

Dynamique et évolution comparée des génomes de deux sous-types de l'espèce
Mycoplasma bovis

Encadrants et lieu du stage

Nom, Prénom du Maître de Stage : Chloé Ambroset

Qualité : Ingénieure de recherche

Téléphone : 04 27 18 04 84

E-mail : chloe.ambroset@vetagro-sup.fr

Nom, Prénom du co-encadrant: Florence Tardy

Qualité : Chargée de recherche et directrice de l'UMR

Téléphone : 04 78 69 68 43

E-mail : florence.tardy@anses.fr

Laboratoire d'accueil, Responsable et équipe :

UMR Mycoplasmoses des Ruminants, Directrice Florence Tardy

Adresse : 31 avenue Tony Garnier, F-69364 Lyon Cedex 07



Sujet de stage :

Les substitutions nucléotidiques sont essentielles à l'évolution. Elles génèrent de la variabilité génétique qui peut être fixée dans les génomes des organismes par la sélection naturelle ou la dérive. De tels phénomènes permettent aux organismes vivants de s'adapter et d'évoluer dans des environnements différents. Dans le monde bactérien, ces changements évolutifs peuvent, dans des échelles de temps relativement courtes, être directement observables sur le phénotype. De nombreuses expériences d'évolution bactérienne ont ainsi été entreprises afin de mesurer les forces évolutives et les mécanismes responsables de l'adaptation des micro-organismes face à de nouveaux environnements (1).

Les bactéries appartenant au genre *Mycoplasma* présentent une évolution particulièrement rapide. En effet, une étude menée sur 16 génomes de *Mycoplasma (M.) gallisepticum* a permis d'estimer que le taux de substitution par site et par an de cette espèce est de $0.5-1.02 \times 10^{-5}$ (2,3) alors que le taux chez *S. aureus* varie entre 1.2 et 2.6×10^{-6} (4). Cette évolution rapide pourrait être liée au manque de certains gènes du système de réparation de l'ADN chez *Mycoplasma spp.* (5). Les mycoplasmes présentent par ailleurs la particularité d'être des bactéries sans paroi, au génome de petite taille (0,5-1,2 Mb) avec un faible pourcentage G+C. Ils sont isolés chez plusieurs hôtes humains et animaux et régulièrement associés à des pathologies diverses.

Chez les bovins, *M. bovis* est responsable de plusieurs signes cliniques (mammites, otites, arthrites et surtout bronchopneumonie infectieuse enzootique chez les jeunes) très délétères. Des études de sous-typage moléculaire par Single Locus Sequence Typing effectuées au sein de notre UMR ont montré que les souches de *M. bovis* isolées récemment en France se divisent en deux sous-types (ST) différents, ST2 et ST3. Les souches plus anciennes, isolées avant 2000, appartenaient quant à elles au ST1, un sous-type actuellement éteint. L'émergence des ST2 et ST3 a coïncidé avec l'acquisition de résistance à la plupart des familles antibiotiques, sauf aux fluoroquinolones. L'analyse des génomes de différents isolats appartenant aux deux ST actuels montre un plus fort polymorphisme chez les isolats ST3, y compris dans les gènes appartenant au système de réparation et de recombinaison de l'ADN. *In vitro*, nous avons démontré que le sous-type ST3 acquiert et fixe plus rapidement que le ST2 les mutations associées à la résistance et, de façon parallèle, le premier isolat clinique résistant aux fluoroquinolones isolé en 2013 était un ST3 (6), alors que les souches de ST2 sont restées sensibles à cette famille antibiotique.

L'objectif du stage est d'étudier et de comparer, pour les deux ST actuels, la dynamique et l'évolution des génomes de *M. bovis*. Le stage reposera essentiellement sur une approche de génomique comparative à partir de génomes séquencés au laboratoire ou disponibles dans les bases de données. Il consistera à :

1/ Caractériser la diversité intra-sous-type à l'aide des données issues du SNP/Indel calling. Les gènes les plus variables seront identifiés (en distinguant les polymorphismes significatifs) ainsi que les catégories fonctionnelles associées. Ces résultats permettront d'investiguer l'existence de signatures génomiques en lien avec le ST et d'identifier des marqueurs moléculaires en lien avec des mesures de fitness *in vitro* réalisées au laboratoire.

2/ Préciser les relations phylogénomiques entre les différents ST isolés en France après avoir défini le core-genome et le génome accessoire des souches. La comparaison d'une phylogénie inférée sur des marqueurs MLST (ou des gènes de ménage) avec une phylogénie basée sur des gènes plus variables sera envisagée afin d'élucider les relations de parenté entre chaque ST.

3/ Caractériser l'évolution génomique de l'un et l'autre sous-type lors de passages *in vitro* sans pression de sélection. Au début du stage, les génomes d'un isolat évolué de chaque ST seront disponibles (illumina en PE 2x250 pb) et seront utilisés pour comparer les génomes des souches parentales et évoluées par SNP/Indel calling. Les loci présentant des mutations lors de l'évolution des souches seront identifiés et comparés aux loci variables intra sous-type. Les résultats obtenus permettront de formuler des hypothèses quant aux voies de biosynthèses impactées par les passages successifs et les processus évolutifs. Des preuves de concept par phase expérimentale pourront être envisagées pour confirmer ou infirmer ces hypothèses.

Les résultats apportés par cette étude permettront de mieux comprendre la situation épidémiologique des infections respiratoires à *M. bovis* en France (prévalence relative de chaque sous-type actuel, résistance aux antibiotiques disparition du ST1).

Références:

- 1: Experimental design, population dynamics, and diversity in microbial experimental evolution. Van den Bergh et al., 2018. Microbiology and molecular Biology Reviews, Sept 2018 vol 82 Issue 3 e00008-18.
- 2: What are mycoplasmas: the relationship of tempo and mode in bacterial evolution. Woese CR et al., 1984. Mol Evol. 1984-1985; 21(4):305-16.
- 3: Ultrafast Evolution and Loss of CRISPRs Following a Host Shift in a Novel Wildlife Pathogen, *Mycoplasma gallisepticum*. Delaney et al., 2012. Plos Genet. 2012 Feb; 8(2): e1002511.
- 4: A Timescale for Evolution, Population Expansion, and Spatial Spread of an Emerging Clone of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Nübel et al., 2010. PLOS Pathogen April 8, 2010
- 5: DNA repair in *Mycoplasma gallisepticum*. Gorbachev et al., 2013. BMC Genomics 2013, 14:726.
- 6 : Alterations in the Quinolone Resistance-Determining Regions and Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates and Laboratory-Derived Mutants of *Mycoplasma bovis*: Not All Genotypes May Be Equal. Khalil et al., 2016. AEM, Feb 2016, vol 82 Number 4.

Missions

- Analyse de données NGS (Illumina PE) et identification des variants
- Analyse d'enrichissement d'annotations fonctionnelles (Gene Ontology)
- Génomique comparative : core-genome, pan-genome, syntenie
- Analyse de phylogénomique

Compétences requises :

- Maîtrise de l'environnement Unix
- Connaissance et expérience en analyses de données NGS
- Connaissance en phylogénie moléculaire et évolution

Le candidat aura un intérêt pour la génomique bactérienne, l'évolution moléculaire et une appétence pour le travail en équipe, au contact de microbiologistes.