

> Dans le cadre de l'unité d'enseignement « Rédiger en sciences » d'Aix-Marseille Université, les étudiants du master 2 Microbiologie Intégrative et Fondamentale (MiF), en partenariat avec l'Institut de Microbiologie, Bioénergies et Biotechnologie (IM2B), ont été initiés aux exigences de l'écriture scientifique. Trois thématiques leur ont été proposées : les mécanismes d'adaptation au stress de l'enveloppe bactérienne, le séquençage d'ARN à l'échelle de la cellule unique et l'évolution de la pathogénicité des vibrios chez l'huître. À partir de publications originales, les étudiants ont rédigé des nouvelles scientifiques mettant en lumière les principaux résultats ainsi que la portée des travaux étudiés. Enrichi par des entretiens avec les auteurs, ces textes portent un regard original sur la compréhension du vivant dans les domaines de la microbiologie et de la santé. <

Partenariat médecine/sciences - Écoles doctorales - Masters (73)

L'actualité scientifique vue par les étudiants du Master 2 Microbiologie Intégrative et Fondamentale (MiF), en partenariat avec l'Institut de Microbiologie, Bioénergies et Biotechnologie (IM2B) d'Aix-Marseille Université

amU Faculté des sciences
Aix Marseille Université

amU Institut microbiologie, bioénergies et biotechnologie
Aix Marseille Université

Responsable de l'Unité d'Enseignement

Laurent Aussel

Équipe pédagogique

Laurent Aussel – Professeur, Aix-Marseille Université – aussel@imm.cnrs.fr
Sophie Tronnet – Professeure junior, Aix-Marseille Université – sophie.tronnet@univ-amu.fr

Sites web



<https://sciences.univ-amu.fr/fr/formation/masters/master-microbiologie>
<https://pliniuscursus.univ-amu.fr/rediger-en-sciences/>

Série coordonnée par Claire Deligne

NOUVELLE

Séquençage d'ARN en cellule unique

Briser le mythe du clone

Ludivine Aguttes^{1*}, Pierre-Yves Gasc^{1*} , Sarah Guillou^{1*}, Lucie Paret^{1*}, Laurent Aussel² 

¹Master 2 Microbiologie Fondamentale, Aix Marseille Université, Marseille, France.

²Aix Marseille Université, CNRS, LCB UMR7283, IMM, Marseille, France.

ludivine.aguttes@etu.univ-amu.fr

pierre-yves.gasc@etu.univ-amu.fr

sarah.guillou@etu.univ-amu.fr

luce.paret@etu.univ-amu.fr

aussel@imm.cnrs.fr

*Ces quatre auteurs ont contribué de façon égale au travail

> À la fin du XIII^e siècle le terme « infection » désignait les souillures du péché dans un contexte spirituel, pour aboutir à la définition actuelle : la pénétration et la multiplication de germes pathogènes dans l'organisme [1]. Parallèlement à cette évolution conceptuelle est survenue la découverte des agents infectieux, les pathogènes [2]. Les techniques d'étude des bactéries n'ont depuis

cessé de se perfectionner. De l'identification phénotypique rendue possible par le microscope optique au XVII^e siècle à des approches modernes d'identification génétique par séquençage développées à partir des années 2000, en passant par des méthodes enzymatiques rapides utilisées en laboratoire [3] (→).

(→) Voir m/s hors série n° 1, 2025, page 30

Malgré ces avancées, certains phénomènes demeurent mal compris, notamment la réponse adaptative hétérogène des bactéries à différents stress retrouvés en condition d'infection, provoqués par les défenses innées de l'hôte, la carence en nutriment ou encore l'exposition aux antibiotiques. C'est dans ce contexte qu'une variante du séquençage



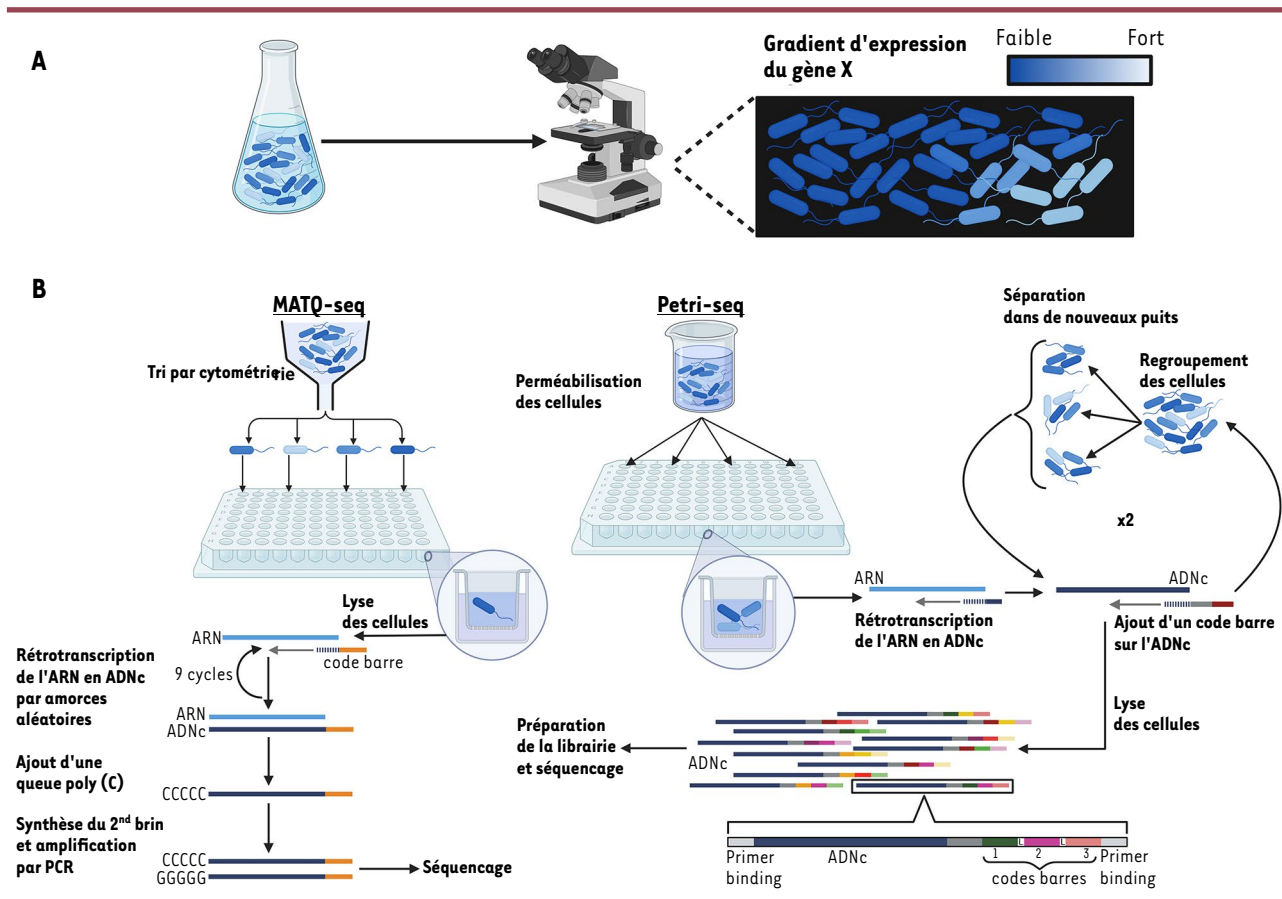


Figure 1. Description des deux méthodes de RNA-seq utilisées dans le cadre de l'étude de l'hétérogénéité phénotypique. **A.** Schéma d'observation d'une population clonale au microscope présentant une hétérogénéité phénotypique. **B.** Comparaison des méthodes de MATQ-seq et de PETRI-seq. Le MATQ-seq est réalisé en plusieurs étapes : isolement des bactéries par cytométrie en flux, lyse des cellules, rétrotranscription de l'ARNm en ADnc avec un code barre unique, ajout d'une queue poly(C), amplification et séquençage. Le PETRI-seq est réalisé par perméabilisation des cellules, séparation dans différents puits, rétrotranscription de l'ARNm en ADnc, ajout d'un code barre unique associé au puits, regroupement des cellules et nouvelle séparation afin de répéter l'étape d'ajout du code barre deux fois. Les cellules sont enfin lysées pour préparer la librairie d'ADnc avant séquençage.

d'ARN (RNA-seq) a été développé pour l'étude bactérienne à l'échelle de la cellule unique.

L'hétérogénéité populationnelle façonne les infections

Dans des populations d'individus appartenant à une même lignée et évoluant dans un même environnement, des variations physiologiques dynamiques peuvent être observées. Cette hétérogénéité, dite phénotypique, résulte d'une diversité intrinsèque aux cellules. Elle se manifeste par une régulation différentielle ciblant des catégories de gènes : ceux impliqués dans le métabolisme, dans la réponse au stress ou encore de virulence. [4] Ces variations s'expriment aussi sous la forme de gradients d'expression pouvant être liés à l'exposition à différents micro-environnements (Figure 1A). Le bruit stochastique de l'expression génique (fluctuations aléatoires liées au faible nombre de molécules d'ARNm ou de protéines dans la cellule) et la distribution inégale de composants cellulaires lors de la division créent des états phénotypiques distincts. D'autres facteurs, tels que des oscillations périodiques (changements phénotypiques réguliers, par exemple le cycle cellulaire ou les

horloges circadiennes), et les divisions asymétriques [4] contribuent à cette variabilité. Enfin, les interactions inter-cellulaires modulent les profils d'expression génique via des molécules de signalisation, diffusibles (comme dans le quorum sensing) ou ancrées à l'enveloppe. [4] Cette variabilité phénotypique influe sur la dynamique des infections. Elle permet à une fraction minoritaire de cellules d'adopter spontanément un état protecteur. Ce mécanisme, appelé *bet-hedging*, assure la survie d'une partie de la population face aux pressions de l'hôte, telles que la réponse immunitaire ou les

horloges circadiennes), et les divisions asymétriques [4] contribuent à cette variabilité. Enfin, les interactions inter-cellulaires modulent les profils d'expression génique via des molécules de signalisation, diffusibles (comme dans le quorum sensing) ou ancrées à l'enveloppe. [4] Cette variabilité phénotypique influe sur la dynamique des infections. Elle permet à une fraction minoritaire de cellules d'adopter spontanément un état protecteur. Ce mécanisme, appelé *bet-hedging*, assure la survie d'une partie de la population face aux pressions de l'hôte, telles que la réponse immunitaire ou les



traitements antibiotiques. Chez *Escherichia coli*, certaines sous-populations peuvent entrer dans un état de persistance : bien qu'elles restent viables, l'arrêt transitoire de leur division cellulaire confère une tolérance aux antibiotiques. Chez *Salmonella enterica*, une sous-population ne produisant pas de flagelle (état *fliC-OFF*) échappe aux défenses de l'hôte [4]. Cette diversité favorise aussi une division du travail entre sous-populations. Lors d'une infection intestinale par *S. enterica*, la fraction exprimant le système de sécrétion de type III (*ttss-1 ON*) envahit l'épithélium et déclenche une réponse inflammatoire. En parallèle, la fraction *ttss-1 OFF* reste dans la lumière intestinale et profite des nutriments libérés [4]. Ces rôles complémentaires contribuent à la prolifération de la population bactérienne et à sa transmission. Les bactéries peuvent vivre sous forme de biofilms, qui correspondent à une communauté sessile enchâssée dans une matrice qu'elles sécrètent. La proximité cellulaire au sein de ces biofilms ou des tissus favorise la stabilité de ces interactions.

La coexistence de phénotypes cellulaires distincts au sein d'un même ensemble bactérien augmente les chances qu'une partie de la population résiste aux défenses de l'hôte et aux traitements. Cette hétérogénéité favorise également l'émergence de fonctions collectives, renforçant la virulence et facilitant la dissémination. Cette diversification, modulable par évolution, constitue un avantage pour les bactéries pathogènes. Son analyse nécessite d'explorer l'expression génique cellule par cellule, rendue possible par des approches de séquençage ARN en cellule unique (scRNA-seq).

Séquençage d'ARN en cellule unique

L'étude de la régulation de l'expression génique bactérienne a profondément évolué avec l'émergence du séquençage à haut débit. Cette avancée a permis une exploration globale du transcriptome grâce à la méthode de RNA-seq.

Cette technique repose sur l'extraction des ARNm d'une population cellulaire, leur rétrotranscription en ADNc puis au séquençage des fragments obtenus (Figure 1B). L'analyse bioinformatique permet ensuite d'identifier et de quantifier les transcrits exprimés. Elle offre une vue d'ensemble de l'expression génique sans biais de sélection. Toutefois, cette approche fondée sur un mélange d'ARNm issus de nombreuses cellules masque l'hétérogénéité phénotypique. Afin de révéler cette hétérogénéité, des approches unicellulaires (scRNA-seq) ont été développées dans un premier temps chez les cellules eucaryotes. Cependant, ces techniques se reposaient sur la présence des queues polyadénylées des ARNm eucaryotes. Ainsi, des adaptations pour les modèles procaryotes ont vu le jour, dont le PETRI-seq et le MATQ-seq chez les bactéries.

Le PETRI-seq associe chaque ARN à sa cellule via des codes-barres, courtes séquences d'ADN uniques servant d'identifiants moléculaires. Les cellules sont fixées et perméabilisées au formaldéhyde, préservant leur intégrité tout en permettant la diffusion des réactifs. Elles sont ensuite réparties dans différents puits où s'effectue la rétrotranscription (Figure 1B). Lors de cette étape, un premier code-barres, propre à chaque puits, est ajouté à l'ADNc [5]. Les cellules sont ensuite regroupées, puis redistribuées dans de nouveaux puits. Deux cycles supplémentaires d'ajout de code-barres sont alors réalisés (Figure 1B). Au terme de ce processus, chaque molécule d'ADNc porte une combinaison unique de 3 codes-barres, dont la probabilité d'être partagée entre deux cellules est extrêmement faible [5]. Cette signature permet, lors du séquençage, d'attribuer les ARN à leur cellule d'origine et de reconstituer le profil transcriptomique individuel [6].

Le MATQ-seq constitue une autre approche de scRNA-seq reposant sur l'isolation physique de cellules individuelles. Elle utilise des dispositifs de microfluidique, tels que la cytométrie

en flux, pour trier et distribuer chaque cellule dans un puits distinct. Une fois isolées, les cellules subissent les étapes classiques du RNA-seq couplées à l'ajout d'un code-barres spécifique à chaque puits (Figure 1B). Ce marquage permet de regrouper les transcrits issus d'une même cellule [7]. Cette stratégie permet de reconstruire les programmes transcriptionnels présents au sein de la population étudiée [7].

Ces deux approches diffèrent par leur complexité, leur coût et leur profondeur d'analyse : la MATQ-seq, plus coûteuse (tri cellulaire par cytométrie en flux), offre une plus grande profondeur de séquençage (300-600 gènes/cellule avec déplétion des rRNA), tandis que la PETRI-seq est plus économique et permet d'analyser plus de cellules. Toutes deux permettent néanmoins de révéler la diversité phénotypique des populations bactériennes soumises à des conditions identiques.

L'analyse de la cellule unique pour une meilleure compréhension de l'infection

La matrice des biofilms forme une structure dense, isolant et protégeant les bactéries du milieu extérieur. Grâce à cette protection, les bactéries du biofilm présentent une meilleure résistance aux différents stress environnementaux. Elles montrent également une sensibilité réduite aux antibactériens et autres composés extérieurs. Ainsi, les biofilms favorisent la survie des bactéries et compliquent l'identification des agents infectieux, rendant la prise en charge thérapeutique complexe. Ces communautés bactériennes structurées sont bien connues dans le domaine de la santé humaine. On les retrouve notamment comme constituants de la plaque dentaire, mais aussi adhérent à des dispositifs médicaux tels que les cathéters, les prothèses et les implants. L'hétérogénéité phénotypique est fortement présente dans les biofilms, influencée notamment par les interactions bactériennes, l'environnement extérieur du biofilm et son organisation spatiale [8].

Grâce au PETRI-seq, les chercheurs ont pu identifier dans un biofilm test, issue d'une culture *in vitro* d'*E. coli*, une sous-population représentant 2,1 % de l'ensemble de la culture, caractérisée par l'expression de seulement 10 gènes de l'enveloppe cellulaire. Ce groupe est constamment présent bien que son rôle n'ait pas encore été caractérisé [8].

Grâce à la finesse d'analyse de cette technique, il est à présent possible d'identifier des sous-populations peu abondantes. Ainsi, cette caractérisation de l'hétérogénéité au sein du biofilm permet d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant différentes fractions de la population.

Un autre exemple d'application du scRNA-seq concerne le microbiote intestinal, dont l'équilibre est essentiel à la bonne santé humaine. Cette communauté microbienne compte plus de 10¹³ micro-organismes, dont une majorité de bactéries. Toutes sont exposées à des micro-environnements variables en raison d'une distribution inégale des nutriments dans le milieu. Cette hétérogénéité environnementale favorise l'émergence de phénotypes distincts. Parmi elles se trouve *Bacteroides thetaiotaomicron*, qui possède trois morphologies différentes [9]. Grâce au MATQ-seq, il a été montré que ces morphologies étaient directement liées à une spécialisation métabolique de la bactérie. Cette spécialisation influe sur la colonisation de l'hôte et la répartition dans la niche écologique [9]. Bien qu'aucune diversité fonction-

nelle n'ait été clairement démontrée, l'importance du microbiote intestinal humain et l'abondance de cette espèce bactérienne dans celui-ci rendent ces résultats prometteurs. Ils ouvrent des perspectives pour la compréhension des dynamiques du microbiote intestinal, notamment les dysbioses.

Conclusion

Le scRNA-seq est aujourd'hui décliné en plusieurs méthodes chez les bactéries, comme le MATQ-seq, le PETRI-seq ou encore BacDrop, une variante développée spécifiquement pour l'étude de l'hétérogénéité phénotypique en réponse à un stress induit par des antibiotiques [10].

L'existence de sous-populations hétérogènes est bien connue dans le contexte des infections, et plus largement comme un phénomène d'adaptation des bactéries aux environnements qu'elles rencontrent. Cependant, bien que leur étude soit possible au niveau de l'expression de gènes individuels grâce à des outils comme les rapporteurs transcriptionnels fluorescents, leur analyse à l'échelle du génome reste complexe. Dans ce cadre, les approches de scRNA-seq permettant d'étudier un grand nombre de cellules à l'échelle individuelle offrent des perspectives intéressantes. Néanmoins, leur développement récent ainsi que leur coût élevé, en particulier lié au séquençage, limitent encore leur utilisation à plus grande échelle et en contexte clinique.

Le scRNA-seq constitue ainsi un outil précieux, ouvrant la voie à une compréhension plus fine de la réponse des bactéries et au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. ♦

Single-cell RNA-sequencing: shattering the clone myth

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt

RÉFÉRENCES

1. Infection : Définition de Infection. (s. d.). <https://www.cnrntl.fr/definition/infection>
2. Freney J, Laurent F. *Une brève histoire de la microbiologie*. 1^{re} ed. Paris : Eska, 2024.
3. Tazi A. Maladies infectieuses en 2025. Populations vulnérables, défis diagnostiques et thérapeutiques. *Med Sci (Paris)* 2025 ; 41 (HS1) : 30-4.
4. Ackermann M. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2015 ; 13 : 497-508.
5. Blattman SB, Jiang W, Oikonomou P, et al. Prokaryotic single-cell RNA sequencing by in situ combinatorial indexing. *Nat Microbiol* 2020 ; 5 : 1192-201.
6. Pountain AW, Jiang P, Yao T, et al. Transcription-replication interactions reveal bacterial genome regulation. *Nature* 2024 ; 626 : 661-9.
7. Imdahl F, Vafadarnejad E, Homberger C, et al. Single-cell RNA-sequencing reports growth-condition-specific global transcriptomes of individual bacteria. *Nat Microbiol* 2020 ; 5 : 1202-6.
8. Yan X, Liao H, Wang C, et al. An improved bacterial single-cell RNA-seq reveals biofilm heterogeneity. *eLife* 2024 ; 13 : RP97543.
9. Bornet E, Prezza G, Cecchino L, et al. Low-input RNA-seq suggests metabolic specialization underlying morphological heterogeneity in a gut commensal bacterium. *Cell Reports* 2025 ; 44 : 115844.
10. Ma P, Amemiya HM, He LL, et al. Bacterial droplet-based single-cell RNA-seq reveals antibiotic-associated heterogeneous cellular states. *Cell* 2024 ; 186 : 877-91.

Entretien avec Antoine-Emmanuel Saliba

Antoine-Emmanuel Saliba est professeur à l'université de Wurtzbourg (Allemagne) et dirige le groupe *Single-Cell Analysis* au sein du Helmholtz Institute for RNA-based Infection Research (HIRI). Après un doctorat à l'Institut Curie, il s'est intéressé aux technologies permettant d'observer les cellules de manière individuelle. Aujourd'hui, avec son équipe, il cherche à comprendre pourquoi certaines bactéries persistent dans l'organisme malgré le système immunitaire et



© Helmholtz Institute

les traitements. Pour cela, il étudie les infections au sein des tissus, cellule par cellule, en combinant transcriptomique en cellule unique *in vivo* et analyses computationnelles avec l'objectif de relier organisation cellulaire et évolution de l'infection.

En quoi la mise en place du scRNA-seq chez les bactéries a été un défi comparé aux cellules eucaryotes ?

Chez les procaryotes, il y a trois grands problèmes qui se posent pour la mise en place du scRNA-seq. Dans un premier temps, la membrane bactérienne rend l'accès à l'ARN difficile sans traitement enzymatique préalable, ce qui n'est pas le cas pour les cellules eucaryotes. Ces membranes sont également propres à



chaque espèce bactérienne, ce qui implique la mise en place de protocoles spécifiques à chaque bactérie. Cette variabilité complique le travail dans le cadre de l'étude d'associations de bactéries à l'échelle du microbiome par exemple où les protocoles utilisés vont devoir être efficaces sur toutes les bactéries analysées. De plus, chez les bactéries, l'ARN est présent en très faible quantité, de l'ordre du femtogrammes (10^{-15}) contre des picogrammes (10^{-12}) retrouvés chez les eucaryotes. Ce phénomène représente un défi majeur pour la sensibilité de détection des protocoles mis en œuvre. Enfin, chez les procaryotes, l'ARN n'est pas polyadénylé contrairement à l'ARN des eucaryotes. Cela signifie que lors de la capture des ARN, il va être impossible de différencier les ARN non codants, comme les ARN ribosomiaux, des ARN messagers.

Comment le scRNA-seq a-t-il permis une compréhension et une caractérisation des bactéries sans biais expérimental ?

Le caractère non biaisé réside sur le principe même de la transcriptomique. En effet, cette approche ne sélectionne pas les transcrits capturés, ce qui permet une vision globale et impartiale de l'expression du génome. Le scRNA-seq est également une méthode qui tend à analyser le génome d'une cellule dans son entièreté malgré le fait qu'elle soit toujours limitée par certaines contraintes techniques telles que l'accessibilité à l'ARN et la sensibilité de détection.

Quelles applications thérapeutiques peut-on imaginer grâce aux scRNA-seq ?

J'ai trois exemples en tête : le premier concerne les populations bactériennes exposées à des antibiotiques. Dans cette population, le scRNA-seq va permettre de mettre en évidence les sous-populations qui présentent des phénotypes de résistance aux antibiotiques, ce qui permettra par la suite de pouvoir développer des stratégies thérapeutiques adaptées pour les cibler. Le second exemple se place dans le même contexte, mais concerne cette fois des phénotypes plus rares des bactéries : les *persisters*¹. De la même manière, cette technique d'étude pourrait permettre de les identifier, de comprendre leur physiologie ainsi que leur adaptation à un environnement infectieux afin de concevoir des nouvelles stratégies pour empêcher leur développement. Le troisième exemple, plus complexe mais tout aussi intéressant, est celui du microbiote. Le scRNA-seq pourrait aider à mieux comprendre ses variations d'un point de vue phénotypique, en analysant l'expression des ARN bactériens dans différentes conditions, notamment en cas de maladie ou de dysbiose, et ce à l'échelle de la cellule unique, alors qu'à ce jour ces analyses ont uniquement été réalisées à l'échelle de la population.

Selon vous, comment la biologie actuelle se réinvente-t-elle face aux nouveaux outils et aux approches globales ?

Pour la première fois, il devient possible d'obtenir une description globale et systémique de toutes les molécules présentes dans la cellule. Grâce à cela, on peut désormais, sans réaliser aucune expérience, prévoir la réponse d'une cellule selon des modélisations et prédictions. Pour moi, c'est la véritable révolution que

connait actuellement la recherche, portée par une évolution extrêmement rapide des outils et des technologies.

Qu'est-ce qui vous a attiré vers le métier de chercheur et qu'est-ce qui vous a amené à votre poste actuel en Allemagne ?

Le premier point, c'est fondamentalement la curiosité : comprendre comment le vivant fonctionne et, d'un point de vue médical, comment les maladies infectieuses se développent et persistent. C'est un défi que nous rencontrons aujourd'hui et qui restera d'actualité pendant longtemps, avec l'émergence continue de nouvelles maladies infectieuses. Le deuxième point, c'est que j'apprécie particulièrement de développer de nouvelles technologies permettant de faire de la biologie quantitative. La recherche est un milieu incroyable qui nous offre cette possibilité, avec la liberté académique et le luxe de pouvoir mener des travaux de qualité. Pour l'Allemagne, j'ai eu l'opportunité de participer à la création d'un nouvel institut, le *Helmholtz Institute for RNA-based Infection Research (HIRI)*, dédié à la recherche sur l'ARN et les maladies infectieuses. C'était pour moi l'endroit idéal pour fonder mon laboratoire, une opportunité unique. Je pense aussi qu'en tant que chercheur, on a tout à gagner à avoir une réelle mobilité entre différentes cultures.

Au cours de vos travaux, vous avez étudié des organismes eucaryotes et procaryotes. Préférez-vous travailler sur un type d'organisme en particulier ou votre recherche se concentre-t-elle sur les aspects méthodologiques et l'amélioration des techniques, indépendamment du modèle biologique ?

Les deux aspects se combinent. Notre expertise reste centrée sur la réponse de l'hôte : il s'agit d'inventer de nouvelles méthodes pour mieux comprendre comment l'hôte réagit aux maladies infectieuses. Nous avons développé ces approches à différentes échelles, allant du micro-organisme unique jusqu'aux cohortes de patients. Le développement de nouvelles méthodes va toujours de pair avec la biologie et les organismes eux-mêmes : ils s'influencent mutuellement.

Si l'on veut étudier un processus infectieux à l'échelle de la cellule unique et qu'aucune méthode adaptée n'existe encore, il faut la créer. Cela pose de nombreux défis, à la fois technologiques et biologiques. On en a parlé pour les cellules procaryotes, mais il y a aussi la dimension temporelle : les processus infectieux se déroulent sur des échelles de temps très courtes, et il faut être capable de suivre les changements transcriptomiques sur ces périodes restreintes. Par ailleurs, il y a également la dimension spatiale : comment caractériser les réponses aux infections au sein de tissus complexes ? Tous ces aspects représentent des défis biologiques et technologiques importants, qui ne sont pas évidents à résoudre.

Selon vous, qu'est-ce qui fait aujourd'hui un bon chercheur : la créativité, la rigueur, ou la capacité à se remettre en question ?

Il y a les fondamentaux : être chercheur, c'est avant tout être capable de poser des questions et de créer des réseaux avec d'autres scientifiques. La curiosité et la motivation sont également des qualités essentielles dans ce métier. Mais il y a aussi un aspect plus difficile, souvent moins évident, qui est la capacité à encadrer et à gérer un laboratoire et une équipe, ce qui fait partie intégrante du métier de chercheur.

¹ Une bactérie dite *persisters* voit son activité métabolique fortement diminuée, jusqu'à entrer en état de non-croissance, voir dormance. Cet état, rare, permet aux bactéries de fortement diminuer leur sensibilité aux antibiotiques.