG n'a été décrit dans la littérature jusqu'à aujourd'hui. De plus, il a déjà été rapporté que le PEG de haut poids moléculaire est toxique pour ce mycoplasme (Prakash and Gabridge, 1981). De ce fait, le développement d'un protocole de transformation au PEG de *M. pneumoniae* s'annonçait difficile, bien que nécessaire.

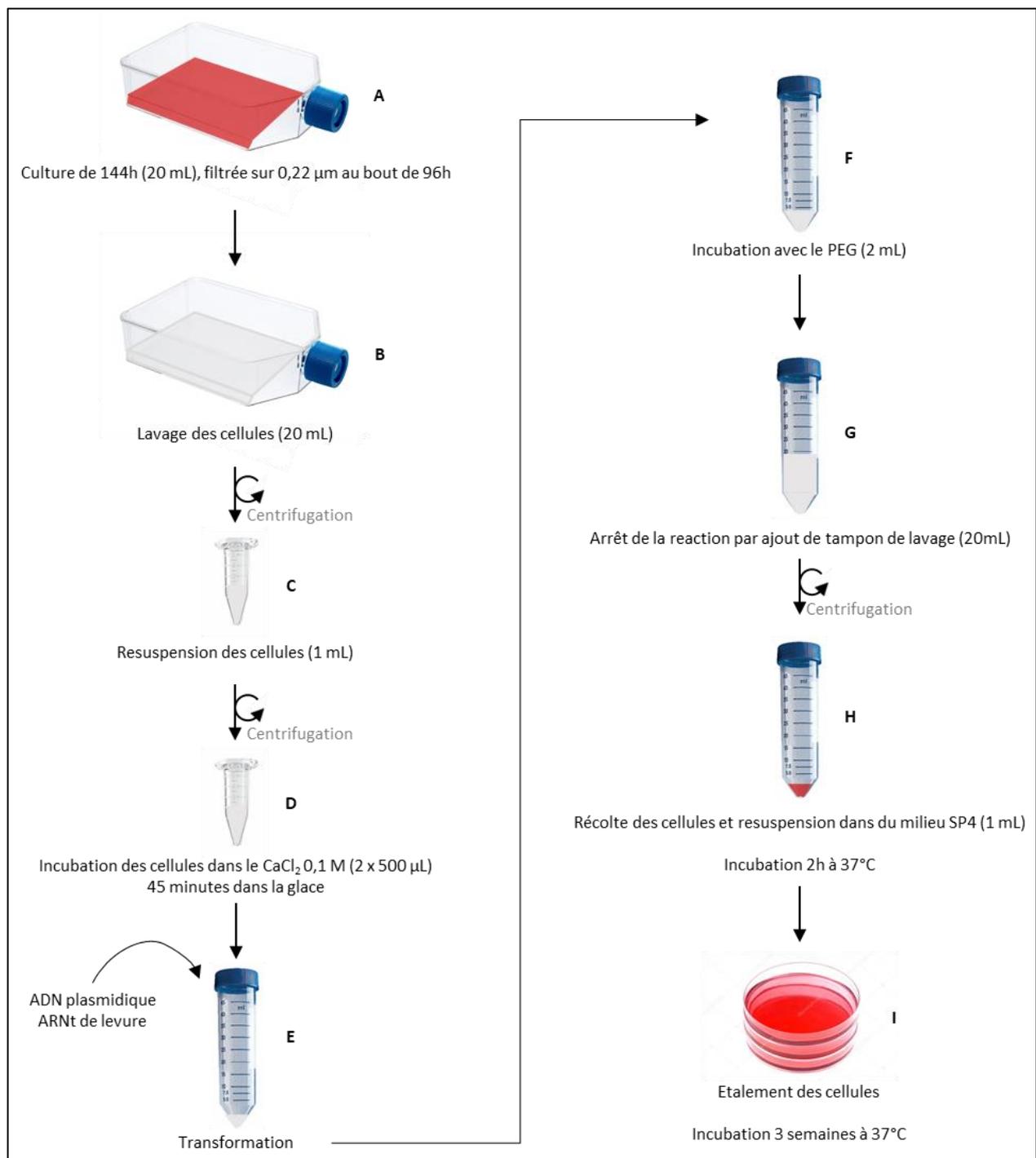


Figure 75. Schéma illustrant les principales étapes du protocole initial de transformation au PEG de *M. pneumoniae*. Les lettres en gras (A à I) correspondent aux paramètres qui ont été étudiés par la suite.

Pour mettre au point ce protocole, nous nous sommes appuyés sur (a) le protocole de la transplantation de génomes au PEG développé pour *M. capricolum* (Lartigue *et al.*, 2007, 2009), qui fonctionne également pour la transformation de plasmides *oriC* avec des efficacités de transformation pouvant atteindre 6×10^{-5} transformants par UFC (Unité Formant Colonie) par microgramme de plasmide (tfs/UFC/ μg) (Labroussaa *et al.*, 2016); (b) les protocoles de transformation basés sur le PEG permettant d'introduire des plasmides dans diverses espèces de mycoplasmes (Dybvig and Cassell, 1987; Dybvig and Alderete, 1988; King and Dybvig, 1991, 1994; Cao, Kapke and Minion, 1994; Voelker and Dybvig, 1996; Papazisi *et al.*, 2000; Cordova *et al.*, 2002; Lartigue *et al.*, 2003; Aboklaish *et al.*, 2014; Matteau *et al.*, 2017) Rideau *et al.*, 2019, manuscrit soumis) et enfin (c) des expériences réalisées, il y a quelques années, au John Craig Venter Institute par Nacyra-Assad-Garcia et Carole Lartigue sur *M. pneumoniae* et *M. genitalium*.

A partir de ces données, un premier protocole a donc été établi pour *M. pneumoniae*. Il est illustré Figure 75 et brièvement, comprend les étapes suivantes : les cellules obtenues après six jours de culture à 37°C, sont lavées avec du tampon HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), récoltées puis incubées dans du chlorure de calcium (CaCl_2). Elles sont ensuite transformées avec 5 μg du plasmide pMiniTn4001PsPuro, en présence de PEG₆₀₀₀ (temps de contact de deux minutes) et la réaction est stoppée par ajout du tampon de lavage HBSS. Les cellules sont ensuite collectées par centrifugation, remises en suspension dans du milieu SP4, puis étalées sur milieu SP4-Agar contenant 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de puromycine. Lors de nos premiers essais de transformation, des colonies sont apparues sur milieu sélectif après 3 semaines d'incubation à 37°C. Suivant les essais, de 250 à 350 colonies étaient comptées à la dilution 10^{-1} , laissant entrevoir des efficacités de transformation autour de 10^{-7} à 10^{-8} tfs/UFC/ μg d'ADN plasmidique, soit des efficacités cent à mille fois inférieures aux efficacités de transformation obtenues par électroporation (environ 2.8×10^{-5} tfs/UFC/ μg).

Ce premier protocole a donc été entièrement repris fin de l'adapter au mieux à *M. pneumoniae*, un mycoplasme à croissance lente et adhérent (contrairement à *M. capricolum*). De nombreux paramètres ont été étudiés afin de déterminer les conditions optimales de transformation de *M. pneumoniae* au PEG et obtenir les meilleures efficacités de transformation possible. Parmi eux : la culture de *M. pneumoniae* (conditions de culture et quantité de cellules) (Figure 75 A), le tampon de lavage des cellules (Figure 75 B), le traitement des cellules avec de la trypsine (Figure 75 C), l'utilisation du CaCl_2 (Figure 75 D), et le traitement

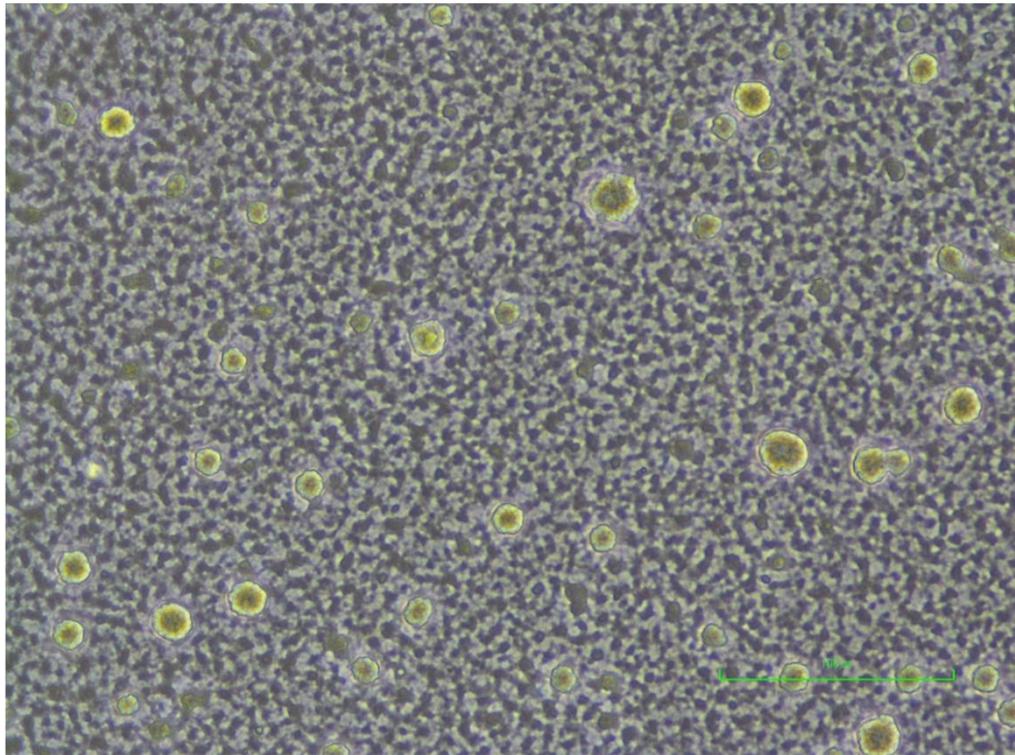
au PEG (concentration et temps de contact) (Figure 75 F). Ces paramètres ont parfois été analysés séparément, et parfois en combinaison les uns avec les autres.

Par souci de simplicité, ils sont présentés dans l'ordre du déroulement de la procédure de transformation (Figure 75 A-I). En pratique, des contraintes techniques (six essais maximum par expérience de transformation) mais également de temps nous ont poussés à réaliser la plupart de ces expérimentations en parallèle, sans forcément attendre le résultat d'une expérimentation pour passer à la suivante. En effet, *Mycoplasma pneumoniae* est un micro-organisme qui possède un temps de génération d'environ dix heures. Ce facteur rend la plupart des expériences scientifiques extrêmement longues, avec des durées se comptant en mois. Lors d'une expérience de transformation, par exemple, les colonies sont généralement visibles sur milieu solide deux à quatre semaines après l'expérience. Elles sont ensuite piquées dans un petit volume de milieu liquide afin d'obtenir le matériel suffisant pour réaliser les premières analyses génotypiques. Le criblage des différents clones par PCR n'est donc possible qu'une à trois semaines après cette mise en culture. Cette échelle de temps (3 à 6 semaines au total) a rendu le suivi des expériences complexe, et il a parfois été difficile d'attendre les conclusions de certaines manipulations pour mettre en place les suivantes.

L'optimisation du protocole de transformation au PEG a été réalisée principalement sur la souche *M. pneumoniae* M129. Régulièrement, les améliorations apportées ont été confirmées sur la souche *M. pneumoniae* FH, et parfois sur la souche *M. pneumoniae* M129-B170. Il s'agit de souches candidates pour servir de cellules receveuses dans les expériences ultérieures de transplantation (voir section « II.2.1.1. Cellules receveuses »). Les essais de transformation ont été effectués en utilisant le plasmide pMiniTn4001PsPuro. Les colonies obtenues sur boîtes SP4-Agar puromycine 3 µg/mL ont été dénombrées et ce chiffre a servi à calculer des efficacités de transformation en nombre de transformants par nombre d'UFC (Unité formant colonie) par microgramme d'ADN plasmidique (nombre de tfs/UFC/µg).

Le protocole actualisé est présenté après l'étude des paramètres mais fait encore aujourd'hui l'objet de modifications.

A



B

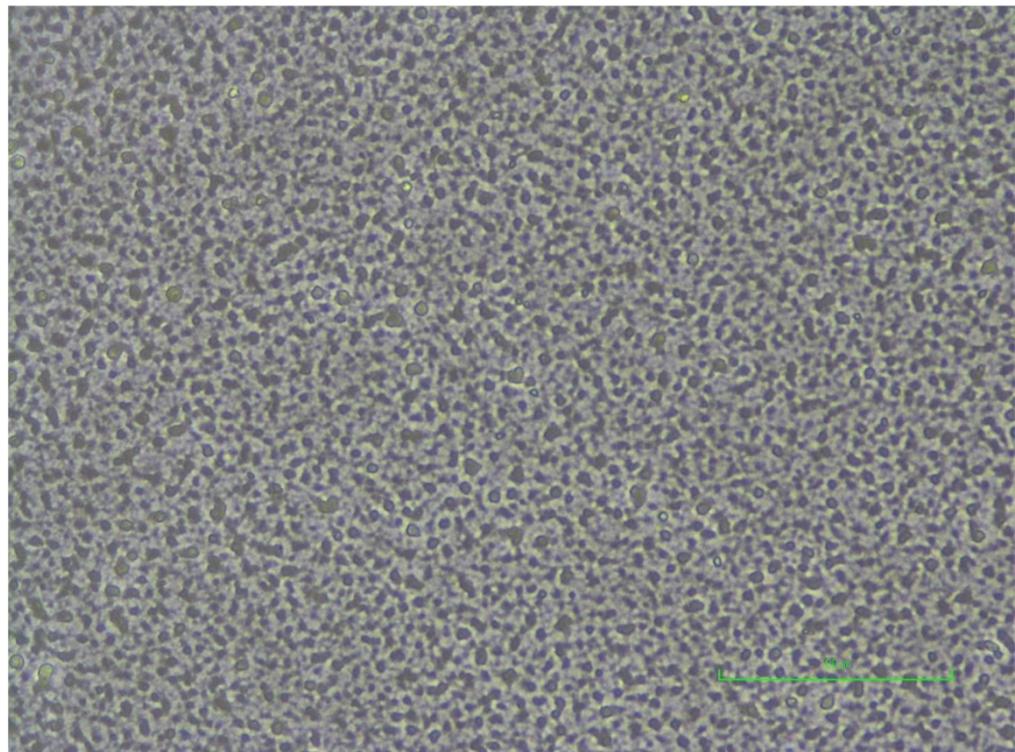


Figure 76. Observation au microscope inversé (grossissement X20) des cultures de *M. pneumoniae* M129. (A) Photo réalisée avant filtration, au bout de 96h de culture. (B) Photo réalisée après filtration sur 0,22 μm , au bout de 48h de culture.

1. 1. Optimisation de la culture de *M. pneumoniae* »

1. 1. 1. Conditions de culture

Nous nous sommes intéressés, en premier lieu, aux conditions de culture de *M. pneumoniae*. En effet, au démarrage du projet, la manipulation de *M. pneumoniae* ne faisait pas partie des compétences du laboratoire. Nous avons donc dû nous familiariser avec la culture de cet organisme, qui est adhérent et présente un temps de génération très long. Initialement, notre façon de procéder nous permettait d'obtenir des cultures prêtes à être transformées en six jours. Nous avons cherché à améliorer notre façon de faire afin d'obtenir des cultures formant un tapis cellulaire uniforme recouvrant la totalité du flacon de culture, présentant peu d'agrégats et ceci sur un temps plus court. Nous avons accordé de l'importance aux conditions de culture car l'état de la culture de départ est primordial dans la mise en place d'un protocole de transformation (nombre de cellules/mL, pH, phase de croissance, présence d'agrégats...) (King and Dybvig, 1991; Chopra-Dewasthaly, Zimmermann, *et al.*, 2005)(Rideau *et al.*, 2019, manuscrit soumis).

Initialement, la cultureensemencée était incubée pendant quatre jours à 37°C, puis passée à travers un filtre de 0,22 µm et de nouveau incubée à 37°C pendant environ 48 heures. Nous nous sommes demandé si nous ne perdions pas trop de cellules lors de l'étape de filtration. En effet, ces dernières agrègent énormément (Figure 76 A), et les agrégats restaient probablement coincés dans le filtre. Un faible nombre de cellules passant au travers du filtre, deux jours de culture étaient nécessaires pour obtenir à nouveau un tapis confluent (Figure 76B).

Nous avons donc décidé de réduire à trois jours le temps de culture avant filtration. Après trois jours, la culture arrive en effet à confluence et quelques agrégats sont déjà visibles. Il n'y a donc pas forcément besoin d'attendre un jour de plus, au risque de voir se former encore plus d'agrégats. Au terme de ces trois jours, juste avant la filtration, nous avons inclus une étape de désagrégation par passage des cellules dix fois dans une aiguille de 26 Gauge. Le but de cette étape est de réduire mécaniquement la taille des agrégats avant leur passage dans le filtre, afin de perdre le moins de cellules possible. Nous avons également changé de filtre. Nous avons choisi d'utiliser un filtre Low Protein Binding (LPB) de 0,45 µm. Ce filtre à mailles plus larges laisse passer certainement plus de cellules, surtout si celles-ci ont tendance à former des amas. En incluant ces changements, la culture fût prête après un seul jour d'incu-

Table 10. Effet du tampon de lavage et de la quantité de cellules sur la transformation de *M. pneumoniae* M129 au PEG₆₀₀₀

Quantité de cellules	Tampon	Efficacité de transformation (tfs/UFC/ μ g)
Un flacon de culture pour deux essais de transformation	HBSS	1×10^{-5}
	HBSS Φ CaMg	2×10^{-6}
	Tris-NaCl	6×10^{-7}
Un flacon de culture pour un essai de transformation	HBSS	2×10^{-6}
	HBSS Φ CaMg	1×10^{-6}
	Tris-NaCl	5×10^{-7}

-bation à 37°C après filtration. Nous avons donc réussi à améliorer les conditions de culture de façon à ce qu'elles soient prêtes en quatre jours au lieu de six. Le titre de la culture est généralement compris entre 5×10^8 cellules/mL à 10^9 cellules/mL.

1. 1. 2. Quantité de cellules

Le second paramètre que nous avons testé est la quantité de cellules transformées. Initialement, le volume de cellules collectées (1 mL, Figure 75 C) à partir d'un flacon de culture (20 mL) était divisé en deux (Figure 75 D), et permettait donc de réaliser deux essais de transformation. Le titre de la culture de départ était de 2×10^9 cellules/mL. Nous avons choisi de tester si le fait de doubler la quantité de cellules pouvait avoir un impact sur l'efficacité de la transformation. En effet, nous nous sommes demandé si en augmentant la quantité de cellules soumises à l'étape de transformation, nous augmenterions par la même occasion le nombre de cellules transformées. Pour cela, nous avons récolté les cellules issues d'un seul flacon de culture (20 mL) dans un volume deux fois plus petit (500 μ L), et la totalité des cellules ont servi à un seul essai de transformation. Cet essai a été réalisé en combinaison avec la variation des tampons de lavage (Table 10).

Nous avons obtenu des colonies sur boîtes pour chacune des conditions testées mais le nombre de colonies compté était variable d'une condition à l'autre. Les résultats de cette expérience ont montré (i) que l'efficacité de transformation la plus haute est obtenue avec le tampon HBSS et la plus faible avec le tampon Tris-NaCl, et ceci quelle que soit la quantité de cellules utilisée ; et (ii) que les efficacités de transformations sont globalement meilleures avec une quantité de cellules non doublée, peu importe le tampon utilisé. Il est intéressant de noter que si nous prenons en compte toutes les variables (quantité de cellules et type de tampon), l'efficacité de transformation la plus haute (1×10^{-5} tfs/UFC/ μ g) obtenue avec le tampon HBSS et une quantité de cellules non doublée est environ vingt fois supérieure à l'efficacité la plus faible (5×10^{-7} tfs/UFC/ μ g) obtenue avec le tampon Tris-NaCl et une quantité de cellules doublée. Cette expérience a été faite deux fois et doit être répétée.

A l'issu de ce test, nous avons conclu qu'augmenter la quantité de cellules à transformer ne permettait pas d'augmenter le nombre de transformants et pouvait même dans certains cas le diminuer, en tout cas dans les conditions testées. La quantité de cellules

Table 11. Composition des différents tampons de lavage testés lors des expériences de transformation de *M. pneumoniae* M129 au PEG₆₀₀₀

HBSS (pH 7,0-7,4)		Tris-NaCl (pH 7,5)	
	mg/L		mg/L
Chlorure de calcium dihydraté	185,4	TRIS chlorhydrate	600
Magnésium sulfate heptahydraté	200	Chlorure de sodium	7300
Chlorure de potassium	400		
Phosphate de potassium monobasique anhydre	60		
Bicarbonate de sodium	350		
Chlorure de sodium	8000		
Phosphate de sodium dibasique heptahydraté	90		
Dextrose anhydre	1000		

HBSSΦCaMg (pH 7,0-7,4)		HEPES-Saccharose (pH 7,4)	
	mg/L		mg/L
Chlorure de potassium	400	HEPES	1910
Phosphate de potassium monobasique anhydre	60	Saccharose	93110
Bicarbonate de sodium	350		
Chlorure de sodium	8000		
Phosphate de sodium dibasique anhydre	47,88		
Dextrose anhydre	1000		

HBSSΦCaMg (pH 7,0-7,4)		PBS (pH 7,4)	
	mg/L		mg/L
Chlorure de potassium	400	Chlorure de sodium	8000
Phosphate de potassium monobasique anhydre	60	Chlorure de potassium	200
Bicarbonate de sodium	350	Phosphate de sodium dibasique	1440
Chlorure de sodium	8000	Phosphate de potassium monobasique	240
Phosphate de sodium dibasique anhydre	47,88		
Dextrose anhydre	1000		

Table 12. Effets du tampon de lavage sur la transformation de *M. pneumoniae* M129 au PEG₆₀₀₀

Tampon	Efficacité de transformation (tfs/UFC/μg)
HBSS	3×10^{-6}
HBSSΦCaMg	3×10^{-6}
HEPES Saccharose	7×10^{-9}
PBS	2×10^{-6}
Tris-NaCl	4×10^{-6}

initialement utilisée était visiblement la plus appropriée. Nous avons donc décidé de poursuivre nos essais sans changer la condition de départ, c'est-à-dire que les cellules issues d'un flacon de culture (20 mL) sont récoltées dans 1 mL de tampon de lavage, et permettent de réaliser deux essais de transformation avec 500 μ L de cellules pour chacun.

1. 2. Optimisation des tampons de lavage

L'expérience précédente a montré que le tampon avec lequel les cultures de *M. pneumoniae* sont lavées et récoltées avant la transformation pouvait influencer de façon significative les résultats de la transformation. Nous nous sommes donc intéressés à ce paramètre qui semblait déterminant dans la mise en place de notre protocole.

Le tampon de lavage est utilisé à plusieurs reprises dans ce protocole. En effet, il permet, d'une part, de laver les cellules (Figure 75 B), de les remettre en suspension après centrifugation (Figure 75 C) et de stopper le contact PEG/cellules (Figure 75 G). Il permet, d'autre part, de préparer la solution contenant le PEG, un élément clé du processus de transformation (Figure 75 F). Au cours de cette étude, plusieurs tampons ont été testés (Table 11): (i) le tampon HEPES-Saccharose utilisé pour transformer *M. pneumoniae* par électroporation, (ii) le tampon Tris-NaCl et le tampon PBS (un tampon phosphate salin) communément utilisés dans des protocoles de transformation d'autres mycoplasmes, et (iii) le tampon Hank's Balanced Salt Solution contenant du calcium et du magnésium (HBSS) ou pas (HBSS Φ CaMg), deux tampons couramment utilisés pour les cultures cellulaires eucaryotes. L'impact de ces tampons sur la transformation de *M. pneumoniae* a été évalué pour une quantité de cellule fixe (un flacon de culture à 8×10^8 cellules/mL pour deux essais de transformation).

Après transformation, des colonies ont été obtenues sur milieu sélectif pour chaque tampon utilisé, avec parfois des différences marquées. Des efficacités de transformation très proches ont été obtenues avec quatre des cinq tampons (Table 12): le tampon HBSS (3×10^{-6} tfs/UFC/ μ g), le tampon HBSS Φ CaMg, (3×10^{-6} tfs/ UFC / μ g), le tampon PBS (2×10^{-6} tfs/CFU/ μ g), et le tampon Tris-NaCl (4×10^{-6} tfs/ UFC / μ g). De façon surprenante, une efficacité de seulement 7×10^{-9} tfs/UFC/ μ g a été observée avec le tampon HEPES-Saccharose, le tampon

communément utilisé pour transformer *M. pneumoniae* par électroporation. Cette expérience a été répétée trois fois et les mêmes efficacités de transformation ont été obtenues à chaque fois. Ce résultat inattendu nous a permis d'éliminer le tampon HEPES-Saccharose comme tampon de lavage potentiel pour le protocole de transformation de *M. pneumoniae* au PEG. Les quatre autres tampons semblaient en revanche équivalents.

Suite à cette expérience, nous avons choisi de poursuivre le travail d'optimisation avec le tampon HBSS, qui avait également donné des résultats satisfaisants lors des expériences « variation de la quantité de cellules et du tampon de lavage » et « Traitement à la trypsine et tampon de lavage ».

1. 3. Optimisation du traitement à la trypsine

Le paramètre suivant que nous avons inclus dans l'élaboration de ce protocole est une étape de « trypsination » des cellules avant transformation. La trypsine est une protéase qui est utilisée dans les procédés de culture cellulaire pour détacher les cellules adhérentes des flacons de culture. Elle permet le clivage des protéines d'adhérence, ce qui a pour conséquence de favoriser la remise en suspension des cellules.

M. pneumoniae est lui aussi un organisme qui adhère au plastique des flacons de culture (Kasai *et al.*, 2013). Mais, nous n'avons pas utilisé la trypsine pour cette raison (les cellules de *M. pneumoniae* sont récoltées de manière mécanique en grattant la surface sur laquelle elles adhèrent). La trypsine a été utilisée pour détacher les cellules les unes des autres. En effet, les cellules de *M. pneumoniae* ont tendance à former de gros agrégats (Figure 76 A), du fait d'une forte adhérence entre les cellules. La destruction ménagée de ces agrégats devrait augmenter la surface cellulaire disponible pour l'entrée de l'ADN lors des expériences de transformation.

L'étape de traitement à la trypsine est effectuée après la récolte des cellules et avant leur traitement dans le CaCl₂, afin de détacher au maximum les cellules de *M. pneumoniae* les unes des autres. L'utilisation de la trypsine pour défaire des amas cellulaires n'étant pas couramment employée chez les mycoplasmes (elle est parfois utilisée pour détacher les mycoplasmes adhérents de certaines surfaces), nous avons dû nous baser sur la littérature eucaryote (Li *et al.*, 2013; Tsuji *et al.*, 2017). Au début des essais d'optimisation du protocole

Table 13. Effets de la trypsine sur la transformation de *M. pneumoniae* M129 au PEG₆₀₀₀. Les efficacités de transformation sont exprimées en nombre de tfs/UFC/ μ g.

Temps d'incubation (minutes)	Pourcentage en trypsine (m/v)		
	0,25%	0,5%	1%
Contrôle sans trypsine	7×10^{-8}	4×10^{-9}	1×10^{-6}
5	2×10^{-6}	4×10^{-6}	4×10^{-6}
10	2×10^{-6}	4×10^{-6}	1×10^{-6}
15	1×10^{-6}	3×10^{-6}	1×10^{-7}
20	1×10^{-6}	3×10^{-6}	1×10^{-6}
30	3×10^{-7}	2×10^{-7}	1×10^{-7}

de transformation de *M. pneumoniae* au PEG, il nous a donc fallu choisir une concentration en trypsine ainsi qu'une durée d'incubation. Pour commencer, nous avons opté pour une étape d'incubation des cellules avec de la trypsine à une concentration finale de 0,25 % (m/v) pendant 5 minutes. La trypsine, préparée extemporanément, doit être dissoute dans un tampon adéquat avant utilisation. Nous avons choisi de tester trois des cinq tampons de lavage utilisés précédemment (les tampons HBSS, HBSS Φ CaMg et Tris-NaCl) et avons réalisé trois essais en parallèle (répétés deux fois chacun). Lors de cette expérience, le témoin sans trypsine n'a pas pu être réalisé (du fait de ne pouvoir traiter que six échantillons maximum). Néanmoins nous avons pu observer que (i) des colonies étaient apparues dans chacune des conditions testées, et (ii) que le nombre maximal de colonies coïncidait avec la condition « 0,25% trypsine/tampon de lavage HBSS ». Ce résultat, corroborant une nouvelle fois le fait que le tampon de lavage le plus approprié pour transformer *M. pneumoniae* au PEG est le tampon HBSS, nous décidât à sélectionner ce tampon pour la suite des manipulations.

Lors des expériences suivantes nous avons fait varier le pourcentage final de trypsine (0 %, 0,25 % ou 0,5 % ou 1 %) et le temps d'incubation (5 minutes, 10 minutes, 15 minutes, 20 minutes ou 30 minutes) afin de déterminer si certaines conditions permettraient d'améliorer l'efficacité de la transformation. Ces expériences ont été réalisées avec le tampon de lavage HBSS exclusivement. Nous avons obtenu des colonies sur boîte pour chacune des conditions testées (Table 13). Les efficacités les plus basses ont été observées en l'absence de traitement à la trypsine : 7×10^{-8} tfs/UFC/ μ g pour la trypsine 0,25% et 4×10^{-9} tfs/UFC/ μ g pour la trypsine 0,5%. De manière générale, nous avons donc observé une diminution de l'efficacité de transformation en l'absence de traitement trypsine. Étonnamment, cette diminution est beaucoup moins marquée (1×10^{-6} tfs/UFC/ μ g) pour la trypsine 1%. Ces expériences ont été réalisées une seule fois chacune, il s'agit peut-être là d'une valeur aberrante. Chaque expérience sera refaite trois fois à minima d'ici la fin du projet.

Pour chaque pourcentage de trypsine, nous avons observé l'efficacité de transformation la plus haute avec un temps d'incubation de 5 minutes : 2×10^{-6} tfs/UFC/ μ g pour la trypsine 0,25%, et 4×10^{-6} tfs/UFC/ μ g pour les trypsines 0,5% et 1%. Pour les pourcentages 0,25% et 0,5%, cette efficacité diminue avec l'allongement de la durée d'incubation pour atteindre au bout de 30 minutes une valeur 3×10^{-7} tfs/UFC/ μ g et 2×10^{-7} tfs/UFC/ μ g, respectivement. Pour le pourcentage 1% il est plus difficile de conclure car l'effica-

-cité la plus basse (2×10^{-7} tfs/UFC/ μg) a été calculée pour des temps d'incubation de 15 minutes et 30 minutes.

Si nous regardons maintenant uniquement le temps d'incubation, les valeurs des efficacités de transformations restent très proches les unes des autres, quel que soit le pourcentage final de trypsine utilisé.

L'ensemble de ces travaux semblent montrer qu'une étape de « trypsination » des cellules, avant ajout du plasmide, améliore l'efficacité de la transformation. En revanche, un pourcentage en trypsine compris entre 0,25 % et 1 %, et une durée d'incubation de 5 à 15-20 minutes ne semblent pas faire varier cette valeur. Aux vues de ces résultats, nous avons donc décidé d'inclure cette étape dans notre protocole et de poursuivre nos essais en traitant les cellules avec de la trypsine 0,25% pendant 5 minutes. Lorsque ces expérimentations auront été reproduites, nous ajusterons la concentration finale et le temps d'incubation si nécessaire.

1. 4. Optimisation de l'incubation dans le chlorure de calcium (CaCl_2)

Un paramètre supplémentaire que nous avons étudié est l'étape d'incubation dans le CaCl_2 0,1M. Le CaCl_2 est retrouvé dans de nombreux protocoles de « transformation artificielle » chez les bactéries dont les mycoplasmes (King and Dybvig, 1991; Papazisi *et al.*, 2000; Lartigue *et al.*, 2007). Il permettrait de neutraliser les charges négatives de l'ADN et de la membrane plasmique, évitant ainsi leur répulsion électrostatique mutuelle (Asif *et al.*, 2017). Il permettrait également de fragiliser la membrane ce qui conduirait à la formation d'invaginations, et de compacter l'ADN ce qui faciliterait son entrée dans la cellule (Asif *et al.*, 2017).

Cependant, nous nous sommes questionnés sur son utilité dans le cas de *M. pneumoniae*. En effet, deux nucléases membranaires ont été décrites chez *M. pneumoniae* (Jarvill-Taylor, VanDyk and Minion, 1999; Somarajan, Kannan and Baseman, 2010). La nucléase, codée par le gène *mpn133*, a été identifiée comme étant une nucléase cytotoxique dépendante du calcium (Somarajan *et al.*, 2010). La seconde, codée par le gène *mpn491*, serait un homologue de la nucléase membranaire MnuA identifiée chez *Mycoplasma pulmonis* (Jarvill-Taylor, VanDyk and Minion, 1999). Les nucléases ont généralement besoin de cations divalents (souvent Mg^{2+} ou Ca^{2+}) comme cofacteurs pour être actives (Dominguez and Ward, 2009). Nous nous som-

Table 14. Effet de l'incubation des cellules dans le chlorure de calcium (CaCl₂) 0,1 M sur la transformation de *M. pneumoniae* M129 au PEG₆₀₀₀. (+) Incubation des cellules dans du CaCl₂ 0.1M ; (-), incubation des cellules dans du tampon HBSS.

CaCl ₂ 0,1 M	Incubation dans la glace	Efficacité de transformation (tfs/UFC/μg)
+	0 minute	2 x 10 ⁻⁵
-		8 x 10 ⁻⁷
+	45 minutes	6 x 10 ⁻⁵
-		5 x 10 ⁻⁷

Table 15. Effets de la concentration en PEG₆₀₀₀ sur la transformation de *M. pneumoniae* au PEG.
Les essais ont été réalisés avec un temps de contact des cellules avec le PEG₆₀₀₀ de 2 minutes.

Pourcentage en PEG ₆₀₀₀ (m/v)	Efficacité de transformation (tfs/UFC/μg)	
	<i>M. pneumoniae</i> M129	<i>M. pneumoniae</i> FH
50%	3 x 10 ⁻⁷	1 x 10 ⁻⁶
40%	5 x 10 ⁻⁶	4 x 10 ⁻⁶
30%	2 x 10 ⁻⁶	3 x 10 ⁻⁶
20%	2 x 10 ⁻⁶	2 x 10 ⁻⁶
10%	6 x 10 ⁻⁷	1 x 10 ⁻⁶
5%	1 x 10 ⁻⁷	5 x 10 ⁻⁷

Table 16. Effets de la concentration en PEG₆₀₀₀ sur la transformation de *M. pneumoniae* au PEG.
Les essais ont été réalisés avec un temps de contact des cellules avec le PEG₆₀₀₀ de 5 minutes.

Pourcentage en PEG ₆₀₀₀ (m/v)	Efficacité de transformation (tfs/UFC/μg)	
	<i>M. pneumoniae</i> M129	<i>M. pneumoniae</i> FH
40%	6 x 10 ⁻⁶	2 x 10 ⁻⁶
30%	3 x 10 ⁻⁶	2 x 10 ⁻⁶
20%	2 x 10 ⁻⁶	9 x 10 ⁻⁷
10%	1 x 10 ⁻⁶	8 x 10 ⁻⁷
5%	2 x 10 ⁻⁶	4 x 10 ⁻⁷

mes donc demandé si le fait d'éliminer cette étape d'incubation dans le CaCl₂ pouvait augmenter l'efficacité de transformation de *M. pneumoniae*. Nous avons supposé qu'en l'absence du cofacteur nécessaire (Ca²⁺), l'activité des nucléases de surface serait diminuée, limitant ainsi la dégradation de l'ADN avant son entrée dans la cellule. Nous avons également voulu vérifier s'il était nécessaire d'incuber les cellules à froid (dans la glace), lors du contact avec le CaCl₂.

Une diminution de l'efficacité de transformation d'un facteur 100 a été observée en l'absence de CaCl₂ (Table 14). L'efficacité la plus haute (6×10^{-5} tfs/UFC/ μ g) a été obtenue lorsque les cellules sont reprises dans le CaCl₂ 0,1M et placées 45 minutes dans la glace avant d'être mises en contact avec le plasmide et le PEG. Mais ce chiffre reste proche de l'efficacité obtenue lorsque les cellules sont reprises dans le CaCl₂ 0,1M et immédiatement mises en contact avec le plasmide et le PEG (2×10^{-5} tfs/UFC/ μ g).

Nous en avons donc déduit qu'il faut conserver l'étape d'incubation des cellules dans le CaCl₂ avant la transformation, et qu'il est peut-être préférable de réaliser cette étape dans la glace. Il est difficile de conclure ici si le CaCl₂ a eu un impact vis-à-vis des nucléases membranaires, mais il paraît clair que son implication dans la réaction de transformation en elle-même est prépondérante.

1. 5. Optimisation du traitement au PEG

Le traitement au PEG a lui aussi été étudié afin de déterminer les concentrations et durées d'incubation optimales pour la réaction de transformation. Initialement, les cellules étaient traitées avec du PEG₆₀₀₀ 40% pour une durée de deux minutes. Nous avons choisi de faire varier le pourcentage en PEG (m/v) (50%, 40%, 30%, 20%, 10% et 5%) ainsi que le temps de contact de celui-ci avec les cellules (2, 5, 10, 15, 30 et 60 minutes).

Ces expériences ont été menées sur les souches *M. pneumoniae* M129 et en parallèle *M. pneumoniae* FH. Nous avons obtenu des colonies sur boîte pour toutes les conditions testées (Tables 15-20).

Nous avons observé que les efficacités de transformation les plus hautes étaient systématiquement obtenues avec le PEG 30% ou/et 40%, et ceci quel que ce soit le temps de contact (5, 10, 15, 30 et 60 minutes) et quelle que ce soit la souche (M129 vs FH). L'utilisation

Table 17. Effets de la concentration en PEG₆₀₀₀ sur la transformation de *M. pneumoniae* au PEG. Les essais ont été réalisés avec un temps de contact des cellules avec le PEG₆₀₀₀ de 10 minutes.

Pourcentage en PEG ₆₀₀₀ (m/v)	Efficacité de transformation (tfs/UFC/μg)	
	<i>M. pneumoniae</i> M129	<i>M. pneumoniae</i> FH
40%	4 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵
30%	2 x 10 ⁻⁶	7 x 10 ⁻⁶
20%	9 x 10 ⁻⁷	5 x 10 ⁻⁶
10%	8 x 10 ⁻⁷	4 x 10 ⁻⁶
5%	7 x 10 ⁻⁷	9 x 10 ⁻⁷

Table 18. Effets de la concentration en PEG₆₀₀₀ sur la transformation de *M. pneumoniae* au PEG. Les essais ont été réalisés avec un temps de contact des cellules avec le PEG₆₀₀₀ de 15 minutes.

Pourcentage en PEG ₆₀₀₀ (m/v)	Efficacité de transformation (tfs/UFC/μg)	
	<i>M. pneumoniae</i> M129	<i>M. pneumoniae</i> FH
40%	8 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵
30%	1 x 10 ⁻⁶	3 x 10 ⁻⁵
20%	9 x 10 ⁻⁸	8 x 10 ⁻⁶
10%	1 x 10 ⁻⁶	3 x 10 ⁻⁶
5%	9 x 10 ⁻⁷	6 x 10 ⁻⁷

Table 19. Effets de la concentration en PEG₆₀₀₀ sur la transformation de *M. pneumoniae* au PEG. Les essais ont été réalisés avec un temps de contact des cellules avec le PEG₆₀₀₀ de 30 minutes.

Pourcentage en PEG ₆₀₀₀ (m/v)	Efficacité de transformation (tfs/UFC/μg)	
	<i>M. pneumoniae</i> M129	<i>M. pneumoniae</i> FH
50%	9 x 10 ⁻⁷	5 x 10 ⁻⁶
40%	1 x 10 ⁻⁵	8 x 10 ⁻⁵
30%	3 x 10 ⁻⁶	8 x 10 ⁻⁵
20%	7 x 10 ⁻⁶	4 x 10 ⁻⁵
10%	3 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁶
5%	7 x 10 ⁻⁷	6 x 10 ⁻⁷

Table 20. Effets de la concentration en PEG₆₀₀₀ sur la transformation de *M. pneumoniae* au PEG. Les essais ont été réalisés avec un temps de contact des cellules avec le PEG₆₀₀₀ de 60 minutes.

Pourcentage en PEG ₆₀₀₀ (m/v)	Efficacité de transformation (tfs/UFC/μg)	
	<i>M. pneumoniae</i> M129	<i>M. pneumoniae</i> FH
40%	6 x 10 ⁻⁶	8 x 10 ⁻⁵
30%	3 x 10 ⁻⁶	5 x 10 ⁻⁵
20%	6 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵
10%	2 x 10 ⁻⁶	4 x 10 ⁻⁶
5%	3 x 10 ⁻⁶	2 x 10 ⁻⁶

d'un PEG plus concentré (PEG 50%) n'a pas permis d'augmenter cette efficacité. De même, plus le pourcentage en PEG diminuait, plus l'efficacité de transformation était faible. Pour chaque pourcentage en PEG, nous avons observé que l'efficacité de transformation semble être maximale pour un temps de contact de 15-30 minutes. Pour *M. pneumoniae* M129 (1×10^{-5} tfs/UFC/ μ g) et *M. pneumoniae* FH (8×10^{-5} tfs/UFC/ μ g), les meilleures efficacités ont toutes deux été calculées avec le PEG 40% et un temps d'incubation de 30 minutes.

Nous aurions voulu tester l'influence de la masse molaire du PEG (PEG₂₀₀ à PEG_{20 000}) mais nous n'avons pas pu réaliser ces expériences par manque de temps. Les résultats actuels suggèrent que le traitement au PEG optimal semble être un traitement au PEG₆₀₀₀ 40%, avec une durée de contact de 15 à 30 minutes.

1. 6. Autres observations

En plus des paramètres évoqués ci-dessus, nous avons souhaité apporter d'autres améliorations au protocole de transformation au PEG. Ces modifications sont en lien avec le caractère agrégatif de *M. pneumoniae*. Nous avons donc voulu optimiser certaines étapes afin de limiter au maximum la formation d'amas cellulaires, afin que les cellules restent le plus accessibles possible à l'ADN.

Initialement, les cellules étaient récoltées puis soumises à une succession d'étapes de lavages et de centrifugations, avant d'être traitées à la trypsine. Cette centrifugation avait tendance à agréger les cellules les unes aux autres, un phénomène mis en lumière par la difficulté à remettre en suspension les culots de cellules. Nous avons donc décidé d'éliminer ces étapes et de traiter les cellules à la trypsine directement après leur récolte.

Toujours dans un souci de limiter la formation de ces amas cellulaires avant l'étape de transformation, nous avons également ajouté une étape de passage des cellules dix fois dans une aiguille de 26 Gauge, juste après les 45 minutes d'incubation dans le CaCl₂. Cette étape permet de fragmenter les agrégats qui ont pu se former lors des étapes précédentes de centrifugation ou même lors de l'incubation dans le CaCl₂.

Ces deux améliorations ont été apportées dans l'objectif de perfectionner la façon dont les cellules sont préparées, afin que la réaction de transformation se fasse dans les meil-

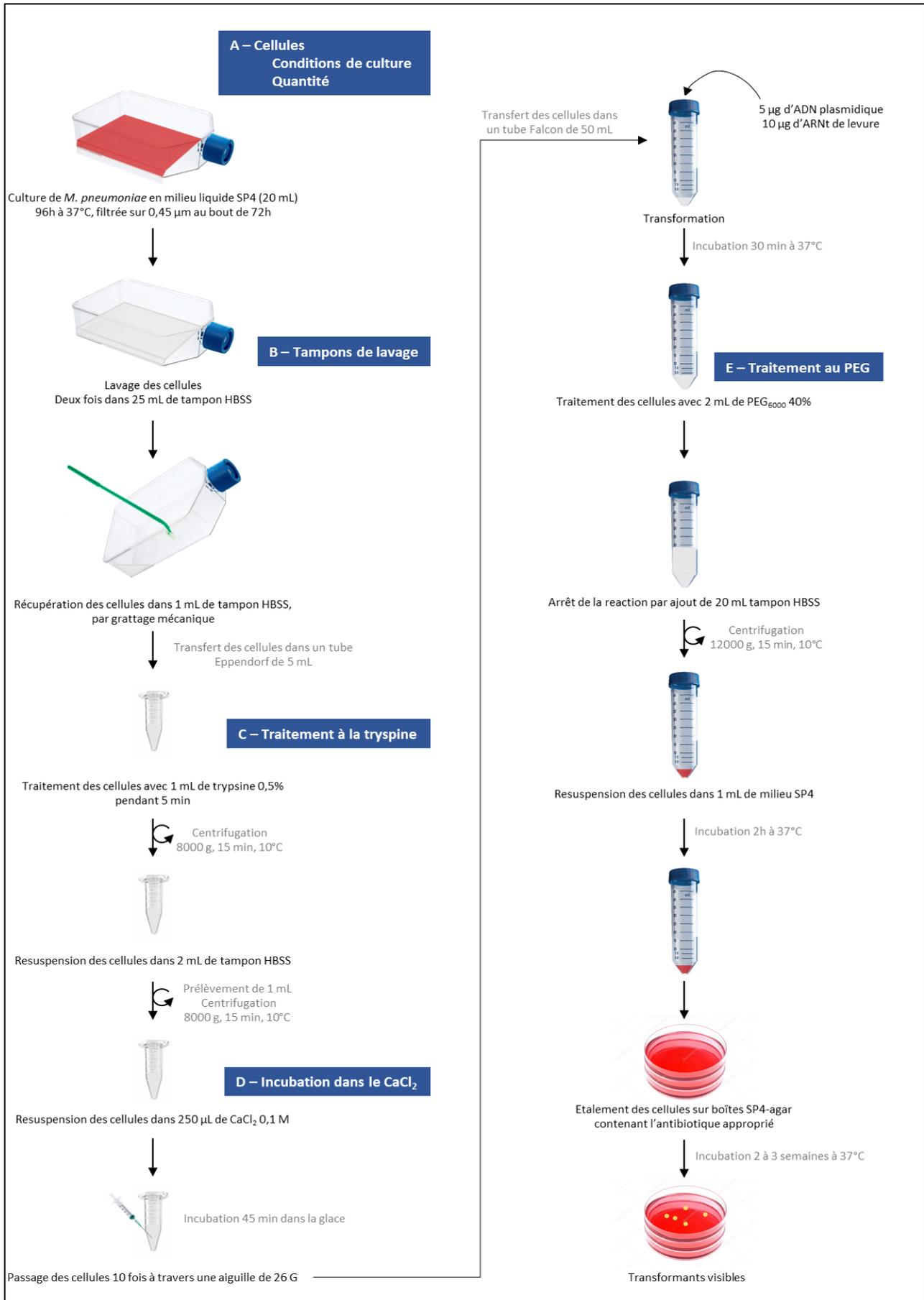


Figure 77. Schéma illustrant en détail les étapes du protocole optimisé de transformation au PEG de *M. pneumoniae*. Les lettres encadrées en bleu (A, B, C, D et E) correspondent aux paramètres qui ont été étudiés.

-leures conditions possibles et soit également la plus reproductible possible. En effet, nous avons noté sur l'ensemble des manipulations réalisées que les résultats avaient tendance à fluctuer. Elles font aujourd'hui parti de la version optimisée du protocole de transformation de *M. pneumoniae* au PEG.

1. 7. Protocole optimisé de transformation au PEG

L'étude des nombreux paramètres décrits ci-dessus nous a permis de mettre au point un protocole efficace de transformation au PEG pour *M. pneumoniae*. Ce protocole est décrit de manière détaillée dans la section « Matériels et méthodes, 3. Outils de manipulation génétique du génome de *Mycoplasma pneumoniae*, Transformation de *Mycoplasma pneumoniae* au polyéthylène glycol (PEG) » et est illustré en Figure 77.

Brièvement, des tapis cellulaires homogènes et sans agrégats sont obtenus au bout de quatre jours de culture (Figure 77 A). La quantité de cellules issues d'une culture de *M. pneumoniae* permet de réaliser deux essais de transformation. Les cellules sont lavées avec le tampon HBSS (Figure 77 B), puis récoltées et traitées avec 0,25% de trypsine pendant 5 minutes (Figure 77 C). Elles sont ensuite incubées dans du CaCl₂ 0,1M pendant 45 minutes (Figure 77 D). Pour limiter au maximum l'agrégation des cellules entre elles, les cellules sont passées dix fois dans une aiguille de 26 Gauge. Pour finir, l'étape de transformation est réalisée en traitant les cellules avec du PEG₆₀₀₀ 40% pour une durée de contact de 30 minutes (Figure 77 E).

Le protocole de transformation au PEG que nous avons développé au cours de ces travaux permet de transformer les souches *M. pneumoniae* M129 et FH avec une efficacité de transformation pouvant atteindre environ 1×10^{-5} tfs/UFC/ μ g et 8×10^{-5} tfs/UFC/ μ g, respectivement. Des essais ont également été réalisés sur la souche *M. pneumoniae* M129-B170 non adhérente, les efficacités de transformation sont de l'ordre de 4×10^{-6} tfs/UFC/ μ g.

Ainsi, la méthode pour transformer *M. pneumoniae* au PEG a été mise point et optimisée. A ce stade, les efficacités de transformation obtenues avec un plasmide semblaient suffisamment élevées pour amorcer des expériences de transplantation de génomes entiers. L'étape suivante était donc d'appliquer ce protocole de transformation en utilisant comme

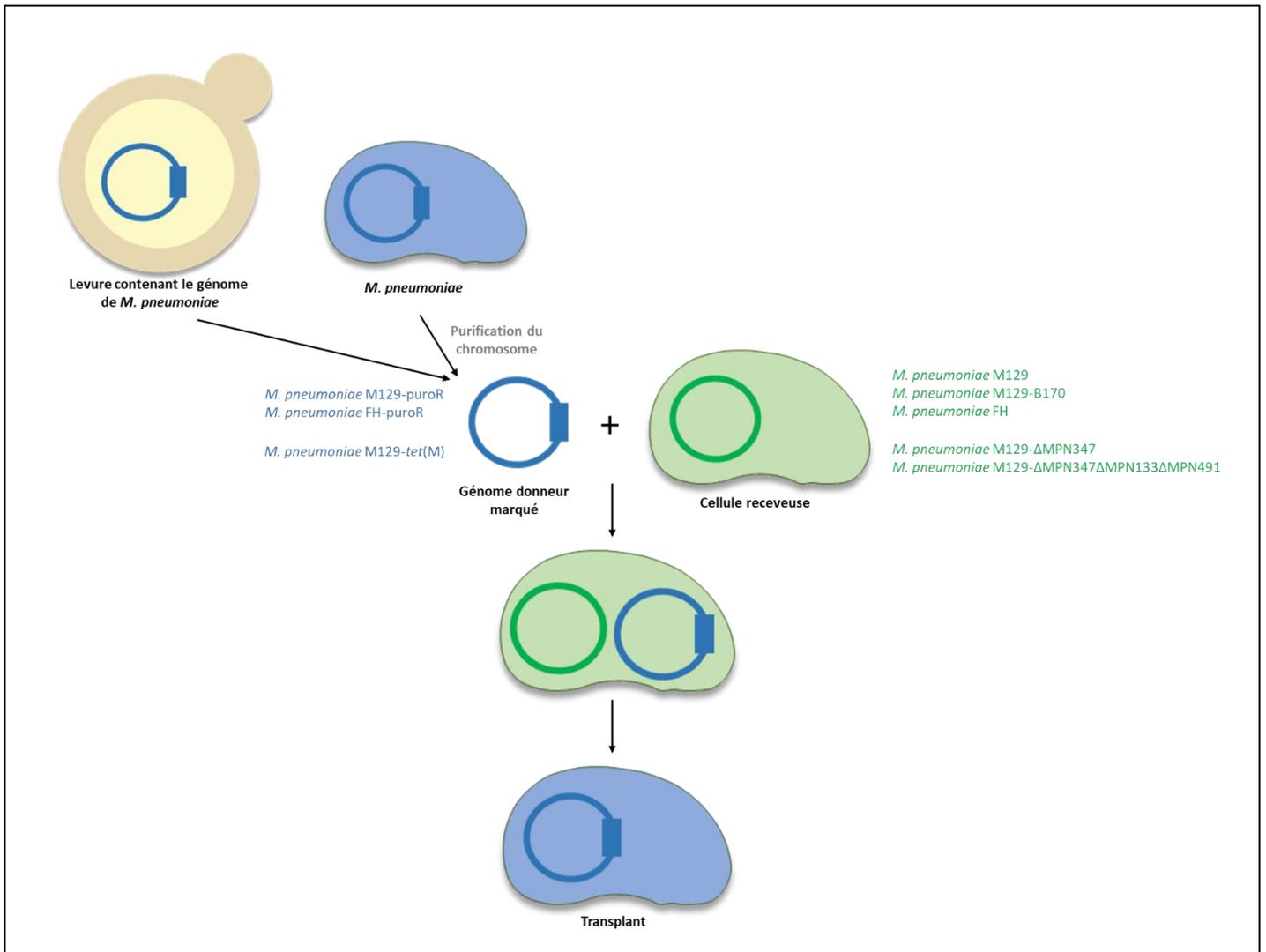


Figure 78. Schéma illustrant le processus de transplantation de génome. Un génome donneur est « injecté » dans une cellule receveuse, la cellule receveuse se transforme en une nouvelle cellule, adoptant toutes les caractéristiques génotypiques et phénotypiques qui lui sont dictées par le génome donneur. Ceci conduit à l'obtention d'une cellule modifiée (transplant). Sont indiqués sur le schéma les génomes donneurs et les cellules receveuses qui ont été utilisés lors des essais de transplantation.

ADN donneur, non plus un plasmide, mais le chromosome complet de *M. pneumoniae* isolé et intact.

2. TRANSPLANTATION DU GENOME DE *M. PNEUMONIAE*

Le processus de transplantation de génome consiste à introduire le génome purifié d'une cellule A (génome donneur) dans une cellule B (cellule receveuse). Une fois transplanté, le génome donneur remplace le génome de la cellule receveuse et devient le nouveau programme de la cellule. La cellule B « se transforme » alors en cellule A, adoptant ainsi toutes les caractéristiques génotypiques et phénotypiques qui lui sont dictées par le génome donneur (Figure 78) (Lartigue *et al.*, 2007, 2009). Maitriser cette technique de transplantation pour *M. pneumoniae* nous permettrait de transplanter les génomes que nous avons édités dans la levure au cours du chapitre I, de façon à obtenir les châssis cellulaires souhaités. En amont des premiers essais de transplantation, il nous a d'abord fallu identifier quelles cellules receveuses et quels génomes donneurs nous pouvions utiliser.

2. 1. Choix des cellules receveuses et des génomes donneurs potentiels

2. 1. 1. Cellules receveuses

Dans la littérature, il a été démontré qu'une des contraintes principales à la réussite du processus de transplantation est la distance phylogénétique qui sépare le génome donneur et la cellule receveuse (Labroussaa *et al.*, 2016). En effet, il a été observé une corrélation négative entre l'efficacité de transplantation et cette distance phylogénétique. La distance phylogénétique maximale compatible avec la transplantation a été obtenue entre le génome de *Mesoplasma florum* et la cellule receveuse *Mycoplasma capricolum*. Ces derniers partagent 92,47% de similarité sur un « core protéome » de 79 protéines. Sur la base de ces informations, nous avons cherché les espèces les plus proches de *M. pneumoniae* sur l'arbre phylogénétique des *Mollicutes* et avons sélectionné *M. genitalium* et *M. gallisepticum* qui appartiennent au même groupe phylogénétique que *M. pneumoniae* (Figure 1). Nous avons

ensuite déterminé le pourcentage de similarité entre le « core protéome » de *M. pneumoniae* et chacune de ces 2 espèces et avons trouvé que *M. genitalium* et *M. gallisepticum* partageaient respectivement 91,36% et 80,32% de similarité dans leur protéome avec *M. pneumoniae*. Aux vues de ces résultats, nous avons jugé qu'il était, dans un premier temps, trop risqué de tenter une transplantation inter-espèces, et qu'il était plus approprié de commencer nos essais en réalisant une transplantation intra-espèce et garantir ainsi la compatibilité entre cellule receveuse et génome donneur. Pour débiter nos essais de transplantation, nous avons sélectionné cinq souches de *M. pneumoniae* comme cellules receveuses potentielles (Figure 78 en vert) :

Les souches sauvages *M. pneumoniae* M129, FH et M129-B170. Cette dernière étant avirulente et non adhérente (Lipman and Clyde, 1969), nous avons pensé qu'elle pouvait constituer un point de départ intéressant à la construction d'un châssis bactérien avirulent.

Deux mutants de *M. pneumoniae* M129 obtenus au laboratoire par Luis Garcia-Morales, en utilisant une méthode développée au « Centre for Genomic Regulation » par Carlos Piñero-Lambea et confidentielle. Il s'agit de mutants de délétion des gènes *mpn133* et/ou *mpn491*, qui codent pour des nucléases membranaires, ou encore du gène *mpn347*, qui code une enzyme de restriction. Les nucléases membranaires et les restrictases sont considérées comme des barrières potentielles à la transplantation, car elles peuvent dégrader l'ADN donneur avant même qu'il ne pénètre dans la cellule, ou bien alors une fois que celui-ci est en suspension dans le cytoplasme. Nous avons donc pensé qu'il était particulièrement intéressant d'inclure ces mutants dans nos essais de transplantation.

2. 1 .2. Génomes donneurs

Le génome donneur doit contenir un marqueur de résistance à un antibiotique, afin de pouvoir le sélectionner à l'issue de l'expérience de transplantation. Plusieurs génomes donneurs ont été utilisés (Figure 78 en bleu). Nous avons travaillé avec le génome de *M. pneumoniae* M129 et celui de *M. pneumoniae* FH, tous deux marqués avec le gène codant la résistance à la puromycine (souches transformées au laboratoire par électroporation avec le plasmide pMiniTn4001PsPuro). Ces génomes ont été utilisés pour transplanter les souches de *M. pneumoniae* M129 et FH sauvages .

Nous avons également utilisé le génome de *M. pneumoniae* M129 marqué avec le gène codant la résistance à la tétracycline afin de transplanter les mutants nucléases/restrictase évoqués ci-dessus. En effet, ces derniers contiennent déjà le marqueur de résistance à la puromycine. Les génomes donneurs et les cellules receveuses ayant ainsi été identifiées, nous avons pu débiter nos essais de transplantation.

2. 2. Essais de transplantation

Les essais de transplantation ont été réalisés en appliquant le protocole de transformation de *M. pneumoniae* au PEG. Les génomes donneurs ont été préparés en blocs d'agarose à partir des cultures de *M. pneumoniae* correspondantes. Les blocs ont ensuite été traités de façon à obtenir des chromosomes bactériens purs et intacts.

A l'issue du protocole de transformation au PEG, les cellules sont remises en suspension dans 5 mL de milieu SP4, et incubées pendant 4 heures à 37°C dans des flacons de culture cellulaire T-25. Les cellules sont ensuite récoltées par grattage mécanique et diluées dans un volume final de 12,5 mL de milieu SP4 contenant l'antibiotique approprié (puromycine 3 µg/mL ou tétracycline 5 µg/mL). Des volumes de 200 µL sont distribués dans une plaque 96 puits. La plaque est ensuite incubée plusieurs semaines à 37°C.

Dans l'objectif d'identifier les meilleures conditions de transplantation et de maximiser nos chances d'obtenir des transplants, nous avons fait varier quelques paramètres. Nous avons testé différentes concentrations en ADN donneur (de 10 ng/µL à 300 ng/µL), et différents volumes d'ADN donneur (20 µL, 25 µL, 50 µL et 100 µL).

Malgré tous nos efforts, nous n'avons pour l'instant obtenu aucun transplant. En effet, lors des essais réalisés, aucune colonie n'est apparue sur les boîtes de transformation, même après plusieurs semaines d'incubation à 37°C.

3. DISCUSSION

Ces travaux ont permis le développement d'un protocole de transformation de *M. pneumoniae* au PEG. Le protocole a été optimisé en testant de nombreux paramètres, de ma-

-nière à s'approcher d'une efficacité de transformation suffisamment haute pour pouvoir envisager de transplanter des génomes entiers.

Parmi les multiples paramètres analysés, certains semblent jouer un rôle plus important que d'autres. Par exemple, la nature du tampon de lavage des cellules a un impact non négligeable sur l'efficacité de la méthode. En effet, lorsque nous avons utilisé un tampon HEPES- Saccharose, nous avons obtenu une efficacité de transformation bien inférieure à celle obtenue avec les autres tampons testés. Le tampon le plus approprié semble être le tampon HBSS, ce qui n'est pas étonnant puisqu'il s'agit d'un tampon couramment utilisé en culture cellulaire. *M. pneumoniae* étant un organisme adhérent, ses conditions de culture se rapprochent parfois de celles des cultures cellulaires eucaryotes. Un autre paramètre qui s'est révélé être important est le traitement des cellules à la trypsine avant transformation. Le plus souvent, les efficacités de transformation sont plus élevées si les cellules ont été traitées à la trypsine. Cela semble cohérent avec le fait que les cellules *M. pneumoniae* agrègent énormément entre elles. La trypsine aide certainement à séparer les cellules les unes des autres, ce qui augmente ainsi la surface cellulaire disponible pour « capter » l'ADN entrant. Un autre facteur important est l'incubation des cellules dans le CaCl_2 0,1 M avant transformation. Nous avons observé une réelle diminution de l'efficacité de transformation lorsque nous avons tenté de supprimer cette étape. Nous pensions « neutraliser » l'activité des nucléases membranaires (dépendantes du calcium) en éliminant le CaCl_2 , mais visiblement l'importance des rôles joués par le CaCl_2 dans la réaction de transformation reste prédominante. Le rôle du PEG a également été étudié. La meilleure efficacité de transformation a été observée avec du PEG₆₀₀₀ à une concentration de 40%. Au-delà (PEG 50%) l'efficacité est plus faible, et lorsque le pourcentage en PEG diminue (de 30% à 5%), l'efficacité diminue elle-aussi progressivement. Un temps de contact des cellules avec le PEG compris entre 15 et 30 minutes semble être le plus adapté. Cependant, nous notons ici que le pourcentage en PEG et le temps de contact ne semblent pas non plus déterminants, dans le sens où même si nous avons observé de légères variations de l'efficacité de transformation, les résultats ne sont pas non plus drastiquement différents. Chez *M. hominis* par exemple (Rideau *et al*, manuscrit en préparation), en dehors des conditions appropriées (PEG concentré entre 40% et 60%, temps de contact compris entre 10 minutes et une heure), aucune colonie sur boîte n'était obtenue. Chez *M. pneumoniae* les résultats ne sont pas aussi marqués. Cette absence de réel écart dans les efficacités de transformation est un phénomène

que nous avons également observé lorsque nous avons étudié la quantité de cellules transformées. En effet, doubler la quantité de cellules semble moins bénéfique, mais cela n'affecte pas non plus grandement l'efficacité de transformation.

D'autres paramètres ont été étudiés mais n'ont pas directement été corrélés avec l'efficacité de transformation. Il s'agit des conditions de culture, de l'élimination des étapes de centrifugation au début du protocole de transformation, et de l'ajout de l'étape de passage des cellules dans une aiguille. Au début de ces travaux, nous ne savions pas particulièrement bien manipuler *M. pneumoniae*. Nous avons cependant observé le fort caractère agrégatif de cet organisme. Nous avons également noté un manque de reproductibilité dans nos expériences, probablement lié à cette tendance à l'agrégation des cellules de *M. pneumoniae*. Ces améliorations ont donc été apportées dans l'optique d'améliorer notre façon de traiter les cellules afin de nous affranchir de cette agrégation des cellules entre elles, et ainsi d'optimiser les conditions de transformation.

L'étude de ces différents paramètres nous a permis d'élaborer un protocole de transformation au PEG de *M. pneumoniae*. Nous sommes capables de transformer différentes souches de *M. pneumoniae* (M129, FH et M129-B170) avec une efficacité de transformation pouvant aller jusqu'à 6×10^{-5} tfs/UFC/ μg d'ADN plasmidique pour la souche M129, jusqu'à 8×10^{-5} tfs/UFC/ μg d'ADN plasmidique pour la souche FH, et jusqu'à 4×10^{-6} tfs/UFC/ μg d'ADN plasmidique pour la souche M129-B170. Cette efficacité est très proche de celle obtenue au laboratoire en électroporation (3×10^{-5} transformants/CFU/ μg de plasmide) avec le plasmide pMiniTn4001PsPuro. Ce chiffre témoigne donc du succès de la mise au point de la méthode de transformation au PEG. Ce résultat est d'autant plus encourageant que le PEG de haut poids moléculaire est décrit comme cytotoxique dans la littérature (Prakash and Gabridge, 1981; Hedreyda, Lee and Krause, 1993).

Néanmoins, il s'agit de premiers essais qui méritent d'être répétés, afin de confirmer les observations énoncées ci-dessus. En effet, la plupart des expériences ont été réalisées une seule fois, et quelques-unes deux ou trois fois. Afin d'établir un protocole fiable et reproductible, il serait nécessaire que ces essais soient effectués au minimum en trois réplicats biologiques. Par manque de temps, nous ne sommes pas allés plus loin dans l'optimisation de la technique de transformation de *M. pneumoniae* au PEG. Il serait intéressant de pouvoir analyser d'autres paramètres afin de voir si nous pourrions augmenter encore l'efficacité de transformation. Si nous revenons sur la nature du PEG, les essais ont été réalisés avec du

PEG₆₀₀₀. Or c'est le PEG₈₀₀₀ qui est utilisé pour transformer d'autres mycoplasmes comme *M. mycoides* subsp. *mycoides*, *M. capricolum*, *M. gallisepticum*, *M. pulmonis* et *M. hominis* (Mahairas and Minion, 1989; King and Dybvig, 1991; Rideau, 2018). Nous pourrions donc envisager de faire des essais de transformation de *M. pneumoniae* avec du PEG₈₀₀₀. D'autre part, comme évoqué ci-dessus, le PEG de haut poids moléculaire est décrit comme étant cytotoxique pour *M. pneumoniae*. Il serait donc également intéressant de réaliser des essais de transformation avec du PEG de plus faible poids moléculaire, tel que le PEG₁₅₀₀, PEG₁₀₀₀, PEG₆₀₀, PEG₄₀₀ ou PEG₂₀₀. Un autre paramètre important est la quantité d'ADN plasmidique. Nous avons réalisé nos essais avec une quantité fixe de 5 µg de plasmide, mais nous pourrions aussi faire varier cette quantité. Un travail pourrait également être mené sur le plasmide utilisé lors des essais de transformation. En effet, nous pourrions remplacer le promoteur actuellement utilisé (promoteur du gène codant la spiruline de *S. citri*) par un promoteur endogène de *M. pneumoniae*, ou encore de *M. genitalium* (tel que le P438). La construction ou l'utilisation d'un promoteur synthétique pourrait également être envisagé (Montero-Blay *et al.*, 2019). Si l'utilisation de ces différents promoteurs se révèle avoir un effet positif sur l'efficacité de transformation, nous pourrions alors envisager de les utiliser pour la construction des cassettes servant à marquer les génomes à transplanter. Nous pourrions également nous intéresser au stade de croissance cellulaire de *M. pneumoniae* au moment de la transformation, et ainsi tester d'autres stades de croissance.

La transplantation de génome entier n'est à ce jour pas encore effective chez *M. pneumoniae*. Cependant, de nombreux paramètres restent encore à étudier. Toutes les optimisations possibles du protocole de transformation, évoquées ci-dessus, aideront peut-être à lever ce verrou qu'est la transplantation.

Une autre voie à creuser pourrait être le choix de la cellule receveuse. En effet, nous avons inclus dans nos essais les mutants nucléases/restrictase *M. pneumoniae* M129 $\Delta mpn347$ et *M. pneumoniae* M129 $\Delta mpn347\Delta mpn133\Delta mpn491$. Nous pourrions inclure dans nos essais les mutants simples $\Delta mpn133$ et $\Delta mpn491$, ainsi que les différentes combinaisons de mutants doubles, $\Delta mpn133\Delta mpn491$, $\Delta mpn347\Delta mpn133$ et $\Delta mpn347\Delta mpn491$. Nous pourrions également obtenir les mutants correspondants pour les souches *M. pneumoniae* FH et M129-B170. Une autre stratégie serait de protéger l'ADN entrant des systèmes de restric-

-tion/modification. Il pourrait être intéressant d'essayer de méthyler l'ADN *in vitro* avec des extraits cellulaires de la cellule *M. pneumoniae* receveuse (Lartigue *et al.*, 2009).

Nous pourrions également envisager de travailler sur la transplantation inter-espèces, même si celle-ci semble plus risquée. Des essais ont été amorcés avec *M. genitalium*, qui est phylogénétiquement l'organisme le plus proche de *M. pneumoniae*. Il présente également l'avantage de ne pas avoir de gène codant pour une restrictase. *M. gallisepticum* pourrait également être un bon candidat pour les essais de transplantation. Il est phylogénétiquement plus distant, mais certaines souches ne disposent pas de système de restriction/modification. Il s'agit d'un mycoplasme non adhérent, qui se cultive donc plus facilement en suspension, et qui pousse plus rapidement (temps de génération de 2 heures). Un protocole de transformation au PEG a déjà été développé pour *M. gallisepticum*, et des plasmides réplicatifs ont été construits (Lee, Browning and Markham, 2008). Ceci en fait donc un organisme chez lequel il peut sembler plus facile de travailler.

M. pneumoniae et *M. genitalium* sont des mycoplasmes dotés d'un cytosquelette (Balish and Krause, 2006; Mayer, 2006; García-Morales *et al.*, 2016; Miyata and Hamaguchi, 2016). Cette structure pourrait constituer une barrière physique à l'entrée de l'ADN dans les cellules. Il serait donc intéressant de tester, en tant que cellules receveuses, des mutants de délétion (*M. pneumoniae* et *M. genitalium*) pour certaines protéines du cytosquelette.

Ainsi, de nombreuses pistes sont encore envisageables pour arriver à élaborer un protocole de transplantation chez *M. pneumoniae*. Ce travail se poursuit et de nombreuses expériences sont en cours au laboratoire pour atteindre cet objectif.

CHAPITRE 3

Genomic Transfer – Recombinase-Mediated Cassette Exchange (GT-RMCE)

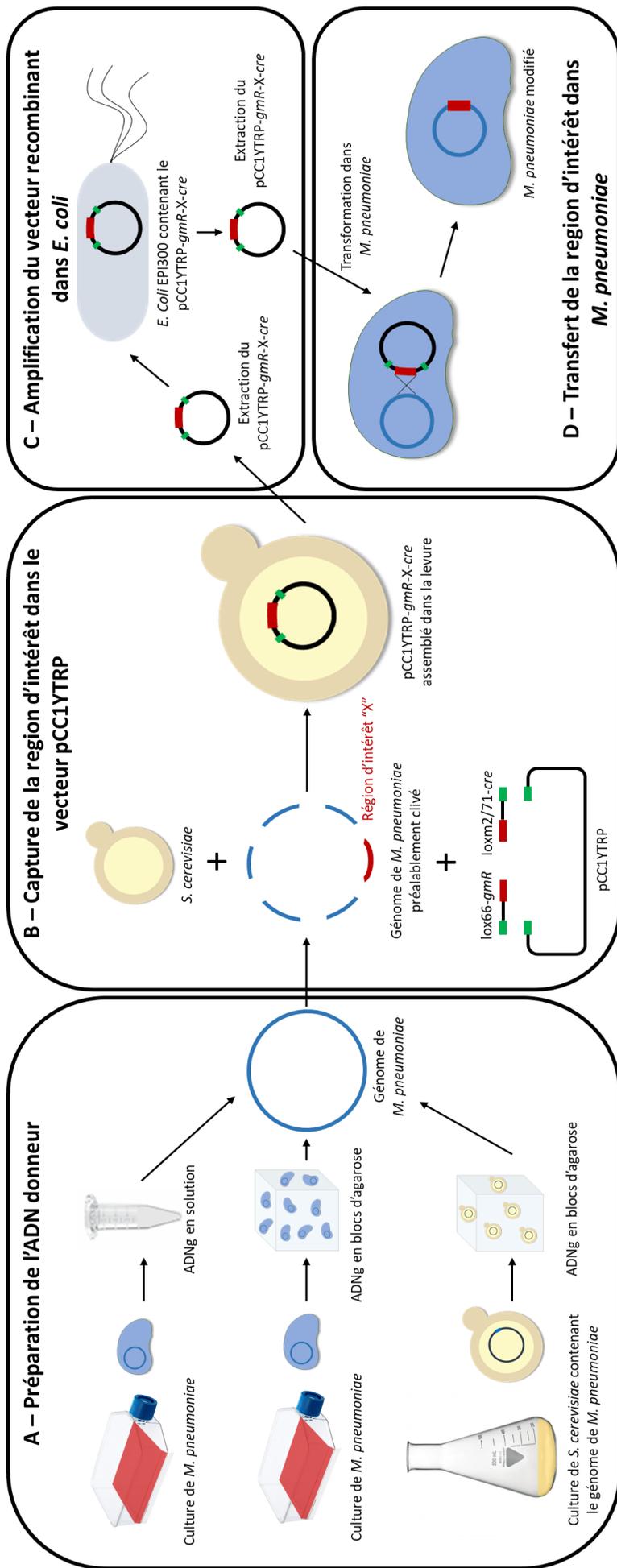


Figure 79. Schéma illustrant la technique du GT-RMCE. (A) L'ADN génomique de *M. pneumoniae* peut provenir de différentes sources. Il peut être extrait en solution à partir d'une culture de *M. pneumoniae* (en utilisant un kit ou le protocole d'extraction au phénol-chloroforme), isolé dans des blocs d'agarose à partir d'une culture de *M. pneumoniae*, ou bien préparé en blocs d'agarose à partir d'une culture de levure contenant le génome de *M. pneumoniae*. Cet ADN est fragmenté par clivage mécanique ou enzymatique afin de préparer l'étape suivante. (B) La levure est co-transformée avec l'ADNg clivé, le vecteur pCC1YTRP linéarisé au site HpaI, et les cassettes lox66-gmR et loxm2/71-cre produites par PCR. Le plasmide pCC1YTRP-gmR-X-cre est alors assemblé par le système de recombinaison homologue de la levure, permettant ainsi la capture de la région d'intérêt « X » dans le vecteur. (C) Le vecteur pCC1YTRP-gmR-X-cre est extrait puis transformé dans la souche *E. coli* EPI300 afin d'être amplifié et de nouveau purifié. (D) Le vecteur pCC1YTRP-gmR-X-cre est transformé dans *M. pneumoniae*, permettant ainsi le transfert de la région X dans le génome bactérien. Une souche de *M. pneumoniae* modifiée est alors obtenue.

RÉSULTATS - CHAPITRE 3 : GENOMIC TRANSFER – RECOMBINASE-MEDIATED CASSETTE EXCHANGE

Notre objectif est de développer des outils de biologie de synthèse qui permettent de modifier à grande échelle le génome de *M. pneumoniae*, afin de pouvoir en faire un châssis bactérien. Face au manque d'outils génétiques disponibles pour cet organisme, nous avons choisi d'utiliser la levure *S. cerevisiae* comme plateforme d'édition de génome. Pour rappel, ce cycle d'ingénierie nécessite de cloner le génome bactérien dans la levure afin d'utiliser les outils de manipulation génétique disponibles chez cet hôte, puis de transplanter le génome modifié dans une cellule receveuse appropriée afin de créer un organisme mutant.

Dans le chapitre I, nous avons cloné et modifié le génome de *M. pneumoniae* dans la levure. Au cours du chapitre II, nous avons tenté de développer un protocole de transplantation en étudiant la transformation de plasmides dans *M. pneumoniae* grâce au PEG. Cependant, après avoir appliqué ce protocole sur plusieurs souches receveuses potentielles, nous n'avons pas réussi à effectuer la transplantation de génome, dernière étape nécessaire à l'obtention d'une cellule *M. pneumoniae* modifiée.

L'objectif de ce chapitre III est donc de proposer une stratégie alternative à la transplantation de génome qui permettrait de manipuler à grande échelle le génome de *M. pneumoniae*. Pour cela, nous avons imaginé puis développé une stratégie appelée Genomic Transfer – Recombinase-Mediated Cassette Exchange (GT-RMCE). Cette méthode permet de transférer non pas le génome entier de *M. pneumoniae*, mais des portions de ce génome de la levure vers la bactérie à éditer. Dans cette stratégie les portions de génomes peuvent provenir aussi bien d'ADN génomique extrait à partir d'une culture de *M. pneumoniae* (ADNg en solution ou inclus dans des blocs d'agarose) que d'une culture de levure hébergeant le génome de *M. pneumoniae* (Figure 79 A).

Le GT-RMCE est une combinaison de plusieurs procédés développés par d'autres groupes : le TAR-cloning (Transformation-Associated Recombination-cloning) qui utilise la capacité de la levure à capturer des fragments d'ADN dans un vecteur par recombinaison homologue (Noskov *et al.*, 2001; Kouprina and Larionov, 2016), et le RMCE qui est une technologie basée sur un système de recombinaison site-spécifique (le système Cre-Lox dans

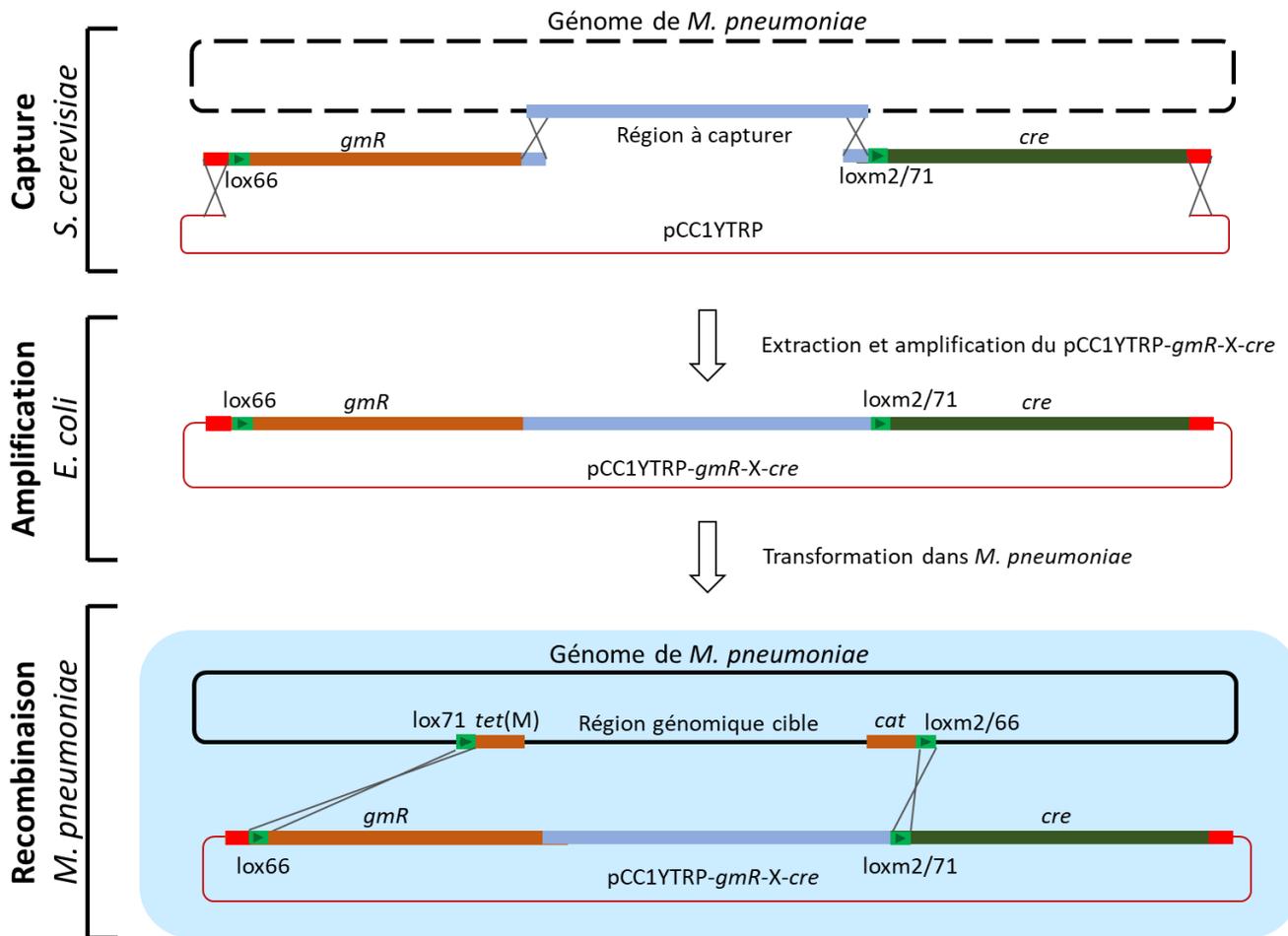


Figure 80. Détails des étapes de capture dans la levure, d'amplification dans *E. coli* et de recombinaison dans *M. pneumoniae*. La région d'intérêt du génome de *M. pneumoniae* (région X) est capturée dans le vecteur navette pCC1YTRP, dans la levure. Pour cela, la levure est co-transformée avec le plasmide pCC1YTRP linéarisé, une cassette lox66-gmR, une cassette loxm2/71-cre, et l'ADN génomique fragmenté de *M. pneumoniae*. Grâce à la présence de régions homologues à chaque extrémité des différents fragments d'ADN, le système de recombinaison homologue de la levure permet l'assemblage du plasmide pCC1YTRP-gmR-X-cre. Ce dernier est transformé dans *E. coli* afin d'être amplifié en quantité suffisante. Enfin, le plasmide pCC1YTRP-gmR-X-cre est transformé dans *M. pneumoniae*, dont le génome a été préalablement marqué avec deux « landing pads ». Grâce au système Cre-lox, la région X est alors « échangée » dans le génome bactérien, au niveau des landing pads. Il en résulte une cellule *M. pneumoniae* modifiée.

notre cas) permettant l'échange de *loci* entre deux molécules d'ADN (Langer *et al.*, 2002; Turan *et al.*, 2011; Noskov *et al.*, 2015).

1. PRINCIPE GENERAL DU GT-RMCE

Le GT-RMCE est un outil qui permet de capturer dans la levure, à l'aide d'un vecteur navette, des portions du génome de *M. pneumoniae*. Ce vecteur navette est ensuite transformé dans *M. pneumoniae*, et grâce au système de recombinaison Cre-lox la région capturée est introduite dans le génome *M. pneumoniae*. Plus précisément, la méthode que nous avons développée est composée des étapes suivantes :

Capture dans la levure de la région d'intérêt du génome de *M. pneumoniae* (Figure 79 B et Figure 80). La capture de la région d'intérêt est réalisée dans le plasmide pCC1YTRP, un vecteur navette de type BAC que l'on peut cloner à la fois dans la levure et dans *E. coli*. Il contient les éléments levure ARSH4, CEN6 et TRP1, symbolisés par la lettre « Y » (pour Yeast) dans le nom du plasmide. Un descriptif plus complet ainsi que la carte de ce plasmide sont donnés dans la section « Matériels et méthodes, 2. Biologie moléculaire, 2. 1. Plasmides construits au cours de la thèse ». Lors de cette étape, la levure *S. cerevisiae* est transformée avec quatre éléments : (1) le plasmide pCC1YTRP linéarisé, (2) une cassette contenant le gène codant pour la résistance à la gentamycine et le site *lox66* (cassette *lox66-gmR*), (3) l'ADN génomique fragmenté de *M. pneumoniae*, et (4) une cassette contenant le gène codant pour la recombinase Cre et le site *loxm2/71* (cassette *loxm2/71-cre*) (Figure 79 B et Figure 80). Les cassettes *lox66-gmR* et *loxm2/71-cre* contiennent chacune une extrémité de 60 pb identique à leur site d'insertion dans le vecteur pCC1YTRP, et une extrémité de 60 pb identique au site de capture de la région *M. pneumoniae* d'intérêt. Après transformation, les différents fragments sont assemblés par recombinaison homologue dans la levure, et le plasmide recombinant pCC1YTRP-*gmR-X-cre* (X désignant la région du génome de *M. pneumoniae* capturée) est obtenu. A la fin de cette étape, la région de *M. pneumoniae* capturée peut être modifiée si besoin, en utilisant la palette d'outils disponible chez la levure (TREC, TREC-IN, CRISPR-Cas9).

Amplification du vecteur recombinant (Figure 79 C et Figure 80) : Le plasmide pCC1YTRP-*gmR-X-cre* assemblé dans la levure est purifié, puis transformé dans la souche *E. coli* EPI300 afin d'être propagé et amplifié. La région de *M. pneumoniae* capturée peut être modifiée également à cette étape, en utilisant les outils disponibles chez *E. coli* (lambda Red, RecET, CRISPR-Cas9...), ce qui offre une certaine flexibilité à la méthodologie.

Transfert de la région d'intérêt dans le génome de *M. pneumoniae* (Figure 79 D et Figure 80). Le plasmide pCC1YTRP-*gmR-X-cre*, isolée de la souche *E. coli* EPI300, est finalement transformé dans une souche de *M. pneumoniae* modifiée contenant une séquence dite « landing pad » de chaque côté de la région à éditer. L'insertion de ces landing pads ne peut pas être détaillée dans ce manuscrit car la technologie utilisée, développée par un autre groupe, est à l'heure actuelle non-publiée et confidentielle. Chaque landing pad est composé d'un site *lox* associé à un marqueur de résistance. La région ciblée est donc encadrée par les landing pads *lox71-tet(M)* et *Cat-loxm2/66* (Figure 79 D et Figure 80). Suite à l'action de la recombinase Cre, il y a recombinaison entre les sites *lox66* (plasmide) et *lox71* (chromosome), et entre les sites *loxm2/71* (plasmide) et *loxm2/66* (chromosome) ce qui crée un échange d'ADN entre le génome bactérien et le plasmide pCC1YTRP-*gmR-X-cre*. La région X qui a été modifiée est ainsi introduite dans le génome bactérien, et nous obtenons une cellule *M. pneumoniae* mutante.

Cette approche en 3 étapes peut, en théorie, être utilisée pour insérer de grands fragments ADN dans le génome bactérien, supprimer ou remplacer des gènes cibles, et introduire des mutations ponctuelles. Dans le cadre de cette thèse, elle a été appliquée de façon à démontrer notre capacité à (1) insérer un morceau d'ADN de 15 kpb dans une région cible du génome de *M. pneumoniae* (duplication de l'opéron *s10*), et (2) remplacer une grande région de ce génome (38kb) par une autre modifiée (remplacement de la région *mpn372-mpn400*).

2. CAPTURE D'UNE REGION GENOMIQUE DE *M. PNEUMONIAE* DANS LE VECTEUR PCC1YTRP

La première étape du GT-RMCE est la capture d'une région du génome de *M. pneumoniae* dans pCC1YTRP (Figure 79 B - 80). Cette étape est réalisée dans la levure *S. cere-*

-*visiae* VL6-48N, en suivant le protocole de transformation de sphéroplastes de levure au PEG. Le plasmide pCC1YTRP a été linéarisé par digestion avec l'enzyme HpaI, les cassettes lox66-*gmR* et loxm2/71-*cre* ont été obtenues par PCR à partir des plasmides pMT85Genta et pGmR*cre*, respectivement. L'ADN génomique de *M. pneumoniae*, a été extrait de différentes manières (Figure 79 A) puis fragmenté de façon à créer des cassures double brin à proximité de la région à capturer. En effet, chez la levure, la fréquence des événements de recombinaison est augmentée d'un facteur 20 en présence de cassures double-brin (Leem *et al.*, 2003).

2. 1. Capture de l'opéron *s10*

2. 1. 1. Contexte

Il est rapporté dans la littérature que les bactéries à croissance rapide disposent, par rapport à des bactéries ayant une vitesse de croissance plus lente : (i) d'un nombre supérieur d'opérons codants pour des ARN ribosomiques (ARNr), (ii) d'un nombre plus élevé de copies des gènes codant pour des ARN de transfert (ARNt) et (iii) d'une plus grande abondance de protéines ribosomiques (Rocha, 2004; Vieira-Silva and Rocha, 2010). Il n'est donc pas surprenant de ne trouver chez *M. pneumoniae* (temps de génération d'~10h) qu'un seul opéron codant pour des ARNr, contre 7 et 10 pour des espèces telles que *E. coli* (temps de génération ~20 min.) et *B. subtilis* (temps de génération ~26 min.), respectivement. De même, 34 ARNt sont présents chez *M. pneumoniae* (codés par 37 gènes). En comparaison, *B. subtilis* exprime 33 ARNt codés par 86 gènes, et *E. coli* 45 ARNt codés par 89 gènes (thèse Carolina Gallo, 2017).

Les travaux de thèse de Carolina Gallo réalisés au « Centre for Genomic Regulation » ont démontré chez *M. pneumoniae* (i) qu'une augmentation du nombre de copies de l'opéron codant pour des ARNr (passage d'une copie à 3 copies) permet une diminution du temps de doublement de 0,21 heure et (ii) qu'une duplication des gènes codant les ARNt (passage de 37 copies à un nombre de 74 copies) permet une diminution du temps de doublement de 0,19 heure. Un effet cumulatif de ces deux modifications a également été observé. En effet, un mutant *M. pneumoniae* contenant à la fois un plus grand nombre d'opérons ARNr et un plus

grand nombre de copies des gènes codant pour les ARNt a permis d'obtenir une diminution du temps de doublement de 0,48 heure.

Au cours de ces travaux de thèse, l'effet de l'augmentation du nombre de protéines ribosomiques n'a pas été étudié. Or une étude menée récemment chez *Vibrio cholerae* a montré que le repositionnement de l'opéron *s10* (opéron codant majoritairement pour des protéines ribosomiques) à proximité de l'origine de réplication avait pour conséquence d'augmenter la vitesse de croissance de cet organisme, en condition optimale de culture (Soler-Bistué *et al.*, 2015; Soler-Bistué, Timmermans and Mazel, 2017). Nous avons donc supposé que rajouter une copie de cet opéron *s10* chez *M. pneumoniae*, tout en plaçant cette copie supplémentaire le plus proche possible de l'origine de réplication, pourrait avoir un impact positif sur sa vitesse de croissance. Outre les 24 gènes codant 24 des 50 protéines ribosomiques présentes chez *M. pneumoniae* (Himmelreich *et al.*, 1996), cet opéron contient également les gènes codant la sous-unité alpha de l'ARN polymérase ADN dépendante (RpoA), la sous-unité SecY de la préprotéine translocase, la méthionine aminopeptidase 2 (MAP), le facteur d'initiation de la traduction IF-1 (InfA), et l'adénylate kinase (ADK).

2. 1. 2. Expérience de capture

Lors de la première expérience de capture, nous avons décidé d'utiliser une extraction d'ADN génomique (ADNg) de *M. pneumoniae* comme source d'ADN. Celui-ci a été extrait en suivant différents protocoles, afin de déterminer si une des méthodes d'extraction pouvait générer un ADN plus propice à l'expérimentation. L'ADNg de *M. pneumoniae* a été extrait en utilisant soit : (a) un protocole d'extraction au phénol-chloroforme, (b) le kit MagAttract HMW DNA de Qiagen, et (c) le kit NucleoBond® AXG Columns - Buffer Set III de Macherey-Nagel.

Un autre paramètre que nous avons fait varier est la manière de traiter cet ADNg avant la transformation. En effet, le système de recombinaison homologue de la levure étant plus efficace sur un fragment d'un ADN linéaire (Orr-Weaver, Szostak and Rothstein, 1981; Noskov *et al.*, 2002; Leem *et al.*, 2003), nous avons décidé d'introduire des cassures double brins sur le génome de *M. pneumoniae*, de préférence à proximité de la région que nous souhaitons capturer dans le vecteur pCC1YTRP. Nous avons comparé deux manières de procéder. La première technique que nous avons utilisée a été de digérer l'ADNg de *M. pneumoniae* avec

Table 21. Capture de l'opéron *s10* de *M. pneumoniae* dans le vecteur pCC1YTRP – Expérience 1.
 Nombre de clones positifs obtenus après analyse en PCR et PCR multiplex, en fonction des différentes conditions testées.

Protocole d'extraction d'ADN génomique	Fragmentation de l'ADN	Quantité d'ADN génomique (µg)	Nombre de clones positifs
Kit « NucleoBond® AXG Columns - Buffer Set III » de chez Macherey-Nagel	Sall	1,5	3
	Sall	3	1
	Pipetage – 0X	1,5	0
	Pipetage – 0X	3	0
	Pipetage – 18X	1,5	0
	Pipetage – 18X	3	0
	Pipetage – 22X	1,5	0
	Pipetage – 22X	3	0
Kit « MagAttract HMW DNA » de chez Quiagen	Sall	1,5	0
	Sall	3	0
	Pipetage – 0X	1,5	0
	Pipetage – 0X	3	0
	Pipetage – 18X	1,5	0
	Pipetage – 18X	3	0
	Pipetage – 22X	1,5	0
	Pipetage – 22X	3	0
Protocole d'extraction au phénol-chloroforme	Sall	1,5	0
	Sall	3	0
	Pipetage – 0X	1,5	0
	Pipetage – 0X	3	0
	Pipetage – 18X	1,5	0
	Pipetage – 18X	3	0
	Pipetage – 22X	1,5	0
	Pipetage – 22X	3	0

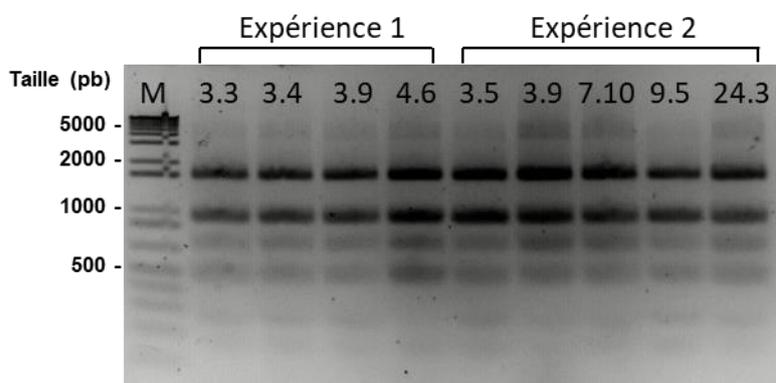


Figure 81. Capture de l'opéron *s10* de *M. pneumoniae* dans le vecteur pCC1YTRP.
 Validation en PCR multiplex du profil du plasmide pCC1YTRP-*gmR-s10-cre* pour les clones obtenus. M, marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen).

l'enzyme de restriction Sall, car des sites de restriction Sall sont présents de chaque côté de l'opéron *s10* sur le génome bactérien. Une autre manière de faire a été de fragmenter l'ADNg par pipetage. En effet, il a été démontré que pipeter de l'ADN génomique 18 fois permettait d'obtenir des fragments d'environ 100 kb, et que pipeter l'ADN 21 fois permettait d'obtenir des fragments d'environ 50 kpb (Leem *et al.*, 2003). La région que nous souhaitons capturer est d'environ 15 kb, nous avons donc décidé de tester différents nombres de pipetages : 0x, 18x et 22x. Il est important de noter que ce mode de fractionnement de l'ADN permet de cibler la taille des fragments, mais que les cassures de l'ADN se font de manière aléatoire à différents endroits du génome bactérien.

La levure a été transformée avec 1,5 ou 3 µg de chacune des préparations d'ADNg décrites ci-dessus (Table 21). Des colonies ont été obtenues sur boîtes SD-TRP en nombre très variable selon les conditions testées (allant de l'ordre de la dizaine jusqu'au millier). Dix colonies ont été repiquées pour chaque condition, puis leur ADN extrait et analysé par PCR. Quatre colonies se sont révélées être positives en PCR puis en PCR multiplex, pour laquelle un profil à quatre bandes était attendu: 1707 pb, 978 pb, 715 pb et 521 pb (Figure 81, clones 3.3, 3.4, 3.9 et 4.6). Ces transformants étaient, tous, issues de la transformation de la levure avec l'ADNg de *M. pneumoniae* extrait en utilisant le kit NucleoBond® AXG Columns - Buffer Set III de Macherey-Nagel, et digéré par l'enzyme Sall.

Nous avons ensuite réalisé une deuxième expérience, afin de voir si nous étions capables de réaliser la capture de l'opéron *s10* à partir d'ADNg isolé à partir de cellules de *M. pneumoniae* immobilisée dans des blocs d'agarose. Nous avons travaillé avec des blocs contenant le génome de la souche *M. pneumoniae* M129, provenant de la bactérie elle-même, mais aussi avec des blocs contenant le génome de *M. pneumoniae* M129 $\Delta mpn372$ cloné précédemment dans la levure *S. cerevisiae*. Lors de cette expérience, nous avons à nouveau comparé le fait de digérer l'ADN génomique avec l'enzyme Sall ou bien de le casser mécaniquement par pipetage. Concernant les blocs levure, nous avons testé une étape préalable de PFGE, permettant d'éliminer (au moins en partie) l'ADN levure présent des blocs.

Des centaines de colonies ont été obtenues sur boîtes SD-TRP pour toutes les conditions testées (Table 22). Cinq clones (cl. 3.5, 3.9, 7.10, 9.5 et 24.3) se sont révélés être positifs en PCR puis en PCR multiplex (Figure 81). Sur ces cinq colonies, quatre sont issues de la transformation de la levure avec les blocs bactérie. Plus précisément, trois colonies sont issues de l'utilisation de l'ADNg digéré par l'enzyme Sall, et une colonie est issue de l'utilisation

Table 22. Capture de l'opéron *s10* de *M. pneumoniae* dans le vecteur pCC1YTRP – Expérience 2. Nombre de clones positifs obtenus après analyse en PCR et PCR multiplex, en fonction des différentes conditions testées.

Source d'ADN génomique	Fragmentation de l'ADN	Nombre de clones positifs
Blocs bactérie <i>M. pneumoniae</i> M129	Sall	3
	Pipetage – 0X	0
	Pipetage – 18X	1
	Pipetage – 22X	0
Blocs levure contenant le génome de <i>M. pneumoniae</i> M129	Sall	0
	Sall + PFGE	1
	Pipetage – 0X	0
	Pipetage – 18X	0
	Pipetage – 22X	0
	Pipetage – 0X + PFGE	0
	Pipetage – 18X + PFGE	0
	Pipetage – 22X + PFGE	0

de l'ADNg pipeté 18 fois. Une seule colonie a été obtenue après transformation de la levure avec un bloc levure (Table 22). La seule condition qui a fonctionné est celle dans laquelle le bloc levure a été soumis à un PFGE puis digéré avec l'enzyme Sall.

Ces expériences ont démontré que nous étions capables de réaliser la capture de l'opéron *s10* de *M. pneumoniae*, que celui-ci provienne d'une extraction d'ADNg (via l'utilisation d'un kit), ou qu'il provienne de blocs d'agarose. Nous avons également observé qu'un bon moyen de cliver la région d'ADN à capturer est d'utiliser des enzymes dont les sites de restriction sont localisés de part et d'autre de la séquence cible. Enfin, nous avons montré qu'il est possible de capturer l'opéron *s10* à partir de blocs levure. Dans ce cas-là, il est nécessaire que le bloc levure soit préalablement soumis à un PFGE afin de se débarrasser de l'ADN de levure, avant d'être digéré par l'enzyme Sall. Ce sont donc ces conditions qui ont conservées pour la suite de nos expérimentations.

2. 2. Capture de la région *mpn372-mpn400*

La seconde modification que nous avons voulu réaliser par GT-RMCE est le remplacement d'une grande région du génome de *M. pneumoniae* par une autre. Nous nous sommes intéressés à la région *mpn372-mpn400*. Il s'agit d'une région qui a été éditée dans la levure par CREasPy-cloning (voir Chapitre I - Clonage et ingénierie du génome de *Mycoplasma pneumoniae* dans la levure). A défaut de pouvoir transplanter le génome édité en entier, le GT-RMCE pourrait permettre de transférer la portion du génome qui a été modifiée, et ainsi d'obtenir une cellule mutée. Nous avons donc pensé que le remplacement de la région sauvage *mpn372-mpn400* (38 kpb) par la région mutée $\Delta mpn372-\Delta mpn400$ pourrait représenter un pas en avant significatif vers la construction d'un châssis cellulaire avirulent.

Il est prédit que les gènes *mpn372* et *mpn400* sont non essentiels lorsqu'ils sont supprimés individuellement. Par précaution, nous avons procédé par étape et avons réalisé trois expériences de captures

Lors de la première expérience, la région sauvage *mpn372-mpn400* (38 kb) a été capturée dans le vecteur pCC1YTRP en présence des cassettes *lox66-gmR* et *loxm2/71-cre* (Figure 79 B et Figure 80). Pour cela, la levure a été co-transformée avec des blocs d'agarose contenant le génome sauvage de *M. pneumoniae* M129, préalablement digérés avec les enzy-

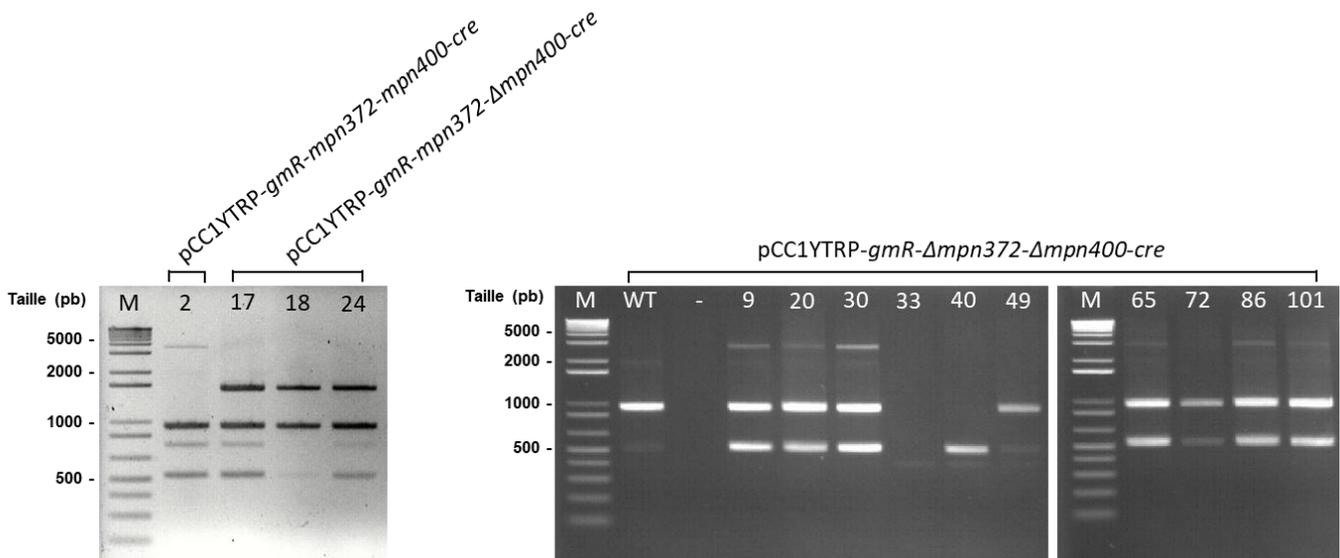


Figure 82. Capture des régions *mpn372-mpn400*, *mpn372-Δmpn400*, ou *Δmpn372-Δmpn400* de *M. pneumoniae* dans le vecteur pCC1YTRP. Validation en PCR multiplex du profil des plasmides pCC1YTRP-*gmR*-X-*cre* pour les clones obtenus. M, marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; WT, wild type (ADN génomique de *M. pneumoniae* M129) ; -, contrôle négatif (H₂O)

-mes XhoI et EagI. Plusieurs centaines de colonies ont été obtenues sur boîtes SD-TRP. L'ADNg total de 230 colonies a été extrait puis analysé en PCR multiplex. Une colonie s'est révélée positive en présentant un profil à quatre bandes (3479 pb, 956 pb, 658 pb et 521 pb) correspondant au profil attendu (Figure 82).

Lors de la deuxième expérience, nous avons capturé la région *mpn372-Δmpn400*. Pour cela, nous avons transformé la levure avec des blocs levure contenant le génome de *M. pneumoniae* M129 dans lequel le gène *mpn400* a été supprimé (construction obtenue par CREasPy-cloning, chapitre I). Les blocs ont été traités avec les enzymes de restriction XhoI et EagI avant la transformation. Des centaines de colonies ont été obtenues sur boîtes SD-TRP. Trois colonies positives sur 240 analysées ont été identifiées en PCR (permettant de confirmer la délétion du gène *mpn400*) puis en PCR multiplex (Figure 82). Le profil attendu en PCR multiplex est un profil de quatre bandes (1587 pb, 956 pb, 658 pb et 521 pb).

Lors de la troisième expérience, nous avons capturé la région *Δmpn372-Δmpn400*. La levure a été co-transformée avec des blocs levure contenant le génome de *M. pneumoniae* M129 dans lequel les gènes *mpn372* et *mpn400* ont été supprimés (construction obtenue par CREasPy-cloning, chapitre I). Les blocs ont été digérés avec les enzymes de restriction XhoI et NotI avant la transformation. Encore une fois, des centaines de colonies ont été obtenues. Six colonies positives sur 600 analysées ont été identifiées par PCR (permettant de valider la délétion des gènes *mpn372* et *mpn400*) puis par PCR multiplex (Figure 82). Le profil attendu en PCR multiplex est un profil présentant trois bandes : 2796 pb, 936 pb et 528 pb (cette dernière bande à une taille attendue de 2073 pb pour le contrôle *M. pneumoniae* M129).

Nous avons réussi à obtenir des clones positifs pour les trois expériences de capture réalisées. Cet exemple nous a permis de confirmer la faisabilité du protocole ainsi que la possibilité de l'étendre à des fragments de 38 kpb.

2. 3. Conclusion

A travers ces deux exemples de capture (opéron *s10* et région *mpn372-mpn400*), nous avons démontré que nous sommes capables de capturer dans le vecteur navette pCC1YTRP différentes portions cibles du génome de *M. pneumoniae* M129, grâce à la levure. En effet, nous avons réussi la capture de l'opéron ribosomique *s10*, correspondant à un fragment de

15 kpb, ainsi qu'une région de 38 kpb, qui est la portion du génome de *M. pneumoniae* allant du gène *mpn372* codant la toxine CARDS au gène *mpn400* codant une protéine capable de lier les immunoglobulines. Différentes versions de ce fragment ont pu être capturées, une version sauvage, mais aussi des versions modifiées (absence du gène *mpn400*, ou absence des gènes *mpn372* et *mpn400*), obtenues lors de l'étape d'ingénierie du génome de *M. pneumoniae* dans la levure par CReasPy-cloning (Chapitre I).

3. AMPLIFICATION DU VECTEUR PCC1YTRP-GMR-X-CRE DANS *E. COLI*

Toutes les constructions du vecteur pCC1YTRP-*gmR-X-cre* obtenues lors des différentes expériences de capture ont été transformées par électroporation dans la souche *E. coli* EPI300, afin d'être amplifiées (Figure 79 C et Figure 80). L'ADN plasmidique a été extrait en suivant le protocole de mini-préparation (mat et met). Les plasmides ont été vérifiés par analyse par électrophorèse du profil obtenu après digestion par différentes enzymes de restriction (XhoI ou AscI/NsiI), et par analyse en PCR multiplex.

Pour rappel, la souche *E. coli* EPI300 permet le maintien et la propagation de grands plasmides, qu'elle réplique à un faible nombre de copies afin de garantir leur stabilité. Il est ensuite possible d'induire un changement de comportement des cellules afin que celles-ci se mettent à répliquer le plasmide à un grand nombre de copies. L'ADN plasmidique à présent en grande quantité peut ainsi être extrait par midi-préparation, en quantités suffisantes pour pouvoir être utilisé dans les expériences de transformation de *M. pneumoniae*.

4. TRANSFERT DE LA REGION D'INTERET DANS LE GENOME DE *M. PNEUMONIAE*

La dernière étape du GT-RMCE est la transformation des vecteurs pCC1YTRP-*gmR-X-cre* dans *M. pneumoniae* (Figure 79 D et Figure 80). Une étape nécessaire à l'utilisation du GT-RMCE est l'introduction préalable des landing pads dans le génome de la souche de *M. pneumoniae* qui doit être éditée. Ces landing pads vont permettre, via le système Cre-Lox, de « réceptionner » la région que l'on souhaite introduire dans le génome bactérien.

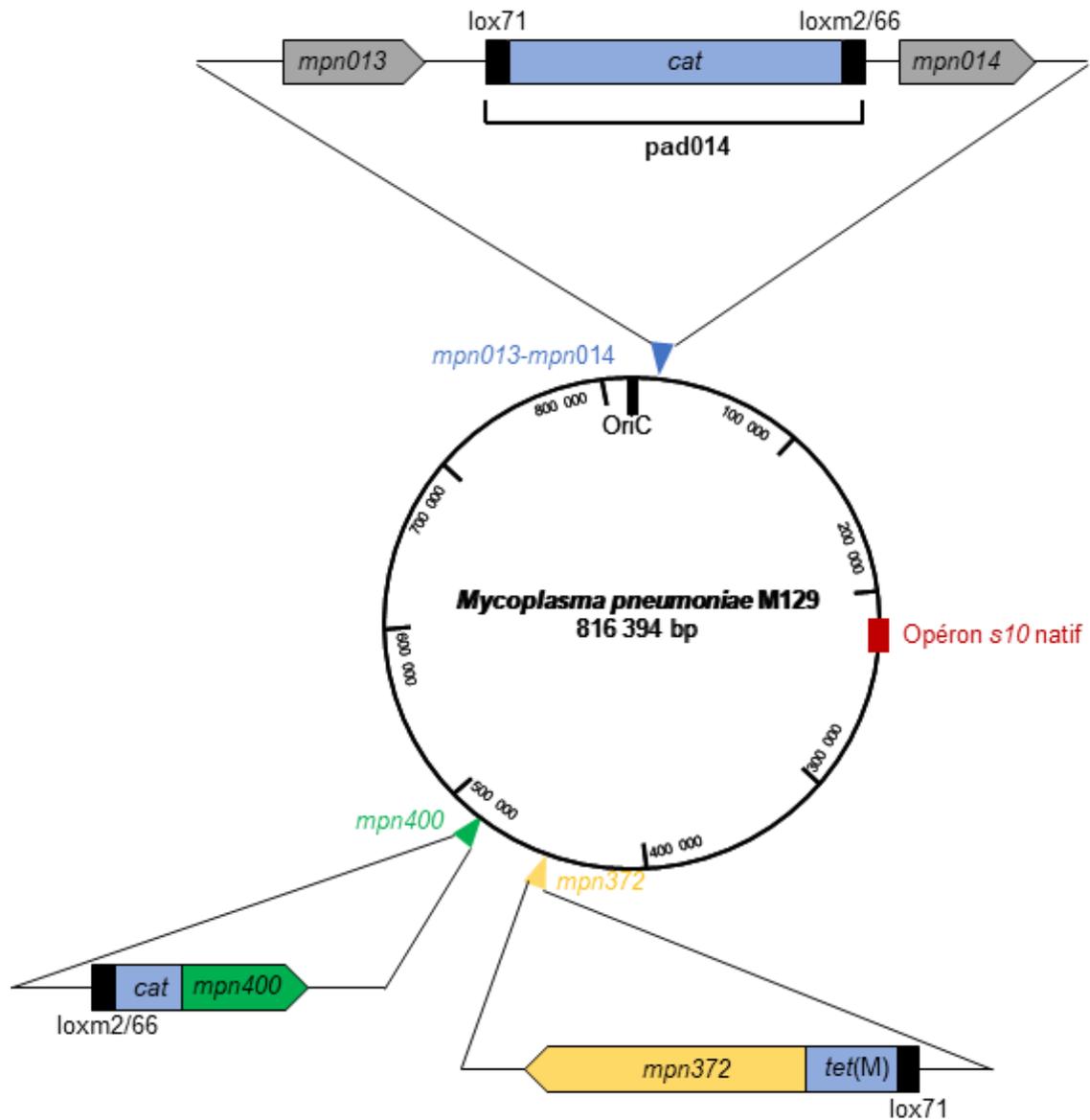


Figure 83. Carte du génome de *M. pneumoniae* M129. L'emplacement de la région *mpn013-mpn014* est indiqué par une flèche bleue, et celui de l'opéron *s10* natif par un rectangle rouge. Un grossissement est effectué sur la région intergénique comprise entre *mpn013* et *mpn014* afin d'illustrer la localisation ainsi que la conformation du *pad014*. L'emplacement du gène *mpn372* est indiqué par une flèche jaune, et celui du gène *mpn400* par une flèche verte. Un grossissement est effectué sur chaque locus afin d'illustrer la localisation ainsi que la conformation du *pad372* et du *pad400*.

4. 1. Préparation des cellules receveuses : intégration de « landing pads » à proximité de la région à modifier

4. 1. 1. Landing pad pour la duplication de l'opéron ribosomique *s10*

Nous avons décidé d'insérer l'opéron *s10* dans une région proche de l'origine de réplication et ne contenant pas de gène essentiel. Notre choix s'est porté sur la région intergénique de 100 pb comprise entre les *loci mpn013* et *mpn014* (Figure 83). Pour réaliser cette insertion, un seul landing pad est nécessaire (Figure 84 A). Le landing pad que nous avons inséré à cet endroit a été nommé « pad014 ». Il porte le gène de résistance au chloramphénicol flanqué des sites *lox71* et *loxm2/66*.

Le pad014 a été produit par PCR à partir du plasmide pBSK_pad014, puis transformé par électroporation dans la souche *M. pneumoniae* M129, et insérée dans le génome. Plusieurs colonies ont été obtenues sur les boîtes SP4 chloramphénicol 50 µg/mL, et ont été repiquées en milieu liquide. Un seul clone a poussé. L'ADN génomique de ce clone a été extrait en utilisant le protocole d'extraction rapide, et la présence du pad014 a été confirmée par PCR.

4. 1. 2. Landing pads pour le remplacement de la région *mpn372-mpn400*

Pour réaliser ce remplacement, nous avons dû insérer deux landing pads dans le génome de *M. pneumoniae* : le pad372 et le pad400 (Figure 83 et Figure 84 B). Ces deux landing pads ont été produits par PCR à partir des plasmides pBSK_pad372 et pBSK_pad400, respectivement. Le pad372 est composé du gène de résistance à la tétracycline flanqué du site *lox71* en 5'. Le pad400 est constitué du gène de résistance au chloramphénicol flanqué du site *loxm2/66* en 3' (Figure 84 B).

Dans un premier temps, le pad372 a été transformé par électroporation dans la souche *M. pneumoniae* M129, mais aucune colonie n'a été obtenue. Nous avons alors décidé d'utiliser la souche *M. pneumoniae* M129 – $\Delta mpn133\Delta mpn491\Delta mpn110\Delta mpn347$ (une souche obtenue au laboratoire par Luis Garcia-Morales) dans laquelle les gènes codant des nucléases membranaires *mpn133* et *mpn491* et les deux enzymes de restriction potentielles

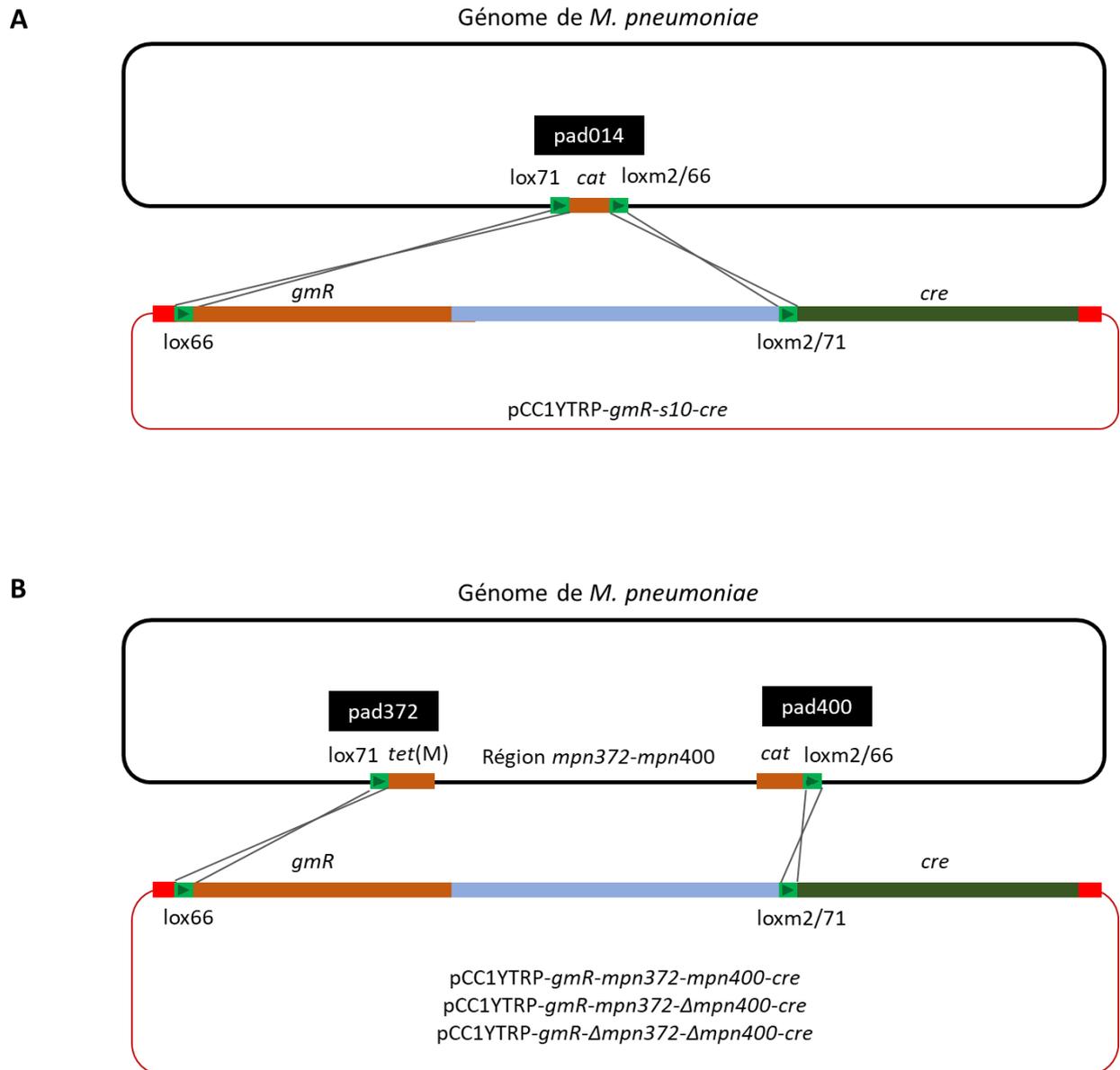


Figure 84. Insertion des landing pads dans le génome de *M. pneumoniae*. A. Modification 1, duplication de l'opéron *s10*. Un seul landing pad est nécessaire, il s'agit du pad014. B. Modification 2, remplacement de la région *mpn372-mpn400*. Deux landing pads sont nécessaires, il s'agit des pad372 et pad400.

mpn110 et *mpn347* ont été supprimés. Avec cette souche, plusieurs colonies ont été obtenues sur les boîtes SP4 tétracycline 5 µg/mL, et ont été repiquées en milieu liquide. A nouveau, un seul clone s'est multiplié en milieu sélectif. L'ADN génomique de ce clone a été extrait et la présence du *pad372* a été confirmée par PCR.

Le *pad400* a été introduit dans la souche *M. pneumoniae* M129 Δ *mpn133* Δ *mpn491* Δ *mpn110* Δ *mpn347* – *pad372*, précédemment obtenue en utilisant un protocole identique. Plusieurs colonies ont été obtenues sur les boîtes SP4 chloramphénicol 50 µg/mL, puis repiquées en milieu liquide. L'ADNg de 20 clones a été extrait, et la présence du *pad400* a été confirmée par PCR pour tous.

4. 1. 3. Conclusion

Deux nouvelles souches de *M. pneumoniae* ont été obtenues. Elles contiennent un ou deux landing pads en fonction de la modification souhaitée (insertion ou remplacement). Ces souches sont donc prêtes à « accueillir » ou échanger une nouvelle portion de génome, et constituent les cellules receveuses pour le GT-RMCE.

4. 2. Transformation du vecteur pCC1YTRP-*gmR-X-cre* dans *M. pneumoniae*

En fonction de la modification envisagée, les différents vecteurs navettes ont été transformés par électroporation dans différentes souches « landing pad » de *M. pneumoniae*.

4. 2. 1. Duplication de l'opéron *s10*

Le plasmide pCC1YTRP-*gmR-s10-cre* a été transformé dans la souche *M. pneumoniae* M129–*pad014*. De façon surprenante, après une semaine seulement d'incubation à 37°C, des centaines de colonies sont apparues sur les boîtes SP4 gentamycine 100 µg/mL. Nous avons analysé en PCR multiplex l'ADN génomique de 20 colonies (Figure 85). Cette PCR multiplex a

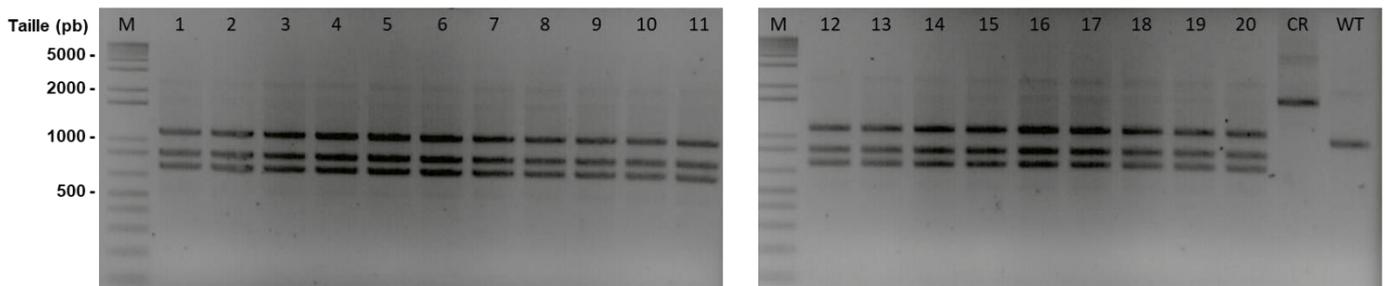


Figure 85. Modification 1, duplication de l'opéron *s10*. Validation en PCR multiplex des clones *M. pneumoniae* issus du GT-RMCE. M, marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; CR, cellule receveuse (ADN génomique de *M. pneumoniae* M129 - pad014) ; WT, wild type (ADN génomique de *M. pneumoniae* M129)

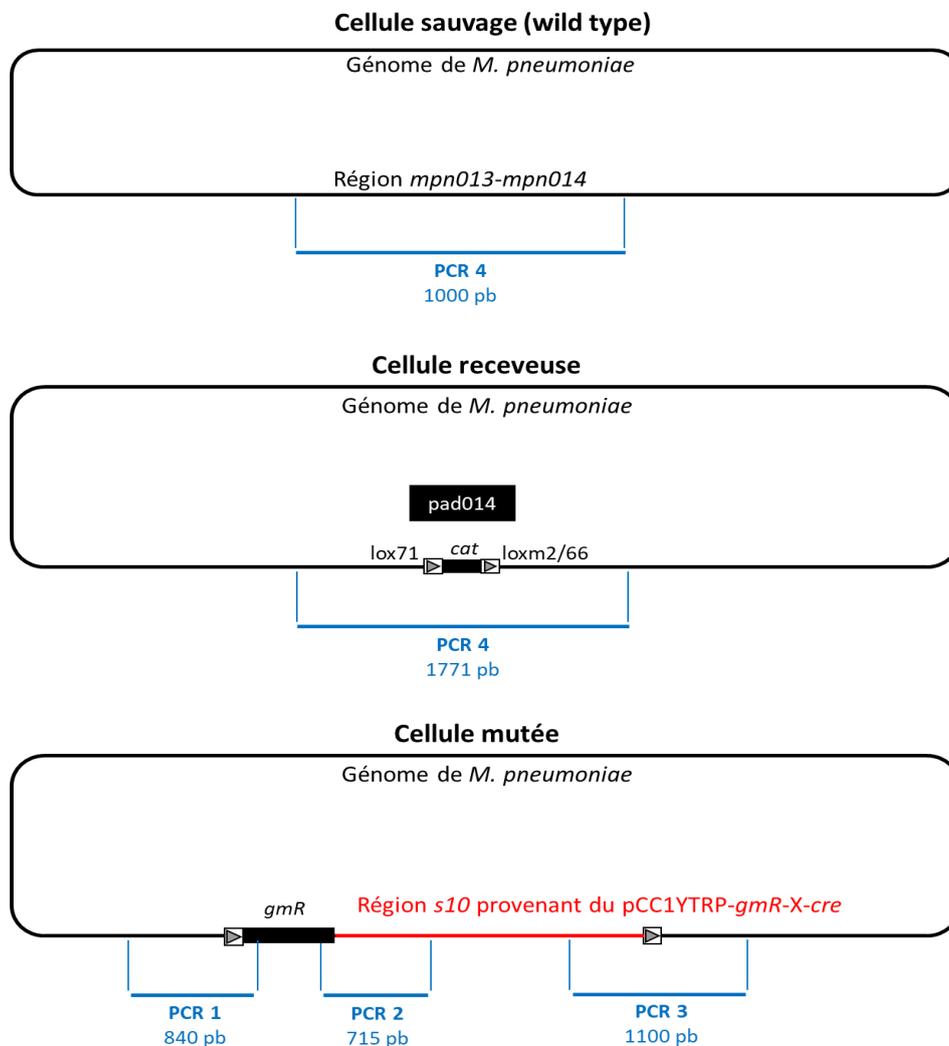


Figure 86. Modification 1, duplication de l'opéron *s10*. Schéma illustrant la localisation sur le génome de *M. pneumoniae* des différentes PCR réalisées pour valider les transformants issus du GT-RMCE. Trois exemples sont illustrés, celui concernant la souche sauvage (wild type) *M. pneumoniae* M129, la cellule receveuse *M. pneumoniae* M129 – pad014, et celui de la cellule mutée obtenue.

été réalisée dans le but de confirmer l'intégration de la seconde copie de l'opéron *s10* dans le génome de *M. pneumoniae* entre les gènes *mpn013* et *mpn014* (Figure 83). Pour cela, nous avons utilisé trois couples d'amorces permettant d'amplifier la jonction entre le chromosome bactérien et le marqueur gentamycine (couple 1), la jonction entre le marqueur gentamycine et l'opéron *s10* (couple 2), et la jonction entre l'opéron *s10* et le chromosome bactérien (couple 3) (Figure 86). Le profil attendu est un profil comportant trois bandes dont les tailles sont 840 pb (couple 1), 715 pb (couple 2) et 1100 pb (couple 3). Deux contrôles ont été réalisés, un contrôle avec l'ADNg issu de la cellule receveuse *M. pneumoniae* M129 – pad014, qui présente une amplification de 1771 pb (couple 4, constitué de l'amorce sens du couple 1 et de l'amorce antisens du couple 3), et un contrôle avec l'ADN génomique issu de la souche sauvage *M. pneumoniae* M129, qui présente une amplification de 1000 pb (couple 4). Les 20 clones analysés ont été validés, leur profil en PCR multiplex correspondant au profil attendu.

4. 2. 2. Remplacement de la région *mpn372-mpn400*

Les différents plasmides pCC1YTRP-*gmR-X-cre* ont été transformés dans la souche *M. pneumoniae* M129– $\Delta mpn133\Delta mpn491\Delta mpn110\Delta mpn347$ – pad372 – pad400. Une modification a été apportée au protocole de transformation. En effet, à la fin de celui-ci les cellules sont normalement remises en suspension dans 1 mL de SP4, incubées deux heures à 37°C, puis étalées sur des boîtes SP4 gentamycine 100 µg/mL. Nous avons décidé d'étaler 900 µL sur boîtes SP4 gentamycine 100 µg/mL, et utiliser les 100 µL restant pour ensemercer 5 mL de milieu liquide SP4 gentamycine 100 µg/mL. Les cultures liquides ont été incubées à 37°C pendant une semaine, puis elles ont été étalées sur boîtes SP4 (sans antibiotique). Nous avons envisagé cette autre manière de procéder car nous avons pensé que la suppression de l'antibiotique utilisé pourrait permettre une meilleure récupération des cellules après transformation. De plus, la gentamycine étant un antibiotique bactéricide, nous avons considéré qu'au bout d'une semaine (temps que nous supposons nécessaire pour que le double évènement de recombinaison ait lieu) toutes les cellules n'ayant pas été transformées correctement étaient probablement mortes. Il ne serait donc plus nécessaire d'appliquer une pression de sélection sur les transformants.

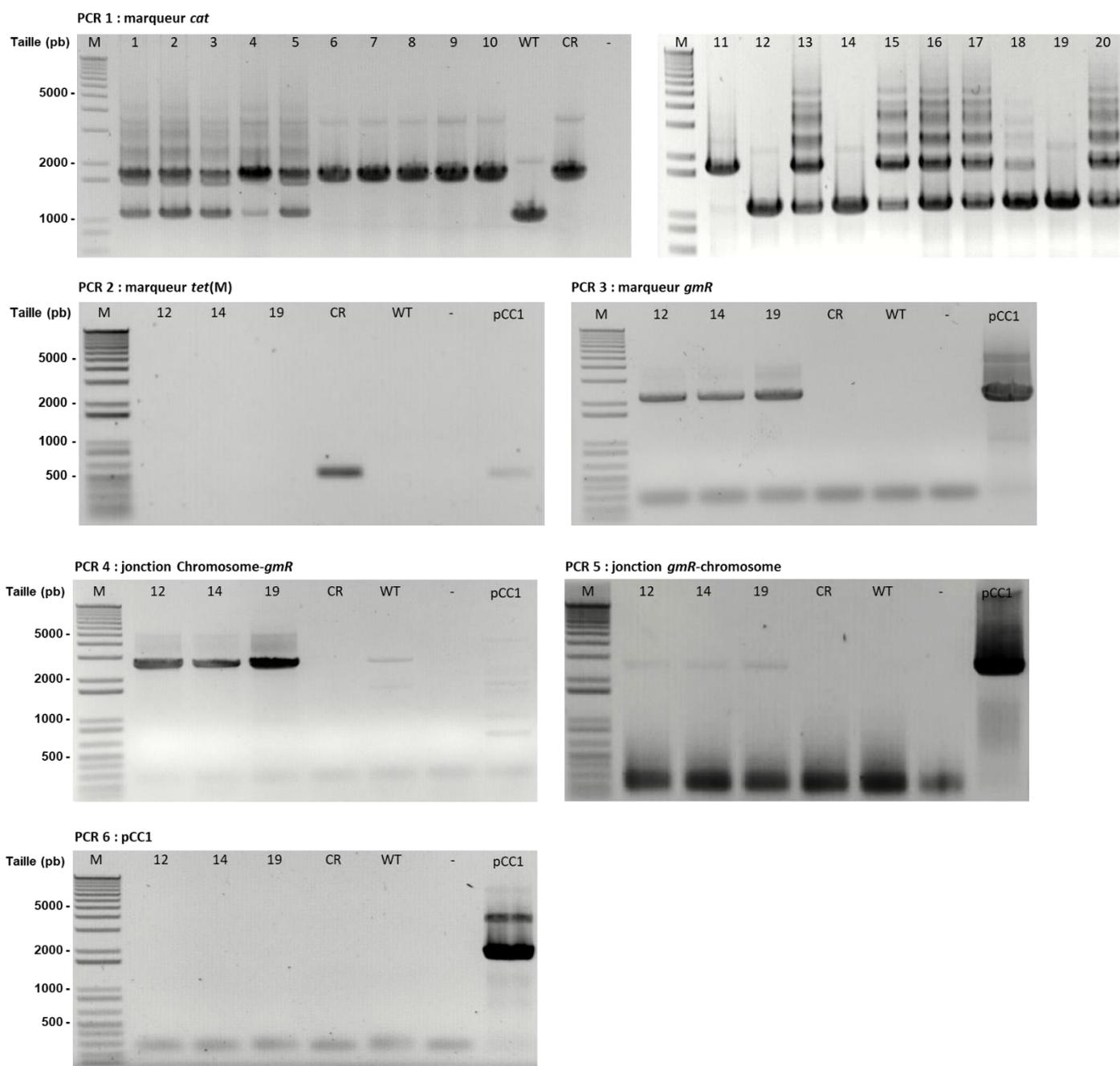


Figure 87. Modification 2, remplacement de la région *mpn372-mpn400*. Analyses PCR ciblant différentes régions du génome des clones *M. pneumoniae* issus du GT-RMCE (1^{er} passage). M, marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; WT, wild type (ADN génomique de *M. pneumoniae* M129) ; -, contrôle négatif (H₂O) ; CR, cellule receveuse (ADN génomique de *M. pneumoniae* M129 – $\Delta mpn133\Delta mpn491\Delta mpn110\Delta mpn347$ – pad372 – pad400) ; pCC1, plasmide pCC1YTRP-*gmR-s10-cre*.

Une première expérience de transformation dans *M. pneumoniae* a été réalisée avec la construction pCC1YTRP-*gmR-mpn372-mpn400-cre* (plasmide navette contenant la séquence non modifiée du locus *mpn372-mpn400*). Trois colonies ont été obtenues sur les boîtes SP4 gentamycine 100 µg/mL, alors que de nombreuses colonies ont été obtenues sur les boîtes SP4. Nous avons analysé 20 colonies issues des boîtes SP4 et les 3 clones isolés sur boîte SP4 gentamycine 100 µg/mL. Pour cela, l'ADNg a été extrait puis analysé en PCR. Plusieurs PCR ont été réalisées afin de s'assurer que la région *mpn372-mpn400* a été correctement remplacée (Figure 87). La cellule à transformer contient les marqueurs *tet(M)* et *cat*, et la région *mpn372-mpn400* issue du vecteur navette contient le marqueur *gmR* (Figure 88). Nous devons donc confirmer par PCR la disparition des marqueurs *cat* et *tet(M)* concomitant à l'apparition du marqueur *gmR* chez les transformants *M. pneumoniae* obtenus.

La première PCR que nous avons réalisé est celle permettant l'amplification de la région portant le marqueur *cat* (PCR 1) (Figure 87). Deux contrôles ont été réalisés, un contrôle avec l'ADNg de *M. pneumoniae* M129 (WT), et un contrôle avec l'ADNg de *M. pneumoniae* M129 – $\Delta mpn133\Delta mpn491\Delta mpn110\Delta mpn347$ – pad372 – pad400 (cellule à transformer, CR). Trois clones présentaient le profil attendu avec une bande unique à 1034 pb (clones 12, 14 et 19) (Figure 87). Six autres clones présentaient également un profil à une bande mais de taille différente (1737pb) (clones 6, 7, 8, 9, 10 et 11). Ce profil, identique au profil CR, suggèrent qu'aucun évènement de recombinaison n'a eu lieu dans ces clones. Enfin, 11 clones montraient un profil à deux bandes ou plus (principalement 1034 et 1737 pb). Plusieurs raisons pourraient expliquer ces profils multi-bandes. Les raisons les plus évidentes sont que ces clones sont formés (i) d'un mélange de cellules, certaines ayant fait l'échange de la région *mpn373-mpn400* (absence du marqueur *cat*) et d'autres pas (présence du marqueur *cat*), ou bien (ii) de cellules dans lesquelles un seul évènement de recombinaison a eu lieu (au lieu de deux), entraînant l'intégration complète du plasmide dans la région cible, et donc la présence dans ces clones de la région avec le marqueur *cat* et de la région sans le marqueur *cat*. Les trois colonies qui avaient été obtenues après étalement du mélange de transformation sur boîtes SP4 gentamycine 100 µg/mL présentaient le même profil à deux bandes ou plus pour la PCR 1 (*cat*) que les clones 1, 2, 3, 4, 5, 13, 15, 16, 17, 18 et 20.

Les clones 12, 14 et 19 ont été sélectionnés pour poursuivre les analyses PCR. Un contrôle a été ajouté lors de cette deuxième série de PCR. Il s'agit du plasmide navette pCC1YTRP-*gmR-mpn372-mpn400-cre* (nommé pCC1 ici). L'absence du marqueur *tet(M)* a été

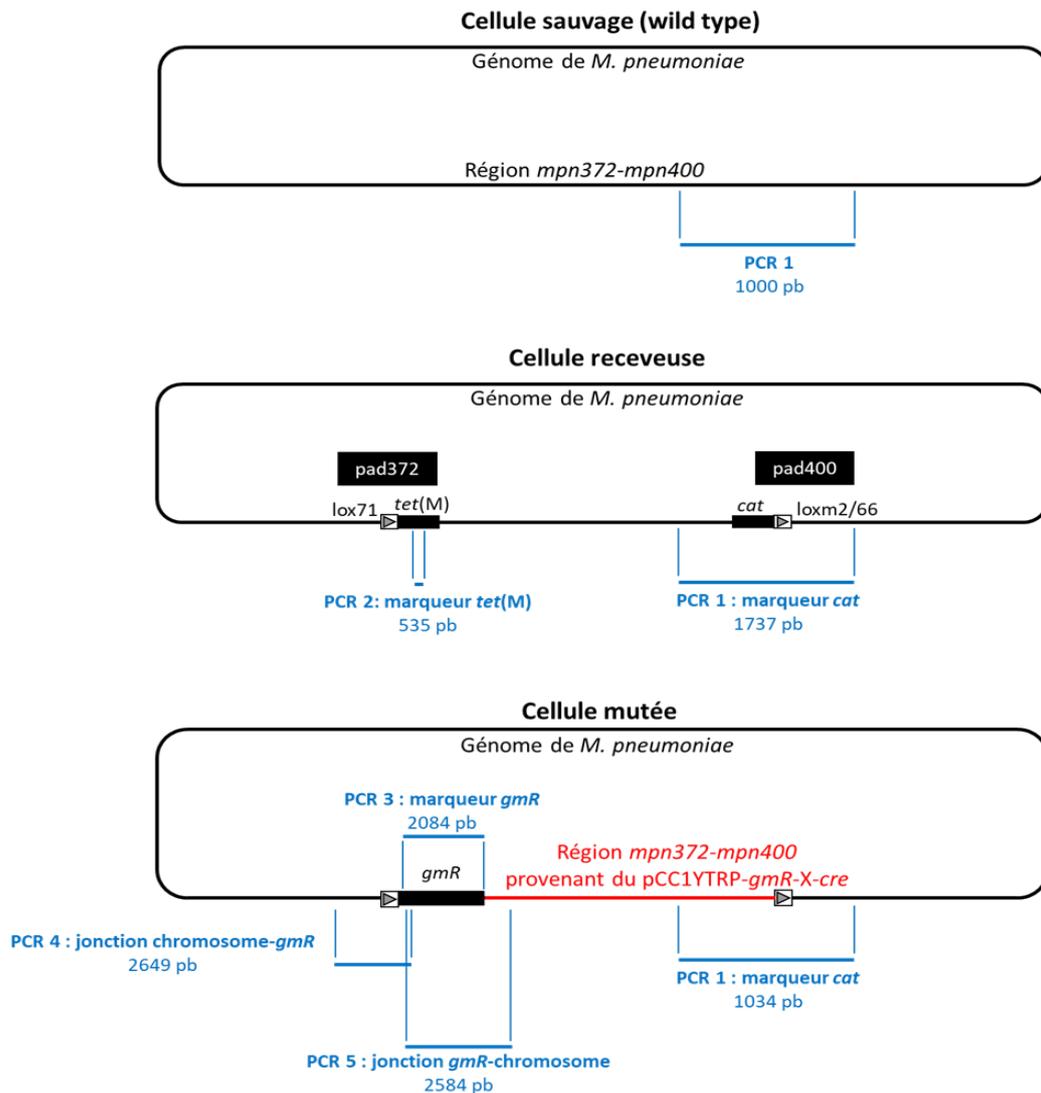


Figure 88. Modification 2, remplacement de la région *mpn372-mpn400*. Schéma illustrant la localisation sur le génome de *M. pneumoniae* des différentes PCR réalisées pour valider les transformants issus du GT-RMCE. Trois exemples sont illustrés, celui concernant la souche sauvage (wild type) *M. pneumoniae* M129, la cellule receveuse *M. pneumoniae* M129 – $\Delta mpn133\Delta mpn491\Delta mpn110\Delta mpn347$ – pad372 – pad400, et celui de la cellule mutée obtenue.

confirmée par PCR pour les trois clones analysés (PCR 2) (Figure 87). Une amplification à 535 pb était attendue pour le contrôle cellule receveuse. Nous avons également observé une légère amplification pour le pCC1, celle-ci est probablement due à une fixation aspécifique des amorces utilisées.

Les clones ont ensuite été analysés en PCR pour la présence du marqueur *gmR* (PCR 3) (Figure 87). Les trois clones ainsi que le contrôle pCC1 montraient un profil attendu avec une bande à 2084 pb. Les autres contrôles ne présentent pas d'amplification. Afin d'être certains de l'intégration du marqueur *gmR*, nous avons également analysés par PCR ces mêmes clones au niveau de la jonction entre le chromosome bactérien et le début du marqueur *gmR*, nommée jonction chromosome-*gmR* (PCR 4) et au niveau de la jonction entre la fin du marqueur *gmR* et le chromosome bactérien, nommée jonction *gmR*-chromosome (PCR 5) (Figure 87). Nous avons bien observé une amplification de 2649 pb pour la PCR 4 et une amplification de 2584 pb pour la PCR 5, pour les clones 12, 14 et 19. Nous pouvons remarquer que pour la PCR 5, les bandes sont de très faible intensité. Aucune amplification n'a été obtenue pour les contrôles.

Enfin, une dernière PCR a été réalisée afin de confirmer que le vecteur pCC1 lui-même ne s'est pas intégré dans le chromosome bactérien (PCR 6) (Figure 87). Comme attendu, aucune amplification n'a été observée pour les clones 12, 14 et 19, et une bande à 1302 pb a été obtenue pour le contrôle pCC1.

Aux vues de ces résultats, nous avons conclu que les clones 12, 14 et 19 résultaient très certainement de l'échange de la région *mpn372-mpn400* entre le génome bactérien et le vecteur navette. Mais la PCR 5 n'ayant donné des bandes que de très faible intensité, nous avons préféré extraire de nouveau l'ADNg de ces transformants et refaire les PCR 1 (marqueur *cat*), PCR 3 (marqueur *gmR*) et PCR 5 (jonction *gmR*-chromosome). Les trois clones analysés ont présenté le profil attendu pour chaque PCR. De plus, pour la PCR 5 les bandes sont cette fois-ci d'une intensité tout à fait satisfaisante (Figure 89).

D'autres expériences de transformation de *M. pneumoniae* ont été réalisées avec les constructions pCC1YTRP-*gmR-mpn372-Δmpn400-cre* et pCC1YTRP-*gmR-Δmpn372-Δmpn400-cre*. Cependant, aucune colonie n'a été obtenue sur boîte à ce jour. Nous essayons actuellement de répéter ces expériences afin d'obtenir des cellules mutantes de délétion pour *mpn372* et *mpn400*.

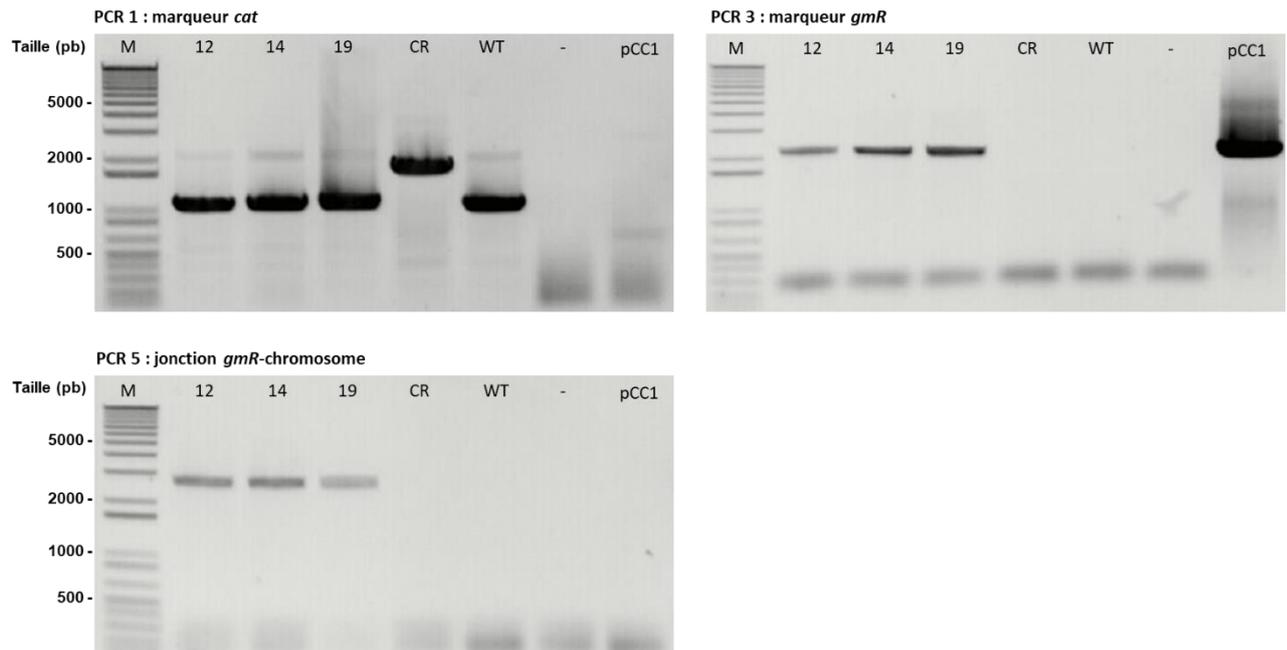


Figure 89. Modification 2, remplacement de la région *mpn372-mpn400*. Analyses PCR ciblant différentes régions du génome des clones *M. pneumoniae* issus du GT-RMCE (2^{ème} passage). M, marqueur de taille 1 kb Plus (Invitrogen) ; WT, wild type (ADN génomique de *M. pneumoniae* M129) ; -, contrôle négatif (H₂O) ; CR, cellule receveuse (ADN génomique de *M. pneumoniae* M129 – $\Delta mpn133\Delta mpn491\Delta mpn110\Delta mpn347$ – pad372 – pad400 ; pCC1, plasmide pCC1YTRP-*gmR*-s10-cre.

4. 2. 3. Conclusion

Au terme de ces expériences de transformation de *M. pneumoniae*, nous pouvons conclure que l'outil GT-RMCE que nous avons développé permet de réaliser différents types de modifications génomiques à grande échelle. Nous avons été capables d'introduire un fragment de 15 kpb dans un *locus* ciblé du génome bactérien afin de dupliquer l'opéron *s10*. Nous avons également réussi à échanger une région chromosomique de 38 kb, la région *mpn372-mpn400*. Cette dernière a été entièrement refaite récemment et a donné des résultats de bonne qualité, tant au niveau de l'efficacité de transformation que du screening des clones par PCR (absence de profil multi-bande pour la PCR1).

Nous avons donc mis au point un outil nous permettant de transférer des portions de génome lorsque la transplantation de génome n'est pas possible, ce qui est pour l'instant le cas pour *M. pneumoniae*. Grâce au GT-RMCE nous pouvons maintenant envisager des modifications génétiques de ce mycoplasme à plus grande échelle, et sans nécessairement passer par une étape d'édition du génome dans la levure et sans utiliser le processus de transplantation de génome.

5. DISCUSSION

Le GT-RMCE est un outil d'édition de génome qui a été développé au cours de cette thèse. Il a permis de réaliser des modifications génétiques de grande ampleur sur le génome de *M. pneumoniae*, telles que l'introduction ou le remplacement de séquences de plusieurs dizaines de kilobases. Il constitue donc une alternative intéressante à la transplantation de génomes entiers lorsque celle-ci n'est pas réalisable.

Sa mise au point a nécessité de s'intéresser à différents paramètres. Le premier sur lequel nous avons travaillé est la capture, dans le vecteur pCC1YTRP de la région d'intérêt, en utilisant la levure *S. cerevisiae* comme hôte de clonage. En effet, nous avons mis en évidence que l'ADN à capturer peut avoir différentes origines (Figure 79A). Il peut être issu d'une extraction d'ADN génomique de *M. pneumoniae* de qualité suffisante, comme par exemple dans le cadre de l'utilisation du kit NucleoBond® AXG Columns - Buffer Set III de Macherey-

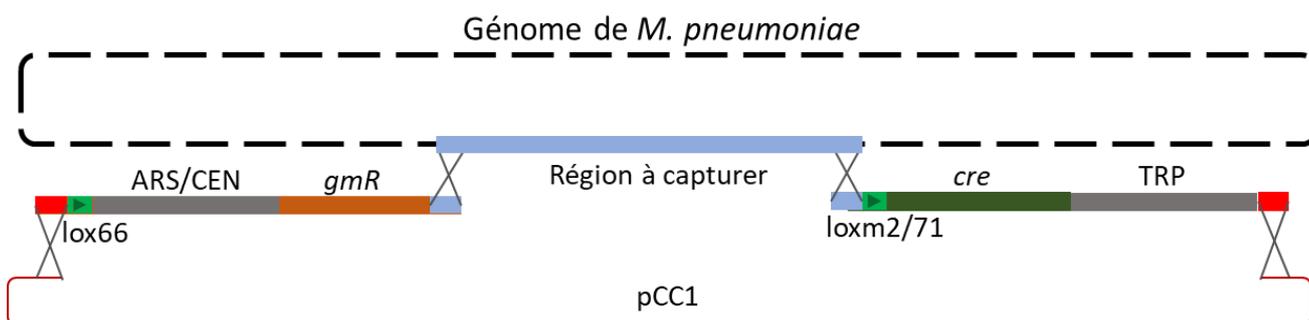


Figure 90. Assemblage du pCC1YTRP-*gmR*-X-*cre* par transformation de la levure avec le plasmide pCC1, une cassette *gmR*-Y, une cassette *cre*-TRP, et l'ADN génomique fragmenté de *M. pneumoniae*.

Nagel. Il peut également provenir de blocs d'agarose contenant le génome de *M. pneumoniae*, isolé à partir de la bactérie, ou à partir d'une levure contenant le génome cloné de la bactérie.

Il est intéressant de noter qu'avec notre système, il n'est pas forcément nécessaire de cloner le chromosome bactérien dans la levure pour pouvoir l'éditer. Il est en effet possible de travailler uniquement sur la région capturée dans le vecteur pCC1YTRP dans la levure. Ceci ouvre la possibilité de travailler sur des génomes de grande taille et/ou que l'on ne peut pas cloner dans la levure. Cela ouvre également la voie à l'ingénierie d'autres espèces bactériennes pour lesquelles de tels outils n'existent pas encore.

Avant d'être transformé dans la levure, l'ADN génomique de *M. pneumoniae* doit être digéré avec une enzyme de restriction dont les sites de clivage se situent de part et d'autre de la région d'intérêt, afin de pouvoir capturer cette région dans le vecteur pCC1YTRP. Dans les exemples réalisés au cours de cette thèse, que ce soit la duplication de l'opéron *s10* ou l'échange de la région *mpn372-mpn400*, nous avons trouvé des enzymes appropriées. Cependant, il se pourrait que ce ne soit pas toujours le cas. Dans le cas où aucun site de restriction ne serait disponible à proximité de la région à capturer, il pourrait être intéressant de trouver une autre manière de fragmenter l'ADN. Nous avons testé le pipetage de l'ADN génomique pour le casser mécaniquement en fragments de tailles préalablement déterminées, mais cette approche n'a pas été concluante. Cependant, nous n'avons pas vérifié la taille des fragments d'ADN obtenus, peut-être étaient-ils trop petits ou trop dégradés. Une autre manière de procéder pourrait être d'utiliser le système CRISPR-Cas *in vitro* pour cibler de manière spécifique les séquences à cliver dans le génome de *M. pneumoniae* de part et d'autre de la région d'intérêt. Cette approche est similaire à celle que nous avons mise en place lors du processus de CREasPy-cloning *in vitro* (voir chapitre I, clonage CREasPy *in vitro*).

Globalement, nous avons observé que les expériences de capture ont une efficacité assez faible. En effet, peu de clones levure ont été validés malgré un grand nombre de clones analysés. Le marqueur d'auxotrophie TRP se situant sur le plasmide pCC1TRP, il se pourrait que ce dernier se circularise et induise ainsi l'apparition de clones faux-positifs. Afin de diminuer ce bruit de fond, il pourrait être intéressant d'assembler le plasmide pCC1YTRP différemment (Figure 90). Nous pourrions intégrer les éléments levure (CEN6, ARSH6, TRP1) dans les cassettes contenant le marqueur gentamycine (*gmR*) et la recombinase Cre et assembler dans la levure le plasmide pCC1FOSTM, la cassette *gmR-Y*, la cassette *cre-TRP* et l'ADN génomique de *M. pneumoniae*. De cette manière, seuls les transformants s'étant cor-

-rectement assemblés seraient capables de se multiplier en milieu sélectif SD-TRP.

La duplication de l'opéron *s10* est un exemple d'introduction d'un fragment d'ADNg dans le génome de *M. pneumoniae*. L'intérêt d'avoir ciblé l'opéron *s10* s'inscrit dans un des objectifs du projet MycoSynVac, qui est d'améliorer la croissance de *M. pneumoniae*. Si cet opéron joue un rôle dans la vitesse de croissance de ce mycoplasme, comme c'est le cas chez *Vibrio cholerae* (Soler-Bistué *et al.*, 2015; Soler-Bistué, Timmermans and Mazel, 2017), le dupliquer tout en localisant la copie supplémentaire proche de l'origine de réplication, pourrait avoir un effet positif sur son temps de doublement. Il serait également intéressant d'étudier l'impact de la position de cette seconde copie de l'opéron *s10*. Pour cela, nous pourrions tenter de la placer à mi-chemin entre l'origine de réplication et le site de terminaison de la réplication, ou encore de la placer à proximité du site de terminaison de la réplication. Déplacer de cette manière la copie supplémentaire de l'opéron *s10* pourrait permettre de déterminer si son éloignement progressif de l'origine de réplication affecte la vitesse de croissance de *M. pneumoniae*. Une fois tous les mutants obtenus, il faudrait étudier leurs vitesses de croissances respectives afin de déterminer si le fait de dupliquer l'opéron *s10*, ou encore si la localisation sur le génome bactérien de la version supplémentaire de cet opéron *s10*, aurait véritablement une influence sur la croissance de *M. pneumoniae*. Une fois déterminé, il pourrait être intéressant d'ajouter l'opéron *s10* dans les souches produites au CRG possédant un set d'ARNt et ARNr augmenté (cf. paragraphe III. 2. 1. Capture de l'opéron *s10*).

En ce qui concerne le remplacement d'une portion du génome de *M. pneumoniae*, nous avons pour l'instant réussi à remplacer la région *mpn372-mpn400* par la même région capturée dans le vecteur pCC1YTRP. Lorsque nous avons essayé de remplacer cette même région par son homologue édité pour *mpn400* ($\Delta mpn400$), ou pour *mpn372* et *mpn400* ($\Delta mpn372-\Delta mpn400$), nous n'avons pas obtenu de transformant. Le problème pourrait venir du fait que les régions éditées proviennent de la levure, contrairement à la région *mpn372-mpn400* non modifiée qui provient de blocs bactéries. Cependant, cela semble peu probable. En effet, lors de l'expérience de duplication de l'opéron *s10*, des clones *M. pneumoniae* ont été obtenus en utilisant de l'ADN extrait de levure hébergeant le génome de *M. pneumoniae*. Nous pouvons également supposer que la modification que nous souhaitons apporter n'est pas viable pour *M. pneumoniae*. Peut-être avons-nous affecté des régions essentielles du génome. Les délétions des gènes *mpn372* et *mpn400* ont été réalisées de manière précise par

CREasPy-cloning. En revanche, il n'est pas impossible que des mutations touchant des gènes essentiels présents dans cette région soient apparues dans cette région au cours des manipulations. La région *mpn372-mpn400* contient 32 gènes, 9 de ces gènes seraient essentiels, 13 seraient impliqués dans le « fitness » de *M. pneumoniae*, et les 10 gènes restants seraient non essentiels (Lluch-Senar, Delgado, *et al.*, 2015). Cela semble cependant peu vraisemblable car la levure est utilisée au laboratoire comme plateforme d'ingénierie d'édition de génomes depuis presque dix ans, et très peu de mutations non désirées sont apparues au cours de ces expérimentations. Un moyen de le vérifier serait de faire séquencer la région capturée.

De nouveaux essais de GT-RMCE sont en cours, en utilisant comme source d'ADN d'autres clones levure contenant le génome de *M. pneumoniae* édité. Nous supposons que les différents clones ne contiennent pas tous des mutations dans des gènes essentiels. Un autre moyen de confirmer l'hypothèse concernant ces mutations pourrait être de faire séquencer les plasmides pCC1YTRP-*gmR-mpn372-Δmpn400-cre* et pCC1YTRP-*gmR-Δmpn372-Δmpn400-cre*.

Le GT-RMCE est un outil présentant une certaine flexibilité. En effet, il offre la possibilité de modifier la région d'intérêt à plusieurs niveaux. Celle-ci peut être éditée dans la levure, à l'issue de sa capture, en utilisant les technologies disponibles pour cet hôte (TREC, TREC-IN, CRISPR-Cas9...), mais elle peut également être mutée dans *E. coli*. Ce deuxième hôte est initialement utilisé pour amplifier le plasmide pCC1YTRP-*gmR-X-cre*, mais il dispose également d'outils (lambda Red, RecET, CRISPR-Cas9...) permettant de modifier la région X, et ce de manière encore plus rapide que dans la levure.

Plus généralement, le GT-RMCE est un outil que nous envisageons d'améliorer encore. Nous voulons notamment travailler sur la taille des fragments capturés et utilisés pour réaliser les modifications dans le génome de *M. pneumoniae*. En effet, nous avons introduit dans le génome bactérien un fragment de 15 kb, et nous avons échangé un fragment de 38 kb. Nous souhaitons augmenter progressivement la taille de ces fragments afin de déterminer la taille maximale avec laquelle il est possible de travailler. Le vecteur pCC1FOS™ pouvant intégrer des fragments dont la taille peut aller jusqu'à 100 kb, nous pensons qu'il serait intéressant de capturer des fragments d'ADN de cette taille-là. Le génome de *M. pneumoniae* faisant 816 kb, cela permettrait de pouvoir l'éditer entièrement en travaillant seulement sur 8 ou 9 portions génomiques différentes. En revanche, nous ne connaissons pas encore la taille maximale des

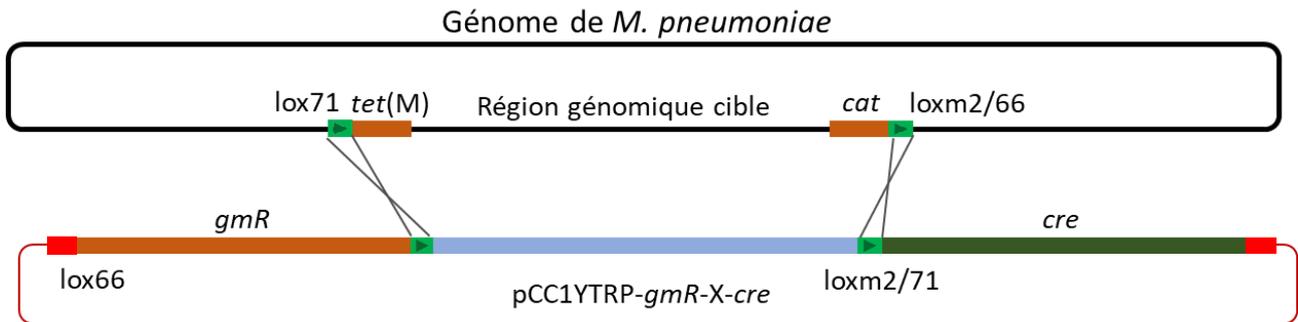


Figure 91. Localisation du marqueur *gmR* à l'extérieur des sites *lox*, afin d'éviter son intégration dans le génome de *M. pneumoniae* à l'issu du GT-RMCE.

molécules d'ADN que l'on peut transformer dans *M. pneumoniae*. Ces essais pourraient donc permettre d'appréhender cette limite.

Un autre point que nous souhaiterions améliorer est l'utilisation du marqueur gentamycine. Effectivement, avec le système GT-RMCE actuel ce marqueur est intégré *in fine* dans le génome de *M. pneumoniae*. Or, si nous souhaitons modifier ce génome de manière itérative nous ne pouvons pas nous permettre de garder les marqueurs de sélection dans le génome. En effet, les marqueurs disponibles sont en nombre limités (puromycine, tétracycline, gentamycine, chloramphénicol, érythromycine). De plus, le but final des projets MiniCell et MycoSynVac étant de produire un châssis bactérien qui pourrait être injecté dans des organismes vivants, il n'est pas possible de garder un gène de résistance à un antibiotique. Nous pourrions donc envisager de placer le marqueur *gmR* à l'extérieur des sites *lox*, afin que celui-ci ne soit pas intégré dans le génome bactérien à l'issue du GT-RMCE (Figure 91). Il pourrait également être intéressant d'utiliser d'autres recombinaisons afin d'éliminer le marqueur *gmR* du génome bactérien après édition de ce dernier. En effet, il existe d'autres systèmes de recombinaison qui permettent l'excision d'un fragment d'ADN, tels que le système Flp/FRT (Ji *et al.*, 2017) qui provient du plasmide levure 2 μ , ou encore les systèmes de recombinaison *Vcre/VloxP* et *Scre/SloxP*, originaires des plasmides p0908 de *Vibrio* et plasmide 1 de *Shewanella* (Suzuki and Nakayama, 2011), respectivement.

Enfin, une réflexion est actuellement menée sur le fait qu'il pourrait être intéressant de se passer de la levure. En effet, nous aimerions être capables de réaliser l'étape de capture chez *E. coli*. *M. pneumoniae* utilisant un code génétique différent de celui d'*E. coli* (le codon UGA est lu comme un codon tryptophane chez *M. pneumoniae* alors qu'il est lu comme un codon stop chez *E. coli*), les gènes codés par *M. pneumoniae* ne devraient pas être exprimés chez *E. coli*, ce qui évite tout problème éventuel de toxicité. Utiliser la bactérie *E. coli* comme plateforme d'ingénierie permet d'avoir accès à des outils puissants permettant d'effectuer des mutations ciblées, tels que le système lambda Red (Sharan *et al.*, 2009) ou encore le système CRISPR/Cas9 (Chung *et al.*, 2017) L'avantage principal de l'utilisation d'*E. coli* réside dans le fait qu'il est possible d'obtenir des transformants plus rapidement qu'avec la levure.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

L'avènement récent de la biologie de synthèse repose sur l'accumulation de connaissances détaillées sur les mécanismes fondamentaux du vivant. En effet, notre compréhension des règles qui régissent le comportement des systèmes biologiques nous a permis de passer d'une biologie observationnelle et analytique à une biologie prédictive et constructive. Comme tout champ technique, la biologie de synthèse repose sur l'utilisation d'un certain nombre d'outils, issus de domaines tels que la chimie, la physique, l'optique ou l'informatique, ou créés spécifiquement pour la biologie.

Parmi ces outils, ceux centrés sur la manipulation des acides nucléiques (notamment l'ADN) sont d'une importance capitale pour atteindre un des objectifs principaux de la biologie de synthèse : la création « à façon » d'organismes vivants. En effet, l'ADN est la base du dogme de la biologie moléculaire, et représente donc le point de départ de tout projet visant à construire un système biologique.

Les travaux réalisés au cours de ces quatre dernières années entrent dans ce cadre et avaient pour objectif global de créer des outils génétiques efficaces de manipulation du génome de la bactérie *M. pneumoniae*, pour construire un châssis cellulaire à partir de cet organisme. Pour atteindre cet objectif, une stratégie en trois étapes a été envisagée: (1) cloner le génome de *M. pneumoniae* dans la levure *S. cerevisiae*, (2) modifier le génome cloné en utilisant la palette d'outils disponibles chez cet hôte et (3) transplanter le génome cloné et modifié dans une cellule receveuse pour obtenir les mutants correspondants. Nos objectifs ont été en parti atteints.

Le génome de *M. pneumoniae* a été cloné avec succès dans la levure, d'abord en utilisant la méthode du génome pré-marqué par transposition puis par « CReasPy-cloning », une méthode basée sur le système CRISPR/Cas9, qui permet de cloner et d'éditer de manière simultanée un génome de mycoplasme dans la levure *S. cerevisiae*. Le CReasPy-cloning présente de réels avantages par rapport aux méthodes antérieures de clonage, permettant, à la fois, de gagner en flexibilité dans le choix du site d'insertion de la cassette « éléments levure » et de réduire le nombre d'étapes nécessaires à l'édition de plusieurs *loci*.

Sur la base de cette réussite initiale, nous avons ensuite tenté de mettre au point un protocole de transplantation du génome de *M. pneumoniae*, afin de pouvoir convertir nos gé-

-nomes clonés et édités en bactéries mutantes. Malgré de nombreux efforts, dont notamment la mise au point d'un processus efficace de transformation de *M. pneumoniae* au PEG, nous n'avons pas été en mesure de réaliser la transplantation du génome de cette bactérie.

Pour pallier ces difficultés, et dans le but d'avancer vers notre objectif final de production de souches mutantes de *M. pneumoniae*, nous avons entrepris le développement d'un nouvel outil d'édition de génome baptisé « GT-RMCE ». Cette technique nous permet de capturer dans un vecteur navette des sections de chromosome bactérien de plusieurs dizaines de kilos paires de bases. Ces sections sont ensuite transférées dans les cellules de *M. pneumoniae* par transformation (électroporation ou méthode au PEG), puis insérées dans le génome par recombinaison homologue, générant ainsi une souche bactérienne mutante. Bien qu'encore en cours d'optimisation, cette nouvelle stratégie constitue un pas en avant significatif dans notre capacité à produire des châssis bactériens.

Au cours de cette section, nous discuterons de l'apport des outils que nous avons mis au point aux domaines de la biologie de synthèse et à l'étude de *M. pneumoniae* et d'autres micro-organismes. Nous reviendrons également sur nos tentatives infructueuses de transplantation du génome, en évoquant un certain nombre de barrières biologiques qui pourraient être à l'origine des difficultés que nous rencontrons pour mettre en place cette technique pour le génome de *M. pneumoniae*.

1. APPORTS DES OUTILS CREASPY-CLONING ET GT-RMCE A LA BIOLOGIE DE SYNTHESE

Les travaux menés dans le cadre des projets MiniCell et MycoSynVac ont pour objectif central d'aboutir à la production d'un châssis cellulaire. Ce terme de « châssis » est largement utilisé en biologie de synthèse, du fait de son association au domaine de l'ingénierie mécanique classique (châssis de voiture par exemple), duquel la biologie voudrait se rapprocher sémantiquement et méthodologiquement. Ce terme illustre la volonté de produire des systèmes biologiques servant de plateforme de base, auxquelles différents modules peuvent être ajoutés (ou retranchés) en fonction d'une tâche précise à accomplir (Kim *et al.*, 2016).

De très nombreux modules sont envisagés ou d'ores et déjà mis au point, allant de la production d'une simple protéine à l'implémentation de voies de synthèse complexes permet-

-tant la production de multiples métabolites secondaires à haute valeur ajoutée (Facchini *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2012; Galanie *et al.*, 2015; Savakis and Hellingwerf, 2015; Walker and Pretorius, 2018). D'autres applications, envisagées notamment dans les projets MiniCell et MycoSynVac, visent à utiliser les châssis comme vecteurs pour la synthèse et livraison *in situ* de molécules thérapeutiques ou comme plateformes de présentations d'antigènes (Forbes, 2010; Piñero-Lambea, Ruano-Gallego and Fernández, 2015; McKay *et al.*, 2018; Chowdhury *et al.*, 2019).

Les caractéristiques que doivent posséder de tels châssis sont multiples, et visent à obtenir des outils industriels efficaces : rapidité de croissance en conditions axéniques, innocuité pour l'Homme et l'environnement, robustesse, facilité des manipulations génétiques, et standardisation des composants (Adams, 2016).

1. 1. Construction d'un châssis bactérien minimal

En plus des caractéristiques citées ci-dessus, un but majeur de la biologie de synthèse est d'obtenir un châssis qui soit aussi une cellule minimale, c'est-à-dire un organisme dont le génome ne contiendrait que les gènes nécessaires et suffisants à la production de la fonction voulue (Gao *et al.*, 2010). L'objectif de cette minimisation est de rationaliser au maximum le contenu de la cellule, avec comme précepte central que chaque élément superflu correspond à une perte d'efficacité ou de rendement et doit donc être éliminé. Cette minimisation aurait aussi comme effet de limiter les risques d'interactions négatives entre le châssis et sa charge utile (Morimoto *et al.*, 2008; Cardinale and Arkin, 2012).

Deux grandes méthodologies sont envisagées pour la production des cellules minimales (Fritz *et al.*, 2010; Xu, Hu and Chen, 2016). La première dite « Bottom-Up » (ou « constructiviste ») cherche à rassembler dans une cellule artificielle l'ensemble des composants nécessaires au fonctionnement d'un organisme vivant (Powell, 2018; Schwille *et al.*, 2018). La seconde est dite « Top-Down » (ou « réductionniste »), démarre d'un organisme vivant et tente d'en retirer toutes les fonctions non-nécessaires et superflues (Luisi, 2002; Glass *et al.*, 2017). Les outils développés au cours de cette thèse s'intègrent donc principalement dans cette seconde voie, car ils permettent la délétion de gènes à grande échelle dans des génomes d'organismes existants.

Dans ce cadre, l'étude des *Mollicutes* revêt un caractère particulier pour la conception des cellules minimales. En effet, les bactéries de cette classe font partie des organismes vivants possédant les plus petits génomes, résultat d'une évolution par perte de gènes à partir d'un ancêtre Gram positif (Woese, 1987; Weisburg *et al.*, 1989). Les *Mollicutes* sont considérés comme étant d'ores et déjà « quasi-minimale », et sont donc des points de départ intéressants pour la production réductionniste d'un châssis et la détermination du set de gènes essentiels à la vie.

La construction d'une telle cellule a déjà été entreprise à partir du mycoplasme *M. mycoides* subsp. *capri* GM12 (Hutchison *et al.*, 2016)(1). Sur la base d'études antérieures sur l'essentialité des gènes de cet organisme (réalisée par l'utilisation de transposons), un génome minimal réduit à 531 kpb et codant pour 473 gènes a été conçu. Ce génome a ensuite été synthétisé chimiquement, puis assemblé dans la levure avant d'être transplanté dans une cellule receveuse pour générer JCVI-Syn3.0, l'organisme vivant avec le génome le plus simple.

Le choix opéré dans cette étude, de fabriquer le génome modifié par synthèse d'acides nucléiques se justifie par le grand nombre de *loci* différents à supprimer (de l'ordre de plusieurs centaines) et par l'ajout d'une expérience de « défragmentation » du génome (c'est-à-dire de positionner des gènes impliqués dans les mêmes fonctions à des *loci* adjacents). Ces travaux auraient été particulièrement ardues et longs s'ils avaient été réalisés par délétion de *loci* à partir d'une molécule déjà existante.

La production d'une cellule minimale à partir de *M. pneumoniae* ne peut à l'heure actuelle pas être réalisée de la même manière, du fait de l'absence de méthode de transplantation. Néanmoins, la mise au point du GT-RMCE nous permet d'envisager le transfert morceau par morceau d'un génome synthétique, ou naturel mais édité, cloné dans la levure vers le mycoplasme. En effet, si nous parvenions à augmenter la taille de la section de génome capturée dans le vecteur navette à sa limite théorique d'environ 100-150 kpb (Gibson *et al.*, 2010; Krishnakumar *et al.*, 2014; Jiang *et al.*, 2015), nous pourrions réassembler le chromosome de *M. pneumoniae* (~800 kb) en 6 à 9 cycles successifs de GT-RMCE.

Cette approche itérative, bien que plus longue que la transplantation d'un génome entier, présente l'avantage de permettre de réaliser plus facilement un cycle « Design – Build – Test » avec ce génome muté. Il sera en effet possible de tester l'impact de chaque section sur la viabilité de la cellule minimale, en créant une souche « mosaïque » contenant des sections sauvages et des sections synthétiques. Ainsi, il sera plus facile de détecter un problè-

-me de conception entraînant une non-conformité de la cellule (taux de croissance trop lent, fragilité excessive, mauvais fonctionnement d'une voie métabolique, etc...), celui-ci étant confiné dans une section bien identifiée. Notons que cette approche de test de sections individuelles était déjà présente dans les travaux de production de JCVI-Syn3.0. Les auteurs avaient fait le choix de découper le génome de *M. mycoides* subsp *capri* en 8 morceaux, et de créer dans la levure 8 génomes chimériques contenant chacun 1 morceau synthétique et 7 morceaux sauvages. Ces 8 clones chimériques ont été transplantés séparément puis analysés, avant d'assembler le génome synthétique final et de le transplanter.

Notons enfin que dans le cadre des projets MiniCell et MycoSynVac, la création d'un génome de *M. pneumoniae* totalement minimal, c'est-à-dire constitué uniquement des gènes essentiels, n'est pas forcément souhaitable. *M. pneumoniae* étant déjà une cellule « quasi-minimale », l'objectif principal est de produire une souche avirulente. Pour cela, seul un nombre restreint de gènes codant pour des facteurs de virulence potentiels doivent être édités, les principaux étant *mpn141* (adhésine P1), *mpn142* (adhésines P90 et P40), *mpn372* (toxine CARDS), *mpn400* (Protein M), *mpn050-051* (GlpK-GlpO), *mpn043* (GlpF) et *mpn487* (HapE) (Kannan and Baseman, 2006; Hames *et al.*, 2009; Grover *et al.*, 2014; Chaudhry, Ghosh and Chandolia, 2016; Großhennig *et al.*, 2016; Parrott, Kinjo and Fujita, 2016). En tout, moins d'une dizaine de *loci* devraient être édités, ce qui peut être accompli rapidement par CREasPy-cloning et édition dans la levure. Il est même envisageable de réaliser simultanément 3 expériences de CREasPy-cloning indépendantes, ciblant chacune 3 *loci* différents, puis de rassembler par GT-RMCE toutes les sections d'ADN concernées pour produire notre châssis cellulaire avirulent.

L'approche de synthèse totale du génome reste néanmoins attractive pour *M. pneumoniae* dans le cadre de l'émergence en biologie de synthèse des approches de recodage du génome. Cette dernière consiste à remplacer systématiquement un codon par un de ses synonymes. En effet, le code génétique universel contient 64 codons qui correspondent à seulement 20 acides aminés et un Stop. Il y a donc une redondance partielle du code génétique, avec certains acides aminés codés par un unique codon et d'autres codés par deux, trois, quatre ou six codons (Koonin and Novozhilov, 2017; Szymanski and Barciszewski, 2017). Il est donc possible de coder une même séquence d'acides aminés avec de multiples combinaisons d'acides nucléiques.

Le recodage a initialement été utilisé dans le cadre de l'expression hétérologue des protéines, afin d'adapter la séquence en acides nucléiques au biais d'usage du codon de l'organisme hôte utilisé pour l'expression). Plus tard, la pratique du recodage a été utilisée en association avec le développement d'amino-acyl ARNt synthétase orthogonale, afin de pouvoir utiliser le codon STOP ambre pour coder l'insertion d'un acide aminé non-naturel (Amiram *et al.*, 2015; Bryson *et al.*, 2017; Kwok *et al.*, 2019; Melnikov and Söll, 2019). Cette utilisation implique généralement l'insertion d'un codon STOP ambre dans une séquence codante, aboutissant à la traduction d'une protéine contenant l'acide aminé non-naturel (Hong, Kwon and Jewett, 2014) .

Plus récemment, avec le développement des techniques de synthèse d'ADN, il est devenu envisageable de recoder toutes les séquences codantes d'un organisme donné, afin de totalement supprimer un ou plusieurs codons. Deux exemples récents ont été décrits dans la littérature. D'une part, le génome d'*E. coli* (4 Mpb) a été entièrement remplacé par un génome synthétique dans lequel $1,8 \times 10^4$ codons cibles ont été éliminés, permettant ainsi la création d'un organisme utilisant uniquement 59 codons (Fredens *et al.*, 2019). D'autre part, la synthèse chimique d'un génome réduit de *Caulobacter crescentus* a également été effectuée (785 701 pb contre 4 042 929 pb pour le génome naturel) (Venetz *et al.*, 2019). Dans ce cas, ce sont 123 562 codons qui ont été réécrits (soit 56% des codons). Les codons TTG et TTA ont été entièrement éliminés du génome synthétique. Le codon TAG y est présent seulement 10 fois et plusieurs éléments génétiques incluant ORFs, site de liaison aux ribosomes et site de démarrage de la transcription ont disparu (6290 dans le génome naturel contre 799 dans le génome synthétique).

Le recodage de gènes présente plusieurs intérêts. Il peut permettre notamment (i) de simplifier le processus de synthèse d'ADN *de novo*, via l'élimination de certaines contraintes telles que la présence de régions répétées, de brins d'ADN constitués de la répétition d'un homopolymère, ou bien de régions ayant un fort ou faible pourcentage en GC ; mais aussi (ii) de comprendre comment les fonctions les plus fondamentales d'une cellule sont programmées en ADN ; et encore (iii) de réassigner des codons sens pour coder la synthèse d'acides aminés artificiels (acides aminés non présents dans des organismes naturels), ceci pouvant conduire par exemple à la synthèse d'un biopolymère (Fredens *et al.*, 2019; Venetz *et al.*, 2019).

Concernant *M. pneumoniae*, le recodage du génome serait également intéressant d'un point de vue fondamental, car il permettrait de supprimer une des caractéristiques génétiques des mycoplasmes : l'usage d'un code génétique non-standard. L'origine évolutive de cette idiosyncrasie est toujours inconnue, et il est intéressant de noter qu'elle n'est pas partagée avec les phytoplasmes ou les Acholeplasma, eux aussi membres de la classe *Mollicutes*. De plus, le recodage permettrait aussi de travailler sur l'origine et l'impact biologique du pourcentage de GC du génome des mycoplasmes. *M. pneumoniae* fait en effet figure d'exception, avec un taux de GC proche de 40% alors que les autres mycoplasmes ont un taux proche de 20%, y compris son très proche « cousin » phylogénétique *M. genitalium*. Avoir la capacité d'obtenir une souche de *M. pneumoniae* avec un pourcentage de GC bas (environ 25%), ou à l'inverse une souche d'un autre mycoplasme avec un pourcentage de GC « classique » (environ 40%), pourrait nous éclairer sur la fonction évolutive de cette composition en acides nucléiques.

1. 2. Ajout de modules de charge utile à un châssis

Une fois le châssis cellulaire conçu et produit, il faut être à même d'y rajouter efficacement les différents modules génétiques codant pour les charges utiles destinées à remplir une fonction donnée. A l'heure actuelle, il n'y a pas d'exemple dans la littérature d'utilisation d'un mycoplasme comme plateforme de production d'un composant particulier. Nous ne prenons pas en compte dans cette assertion les travaux de recherche fondamentale visant à faire exprimer par la cellule un marqueur de résistance antibiotique (Lartigue *et al.*, 2007), ou une protéine de fusion (Bonnefois *et al.*, 2016), depuis un *loci* génomique ou plasmidique (Li *et al.*, 2015).

En revanche, ces approches sont largement développées chez d'autres micro-organismes, notamment *E. coli*, *B. subtilis* et *S. cerevisiae*, qui sont fréquemment utilisés pour la production biotechnologique de composés d'intérêt. En fonction de l'objectif à accomplir, la taille totale des gènes codant pour la charge utile peut varier des quelques kilos paires de bases à plusieurs dizaines de kilos paires de bases (Facchini *et al.*, 2012; Walker and Pretorius, 2018). C'est par exemple le cas pour la voie de synthèse des opiacés recrée chez la levure (Galanie *et al.*, 2015), qui comporte 27 gènes, répartis dans 7 modules intégrés dans 6 *loci* génomique et 1 *locus* plasmidique et totalisant plus de 49 kb.

Le GT-RMCE est conceptuellement bien adapté à ce type de manipulation, comme nous l'avons démontré avec la duplication de l'opéron *s10*. Notons également que l'utilisation des landing pads est en parfaite adéquation avec la notion de modularité. Il est en effet possible de destiner une portion du génome du châssis à devenir une « zone cargo », en y plaçant plusieurs landing pads différents dans lesquels viendraient s'insérer les modules de charge utile désirés.

2. APPORTS DES OUTILS CREASPY-CLONING ET GT-RMCE A LA BIOLOGIE

Le CREasPy-cloning et le GT-RMCE présentent un certain nombre d'avantages par rapport aux outils déjà disponibles pour l'édition des génomes de mycoplasmes en général, et de *M. pneumoniae* en particulier. Ces améliorations techniques ouvrent plusieurs perspectives d'applications, à la fois pour les travaux de construction de châssis pour lesquels ils ont été développés, mais aussi pour des recherches en biologie fondamentale.

2. 1. Développement de la génétique inverse chez les mycoplasmes

Le terme « génétique inverse » décrit une méthode expérimentale dans laquelle le matériel génétique d'un organisme est modifié afin de pouvoir observer les modifications phénotypiques qui en résultent (Griffiths *et al.*, 2000). Cette approche permet ainsi d'obtenir des informations sur la fonction d'un gène ou de l'effecteur (protéine ou ARN) qu'il code.

La puissance de la génétique inverse est directement liée à la capacité de l'expérimentateur à générer tel ou tel type de mutation dans le génome de l'organisme à étudier. Par exemple, la génération d'un mutant knock-out pour un gène donné peut se faire : *i)* par délétion propre (suppression de la totalité du gène ou de la totalité de la séquence codante); *ii)* par décalage du cadre de lecture par génération d'indels; ou *iii)* par insertion d'une cassette exogène. Bien que ces trois méthodes produisent le même résultat global, à savoir la perte de la fonction encodée par le gène, le degré de contrôle expérimental qu'elles autorisent n'est pas le même.

Il est globalement préférable pour la génétique inverse de disposer d'une technique de mutagenèse la plus précise possible, autorisant la manipulation de l'ADN à la base près, que ce soit pour réaliser des délétions, des insertions ou des remplacements. Il est également intéressant de disposer d'un système permettant de cibler plusieurs gènes situés à des *loci* éloignés, soit simultanément, soit de façon itérative, afin de pouvoir étudier d'éventuels effets cumulatifs ou synergiques. Ce sont ces caractéristiques désirables qui sont à l'origine de l'expansion fulgurante des outils basés sur le système CRISPR-Cas9, que nous avons-nous aussi adoptés.

Dans le cas spécifique de l'étude des mycoplasmes du cluster *Mycooides*, les outils d'édition de génome dans la levure et de transplantation, développés au cours de la décennie précédente, permettent de réaliser ces mutagenèses « à façon ». Plusieurs études centrées sur *Mycoplasma mycooides* subsp. *capri* ont utilisé cette technique pour supprimer sans cicatrice des gènes codant pour des facteurs de virulence putatifs, comme par exemple *glf* (impliqué dans la synthèse du galactofuranose, composant de la capsule)(Schieck *et al.*, 2016; Jores, Schieck, *et al.*, 2019), *glpO* (glycerol oxidase impliquée dans la production de peroxyde d'hydrogène)(Tsarmopoulos *et al.*, 2016) ou *rlmFO* (impliqué dans la maturation de l'ARNr 23S)(Lartigue *et al.*, 2014).

Des expériences conceptuellement similaires ont été réalisées au laboratoire avec la méthode CReasPy-Cloning, qui a été appliquée pour cloner et éditer les génomes de deux autres bactéries du cluster *Mycooides*, ayant par le passé été clonés dans la levure par les méthodes « classiques ». Ainsi, le génome de *Mycoplasma leachii* (Manso-Silván *et al.*, 2009) a été cloné dans *S. cerevisiae* en remplaçant le *locus* MSB_0138 codant pour une bêta-lactamase putative par la cassette « éléments levure ». En parallèle, le génome de *Mycoplasma mycooides* subsp. *mycoide* souche Aadé (Yaya *et al.*, 2008) a été cloné en ciblant le *locus* TS60_0301-0299 codant pour une α -glycerolphosphate oxidase (GlpO), une glycérol kinase (GlpK) et une protéine impliquée dans l'import de glycérol (GlpF). Dans ces deux cas de figure, le système CReasPy-Cloning présente l'avantage de n'éditer que le *locus* ciblé, les éléments levures n'étant pas insérés aléatoirement par ailleurs. Dans le cas de *M. leachii*, le génome cloné et édité a été transplanté dans la cellule receveuse *M. capricolum* subsp. *capricolum* et les mutants correspondants ont été obtenus.

En ce qui concerne *M. pneumoniae*, au début de ces travaux de thèse, un seul exemple de mutagenèse ciblée avait été décrit dans la littérature (Krishnakumar *et al.*, 2010). Dans cette

étude, les auteurs ont utilisé un système dans lequel la bactérie est transformée avec un plasmide non-répliatif contenant une cassette de résistance à la puromycine encadrée par deux régions de 1 kpb homologues au site d'insertion dans le génome. La culture des transformants sur un milieu contenant de la puromycine permet ensuite de sélectionner les cellules dans lesquelles un évènement de recombinaison a permis d'intégrer la cassette de résistance dans le chromosome. Malgré ce succès technique, cette méthode n'a depuis plus été réutilisée dans la littérature, sans doute à cause de sa faible efficacité.

De ce fait, la méthode la plus employée pour la mutagenèse de *M. pneumoniae* reste l'utilisation de transposons, et notamment Tn4001 et ses dérivés (Halbedel and Stülke, 2007). Cette approche, bien qu'aléatoire et basée sur la disruption du cadre de lecture par une cassette, a été utilisée à de très nombreuses reprises afin d'élucider la biologie de *M. pneumoniae* (Reddy, Rasmussen and Baseman, 1996; Krause *et al.*, 1997; Hutchison *et al.*, 1999; Hasselbring *et al.*, 2006; Lluch-Senar, Delgado, *et al.*, 2015). De ce fait, plusieurs banques de mutants sont disponibles, couvrant la quasi-totalité du génome, ce qui permet en théorie de caractériser tout gène d'intérêt. Néanmoins, ces banques ont été réalisées sur des souches modèles de laboratoire, et ne sont donc pas adaptées à l'étude de souches plus atypiques ou d'isolats cliniques.

De plus, l'approche par transposon présente deux inconvénients majeurs. Tout d'abord il a récemment été démontré que l'utilisation du transposon Tn5-Puro^R chez *M. mycoides* subsp. *capri* entraîne des effets polaires sur l'expression des gènes adjacents au locus d'insertion du transposon (Hutchison *et al.*, 2019). Ce type d'effet peut introduire un biais dans la caractérisation phénotypique du mutant. De plus, l'approche par transposon ne permet pas de cibler aisément plusieurs loci. Il faut réaliser de façon itérative deux expériences de bombardement du génome, avec deux transposons différents, et cribler chaque banque jusqu'à trouver le clone présentant les deux mutations désirées. Il serait donc particulièrement long et complexe de réaliser des études d'épistasie chez *M. pneumoniae*.

La stratégie GT-RMCE permettrait de passer outre ces restrictions techniques, du fait de la rapidité d'obtention du génome muté en de multiples positions et de la possibilité de réaliser des délétions propres des loci d'intérêt. Notons que le GT-RMCE n'est pas une méthode spécifique aux mycoplasmes, et qu'elle peut potentiellement être appliquée à une large gamme d'organismes vivants, à condition que ceux-ci soient transformables et permettent l'insertion de landing pads.

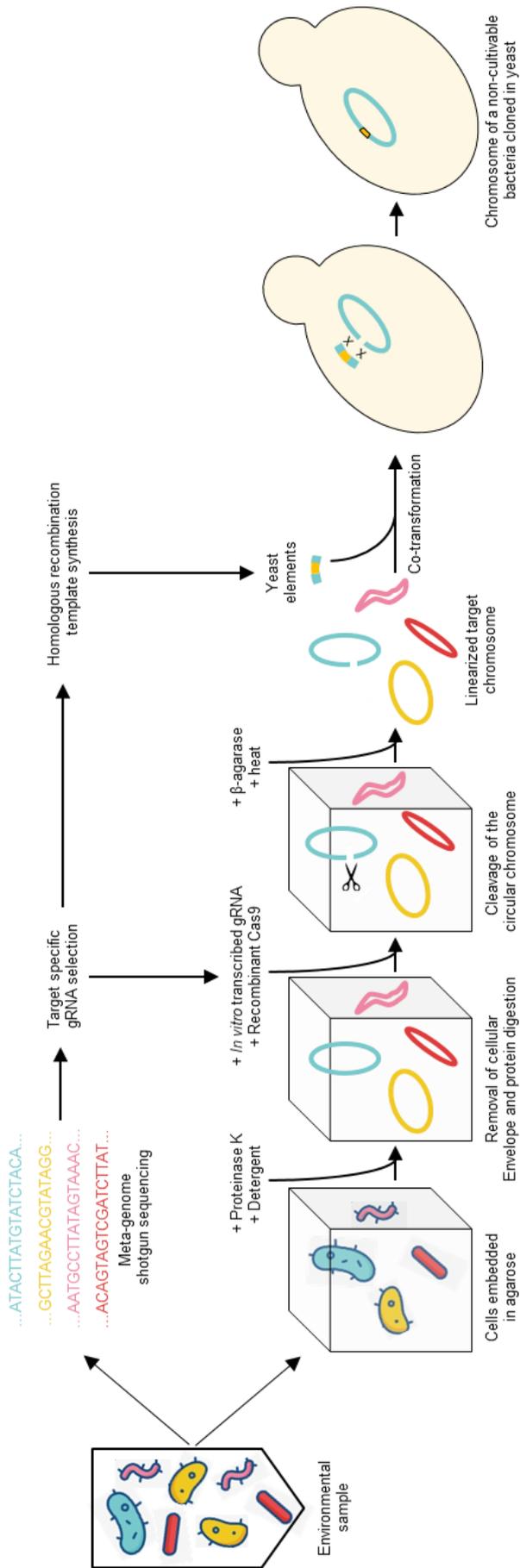


Figure 92. Capture d'ADN environnemental par CReasPy-cloning. Schéma illustrant la stratégie proposée de capture et de clonage dans la levure d'un chromosome bactérien à partir d'un échantillon complexe, contenant une communauté microbienne diverse. L'échantillon peut être divisé en deux après collecte, la première moitié étant utilisée pour une analyse de métagénomique (type « shotgun sequencing »). La seconde moitié d'échantillon est utilisée pour la préparation de blocs d'agarose. Une fois les données de métagénomique collectées, un locus d'intérêt est choisi, et utilisé pour concevoir l'ARN guide correspondant. Le bloc d'agarose et l'ARN guide sont ensuite utilisés dans un protocole de CReasPy-cloning.

2. 2. Capture d'ADN génomique d'organismes non-cultivables

Au cours du processus de conception du CReasPy-cloning, nous avons envisagé que cette technique puisse être utilisée pour capturer tout ou partie du ou des chromosomes d'un micro-organisme non-cultivable.

L'écologie microbienne, appuyée notamment par les progrès de la métagénomique, nous indique que la quasi-totalité des écosystèmes sont occupés par des populations de micro-organismes extrêmement diverses. Or, les tentatives d'isolement et de mise en culture de ces organismes se soldent généralement par des échecs relatifs, avec seulement 1-10% de la diversité observable finalement capturée (Keller and Zengler, 2004; Singh *et al.*, 2013). Cette « grande anomalie de comptage » (Connon and Giovannoni, 2002) s'explique notamment par l'inadéquation des conditions de culture *in vitro*, l'état de dormance de certains organismes, et la co-dépendance de certaines espèces rendant impossible leur culture axénique. L'accès restreint à cette biodiversité nous prive potentiellement de la découverte d'activités enzymatiques intéressantes, et de connaissances fondamentales sur le vivant. Cette limite est partiellement contrebalancée par l'abaissement du coût du séquençage, qui permet d'obtenir de plus en plus d'informations sur les génomes de ces micro-organismes.

Nous proposons donc d'utiliser la méthode du CReasPy-cloning pour venir capturer de façon sélective le génome d'un organisme particulier présent dans un échantillon (Figure 92). Sur la base de données de métagénomique, nous pouvons choisir un *locus* cible dans une des séquences générées et concevoir et produire le gRNA et la cassette « éléments levure » associés. L'ADNg environnemental peut ensuite être préparé en bloc d'agarose, et traité *in vitro* avec la Cas9 et le gRNA, puis co-transformé avec le pansement de recombinaison, dans *S. cerevisiae*. Une fois cloné dans la levure, cet ADNg environnemental pourrait être étudié à loisir, car à présent disponible en quantités importantes et donc facilement séquençable.

3. LES BARRIERES POTENTIELLES A LA TRANSPLANTATION DE GENOMES

La transplantation de génomes est une technique encore relativement jeune, et qui a pour le moment été appliquée à un nombre restreint de mycoplasmes appartenant tous au cluster Mycoides. L'extension de cette méthode à d'autres mycoplasmes, dont *M. pneumo-*

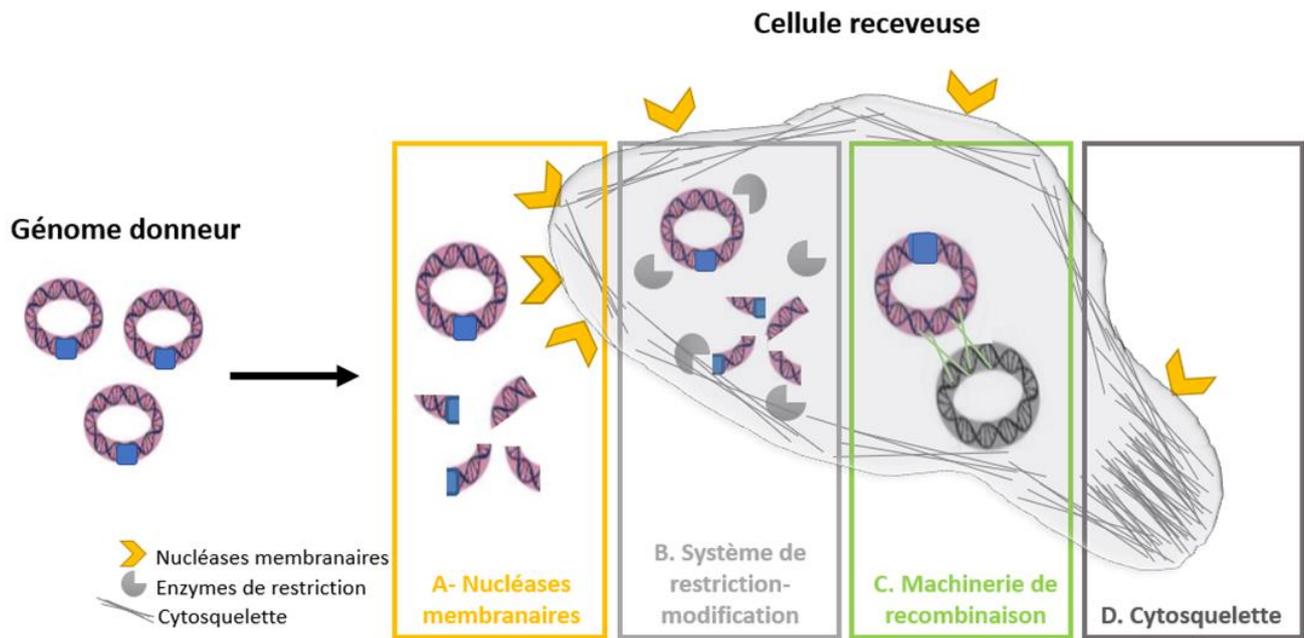


Figure 93. Schéma illustrant les barrières potentielles à la transplantation de génomes.

-niae, et à d'autres organismes est un enjeu important. En effet, bien que nous ayons réussi à développer une méthode alternative pour éditer des génomes, la transplantation reste un outil extrêmement puissant qu'il sera toujours bénéfique de maîtriser.

Une large partie des ressources dévolues à cette thèse ont été utilisées pour la mise au point de ce processus de transplantation chez *M. pneumoniae*, mais pour l'instant sans succès. La plupart des essais ont été réalisés en utilisant *M. pneumoniae* M129 ou FH (sauvage ou mutées) comme cellule receveuse et *M. pneumoniae* M129-tet(M) ou *M. pneumoniae* M129-puroR comme génome donneur. Plus récemment, ces expérimentations ont été élargies à *M. genitalium* G37, utilisée comme autre cellule receveuse potentielle.

Un certain nombre de facteurs biologiques pouvant impacter négativement le processus de transplantation du génome de *M. pneumoniae* dans *M. pneumoniae* ou *M. genitalium* ont été identifiés, et sont regroupés sous le terme de « barrières potentielles » à la transplantation. Ces facteurs peuvent affecter aussi bien l'entrée du génome donneur dans la cellule receveuse, que l'intégrité du génome donneur (Figure 93).

3. 1. Les nucléases membranaires

L'analyse des besoins nutritionnels des mycoplasmes, ainsi que les informations fournies par la génomique comparative et les expériences de biochimie suggèrent que les mycoplasmes sont incapables de réaliser la synthèse *de novo* des nucléotides (Jarvill-Taylor, VanDyk and Minion, 1999; Sharma *et al.*, 2015). Afin de compenser cette déficience, ces organismes doivent posséder des activités enzymatiques et de transports permettant de prélever depuis l'environnement les précurseurs de leurs acides nucléiques, soit sous forme de bases azotées libres ou sous forme d'oligonucléotides.

Des nucléases membranaires ou associées aux membranes, localisées sur la face externe des cellules, ont été identifiées chez la quasi-totalité des mycoplasmes (Minion *et al.*, 1993). De plus, la majorité des espèces étudiées présentent dans leur génome plusieurs gènes codant pour ces nucléases membranaires. Du fait de leur activité et de leur localisation, il a été proposé que ces enzymes soient impliquées dans l'approvisionnement des cellules en purines et pyrimidines, en dégradant les ADN ou ARN présents dans l'environnement.

Ces nucléases membranaires pourraient donc constituer une barrière à la transplantation de génomes, en dégradant le chromosome donneur avant son entrée dans la cellule, lors de la période d'incubation avec la cellule receveuse (Figure 93 A). Etant donné que le génome transplanté doit être circulaire et intact, même une très faible activité endonucléasique pourrait suffire à abaisser drastiquement le taux de transplantation en linéarisant le chromosome donneur.

Chez *M. pneumoniae*, deux nucléases membranaires ont été identifiées (Jarvill-Taylor, VanDyk and Minion, 1999; Somarajan, Kannan and Baseman, 2010). La première est codée par le gène *mpn133* et a été décrite comme étant une nucléase cytotoxique dépendante du calcium. La seconde, codée par le gène *mpn491*, serait un homologue de la nucléase membranaire MnuA identifiée chez *M. pulmonis*.

Plusieurs solutions techniques sont envisageables afin de limiter l'impact de ces deux nucléases sur la transplantation. La première possibilité consiste à utiliser comme cellule receveuse des mutants de délétion pour les gènes *mpn133* et *mpn491* (la méthode utilisée est une technologie non publiée et protégée). Ces mutants font actuellement partie des cellules receveuses utilisées dans les essais de transplantation de génomes en cours. En théorie, les nucléases de surface pourraient être également neutralisées par un agent chélateur du calcium, tel que l'EDTA (Almeida Garcia *et al.*, 2017). Ceci permettrait, en effet, de priver les nucléases de leur cofacteur (Ca^{2+}) et donc d'affecter de manière négative leur activité. En pratique, il est difficile d'imaginer qu'un tel traitement puisse être efficace dans le cas de *M. pneumoniae* car les cellules doivent être remise en suspension dans du CaCl_2 0.1M et laissées 45 minutes dans la glace pour que le protocole de transformation soit efficace. Dans ce contexte, il serait certainement plus intéressant d'essayer différents inhibiteurs de nucléases, comme l'héparine, la spermine, la spermidine ou encore l'acide aurintricarboxylique (Hallick *et al.*, 1977; Osland and Kleppe, 1978; Basu *et al.*, 2003).

3. 2. Les systèmes de restriction-modification

Les systèmes de restriction-modification (RM) sont des mécanismes de défense produits par certaines bactéries afin de lutter contre l'invasion par de l'ADN exogène, notamment celui de bactériophages. Ils sont qualifiés de systèmes immunitaires primitifs chez

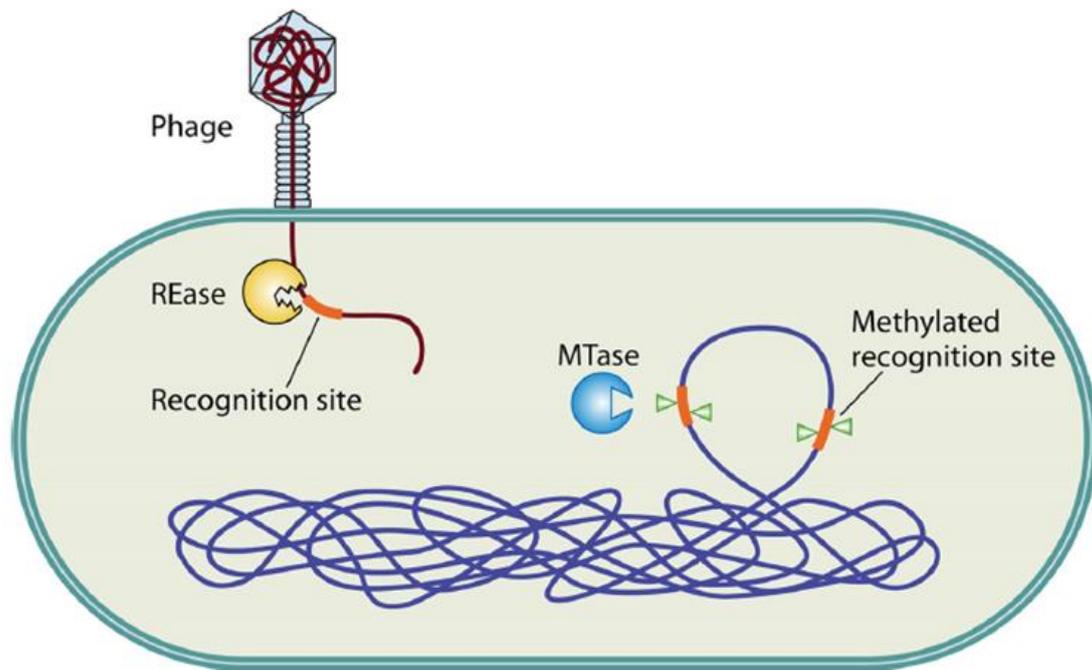


Figure 94. Schéma illustrant le fonctionnement général des systèmes de restriction-modification (RM). L'enzyme de restriction (REase) clive l'ADN étranger (dans cet exemple un ADN de phage) au niveau de sites de reconnaissance bien spécifiques. La méthyltransférase (MTase) méthyle l'ADN endogène au niveau de ces mêmes sites spécifiques. La bactérie protège ainsi son propre génome contre l'action des REases, via la méthylation de son ADN. Ce schéma est issu de la publication Vasu & Nagaraja, 2013.

les bactéries (Vasu and Nagaraja, 2013). Il en existe différents types (type I, type II, type III et type IV), mais les plus représentés sont les types I et II. Les systèmes de RM de type I sont composés de trois polypeptides assemblés en un seul complexe : une sous-unité « R » qui dispose d'une activité de restriction, une sous-unité « M » (pour modification) qui possède une activité de méthyltransférase, et une sous-unité « S » qui détermine la spécificité de la méthylation et de la restriction. Dans les systèmes de RM de type II, l'endonucléase de restriction (REase) et la méthyltransférase (MTase) sont deux protéines différentes. De manière générale le fonctionnement de ces systèmes est le suivant. La REase clive l'ADN au niveau de sites bien spécifiques, et la MTase méthyle l'ADN au niveau de ces mêmes sites spécifiques. L'ADN méthylé est « protégé » contre l'action des REases, alors que l'ADN non méthylé ne l'est pas. Les systèmes de R-M permettent donc aux hôtes qui les hébergent de différencier l'ADN endogène (méthylé) de l'ADN exogène (non méthylé) qui sera alors digéré par les REases (Figure 94).

Ces systèmes de restriction-modification ont déjà été identifiés comme pouvant empêcher la transplantation de génomes (Lartigue *et al.*, 2009), en particulier dans le cas où le génome donneur est isolé depuis la levure. En effet, l'ADN donneur présente un profil de méthylation qui est propre aux MTases présentes chez l'hôte dans lequel il a été répliqué (par exemple la levure). Lorsque ce génome donneur est extrait puis transplanté dans un autre organisme (comme par exemple un mycoplasme receveur), ce profil de méthylation est reconnu comme étant du « non-soi » et l'ADN est dégradé par les REases de la nouvelle cellule receveuse. Les systèmes RM constituent donc une barrière à la transplantation en dégradant le génome donneur à l'intérieur du cytoplasme de la cellule receveuse (Figure 93 B).

Des gènes codant pour un système de RM de type I ont été identifiés chez *M. pneumoniae* (Lluch-Senar *et al.*, 2013). Il s'agit des gènes *mpn342* pour la sous-unité M, *mpn343* pour la sous-unité S, et *mpn345*, *mpn346* et *mpn347* pour des sous-unités R. Différents gènes codant un système de type II ont également été annotés : les gènes *mpn107*, *mpn108* et *mpn111* qui codent des MTases, et les gènes *mpn109* et *mpn110* qui codent des REases. Une autre méthyltransférase a été identifiée, codée par le gène *mpn198*, mais elle n'est pas associée à un système de RM (Lluch-Senar *et al.*, 2013). Il est intéressant de souligner ici que le gène *mpn198* est un gène essentiel (Lluch-Senar, Delgado, *et al.*, 2015). Nous pouvons donc supposer que cette MTase pourrait jouer un rôle important, *via* la méthylation du génome de *M. pneumoniae*, même si son rôle n'est pas encore élucidé.

Afin de se prémunir face à l'activité éventuelle de ces restrictases intracellulaires, des mutants de délétions pour les gènes codant des restrictases ont été obtenus au laboratoire. Nous avons choisi d'opérer une délétion du gène *mpn347*. En effet, lorsque nous avons analysé les séquences protéiques codées par les gènes *mpn346* et *mpn347* dans la base de données « Pfam » (base de données bio-informatique de familles de protéines), nous avons remarqué que la protéine codée par le gène *mpn347* contient un domaine de restriction de type I, alors qu'aucun domaine de ce type n'a été identifié pour la protéine codée par le gène *mpn346*. En ce qui concerne le gène *mpn345*, celui-ci contient trois mutations entraînant un décalage de lecture, ce qui entraîne la production d'une protéine très certainement inactive. Il a donc été décidé de construire un mutant de délétion uniquement pour le gène *mpn347*. Un mutant de délétion pour le gène *mpn110* a également été obtenu. Comme précédemment, nous avons entré les séquences protéiques des gènes *mpn109* et *mpn110* dans la base de données « Pfam », et contrairement à ce qui est prédit dans la littérature (Lluch-Senar *et al.*, 2013), c'est la protéine codée par le gène *mpn110* qui semble disposer d'un domaine restrictase, et non la protéine codée par le gène *mpn109*. La technique utilisée pour réaliser ce type de délétions (méthode non publiée et protégée) ne permettant de travailler que sur un seul gène à la fois, nous avons décidé de commencer par cibler le gène *mpn110*, mais nous pourrions toujours envisager de déléter également le gène *mpn109* par la suite. Les mutants de délétion pour les gènes *mpn347* et *mpn110* font donc parti des cellules receveuses potentielles lors des expériences de transplantation. Inactiver par délétion une endonucléase s'est déjà révélé efficace dans le cas de la transplantation du génome de *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri* de la levure vers *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* (Lartigue *et al.*, 2009). Un autre moyen de s'affranchir de l'activité des systèmes de RM est de protéger l'ADN donneur en le méthylant. Ainsi, le génome donneur pourrait être méthylé *in vitro*, en utilisant des extraits cellulaires de la bactérie receveuse, ou bien directement ses MTases purifiées. Une autre façon de faire pourrait être de méthylater l'ADN donneur *in vivo*, en clonant par exemple dans la levure les gènes *mpn342*, *mpn107*, *mpn108* et *mpn111* qui codent pour des MTases. Cependant, il a été montré que l'expression de méthyltransferases bactériennes chez la levure peut induire des phénomènes de recombinaison homologue non désirée ou des effets mutagènes (Hoekstra and Malone, 1985). Enfin, il serait très intéressant d'inclure la MTase MPN198 dans toutes ces propositions, afin de déterminer si elle pourrait jouer un rôle important lors du processus de transplantation. Il pourrait effectivement être indispensable

de méthyler le génome donneur avec cette MTase avant toute expérience de transplantation, afin que celui-ci soit protégé d'une éventuelle dégradation par la cellule receveuse ou bien si cette MTase devait intervenir dans un autre processus fondamental de la cellule. Rappelons ici que le gène codant la MTase MPN198 est essentiel.

3. 3. La machinerie de recombinaison

Lors de la transplantation de génomes, le génome donneur est « injecté » dans la cellule receveuse. A l'heure actuelle, nous n'avons pas de réelle connaissance sur les mécanismes mis en place au niveau cellulaire, entre le moment où le génome donneur entre dans la cellule receveuse et l'obtention de la cellule mutée. En revanche, nous pensons qu'il existe une étape intermédiaire durant laquelle le génome donneur se retrouve en présence du génome de la cellule receveuse, dans le cytoplasme de cette dernière. Cette cohabitation des deux génomes présentant un fort taux de similitude pourrait donner lieu à des phénomènes de recombinaison homologue entre ces deux molécules d'ADN, et conduire ainsi à l'obtention de transplants contenant un génome recombinant au lieu du génome donneur (Figure 93C).

Du fait de l'absence de machinerie de recombinaison chez *M. pneumoniae*, cela ne devrait pas impacter la transplantation de génome dans notre cas. De plus, ce phénomène de recombinaison entre génomes n'a pas encore été démontré (Lartigue *et al.*, 2007).

Il est quand même préférable de s'assurer qu'aucun évènement de recombinaison n'a lieu lors de nos essais. Pour cela, nous pouvons prévoir un moyen de différencier les transplants attendus des transplants recombinants. Dans le cas des transplantations inter-espèces, ou intra-espèces mais entre des souches différentes de *M. pneumoniae*, il pourrait être intéressant de mettre en place un test de PCR quantitative « High Resolution Melt » (qPCR-HRM)(Krypuy *et al.*, 2007; Pasay *et al.*, 2008; Rouleau *et al.*, 2009; Mehrotra and Patel, 2016). Il s'agit d'une PCR basée sur l'analyse des courbes de fusion de deux brins d'ADN, à haute résolution. En étudiant le décalage éventuel d'une courbe de fusion par rapport à une autre, elle permet ainsi de mettre en évidence des mutations telles que des SNPs. Ce test a été appliqué au laboratoire afin de pouvoir différencier deux souches *M. mycoides* subsp. *mycoides*, les souches PG1 et T1/44. Nous pourrions donc certainement l'adapter à *M. pneu-*

-moniae, par exemple pour différencier les souches M129 et FH entre lesquelles il pourrait y avoir jusqu'à 1500 SNPs (Xiao *et al.*, 2015). En revanche, ce test ne pourra pas être utilisé dans le cadre d'une transplantation de la souche M129 dans la souche M129, ou de la souche FH dans la souche FH. Dans ce cas-là, nous pourrions faire séquencer le génome du transplant afin de vérifier qu'il correspondrait bien à ce qui serait attendu. Bien entendu, nous ne pourrions pas, ici, déterminer si le mutant obtenu est un véritable « transplant » ou bien s'il s'agit d'un simple « recombinant », mais si au final le génome contient les modifications souhaitées, cela a peu d'importance.

3. 4. Le cytosquelette

Un dernier élément que nous avons suspecté comme pouvant être une barrière à la transplantation de génomes est la présence d'un cytosquelette (Figure 9). En effet, *M. pneumoniae* et *M. genitalium* sont des mycoplasmes pourvu d'un cytosquelette (Balish and Krause, 2006; Mayer, 2006; García-Morales *et al.*, 2016; Miyata and Hamaguchi, 2016). Celui-ci, localisé au niveau de la face interne de la membrane plasmique, est organisé sous la forme d'un réseau hélicoïdal. Il est composé d'éléments protéiques formant un assemblage régulier de mailles et entourant l'ensemble du cytoplasme. De nombreux éléments structurels, sous forme de « broches », sont présents de manière régulièrement espacée et relient le cytosquelette à la membrane cytoplasmique (Mayer, 2006). Ces éléments de structure composant le cytosquelette sont impliqués dans l'adhérence cellulaire de ces mycoplasmes, un comportement qui les caractérise et qui est en lien avec leur pathogénicité. *M. pneumoniae* et *M. genitalium* sont également pourvus d'une motilité par glissement, permise grâce à l'existence d'une structure particulière, appelée organelle terminale (Hasselbring *et al.*, 2006; Bose, Balish and Krause, 2009). Il s'agit d'une structure en forme de pointe, qui se situe à l'extrémité avant de la cellule (Pich *et al.*, 2008) et qui interagit avec le cytosquelette.

Le cytosquelette pourrait donc constituer une barrière physique à l'entrée du génome donneur dans la cellule receveuse (Figure 93 D). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'une déstructuration de ce cytosquelette pourrait permettre au génome entrant d'accéder plus facilement au cytoplasme receveur. Des mutants de délétion pour des gènes codants pour certaines protéines du cytosquelette sont en cours d'obtention au laboratoire. Plus précisé-

-ment, il s'agit de mutants *M. pneumoniae* ciblés pour les gènes *mpn141* et *mpn310*, codant pour l'adhésine P1 et la protéine HMW2, respectivement ; et des mutants *M. genitalium* ciblés pour les gènes *mg218*, *mg191* et *mg192*, codant pour un homologue de la protéine HMW2, l'adhésine P140 (homologue de l'adhésine P1) et l'adhésine P110 (homologue des protéines P40/P90), respectivement.

De plus, il a été observé, lors de l'obtention de mutants de délétion pour le gène *mg218* chez *M. genitalium*, que les cellules mutantes présentaient une morphologie altérée, et notamment un agrandissement de leur taille cellulaire (Pich *et al.*, 2008). Cette caractéristique pourrait elle aussi conférer un avantage positif à la transplantation, en permettant d'agrandir l'espace disponible pour l'incorporation d'un nouveau génome.

4. CONCLUSIONS

Ces travaux de thèse ont porté sur le développement d'outils de biologie de synthèse permettant la construction d'une cellule minimale et non pathogène, à partir de *M. pneumoniae*. La stratégie adoptée a été d'utiliser la levure *S. cerevisiae* comme plateforme d'ingénierie de génomes, de nombreux outils de modification génétiques existant pour cet hôte.

La première partie de ce travail a concerné le clonage du génome de *M. pneumoniae* dans la levure. Ce génome a d'abord été cloné par une méthode déjà existante : la transformation de la levure par un génome pré-marqué par transposition. La stabilité des génomes clonés dans la levure avec cette méthode a été évaluée. Nous avons constaté que la levure maintient de manière stable le génome de *M. pneumoniae* jusqu'à dix passages. Après avoir ainsi confirmé la possibilité de cloner ce génome bactérien dans la levure, nous avons choisi de développer une nouvelle méthode plus puissante et polyvalente : le CREasPy-cloning. Cet outil nous a permis de cloner le génome de *M. pneumoniae*, tout en éditant de manière simultanée jusqu'à trois *loci* différents. Avec cette approche originale nous avons ainsi pu améliorer le clonage de génomes bactériens, en particulier celui des génomes de mycoplasmes, et réduire le temps nécessaire pour obtenir une souche éditée.

La suite des travaux a porté sur le développement d'un protocole de transformation au PEG de *M. pneumoniae*, dans le but de pouvoir réaliser la transplantation de génomes. De nombreux paramètres ont été étudiés et optimisés, permettant l'élaboration d'un protocole de transformation au PEG ayant une efficacité de transformation élevée (jusqu'à 8×10^{-5} tfs/UFC/ μg selon la souche employée). Cependant, malgré ces progrès importants, nous n'avons pas pu transplanter le génome de *M. pneumoniae*.

Les derniers travaux réalisés ont permis de trouver une voie alternative à la transplantation de génomes. Nous avons mis au point un nouvel outil, le GT-RMCE, qui rend possible le transfert de portions de ce génome de la levure vers la cellule de *M. pneumoniae* que l'on souhaite éditer. Grâce à cette technique, nous avons pu dupliquer l'opéron *s10* (15 kpb) de *M. pneumoniae*, en utilisant simplement de l'ADN génomique extrait d'une culture de *M. pneumoniae*. Nous avons également démontré notre capacité à échanger une région de 38 kpb contre la même région provenant du génome de *M. pneumoniae* cloné dans la levure.

La combinaison des deux outils développés au cours de ces travaux, le CReasPy-cloning et le GT-RMCE, rend possible la modification à grande échelle du génome de *M. pneumoniae*. La mise à disposition de ces nouveaux outils offre de nombreuses perspectives. En effet, nous pourrions obtenir de manière plus aisée et plus rapide une grande diversité de mutants *M. pneumoniae*, permettant ainsi d'approfondir nos connaissances autour de cet organisme modèle. De même, ces outils constituent un pas significatif vers la construction de nouveaux châssis bactériens.

REFERENCES

REFERENCES

- Aboklaish, A. F. *et al.* (2014) 'Random insertion and gene disruption via transposon mutagenesis of *Ureaplasma parvum* using a mini-transposon plasmid.', *International journal of medical microbiology : IJMM*, 304(8), pp. 1218–1225. doi: 10.1016/j.ijmm.2014.09.003.
- Adams, B. L. (2016) 'The Next Generation of Synthetic Biology Chassis: Moving Synthetic Biology from the Laboratory to the Field.', *ACS synthetic biology*, 5(12), pp. 1328–1330. doi: 10.1021/acssynbio.6b00256.
- Adli, M. (2018) 'The CRISPR tool kit for genome editing and beyond', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 9(1), p. 1911. doi: 10.1038/s41467-018-04252-2.
- Ajikumar, P. K. *et al.* (2010) 'Isoprenoid pathway optimization for Taxol precursor overproduction in *Escherichia coli*.', *Science (New York, N.Y.)*. NIH Public Access, 330(6000), pp. 70–4. doi: 10.1126/science.1191652.
- Algire, M. a *et al.* (2009) 'New selectable marker for manipulating the simple genomes of *Mycoplasma* species.', *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(10), pp. 4429–32. doi: 10.1128/AAC.00388-09.
- Almeida Garcia, R. *et al.* (2017) 'Nucleases as a barrier to gene silencing in the cotton boll weevil, *Anthonomus grandis*', *PLOS ONE*. Edited by J. L. Jurat-Fuentes, 12(12), p. e0189600. doi: 10.1371/journal.pone.0189600.
- Amiram, M. *et al.* (2015) 'Evolution of translation machinery in recoded bacteria enables multi-site incorporation of nonstandard amino acids.', *Nature biotechnology*, 33(12), pp. 1272–1279. doi: 10.1038/nbt.3372.
- Annaluru, N. *et al.* (2014) 'Total Synthesis of a Functional Designer Eukaryotic Chromosome', *Science*, 344(6179), pp. 55–58. doi: 10.1126/science.1249252.
- Asif, A. *et al.* (2017) 'Revisiting the Mechanisms Involved in Calcium Chloride Induced Bacterial Transformation', *Frontiers in Microbiology*, 8. doi: 10.3389/fmicb.2017.02169.
- Atkinson, T. P., Balish, M. F. and Waites, K. B. (2008) 'Epidemiology, clinical manifestations, pathogenesis and laboratory detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections.', *FEMS microbiology reviews*, 32(6), pp. 956–73. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00129.x.
- Atkinson, T. P. and Waites, K. B. (2014) 'Mycoplasma pneumoniae Infections in Childhood.', *The Pediatric infectious disease journal*, 33(1), pp. 92–94. doi: 10.1097/INF.0000000000000171.
- Baban, C. K. *et al.* (2010) 'Bacteria as vectors for gene therapy of cancer', *Bioengineered Bugs*, 1(6), pp. 385–394. doi: 10.4161/bbug.1.6.13146.
- Baby, V. *et al.* (2018) 'Cloning and Transplantation of the *Mesoplasma florum* Genome', *ACS Synthetic Biology*, 7(1), pp. 209–217. doi: 10.1021/acssynbio.7b00279.

Balasubramanian, S., Kannan, T. R. and Baseman, J. B. (2008) 'The surface-exposed carboxyl region of Mycoplasma pneumoniae elongation factor Tu interacts with fibronectin.', *Infection and immunity*. American Society for Microbiology Journals, 76(7), pp. 3116–23. doi: 10.1128/IAI.00173-08.

Balish, M. F. *et al.* (2003) 'Deletion analysis identifies key functional domains of the cytoadherence-associated protein HMW2 of Mycoplasma pneumoniae.', *Molecular microbiology*, 50(5), pp. 1507–16. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14651634> (Accessed: 17 November 2015).

Balish, M. F. (2006) 'Subcellular structures of mycoplasmas.', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 11, pp. 2017–27.

Balish, M. F. (2014) 'Mycoplasma pneumoniae, an Underutilized Model for Bacterial Cell Biology', *Journal of Bacteriology*, 196(21), pp. 3675–3682. doi: 10.1128/JB.01865-14.

Balish, M. F. and Krause, D. C. (2006) 'Mycoplasmas: a distinct cytoskeleton for wall-less bacteria.', *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 11(3–5), pp. 244–55. doi: 10.1159/000094058.

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

Barré, A., de Daruvar, A. and Blanchard, A. (2004) 'MolliGen, a database dedicated to the comparative genomics of Mollicutes.', *Nucleic acids research*, 32(Database issue), pp. D307-10. doi: 10.1093/nar/gkh114.

Basu, C. *et al.* (2003) 'Transient reporter gene (GUS) expression in creeping bentgrass (*Agrostis palustris*) is affected by in vivo nucleolytic activity.', *Biotechnology letters*, 25(12), pp. 939–944. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12889827>.

Belfort, M. and Roberts, R. J. (1997) 'Homing endonucleases: keeping the house in order.', *Nucleic acids research*, 25(17), pp. 3379–3388. doi: 10.1093/nar/25.17.3379.

Benders, G. A. *et al.* (2010) 'Cloning whole bacterial genomes in yeast.', *Nucleic acids research*. 2010/03/10, 38(8), pp. 2558–69. doi: 10.1093/nar/gkq119.

BJ Karas IT Yonemoto, CA Hutchison III, HO Smith, C. T. (2012) 'Cloning the *Acholeplasma laidlawii* PG-8A genome in *Saccharomyces cerevisiae* as a yeast centromeric plasmid', *ACS Synthetic Biology*, 1(1), pp. 22–28.

Blanchard, A. and Bébéar, C. M. (2002) 'Mycoplasmas of Humans', in *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Boston, MA: Springer US, pp. 45–71. doi: 10.1007/0-306-47606-1_3.

Blötz, C. *et al.* (2018) 'Development of a replicating plasmid based on the native oriC in Mycoplasma pneumoniae.', *Microbiology (Reading, England)*, 164(11), pp. 1372–1382. doi: 10.1099/mic.0.000711.

Blötz, C. and Stülke, J. (2017) 'Glycerol metabolism and its implication in virulence in Mycoplasma', *FEMS Microbiology Reviews*, 41(5), pp. 640–652. doi: 10.1093/femsre/fux033.

Bonnefois, T. *et al.* (2016) 'Development of fluorescence expression tools to study host-mycoplasma interactions and validation in two distant mycoplasma clades.', *Journal of biotechnology*, 236, pp. 35–44. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.08.006.

Bose, S. R., Balish, M. F. and Krause, D. C. (2009) 'Mycoplasma pneumoniae cytoskeletal protein HMW2 and the architecture of the terminal organelle.', *Journal of bacteriology*, 191(21), pp. 6741–8. doi: 10.1128/JB.01486-08.

Brooks, A. K. and Gaj, T. (2018) 'Innovations in CRISPR technology', *Current Opinion in Biotechnology*, 52, pp. 95–101. doi: 10.1016/j.copbio.2018.03.007.

Bryson, D. I. *et al.* (2017) 'Continuous directed evolution of aminoacyl-tRNA synthetases', *Nature Chemical Biology*, 13(12), pp. 1253–1260. doi: 10.1038/nchembio.2474.

Calero, P. and Nikel, P. I. (2019) 'Chasing bacterial chassis for metabolic engineering: a perspective review from classical to non-traditional microorganisms', *Microbial Biotechnology*, 12(1), pp. 98–124. doi: 10.1111/1751-7915.13292.

Cao, J., Kapke, P. A. and Minion, F. C. (1994) 'Transformation of Mycoplasma gallisepticum with Tn916, Tn4001, and integrative plasmid vectors.', *Journal of bacteriology*, 176(14), pp. 4459–4462. doi: 10.1128/jb.176.14.4459-4462.1994.

Cardinale, S. and Arkin, A. P. (2012) 'Contextualizing context for synthetic biology--identifying causes of failure of synthetic biological systems.', *Biotechnology journal*, 7(7), pp. 856–866. doi: 10.1002/biot.201200085.

Carroll, D. (2011) 'Genome engineering with zinc-finger nucleases.', *Genetics*, 188(4), pp. 773–782. doi: 10.1534/genetics.111.131433.

Casini, A. *et al.* (2018) 'A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast', *Nature Biotechnology*, 36(3), pp. 265–271. doi: 10.1038/nbt.4066.

Casjens, S. R. and Hendrix, R. W. (2015) 'Bacteriophage lambda: Early pioneer and still relevant', *Virology*, 479–480, pp. 310–330. doi: 10.1016/j.virol.2015.02.010.

Chandran, S. *et al.* (2014) 'TREC-IN: gene knock-in genetic tool for genomes cloned in yeast', *BMC Genomics*, 15(1), p. 1180. doi: 10.1186/1471-2164-15-1180.

Chang, T. L.-Y. *et al.* (2003) 'Inhibition of HIV infectivity by a natural human isolate of *Lactobacillus jensenii* engineered to express functional two-domain CD4', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(20), pp. 11672–11677. doi: 10.1073/pnas.1934747100.

Chaudhry, R., Ghosh, A. and Chandolia, A. (2016) 'Pathogenesis of Mycoplasma pneumoniae: An update', *Indian Journal of Medical Microbiology*, 34(1), p. 7. doi: 10.4103/0255-0857.174112.

Chaudhry, R., Varshney, A. K. and Malhotra, P. (2007) 'Adhesion proteins of Mycoplasma pneumoniae.', *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 12, pp. 690–699.

Chen, J. S. *et al.* (2017) 'Enhanced proofreading governs CRISPR–Cas9 targeting accuracy', *Nature*, 550(7676), pp. 407–410. doi: 10.1038/nature24268.

Cho, S., Shin, J. and Cho, B.-K. (2018) 'Applications of CRISPR/Cas System to Bacterial Metabolic Engineering', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), p. 1089. doi: 10.3390/ijms19041089.

Chopra-Dewasthaly, R., Marendra, M., *et al.* (2005) 'Construction of the first shuttle vectors for gene cloning and homologous recombination in *Mycoplasma agalactiae*', *FEMS Microbiology Letters*, 253(1), pp. 89–94. doi: 10.1016/j.femsle.2005.09.021.

Chopra-Dewasthaly, R., Zimmermann, M., *et al.* (2005) 'First steps towards the genetic manipulation of *Mycoplasma agalactiae* and *Mycoplasma bovis* using the transposon Tn4001mod', *International Journal of Medical Microbiology*, 294(7), pp. 447–453. doi: 10.1016/j.ijmm.2004.09.010.

Chowdhury, S. *et al.* (2019) 'Programmable bacteria induce durable tumor regression and systemic antitumor immunity.', *Nature medicine*. Springer US, 25(7), pp. 1057–1063. doi: 10.1038/s41591-019-0498-z.

Chung, M.-E. *et al.* (2017) 'Enhanced integration of large DNA into *E. coli* chromosome by CRISPR/Cas9', *Biotechnology and Bioengineering*, 114(1), pp. 172–183. doi: 10.1002/bit.26056.

Clewell, D. B. and Gawron-Burke, C. (1986) 'Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in streptococci.', *Annual review of microbiology*, 40(1), pp. 635–659. doi: 10.1146/annurev.mi.40.100186.003223.

Cobb, R. E., Wang, Y. and Zhao, H. (2015) 'High-efficiency multiplex genome editing of *Streptomyces* species using an engineered CRISPR/Cas system.', *ACS synthetic biology*, 4(6), pp. 723–728. doi: 10.1021/sb500351f.

Connon, S. A. and Giovannoni, S. J. (2002) 'High-throughput methods for culturing microorganisms in very-low-nutrient media yield diverse new marine isolates.', *Applied and environmental microbiology*, 68(8), pp. 3878–3885. doi: 10.1128/aem.68.8.3878-3885.2002.

Cordova, C. M. *et al.* (2002) 'Identification of the origin of replication of the *Mycoplasma pulmonis* chromosome and its use in oriC replicative plasmids', *J Bacteriol.* 2002/09/10, 184(19), pp. 5426–5435.

Cordova, C. M. M. *et al.* (2016) 'Molecular biology of mycoplasmas: from the minimum cell concept to the artificial cell.', *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 88 Suppl 1(suppl 1), pp. 599–607. doi: 10.1590/0001-3765201620150164.

Court, D. L. *et al.* (2002) 'Genetic Engineering Using Homologous Recombination ¹', *Annual Review of Genetics*. BioMed Central, 36(1), pp. 361–388. doi: 10.1146/annurev.genet.36.061102.093104.

Dandekar, T. *et al.* (2000) 'Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames.', *Nucleic acids research*, 28(17), pp. 3278–3288. doi: 10.1093/nar/28.17.3278.

Dhandayuthapani, S., Rasmussen, W. G. and Baseman, J. B. (1999) 'Disruption of gene mg218 of *Mycoplasma genitalium* through homologous recombination leads to an adherence-deficient phenotype', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(9), pp. 5227–5232. doi: 10.1073/pnas.96.9.5227.

DiCarlo, J. E. *et al.* (2013) 'Genome engineering in *Saccharomyces cerevisiae* using CRISPR-Cas systems', *Nucleic Acids Research*, 41(7), pp. 4336–4343. doi: 10.1093/nar/gkt135.

Dominguez, K. and Ward, W. S. (2009) 'A Novel Nuclease Activity that is Activated by Ca²⁺ Chelated to EGTA', *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 55(5–6), pp. 193–199. doi: 10.3109/19396360903234052.

Dumke, R., Hausner, M. and Jacobs, E. (2011) 'Role of *Mycoplasma pneumoniae* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in mediating interactions with the human extracellular matrix.', *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 8), pp. 2328–38. doi: 10.1099/mic.0.048298-0.

Duret, S. *et al.* (1999) 'Gene disruption through homologous recombination in *Spiroplasma citri*: an scm1-disrupted motility mutant is pathogenic.', *Journal of bacteriology*, 181(24), pp. 7449–7456.

Duret, S., André, A. and Renaudin, J. (2005) 'Specific gene targeting in *Spiroplasma citri*: improved vectors and production of unmarked mutations using site-specific recombination.', *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 8), pp. 2793–2803. doi: 10.1099/mic.0.28123-0.

Dybvig, K. and Alderete, J. (1988) 'Transformation of *Mycoplasma pulmonis* and *Mycoplasma hyorhinitis*: Transposition of Tn916 and formation of cointegrate structures', *Plasmid*, 20(1), pp. 33–41. doi: 10.1016/0147-619X(88)90005-4.

Dybvig, K. and Cassell, G. H. (1987) 'Transposition of gram-positive transposon Tn916 in *Acholeplasma laidlawii* and *Mycoplasma pulmonis*', *Science*. 1987/03/13, 235(4794), pp. 1392–1394.

Dybvig, K. and Voelker, L. L. (1996) 'MOLECULAR BIOLOGY OF MYCOPLASMAS', *Annual Review of Microbiology*, 50(1), pp. 25–57. doi: 10.1146/annurev.micro.50.1.25.

Elkhal, C. K. *et al.* (2015) 'Structure and proposed mechanism of I - α -glycerophosphate oxidase from *Mycoplasma pneumoniae*', *The FEBS Journal*, 282(16), pp. 3030–3042. doi: 10.1111/febs.13233.

Facchini, P. J. *et al.* (2012) 'Synthetic biosystems for the production of high-value plant metabolites', *Trends in Biotechnology*, 30(3), pp. 127–131. doi: 10.1016/j.tibtech.2011.10.001.

Forbes, N. S. (2010) 'Engineering the perfect (bacterial) cancer therapy', *Nature Reviews Cancer*, 10(11), pp. 785–794. doi: 10.1038/nrc2934.

Fraczek, M. G., Naseeb, S. and Delneri, D. (2018) 'History of genome editing in yeast', *Yeast*, 35(5), pp. 361–368. doi: 10.1002/yea.3308.

Fraser, C. M. *et al.* (1995) 'The minimal gene complement of *Mycoplasma genitalium*.', *Science (New York, N.Y.)*, 270(5235), pp. 397–403.

Fredens, J. *et al.* (2019) 'Total synthesis of *Escherichia coli* with a recoded genome', *Nature*, 569(7757), pp. 514–518. doi: 10.1038/s41586-019-1192-5.

French, C. T. *et al.* (2008) 'Large-scale transposon mutagenesis of *Mycoplasma pulmonis*', *Mol Microbiol.* 2008/05/03, 69(1), pp. 67–76. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06262.x MMI6262 [pii].

Frey, J. (2002) 'Mycoplasmas of Animals', in *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Boston, MA: Springer US, pp. 73–90. doi: 10.1007/0-306-47606-1_4.

Fritz, B. R. *et al.* (2010) 'Biology by design: from top to bottom and back.', *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, p. 232016. doi: 10.1155/2010/232016.

Fu, Y. *et al.* (2014) 'Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs', *Nature Biotechnology*, 32(3), pp. 279–284. doi: 10.1038/nbt.2808.

Galanie, S. *et al.* (2015) 'Complete biosynthesis of opioids in yeast', *Science*, 349(6252), pp. 1095–1100. doi: 10.1126/science.aac9373.

Gao, H. *et al.* (2010) 'Engineering of a genome-reduced host: practical application of synthetic biology in the overproduction of desired secondary metabolites', *Protein & Cell*, 1(7), pp. 621–626. doi: 10.1007/s13238-010-0073-3.

García-Morales, L. *et al.* (2016) 'A minimized motile machinery for *Mycoplasma genitalium*', *Molecular Microbiology*, 100(1), pp. 125–138. doi: 10.1111/mmi.13305.

Gibson, D. G., Benders, G. A., Andrews-Pfannkoch, C., *et al.* (2008) 'Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome.', *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867), pp. 1215–20. doi: 10.1126/science.1151721.

Gibson, D. G., Benders, G. A., Axelrod, K. C., *et al.* (2008) 'One-step assembly in yeast of 25 overlapping DNA fragments to form a complete synthetic *Mycoplasma genitalium* genome', *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008/12/17, 105(51), pp. 20404–20409. doi: 10.1073/pnas.0811011106 0811011106 [pii].

Gibson, D. G. *et al.* (2017) *Synthetic biology : tools for engineering biological systems*. Edited by D. G. Gibson *et al.* New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

Gibson, D. G. G. *et al.* (2010) 'Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome', *Science*. 2010/05/22, 329(5987), pp. 52–56. doi: science.1190719 [pii] 10.1126/science.1190719.

Gietz, R. D. *et al.* (1995) 'Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure', *Yeast*, 11(4), pp. 355–360. doi: 10.1002/yea.320110408.

Gil, R. *et al.* (2004) 'Determination of the Core of a Minimal Bacterial Gene Set', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(3), pp. 518–537. doi: 10.1128/MMBR.68.3.518-537.2004.

Glass, J. I. *et al.* (2017) 'Minimal Cells—Real and Imagined', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 9(12), p. a023861. doi: 10.1101/cshperspect.a023861.

Griffiths, A. J. *et al.* (2000) 'Reverse genetics', in *An Introduction to Genetic Analysis. 7th edition*. New York, NY: W. H. Freeman.

Grosjean, H. *et al.* (2014) 'Predicting the minimal translation apparatus: lessons from the reductive evolution of mollicutes.', *PLoS genetics*. Public Library of Science, 10(5), p. e1004363. doi: 10.1371/journal.pgen.1004363.

Großhennig, S. *et al.* (2016) 'Hydrogen sulfide is a novel potential virulence factor of *Mycoplasma pneumoniae*: characterization of the unusual cysteine desulfurase/desulfhydrase HapE', *Molecular Microbiology*, 100(1), pp. 42–54. doi: 10.1111/mmi.13300.

Grover, R. K. *et al.* (2014) 'A structurally distinct human mycoplasma protein that generically blocks antigen-antibody union.', *Science (New York, N.Y.)*, 343(6171), pp. 656–61. doi: 10.1126/science.1246135.

Gründel, A., Jacobs, E. and Dumke, R. (2016) 'Interactions of surface-displayed glycolytic enzymes of *Mycoplasma pneumoniae* with components of the human extracellular matrix.', *International journal of medical microbiology: IJMM*, 306(8), pp. 675–685. doi: 10.1016/j.ijmm.2016.09.001.

Guell, M. *et al.* (2009) 'Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium', *Science*. 2009/12/08, 326(5957), pp. 1268–1271. doi: 10.1126/science.1176951.

Hagemann, L. *et al.* (2017) 'The surface-displayed chaperones GroEL and DnaK of *Mycoplasma pneumoniae* interact with human plasminogen and components of the extracellular matrix', *Pathogens and Disease*, 75(3). doi: 10.1093/femspd/ftx017.

Hahn, T. W. *et al.* (1999) 'Construction and analysis of a modified Tn4001 conferring chloramphenicol resistance in *Mycoplasma pneumoniae*.', *Plasmid*, 41(2), pp. 120–4. doi: 10.1006/plas.1998.1387.

Halbedel, S. and Stülke, J. (2007) 'Tools for the genetic analysis of *Mycoplasma*.', *International journal of medical microbiology: IJMM*, 297(1), pp. 37–44. doi: 10.1016/j.ijmm.2006.11.001.

Hallick, R. B. *et al.* (1977) 'Use of aurintricarboxylic acid as an inhibitor of nucleases during nucleic acid isolation', *Nucleic Acids Research*, 4(9), pp. 3055–3064. doi: 10.1093/nar/4.9.3055.

Hames, C. *et al.* (2009) 'Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*.', *Journal of bacteriology*, 191(3), pp. 747–753. doi: 10.1128/JB.01103-08.

Hammerschlag, M. R. (2001) 'Mycoplasma pneumoniae infections.', *Current opinion in infectious diseases*, 14(2), pp. 181–186.

Hardy, R. D. *et al.* (2009) 'Analysis of pulmonary inflammation and function in the mouse and baboon after exposure to *Mycoplasma pneumoniae* CARDS toxin.', *PloS one*, 4(10), p. e7562. doi: 10.1371/journal.pone.0007562.

Hasselbring, B. M. *et al.* (2006) 'Terminal organelle development in the cell wall-less bacterium *Mycoplasma pneumoniae*.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), pp. 16478–16483. doi: 10.1073/pnas.0608051103.

He, J. *et al.* (2016) 'Insights into the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae*', *Molecular Medicine Reports*, 14(5), pp. 4030–4036. doi: 10.3892/mmr.2016.5765.

He, J. *et al.* (2017) '[Corrigendum] Insights into the pathogenesis of *Mycoplasma pneumoniae* (Review)', *Molecular Medicine Reports*, 17(3), p. 4155. doi: 10.3892/mmr.2017.8324.

Hedreyda, C. T., Lee, K. K. and Krause, D. C. (1993) 'Transformation of *Mycoplasma pneumoniae* with Tn4001 by electroporation.', *Plasmid*, 30(2), pp. 170–175. doi: 10.1006/plas.1993.1047.

Henderson, K. C. *et al.* (2014) 'The multivariate detection limit for *Mycoplasma pneumoniae* as determined by nanorod array-surface enhanced Raman spectroscopy and comparison with limit of detection by qPCR.', *The Analyst*, 139(24), pp. 6426–6434. doi: 10.1039/c4an01141d.

Himmelreich, R. *et al.* (1996) 'Complete Sequence Analysis of the Genome of the Bacterium *Mycoplasma Pneumoniae*', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 24(22), pp. 4420–4449. doi: 10.1093/nar/24.22.4420.

Himmelreich, R. *et al.* (1997) 'Comparative analysis of the genomes of the bacteria *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*.', *Nucleic acids research*, 25(4), pp. 701–712.

Hoekstra, M. F. and Malone, R. E. (1985) 'Expression of the *Escherichia coli* dam methylase in *Saccharomyces cerevisiae*: effect of in vivo adenine methylation on genetic recombination and mutation.', *Molecular and cellular biology*, 5(4), pp. 610–618. doi: 10.1128/mcb.5.4.610.

Hong, S. H., Kwon, Y.-C. and Jewett, M. C. (2014) 'Non-standard amino acid incorporation into proteins using *Escherichia coli* cell-free protein synthesis.', *Frontiers in chemistry*, 2(June), p. 34. doi: 10.3389/fchem.2014.00034.

Horvath, P. and Barrangou, R. (2010) 'CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea', *Science*, 327(5962), pp. 167–170. doi: 10.1126/science.1179555.

Hsu, P. D., Lander, E. S. and Zhang, F. (2014) 'Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering', *Cell*, 157(6), pp. 1262–1278. doi: 10.1016/j.cell.2014.05.010.

Hutchison, C. A. *et al.* (1999) 'Global transposon mutagenesis and a minimal *Mycoplasma* genome.', *Science (New York, N.Y.)*, 286(5447), pp. 2165–9.

Hutchison, C. A. *et al.* (2016) 'Design and synthesis of a minimal bacterial genome', *Science*, 351(6280), pp. aad6253--aad6253. doi: 10.1126/science.aad6253.

Hutchison, C. A. *et al.* (2019) 'Polar effects of transposon insertion into a minimal bacterial genome', *Journal of Bacteriology*. doi: 10.1128/JB.00185-19.

Ishag, H. Z. A. *et al.* (2016) 'A replicating plasmid-based vector for GFP expression in *Mycoplasma hyopneumoniae*', *Genetics and Molecular Research*, 15(2). doi: 10.4238/gmr.15027832.

Ishag, H. Z. A. *et al.* (2017) 'Development of oriC-plasmids for use in *Mycoplasma hyorhinitis*', *Scientific Reports*, 7(1), p. 10596. doi: 10.1038/s41598-017-10519-3.

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*. American Society for Microbiology Journals, 169(12), pp. 5429–5433. doi: 10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987.

Jang, Y.-S. *et al.* (2012) 'Engineering of microorganisms for the production of biofuels and perspectives based on systems metabolic engineering approaches.', *Biotechnology advances*, 30(5), pp. 989–1000. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.015.

Janis, C. *et al.* (2005) 'Versatile use of *oriC* plasmids for functional genomics of *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum*', *Appl Environ Microbiol.* 2005/06/04, 71(6), pp. 2888–2893. doi: 10.1128/AEM.71.6.2888-2893.2005.

Jansen, R. *et al.* (2002) 'Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes.', *Molecular microbiology*, 43(6), pp. 1565–1575.

Jarvill-Taylor, K. J., VanDyk, C. and Minion, F. C. (1999) 'Cloning of *mnuA*, a membrane nuclease gene of *Mycoplasma pulmonis*, and analysis of its expression in *Escherichia coli*.', *Journal of bacteriology*, 181(6), pp. 1853–1860.

Javed, M. R. *et al.* (2018) 'CRISPR-Cas System: History and Prospects as a Genome Editing Tool in Microorganisms', *Current Microbiology*, 75(12), pp. 1675–1683. doi: 10.1007/s00284-018-1547-4.

Ji, X. *et al.* (2017) 'Application of FLP-FRT System to Construct Unmarked Deletion in *Helicobacter pylori* and Functional Study of Gene *hp0788* in Pathogenesis.', *Frontiers in microbiology*, 8, p. 2357. doi: 10.3389/fmicb.2017.02357.

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.

Jiang, W. *et al.* (2015) 'Cas9-Assisted Targeting of CHromosome segments CATCH enables one-step targeted cloning of large gene clusters', *Nature Communications*. Nature Publishing Group, 6(1), p. 8101. doi: 10.1038/ncomms9101.

Jiang, W. and Zhu, T. F. (2016) 'Targeted isolation and cloning of 100-kb microbial genomic sequences by Cas9-assisted targeting of chromosome segments', *Nature Protocols*, 11(5), pp. 960–975. doi: 10.1038/nprot.2016.055.

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.

Johansson, K.-E. and Pettersson, B. (2002) 'Taxonomy of Mollicutes', in *Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. Boston, MA: Springer US, pp. 1–29. doi: 10.1007/0-306-47606-1_1.

Jores, J., Schieck, E., *et al.* (2019) 'In vivo role of capsular polysaccharide in *Mycoplasma mycoides*', *The Journal of Infectious Diseases*, 219(10), pp. 1559–1563. doi: 10.1093/infdis/jiy713.

Jores, J., Ma, L., *et al.* (2019) 'Removal of a subset of non-essential genes fully attenuates a highly virulent Mycoplasma strain', *bioRxiv*. Cold Spring Harbor Laboratory, p. 508978. doi: 10.1101/508978.

Joung, J. K. and Sander, J. D. (2013) 'TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing.', *Nature reviews. Molecular cell biology*. NIH Public Access, 14(1), pp. 49–55. doi: 10.1038/nrm3486.

Kannan, K. *et al.* (2016) 'One step engineering of the small-subunit ribosomal RNA using CRISPR/Cas9', *Scientific Reports*, 6(1), p. 30714. doi: 10.1038/srep30714.

Kannan, T. R. *et al.* (2010) 'Mycoplasma pneumoniae Community Acquired Respiratory Distress Syndrome toxin expression reveals growth phase and infection-dependent regulation', *Molecular Microbiology*, 76(5), pp. 1127–1141. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07092.x.

Kannan, T. R. and Baseman, J. B. (2006) 'ADP-ribosylating and vacuolating cytotoxin of Mycoplasma pneumoniae represents unique virulence determinant among bacterial pathogens.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(17), pp. 6724–6729. doi: 10.1073/pnas.0510644103.

Karas, B. J. *et al.* (2013) 'Direct transfer of whole genomes from bacteria to yeast', *Nature Methods*, 10(5), pp. 410–412. doi: 10.1038/nmeth.2433.

Karas, B. J. *et al.* (2014) 'Transferring whole genomes from bacteria to yeast spheroplasts using entire bacterial cells to reduce DNA shearing', *Nature Protocols*, 9(4), pp. 743–750. doi: 10.1038/nprot.2014.045.

Karas, B. J. *et al.* (2019) 'Direct transfer of a Mycoplasma mycoides genome to yeast is enhanced by removal of the mycoides glycerol uptake factor gene glpF', *ACS Synthetic Biology*, pp. 1–16. doi: 10.1021/acssynbio.8b00449.

Karr, J. R. *et al.* (2012) 'A Whole-Cell Computational Model Predicts Phenotype from Genotype', *Cell*, 150(2), pp. 389–401. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.044.

Kasai, T. *et al.* (2013) 'Role of binding in Mycoplasma mobile and Mycoplasma pneumoniae gliding analyzed through inhibition by synthesized sialylated compounds.', *Journal of bacteriology*, 195(3), pp. 429–435. doi: 10.1128/JB.01141-12.

Keller, M. and Zengler, K. (2004) 'Tapping into microbial diversity.', *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), pp. 141–150. doi: 10.1038/nrmicro819.

Kenri, T. *et al.* (2004) 'Use of Fluorescent-Protein Tagging To Determine the Subcellular Localization of Mycoplasma pneumoniae Proteins Encoded by the Cytadherence Regulatory Locus', 186(20), pp. 6944–6955. doi: 10.1128/JB.186.20.6944.

Kenri, T. *et al.* (2019) 'Production and characterization of recombinant P1 adhesin essential for adhesion, gliding, and antigenic variation in the human pathogenic bacterium, Mycoplasma pneumoniae', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 508(4), pp. 1050–1055. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.11.132.

Kim, J. *et al.* (2016) 'Properties of alternative microbial hosts used in synthetic biology: towards the design of a modular chassis.', *Essays in biochemistry*, 60(4), pp. 303–313. doi: 10.1042/EBC20160015.

King, K. W. and Dybvig, K. (1991) 'Plasmid transformation of *Mycoplasma mycoides* subspecies *mycoides* is promoted by high concentrations of polyethylene glycol', *Plasmid*. 1991/09/01, 26(2), pp. 108–115. doi: 0147-619X(91)90050-7 [pii].

King, K. W. and Dybvig, K. (1994) 'Transformation of *Mycoplasma capricolum* and examination of DNA restriction modification in *M. capricolum* and *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*', *Plasmid*. 1994/05/01, 31(3), pp. 308–311. doi: S0147-619X(84)71033-X [pii] 10.1006/plas.1994.1033.

Kleinstiver, B. P. *et al.* (2016) 'High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects', *Nature*, 529(7587), pp. 490–495. doi: 10.1038/nature16526.

Kocak, D. D. *et al.* (2019) 'Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures', *Nature Biotechnology*, 37(6), pp. 657–666. doi: 10.1038/s41587-019-0095-1.

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.

Koonin, E. V and Novozhilov, A. S. (2017) 'Origin and Evolution of the Universal Genetic Code', *Annual Review of Genetics*, 51(1), pp. 45–62. doi: 10.1146/annurev-genet-120116-024713.

Kornberg, R. D. (1999) 'Eukaryotic transcriptional control.', *Trends in cell biology*, 9(12), pp. M46--9.

Kornspan, J. D., Tarshis, M. and Rottem, S. (2011) 'Adhesion and biofilm formation of *Mycoplasma pneumoniae* on an abiotic surface.', *Archives of microbiology*, 193(11), pp. 833–6. doi: 10.1007/s00203-011-0749-y.

Kouprina, N. *et al.* (1997) 'Specific isolation of human rDNA genes by TAR cloning', *Gene*. 1997/10/23, 197(1–2), pp. 269–276.

Kouprina, N. *et al.* (1998) 'Functional copies of a human gene can be directly isolated by transformation-associated recombination cloning with a small 3' end target sequence', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(8), pp. 4469–4474. doi: 10.1073/pnas.95.8.4469.

Kouprina, N. and Larionov, V. (2003) 'Exploiting the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the study of the organization and evolution of complex genomes', *FEMS Microbiol Rev*. 2003/11/26, 27(5), pp. 629–649. doi: S0168644503000706 [pii].

Kouprina, N. and Larionov, V. (2008) 'Selective isolation of genomic loci from complex genomes by transformation-associated recombination cloning in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Nature Protocols*, 3(3), pp. 371–377. doi: 10.1038/nprot.2008.5.

Kouprina, N. and Larionov, V. (2016) 'Transformation-associated recombination (TAR) cloning for genomics studies and synthetic biology', *Chromosoma*, 125(4), pp. 621–632. doi: 10.1007/s00412-016-0588-3.

Kouprina, N., Noskov, V. N. and Larionov, V. (2006) 'Selective isolation of large chromosomal regions by transformation-associated recombination cloning for structural and functional analysis of mammalian genomes', *Methods Mol Biol.* 2006/10/31, 349, pp. 85–101. doi: 1-59745-158-4:85 [pii] 10.1385/1-59745-158-4:85.

Kozak, M. (1999) 'Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes.', *Gene*, 234(2), pp. 187–208. doi: 10.1016/s0378-1119(99)00210-3.

Krause, D. C. *et al.* (1997) 'Transposon mutagenesis reinforces the correlation between *Mycoplasma pneumoniae* cytoskeletal protein HMW2 and cytoadherence.', *Journal of Bacteriology*, 179(8), pp. 2668–2677. doi: 10.1128/jb.179.8.2668-2677.1997.

Krause, D. C. *et al.* (2018) 'Electron cryotomography of *Mycoplasma pneumoniae* mutants correlates terminal organelle architectural features and function', *Molecular Microbiology*, 108(3), pp. 306–318. doi: 10.1111/mmi.13937.

Krause, D. C. and Balish, M. F. (2001) 'Structure, function, and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*', *FEMS Microbiology Letters*, 198(1), pp. 1–7. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10610.x.

Krishnakumar, R. *et al.* (2010) 'Targeted Chromosomal Knockouts in *Mycoplasma pneumoniae*', *Applied and Environmental Microbiology*, 76(15), pp. 5297–5299. doi: 10.1128/AEM.00024-10.

Krishnakumar, R. *et al.* (2014) 'Simultaneous non-contiguous deletions using large synthetic DNA and site-specific recombinases', *Nucleic Acids Research*, 42(14), pp. e111–e111. doi: 10.1093/nar/gku509.

Krypuy, M. *et al.* (2007) 'High resolution melting for mutation scanning of TP53 exons 5–8', *BMC Cancer*, 7(1), p. 168. doi: 10.1186/1471-2407-7-168.

Kuhner, S. *et al.* (2009) 'Proteome organization in a genome-reduced bacterium', *Science*. 2009/12/08, 326(5957), pp. 1235–1240. doi: 326/5957/1235 [pii] 10.1126/science.1176343.

Kumar, S. (2018) '*Mycoplasma pneumoniae*: A significant but underrated pathogen in paediatric community-acquired lower respiratory tract infections', *Indian Journal of Medical Research*, 147(1), p. 23. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_1582_16.

Kwok, H. S. *et al.* (2019) 'Engineered Aminoacyl-tRNA Synthetases with Improved Selectivity toward Noncanonical Amino Acids.', *ACS chemical biology*, 14(4), pp. 603–612. doi: 10.1021/acscchembio.9b00088.

Labroussaa, F. *et al.* (2016) 'Impact of donor-recipient phylogenetic distance on bacterial genome transplantation', *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press, 44(17), pp. 8501–8511. doi: 10.1093/nar/gkw688.

Langer, S. J. *et al.* (2002) 'A genetic screen identifies novel non-compatible loxP sites.', *Nucleic acids research*, 30(14), pp. 3067–3077. doi: 10.1093/nar/gkf421.

Larionov, V. *et al.* (1996) 'Specific cloning of human DNA as yeast artificial chromosomes by transformation-associated recombination', *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996/01/09, 93(1), pp. 491–496.

Larionov, V. *et al.* (1997) 'Direct isolation of human BRCA2 gene by transformation-associated recombination in yeast', *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997/07/08, 94(14), pp. 7384–7387.

Lartigue, C. *et al.* (2002) 'New plasmid vectors for specific gene targeting in *Spiroplasma citri*', *Plasmid.* 2002/10/18, 48(2), pp. 149–159. doi: S0147619X0200121X [pii].

Lartigue, C. *et al.* (2003) 'Host specificity of mollicutes oriC plasmids: functional analysis of replication origin', *Nucleic Acids Res.* 2003/11/07, 31(22), pp. 6610–6618.

Lartigue, C. *et al.* (2007) 'Genome transplantation in bacteria: changing one species to another.', *Science (New York, N.Y.)*, 317(5838), pp. 632–8. doi: 10.1126/science.1144622.

Lartigue, C. *et al.* (2009) 'Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast.', *Science (New York, N.Y.)*, 325(5948), pp. 1693–6. doi: 10.1126/science.1173759.

Lartigue, C. *et al.* (2014) 'The flavoprotein Mcap0476 (RlmFO) catalyzes m5U1939 modification in *Mycoplasma capricolum* 23S rRNA', *Nucleic Acids Res.* 2014/06/19, 42(12), pp. 8073–8082. doi: 10.1093/nar/gku518 gku518 [pii].

Lartigue, C. *et al.* (2019) 'Attenuation of a Pathogenic *Mycoplasma* Strain by Modification of the *obg* Gene by Using Synthetic Biology Approaches', *mSphere*. Edited by D. W. Pascual, 4(3). doi: 10.1128/mSphere.00030-19.

Leduc, S. (1912) *La Biologie Synthétique*. Edited by A. Poinat. Paris.

Lee, J. K. *et al.* (2018) 'Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity', *Nature Communications*, 9(1), p. 3048. doi: 10.1038/s41467-018-05477-x.

Lee, N. C. O., Larionov, V. and Kouprina, N. (2015) 'Highly efficient CRISPR/Cas9-mediated TAR cloning of genes and chromosomal loci from complex genomes in yeast', *Nucleic Acids Research*, 43(8), pp. e55--e55. doi: 10.1093/nar/gkv112.

Lee, S. W., Browning, G. F. and Markham, P. F. (2008) 'Development of a replicable oriC plasmid for *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma imitans*, and gene disruption through homologous recombination in *M. gallisepticum*', *Microbiology*, 154(9), pp. 2571–2580. doi: 10.1099/mic.0.2008/019208-0.

Leem, S. H. *et al.* (2003) 'Optimum conditions for selective isolation of genes from complex genomes by transformation-associated recombination cloning', *Nucleic Acids Res.* 2003/03/11, 31(6), p. e29.

Li, D. *et al.* (2013) 'Complete disassociation of adult pancreas into viable single cells through cold trypsin-EDTA digestion.', *Journal of Zhejiang University. Science. B.* Zhejiang University Press, 14(7), pp. 596–603. doi: 10.1631/jzus.B1200226.

Li, Jiahe *et al.* (2015) 'Development of a replicative plasmid for gene expression in *Mycoplasma bovis*.', *Journal of microbiological methods*, 108, pp. 12–18. doi: 10.1016/j.mimet.2014.11.005.

Li, S. *et al.* (2019) 'The *Mycoplasma pneumoniae* HapE alters the cytokine profile and growth of human bronchial epithelial cells', *Bioscience Reports*. Portland Press Ltd, 39(1). doi: 10.1042/BSR20182201.

Lipman, R. P. and Clyde, W. A. (1969) 'The Interrelationship of Virulence, Cytadsorption, and Peroxide Formation in *Mycoplasma pneumoniae*', *Experimental Biology and Medicine*, 131(4), pp. 1163–1167. doi: 10.3181/00379727-131-34061.

Lluch-Senar, M. *et al.* (2013) 'Comprehensive Methylome Characterization of *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae* at Single-Base Resolution', *PLoS Genetics*. Edited by P. M. Richardson, 9(1), p. e1003191. doi: 10.1371/journal.pgen.1003191.

Lluch-Senar, M., Cozzuto, L., *et al.* (2015) 'Comparative “-omics” in *Mycoplasma pneumoniae* Clinical Isolates Reveals Key Virulence Factors', *PLOS ONE*. Edited by M. F. Balish, 10(9), p. e0137354. doi: 10.1371/journal.pone.0137354.

Lluch-Senar, M., Delgado, J., *et al.* (2015) 'Defining a minimal cell: essentiality of small ORFs and ncRNAs in a genome-reduced bacterium', *Molecular Systems Biology*, 11(1), p. 780. doi: 10.15252/msb.20145558.

Luisi, P. L. (2002) 'Toward the engineering of minimal living cells', *The Anatomical Record*, 268(3), pp. 208–214. doi: 10.1002/ar.10155.

Lyon, B. R., May, J. W. and Skurray, R. A. (1984) 'Tn4001: a gentamicin and kanamycin resistance transposon in *Staphylococcus aureus*.' *Molecular & general genetics: MGG*, 193(3), pp. 554–556.

Maglennon, G. A. *et al.* (2013) 'Development of a self-replicating plasmid system for *Mycoplasma hyopneumoniae*', *Veterinary Research*, 44(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/1297-9716-44-63.

Mahairas, G. G. and Minion, F. C. (1989) 'Random insertion of the gentamicin resistance transposon Tn4001 in *Mycoplasma pulmonis*.' *Plasmid*, 21(1), pp. 43–7.

Maier, T. *et al.* (2011) 'Quantification of mRNA and protein and integration with protein turnover in a bacterium.' *Molecular systems biology*, 7(1), p. 511. doi: 10.1038/msb.2011.38.

Makarova, K. S. *et al.* (2011) 'Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems', *Nature Reviews Microbiology*, 9(6), pp. 467–477. doi: 10.1038/nrmicro2577.

Makarova, K. S. *et al.* (2015) 'An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems', *Nature Reviews Microbiology*, 13(11), pp. 722–736. doi: 10.1038/nrmicro3569.

Maniloff, J. (2002) 'Phylogeny and evolution', in Razin, S. and R., H. (eds) *Molecular biology and Pathogenicity of Mycoplasmas*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publisher, pp. 31–43.

Manso-Silvan, L. *et al.* (2009) '*Mycoplasma leachii* sp. nov. as a new species designation for *Mycoplasma* sp. bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as a serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*.' *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(Pt 6), pp. 1353–8. doi: 10.1099/ijs.0.005546-0.

Mariscal, A. M. *et al.* (2016) 'All-in-one construct for genome engineering using Cre-lox technology.', *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes*, 23(3), pp. 263–270. doi: 10.1093/dnares/dsw015.

Mariscal, A. M. *et al.* (2018) 'Tuning Gene Activity by Inducible and Targeted Regulation of Gene Expression in Minimal Bacterial Cells', *ACS Synthetic Biology*, 7(6), pp. 1538–1552. doi: 10.1021/acssynbio.8b00028.

Marraffini, L. A. and Sontheimer, E. J. (2010) 'CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea', *Nature Reviews Genetics*, 11(3), pp. 181–190. doi: 10.1038/nrg2749.

Maselli, D. J. *et al.* (2018) 'The Immunopathologic Effects of *Mycoplasma pneumoniae* and Community-acquired Respiratory Distress Syndrome Toxin. A Primate Model.', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 58(2), pp. 253–260. doi: 10.1165/rcmb.2017-0006OC.

Matteau, D. *et al.* (2017) 'Development of *oriC*-Based Plasmids for *Mesoplasma florum*', *Applied and Environmental Microbiology*. Edited by S.-J. Liu, 83(7). doi: 10.1128/AEM.03374-16.

May, M., Balish, M. F. and Blanchard, A. (2014) *Review, Chapter 289 Mycoplasmatales*. doi: 10.1007/978-3-642-30120-9.

Mayer, F. (2006) 'Cytoskeletal Elements in Bacteria *Mycoplasma pneumoniae*, *Thermoanaerobacterium sp.*, and *Escherichia coli* Revealed by Electron Microscopy', *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 11(3–5), pp. 228–243. doi: 10.1159/000094057.

McKay, R. *et al.* (2018) 'A platform of genetically engineered bacteria as vehicles for localized delivery of therapeutics: Toward applications for Crohn's disease.', *Bioengineering & translational medicine*, 3(3), pp. 209–221. doi: 10.1002/btm2.10113.

Medina, J. L. *et al.* (2012) 'Mycoplasma pneumoniae CARDS toxin induces pulmonary eosinophilic and lymphocytic inflammation.', *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 46(6), pp. 815–822. doi: 10.1165/rcmb.2011-0135OC.

Mehrotra, M. and Patel, K. P. (2016) 'High-Resolution Melt Curve Analysis in Cancer Mutation Screen', in, pp. 63–69. doi: 10.1007/978-1-4939-3360-0_7.

Melnikov, S. V and Söll, D. (2019) 'Aminoacyl-tRNA Synthetases and tRNAs for an Expanded Genetic Code: What Makes them Orthogonal?', *International journal of molecular sciences*, 20(8), p. 1929. doi: 10.3390/ijms20081929.

Mertz, J. E. and Davis, R. W. (1972) 'Cleavage of DNA by R 1 restriction endonuclease generates cohesive ends.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 69(11), pp. 3370–3374. doi: 10.1073/pnas.69.11.3370.

Minion, F. C. *et al.* (1993) 'Membrane-associated nuclease activities in mycoplasmas.', *Journal of Bacteriology*, 175(24), pp. 7842–7847. doi: 10.1128/jb.175.24.7842-7847.1993.

Missirlis, P. I., Smailus, D. E. and Holt, R. A. (2006) 'A high-throughput screen identifying sequence and promiscuity characteristics of the loxP spacer region in Cre-mediated recombination.', *BMC Genomics*, 7(1), p. 73. doi: 10.1186/1471-2164-7-73.

Miyata, M. and Hamaguchi, T. (2016) 'Integrated Information and Prospects for Gliding Mechanism of the Pathogenic Bacterium *Mycoplasma pneumoniae*', *Frontiers in Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00960.

Montero-Blay, A. *et al.* (2019) 'SynMyco transposon: engineering transposon vectors for efficient transformation of minimal genomes', *DNA Research*. doi: 10.1093/dnares/dsz012.

Morange, M. (2000) *A history of molecular biology*. Cambridge: Harvard University Press.

Morimoto, T. *et al.* (2008) 'Enhanced Recombinant Protein Productivity by Genome Reduction in *Bacillus subtilis*', *DNA Research*, 15(2), pp. 73–81. doi: 10.1093/dnares/dsn002.

Morowitz, H. J. (1984) 'The completeness of molecular biology.', *Israel journal of medical sciences*, 20(9), pp. 750–753.

Mosberg, J. A., Lajoie, M. J. and Church, G. M. (2010) 'Lambda Red Recombineering in *Escherichia coli* Occurs Through a Fully Single-Stranded Intermediate', *Genetics*, 186(3), pp. 791–799. doi: 10.1534/genetics.110.120782.

Murphy, K. C. (1998) 'Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*.', *Journal of bacteriology*, 180(8), pp. 2063–2071.

Musatovova, O., Kannan, T. R. and Baseman, J. B. (2012) 'Mycoplasma pneumoniae Large DNA Repetitive Elements RepMP1 Show Type Specific Organization among Strains', *PLoS ONE*. Edited by B. Adler, 7(10), p. e47625. doi: 10.1371/journal.pone.0047625.

Mushegian, A. R. and Koonin, E. V (1996) 'Gene order is not conserved in bacterial evolution.', *Trends in genetics : TIG*, 12(8), pp. 289–290.

Nakane, D. *et al.* (2015) 'Systematic Structural Analyses of Attachment Organelle in *Mycoplasma pneumoniae*', *PLOS Pathogens*. Edited by M. F. Balish, 11(12), p. e1005299. doi: 10.1371/journal.ppat.1005299.

Narita, M. (2010) 'Pathogenesis of extrapulmonary manifestations of *Mycoplasma pneumoniae* infection with special reference to pneumonia.', *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 16(3), pp. 162–169. doi: 10.1007/s10156-010-0044-x.

Nesbeth, D. N. (2016) *Synthetic biology handbook*. Edited by D. N. Nesbeth. Boca Raton, FL: CRC Press.

Newlon, C. S. and Theis, J. F. (2002) 'DNA replication joins the revolution: whole-genome views of DNA replication in budding yeast.', *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 24(4), pp. 300–304. doi: 10.1002/bies.10075.

Nieszner, I. *et al.* (2013) 'Development of a site-directed integration plasmid for heterologous gene expression in *Mycoplasma gallisepticum*.', *PloS one*. Edited by M. F. Balish, 8(11), p. e81481. doi: 10.1371/journal.pone.0081481.

Noskov, V. *et al.* (2002) 'A genetic system for direct selection of gene-positive clones during recombinational cloning in yeast', *Nucleic Acids Res.* 2002/01/15, 30(2), p. E8.

Noskov, V. N. *et al.* (2001) 'Defining the minimal length of sequence homology required for selective gene isolation by TAR cloning.', *Nucleic acids research.* Oxford University Press, 29(6), p. E32.

Noskov, V. N. *et al.* (2015) 'Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) system for functional genomics studies in *Mycoplasma mycoides*', *Biological Procedures Online*, 17(1), p. 6. doi: 10.1186/s12575-015-0016-8.

Noskov, V. N., Segall-Shapiro, T. H. and Chuang, R. Y. (2010) 'Tandem repeat coupled with endonuclease cleavage (TREC): A seamless modification tool for genome engineering in yeast', *Nucleic Acids Research*, 38(8), pp. 2570–2576. doi: 10.1093/nar/gkq099.

Orr-Weaver, T. L., Szostak, J. W. and Rothstein, R. J. (1981) 'Yeast transformation: a model system for the study of recombination.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(10), pp. 6354–6358. doi: 10.1073/pnas.78.10.6354.

Osland, A. and Kleppe, K. (1978) 'Influence of polyamines on the activity of DNA polymerase I from *Escherichia coli*.', *Biochimica et biophysica acta*, 520(2), pp. 317–330. doi: 10.1016/0005-2787(78)90230-7.

Paddon, C. J. and Keasling, J. D. (2014) 'Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development', *Nature Reviews Microbiology*, 12(5), pp. 355–367. doi: 10.1038/nrmicro3240.

Papazisi, L. *et al.* (2000) 'Analysis of Cytadherence-Deficient, GapA-Negative *Mycoplasma gallisepticum* Strain R', *Infection and Immunity*, 68(12), pp. 6643–6649. doi: 10.1128/IAI.68.12.6643-6649.2000.

Parrott, G. L., Kinjo, T. and Fujita, J. (2016) 'A Compendium for *Mycoplasma pneumoniae*', *Frontiers in Microbiology*, 7. doi: 10.3389/fmicb.2016.00513.

Pasay, C. *et al.* (2008) 'High-resolution melt analysis for the detection of a mutation associated with permethrin resistance in a population of scabies mites.', *Medical and veterinary entomology*, 22(1), pp. 82–88. doi: 10.1111/j.1365-2915.2008.00716.x.

Pich, O. Q. *et al.* (2008) 'Role of *Mycoplasma genitalium* MG218 and MG317 cytoskeletal proteins in terminal organelle organization, gliding motility and cytodherence', *Microbiology*, 154(10), pp. 3188–3198. doi: 10.1099/mic.0.2008/020636-0.

Piñero-Lambea, C., Ruano-Gallego, D. and Fernández, L. Á. (2015) 'Engineered bacteria as therapeutic agents', *Current Opinion in Biotechnology*, 35, pp. 94–102. doi: 10.1016/j.copbio.2015.05.004.

Pines, G. *et al.* (2015) 'Bacterial Recombineering: Genome Engineering via Phage-Based Homologous Recombination', *ACS Synthetic Biology*, 4(11), pp. 1176–1185. doi: 10.1021/acssynbio.5b00009.

Poteete, A. R. (2001) 'What makes the bacteriophage λ Red system useful for genetic engineering: molecular mechanism and biological function', *FEMS Microbiology Letters*, 201(1), pp. 9–14. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10725.x.

Powell, K. (2018) 'How biologists are creating life-like cells from scratch', *Nature*, 563(7730), pp. 172–175. doi: 10.1038/d41586-018-07289-x.

Prakash, G. and Gabridge, M. G. (1981) 'Influence of the fusogenic agent polyethylene glycol on attachment of *Mycoplasma pneumoniae* to other cells.', *Infection and immunity*, 32(2), pp. 969–972.

Ramasamy, K. *et al.* (2018) 'Mycoplasma pneumoniae Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome Toxin Uses a Novel KELED Sequence for Retrograde Transport and Subsequent Cytotoxicity', *mBio*. Edited by R. J. Collier, 9(1). doi: 10.1128/mBio.01663-17.

Ran, F. A. *et al.* (2013) 'Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity', *Cell*, 154(6), pp. 1380–1389. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021.

Rath, D. *et al.* (2015) 'The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications', *Biochimie*, 117, pp. 119–128. doi: 10.1016/j.biochi.2015.03.025.

Razin, S. (2006) 'The Genus *Mycoplasma* and Related Genera (Class Mollicutes)', in *The Prokaryotes*. New York, NY: Springer US, pp. 836–904. doi: 10.1007/0-387-30744-3_29.

Razin, S. and Hayflick, L. (2010) 'Highlights of mycoplasma research--an historical perspective.', *Biologicals: journal of the International Association of Biological Standardization*, 38(2), pp. 183–190. doi: 10.1016/j.biologicals.2009.11.008.

Razin, S., Yogev, D. and Naot, Y. (1998) 'Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas', *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62(4), pp. 1094–1156.

Reddy, S. P., Rasmussen, W. G. and Baseman, J. B. (1995) 'Molecular cloning and characterization of an adherence-related operon of *Mycoplasma genitalium*.', *Journal of Bacteriology*, 177(20), pp. 5943–5951. doi: 10.1128/jb.177.20.5943-5951.1995.

Reddy, S. P., Rasmussen, W. G. and Baseman, J. B. (1996) 'Isolation and characterization of transposon Tn 4001-generated, cytoadherence-deficient transformants of *Mycoplasma pneumoniae* and *Mycoplasma genitalium*', *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 15(4), pp. 199–211. doi: 10.1111/j.1574-695X.1996.tb00086.x.

Reisch, C. R. and Prather, K. L. J. (2015) 'The no-SCAR (Scarless Cas9 Assisted Recombineering) system for genome editing in *Escherichia coli*.', *Scientific reports*, 5(1), p. 15096. doi: 10.1038/srep15096.

Renaudin, J. *et al.* (1995) 'Integrative and free *Spiroplasma citri* oriC plasmids: expression of the *Spiroplasma phoeniceum* spiralin in *Spiroplasma citri*', *J Bacteriol.* 1995/05/01, 177(10), pp. 2870–2877.

Renaudin, J., Breton, M. and Citti, C. (2014) 'Molecular genetic tools for Mollicutes.', in Browning, G. F. and Citti, Christine (eds) *Mollicutes. Molecular Biology and Pathogenesis*. Norfolk, GBR: Caister Academic Press., pp. 55–76.

Le Rhun, A. *et al.* (2019) 'CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*', *RNA Biology*, 16(4), pp. 380–389. doi: 10.1080/15476286.2019.1582974.

Richardson, S. M. *et al.* (2017) 'Design of a synthetic yeast genome', *Science*, 355(March), pp. 1040–1044.

Rideau, F. *et al.* (2017) 'Cloning, Stability, and Modification of Mycoplasma hominis Genome in Yeast.', *ACS synthetic biology*, 6(5), pp. 891–901. doi: 10.1021/acssynbio.6b00379.

Rideau, F. (2018) 'Clonage et modification du génome de Mycoplasma hominis dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*', <http://www.theses.fr>. Bordeaux. Available at: <http://www.theses.fr/2018BORD0227> (Accessed: 23 July 2019).

Ro, D.-K. *et al.* (2006) 'Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast', *Nature*, 440(7086), pp. 940–943. doi: 10.1038/nature04640.

Rocha, E. P. C. (2004) 'Codon usage bias from tRNA's point of view: Redundancy, specialization, and efficient decoding for translation optimization', *Genome Research*, 14(11), pp. 2279–2286. doi: 10.1101/gr.2896904.

Rocha, E. P. C. and Blanchard, A. (2002) 'Genomic repeats, genome plasticity and the dynamics of Mycoplasma evolution', *Nucleic Acids Research*, 30(9), pp. 2031–2042. doi: 10.1093/nar/30.9.2031.

Rouleau, E. *et al.* (2009) 'Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome.', *Human mutation*, 30(6), pp. 867–875. doi: 10.1002/humu.20947.

Roy, B. *et al.* (2018) 'CRISPR/Cascade 9-Mediated Genome Editing-Challenges and Opportunities', *Frontiers in Genetics*, 9, p. 240. doi: 10.3389/fgene.2018.00240.

Ruland, K., Wenzel, R. and Herrmann, R. (1990) 'Analysis of three different repeated DNA elements present in the P1 operon of Mycoplasma pneumoniae: size, number and distribution on the genome.', *Nucleic acids research*, 18(21), pp. 6311–6317. doi: 10.1093/nar/18.21.6311.

Saprunauskas, R. *et al.* (2011) 'The Streptococcus thermophilus CRISPR/Cas system provides immunity in Escherichia coli', *Nucleic Acids Research*, 39(21), pp. 9275–9282. doi: 10.1093/nar/gkr606.

Saraya, T. (2016) 'The History of Mycoplasma pneumoniae Pneumonia.', *Frontiers in microbiology*, 7, p. 364. doi: 10.3389/fmicb.2016.00364.

Savakis, P. and Hellingwerf, K. J. (2015) 'Engineering cyanobacteria for direct biofuel production from CO₂', *Current Opinion in Biotechnology*, 33, pp. 8–14. doi: 10.1016/j.copbio.2014.09.007.

Schieck, E. *et al.* (2016) 'Galactofuranose in Mycoplasma mycoides is important for membrane integrity and conceals adhesins but does not contribute to serum resistance', *Molecular Microbiology*. 2015/09/12, 99(1), pp. 55–70. doi: 10.1111/mmi.13213.

Schmidl, S. R. *et al.* (2011) 'A trigger enzyme in Mycoplasma pneumoniae: impact of the glycerophosphodiesterase GlpQ on virulence and gene expression.', *PLoS pathogens*. Edited by J. L. Flynn, 7(9), p. e1002263. doi: 10.1371/journal.ppat.1002263.

Schwille, P. *et al.* (2018) 'MaxSynBio: Avenues Towards Creating Cells from the Bottom Up.', *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 57(41), pp. 13382–13392. doi: 10.1002/anie.201802288.

Seto, S. *et al.* (2001) 'Visualization of the Attachment Organelle and Cytadherence Proteins of *Mycoplasma pneumoniae* by Immunofluorescence Microscopy', *Journal of Bacteriology*, 183(5), pp. 1621–1630. doi: 10.1128/JB.183.5.1621-1630.2001.

Shahid, M. A. *et al.* (2014) 'Development of an *oriC* vector for use in *Mycoplasma synoviae*', *Journal of Microbiological Methods*, 103, pp. 70–76. doi: 10.1016/j.mimet.2014.05.014.

Shao, Y. *et al.* (2018) 'Creating a functional single-chromosome yeast', *Nature*. Springer US, 560(7718), pp. 331–335. doi: 10.1038/s41586-018-0382-x.

Sharan, S. K. *et al.* (2009) 'Recombineering: a homologous recombination-based method of genetic engineering', *Nature Protocols*, 4(2), pp. 206–223. doi: 10.1038/nprot.2008.227.

Sharma, S. *et al.* (2015) 'Development and Host Compatibility of Plasmids for Two Important Ruminant Pathogens, *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae*', *PLOS ONE*. Edited by J. R. Battista, 10(3), p. e0119000. doi: 10.1371/journal.pone.0119000.

Singh, S. *et al.* (2013) 'Axenic culture of fastidious and intracellular bacteria', *Trends in Microbiology*, 21(2), pp. 92–99. doi: 10.1016/j.tim.2012.10.007.

Slaymaker, I. M. *et al.* (2016) 'Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity', *Science*, 351(6268), pp. 84–88. doi: 10.1126/science.aad5227.

Sluijter, M. *et al.* (2012) 'The RuvA Homologues from *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae* Exhibit Unique Functional Characteristics', *PLoS ONE*. Edited by J. Rengarajan, 7(5), p. e38301. doi: 10.1371/journal.pone.0038301.

Soler-Bistué, A. *et al.* (2015) 'Genomic Location of the Major Ribosomal Protein Gene Locus Determines *Vibrio cholerae* Global Growth and Infectivity', *PLOS Genetics*. Edited by J. Casadesús, 11(4), p. e1005156. doi: 10.1371/journal.pgen.1005156.

Soler-Bistué, A., Timmermans, M. and Mazel, D. (2017) 'The Proximity of Ribosomal Protein Genes to *oriC* Enhances *Vibrio cholerae* Fitness in the Absence of Multifork Replication', *mBio*. Edited by J. Parkhill, 8(1). doi: 10.1128/mBio.00097-17.

Somarajan, S. R., Kannan, T. R. and Baseman, J. B. (2010) 'Mycoplasma pneumoniae Mpn133 is a cytotoxic nuclease with a glutamic acid-, lysine- and serine-rich region essential for binding and internalization but not enzymatic activity', *Cellular Microbiology*, 12(12), pp. 1821–1831. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01513.x.

Somerson, N. L., Walls, B. E. and Chanock, R. M. (1965) 'Hemolysin of *Mycoplasma pneumoniae*: Tentative Identification as a Peroxide', *Science*, 150(3693), pp. 226–228. doi: 10.1126/science.150.3693.226.

Song, A. J. and Palmiter, R. D. (2018) 'Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System.', *Trends in genetics: TIG*, 34(5), pp. 333–340. doi: 10.1016/j.tig.2017.12.008.

Sorek, R., Lawrence, C. M. and Wiedenheft, B. (2013) 'CRISPR-Mediated Adaptive Immune Systems in Bacteria and Archaea', *Annual Review of Biochemistry*, 82(1), pp. 237–266. doi: 10.1146/annurev-biochem-072911-172315.

Spuesens, E. B. M. *et al.* (2009) 'Sequence variations in RepMP2/3 and RepMP4 elements reveal intragenomic homologous DNA recombination events in *Mycoplasma pneumoniae*.', *Microbiology (Reading, England)*, 155(Pt 7), pp. 2182–96. doi: 10.1099/mic.0.028506-0.

Sternberg, N. and Hamilton, D. (1981) 'Bacteriophage P1 site-specific recombination', *Journal of Molecular Biology*, 150(4), pp. 467–486. doi: 10.1016/0022-2836(81)90375-2.

Suzuki, E. and Nakayama, M. (2011) 'VCre/VloxP and SCre/SloxP: new site-specific recombination systems for genome engineering', *Nucleic Acids Research*, 39(8), pp. e49–e49. doi: 10.1093/nar/gkq1280.

Szymanski, M. and Barciszewski, J. (2017) 'The path to the genetic code', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(11), pp. 2674–2679. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.07.009.

Tao, W. *et al.* (2018) 'CRISPR/Cas9-Based Editing of *Streptomyces* for Discovery, Characterization, and Production of Natural Products.', *Frontiers in microbiology*, 9, p. 1660. doi: 10.3389/fmicb.2018.01660.

Tarshis, M., Salman, M. and Rottem, S. (1991) 'Fusion of mycoplasmas: the formation of cell hybrids', *FEMS Microbiology Letters*, 82(1), pp. 67–71. doi: 10.1016/0378-1097(91)90422-7.

Theis, J. F. and Newlon, C. S. (1997) 'The ARS309 chromosomal replicator of *Saccharomyces cerevisiae* depends on an exceptional ARS consensus sequence.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(20), pp. 10786–10791. doi: 10.1073/pnas.94.20.10786.

Thomas, C., Jacobs, E. and Dumke, R. (2013) 'Characterization of pyruvate dehydrogenase subunit B and enolase as plasminogen-binding proteins in *Mycoplasma pneumoniae*.', *Microbiology (Reading, England)*, 159(Pt 2), pp. 352–65. doi: 10.1099/mic.0.061184-0.

Thomason, L. C. *et al.* (2014) 'Recombineering: Genetic Engineering in Bacteria Using Homologous Recombination', in *Current Protocols in Molecular Biology*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1.16.1--1.16.39. doi: 10.1002/0471142727.mb0116s106.

Thomason, L. C., Costantino, N. and Court, D. L. (2016) 'Examining a DNA Replication Requirement for Bacteriophage λ Red- and Rac Prophage RecET-Promoted Recombination in *Escherichia coli*', *mBio*, 7(5). doi: 10.1128/mBio.01443-16.

Tronche, F. *et al.* (2002) 'When reverse genetics meets physiology: the use of site-specific recombinases in mice.', *FEBS letters*, 529(1), pp. 116–121. doi: 10.1016/s0014-5793(02)03266-0.

Trussart, M. *et al.* (2017) 'Defined chromosome structure in the genome-reduced bacterium *Mycoplasma pneumoniae*', *Nature Communications*, 8(1), p. 14665. doi: 10.1038/ncomms14665.

Tsarpopoulou, I. *et al.* (2016) 'In-Yeast Engineering of a Bacterial Genome Using CRISPR/Cas9', *ACS Synth Biol*. 2015/11/26, 5(1), pp. 104–109. doi: 10.1021/acssynbio.5b00196.

Tsuji, K. *et al.* (2017) 'Effects of Different Cell-Detaching Methods on the Viability and Cell Surface Antigen Expression of Synovial Mesenchymal Stem Cells.', *Cell transplantation*, 26(6), pp. 1089–1102. doi: 10.3727/096368917X694831.

Turan, S. *et al.* (2011) 'Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE): traditional concepts and current challenges.', *Journal of molecular biology*, 407(2), pp. 193–221. doi: 10.1016/j.jmb.2011.01.004.

Vasu, K. and Nagaraja, V. (2013) 'Diverse Functions of Restriction-Modification Systems in Addition to Cellular Defense', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), pp. 53–72. doi: 10.1128/MMBR.00044-12.

Venetz, J. E. *et al.* (2019) 'Chemical synthesis rewriting of a bacterial genome to achieve design flexibility and biological functionality', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(16), pp. 8070–8079. doi: 10.1073/pnas.1818259116.

Vieira-Silva, S. and Rocha, E. P. C. (2010) 'The Systemic Imprint of Growth and Its Uses in Ecological (Meta)Genomics', *PLoS Genetics*. Edited by N. A. Moran, 6(1), p. e1000808. doi: 10.1371/journal.pgen.1000808.

Voelker, L. L. and Dybvig, K. (1996) 'Gene transfer in *Mycoplasma arthritidis*: transformation, conjugal transfer of Tn916, and evidence for a restriction system recognizing AGCT.', *Journal of Bacteriology*, 178(20), pp. 6078–6081. doi: 10.1128/jb.178.20.6078-6081.1996.

Waites, K. B. *et al.* (2017) 'Mycoplasma pneumoniae from the Respiratory Tract and Beyond', *Clinical Microbiology Reviews*, 30(3), pp. 747–809. doi: 10.1128/CMR.00114-16.

Waites, K. B., Balish, M. F. and Atkinson, T. P. (2008) 'New insights into the pathogenesis and detection of *Mycoplasma pneumoniae* infections', *Future Microbiology*, 3(6), pp. 635–648. doi: 10.2217/17460913.3.6.635.

Waites, K. B. and Talkington, D. F. (2004) 'Mycoplasma pneumoniae and its role as a human pathogen.', *Clinical microbiology reviews*, 17(4), pp. 697–728, table of contents. doi: 10.1128/CMR.17.4.697-728.2004.

Walker, R. and Pretorius, I. (2018) 'Applications of Yeast Synthetic Biology Geared towards the Production of Biopharmaceuticals', *Genes*, 9(7), p. 340. doi: 10.3390/genes9070340.

Wang, H., La Russa, M. and Qi, L. S. (2016) 'CRISPR/Cas9 in Genome Editing and Beyond', *Annual Review of Biochemistry*, 85(1), pp. 227–264. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014607.

Weiner III, J., Herrmann, R. and Browning, G. F. (2000) 'Transcription in *Mycoplasma pneumoniae*', *Nucleic Acids Research*, 28(22), pp. 4488–4496. doi: 10.1093/nar/28.22.4488.

Weisburg, W. G. *et al.* (1989) 'A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification.', *Journal of Bacteriology*. 1989/12/01, 171(12), pp. 6455–6467. doi: 10.1128/jb.171.12.6455-6467.1989.

Wenzel, R. and Herrmann, R. (1988) 'Repetitive DNA sequences in *Mycoplasma pneumoniae*', *Nucleic Acids Research*, 16(17), pp. 8337–8350. doi: 10.1093/nar/16.17.8337.

Willby, M. J. *et al.* (2004) 'HMW1 is required for stability and localization of HMW2 to the attachment organelle of *Mycoplasma pneumoniae*.' , *Journal of bacteriology*, 186(24), pp. 8221–8228. doi: 10.1128/JB.186.24.8221-8228.2004.

Wodke, J. A. H. *et al.* (2014) 'Dissecting the energy metabolism in *Mycoplasma pneumoniae* through genome-scale metabolic modeling', *Molecular Systems Biology*, 9(1), p. 653. doi: 10.1038/msb.2013.6.

Woese, C. R. (1987) 'Bacterial evolution.', *Microbiological reviews*, 51(2), pp. 221–271.

Wu, X., Kriz, A. J. and Sharp, P. A. (2014) 'Target specificity of the CRISPR-Cas9 system', *Quantitative Biology*, 2(2), pp. 59–70. doi: 10.1007/s40484-014-0030-x.

Xiao, L. *et al.* (2015) 'Comparative genome analysis of *Mycoplasma pneumoniae*', *BMC Genomics*. BioMed Central, 16(1), p. 610. doi: 10.1186/s12864-015-1801-0.

Xu, C., Hu, S. and Chen, X. (2016) 'Artificial cells: from basic science to applications', *Materials Today*, 19(9), pp. 516–532. doi: 10.1016/j.mattod.2016.02.020.

Yang, J. and Shen, M. H. (2006) 'Polyethylene Glycol-Mediated Cell Fusion', in *Nuclear Reprogramming*. New Jersey: Humana Press, pp. 59–66. doi: 10.1385/1-59745-005-7:59.

Yaya, A. *et al.* (2008) 'Genotyping of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* SC by multilocus sequence analysis allows molecular epidemiology of contagious bovine pleuropneumonia.', *Veterinary research*, 39(2), p. 14. doi: 10.1051/vetres:2007052.

Yu, D. *et al.* (2000) 'An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*.' , *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11). doi: 10.1073/pnas.100127597.

Yus, E. *et al.* (2012) 'Transcription start site associated RNAs in bacteria', *Molecular Systems Biology*, 8, p. 585. doi: 10.1038/msb.2012.16.

Zhang, J. *et al.* (2018) 'Markerless genome editing in *Clostridium beijerinckii* using the CRISPR-Cpf1 system', *Journal of Biotechnology*, 284, pp. 27–30. doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.07.040.

Zhang, Y. *et al.* (1998) 'A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*', *Nat Genet*, 20. doi: 10.1038/2417.

Zhou, J. *et al.* (2016) 'CasHRA (Cas9-facilitated Homologous Recombination Assembly) method of constructing megabase-sized DNA', *Nucleic Acids Research*, 44(14), pp. e124–e124. doi: 10.1093/nar/gkw475.

Zimmerman, C.-U. and Herrmann, R. (2005) 'Synthesis of a small, cysteine-rich, 29 amino acids long peptide in *Mycoplasma pneumoniae*', *FEMS Microbiology Letters*, 253(2), pp. 315–321. doi: 10.1016/j.femsle.2005.09.054.

ANNEXES

ANNEXES

LISTE DES ABBREVIATIONS

<i>aacA-aphD</i>	gène de résistance à la gentamycine
A, C, T, G, U	adénine, cytosine, thymine, guanine, uracile
ADN	acide désoxyribonucléique
ADNg	ADN génomique
ADP	adénosine diphosphate
ARN	acide ribonucléique
ARNg	ARN guide
ARNr	ARN ribosomique
ARS	Autonomously Replicating Sequence
ATP	adénosine triphosphate
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BET	bromure d'éthidium
CARDS	Community-Acquired Respiratory Distress Syndrome
Cas	CRISPR associated protein
<i>cat</i>	gène de résistance au chloramphénicol
CEN	centromère
crARN	CRISPR ARN
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
dNTP	désoxyribonucléotide 5' triphosphate
E	gène essentiel
EDTA	éthylène diamine tétra acétate
FAD	flavine adénine dinucléotide
<i>gmR</i>	cassette de résistance à la gentamycine
GPC	Glycérophosphocholine
GT-RMCE	Genomic Transfer – Recombinase-Mediated Cassette Exchange
G3P	glycérol-3-phosphate
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HDR	Homologous-Directed Repair
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)
HIS	marqueur d'auxotrophie pour l'histidine
IL	interleukine
IS	Insertion Sequence
kpb	kilo paire de bases
Mpb	Méga paire de bases
MTase	méthyltransférase
m/v	masse/volume
NE	gène non essentiel
NHEJ	Non Homologous End Joining
<i>oriC</i>	origine de réplication chromosomique
<i>pac</i>	gène de résistance à la puromycine

pb	paire de bases
PAM	Protospacer Adjacent Motif
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	polyéthylène glycol
PFGE	Pulse-Field Gel Electrophoresis
QE	gène quasi-essentiel
qPCR-HRM	PCR quantitative High-Resolution Melting
REase	endonucléase de restriction
RMCE	Recombinase-Mediated Cassette Exchange
RNase	ribonucléase
rpm	rotation par minute
SDS	dodécylsulfate de sodium
TAE	tris acétate EDTA
TALEN	Transcription Activator-Like Effector Nuclease
TAR	Transformation-Associated Recombinaison
TBE	tris borate EDTA
<i>tet</i> (M)	gène de résistance à la tétracycline
tfs	transformants
tracrARN	trans-activating crARN
TREC	Tandem Repeats Coupled with Endonuclease Cleavage
TREC-IN	TREC-assisted gene knock-IN
Tris	Tris-(hydroxyméthyl)-aminoéthane
TRP	marqueur d'auxotrophie pour le tryptophane
UFC	Unité Formant Colonie
URA	marqueur d'auxotrophie pour l'uracile
v/v	volume/volume
WP	Word Package
YAC	Yeast Artificial Chromosome
ZFN	Zinc Finger Nuclease

COMMUNICATIONS

Publications

- Blötz C, Lartigue C, Valverde Timana YV, **Ruiz E**, Paetzold B, Busse J, Stülke J ; Development of a replicating plasmid based on the native oriC in *Mycoplasma pneumoniae*; *Microbiology* 2018, 164(11):1372-1382
- **Ruiz E**, Talenton V, Dubrana MP, Guesdon G, Lluch-Senar M, Sirand-Pugnet P, Arfi Y, Lartigue C; CReasPy-cloning: a method for simultaneous cloning and engineering of megabase-sized genomes in yeast using the CRISPR-Cas9 system; *ACS Synthetic Biology*, Soumis 2019

Communications lors de congrès

- **Ruiz E**, Lartigue C, Arfi Y, Valverde Timana VY, Garcia-Morales L, Blanchard A, Sirand-Pugnet P, Stülke J, Karr J, Lluch-Senar M, Serrano L ; Construction of a viable minimal non-pathogenic bacterial chassis with synthetic biology tools ; 3^{ème} conférence du « Synthetic Biology Congress » ; 20-21 Octobre 2017, Londres (UK), Poster
- **Ruiz E**, Valverde Timana VY, Garcia-Morales L, Sirand-Pugnet P, Arfi Y, Blanchard A, Lartigue C ; Construction of a viable minimal non-pathogenic bacterial chassis with synthetic biology tools; 17^{ème} Journée scientifique de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé ; 12 Avril 2017, Talence (France), Poster
- **Ruiz E**, Talenton V, Dubrana MP, Guesdon G, Lluch-Senar M, Sirand-Pugnet P, Arfi Y, Lartigue C; CReasPy-cloning: Simultaneous cloning and engineering of megabase-sized genomes into yeast using the CRISPR-Cas9 system; 22^{ème} conférence de l'« International Organization for Mycoplasma » (IOM) ; 9-12 Juillet 2018, Portsmouth (USA), Poster
- **Ruiz E**, Talenton V, Dubrana MP, Guesdon G, Lluch-Senar M, Sirand-Pugnet P, Arfi Y, Lartigue C; CReasPy-cloning: Simultaneous cloning and engineering of megabase-sized genomes into yeast using the CRISPR-Cas9 system; 4^{ème} conférence du GDR BioSynSys ; 21-24 Octobre 2018, Toulouse (France), Poster