

ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS

UNIVERSITÉ DE TOURS

FACULTE DE PHARMACIE « Philippe-Maupas »

Année 2023-2024

N° 91

**THÈSE D'EXERCICE POUR LE
DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

LAMBERIOUX Morgan

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 26 OCTOBRE 2023

**« LES CIBLES ET STRATEGIES INNOVANTES DANS LA LUTTE CONTRE
L'ANTIBIORESISTANCES »**

JURY

Président : BRAND Denys, Professeur, faculté de Pharmacie de Tours, Pharmacien.....

Membres :

LANOTTE Philippe, Professeur, faculté de Pharmacie de Tours, Pharmacien.....

MAZEL Didier, Professeur, Institut Pasteur de Paris.....

HIRON Aurélia, Maître de conférence, faculté des Sciences de l'Université de Tours.....

ANNEE : 2023 – 2024

Directeur : Pr Denys BRAND

Directeur Adjoint : M. Matthieu JUSTE

Assesseurs : M. Gildas PRIE, Mme Mélanie BOUVIN PLEY, Mme Emilie ALLARD-VANNIER, M. Bruno GIRAUDAU, Mme Claire POUPLARD, Mme Audrey OUDIN

ENSEIGNANTS

14 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
MUNNIER	Émilie	PHARMACIE GALENIQUE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

6 PROFESSEURS D'UNIVERSITÉ ET PRATICIENS HOSPITALIERS

ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
GIRAUDAU	Bruno	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistiques & Épidémiologie
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE

2 PROFESSEURS ÉMERITES

BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
THIBAULT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

35 MAITRES DE CONFÉRENCES

AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BIRER-WILLIAMS	Caroline	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
BONNIER (disponibilité)	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE
BORDY	Romain	PHARMACOLOGIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE

HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LOUDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
POUPET	Cyril	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
SAHLI	Ramla	PHARMACOGNOSIE
SIEROCKI	Pierre	CHIMIE ORGANIQUE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & BIOINFORMATIQUE
VERGER	Alexis	PHARMACIE GALENIQUE
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	SANTÉ PUBLIQUE, BIostatistiques & Épidémiologie
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

1 MAST

CAMUS GABRIEL	Mathilde	FILIERE OFFICINE
---------------	----------	------------------

4 MAITRES DE CONFÉRENCES ET PRATICIENS HOSPITALIERS

FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VEYRATT DUREBEX	Charlotte	BIOCHIMIE CLINIQUE

4 AHU (Assistant Hospitalier Universitaire)

BOULARD	Pierre	IMMUNOLOGIE
DOUEZ	Emmanuel	PHARMACIE GALENIQUE
POUPIN	Pierre	BIostatistiques ET SANTE PUBLIQUE
TULOU	Vianney	PHARMACIE CLINIQUE

1 ATER (Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche)

KICHOU	Hichem	CHIMIE ANALYTIQUE
--------	--------	-------------------

1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

1 contrat d'enseignement

GERBIER (contrat enseig)	Soledad	ANGLAIS
--------------------------	---------	---------

3 CHARGES DE RECHERCHER

EPARDAUD	Mathieu	INRAE
MEVELEC	Noëlle	INRAE
MOIRE	Nathalie	INRAE

Mise à jour du 18/09,



SERMENT DE GALIEN

En présence des Maîtres de la Faculté, je fais le serment :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;

De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;

De coopérer avec les autres professionnels de santé ;

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date : 26 octobre 2023

*L'étudiant Morgan LAMBERIOUX
Le Doyen de la Faculté Professeur Denys BRAND*

Remerciement :

Je souhaite premièrement remercier mon directeur de thèse, Philippe Lanotte, pour ses précieux conseils et son aide dans la rédaction de ce manuscrit.

Je remercie également mon co-directeur de thèse, Didier Mazel, pour son encadrement au quotidien dans son unité où j'ai la chance de réaliser une thèse de science, pour ses nombreux conseils, son soutien et ses discussions scientifiques toujours enrichissantes !

Je remercie les membres du jury, Aurélia Hiron et Denys Brand pour l'intérêt qu'ils portent à mon travail.

Les résultats de ce manuscrit sont le fruit d'un travail collectif. Je remercie toutes les personnes ayant contribué à ces travaux et notamment Magaly Ducos-Galand pour son aide quotidienne et Pedro Dorado-Morales, qui se donne corps et âme dans ce projet et sans qui ce projet ne serait pas si avancé. Sans toi je serai encore en train de me noyer sous des conjugaisons alors merci !!

Je remercie l'unité PGB pour leur convivialité, les nombreuses discussions scientifiques et toutes les bières qu'on a pu partager ensemble, sans qui tout ce travail n'aurait pas la même saveur !

Un grand merci à Théo, j'espère que je n'ai pas été un trop mauvais stagiaire quand je suis arrivé ! Merci pour tous tes conseils, ton aide et ton soutien ! J'espère que la vie nous donnera encore de nombreuses années de travail ensemble ! Ne m'oublie pas quand tu ouvriras une start-up !

Je remercie Louis, aka, Loulou et Sylvine, aka, Sissi l'impératrice, la team voyage viennois pour les nombreuses soirées et week-end passés en leur compagnie !

Pour leurs encouragements et leur soutien tout au long de mes études, je remercie mes parents, mon frère et le reste de ma famille.

Sans oublier Mathou, pour son support moral au quotidien, et, je cite, pour « sa beauté éblouissante et son charisme incroyable » (*et son aide dans l'écriture des remerciements...*). Merci d'être là pour moi !

Table des matières :

TABLE DES MATIERES :	6
LISTE DES ABREVIATIONS :	8
INTRODUCTION	11
1. DECOUVERTE ET UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES :	12
1.1. DECOUVERTE DES ANTIBIOTIQUES	12
1.2. UTILISATION DES ANTIBIOTIQUES DANS LE MONDE	17
2. L'ANTIBIORESISTANCE CHEZ LES BACTERIES :	20
2.1. L'APPARITION DE L'ANTIBIORESISTANCE CHEZ LES BACTERIES	22
2.1.1. LES MUTATIONS ET MODIFICATIONS GENETIQUES	23
2.1.2. LE TRANSFERT HORIZONTAL DE GENE	26
2.2. L'ANTIBIORESISTANCE, UN PROBLEME GLOBAL	30
3. LES BACTERIOPHAGES :	33
3.1. CARACTERISTIQUES GENERALES	33
3.2. LA PHAGOTHERAPIE	35
3.3. LES DEPOLYMERASES PHAGIQUES	38
3.4. LA DELIVRANCE D'AGENT ANTIMICROBIEN CIBLE	39
3.5. LE ROLE DES PHAGES DANS LA VACCINATION	39
4. LES PEPTIDES ANTIMICROBIENS :	41
4.1. ACTION ANTIMICROBIENNE	41
4.2. MODULER L'IMMUNITE DE L'HOTE	43
5. MOLECULES AGISSANT EN SYNERGIE AVEC LES ANTIBIOTIQUES :	44
5.1. LES B-LACTAMASES	44
5.2. LES NANOPARTICULES	45
6. LES VEHICULES DE TRANSPORT D'ANTIBIOTIQUES :	46
6.1. LES NANOPARTICULES	46
6.2. LES CONJUGUES ANTICORPS-MEDICAMENTS	47
7. STRATEGIES BASEES SUR LA CONJUGAISON :	48
7.1. EFFICACITE DE LA CONJUGAISON	49
7.2. LA CONJUGAISON POUR ELIMINER LES PATHOGENES	51
7.2.1. STRATEGIES BASEES SUR CRISPR	51
7.2.2. EXPRESSION DE MODULES TOXIQUES	52

DESCRIPTION / BUT DU PROJET	55
CONCEPTION DE LA STRATEGIE	58
1. DESCRIPTION DES BACTERIES PATHOGENES SELECTIONNEES :	59
1.1. <i>SHIGELLA</i> ET EIEC	59
1.2. <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	60
1.3. <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	63
2. DESCRIPTION DES PLASMIDES CONJUGATIFS SELECTIONNES :	65
2.1. LE PKM101	65
2.2. LE POXA48	66
2.3. LE PRP4/RK2	68
2.4. LE PTP114	68
RESULTATS	72
1. ÉTUDE DES TAUX DE TRANSFERTS DES PLASMIDES CONJUGATIFS SELECTIONNES :	73
2. DEVELOPPEMENTS DE CoKiP SPECIFIQUES AUX PATHOGENES SELECTIONNES :	80
2.1. MODULE TUEUR SPECIFIQUE A <i>SHIGELLA</i>	80
2.2. MODULE TUEUR SPECIFIQUE A <i>SALMONELLA ENTERICA</i>	83
2.3. MODULE TUEUR SPECIFIQUE A <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	90
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	94
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	99

Liste des abréviations :

ADC : *Antibodies drug conjugate*
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNsb : ADN simple brin
AMM : Autorisation de mise sur le marché
ANSM : Agence nationale de sécurité des médicaments et des produits de santé
ARG : *Antimicrobial resistance gene*
ARN : Acide ribonucléique
BLSE : β -lactamase à spectre étendue
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité
CMI : Concentration minimale inhibitrice
CoKiP : *Conjugative killer plasmid*
CRISPR-Cas : *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR associated genes/proteins*
CRISPRi : CRISPR interférence
D : Donneuse
DAP : Acide diaminopimélique
DDJ : Dose définie journalière
DO : Densité optique
EBLSE : Entérobactérie productrice de β -lactamases à spectre étendu
ECDC : Centre européen de prévention et de contrôle des maladies
EIEC : *E. coli* entéro-invasives
endoE : Endosialidase E
EPS : Exopolysaccharide
ERV : Entérocoque résistant à la vancomycine
FT : Facteur de transcription
GFP : *Green fluorescent protein*
HGT : *Horizontal gene transfert*
HPI : *High-pathogenicity island*
hvKp : *Klebsiella pneumoniae* hyper-virulente
ICE : *Integrative conjugative element*
IME : *Integrative mobilisable element*
LB : Luria-Bertani ou *lysogenic broth*
LPS : Lipopolysaccharides

MDR : *Multi-drug resistant*

MGE : *Mobile genetic element*

MH : Mueller-Hinton

MPS : *Mating pair stabilization*

NAREB : *Nanotherapeutics for antibiotic resistant emergent bacterial pathogens*

NK : *Natural killer*

NP : Nanoparticule

NRPS : *Non-ribosomal peptide synthase*

OMS : Organisation mondiale de la santé

oriT : Origine de transfert

PAM : Peptide antimicrobien

PAMP : *Pathogen associated molecular pattern*

PEG : Polyéthylène glycol

PGB : Plasticité du génome bactérien

PLGA : Poly(acide lactique-co-glycolique)

PNN : Polynucléaire neutrophile

PRE : Pays à revenu élevé

PRFI : Pays à revenu faible et intermédiaire

PRP : Plasmide sensible aux phéromones

PRR : *Pattern recognition receptor*

R : Ecceveuse

RBS : *Ribosome binding site*

ROS : Espèces réactives à l'oxygène

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

SI : Super intégron

SNT : Salmonelles non typhoïde

SNTi : Salmonelles non typhoïde invasives

SPI : *Salmonella pathogenicity island*

T3SS : Système de sécrétion de type III

T4CP : Protéine de couplage de type IV

T4P : Pilus de type IV

T4SS : Système de sécrétion de type IV

T6SS : Système de sécrétion de type VI

TA : Toxine-antitoxine

Tc : Transconjugant

TIAC : Toxi-infection alimentaire collective

TNF : Facteur de nécrose tumorale

TROD : Test rapide d'orientation de diagnostic

UPEC : *E. coli* uro-pathogène

UV : Ultraviolet

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

INTRODUCTION

1. Découverte et utilisation des antibiotiques :

1.1. Découverte des antibiotiques

Déjà pendant l'antiquité, les moisissures étaient utilisées pour lutter contre les infections. En Égypte au XVI^{ème} siècle avant notre ère le pain d'orge moisi était utilisé afin de lutter contre l'infection des plaies. Cela a été décrit dans le papyrus Ebers, l'un des plus anciens traités médicaux connus rédigé pendant le règne d'Amenhotep I^{er}. Plus tard, le principe de concurrence vitale et l'antagonisme entre les moisissures et les microbes ont été entrevus par les Grecs. Thucydide, un historien athénien du IV^{ème} siècle avant notre ère, a détaillé dans son ouvrage « *La guerre de Péloponnèse* », l'épisode épidémique dévastateur s'étant déroulé en Attique à la même époque, connu sous le nom de « peste d'Athènes ». Malgré son nom, cet épisode épidémique n'a probablement pas été causé par *Yersinia pestis*, l'agent pathogène de la peste, mais plutôt par un virus comme celui de la rougeole ou de la variole (Cunha, 2004). Pendant cette épidémie, une diminution des autres atteintes morbides a été observée. En effet, Thucydide a remarqué que « pendant l'épidémie, les gens ne souffrirent d'aucune des affections ordinaires, ou, quand l'une d'elles se déclarait, elle aboutissait toujours à celle-ci » (Roussel *et al.*, 1981; Thucydide, IV^e siècle av. J.-C).

Mais ce n'est réellement qu'au début des années 1870 que cet antagonisme entre microbes et moisissures commence à être étudié. En novembre 1871, Joseph Lister, un chirurgien anglais et père de la notion d'asepsie, remarque dans des échantillons d'urines que le développement d'un champignon nommé *Penicillium glaucum* pourrait influencer la croissance et l'activité des bactéries. Il réalise alors une expérience afin d'étudier ce phénomène mais celle-ci n'est pas concluante ("Observables" at the Royal College of Surgeons, 1950; Roussel *et al.*, 1981). Ce n'est qu'en 1877 que la notion de concurrence vitale entre plusieurs micro-organismes a été démontrée par Pasteur et Joubert lorsqu'ils travaillaient sur les bactéries charbonneuses (Pasteur and Joubert, 1877; Roussel *et al.*, 1981).

Deux décennies après leurs travaux, un étudiant en médecine effectue sa thèse sur l'étude de l'antagonisme entre les microbes et les moisissures. Ernest Duchesne montre que « certaines moisissures [...] sont capables d'atténuer dans de très notables proportions la virulence des cultures bactériennes ». En effet, la co-infection d'une dose létale de *Salmonella enterica* sérotype Typhi, responsable de la fièvre typhoïde, avec *Penicillium glaucum* empêche les animaux de contracter la fièvre typhoïde. Il conclut même sa thèse en 1897 par « on peut donc

espérer qu'en poursuivant l'étude des faits de concurrence biologique entre moisissures et microbes, on arrivera, peut-être, à la découverte d'autres faits directement utiles et applicables à l'hygiène prophylactique et à la thérapeutique » (Duchesne, 1897). Même si Duchesne semble conscient de l'importance de cette découverte, l'étude tombe rapidement dans l'oubli.

En 1899, R. Emmerich et O. Löw, deux chercheurs allemands, découvrent qu'une molécule produite par *Bacillus pyocyaneus*, aujourd'hui nommé *Pseudomonas aeruginosa*, est capable d'inhiber la prolifération d'autres bactéries, notamment celles responsables de l'anthrax, de la diphtérie, du choléra et de la fièvre typhoïde. Pour eux, cette molécule est une enzyme bactériolytique qu'ils nomment « pyocyanase » (Emmerich and Löw, 1899; Emmerich *et al.*, 1902). Malheureusement, la quantité de filtrat de *B. pyocyaneus* nécessaire à l'inhibition des bactéries est importante. Cela limitera son usage dans le traitement des infections.

Il faudra attendre 1928 pour que A. Fleming découvre la pénicilline. Il découvre par hasard que ses cultures de staphylocoques ont été contaminées par un champignon, *Penicillium notatum*. Il remarque alors qu'autour des colonies de champignon, il existe une zone où les bactéries n'ont pas poussé. Il émet l'hypothèse que le champignon produit une substance inhibant la croissance des staphylocoques, il appelle cette substance « pénicilline » (Bennett and Chung, 2001).

En 1929, A. Fleming publie cette découverte dans le British Journal of Experimental Pathology dans l'article : « On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae* ». Fleming montre que la pénicilline est active sur certaines bactéries comme les staphylocoques ou sur *Streptococcus pyogenes*. Cependant, elle est inactive sur les bactéries du « groupe coli-typhoïde », sur les bacilles intestinaux tels que *B. pyocyaneus*, *B. proteus* et *V. cholerae*, et sur le bacille de Pfeiffer (*Haemophilus influenzae*) considéré à cette époque comme l'agent bactérien responsable de la grippe. Fleming aborde même la toxicité *in vivo* de la pénicilline et affirme qu'elle est faible. Il conclut l'article en abordant les perspectives qu'offrent la pénicilline notamment dans le traitement des infections pyogènes mais aussi afin de permettre l'isolation de *H. influenzae* (Fleming, 1929).

La pénicilline contrairement à la pyocyanase possède une action antibactérienne à très faible dose (Bennett and Chung, 2001). De plus, la pénicilline est très peu toxique aux doses

minimales efficaces. Ces deux caractéristiques en font une molécule très intéressante dans le traitement des infections. C'est pourquoi, C.G. Paine s'en sert en 1930 afin de traiter des infections oculaires chez des nouveau-nés. Malheureusement, à l'époque ses résultats n'avaient pas été publiés mais ses notes cliniques ont été retrouvées plus tard (Wainwright and Swan, 1986).

A la même époque en Belgique, A. Garcia découvre qu'un champignon de la famille des actinomycètes produit une substance inhibant les staphylocoques, *B. pyocyaneus*, *E. coli* et *M. tuberculosis*. C'est pourquoi il appelle cette substance « mycolysate ». Garcia teste ensuite la toxicité du mycolysate chez l'animal en l'injectant à des lapins et cochons d'Inde et montre que la substance n'est pas toxique. En 1930, le mycolysate est même utilisé chez l'Homme afin de traiter des furoncles staphylococciques. Mais étant donné que le mycolysate a été utilisé en association avec des bactériophages, il n'est pas facile de tirer des conclusions claires concernant son efficacité thérapeutique. Cependant, la non-toxicité du mycolysate chez l'Homme a bien été démontrée (Brunel, 1951; Wainwright, 2000). Bien que cette substance semble prometteuse et ait fait l'objet de nombreuses publications entre 1925 et 1936, l'occupation de la Belgique par l'Allemagne en 1940 induit une rupture des contacts intellectuels entre celle-ci et le reste du monde. Ce qui a probablement diminué de façon importante l'impact de cette découverte.

A Oxford en 1939, E. Chain et H. W. Florey commencent à travailler sur la purification de la pénicilline. Ils publient l'année suivante leur premier article sur les propriétés chimiothérapeutiques de la pénicilline (Chain *et al.*, 1940). C'est le premier article qui démontre que la pénicilline est également active sur les bactéries *in vivo* ouvrant ainsi la perspective d'une utilisation dans le traitement des infections bactériennes. S'ensuit une période d'innovation importante et en 1941, soit 11 ans après l'utilisation du mycolysate par Garcia, les premiers patients sont traités avec succès (Abraham *et al.*, 1941).

D'autres antibiotiques ont été découverts à la même époque comme la subtiline, un polypeptide produit par *B. subtilis* et découvert en 1945 par G. Ramon et R. Richou (Ramon *et al.*, 1945; Korzybski *et al.*, 2013). Ou encore la gramicidine et la tyrocidine découverts en 1939 par R. Dubos. Ces deux substances antimicrobiennes sont des polypeptides produits par la bactérie *Brevibacillus brevis*. Malheureusement, bien que la tyrocidine soit efficace sur les bactéries à Gram négatives et positives, sa forte capacité hémolytique ne permet pas une

utilisation par voie intraveineuse. L'activité antimicrobienne de la gramicidine, bien que non hémolytique, est quant à elle largement inhibée par la présence de peptones et de sérum, ne permettant qu'une utilisation topique (Dubos and Hotchkiss, 1941; Van Epps, 2006). La moindre efficacité de ces molécules et leurs toxicités importantes limiteront leurs utilisations en thérapeutique humaine à la faveur de la pénicilline moins toxique et plus efficace.

En 1941, un biologiste des sols, S. A. Waksman, propose une définition du mot « antibiotique ». Il définit les antibiotiques comme toutes substances produites par des microorganismes capable, à l'état dilué, d'inhiber la croissance de d'autres microorganismes et même de les détruire (Clardy *et al.*, 2009; Paolozzi *et al.*, 2021). Aujourd'hui, la définition s'étend également aux molécules produites par les cellules eucaryotes et de synthèse ou d'hémi-synthèse qui n'ont plus rien à voir avec les produits naturels élaborés par certains microorganismes. Waksman découvrira également son lot d'antibiotiques comme la streptomycine en 1943, premier antibiotique efficace contre la tuberculose qui lui value le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1952. Ou encore la néomycine en 1948, un autre antibiotique de la famille des aminoglycosides, toujours utilisés en thérapeutique (Waksman and Lechevalier, 1949; Schatz *et al.*, 2005).

Aujourd'hui, il existe une dizaine de famille d'antibiotiques différente rassemblant plus de 150 antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine (**tableau I**). Cependant, malgré l'arsenal thérapeutique maintenant disponible, certaines bactéries sont devenues totalement insensibles aux antibiotiques connus. Le processus en cause : l'antibiorésistance.

Tableau I : Principaux antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine

<u>β-lactamines :</u> Inhibeur de la synthèse de la paroi bactérienne par inhibition de la synthèse du peptidoglycane		
Pénicillines et apparentés	Pénicilline G et dérivés	Pénicilline G, pénicilline V
	Pénicilline M	Méticilline, oxacilline, cloxacilline
	Pénicilline A	Amoxicilline, ampicilline
	Amidinopénicilline	Pivmecillinam
	Acyl-uréidopénicillines	Pipéracilline
	Carboxypénicillines	Témocilline, ticarcilline
Céphalosporines	1 ^{ère} génération	Céfaclor, céfadroxil
	2 ^{ème} génération	Céfuroxime
	3 ^{ème} génération	Céfotaxime, ceftriaxone, cefpodoxime, céfixime, ceftazidime, cefsulodine
	4 ^{ème} génération	Céfépime

	5 ^{ème} génération	Ceftaroline, ceftobiprole, ceftolozane
Monobactams	Aztréonam	
Carbapénèmes	Imipénème, ertapénème, méropénème	

<u>Glycopeptides :</u>		
Inhibiteur de la synthèse de la paroi bactérienne par inhibition de la transglycolysation		
Vancomycine, teicoplanine		

<u>Aminosides et cyclines :</u>	
Perturbateur de la synthèse protéique par interaction avec la sous-unité 30S ribosomale	
Aminosides	Amikacine, néomycine, tobramycine, gentamicine, streptomycine, dibékacine, spectinomycine, isépamicine, netilmicine
Cyclines	Doxycycline, lymécycline, méthylènenecycline, minocycline, tétracycline, tigécycline
<u>Macrolides et apparentés :</u>	
Perturbateur de la synthèse protéique par interaction avec la sous-unité 50S ribosomale	
Macrolides vrais	Erythromycine, clarithromycine, spiramycine, josamycine, azithromycine, roxithromycine, midécamycine, télithromycine, dirithromycine
Lincosamides	Clindamycine, lincomycine
Synergistines	Pristinamycine, virginiamycine
Kétolides	Télithromycine

<u>Phénicolés :</u>		
Inhibiteur de la synthèse protéine par inhibition de l'activité peptidyl-transférase de la sous-unité 50S ribosomale		
Chloramphénicol, thiamphénicol		

<u>Oxazolidinones :</u>		
Inhibiteur de la synthèse protéique en empêchant la formation du complexe ribosomal 70S		
Linézolide, tédizolide		

<u>Quinolones :</u>		
Inhibition de la synthèse d'ADN par inhibition des ADN gyrase et/ou le blocage de la topoisomérase IV		
1 ^{ère} génération	Acide pipémidique, fluméquine	
Fluoroquinolones (2 ^{ème} génération)	Urinaire	Norfloxacin, loméfloxacin, enoxacin,
	Systémique	Ofloxacin, ciprofloxacine, péfloxacin
	Anti-pneumococcique	Levofloxacin, moxifloxacin

<u>Produits nitrés :</u>		
---------------------------------	--	--

Prodrogues possédant un radical NO ₂ pouvant être réduit en un dérivé toxique pour l'ADN par substitutions de bases ou cassures	
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne, nifuroxazide
Nitro-imidazolés	Métronidazole, ornidazole, tinidazole

<u>Rifamycine :</u> Inhibition de la synthèse d'ARN par blocage des ARN polymérase	
Rifamycine, rifampicine, rifabutine,	

<u>Sulfamide antibactérien :</u> Inhibiteur de la synthèse de vitamine B9 par inhibition de la dihydroptéroate synthétase	
Suldiazine, sulfaméthisol, sulfafurazole	

<u>Polypeptides :</u> Perturbateur de la membrane cytoplasmique bactérienne	
Polymyxines	Polymyxine B, colistine
Gramicidine et tyrocidine	Gramicidine, bacitracine, tyrothricine
Lipopeptide	Daptomycine
<u>Antituberculeux :</u>	
Isoniazide	Inhibiteur de la synthèse de la paroi bactérienne
Pyrazinamide	Inhibiteur de la synthèse des acides gras à chaînes courtes du bacille de koch
Ethambutol	Inhibiteur de la synthèse des acides mycoliques par inhibition de l'arabinosyl-transférase

<u>Autres antibiotiques :</u>	
Fosfomycine	Inhibiteur de la synthèse de la paroi bactérienne (agit sur la pyruvyl-transférase)
Acide fusidique	Inhibiteur de la synthèse protéique par interaction avec le facteur d'élongation G
Fidaxomicine	Inhibition de la synthèse d'ARN en empêchant la reconnaissance des promoteurs -35 et -10 par le facteur σ
Triméthoprime	Inhibiteur de la synthèse de vitamine B9 par inhibition de la dihydrofolate réductase

1.2. Utilisation des antibiotiques dans le monde

Les antibiotiques sont omniprésents en santé humaine et animale. Ils sont utilisés par tous les pays de monde et sont essentiels pour traiter et prévenir les infections bactériennes. Deux principaux indicateurs sont utilisés afin d'évaluer la consommation d'antibiotiques. D'un côté

on retrouve la consommation globale exprimée en Dose Définie Journalière (DDJ). Et de l'autre on retrouve le taux de consommation d'antibiotique exprimé en DDJ pour 1 000 habitants et par jour.

Entre 2000 et 2015, la consommation globale mondiale d'antibiotique est passée de 21,1 milliards de DDJ à 34,8 milliards de DDJ, ce qui correspond à une augmentation de 65 %. Cette augmentation est majoritairement due aux pays à revenu faible et intermédiaire (PRFI) où la consommation globale a augmenté de 114 % tandis que dans les pays à revenu élevé (PRE), l'augmentation n'a été que de 6 %. Le taux de consommation mondiale d'antibiotiques a quant à lui augmenté de 39 % (de 11,3 à 15,7 DDJ / 1 000 habitants par jour). De la même manière, l'évolution du taux de consommation est fonction du niveau de revenu. Les PRFIs ont vu leur taux de consommation augmenter de 77 %. A l'inverse, le taux de consommation a diminué de 4 % dans les PRE (**figure 1A**) (Klein *et al.*, 2018).

Cependant, si on s'intéresse au taux de consommation par pays, on remarque que ce sont les PREs qui sont responsables de la majeure partie de consommation d'antibiotique. En effet, même si en 2015 on retrouve 4 PRFI dans les 6 plus gros consommateurs d'antibiotiques, le taux de consommation des PRE est presque 2 fois plus important que celui des PRFI (25,7 DDJ / 1 000 habitants par jour contre 13,5 DDJ / 1 000 habitants par jour) (**figure 1B**) (Klein *et al.*, 2018).

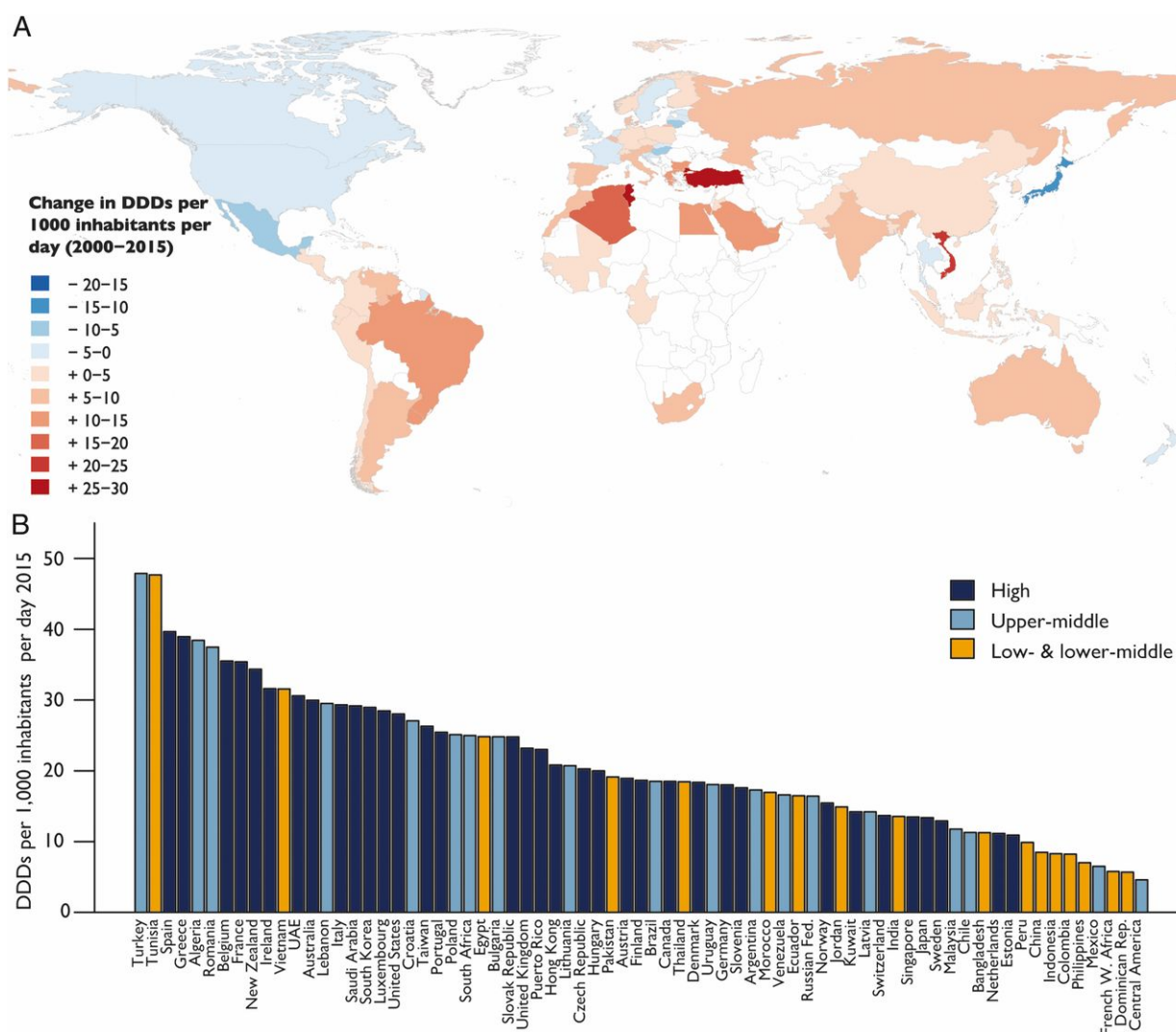


Figure 1 : Évolution de la consommation d'antibiotique mondiale entre 2000 et 2015. (A) : évolution du taux de consommation nationale en antibiotique entre 2000 et 2015 exprimé en DDJ / 1 000 habitants / jour. (B) : taux de consommation nationale en antibiotique en 2015 exprimé en DDJ / 1 000 habitants / jour (Klein et al., 2018).

Mis à part le niveau de consommation d'antibiotique, une autre observation problématique, est l'augmentation importante de l'utilisation d'antibiotiques de dernière ligne comme les carbapénèmes ou les polymyxines que ce soit chez les PRFI ou les PREs (Klein *et al.*, 2018).

Si tous les pays continuent d'augmenter leur consommation d'antibiotique à un niveau similaire aux taux observés entre 2000 et 2015, la consommation globale d'antibiotique devrait atteindre, en 2030, 128 milliards de DDJ ce qui correspondrait à une augmentation de 202 %. Concernant le taux de consommation d'antibiotique, il devrait atteindre 41,1 DDJ par 1 000 habitants et par jour, ce qui équivaldrait à une augmentation de 161 % (Klein *et al.*, 2018).

Cependant même si ce sont les PRFI qui sont responsables de la majeure partie de l'augmentation de cette consommation, ce sont les PREs qui sont les plus gros consommateurs. Il est essentiel d'équilibrer l'accès et l'utilisation des antibiotiques notamment dans les PRFIs où les maladies infectieuses sont encore très problématiques. Il est urgent de diminuer fortement la consommation d'antibiotique dans les PREs et d'utiliser de manière plus judicieuse les antibiotiques efficaces dans les PRFIs, afin de ralentir l'apparition de résistance.

En effet en 2015, l'OMS déclarait : « la résistance aux antimicrobiens est devenue l'une des plus graves menaces des temps modernes pour la santé mondiale » (OMS, 2015). La même année, le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies (ECDC) a publié une analyse sur l'impact de l'antibiorésistance en Europe. Tous les ans en Europe, il y a plus de 650 000 infections à des bactéries résistantes à des antibiotiques, 63,5 % d'entre elles sont nosocomiales et cela conduit à plus de 33 000 décès par an (Cassini *et al.*, 2019). Dans le monde, c'est 700 000 personnes qui décèdent par an à cause de la résistance aux antibiotiques, et ce nombre risque d'augmenter drastiquement dans les prochaines années. En effet, en 2014, le gouvernement britannique a commandé la « Review on Antimicrobial Resistance », dirigée par Jim O'Neill, un économiste britannique. La revue a pour but d'étudier l'impact de l'antibiorésistance, notamment au niveau économique. Publié en 2016, l'article prédit qu'en 2050, 10 millions de décès par an seront imputables à l'antibiorésistance (O'Neill, 2014).

En effet, si les antibiotiques n'étaient plus efficaces, de nombreuses interventions chirurgicales seraient risquées. Par exemple, l'utilisation prophylactique d'antibiotiques lors de césariennes a réduit l'incidence de complications infectieuses graves de 60 % à 70 % (Smaill and Grivell, 2014). En plus des interventions chirurgicales, d'autres patients seraient touchés, notamment ceux atteints de cancers, du VIH et plus généralement tous les patients immunodéprimés. Les transplantations deviendraient également plus à risque d'infection car pour éviter le rejet aigu du greffon, les patients suivent un traitement immunosuppresseur.

Pour toutes ces raisons, la lutte contre l'antibiorésistance est aujourd'hui l'une des problématiques majeures de la santé.

2. L'antibiorésistance chez les bactéries :

En 1854, Charles Darwin publie le fameux ouvrage « L'Origine des espèces » (Darwin, 1859). Il y aborde deux grandes théories : la théorie de la sélection naturelle et la théorie de

l'évolution. Même s'il a fallu plusieurs décennies pour que ces théories soient acceptées par toute la communauté scientifique, on admet aujourd'hui que toutes les espèces évoluent et que les individus les mieux adaptés à l'environnement sont sélectionnés, c'est la sélection naturelle. L'apparition de résistances aux antibiotiques est donc un processus naturel. Lorsqu'on exerce une pression de sélection sur des bactéries en ajoutant des antibiotiques dans leur milieu de vie, les bactéries résistantes sont naturellement sélectionnées. La question que l'on doit se poser n'est pas « est-ce que cette espèce bactérienne deviendra résistante à cet antibiotique ? » mais « quand est-ce que cette espèce bactérienne deviendra résistante et comment retarder le phénomène ? ».

Le problème de l'antibiorésistance fût soulevé par Fleming dès 1945. Il affirme que « toutes les souches d'espèces bactériennes généralement considérées comme sensibles à la pénicilline ne sont pas réellement sensibles à cet antibiotique ». Flemming préconise même déjà la réalisation d'une sorte d'antibiogramme afin d'utiliser de façon plus intelligente la pénicilline (Fleming and Queen, 1946). Dans une entrevue accordée au New York Times la même année, Fleming avertit sur le mésusage de la pénicilline et prédit qu'une mauvaise utilisation pourrait contribuer à la sélection de souches résistantes (NYT, 2015). L'avenir lui donnera raison puisque 30 ans après l'introduction de la pénicilline pour le traitement des infections à *Staphylococcus aureus*, 80 % des souches étaient résistantes (Monaco *et al.*, 2017).

Ce phénomène est commun à tous les antibiotiques utilisés aujourd'hui en thérapeutique humaine. Quelques années après leurs commercialisations, les premiers cas de résistance apparaissent (**figure 2**).

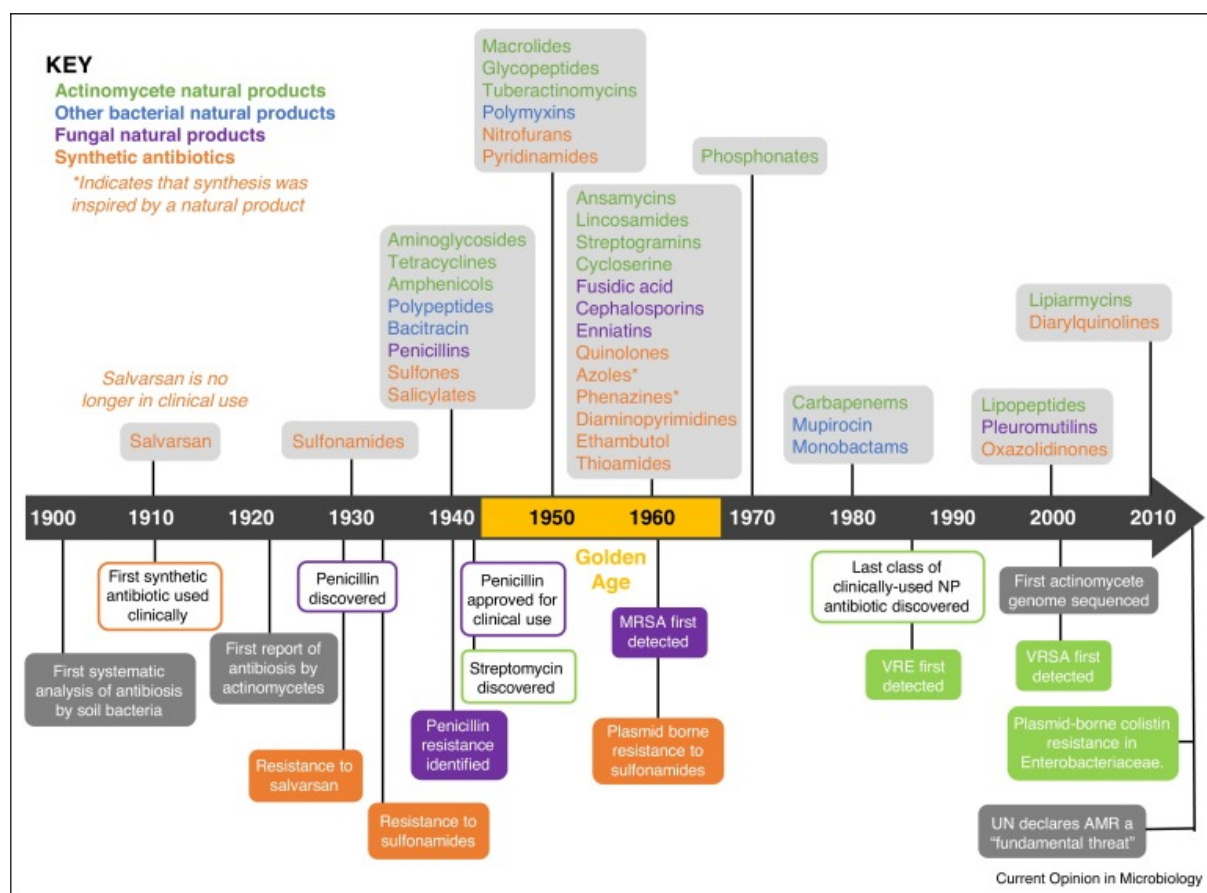


Figure 2 : Frise chronologique de la découverte des antibiotiques et de l'apparition de souches résistantes à ces antibiotiques.

NP : Natural product, UN : ONU, AMR : Antimicrobial resistant. (Hutchings et al., 2019)

Mais afin de lutter contre l'antibiorésistance, il faut d'abord comprendre comment elle apparaît.

2.1. L'apparition de l'antibiorésistance chez les bactéries

La résistance aux antibiotiques peut être une propriété intrinsèque de la cellule bactérienne. En effet, certains antibiotiques du fait de leur mécanisme d'action n'agissent que sur certains genres bactériens. C'est par exemple le cas pour la colistine, un antibiotique appartenant à la famille des polymyxines. La colistine se lie aux groupements phosphates chargés négativement du lipide A du lipopolysaccharide (LPS) de la membrane externe des bactéries à Gram négatifs. Cela conduit à une déstabilisation de la membrane externe et de l'enveloppe cellulaire conduisant à la lyse de la bactérie. Chez les bactéries Gram positives, la colistine est inefficace car les charges négatives de l'enveloppe cellulaire sont neutralisées par des

modifications chimiques comme la D-alanylation, rendant naturellement résistantes ces bactéries à cet antibiotique.

Cependant, la résistance aux antibiotiques peut également être acquise. En effet, les génomes bactériens, bien que stables, sont remarquablement dynamiques à l'échelle de l'évolution. Cette diversité génétique peut être obtenue par des mutations de l'ADN chromosomique, des réarrangements du génome ou par l'acquisition de séquences d'ADN provenant d'organismes apparentés éloignés dans un processus appelé transfert horizontal de gènes (HGT) (Darmon and Leach, 2014).

2.1.1. Les mutations et modifications génétiques

L'ADN des bactéries peut muter aléatoirement. Par exemple pour *E. coli* le taux de mutation moyen est de $5,4 \times 10^{-10}$ par paire de bases par génome répliqué. Autrement dit, chaque paire de base a une probabilité de 1 sur 1,85 milliard de muter. Le taux de mutation peut également être exprimé en nombre de mutation par génome répliqué. La valeur de $3,4 \times 10^{-4}$ est conservée chez de nombreux microorganismes testés (Paolozzi *et al.*, 2021).

Certaines mutations peuvent engendrer un atout pour la bactérie comme une meilleure résistance à la chaleur ou une résistance à un toxique. D'autres mutations n'apportent rien ou peuvent même être délétères. La sélection naturelle fait que seules les mutations avantageuses sont sélectionnées dans la lignée évolutive de la souche bactérienne. Il est donc possible qu'une souche bactérienne acquière une mutation lui conférant une résistance à un antibiotique. Cette mutation sera alors sélectionnée lors du traitement antibiotique car seules les bactéries résistantes pourront se multiplier. Même si ce phénomène est assez rare, de l'ordre d'une bactérie sur 1 milliard, l'importante densité bactérienne présente lors d'un processus d'infection conduit forcément à l'émergence d'un clone résistant à un antibiotique lorsqu'il est utilisé seul. L'utilisation simultanée de deux antibiotiques aux mécanismes d'action différents permettrait de faire chuter la probabilité d'apparition de clone résistant aux deux antibiotiques à 1 bactérie sur 10^{18} (Institut Pasteur, 2021; Paolozzi *et al.*, 2021). Cependant, même si une bithérapie est parfois envisagée dans certains cas, comme lors d'infections nosocomiales respiratoires graves (Ahmed *et al.*, 2014; HAS, 2019), l'utilisation simultanée de deux antibiotiques peut conduire à l'apparition de bactéries multirésistantes, et d'après une étude menée en 2013 alliant modélisation mathématique et expérience d'évolution *in vivo*, l'utilisation synergique de deux

antibiotiques pourrait être dans certains cas la pire stratégie à adopter si la clairance bactérienne n'est pas obtenue après la première phase de traitement, car la pression de sélection exercée par l'administration concomitante des deux antibiotiques est telle qu'une bactérie multirésistante émerge systématiquement dès le premier jour de traitement (Pena-Miller *et al.*, 2013).

De manière générale, les mutations qui conduisent à une résistance à un antibiotique altèrent son action via un des mécanismes suivants : i) modification de la cible de l'antibiotique : conduisant à une diminution de l'affinité de l'antibiotique envers sa cible. ii) modification de l'import/export de l'antibiotique, conduisant à une diminution de son importation ou à une augmentation de son extrusion par des mécanismes d'efflux membranaire. iii) modifications globales d'importantes voies de signalisation métabolique via la modulation du système de régulation (Munita and Arias, 2016). Ces mécanismes sont souvent des mécanismes généraux et peuvent parfois conduire à l'apparition de résistance à plusieurs types d'antibiotiques.

Si nous reprenons l'exemple de la résistance à la colistine, une des stratégies permettant aux bactéries Gram négatives d'échapper à l'effet bactéricide de cet antibiotique repose sur des modifications du LPS réduisant la charge négative de la membrane externe empêchant ainsi la liaison et l'action de l'antibiotique. Cela peut être réalisée en modifiant les groupements phosphate (PO_4^-) chargés négativement du lipide A en ajoutant un groupement 4-amino-4-deoxy-L-Arabinose (L-Ara4N) ou un groupement phosphoéthanolamine (PetN). Chez *Klebsiella pneumoniae*, cela peut être accompli par des systèmes régulateurs à deux composants comme PmrA/B et PhoP/Q. Des mutations dans ces systèmes ou leurs régulateurs conduit à une augmentation de leur expression et est accompagné par un ajout majoré de groupement cationique au LPS conduisant une diminution de la charge négative globale de la membrane externe induisant ainsi une résistance accrue à la colistine. D'autres mutations comme une inactivation du gène *mgrB* par des séquences d'insertions ou des mutations non-sens conduisent également à une surexpression de l'opéron *phoPQ*, augmentant ainsi la résistance à la colistine. Les mutations dans *mgrB* représentent la principale cause de résistance à la colistine dans les souches clinique de *K. pneumoniae* (El-Sayed Ahmed *et al.*, 2020).

Les antibiotiques peuvent aussi promouvoir l'acquisition de résistance. En effet, certains antibiotiques induisent des dommages à l'ADN ou un arrêt de la réplication comme les quinolones qui inhibent l'ADN gyrase, les dérivés nitrés qui produisent des dérivés toxiques pour l'ADN ou encore le triméthoprime et les sulfamides antibactériens qui perturbent la

synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Tout cela conduit à la production d'un stress génotoxique transitoire qui stimule la réponse SOS chez les bactéries. Pendant la réponse SOS, le génome des bactéries se réarrange, mute et l'expression de plusieurs gènes est modifiée. Cela conduit parfois à l'acquisition de caractéristiques qui potentialisent la survie et l'adaptation des bactéries à une pression environnementale (Blázquez *et al.*, 2002; Baharoglu and Mazel, 2014). Par exemple, la réponse SOS est connue pour activer le réarrangement de certains intégrons mobiles et du super-intégron (SI) de *V. cholerae* (Guerin *et al.*, 2009). Un intégron est une structure génétique composée d'une plateforme stable et d'une partie variable composée de cassettes. La plateforme stable est composée d'un gène codant pour une intégrase ainsi que d'un promoteur, le Pc promoteur, permettant l'expression des cassettes situées en aval. Le nombre de cassettes contenues dans un intégron est variable, et peut aller d'une dizaine de cassettes à plusieurs centaines comme c'est le cas pour le SI de *V. cholerae* qui contient environ 180 cassettes. Les cassettes n'ont pas de promoteur propre, ainsi seules les premières cassettes de l'intégron, en aval du Pc promoteur, sont exprimées. Les autres sont silencieuses et stockées à bas coût biologique dans le génome de la bactérie. L'intégrase permet l'excision des cassettes et leur réinsertion au début de l'intégron (**figure 3**). Ce processus s'appelle : *integron shuffling* (réarrangement de l'intégron) (Richard *et al.*, 2022).

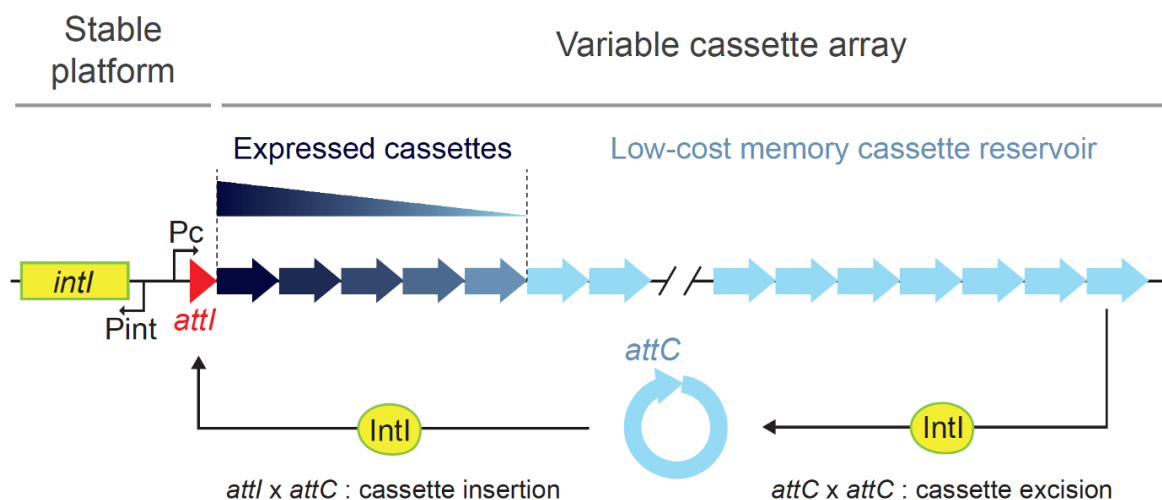


Figure 3 : Structure d'un intégron (Richard et al., 2022).

Lors d'un stress génotoxique, la réponse SOS conduit, entre autres, à l'induction de l'expression de l'intégrase activant fortement le réarrangement de l'intégron. Ainsi des cassettes silencieuses peuvent se réinsérer au début de l'intégron et devenir exprimées. Cela peut conduire à l'expression d'un gène permettant la dégradation ou l'export de l'antibiotique, rendant la bactérie résistante à celui-ci. Il est souvent considéré que les mécanismes de résistance aux antibiotiques sont coûteux pour les bactéries les hébergeant, conduisant à leur disparition en l'absence d'exposition aux antibiotiques. Cependant, grâce aux intégrons, les gènes de résistances aux antibiotiques peuvent être stockés à bas coût biologique, et exprimés uniquement en cas de besoin. Ainsi il est possible que la résistance aux antibiotiques persiste dans le temps dans la bactérie même en absence d'exposition (Guerin *et al.*, 2009).

2.1.2. Le transfert horizontal de gène

En plus de la sélection de la résistance aux antibiotiques par modification génétique, du nouveau matériel génétique peut également être échangé entre les micro-organismes. Ce transfert de gènes horizontal peut fournir à la bactérie un nouveau matériel génétique qui engendrerait une résistance aux antibiotiques. Les échanges de matériaux génétiques entre les micro-organismes peuvent être très importants, jusqu'à une bactérie sur 100 (Institut Pasteur, 2021).

Les principaux moteurs du transfert horizontal de gènes sont les éléments génétiques mobiles (MGE), des segments d'ADN qui catalysent leur propre mouvement dans et entre les génomes. Les MGE comprennent entre autres les phages, les îlots chromosomiques inducibles par les phages (PICI), les éléments transposables, les chromosomes à cassette staphylococciques (SCC), les éléments conjugatifs intégratifs (ICE) et les plasmides (Frost *et al.*, 2005).

Il existe plusieurs mécanismes de transmission, parmi les plus importants on peut citer : la conjugaison, la transduction et la transformation (**figure 4**).

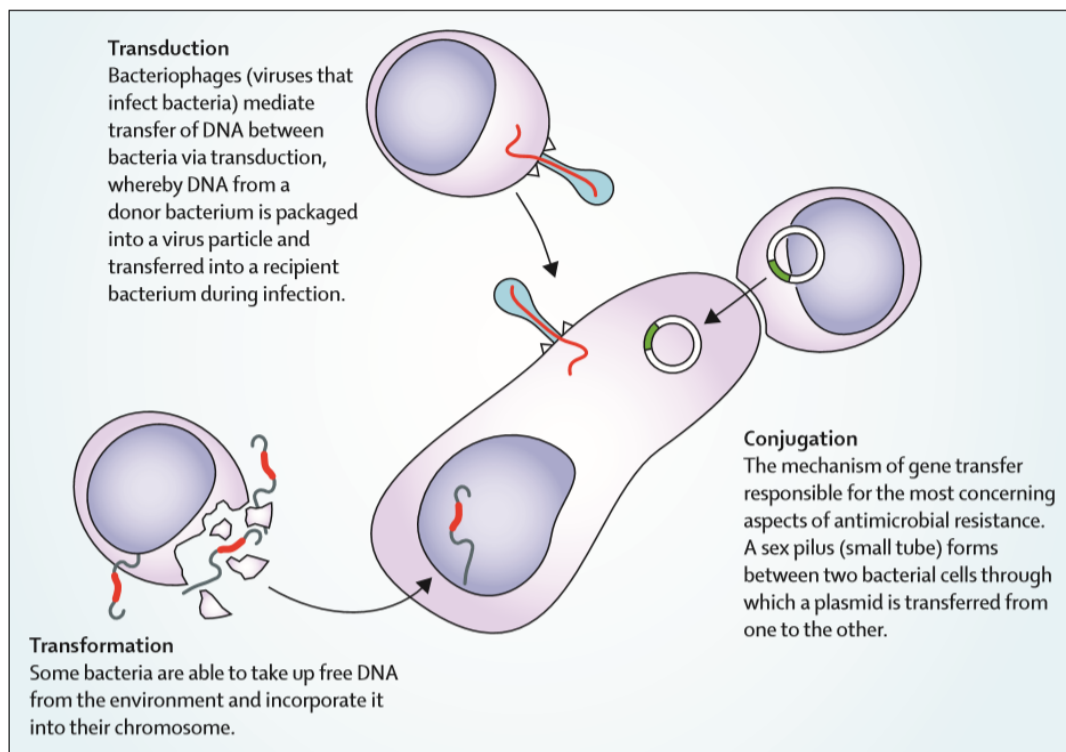


Figure 4 : La transmission de matériels génétiques entre les micro-organismes (Holmes et al., 2016).

2.1.2.1. La conjugaison

La conjugaison est probablement le mécanisme le plus fréquent. Elle correspond au transfert d'un élément génétique mobile de type ICE/IME ou plasmidique d'une bactérie à une autre par l'intermédiaire de pili sexuels, un système de sécrétion de type IV (T4SS).

Les plasmides sont des éléments d'ADN extrachromosomiques circulaires capables de se répliquer de manière semi-autonome en recrutant des enzymes de la cellule hôte. Les plasmides portent les gènes nécessaires à leur réplication et à leur transmission, ainsi que des gènes dits accessoires qui, dans des conditions environnementales spécifiques, fournissent des traits bénéfiques tels que la résistance aux antibiotiques, la tolérance aux métaux lourds, la virulence, le métabolisme des sources de carbone ou encore la nodulation des racines. Les plasmides, et donc les gènes de résistance aux antibiotiques (ARGs) et les facteurs de virulence qu'ils portent, peuvent se propager au sein des populations bactériennes par compétence naturelle, par transduction ou par conjugaison (Wein and Dagan, 2020). Les ICE, également appelés transposons conjugatifs, sont des MGEs qui, contrairement aux plasmides, ne peuvent pas rester sous une forme extrachromosomique et doivent obligatoirement s'intégrer dans le génome de la bactérie hôte dans laquelle ils résident afin d'être répliqué. Ils possèdent plusieurs modules

génétiques permettant leur intégration et excision du génome et leur conjugaison ainsi que des gènes cargo, non essentiel pour leur cycle de vie, mais conférant un phénotype, parfois avantageux, à la cellule hôte (Johnson and Grossman, 2015).

La conjugaison, un phénomène très répandu chez les bactéries à Gram positif et négatif, est le transfert d'ADN d'un donneur à une bactérie réceptrice par contact direct. Ce mécanisme fait intervenir trois systèmes moléculaires clés : le relaxosome, la protéine de couplage de type 4 (T4CP) et le système de sécrétion de type IV (T4SS). La relaxase, souvent associée à d'autres protéines dans le relaxosome, interagit au niveau de l'origine du transfert (*oriT*), produit une coupure simple brin au niveau d'une séquence spécifique (site *nic*), et s'y lie de manière covalente. Ensuite, la T4CP, une ATPase, couple le filament nucléoprotéique comprenant l'ADN simple brin (ADNsb) et la relaxase avec le T4SS. Enfin, le T4SS, un grand complexe protéique qui traverse les deux membranes cellulaires, délivre le filament nucléoprotéique de la cellule mère (donneuse) à la cellule fille (receveuse). Une fois dans le nouvel hôte, la relaxase ligature l'ADN importé, générant une molécule monocaténaire qui est ensuite répliquée par la machinerie cellulaire. À la fin du processus de conjugaison, une copie du MGE est retrouvée dans chaque cellule. Les plasmides restent majoritairement sous la forme extrachromosomique tandis que les ICE s'intègrent dans le génome de la bactérie receveuse (Smillie *et al.*, 2010; Cury *et al.*, 2020; Ares-Arroyo *et al.*, 2022). L'ADN entrant dans une cellule par ce mécanisme est relativement protégé contre les systèmes de défense bactériens grâce à la synthèse du brin complémentaire avec des modifications épigénétiques spécifiques à l'hôte mais aussi grâce aux systèmes anti-défense qui peuvent être codés sur le brin principal (*leading region*) qui est la première à pénétrer dans les cellules réceptrices (Samuel and Burstein, 2023). Plusieurs types de mécanismes de conjugaison ont été identifiés, chacun étant caractérisé par la présence d'un ensemble distinct de gènes et de protéines impliqués dans le processus de conjugaison.

En fonction de leurs capacités à se déplacer, on peut distinguer trois types de plasmides : les plasmides conjugatifs, mobilisables et non mobilisables. Les plasmides conjugatifs sont ceux qui codent tous les éléments fonctionnels nécessaires à un transfert autonome. Les plasmides mobilisables, comme leur nom l'indique, sont ceux qui, bien qu'ils ne portent pas tous les facteurs nécessaires au transfert, en contiennent certains, généralement une relaxase et/ou un *oriT*, qui leur permettent d'être transférés en détournant la machinerie conjugative d'éléments conjugatifs co-résidents. Enfin, les plasmides non mobilisables sont ceux qui ne

contiennent aucun des composants susmentionnés et qui, par conséquent, ne peuvent pas se déplacer par ce mécanisme (Ares-Arroyo *et al.*, 2022).

2.1.2.2. *La transduction*

La transduction est un processus par lequel les bactériophages, aussi plus simplement appelé phages, transfèrent du matériel génétique d'une bactérie à une autre. Les phages sont des virus infectant les bactéries et utilisant la machinerie cellulaire bactérienne afin de se répliquer. On distingue deux grands types de phage : les phages lytiques et les phages lysogéniques.

Les phages lytiques utilisent le cycle lytique afin de répliquer leur ADN. Une fois que le phage a infecté une cellule bactérienne, il prend le contrôle de sa machinerie cellulaire, produisant ainsi un nombre important de nouvelles particules virales jusqu'à l'éclatement de la cellule bactérienne permettant leur libération. Il s'agit d'un processus rapide et très efficace pour infecter et tuer les cellules bactériennes. Au cours du cycle lytique, le phage peut également récupérer des morceaux d'ADN bactérien, qui peuvent ensuite être transférés à une autre bactérie lors d'infections ultérieures. Ce processus est appelé transduction généralisée.

En revanche, les phages lysogènes intègrent leur ADN dans le chromosome bactérien, devenant ainsi un prophage et les bactéries les hébergeant des bactéries lysogènes. Pendant la réplication du chromosome bactérien, le prophage va également être répliqué et transmis aux cellules filles pendant la division cellulaire. Dans certaines conditions, endommageant l'ADN comme l'exposition aux rayons UV ou à certains antibiotiques, le prophage peut s'exciser du chromosome bactérien et entrer dans le cycle lytique, entraînant ainsi la lyse de la cellule bactérienne et la libération de nouvelles particules phagiques. Ce processus, appelé induction, peut conduire à une transduction spécialisée si le prophage s'excise de manière incorrecte et emporte avec lui de l'ADN bactérien adjacent. La transduction peut avoir des conséquences importantes sur l'évolution bactérienne et la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques (Lerminiaux and Cameron, 2019).

2.1.2.3. *La transformation*

La transformation bactérienne est un processus par lequel les bactéries absorbent des molécules d'ADN étrangères dans leur environnement et les incorporent dans leur propre génome. Ce processus a été découvert pour la première fois chez *Streptococcus pneumoniae* par Frederick Griffith en 1928 et a depuis été observé chez de nombreuses autres espèces

bactériennes (Griffith, 1928). Les molécules d'ADN étrangères absorbées par les bactéries se présentent généralement sous la forme de fragments d'ADN double brin, tels que ceux libérés par la lyse d'autres bactéries dans l'environnement. Ces fragments d'ADN doivent être suffisamment longs pour contenir un gène fonctionnel ou un élément régulateur et avoir des séquences homologues au génome de l'hôte, ce qui permet leur recombinaison et leur intégration. La transformation joue un rôle crucial dans l'évolution et l'adaptation des bactéries en permettant l'acquisition de nouveaux gènes et de nouveaux caractères pouvant être bénéfique à la bactérie.

La transformation peut se produire naturellement chez de nombreuses espèces bactériennes et dépend de divers facteurs, tels que la structure de la paroi cellulaire, l'état de compétence des cellules et la nature des fragments d'ADN. Nous pouvons prendre l'exemple de *Vibrio cholerae*, la bactérie responsable du choléra, qui utilise son système de sécrétion de type VI (T6SS) afin de stimuler la transformation. Le T6SS est une machinerie bactérienne permettant la délivrance de toxines aux cellules voisines. Ce système est utilisé par *V. cholerae* pour éliminer la concurrence et exercer un contrôle social dans les communautés microbiennes. Cette bactérie utilise son T6SS pour tuer les cellules voisines et absorber l'ADN libéré par ces cellules. En intégrant cet ADN étranger dans son propre génome, *V. cholerae* peut rapidement évoluer et acquérir de nouvelles capacités, comme des gènes de résistance aux antibiotiques ou des gènes de virulence (Borgeaud *et al.*, 2015).

Comme nous l'avons vu, les bactéries sont capables de devenir résistantes aux antibiotiques soit par mutations génétiques, soit par acquisition de gènes de résistances par transfert horizontal de gène. Les antibiotiques peuvent même parfois promouvoir l'apparition de ces résistances, mettant en avant le fait qu'une utilisation contrôlée et adéquate est importante afin de limiter l'apparition de résistance.

2.2. L'antibiorésistance, un problème global

Dans notre organisme, nous hébergeons des milliards de bactéries qui cohabitent, au sein de microbiotes. Le corps humain est composé de plusieurs microbiotes différents au niveau de la peau, des cavités nasales, du vagin, des intestins... L'ensemble de ces microbiotes forme le microbiome. Celui-ci est composé de bactéries commensales comme *Lactobacillus* ou *Bacteroides* mais certaines peuvent être des bactéries pathogènes occasionnelles comme

Bacteroides fragilis, *Escherichia coli* ou *Staphylococcus aureus*. Le microbiome de chaque humain est unique puisqu'il se compose des bactéries rencontrées dans notre environnement proche. Dès les premiers jours de vie, la flore vaginale de la mère ainsi que le lait maternel ou industrialisé vont participer à la formation de notre microbiome. Le microbiome du nouveau-né va également acquérir de nouvelles bactéries par l'intermédiaire de ses parents par transfert de bactérie du microbiote du parent vers l'enfant. Puis de nombreuses autres bactéries viennent compléter ce microbiote tout au long de la vie, provenant de notre environnement proche et de notre alimentation.

Les antibiotiques sont très largement utilisés en médecine humaine et animale afin de lutter contre les infections bactériennes, mais généralement, leur spectre d'activité ne se limite pas aux bactéries pathogènes. En effet, bien que les antibiotiques soient efficaces contre de nombreuses bactéries pathogènes, ils agissent également sur les bactéries commensales de nos microbiotes. Cette aspécificité peut conduire à l'apparition de dysbiose, c'est-à-dire, à un dérèglement de notre écosystème bactérien pouvant participer à l'apparition de nombreux troubles variés comme des allergies, des troubles intestinaux, de l'hypertension ou encore des troubles psychiques (Yang *et al.*, 2015; Cryan *et al.*, 2019). De plus, comme nous l'avons vu précédemment, les antibiotiques sélectionnent naturellement les bactéries résistantes de nos microbiotes, et certains antibiotiques sont connus pour stimuler l'apparition de résistance que ce soit par mutations génétiques ou transferts de gènes horizontaux. C'est pourquoi les antibiotiques doivent être utilisés avec discernement et leur utilisation se doit d'être encadrée et règlementée comme c'est le cas en France. Mais ce n'est pas le cas dans tous les pays du monde et cela peut avoir des conséquences désastreuses, car outre le fait que les infections bactériennes sont de plus en plus résistantes aux antibiotiques et que de nombreux patients meurent d'infections pour lesquelles les antibiotiques ne sont plus efficaces, ces bactéries multirésistantes et ces antibiotiques se retrouvent finalement dans l'environnement. Et l'environnement joue un rôle clé dans l'apparition et la dissémination de l'antibiorésistance. En effet, comme nous l'avons souligné, il participe grandement à l'élaboration de notre microbiome, et si des bactéries résistantes aux antibiotiques se retrouvent dans notre environnement proche, nous avons de grande chance de les retrouver également au sein de nos microbiotes !

La présence de résistances aux antibiotiques dans l'environnement a plusieurs causes. Premièrement bien que les antibiotiques soient utilisés en médecine animale, ils ont été et sont encore utilisés dans certains pays en tant que promoteur de croissance dans les élevages, et cette utilisation promeut l'apparition et la dissémination de résistance. On peut citer par exemple le cas de la résistance à l'ampicilline, un antibiotique appartenant à la famille des β -lactamines à large spectre, très largement utilisé en thérapeutique humaine et commercialisé au début des années 1960. Peu après sa commercialisation, des souches de *Salmonella enterica* Typhimurium résistantes à l'ampicilline ont causé plusieurs épidémies en Europe. L'apparition de souches résistantes, si peu de temps après sa commercialisation, laissait penser que des souches résistantes étaient déjà présentes avant son utilisation en thérapeutique humaine. Des chercheurs du *Public Health Laboratory Service* de Londres, au Royaume-Unis, ont décidé d'étudier comment cette résistance était apparue aussi rapidement et ont montré que le gène de résistance à l'ampicilline est apparu, chez l'Homme, avant le début de sa commercialisation, probablement à cause de l'utilisation de pénicilline G, un autre antibiotique de la même famille, dans l'élevage en tant que promoteur de croissance (Anderson and Lewis, 1965). Depuis 2006, cette pratique est interdite dans l'Union européenne, mais de nombreux autres pays ont continué à l'utiliser malgré cette interdiction (Commission Européenne, 2005). En novembre 2017, l'OMS a souligné les risques liés à cette pratique et a recommandé son arrêt (OMS, 2017). L'utilisation des antibiotiques dans les élevages n'est pas la seule cause de la présence de bactéries résistantes dans l'environnement. On retrouve par exemple des antibiotiques dans l'environnement en Amérique latine et en aval de nombreuses industries pharmaceutiques, révélant une gestion des eaux usées insuffisantes (Fick *et al.*, 2009; Reichert *et al.*, 2019). Or, leur présence, même à des concentrations 100 fois inférieures à la concentration létale, peut induire la réponse SOS et conduire à l'apparition de résistance aux antibiotiques (Baharoglu *et al.*, 2013).

Étant donné que l'on retrouve des bactéries résistantes dans notre environnement proche, dans l'eau et même dans la nourriture, il est normal de retrouver des bactéries résistantes aux antibiotiques au sein de nos microbiotes (Walsh *et al.*, 2011; Jans *et al.*, 2018). De nombreuses études ont constaté la présence de bactéries résistantes dans nos microbiotes, même en l'absence de traitement antibiotique récent. On peut par exemple citer cette étude menée par des chercheurs d'un hôpital à New Delhi, en Inde, qui souligne que 41,5 % des nourrissons naîfs aux

antibiotiques étudiés étaient porteurs d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (EBLSE) (Kothari *et al.*, 2013).

Pour lutter efficacement contre l'antibiorésistance, il est donc nécessaire de prendre en compte l'environnement et d'avoir une approche globale : c'est le concept de « One Health » (McEwen and Collignon, 2018).

Il est important de moins et mieux utiliser les antibiotiques, car comme nous l'avons vu, ils promeuvent, par leur mécanisme d'action, l'apparition de résistance. Parfois l'arrêt d'utilisation d'un antibiotique pour une bactérie permet une diminution du taux de résistances. En effet, les mécanismes de résistances représentent un coût énergétique pour la bactérie et en l'absence de pression de sélection, ce mécanisme est perdu. C'est par exemple le cas pour la résistance aux fluoroquinolones chez *E. coli*, en effet entre 2011 et 2018, l'utilisation des fluoroquinolones dans les élevages de porcs et volailles en France a diminué de 70 %. Cette diminution d'usage s'accompagne d'une diminution d'infection à *E. coli* résistantes aux fluoroquinolones chez les animaux malade d'en moyenne 50 % (Perrin-Guyomard *et al.*, 2020). Cependant ce cas de figure n'est pas partagé pour toutes les bactéries et antibiotiques, en effet certain cas, même si l'on arrête de les utiliser, les mécanismes de résistances persistent dans la bactérie, car ils sont peu coûteux. C'est par exemple le cas lorsque les gènes de résistances sont présents dans un intégron qui permet leur conservation à bas coût biologique.

C'est pourquoi, il est urgent de trouver des alternatives aux antibiotiques ou de nouveaux antibiotiques afin de continuer de lutter contre les infections bactériennes. Dans la suite de ce manuscrit, nous aborderons succinctement plusieurs stratégies aujourd'hui en développement avant de nous concentrer sur une stratégie détournant la conjugaison bactérienne afin de lutter contre les infections bactériennes multirésistantes.

3. Les bactériophages :

3.1. Caractéristiques générales

Les bactériophages, aussi appelés plus simplement phages, sont des virus infectants spécifiquement et exclusivement les bactéries. Les phages sont responsables de la mort d'en moyenne 50 % des bactéries par jour sur Terre (Díaz-Muñoz and Koskella, 2014). Cette pression de sélection importante a conduit les bactéries à développer de nombreux systèmes de

défense contre les phages comme les enzymes de restriction ou encore les systèmes CRISPR-Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR associated genes/proteins*).

Il existe plusieurs types de phages en fonction de leur taille et de leur structure. D'une manière générale, les phages ont une taille moyenne de 25 à 200 nm. Ils sont composés d'une capside protéique renfermant un génome d'acide nucléique d'ADN ou d'ARN, et le plus souvent d'une queue par laquelle transite l'ADN ou l'ARN du phage lors de l'infection de la bactérie (**figure 5**). La capside, qui a souvent une structure polyédrique ou cylindrique, peut être entourée d'une enveloppe lipidique chez certains phages.

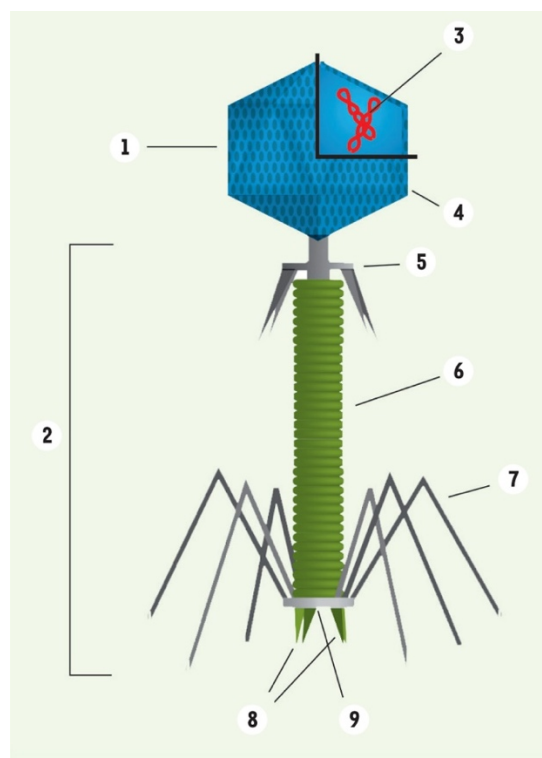


Figure 5 : Structure d'un bactériophage T4 (infectant spécifiquement E.coli).

1 : Tête, 2 : Queue, 3 : Acide nucléique, 4 : Capside, 5 : Collier, 6 : Gaine, 7 : Fibres de queue, 8 : Épines, 9 : Plaque basale (Dufour and Debarbieux, 2017).

Les phages présentent une spécificité importante et très étroite, envers leur cible bactérienne. Ils ne peuvent en général infecter qu'une seule espèce de bactéries. Il est même courant qu'au sein de cette espèce, seules certaines souches soient sensibles au phage. Cette spécificité est due à la présence de récepteurs situés à la surface de la cellule bactérienne utilisé par le phage pour se fixer sur la bactérie et pénétrer dans la cellule. Il existe néanmoins certains

phages à plus large spectre capables d'infecter plusieurs souches de la même espèce bactérienne. Cela les rend plus intéressants en thérapeutique humaine.

Une fois à l'intérieur de la cellule hôte, le phage détourne la machinerie bactérienne pour répliquer son génome et produire de nouvelles particules phagiques. Il existe deux grands types de cycles infectieux : le cycle lytique et le cycle lysogénique. Les phages virulents sont des phages réalisant le cycle lytique. Après l'infection de la bactérie, la machinerie cellulaire produit un grand nombre de copies du virus qui seront libérées par la lyse de la bactérie infectée. Les phages tempérés sont des phages capables de réaliser le cycle lytique et lysogénique. Pendant la phase lysogénique, ils peuvent infecter la bactérie, intégrer leur génome au sein du génome bactérien (ou sous la forme d'un plasmide extrachromosomique). Le phage devient alors un prophage, il s'agit de la forme latente du virus. Celle-ci est transmise aux bactéries descendantes après division cellulaire. Enfin, sous l'effet d'un stress, le phage peut rentrer en cycle lytique (**figure 6**).

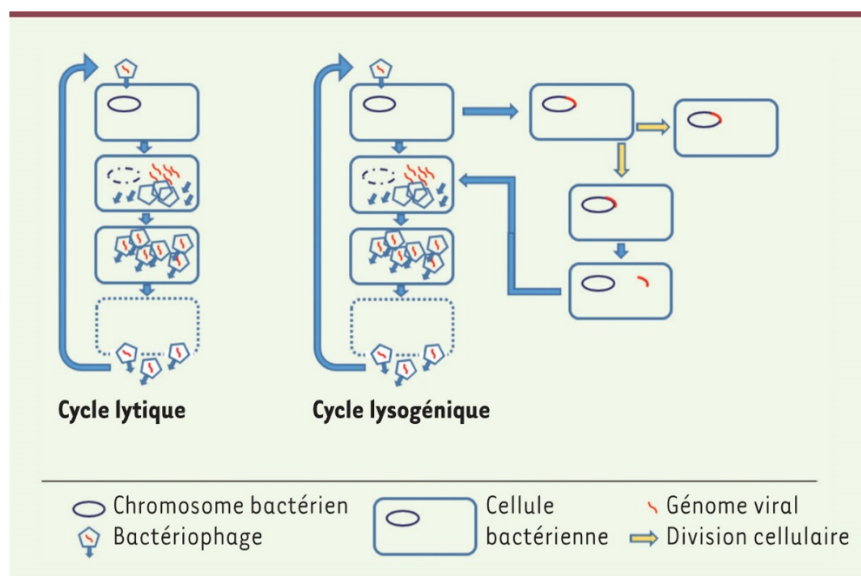


Figure 6 : Cycle lytique et lysogénique des phages virulents ou tempérés (Dufour and Debarbieux, 2017).

Aujourd'hui, de nombreuses stratégies alternatives aux antibiotiques se basent sur l'utilisation de phages. La plus connue étant probablement la phagothérapie.

3.2. La phagothérapie

Les phages sont des régulateurs naturels des populations bactériennes. Ils jouent par exemple un rôle dans l'établissement et le maintien de notre microbiome (Letarov and Kulikov,

2009). Leur activité antibactérienne naturelle a été découverte en 1915 par F.W. Twort (Twort, 1915) et en 1917 par Felix d'Hérelle (D'Herelle, 2007). Même si la paternité de leur découverte est discutée entre les deux chercheurs, F. d'Hérelle a été le premier à donner le nom de bactériophages à ces virus et à les utiliser en thérapeutique (Hérelle *et al.*, 2017).

La thérapie par les phages ou phagothérapie a longtemps été oubliée et inexploitée dans les pays occidentaux car les antibiotiques étaient efficaces sur presque toutes les infections. Aujourd'hui, avec l'augmentation de l'antibiorésistance, la phagothérapie revient sur le devant de la scène. Cette méthode utilise le pouvoir lytique des phages envers les bactéries. L'idée est de mettre en contact un phage lytique capable d'infecter la bactérie responsable de l'infection avec la zone de prolifération de celle-ci. Le phage pourra ainsi infecter la bactérie et la tuer. Il est également important de noter que la cinétique des médicaments phagiques augmente avec le temps, ce qui les distingue des autres médicaments. (Dufour and Debarbieux, 2017).

La spécificité étroite des phages limite cependant leur utilisation en thérapeutique humaine. Cet inconvénient peut être contourné en utilisant un cocktail de plusieurs phages ciblant plusieurs souches de la même espèce bactérienne. Le développement de tests de diagnostic de plus en plus performants et rapides pourra également jouer un rôle important dans le développement de la phagothérapie. Cependant, cet inconvénient est aussi un avantage car l'utilisation d'une thérapie ciblée permet de limiter le dérèglement du microbiome et l'apparition de dysbiose (Dufour and Debarbieux, 2017). Cependant, l'activité des bactériophages en tant qu'agents antibactériens peut être influencée par le système immunitaire du patient. En effet, celui-ci peut produire des anticorps spécifiques contre le bactériophage pouvant contribuer à son élimination rapide de l'organisme (Dabrowska *et al.*, 2005).

Les bactéries peuvent également devenir résistantes aux phages. Plusieurs mécanismes sont responsables de l'apparition de résistances et parmi les plus fréquents nous pouvons citer : i) l'inhibition de l'adsorption virale, ii) le blocage de l'injection de l'acide nucléique phagique, iii) la dégradation de l'acide nucléique phagique, iv) le « suicide » de l'hôte pour interrompre la propagation du phage dans la population bactérienne (*abortive infection*) (Dy *et al.*, 2014). Dans une étude, un cocktail de 9 phages a été utilisé afin de traiter un patient infecté par *Acinetobacter baumannii*. Ce traitement, combiné avec un antibiotique après quelques jours, a permis de sauver le patient qui était dans un état critique. Cependant, les auteurs ont relevé la présence de bactéries résistantes aux phages administrés au patient après quelques jours de traitement. Pour

le traitement de ce patient, cela n'a pas posé de problèmes majeurs car un nouveau phage efficace a été isolé et ajouté au traitement. De plus, la présence d'un antibiotique en complément de la phagothérapie limite le risque d'apparition de résistances combinées (Schooley *et al.*, 2017). Cependant cela souligne le fait que les bactéries résistantes aux phages sont naturellement sélectionnées lors d'un traitement par phagothérapie. C'est pourquoi il est important de mettre en place une réglementation et une surveillance adéquate afin d'éviter de reproduire les mêmes erreurs réalisées avec les antibiotiques dans le passé.

Les phages sont également capables d'évoluer afin de déjouer ces systèmes de résistance. Ils peuvent par exemple modifier les fibres de leur queue pour reconnaître de nouveaux récepteurs à la surface des cellules bactériennes, ou encore produire des protéines anti-CRISPR-Cas bloquant la dégradation de leur génome (Dy *et al.*, 2014; Maxwell, 2016). C'est pourquoi une méthode afin de sélectionner les phages les plus efficaces contre une souche bactérienne a été développée : le *phage training*. Cette méthode, initialement développée en 1921, consiste à faire évoluer les phages en contact avec les bactéries que l'on veut cibler. Ainsi les phages les plus performants seront naturellement sélectionnés (Rohde *et al.*, 2018).

Aujourd'hui de nombreux médicaments à bases de phages sont en cours de développement et d'essais cliniques. Pour l'instant leur utilisation thérapeutiques en France se limite aux traitements compassionnels. Cet usage permet l'utilisation de la thérapie phagique sans autorisation de mise sur le marché (AMM) et est réservée exclusivement aux malades en impasse thérapeutique, donc dans le cas de la phagothérapie, à des patients avec des infections graves sans possibilité de traitement par les antibiotiques. En France, une industrie pharmaceutique, Pherecydes Pharma, est spécialisée dans le développement de médicaments phagothérapeutiques (Pherecydes Pharma, 2023). Elle se concentre sur le développement de thérapie phagique contre *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*, trois bactéries pathogènes responsables de plus de 2/3 des infections nosocomiales résistantes aux antibiotiques. En 2022, un candidat médicament était en cours d'essais clinique dans le traitement des infections ostéoarticulaire sur prothèse à *S. aureus* et présentait des résultats prometteurs (Ferry *et al.*, 2020). D'autres essais cliniques devraient démarrer prochainement en 2023 dans le traitement des infections urinaires à *E. coli* et le traitement de pneumonies à *P. aeruginosa* (Pherecydes Pharma, 2023).

3.3. Les dépolymérase phagiques

Les phages possèdent également une autre propriété intéressante, ils peuvent posséder des dépolymérase capables de dégrader des composants spécifiques de la surface des cellules bactériennes, tels que les polysaccharides capsulaires ou les lipopolysaccharides. Ces enzymes, généralement situées à l'extrémité de la queue ou à l'intérieur de la capside phagique, jouent un rôle clé dans le processus d'infection par les phages en facilitant la pénétration du phage à travers la paroi cellulaire bactérienne. Il a été démontré que l'utilisation de dépolymérase en combinaison avec des bactériophages augmente l'efficacité de la phagothérapie, soulignant leurs importances dans la potentialisation du traitement phagothérapeutique (Hanlon *et al.*, 2001; Pires *et al.*, 2016).

Leurs utilités ne se limitent pas à la potentialisation des phagothérapies puisque les polysaccharides sont connus pour augmenter la protection de la bactérie face au système immunitaire de l'Homme, mais aussi pour jouer un rôle crucial dans la formation de biofilm bactérien. Les biofilms bactériens, sont des communautés multicellulaires bactériennes structurées, adhérant entre elles et sur une surface, protégées par un film protecteur composé d'exopolysaccharides (EPS). Cela leur confère une résistance accrue au système immunitaire de l'hôte, aux désinfectants de surfaces mais aussi aux traitements antibiotiques (Abdi-Ali *et al.*, 2006; Tremblay *et al.*, 2014). Certaines bactéries produisent également une capsule. Ces capsules, généralement composées de polysaccharides, enveloppent la paroi de la bactérie et la protège notamment du système immunitaire de l'hôte et de la phagocytose. Plusieurs dépolymérase phagiques sont connues pour dégrader les capsules bactériennes comme l'endosialidase E (endoE) qui dégrade les dérivés d'acide N-acétylneuraminique capsulaire des souches d'*E. coli* K1. Il a été montré que l'administration d'endoE dans des souris infectées par une souche d'*E. coli* K1, présentant une bactériémie, permettait d'écourter cette bactériémie et entraînait une augmentation de la phagocytose des bactéries *E. coli* K1 par les macrophages (Mushtaq *et al.*, 2005).

Néanmoins, la majorité des phages ne possèdent pas de dépolymérase. Cependant, il est possible de modifier génétiquement le phage afin qu'il produise une enzyme avec la même fonction. Par exemple, des chercheurs de l'université de Boston, aux Etats-Unis, ont modifié un phage afin qu'il exprime une enzyme dégradant le biofilm pendant l'infection. Cette enzyme, initialement produite par une bactérie à Gram négative, *Aggregatibacter*

actinomyces comitans, est capable d'hydrolyser le β -1,6-*N*-acetyl-d-glucosamine un composant essentielle pour la formation et stabilité du biofilm chez *E. coli*. Ils ont montré que ce phage modifié était plus efficace que le phage non modifié pour éliminer les biofilms formés par la bactérie *E. coli*, soulignant une nouvelle fois l'intérêt que peuvent avoir les dépolymérases dans les traitements antibactériens que ce soit dans le milieu médical ou industriel (Lu and Collins, 2007).

3.4. La délivrance d'agent antimicrobien ciblé

Comme nous l'avons vu précédemment, les phages peuvent réaliser deux types distincts de cycle réplcatif. Les phages lytiques induisent la mort de la bactérie, c'est pourquoi ils sont largement utilisés en phagothérapie. Les phages lysogéniques quant à eux, s'intègrent dans le génome de la bactérie sous la forme de prophage. Malgré tout, ce mécanisme peut également être utilisé à des fins bénéfiques. En effet, il est possible de modifier un phage afin qu'il code pour une protéine à action antibactérienne comme une toxine. Ainsi, après avoir infecté une bactérie, l'ADN contenu dans la capsid phagique est intégré dans l'ADN bactérien, celle-ci commence alors à produire la toxine et meure (Westwater *et al.*, 2003). Cette méthode utilise la sélectivité des phages envers certaines bactéries et leur capacité à transmettre une information génétique. Ainsi, seules les bactéries responsables de l'infection seront ciblées et cela participera à la diminution du dérèglement des microbiotes tout en limitant l'utilisation d'antibiotiques, limitant ainsi le risque d'apparition et de dissémination de gènes de résistances aux antibiotiques.

3.5. Le rôle des phages dans la vaccination

Les phages peuvent également se montrer utile dans la vaccination vis à vis des infections bactériennes. En effet, les phages ne sont pas toujours nocifs pour la bactérie, et de nombreux phages filamenteux tempérés de la famille des inovirus apportent un gain de virulence dans la bactérie qu'ils infectent. C'est par exemple le cas pour *Pseudomonas aeruginosa* qui voit sa virulence augmenter lorsqu'elle héberge le bactériophage Pf. En effet, des chercheurs de l'université de Stanford aux Etats-Unis ont remarqué que les infections des plaies chroniques chez l'Homme causées par *P. aeruginosa* étaient majoritairement provoquées par des souches de *P. aeruginosa* hébergeant le prophage Pf. D'un point de vue mécanistique, cela s'explique par une endocytose des phages Pf par les cellules immunitaires de l'Homme, conduisant à la

production de l'ARN de phage déclenchant une cascade de signalisation immunitaire s'achevant par l'inhibition de la production de facteur de nécrose tumorale (TNF) et à l'inhibition de la phagocytose, diminuant ainsi les défenses immunitaires de l'hôte. Pour finir, ils ont démontré que la vaccination contre ce phage Pf permettait une protection des infections des plaies par *P. aeruginosa* (Sweere *et al.*, 2019). De nombreuses autres bactéries pathogènes comme *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli* ou encore *Vibrio cholerae* hébergent des inovirus leur conférant un gain de virulence (Waldor and Mekalanos, 1996; Shapiro and Putonti, 2020). Il se pourrait qu'une vaccination contre ces phages protègent également de ces infections.

Les phages peuvent également se montrer utile pour l'administration de vaccin protéique et à ADN. En effet, les phages peuvent être modifiés afin qu'ils expriment à leur surface des peptides hétérologues. Pour cela, l'ADN codant ce peptide est fusionné avec l'un des gènes codant une protéine de l'enveloppe phagique. Ainsi, lors de la réplication, les phages recombinants exprimeront ces peptides sous la forme de protéine de fusion d'enveloppe à leur surface. Ce mécanisme découvert en 1985 est nommé « *phage display* » (Smith, 1985). Grâce à cette méthode, il est possible d'exprimer à la surface du phage des protéines antigéniques immunogènes spécifiques à une bactérie pathogène. Cette méthode de vaccination s'est montrée efficace chez la souris en permettant de stimuler les complexes majeures d'histocompatibilité I et II (CMH) activant ainsi la réponse cellulaire et humorale (Clark and March, 2004). L'intérêt de cette méthode, c'est que l'on pourrait potentiellement utiliser des épitopes protéiques toxiques ou instables, comme des toxines, ne pouvant pas être utilisés avec la vaccination par protéine recombinantes. De plus, certains phages sont remarquablement tolérants au pH acide gastrique, soulignant leur possible utilisation pour une vaccination par voie orale, plus accessibles dans les pays en voie de développement (Zuercher *et al.*, 2000).

Bien que les vaccins basés sur l'expression phagique d'une protéine antigénique soient très prometteurs, cette méthode présente plusieurs limites inhérentes à la technique, comme la difficulté de s'assurer que les épitopes conformationnellement actifs seront correctement affichés à la surface du phage. Une approche complémentaire, basée sur l'administration de vaccins à ADN par des particules phagiques peut remédier à cette déficience. En effet, ce principe repose sur la modification d'un ADN phagique afin qu'il contienne le gène codant pour l'antigène du vaccin sous le contrôle d'un promoteur eucaryote. Une fois le phage

administré, les cellules présentatrices d'antigènes de l'hôte vont l'endocyter et l'ADN phagique sera libéré dans le cytoplasme. Grâce au promoteur eucaryote, le gène vaccinal sera exprimé et traduit. La protéine antigénique ainsi formée sera reconnue comme étant étrangère, déclenchant la réponse immunitaire du CMH I conduisant à l'externalisation de la protéine antigénique. Celle-ci sera reconnue par les lymphocytes T cytotoxiques de la réponse immunitaire cellulaire (Clark and March, 2004)

4. Les peptides antimicrobiens :

Les peptides antimicrobiens sont présents chez presque toutes les formes de vie dont les plantes, les animaux, les microorganismes et les humains. Ils font partie intégrante de l'immunité innée et jouent un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les infections bactériennes, virales, fongiques et parasitaires (Jenssen *et al.*, 2006).

Ce sont des peptides courts de 12 à 100 acides aminés, généralement avec une charge globale positive (+2 à +9) et amphipathique. C'est-à-dire qu'ils possèdent une partie hydrophile mais aussi une partie hydrophobe importante (> 30 %). Ces propriétés permettent aux peptides de s'organiser selon une structure amphiphile en 3 dimensions selon 4 grands groupes structuraux : les peptides α hélicoïdaux, les peptides en feuillet β avec des ponts disulfures, les peptides étendus et les peptides en boucle ou épingle leur permettant d'interagir avec les membranes cellulaires microbiennes et de les perturber (Hancock and Sahl, 2006).

Les peptides antimicrobiens possèdent une double action. En effet, bien qu'ils possèdent une action antimicrobienne, antifongique ou antivirale, ils sont également capables de moduler l'immunité de l'hôte.

4.1. Action antimicrobienne

L'activité antimicrobienne des peptides antimicrobiens (PAM) a été découverte par A. Fleming en 1922. Le premier peptide antimicrobien a été observé dans des sécrétions nasales d'un patient atteint de coryza, une maladie d'origine virale conduisant à une rhinorrhée aqueuse importante, lorsque Fleming remarque que le mucus nasal produit par le patient avait une activité lytique envers certaines bactéries. Il appelle alors cette substance « lysozyme » (Fleming and Wright, 1997).

Déjà en 1998, leur utilité dans le traitement des bactéries résistantes aux antibiotiques est soulignée (Hancock and Lehrer, 1998). Cependant, ils restent très peu utilisés en clinique aujourd'hui et les polymyxines dont fait partie la colistine, sont les seuls peptides antimicrobiens utilisés en thérapeutique humaine, même si de nombreux autres peptides antimicrobiens sont en cours de développement et d'essais cliniques (Hargraves *et al.*, 2020).

Les PAM ont des mécanismes d'action très variés et leurs activités dépendent de leurs structures et séquences en acides aminés. D'une manière générale leurs charges globalement positives ainsi que leur structure amphipathique leur permet de lier les membranes microbiennes chargées négativement et de les perturber en créant des pores ou en se liant aux lipides membranaires, certains sont également capables de perturber les transporteurs transmembranaires, conduisant ainsi à la lyse de la cellule. Mais ils peuvent également avoir une action intracellulaire. En effet certains PAMs sont capables de traverser les membranes bactériennes soit par translocation intracellulaire soit grâce aux pores qu'ils ont formé dans la membrane. Une fois dans le cytoplasme bactérien, les PAM peuvent inhiber la fonction de nombreux mécanismes cellulaires essentiels comme la synthèse d'ADN, d'ARN ou protéiques, le repliement des protéines ou encore la synthèse de la membrane et paroi cellulaire (Jenssen *et al.*, 2006; Sierra *et al.*, 2017). Le mécanisme d'action précis de tous ces peptides n'est pas encore connu mais certains peptides semblent déjà prometteurs dans la lutte contre l'antibiorésistance.

Nous pouvons par exemple citer la mersacidine qui s'est révélée efficace contre les infections à SARM dans un modèle murin (Kruszewska *et al.*, 2004) ou encore la nicine (un lantibiotique produit par *Lactococcus lactis*) utilisée depuis 50 ans en tant que conservateur antimicrobien dans l'industrie agroalimentaire sans qu'il y ait de développement de bactéries résistantes (Jenssen *et al.*, 2006). Il est également intéressant de noter l'existence de peptides antimicrobiens produits par les bactéries qui possèdent une activité antimicrobienne plus spécifique que les peptides antimicrobiens produits par les mammifères. Cette spécificité en fait des candidats médicaments intéressant permettant de limiter à la fois les dysbioses causées par les molécules à larges spectres d'activité et de diminuer le risque d'apparition et de propagation de mécanismes de résistances.

D'une manière générale, les peptides antimicrobiens possèdent plusieurs avantages. Certains PAM, notamment ceux produit par les mammifères, ont un spectre d'activité large

permettant à une seule et unique molécule d'être active sur plusieurs microorganismes pathogènes. De plus, ils agissent très rapidement et à de très faibles concentrations. Ils possèdent également une activité anti-inflammatoire et contre les biofilms, mais aussi une synergie avec les antibiotiques lors d'une co-administration. En effet, les PAM par leur mécanisme d'action, vont endommager la membrane bactérienne, augmentant ainsi sa perméabilité, facilitant la pénétration et l'accumulation des antibiotiques dans le cytoplasme bactérien (Rios *et al.*, 2016).

Cependant, ils sont sensibles aux protéases, aux variations de pH, pouvant rendre difficile leur administration et peuvent être cytotoxiques s'ils sont administrés à trop forte dose (Rios *et al.*, 2016).

4.2. Moduler l'immunité de l'hôte

Certains peptides antimicrobiens possèdent à la fois une activité antimicrobienne et une activité immunomodulatrice. En fonction de leur mode de sécrétion, ils peuvent être divisés en 2 groupes distincts : les inductibles et les constitutifs.

Lorsqu'une lésion tissulaire laisse pénétrer des pathogènes, ceux-ci expriment des PAMP (*pathogen associated molecular pattern*) qui sont reconnus par les PRR (*pattern recognition receptor*) présents à la surface des cellules de l'immunité innée comme les polynucléaires, les macrophages ou les cellules NK. Ces cellules de l'immunité innée vont en réponse libérer des peptides antimicrobiens (Hözl *et al.*, 2008). Ces peptides antimicrobiens sont dits « inductibles ». Dans cette catégorie nous pouvons retrouver les défensines qui, en plus d'une activité antimicrobienne, possèdent une activité immunomodulatrice. En effet, les défensines neutrophiles humaines HNP1 et HNP2 possèdent des effets chimiotactiques envers les monocytes et les lymphocytes T (Territo *et al.*, 1989; Chertov *et al.*, 1996). Une autre défensine nommée mDFβ2 est capable de stimuler les cellules dendritiques immatures, ce qui conduit à la libération de cytokines comme le TNF-α, IL-1 ou IL-12 (Biragyn *et al.*, 2002). D'autres PAM comme le LL-37 sont capables d'induire la production de ROS (dérivés réactifs de l'oxygène) et même la libération d'autres peptides antimicrobiens présents dans les cellules de l'immunité innée (Zheng *et al.*, 2007).

Certains peptides antimicrobiens sont exprimés de manière constitutive dans un tissu donné. Ils jouent un rôle dans l'immunité innée grâce à leurs propriétés antimicrobiennes mais aussi

en stimulant le système immunitaire de l'hôte. Nous pouvons prendre l'exemple des protéines SPA et SPD présentes dans le surfactant pulmonaire. Elles sont capables de chimiotactisme envers les cellules de l'immunité, d'induire la sécrétion de cytokines et de ROS, et de stimuler la phagocytose (Hözl *et al.*, 2008).

En thérapeutique humaine, nous pourrions utiliser ces peptides en synergie avec une autre méthode de traitement afin de stimuler le système immunitaire de l'hôte. Certains peptides sont également connus pour neutraliser les endotoxines lipopolysaccharidiques produites par les bactéries Gram négatives et pour accélérer le processus de cicatrisation (Rios *et al.*, 2016).

5. Molécules agissant en synergie avec les antibiotiques :

5.1. Les β -lactamases

Lors d'un traitement antibiotique par voie parentérale, certains antibiotiques comme l'ampicilline sont excrétés dans l'intestin du patient. L'antibiotique encore fonctionnel agit alors sur le microbiote intestinal et cela conduit à des dérèglements de celui-ci. Comme nous l'avons vu précédemment, cette pression antibiotique sur le microbiote conduit naturellement à la sélection de souches résistantes aux antibiotiques et à des dysbioses. Ces dysbioses peuvent conduire à des infections opportunistes causées par *Clostridium difficile* (Sullivan *et al.*, 2001). Dans le cas d'un traitement par voie parentérale, les effets des antibiotiques dans le système digestif du patient ne sont pas voulus, ce sont des effets indésirables. Il faudrait donc empêcher l'action des antibiotiques sur le microbiote intestinal.

Pour cela, nous pouvons utiliser les β -lactamases, des enzymes capables d'inactiver les antibiotiques de la famille des β -lactamines comme l'ampicilline. Il a été montré qu'une administration de β -lactamases par voie orale lors d'un traitement par ampicilline ou pipéracilline par voie parentérale, prévenait l'apparition de résistance à ces antibiotiques (Harmoinen *et al.*, 2004; Tarkkanen *et al.*, 2009). De plus, il a été montré dans un modèle murin que cette administration conjointe diminuait la colonisation par des pathogènes nosocomiaux comme les Entérocoques résistants à la vancomycine (ERV) ou les *Klebsiella pneumoniae* productrice de β -lactamases à spectre étendue (Harmoinen *et al.*, 2004), mais aussi pour prévenir la prolifération opportuniste de *Clostridium difficile*, diminuant ainsi les risques d'infection (Stiefel *et al.*, 2008).

5.2. Les nanoparticules

Les nanoparticules (NPs) sont de petites particules de l'ordre du nanomètre ayant une activité antibactérienne à large spectre aussi bien sur les bactéries Gram négatives que sur les bactéries Gram positives.

Leur mécanisme d'action n'est pas encore totalement élucidé, mais il semblerait que l'action antimicrobienne des NPs provienne de leur capacité à perturber la membrane cellulaire bactérienne, à générer des ROS et à dérégler le fonctionnement intracellulaire en se liant à l'ADN, au ribosome ou à diverses enzymes (Wang *et al.*, 2017). Cependant, le système immunitaire peut reconnaître les NPs comme étant des corps étrangers et les phagocyter, ce qui conduirait à leurs destructions. Il est donc important de rendre les NPs furtives pour le système immunitaire de l'hôte. Cette furtivité peut être acquise en greffant sur le cœur de la NP des polymères linéaires comme le polyéthylène glycol (PEG).

Même si les NPs peuvent être utilisées seules, leur faible indice thérapeutique réduit leur usage thérapeutique en tant qu'agent antimicrobien. En effet, aux doses thérapeutiques, les NPs peuvent également agir sur les cellules eucaryotes (Gupta *et al.*, 2019). Cependant, il est possible de modifier la surface de ces NPs afin d'améliorer leur sélectivité envers les cellules bactériennes. Une équipe a notamment développé des nanoparticules d'or coiffées de molécules plus ou moins hydrophobes. Ils ont montré que celles-ci possédaient une activité antibactérienne sur des souches multi-résistantes aux antibiotiques à faible concentration. Cela augmente ainsi l'indice thérapeutique et diminue la toxicité des NPs sur les cellules eucaryotes de l'hôte (Li *et al.*, 2014).

Mais une des propriétés intéressantes des NPs est leur capacité à potentialiser l'action des antibiotiques. En effet, utilisées en synergie, elles permettent de réduire la CMI des antibiotiques et même de rendre à nouveau sensibles des souches auparavant résistantes. Par exemple, une administration concomitante de NP d'oxyde de cuivre et d'amoxicilline permet de resensibiliser des bactéries *S. aureus*, initialement résistantes, aux β -lactamines (Arul Selvaraj *et al.*, 2019). Cette synergie entre les NPs et les antibiotiques a également été observée avec d'autres antibiotiques comme les aminoglycosides ou les fluoroquinolones (Gupta *et al.*, 2017; Dove *et al.*, 2023). Le mécanisme d'action de cette synergie n'est pas encore totalement élucidé mais les NPs pourraient inhiber des mécanismes de résistances aux antibiotiques comme

les pompes d'efflux membranaire extrudant de nombreux antibiotiques ou les β -lactamases produites par certaines bactéries (Gupta *et al.*, 2019; Arul Selvaraj *et al.*, 2019).

6. Les véhicules de transport d'antibiotiques :

6.1. Les nanoparticules

Bien que les NPs puissent être utilisées seules ou en synergie avec des antibiotiques, elles peuvent également servir de véhicules de transport d'antibiotiques. En effet les NPs peuvent généralement incorporer aussi bien des molécules lipophiles qu'hydrophiles, ainsi que d'autres molécules permettant de les stabiliser ou de les rendre fonctionnelle comme des lipides, carbohydrates ou protéines. Ainsi les NPs permettent d'améliorer la solubilité de drogues peu soluble mais aussi de les protéger de la dégradation. Par exemple certains composés phytochimiques possèdent une activité antibactérienne à large spectre y compris contre les souches multi-résistantes aux antibiotiques. Malheureusement la faible solubilité de ces composé hydrophobes dans les milieux aqueux limitent leurs utilisations cliniques. Une étude a cependant montré que des nanoparticules de poly(oxanorborneneimide) chargées de carvacrol, un composé phytochimique possédant entre autres une activité antimicrobienne, étaient efficaces dans l'éradication de bactérie MDR. (Landis *et al.*, 2018).

De plus, les NPs peuvent être modifiées afin de contrôler leurs biodistributions, permettant une certaine sélectivité envers certains organes ou tissus cellulaires. Ces caractéristiques permettent une libération contrôlée du médicament chargé sur la NP, ce qui permet de réduire la dose et la fréquence d'administration (Costa-Gouveia *et al.*, 2017).

C'est pourquoi en 2014, le projet européen NAREB (*Nanotherapeutics for antibiotic resistant emergent bacterial pathogens*) est lancé (NAREB, 2020). Ce projet de grande envergure avait pour but de développer et d'étudier l'efficacité et la sécurité de nanomédicaments composés de NPs couplées à des antibiotiques afin de traiter les infections à SARM et les tuberculoses résistantes aux antibiotiques. Malheureusement, pour toutes les formulations testées, aucun avantage clair à utiliser ces nanomédicaments n'a été identifié. Cependant, ces nanomédicaments pourraient apporter un avantage dans le traitement au long cours de la tuberculose en diminuant la toxicité du traitement antibiotique (CORDIS, 2019). En effet, une étude a montré que des NPs de polymère de poly(acide lactique-co-glycolique) (PLGA) chargé de rifampicine, isoniazide, pyrazinamide et éthambutol permettaient de

maintenir des doses actives d'antibiotiques pendant 4-5 jours dans le plasma et jusqu'à 7-9 jours dans les organes. Ainsi, 3 doses orales administrées tous les 10 jours étaient suffisantes et aussi efficaces pour éliminer l'infection tuberculeuse chez les souris que 28 doses quotidiennes de médicament libre (Pandey *et al.*, 2006). Cette formulation, qui permet à la fois de réduire les doses de médicaments administrés et donc les effets indésirables ainsi que le nombre de doses nécessaire au traitement, pourrait améliorer l'observance des patients aux traitements antituberculeux.

De plus, une autre étude étudiant les VRE a montré qu'utiliser une NP d'or conjuguée à des molécules de vancomycine, permettait d'améliorer la sensibilité de la bactérie à la vancomycine. En effet la CMI de la vancomycine seule était de 64 ou 128 µg/mL selon les souches et, conjuguée avec une NP, celle-ci pouvait être divisée jusqu'à 60 fois (Gu *et al.*, 2003).

Les NP conjuguées peuvent également s'avérer utiles afin de traiter les infections à pathogènes intracellulaires. En effet, certaines bactéries sont capables de résider à l'intérieur des cellules eucaryotes, ce qui leur permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte mais aussi aux antibiotiques. Les NPs ayant une capacité de pénétration de la membrane plasmique importante, les coupler avec des antibiotiques peut permettre le traitement de certaines infections bactériennes intracellulaires. Une étude montre que des NPs conjuguées avec des molécules de tétracycline étaient six fois plus efficaces que la tétracycline seule afin d'éliminer les *S. aureus* intracellulaires (Maya *et al.*, 2012). D'autres bactéries peuvent posséder une membrane cytoplasmique à perméabilité réduite, pouvant rendre certains antibiotiques inefficaces. C'est par exemple le cas de certaines souches de *P. aeruginosa* qui sont insensibles aux aminosides. Certaines NPs comme les liposomes peuvent facilement fusionner avec la membrane plasmique des bactéries étant donné leur composition semblable à la bicouche lipidique composant la membrane plasmique bactérienne. Coupler ces NPs avec un agent antibactérien peut ainsi permettre de faciliter le passage de l'agent antibactérien à l'intérieur de la bactérie et ainsi la rendre sensible à l'antibiotique (Mugabe *et al.*, 2006).

6.2. Les conjugués anticorps-médicaments

Les ADC (*Antibodies Drug Conjugate*) sont composés d'un anticorps auquel est liée une (ou plusieurs) molécule(s) active(s). Cette formulation permet de cibler spécifiquement une

cellule grâce à l'anticorps et de la détruire à l'aide de la molécule active. Dans le traitement des infections, l'intérêt réside dans le fait que l'anticorps cible un pathogène spécifique. Cela empêche l'action non spécifique des antibiotiques sur le microbiome.

Le DSTA4637S est un ADC composé d'un anticorps ciblant un composant de la paroi cellulaire de *S. aureus* et d'un antibiotique de la famille de la rifamycine. Une fois la bactérie opsonisée par l'ADC, le fragment Fc de l'anticorps est reconnu par des cellules phagocytaires et la bactérie est phagocytée. Une fois dans le phagolysosome, le linker permettant l'accroche de l'antibiotique sur l'anticorps est lysé. Cela conduit à la libération de l'antibiotique et à la destruction de la bactérie. Dans le cas des infections à *S. aureus*, cette formulation permet de limiter la survie intracellulaire de la bactérie. En effet en temps normal, lors d'une infection intraveineuse à *S. aureus*, les bactéries sont rapidement phagocytées par les polynucléaires neutrophiles (PNNs) et les macrophages, et même si la majorité des bactéries sont éliminées par ces cellules, certaines bactéries sont capables de survivre à l'intérieur de cellule phagocytaire. Les bactéries vont ensuite être disséminées à distance du site initial de l'infection par ces mêmes cellules phagocytaires (Thwaites and Gant, 2011). Une fois dans les tissus, *S. aureus* pourra envahir divers types de cellules non phagocytaires et causer des infections chroniques telle que des ostéomyélites ou des endocardites (Que *et al.*, 2005; Bosse *et al.*, 2005). Ces infections intracellulaires sont très difficiles à traiter car la bactérie est protégée de l'action des antibiotiques (Sandberg *et al.*, 2009). Les auteurs ont montré que l'efficacité de cet ADC est supérieure à la vancomycine seule dans le traitement des bactériémies à *S. aureus* en permettant d'éliminer de manière efficace les staphylocoques intracellulaires (Lehar *et al.*, 2015).

7. Stratégies basées sur la conjugaison :

La conjugaison est l'un des grands mécanismes de transfert horizontal de gènes (HGT). De nombreux plasmides et d'éléments génétiques mobile (MGE) utilisent ce mécanisme pour se disséminer dans une population bactérienne. Comme nous l'avons souligné précédemment, les gènes de résistances aux antibiotiques utilisent ce mécanisme pour atteindre de nombreuses bactéries pathogènes. Mais, il est possible de tourner ce processus cellulaire à notre avantage et de l'utiliser afin de disséminer des antimicrobiens au sein de population bactérienne complexe comme les microbiotes. Cette idée a initialement été proposée en 2008 par Filutowicz et ses

collègues mais, ce n'est que six ans plus tard que sont apparus les premiers exemples expérimentaux validant les idées avancées dans cet article (Filutowicz *et al.*, 2008).

7.1. Efficacité de la conjugaison

La première étude utilisant la conjugaison comme méthode de délivrance a été publiée en 2014. Dans celle-ci, les auteurs ont utilisé soit des particules de phage, soit un plasmide mobilisable à large gamme d'hôtes pour délivrer un système CRISPR-Cas dirigé contre deux déterminants génétiques impliqués dans la résistance aux antibiotiques (*bla_{SHV-18}* ou *bla_{NDM-1}*). Malgré une réduction du nombre de cellules contenant les gènes ciblés, le système conjugatif proposé ici s'est révélé d'une efficacité limitée. En effet, en l'absence de sélection des transconjugants et dans des expériences de conjugaison en milieu solide où le rapport donneur-receveur était de d'environ 300:1, le nombre de bactéries contenant les gènes ciblés n'a été divisé que de 40 à 60 fois. Dans la suite de l'article, les auteurs eux-mêmes déclarent que "des travaux futurs seront nécessaires pour optimiser davantage l'efficacité des vecteurs basés sur la conjugaison" (Citorik *et al.*, 2014). Quelques mois plus tard, une autre publication décrivait un outil basé sur une plateforme mobilisable pour la délivrance d'un système d'interférence CRISPR (CRISPRi) comme preuve de concept pour le contrôle de l'expression des gènes. Dans cette étude, des limitations similaires ont été observées concernant l'efficacité du transfert conjugatif (0,44 % de transfert de plasmide dans une expérience avec un ratio donneur-receveur de 1:1) (Ji *et al.*, 2014).

Ce problème, qui aurait pu écarter complètement la conjugaison comme outil pour la délivrance d'antimicrobien en raison de sa faible efficacité par rapport à d'autres méthodes de livraison telles que les phages, a été surmonté par Hamilton et ses collaborateurs. Dans une étude publiée en 2019, ils ont évalué le transfert de deux plasmides, l'un mobilisable et l'autre conjugatif, dans un modèle à deux espèces. Ils ont montré que dans des conditions de contact accru entre les cellules, le transfert du plasmide conjugatif était élevé et avoisinait les 100 % (Hamilton *et al.*, 2019).

Sur la base de ces résultats, d'autres études ont suivi et utilisé des plasmides conjugatifs pour la délivrance de cargaisons génétiques (Dong *et al.*, 2019; Sünderhauf *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2019) et certaines se sont même attachées à concevoir des stratégies pour augmenter la capacité de conjugaison des plasmides naturels (Neil *et al.*, 2020). Cependant, malgré leurs performances, des difficultés sont associées à la manipulation de grands plasmides,

ce qui a conduit à la recherche d'approches alternatives. Plusieurs articles successifs ont abordé la question du transfert limité en utilisant des vecteurs mobilisables en co-résidence avec des plasmides conjugatifs (Ruotsalainen *et al.*, 2019; Wongpayak *et al.*, 2021). La logique sous-jacente est que, contrairement aux configurations initiales où les gènes codant pour la machinerie conjugative étaient intégrés dans le chromosome des cellules donneuses, les bactéries recevant les deux plasmides deviendront de potentielles donneuses, ce qui aura pour conséquence d'augmenter le nombre de transmetteurs de plasmides au sein de la population. Cette stratégie en *trans* permet de travailler avec de petits plasmides faciles à manipuler et, en même temps, d'obtenir de bons taux de transfert, mais elle présente certains inconvénients par rapport à l'approche "un seul plasmide". Parmi les exemples pertinents, on peut citer l'augmentation potentielle du coût d'adaptation pour l'hôte et la nécessité de coordonner précisément tous les éléments pour optimiser les performances du système et éviter une propagation préférentielle du plasmide conjugatif au détriment d'un transfert plus atténué de l'élément mobilisable.

La transférabilité des plasmides dépend non seulement des plasmides utilisés, mais aussi d'autres aspects tels que les conditions environnementales, le pool génétique du microbiome, la proportion de la bactérie cible dans la population ainsi que l'identité de la bactérie donneuse (Garcillán-Barcia and de la Cruz, 2008; Virolle *et al.*, 2020; Heß *et al.*, 2021). Lorsque l'on travaille *in situ*, les possibilités d'agir sur les trois premières sont limitées. Cependant, la description récente d'un large éventail de systèmes anti-défense codés dans la région principale des plasmides (Samuel and Burstein, 2023) et l'introduction de nano-anticorps (*nanobodies* en anglais) pour diriger le processus de conjugaison ont ouvert la possibilité d'atténuer les effets négatifs associés aux facteurs susmentionnés (Robledo *et al.*, 2022). Dans le premier cas, l'incorporation de systèmes anti-défense dans de nouveaux vecteurs permet de contourner certaines barrières à la modification génétique, ce qui élargit virtuellement la gamme de micro-organismes modifiables. Quant à l'utilisation de systèmes d'adhésion synthétiques, il a été démontré que leur utilisation *in vitro* améliorait les taux de conjugaison même dans des conditions où les bactéries cibles étaient présentes à faible fréquence. Il convient de noter qu'elle a également permis de surmonter partiellement les mécanismes d'exclusion de l'entrée des plasmides. Bien que certains points, tel que le comportement *in situ*, la dynamique d'association-découplage donneur-récepteur et l'effet de la production de *nanobodies* sur

l'aptitude bactérienne doivent être explorés plus en détail, la technologie semble prometteuse et il est certainement utile de poursuivre les recherches dans cette direction.

7.2. La conjugaison pour éliminer les pathogènes

7.2.1. Stratégies basées sur CRISPR

Les systèmes CRISPR-Cas sont des mécanismes d'immunité acquise chez les archées et les bactéries. Les loci CRISPR consistent en plusieurs répétitions directes non contiguës séparées par des tronçons de séquences variables appelés espaceurs (ou *spacers* en anglais), qui correspondent à des segments d'éléments génétiques étrangers, tels que des virus ou des plasmides. Les gènes *cas* codent pour un large éventail de protéines impliquées dans les différentes étapes de l'activité CRISPR. Les domaines fonctionnels identifiés dans les protéines Cas comprennent des endonucléases, des exonucléases, des hélicases et des domaines de liaison à l'ARN et à l'ADN. Ces protéines effectrices exercent leur action sur les MGE qui partagent la séquence des *spacers* (Sorek *et al.*, 2008; Horvath and Barrangou, 2010). En raison de leur capacité à agir sur des séquences spécifiques d'acides nucléiques, les systèmes CRISPR-Cas ont été largement utilisés pour l'édition du génome et le développement d'outils génétiques polyvalents, tels que le développement d'antimicrobiens.

De même que les travaux de Citorik *et al.* mentionnés ci-dessus, d'autres études ont également placé des systèmes CRISPR-Cas sur des plateformes conjuguées dans le but d'éliminer les gènes de résistances aux antibiotiques (ARG) du pool génétique d'une population microbienne donnée (Ruotsalainen *et al.*, 2019; Dong *et al.*, 2019; Rodrigues *et al.*, 2019; Neil *et al.*, 2020; Wongpayak *et al.*, 2021; Reuter *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2022). Cet objectif peut être atteint soit en supprimant les éléments épisomiques dans lesquels se trouvent les gènes cibles, ce qui génère des cellules sans plasmide sensibles aux antibiotiques, soit par l'élimination du micro-organisme si les gènes se trouvent dans le chromosome bactérien. L'élimination de ces réservoirs empêche les bactéries pathogènes de les exploiter pour acquérir des déterminants de résistance qui leur permettent de proliférer avec succès même en présence d'antibiotiques. De plus, avec cette stratégie, lorsque les plasmides portant les modules CRISPR-Cas se répandent dans la population, ils immunisent les micro-organismes dans lesquels ils entrent, les empêchant d'acquérir des traits qui correspondent aux *spacers* inclus dans le système CRISPR. Parmi les études comprises dans ce groupe, nous allons en décrire un qui a exploité le mécanisme de dissémination particulier des plasmides sensibles aux phéromones (PRP) d'*Enterococcus*

faecalis pour éliminer les ARG de ce groupe taxonomique (Rodrigues *et al.*, 2019) car, bien qu'elles varient dans leurs spécificités, le raisonnement globale est partagé. *E. faecalis* est un pathobionte qui peut proliférer et provoquer des infections lors d'épisodes de dysbiose, qui, dans le cas d'*E. faecalis* multirésistants, présentent un risque accru pour la santé de l'hôte. Les PRP ont une gamme d'hôtes étroite, limitée à *E. faecalis*, mais ils présentent une efficacité de transfert et un maintien élevé même en l'absence de pression de sélection. Ces plasmides sont transférés en réponse à une phéromone produite par les cellules d'*E. faecalis* exemptes de plasmides au sein de la population et assurent leur propagation et leur maintien par la production d'une bactériocine qui tue les bactéries qui ne parviennent pas à acquérir le plasmide. Dans cet article, Rodrigues et ses collègues ont modifié un PRP d'*E. faecalis* en introduisant un système CRISPR-Cas9 dirigé contre deux déterminants de la résistance aux antibiotiques *ermB* et *tetM*, conférant une résistance à l'érythromycine et à la tétracycline respectivement. Ce système permet le transfert et l'élimination spécifiques d'*E. faecalis* multirésistants de l'intestin tout en générant une immunité contre l'acquisition d'autres éléments génétiques mobiles portant ces ARG.

Outre les approches susmentionnées qui visent à réduire l'incidence des ARG au sein des populations microbiennes, il existe deux autres initiatives dignes de mention qui ont utilisé CRISPR pour éliminer des agents pathogènes (Hamilton *et al.*, 2019; Song *et al.*, 2022). La principale différence entre ces deux approches est la protéine effectrice utilisée pour induire la mort bactérienne. Alors que dans le premier article, les auteurs ont utilisé la protéine Cas9 pour cibler un ou plusieurs emplacements chromosomiques (Hamilton *et al.*, 2019), dans la seconde étude, ils ont mis en œuvre une stratégie basée sur la protéine Cas13a, une ARNase qui exerce son activité, après reconnaissance de transcrits spécifiques (Song *et al.*, 2022).

7.2.2. Expression de modules toxiques

Les systèmes basés sur CRISPR-Cas, ne sont pas les seules options pour l'élimination des constituants indésirables du microbiote. Il est par exemple possible d'exprimer un module toxique dans la bactérie pathogène. Collins et ses collaborateurs transfèrent des peptides synthétiques d'agrégation antibactérienne ou OpaL (abréviation de *overexpressed protein aggregator lipophilic*) grâce à des vecteurs mobilisables transférés via la machinerie d'un plasmide conjugatif intégré au chromosome de la bactérie donneuse. Ces molécules sont capables de modifier l'homéostasie bactérienne, par interaction et co-agrégation avec les

protéines cellulaires en raison de leur nature extrêmement hydrophobe. L'attrait de cette approche réside dans l'absence de spécificité du mécanisme d'action ; ces peptides OpaL n'agissent pas sur des cibles spécifiques mais modifient l'homéostasie en interférant avec de multiples processus bactériens, ce qui rend moins probable le développement d'une résistance à leur encontre. Cependant, bien que séduisante dans le sens où la probabilité d'apparition d'une résistance est faible, d'autres études sont nécessaires pour aborder sa performance dans un contexte plus large, en utilisant des promoteurs natifs et des bactéries « naturelles » comme receveurs/donneurs (Collins *et al.*, 2019).

Plus tard, en 2019, des travaux de l'unité Plasticité du Génome Bactérien, dans laquelle je réalise ma thèse de science, ont démontré que les modules génétiques basés sur des systèmes toxine-intéine délivrés par conjugaison sont des agents antimicrobiens très efficaces, capables de tuer sélectivement *Vibrio cholerae* et/ou ses dérivés résistants aux antibiotiques dans des populations mixtes (López-Igual *et al.*, 2019). Le système tueur conçu par López-Igual et ses collègues est composé d'un plasmide modifié qui code à la fois une toxine (CcdB, un inhibiteur de la gyrase), interrompue par une intéine pour mieux contrôler son expression, et son antitoxine (CcdA). Ce système exprime spécifiquement la toxine CcdB à partir d'un promoteur piloté par un activateur transcriptionnel (ToxR) contrôlant l'expression de la virulence chez *V. cholerae*. La production de l'antitoxine, en revanche, est entravée par SetR, un répresseur transcriptionnel associé à l'élément conjugatif intégratif (ICE) STX, principal élément génétique impliqué dans la multirésistance aux antibiotiques chez *V. cholerae*. Le système tueur est intégré dans un plasmide mobilisable qui se dissémine en utilisant la machinerie conjugative du plasmide conjugatif RP4/RK2 intégré au chromosome d'une cellule donneuse *E. coli*.

Ainsi il existe plusieurs cas de figure :

- Le plasmide est transféré à une bactérie non-*V. cholerae* : le module toxine-intéine n'est pas exprimé en l'absence du facteur de transcription ToxR. Et l'antitoxine CcdA est exprimé.
- Le plasmide est transféré à une bactérie *V. cholerae* ne possédant pas l'ICE SXT : La présence du facteur de transcription ToxR conduit à l'expression module toxine-intéine. Après excision de l'intéine, une toxine CcdB active est produite. En l'absence du répresseur transcriptionnel SetR, l'antitoxine est produite, protégeant ainsi la bactérie de l'effet de la toxine.

- Le plasmide est transféré à une bactérie *V. cholerae* avec l'ICE SXT : La présence simultanée de ToxR et SetR conduit à une expression du module toxine-intéine et à une répression de l'antitoxine, conduisant à la mort de la cellule après excision de l'intéine.

Afin de confirmer l'efficacité du système, une expérience de conjugaison avec 3 partenaires a été réalisée (**figure 7**). La cellule donneuse (*E. coli*) contenait soit un plasmide contrôle non toxique (pN_{ctrl}) ou le plasmide tueur (pFW). Une population composée de deux souches de *V. cholerae* de sérotypes différents représente les receveuses potentielles. La souche O139 est une souche contenant l'ICE SXT, elle possède également le gène lacZ permettant une coloration bleue de la colonie sur gélose Xgal. Tandis que la souche O1, ne possèdent ni l'ICE SXT ni le gène lacZ, ainsi la colonie apparaît blanche sur gélose Xgal. Aucun transconjugant O139 n'a été observé avec le plasmide tueur, prouvant que la présence de ce plasmide dans la souche O139 contenant ToxR et SetR est létale.

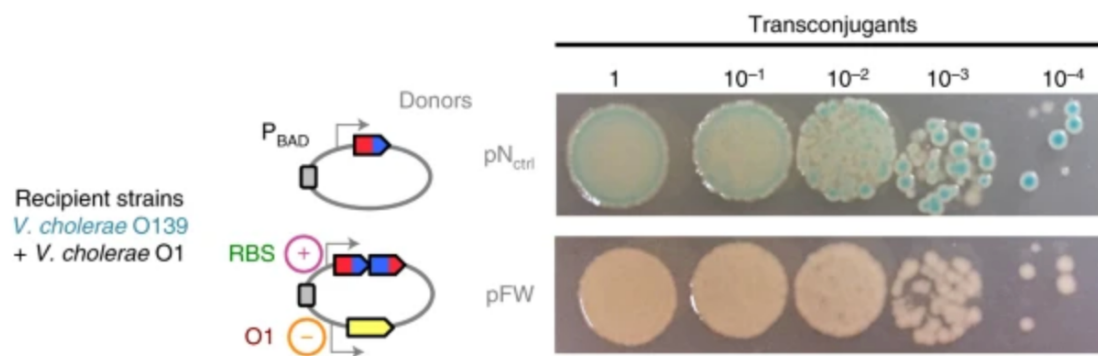


Figure 7 : Illustration du fonctionnement du plasmide tueur développé par López-Igual et al (López-Igual et al., 2019).

En plus des expériences *in vivo*, la performance du système a été testée, *in situ*, à la fois dans des larves de poisson zèbre et de crustacés. Elles ont montré un très faible niveau de mutants d'échappement prouvant que la résistance est moins susceptible d'être développée si on la compare à d'autres stratégies telles que les outils basés sur CRISPR. Par conséquent, bien que certains défis liés aux fréquences de conjugaison aient été soulignés et doivent être améliorés, cette stratégie de destruction ciblée des bactéries pathogènes sans affecter le reste du microbiote bénéfique est prometteuse pour limiter, d'un seul coup, les dysbioses et le développement de la résistance aux antimicrobiens (López-Igual *et al.*, 2019).

C'est dans ce contexte que s'inscrit le projet sur lequel je travaille pendant ma thèse de science et que je vous présente dans la suite de ce manuscrit.

DESCRIPTION / BUT DU PROJET

Le projet CoKiP, pour *Conjugative Killer Plasmid*, a pour but de développer un plasmide conjugatif tueur permettant de cibler de nouveaux pathogènes humains et animaux basés sur le système tueur développé par l'unité Plasticité du Génome Bactérien (PGB) en 2019. Ce projet est en étroite collaboration avec Pedro Dorado-Morales, un post-doctorant au sein de l'unité PGB de l'Institut Pasteur. Il s'organise en trois axes principaux :

Améliorer la capacité de dissémination du plasmide tueur afin d'augmenter son efficacité

Une des limites de cette stratégie est la faible fréquence de conjugaison observée. En effet, dans la preuve de concept, le plasmide tueur est un plasmide mobilisable, il ne possède pas sa propre machinerie de conjugaison. Cela limite son transfert car il n'est pas capable de se transférer de lui-même, et dans une population bactérienne complexe les bactéries non ciblées recevant le plasmide ne peuvent pas le disséminer à leur tour. Afin d'améliorer l'efficacité de transfert, nous proposons d'utiliser comme base, un plasmide conjugatif à large gamme d'hôtes, ainsi lorsque le plasmide atteindra une bactérie non ciblée, celle-ci deviendra à son tour une bactérie donneuse, capable de disséminer le plasmide au sein de la population, améliorant ainsi la propagation du plasmide.

Ensuite le plasmide conjugatif choisit sera modifié afin d'améliorer sa stabilité et sa biosécurité, notamment en supprimant les séquences d'insertions, transposons et gènes de résistances aux antibiotiques, qui sont inutiles à la conjugaison et nuisent à la sécurité du plasmide. De plus, de nombreux systèmes sont connus pour nuire à la dissémination des plasmides comme les systèmes CRISPR-Cas, les enzymes de restriction ou encore des systèmes d'extrusion de plasmide. C'est pourquoi, nous proposons d'ajouter des gènes de défense tel que des protéines-anti-restriction ou anti-CRISPR-Cas sur notre plasmide afin d'augmenter sa protection.

Finalement, afin d'améliorer encore plus sa dissémination au sein du microbiote, nous pourrions augmenter son taux de transfert en élargissant sa gamme d'hôte ou en améliorant son système conjugatif.

Développer des CoKiPs spécifiques de nouvelles bactéries pathogènes

Le système tueur développé dans la preuve de concept ciblait spécifiquement *V. cholerae*. Nous proposons de développer des systèmes ciblant de nouvelles bactéries pathogènes humaines et animales.

Pour cela, nous utiliserons des facteurs de transcription (FT) spécifiques de la bactérie pathogène afin de contrôler l'expression du module toxine-intéine et si besoin de l'antitoxine. Il nous faudra également adapter les systèmes toxine-antitoxine (TA) aux nouvelles bactéries ciblées car le système CcdB-CcdA déjà développé pourrait ne pas être adapté aux pathogènes choisis, cela peut par exemple être le cas si ce système TA est déjà présent dans le génome de la bactérie cible. Nous devons également utiliser de nouvelles intéines afin de compléter l'arsenal du système développé contre *V. cholerae*.

Puis, nous testerons les propriétés bactéricides du CoKiP envers le pathogène ciblé et son innocuité pour les autres espèces bactériennes *in vivo* dans des conditions de laboratoires.

Afin d'identifier les FT candidats, nous pourrons en complément de la bibliographie, utiliser entre autres des bases de données telles que P2TF. Et concernant les TA et intéines, nous nous baserons sur des travaux réalisés au sein de l'unité et résumés dans l'article suivant (López-Igual *et al.*, 2023).

Tester le CoKiP *in situ* sur modèle animal

Enfin, les différents plasmides dont la transmissibilité, la sécurité et la stabilité ont été améliorées, seront d'abord testés afin d'étudier la dissémination des plasmides au sein du microbiote intestinal de l'animal modèle. Puis les CoKiP spécifiques des nouvelles bactéries pathogènes seront testés dans ce même modèle animal afin de déterminer leur efficacité en condition réelle.

CONCEPTION DE LA STRATEGIE

1. Description des bactéries pathogènes sélectionnées :

Nous avons décidé de cibler 3 nouvelles bactéries pathogènes sur la base de leur pathogénicité, de leur virulence et de leur capacité à résister aux antibiotiques. Elles font toutes les trois parties de la liste des agents pathogènes prioritaires pour la recherche-développement de nouveaux antibiotiques publiée par l'OMS en 2017 (OMS, 2017b).

Les bactéries choisies sont : *Shigella spp.* et par extension les souches entéroinvasives d'*E. coli* (EIEC), *Salmonella enterica* et *Klebsiella pneumoniae*.

1.1. *Shigella* et EIEC

Les bactéries du genre *Shigella* et les EIEC sont toutes les deux des bactéries Gram-négatives de la famille des *Enterobacteriaceae*. Sur le plan génétique les Shigelles sont des membres de la famille des *E. coli*. Les souches d'*E. coli* entéroinvasives et *Shigella* sont considérées comme des agents pathogènes majeurs, responsables d'une infection gastro-intestinale nommé shigellose. La shigellose se traduit par un large éventail de symptômes incluant des diarrhées, des douleurs abdominales, de la fièvre et des vomissements, pouvant parfois conduire au décès. Quatre espèces de *Shigella* sont connus : *Shigella dysenteriae*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri* et *Shigella boydii*. Selon l'OMS, les bactéries du genre *Shigella* et les EIEC sont responsables de plus de 80 millions d'infections dans le monde et de 700 000 décès. Une grande majorité des infections et décès concernent des enfants de moins de 5 ans (respectivement 70 % et 60 %) (OMS, 2022).

Les EIEC et les Shigelles partagent un plasmide de virulence connu sous le nom de pINV. Ce plasmide contient un ensemble de gènes de virulence permettant aux bactéries d'envahir les cellules épithéliales intestinales puis le tissu constituant la muqueuse recto-colique permettant aux bactéries d'éviter la réponse immunitaire de l'hôte. Cette virulence est conférée par un système de sécrétion de type III (T3SS) qui est utilisé par la bactérie pour délivrer les facteurs de virulence directement dans les cellules épithéliales de l'hôte. Le T3SS forme une structure semblable à une seringue, permettant à la bactérie d'injecter des effecteurs protéiques directement dans le cytoplasme de l'hôte. Ces effecteurs vont manipuler la signalisation cellulaire et le réarrangement du cytosquelette afin de faciliter l'invasion bactérienne et promouvoir sa survie dans la cellule hôte.

L'expression du T3SS est contrôlée par une protéine régulatrice centrale nommé VirF, codée elle aussi sur le plasmide de virulence pINV. L'expression de *virF* est régulée en réponse

à des changements de conditions environnementales, en particulier en réponse à un changement de température. En effet, à des températures inférieures à 30°C, *virF* n'est pas exprimé et les bactéries sont dans un état non invasif. Cependant lorsque la température atteint 37°C, qui est la température du corps humain, *virF* est activé ce qui entraîne l'expression de plusieurs gènes dont *virB*. C'est l'expression de *virB* qui, à son tour, active la transcription des composants structurels du T3SS et des effecteurs qui permettent l'entrée des bactéries dans les cellules eucaryotes (**figure 8**) (Schnupf and Sansonetti, 2019).

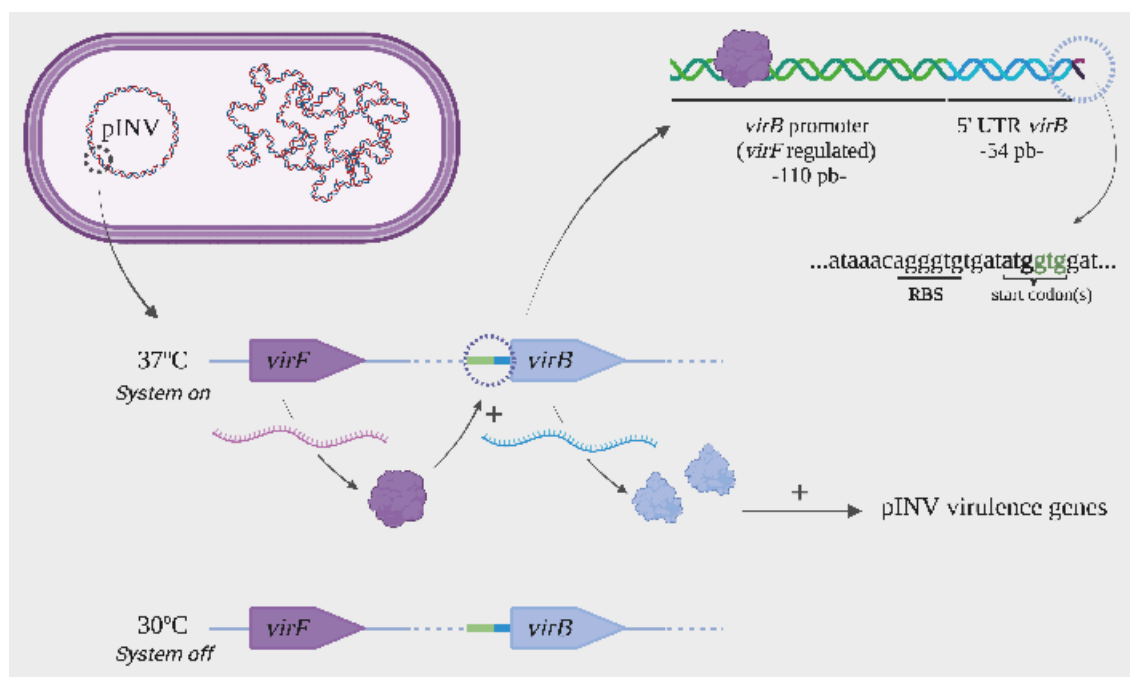


Figure 8 : Régulation de la virulence du pINV médié par VirF

Contrairement aux autres maladies diarrhéiques, comme le choléra, l'atteinte importante de la muqueuse du colon et la destruction des cellules infectées empêchent un traitement des shigelloses basé uniquement sur la réhydratation. Le traitement des shigelloses nécessite des antibiotiques et l'émergence de nombreuses souches multirésistantes aux antibiotiques de première ligne comme l'ampicilline, la tétracycline ou le chloramphénicol obligent à utiliser d'autres antibiotiques plus chers comme les fluoroquinolones ou les céphalosporines de 3^{ème} génération. Cependant, de plus en plus de souches résistantes à tous ces antibiotiques émergent partout dans le monde dont en Europe (OMS, 2022).

1.2. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae est une bactérie pathogène à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. Cette bactérie peut causer de nombreux types d'infections dont des

pneumonies, des septicémies ou encore des infections des voies urinaires. Les septicémies causées par *Klebsiella pneumoniae* sont des infections graves et potentiellement mortelles qui doivent obligatoirement être soignées par des antibiotiques notamment par des carbapénèmes, en cas de résistances aux autres β -lactamines. Cependant, un rapport de l'OMS en 2022 a révélé que 8 % des infections sanguines causées par *K. pneumoniae* étaient résistantes aux carbapénèmes. Ce qui est très problématique car souvent il n'y a aucune autre option thérapeutique ce qui augmente de manière drastique le risque de décès (GLASS report, 2022).

Les souches de *Klebsiella pneumoniae* portent généralement un grand nombre de gènes accessoires sur des plasmides ou dans des loci chromosomiques. Ces gènes accessoires peuvent apporter une résistance aux antibiotiques ou une plus grande virulence. Ainsi, il est possible de classer les souches de *K. pneumoniae* dans trois catégories : multirésistantes (MDR), hypervirulente (*hvKp*) et opportunistes (correspondant aux souches classiques ne possédant pas les éléments précédemment mentionnés). Parmi les facteurs de virulence identifiés dans les souches *hvKp*, les plus courants sont les pili, la capsule, le lipopolysaccharide et les chélateurs de fer (Wang *et al.*, 2020).

Le fer est un nutriment essentiel pour la croissance et la survie des cellules eucaryotes et procaryotes. La compétition pour le fer entre l'hôte et la bactérie est un facteur critique dans l'issue de l'infection. La quantité en fer dans l'hôte est fortement régulée par différents mécanismes dont le stockage sous la forme de ferritine. L'hôte possède également des protéines permettant de lier le fer et d'assurer son transport comme la transferrine. Afin de pouvoir se multiplier rapidement dans l'organisme hôte, de nombreuses bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* sont capables de produire des sidérophores. Ces protéines possèdent une affinité généralement plus élevée envers le fer que les protéines de liaison de l'hôte, permettant ainsi de récupérer le fer. Le fer peut ensuite réintégrer la cellule bactérienne par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques aux sidérophores. Plusieurs sidérophores sont connus chez *K. pneumoniae* dont l'entérobactine, la salmocheline et la yersiniabactine.

La yersiniabactine, comme son nom le laisse sous-entendre, a initialement été identifiée dans des bactéries du genre *Yersinia* (Haag *et al.*, 1993). Les gènes impliqués dans la synthèse, le transport et la régulation de ce sidérophore sont regroupés dans un HPI nommé locus *ybt* lui-même présent, chez *K. pneumoniae*, dans l'*ICEKp*. Au moins 17 lignées différentes du locus

ybt et 14 variants de l'ICEKp ont été identifiés (Lam *et al.*, 2018). Le locus ybt est composé de 12 gènes organisés en 4 opérons dont 2 monocistroniques (**figure 9**).

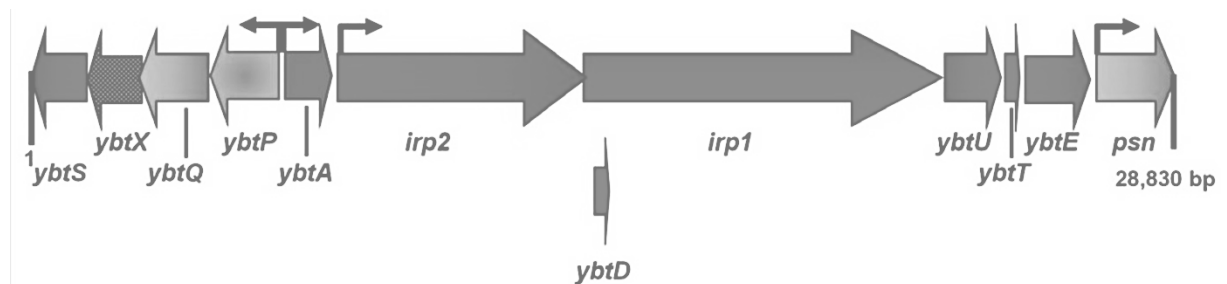


Figure 9 : Structure du locus ybt de l'ICEKp.

Au sein de ce locus, le gène *ybtA* a été identifié comme étant le régulateur central avec le régulateur d'absorption du fer Fur. La protéine Fur, pour *Ferric uptake regulation*, est une protéine régulatrice présente chez toutes les bactéries permettant la régulation de nombreux gènes jouant un rôle dans la capture du fer. En présence de fer, le régulateur Fur se fixe aux promoteurs des gènes ayant pour fonction la capture du fer, comme le gène *ybtA*, régulant ainsi négativement la synthèse de la yersiniabactine. Cependant, lorsque le fer vient à manquer, le régulateur Fur libère la région promotrice de *ybtA*, permettant sa transcription et traduction. Une fois traduite, la protéine YbtA réglera la transcription des 4 opérons du locus dont l'opéron *irp2* codant pour la protéine Irp2 et Irp1, deux enzymes de synthèse de peptide non-ribosomique (NRPS) permettant la synthèse de la yersiniabactine (**figure 10**).

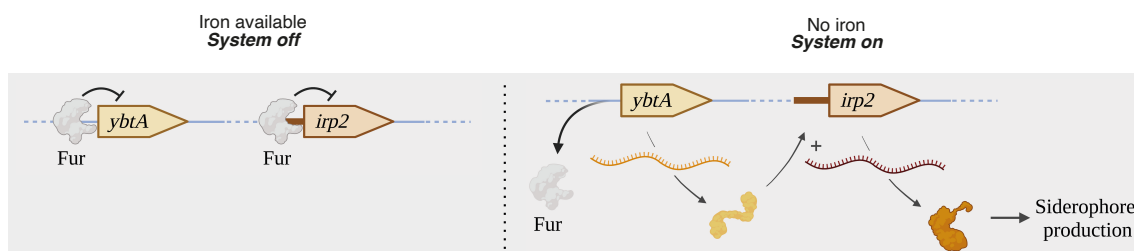


Figure 10 : Représentation schématique de la régulation de la protéine Irp2, une enzyme de synthèse de peptides non-ribosomique (NRPS) impliquée dans la synthèse de la yersiniabactine, du locus ybt médié par YbtA et Fur.

Le locus ybt est largement distribué dans la population de *K. pneumoniae*, on le retrouve dans 30-40 % des isolats cliniques humains et dans 13 % des isolats colonisateurs présent dans notre microbiome. Il est très fortement associé aux souches hypervirulentes car on le retrouve dans au moins 78 % d'entre elles. De plus, entre 6 et 80 %, selon les sources et localisations géographiques, des souches MDR contiennent ce locus (Wyres *et al.*, 2020).

1.3. *Salmonella enterica*

Salmonella enterica est une bactérie pathogène à Gram-négative de la famille des *Enterobacteriaceae*. Le genre *Salmonella* comprend plus de 2 500 sérovars, *S. enterica* étant la cause la plus fréquente de salmonellose chez l'Homme. La salmonellose se présente généralement sous la forme d'une gastro-entérite (fièvre, diarrhée, vomissement et douleur abdominales). Les salmonelles sont fréquemment responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) qui ont provoqué un grand scandale sanitaire en France en 2022 (Santé Public France, 2022).

Il existe trois principaux types d'infections à *Salmonella enterica* selon le sérovar impliqué : les infections à Salmonelles typhoïdes, les infections à Salmonelles non typhoïdes (SNT) et les infections à SNT invasives (**figure 11**). Les infections à Salmonelles typhoïdes, causées par les sérovars Typhi et Paratyphi, se caractérisent par une fièvre entérique accompagnée d'une atteinte gastro-entérique. Ces infections, endémiques dans de nombreuses régions du monde, causent environ 25 millions de cas et plus de 200 000 décès par an (Cuypers *et al.*, 2018).

Les infections à Salmonelles non typhoïdiques sont causées par une série de sérovars, dont *Salmonella* Typhimurium et Enteritidis sont les plus fréquents, et constituent le type le plus courant d'infection à *Salmonella* (MASA, 2017). Plus de 90 millions de cas et environ 800 000 décès sont recensés par an. Les SNT causent généralement des infections gastro-intestinales bénignes, toutefois, chez les personnes immunodéprimées ou présentant d'autres problèmes de santé sous-jacent, les infections peuvent être plus graves et entraîner un grand nombre d'infections invasives telles que des bactériémies. La majeure partie des décès imputable aux salmonelloses sont causés par des infections SNT invasives (MASA, 2017).

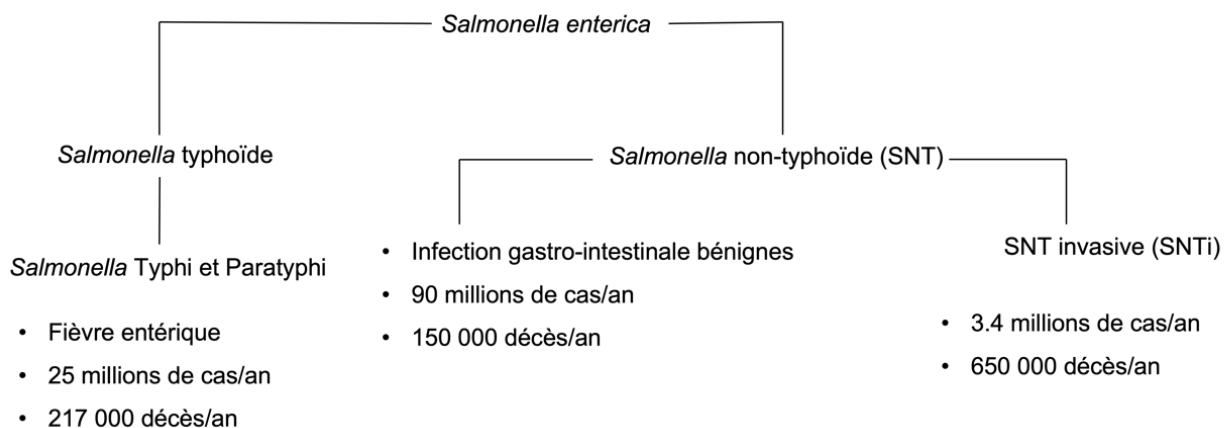


Figure 11 : Distribution de l'incidence des infections à *Salmonella enterica*

La pathogénicité de *Salmonella enterica* est largement attribuée à la présence de plusieurs facteurs de virulence pouvant être répartis sur des îlots de pathogénicité chromosomique ou sur des plasmides de virulence comme pSLT présent chez certains isolats de *Salmonella* Typhimurium. Au total 17 îlots de pathogénicité (SPI) ont été identifiés chez *Salmonella enterica*. Le SPI-1 est conservé dans toutes les souches de *S. enterica* et code pour un T3SS essentiel à l'invasion de la bactérie et à l'apparition d'entérite. Ce T3SS est régulé par un système de régulation HilA/HilD strictement conservé (Kombade *et al.*, 2021).

Le régulateur transcriptionnel central HilD contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans la virulence par interaction directe sur leurs promoteurs dont HilA un autre facteur de transcription central. Ainsi l'activation en cascade de HilD et HilA permet l'expression d'une série de facteurs de virulence impliqués dans les premiers stades de la l'infection dont l'invasion, la survie intracellulaire et la propagation systémique (figure 12) (Kombade *et al.*, 2021).

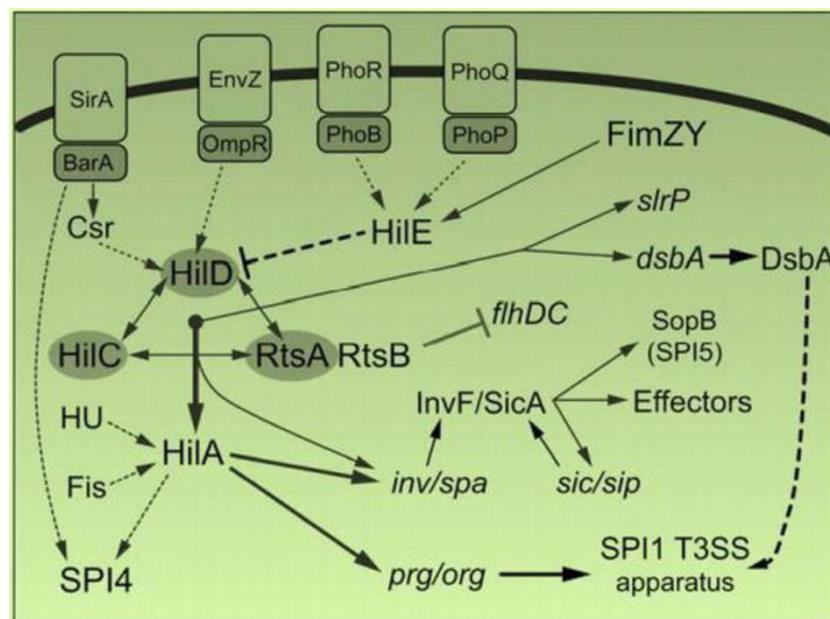


Figure 12 : Régulation de la virulence de *Salmonella enterica* médiée par HilD (Kombade *et al.*, 2021)

2. Description des plasmides conjugatifs sélectionnés :

Afin d'améliorer la dissémination de notre plasmide tueur, nous avons décidé d'utiliser un plasmide conjugatif capable de se transférer de lui-même au sein d'une population bactérienne complexe. Pour cela nous avons décidés d'étudier le transfert de certains plasmides conjugatifs connus pour avoir une large gamme d'hôte ainsi qu'une forte efficacité de transfert.

Nous avons sélectionné les 4 plasmides suivants : pKM101, pOXA48, pRP4 et pTP114.

2.1. Le pKM101

Le plasmide pKM101 est un plasmide conjugatif à large gamme d'hôtes d'environ 36 kb, dérivé du plasmide R46, initialement isolé chez *Salmonella enterica* Typhimurium, ayant subi plusieurs événements de délétion dont un médié par l'excision d'un transposon Tn3 et la recombinaison de deux IS46 (Hall, 1987). A l'origine, le plasmide R46 contenait de nombreux gènes de résistances aux antibiotiques, au sein d'un intégron mobile de classe 1, lui conférant une résistance aux β -lactamines (*oxa-2*), spectinomycine/streptomycine (*aadA1*) et sulfonamides (*sulI*). A la suite d'un événement de délétion, une grande partie de l'intégron a été perdue dans le plasmide pKM101, où il ne reste plus que l'intégrase *intII*, le premier gène de l'intégron *oxa-2* ainsi qu'une moitié de la cassette *aadA1*. De nombreux autres gènes de résistances étaient présents dans le transposon Tn3 conférant une résistance à la tétracycline et à l'arsenic.

C'est un plasmide possédant un faible nombre de copies par cellule (entre 1 et 5) et dont la réplication est initiée par la protéine RepA. Il fait partie du groupe d'incompatibilité IncN. Les groupes d'incompatibilité de plasmide sont un système utilisé pour classer les plasmides en fonction de leur capacité à coexister au sein d'une même cellule bactérienne. Les plasmides qui appartiennent au même groupe d'incompatibilité sont incapables de coexister de manière stable au sein de la même cellule, car ils portent souvent des gènes de réplication et/ou de partition similaires qui entrent en compétition les uns avec les autres pour les ressources au sein de la cellule. Le pKM101 code également pour deux protéines jouant un rôle dans la compétition plasmidique : une protéine exclusion, Eex, empêchant l'entrée dans la cellule d'un autre plasmide du même groupe d'incompatibilité, et une protéine Fip (pour *fertility inhibition of IncP plasmid*) empêchant les plasmides du groupe d'incompatibilité IncP d'être maintenu dans la cellule bactérienne.

D'après une prédiction réalisée à l'aide de l'outil Conj-Scan, son système conjugatif serait un système de type T (Cury *et al.*, 2020). Les gènes du T4SS sont organisés en deux opérons et sont régulés par deux systèmes régulateurs distincts KorAB et StbABC (Moré *et al.*, 1996; Guynet *et al.*, 2011). L'opéron *stbABC* semble également jouer un rôle important dans la stabilité du plasmide.

La *leading region* du plasmide pKM101 (la première à être transférée et exprimée dans la cellule receveuse) est composée de 6 régions conservées et répétées nommées CUP (pour *Conserved UPstream*), et code pour au moins 18 gènes dont les fonctions ne sont pas encore bien caractérisées. Parmi les gènes identifiés, on retrouve une protéine anti-restriction ArdA, l'opéron *stbABC* et les gènes *mucAB*, analogues à *umuDC* chez *E. coli*, dont l'expression est contrôlée par la protéine LexA et codant pour une ADN polymérase V, faiblement processive et sujette aux erreurs, jouant un rôle dans la réparation de l'ADN pendant un stress SOS. Les gènes de la *leading region* semblent être très fortement régulés par deux protéines régulatrices ArdK et ArdR, elles aussi codées dans cette région (Delver and Belogurov, 1997).

2.2. Le pOXA48

Les plasmides pOXA48 sont des plasmides conjugatifs à large gamme d'hôtes d'environ 60 kb, initialement identifiés dans des souches cliniques de *K. pneumoniae* et *E. coli* résistantes aux carbapénèmes via le gène *bla_{OXA-48}*. Ils sont fréquemment responsables d'infections nosocomiales dans les hôpitaux, où ils sont capables de se disséminer entre différents patients mais aussi dans le microbiote des patients très efficacement (León-Sampedro *et al.*, 2021). Dans ce projet, nous utilisons le plasmide pOXA48_K8, identifié et séquencé par une équipe de chercheurs basée à Madrid (León-Sampedro *et al.*, 2021).

Ce plasmide, d'une taille de 65 kb porte le gène *bla_{OXA-48}* conférant une résistance étendue aux β -lactamines dont les carbapénèmes. Ce gène est porté par un transposon Tn1999 inséré dans le gène *tir*, impliqué dans la répression des gènes conjugatifs. Son inactivation par le Tn1999 conduit à une augmentation importante de l'expression du système conjugatif permettant un taux de transfert élevé (Fursova *et al.*, 2015).

La réplication du plasmide est initiée par le système *repABC*. Deux autres protéines, TraC et ParM sont essentielles à la réplication et partition du plasmide dans les cellules bactériennes. Ce plasmide fait partie du groupe d'incompatibilité IncL/M. Il code également pour deux systèmes TA de type II : *pemIK* et *relB/dinJ*. Les systèmes TA sont fréquemment retrouvés sur

les plasmides où ils jouent un rôle de module d'addiction. Dans le cas des TA de type II, la toxine et l'antitoxine sont toutes deux des protéines. Les deux gènes sont en opéron et sont exprimés en même temps. La toxine est une protéine stable, tandis que l'antitoxine est moins stable. Ainsi, afin que la toxine soit inactivée, il est nécessaire d'avoir une expression continue de l'antitoxine, la présence du gène codant pour l'antitoxine devient donc nécessaire à la survie de la cellule. Dans le cas des TA codés sur les plasmides, la perte du plasmide induit un arrêt de l'expression de l'antitoxine, les stocks protéiques d'antitoxine vont finir par s'amenuiser tandis que la toxine, plus stable, est toujours présente, conduisant à la mort de la cellule ayant perdu le plasmide (Harms *et al.*, 2018). En plus de sa fonction dans l'addiction et la maintenance des plasmides, il a également été montré que certains systèmes TA jouaient un rôle dans la résistance aux bactériophages. C'est notamment le cas du système pemIK présent sur le pOXA48. Lorsque qu'une bactérie possédant le pOXA48 est infectée par certains types de phage, la toxine *pemK* est surexprimée, conduisant à la mort de la cellule et empêchant ainsi le phage de se disséminer dans la population bactérienne (Bleriot *et al.*, 2022).

D'après une prédiction réalisée à l'aide de l'outil Conj-Scan, son système conjugatif serait un système de type I (Cury *et al.*, 2020). Les gènes du T4SS sont organisés en 3 opérons et sont normalement régulés par la protéine Tir inactivée dans ce plasmide par le transposon Tn1999.

Sa *leading region*, est composée de 27 gènes dont la plupart sont de fonction inconnue. Parmi eux on retrouve des gènes pouvant jouer un rôle dans la virulence comme une protéine pouvant lier le fibrinogène (*fibrinogen binding protein*), une phospholipase D, capable d'hydrolyser les phospholipides à la membrane des cellules eucaryotes et ainsi faciliter l'invasion ou encore une protéine de la famille ymoA/rmoA connu pour être impliqué dans la thermorégulation de l'expression de la virulence (Madrid *et al.*, 2002). En plus de ces gènes, on peut également noter la présence de gènes impliqués dans la protection du plasmide comme les gènes *ssb* et *klcA* codant respectivement pour une protéine protégeant l'ADN simple brin (importante pour la protection de l'ADN lors du transfert simple brin pendant la conjugaison) et pour une protéine anti-restriction. On retrouve aussi un gène codant pour l'enzyme de restriction *kpnI* impliquée dans la compétition entre plasmides. Trois facteurs de transcription sont également présents dans cette région dont KorC et deux protéines appartenant à la famille XRE. Leurs fonctions régulatrices sont encore inconnues. L'étude de la fonction des nombreux gènes codés dans cette région pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de ce plasmide

dans la cellule bactérienne et comprendre pourquoi ce plasmide n'est pas coûteux dans la plupart des hôtes bactériens voir même bénéfique (Alonso-Del Valle *et al.*, 2021).

2.3. Le pRP4/RK2

Le pRP4 est un plasmide conjugatif à large gamme d'hôtes d'environ 60 kb originellement identifié dans des isolats cliniques de *Klebsiella* et *Pseudomonas sp.* présentant des résistances aux antibiotiques (Lowbury *et al.*, 1969). D'après l'analyse de sa séquence, il proviendrait d'une bactérie environnementale apparentée à *Pseudomonas sp.* ou *Agrobacterium sp.* (Pansegrau *et al.*, 1994). Le pRP4 n'est pas distinguable du plasmide RK2, ce sont juste deux isolats du même plasmide (Pansegrau *et al.*, 1994). Sa large gamme d'hôte, s'étendant à quasiment toutes les bactéries à Gram négatives, avec une exception pour les bactéries du genre *Bacteroides*, en fait un outil biotechnologique intéressant (Thomas and Smith, 1987).

Au cours de son évolution, il a acquis plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques dont *bla_{TEM-2}*, *tetA/R* et *aph* conférant une résistance à l'ampicilline et apparenté, à la tétracycline et à la kanamycine (Meyer and Helinski, 1977).

Son système réplcatif est composé d'une origine de réplcation *oriV* et d'une protéine initiateur *TrfA*. Il possède également deux systèmes de partition *ParABC* et *IncC*. Il appartient au groupe d'incompatibilité *IncP* et *incA/C₂*. De plus, il possède un gène codant pour la protéine *FiwA* (pour *fertility inhibition of IncW plasmid*), rendant le maintien des plasmides *incW* impossible dans les cellules hébergeant le pRP4.

D'après une prédiction réalisée à l'aide de l'outil Conj-Scan, son système conjugatif serait un système de type T (Cury *et al.*, 2020). Les gènes du T4SS sont organisés en 3 opérons.

La réplcation, partition et conjugaison du pRP4 sont fortement régulées par un ensemble de facteurs de transcription codés dans la *leading region* du plasmide : *KorABC* et *trbA* (Kolotka *et al.*, 2010). On retrouve dans cette région deux gènes impliqués dans la protection du plasmide : le gène *ssb* et le gène *klcA* codant respectivement pour une protéine protégeant l'ADN simple brin et une protéine anti-restriction.

2.4. Le pTP114

Le pTP114 est un plasmide conjugatif à large gamme d'hôtes de 65kb, identifié dans une souche *E. coli* K-12. Ce plasmide a été identifié et séquencé très récemment en 2020 par des

chercheurs de l'université de Sherbrooke au Canada. Il code pour le gène *aph(3')-Ia* conférant une résistance à la kanamycine.

Sa réplication est initiée par la protéine RepA et il possède plusieurs systèmes de partition dont ParA et il appartient au groupe d'incompatibilité IncI2.

D'après une prédiction réalisée à l'aide de l'outil Conj-Scan, son système conjugatif serait un système de type T (Cury *et al.*, 2020). Il se distingue des autres plasmides conjugatifs choisis par la présence d'un système d'adhésines accessoires, nommé pilus de type IV (T4P), pouvant faciliter le contact avec les bactéries donneuses et receveuses et la formation de paires d'accouplement en rapprochant les deux cellules l'une de l'autre. Le T4P peut donc jouer un rôle important dans la stabilité des paires d'accouplements, le déploiement du T4SS et donc le transfert de l'ADN plasmidique.

Succinctement, le T4P peut être séparé en 2 parties : une plateforme cytoplasmique-transmembranaire, ainsi que le pilus à proprement parlé (figure 13). De nombreuses protéines participent à la formation de la plateforme cytoplasmique-transmembranaire et seulement deux protéines à la formation du pilus : les pilines. Il existe deux sous-unités de piline : les pilines majeures, participant à la polymérisation la plus importante du pilus, et les pilines mineures moins abondantes, retrouvées majoritairement vers l'extrémité du pilus et jouant un rôle important dans l'interaction du pilus avec la membrane de la cellule cible. Elles jouent un rôle important dans l'adhésion des cellules, la formation de biofilm et la virulence (Craig *et al.*, 2019).

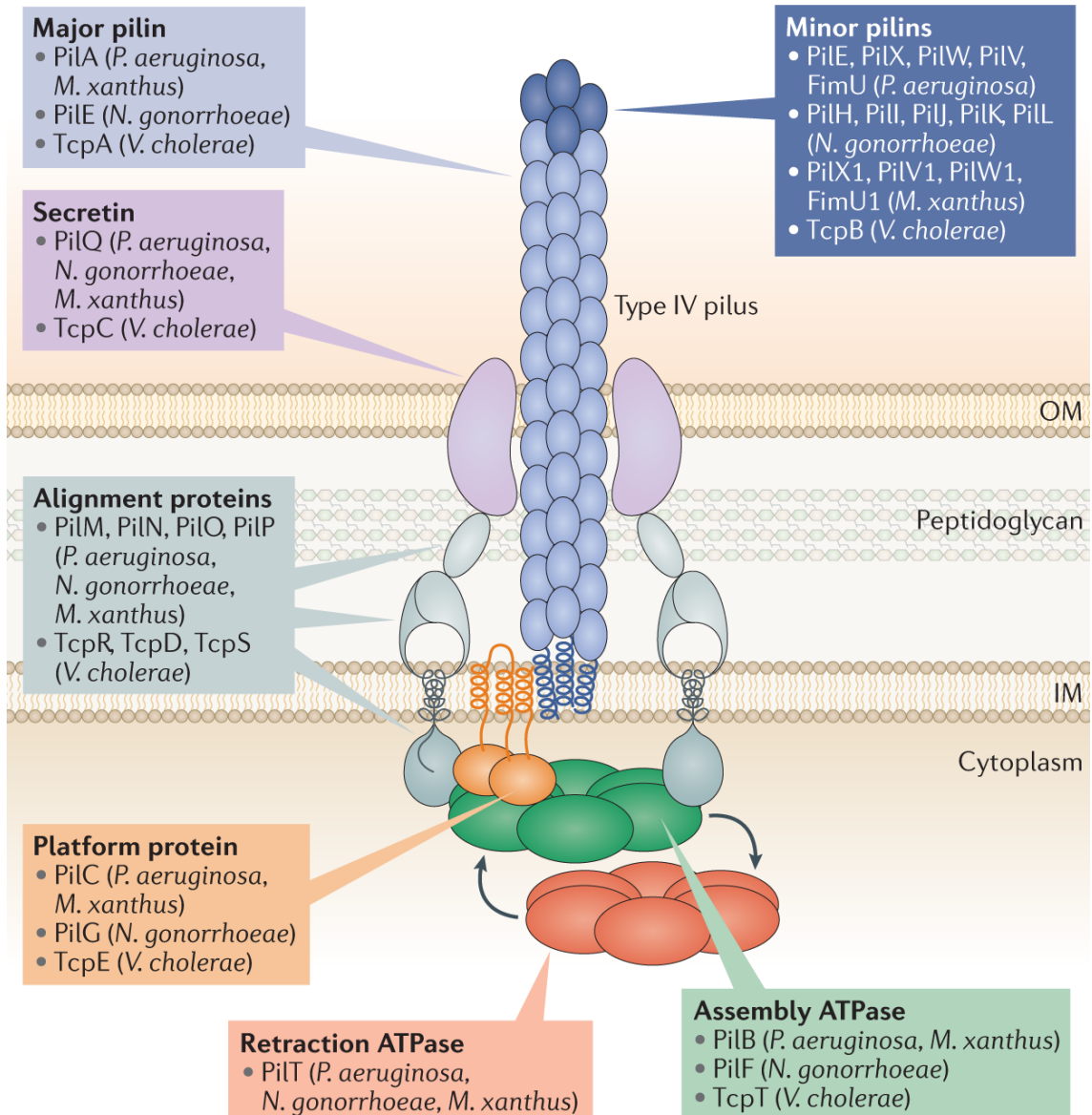


Figure 13 : Représentation schématique d'un pilus de type IV (Craig et al., 2019).

Dans le pTP114, la présence du T4P est nécessaire pour la conjugaison en milieu liquide et au sein du microbiote intestinal des souris, mais pas en milieu solide (Allard *et al.*, 2022). Il est composé d'au moins 11 protéines dont PilS la piline majeure et PilV la piline mineure. Le gène *pilV* fait partie intégrante d'un shufflon et peut ainsi porter différents domaines C-terminaux. Un shufflon est un élément génétique pouvant réarranger l'ordre des segments d'ADN à l'intérieur de l'élément. Il consiste en une série de segments d'ADN, appelés cassettes flanquées de sites de recombinaison, permettant le réarrangement des cassettes par une tyrosine recombinase spécifique nommée shufflase. Ainsi, l'ordre des cassettes dans le shufflon peut affecter l'expression et l'activité des gènes situés dans le shufflon et génère une variabilité génétique

pouvant être bénéfique à l'adaptabilité de la bactérie. Dans le cas du pTP114, le shufflon va générer plusieurs variantes de la protéine PilV, modifiant ainsi le pilus et son affinité pour différentes espèces bactériennes. Cela permet au plasmide de modifier sa spécificité de gamme d'hôte conjugatif potentiel (Allard *et al.*, 2022).

Une récente étude, conduite par des chercheurs de l'université de Sherbrooke au Canada, a étudié le transfert de 13 plasmides conjugatifs, appartenant à différents groupes d'incompatibilité et représentatifs de la variabilité des plasmides conjugatifs existants, au sein d'un microbiote de souris simplifié composé d'*E. coli* Nissle 1917. La bactérie donneuse, possédant le plasmide conjugatif et la bactérie receveuse étaient toutes les deux des souches de *E. coli* Nissle 1917. Des expériences de conjugaison en milieu solide, liquide ainsi que dans le microbiote des souris ont été réalisés afin de calculer le taux de transfert de chaque plasmide. D'après les données de cette étude, le plasmide pTP114, était le plasmide avec les meilleurs taux de transfert au sein du microbiote simplifié de souris. D'après les auteurs, un système de stabilisation de la paire d'accouplement (MPS), dont le T4P fait partie, est nécessaire à la conjugaison *in situ*. Ainsi les plasmides n'en possédant pas ne sont pas capables de se transférer efficacement par conjugaison dans le microbiote intestinal (Neil *et al.*, 2020).

Cependant plusieurs limites peuvent être soulignées. En effet, dans l'étude, les auteurs n'observent pas de transfert du plasmide RK2 *in situ*. Alors que de nombreuses autres études, dont une conduite au sein de l'unité PGB, montrent que le plasmide RK2 est capable de transférer un plasmide mobilisable *in situ* (Ruotsalainen *et al.*, 2019; Dong *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2022; López-Igual *et al.*, 2023). De plus, les souches de *E. coli* Nissle 1917 choisies comme receveuses et donneuses par conjugaison sont connus pour être des souches très peu efficaces pour la conjugaison (Sonnenborn and Schulze, 2009).

Afin de déterminer avec quel plasmide conjugatif nous allons continuer de travailler, nous sommes basés sur plusieurs critères : son efficacité de transfert par conjugaison en milieu solide envers différentes Gammaproteobactérie, l'étendue de sa gamme d'hôte ainsi que son groupe d'incompatibilité.

RESULTATS

1. Étude des taux de transferts des plasmides conjugatifs sélectionnés :

Le taux de transfert des 4 plasmides conjugatifs a été testé en milieu solide sur gélose. Pour cela chaque plasmide a été transféré dans une souche d'*E. coli* MG1655 $\Delta dapA$. La délétion du gène *dapA* rend la bactérie auxotrophe à l'acide diaminopimélique (DAP), un acide aminé non protéinogène essentiel à la synthèse de la paroi bactérienne. Cela permet de contre-sélectionner la souche d'*E. coli* donneuse par conjugaison.

Afin de réaliser l'expérience de conjugaison, les bactéries donneuses et receveuses ont été incubées à 37°C jusqu'à phase exponentielle de croissance (DO_{600nm} comprise entre 0,3 et 0,6). La même quantité de donneuse (D) et de receveuse (R) a été mélangée et déposée sur un filtre sur une gélose Mueller-Hinton (MH) complémentée par 300 μ M de DAP. Après 16h d'incubation à 37°C, en présence ou en absence d'oxygène, les bactéries ont été récupérées et déposées sur plusieurs milieux permettant de calculer le nombre de bactéries donneuses, receveuses et transconjuguants (bactéries receveuses ayant reçues le plasmide). Le taux de transfert a été calculé en divisant le nombre de transconjuguant (Tc) par le nombre total de bactéries receveuses. Ainsi si le plasmide est transféré à une bactérie receveuse sur 10, le taux de transfert sera de 10 %.

Neuf bactéries receveuses différentes ont été utilisées : dont une *E. coli*, une *Shigella*, trois *Klebsiella pneumoniae*, deux *Salmonella* Typhimurium, deux *Vibrio cholerae*. Les caractéristiques principales des souches utilisées sont résumées dans le **tableau II**.

Tableau II : Principales caractéristiques des souches receveuses utilisées.

Espèce	Souche	Informations	Référence
<i>Escherichia coli</i>	K-12 substr. MG1655	<u>Génotype</u> : F- lambda- <i>ilvG</i> - <i>rfb</i> -50 <i>rph</i> -1 <u>Sérotype</u> : OR:H48:K- <u>Plasmide</u> : Ø <u>AMR</u> : ampC β -lactamase (conférant une résistance modérée à l'ampicilline)	(Blattner <i>et al.</i> , 1997).
<i>Shigella flexneri</i>	2a str. 301	<u>Plasmide</u> : pINV-B (IncFII) (Lan <i>et al.</i> , 2003). <u>AMR</u> : ampC β -lactamase (conférant une résistance modérée à l'ampicilline)	(Jin <i>et al.</i> , 2002).

<i>Klebsiella pneumoniae</i>	04A025	Souche MDR ST15 <u>Sérotype</u> : wzi24, KL24, O1v1 <u>Virulence</u> : Yersiniabactine (ybt10 ; ICEKp4 ; ST 107-2LV). <u>AMR</u> : SHV-28, TEM-1, ANT(3'')-Ia, tetA, DfrA1*, sul1*. Confèrent une résistance au β-lactamine, carbapénème, aminosides, tétracycline, triméthoprim et sulfaméthoxazole. <u>Plasmide</u> : 1 plasmide IncFIB	(Brisse <i>et al.</i> , 2009).
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	BJ1-GA	Souche hypervirulente (hvKp) ST380 <u>Sérotype</u> : wzi 2, KL2 <u>Virulence</u> : Yersiniabactine (ybt12 ; ICEKp10 ; ST1), colibactin (clb1, ST1), aerobactine (iuc2, ST14), salmochelin (iro2, ST3) et rmpA (A_3 ; KpVP-2) <u>AMR</u> : SHV-207. Confère une résistance aux β-lactamines. <u>Plasmide</u> : 2 plasmides : IncFIB(K) et IncFIA(HI1)	(Bialek-Davenet <i>et al.</i> , 2014).
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SB5521_Mada	Souche MDR ST307 <u>Sérotype</u> : wzi173, KL102, O2v2 <u>Virulence</u> : Yersiniabactine (ybt10 ; ICEKp4 ; ST 91-2LV). <u>AMR</u> : SHV-28, CTX-M-15, ParC-80i, GyrA-83I Confèrent une résistance aux β-lactamines, carbapénème et fluoroquinolones. <u>Plasmide</u> : Ø	(Huynh <i>et al.</i> , 2020).
<i>Salmonella enterica Typhimurium</i>	SL1344	<u>AMR</u> : AAC(6')-Iaa, APH(6)-Id, sul2, ermB Confèrent une résistance à l'érythromycine, sulfonamides et aminosides.	(Kröger <i>et al.</i> , 2012).

		<u>Plasmide</u> : pCol1B9 (IncI1), pRSF1010 (IncQ1), pSLT (IncFIB).	
<i>Salmonella enterica</i> <i>Typhimurium</i>	STM 36-57	<u>AMR</u> : AAC(6')-Iaa, ermB. Confèrent une résistance à l'érythromycine et aminosides. <u>Plasmide</u> : Ø	F.X. Weill – CNR-ESS
<i>Vibrio cholerae</i>	O1 biovar El Tor str. N16961	<u>AMR</u> : catB9 et varG/R (conférant une résistance au chloramphénicol et β -lactamine). <u>Plasmide</u> : Ø	(Heidelberg <i>et al.</i> , 2000).
<i>Vibrio cholerae</i>	O139 – MO10	<u>AMR</u> : catB9, varG/R, SXT ^{MO10} . L'ICE SXT confère une résistance au sulfaméthoxazole, triméthoprim, chloramphénicol et streptomycine (Burrus <i>et al.</i> , 2006). <u>Plasmide</u> : Ø	

Les plasmides pRP4 et pTP114 codent tous deux pour un gène *aph*, conférant une résistance à la kanamycine, un antibiotique de la famille des aminosides. Le gène *aph(3')-IIa* a été ajouté, par recombinaison homologue à l'aide du système lambda-red, aux plasmides pOXA48 et pKM101 afin de pouvoir sélectionner les événements de transfert plasmidique à l'aide de la résistance à la kanamycine. Concernant le pKM101, le gène *aph* a été ajouté dans le gène *aadA1* inactif, initialement présent dans l'intégron mobile plasmidique. Pour le plasmide pOXA48, le gène *aph* a quant-à-lui été inséré à la place du Tn1999 codant pour le gène *bla_{OXA-48}*, ainsi le plasmide perd sa résistance aux carbapénèmes et devient résistant à la kanamycine.

Toutes les bactéries receveuses sont capables de croître sur un milieu MH avec et sans oxygène et sont sensibles à 25 μ M de kanamycine. Les transconjuguants ont tous été sélectionnés sur gélose MH complémentée par 25 μ M de kanamycine.

Parmi les quatre plasmides conjugatifs, le pTP114 a obtenu les plus faibles taux de transfert. Dans le cas des deux souches de *Salmonella* Typhimurium, aucun transconjuguant n'a été observé avec ce plasmide (**figure 14**). A l'inverse, deux plasmides se démarquent par leur

efficacité de transfert dans les 9 bactéries testées : le pRP4 et le pOXA48. Leur taux de transfert dans *E. coli* et *Shigella*, était de 100 % et avoisinait les 10 % minimum dans les autres souches.

Des différences mineures ont été observées entre les taux de conjugaison en présence et absence d'oxygène pour le pRP4 et pOXA48. Initialement cette condition avait été testée car dans une étude publiée par des chercheurs de l'université de Sherbrooke, le transfert du pTP114 était stimulé en l'absence d'oxygène (Neil *et al.*, 2020). Comme souligné dans l'étude, l'absence d'oxygène stimule bien le transfert du pTP114 entre 2 souches d'*E. coli*, mais dans les autres souches, l'anaérobiose n'a pas d'effet voire un effet négatif sur le transfert du plasmide.

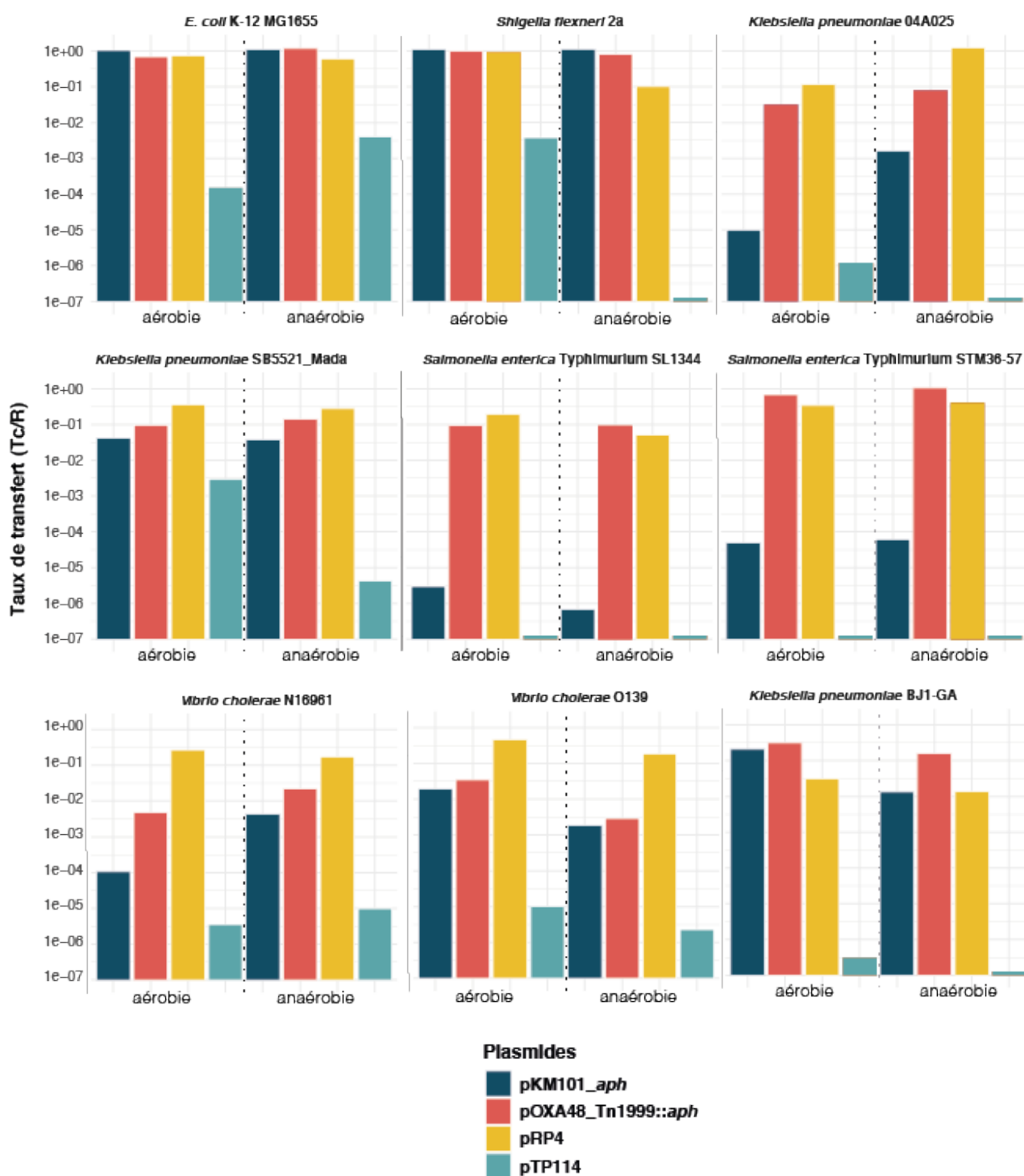


Figure 14 : Taux de transfert des 4 plasmides conjuguatifs testés envers 9 bactéries receveuses appartenant à la classe des gammaprotéobactérie.

D'après ces résultats, les plasmides pRP4 et pOXA48 semblent être de bons candidats pour le transfert du système toxique au sein d'une population complexe bactérienne. Car ils sont

capables d'atteindre des taux de transfert élevés lors d'expérience de paires d'accouplement dans nos conditions de laboratoire.

De plus, ils sont tous les deux réplcatifs dans une large gamme d'hôtes de bactéries à Gram négatif et dans le cas du pRP4, seul le genre *Bacteroides* ne fait pas partie de sa gamme d'hôtes de bactéries Gram négatives (Thomas and Smith, 1987).

Le choix du groupe d'incompatibilité dont le plasmide conjugatif sur lequel se basera notre système CoKiP est important. En effet, s'il fait partie d'un groupe d'incompatibilité très fréquemment isolé dans le microbiote humain et dans les bactéries résistantes aux antibiotiques, des problèmes d'incompatibilité risque de s'opposer à l'entrée, le maintien et dissémination de notre plasmide tueur. Pour surmonter ce problème, les outils biotechnologiques utilisent souvent des plasmides avec des groupes d'incompatibilité inhabituels et peu fréquemment retrouvé dans l'environnement ciblé. Cependant, certains groupes d'incompatibilité inusuels possèdent une gamme d'hôtes étroite comme c'est le cas avec les groupes IncZ, IncX ou IncU (Rozwandowicz *et al.*, 2018). C'est pourquoi il est nécessaire de faire un compromis entre un plasmide possédant un groupe d'incompatibilité peu fréquemment retrouvé mais possédant une gamme d'hôtes large.

Il n'existe, à ma connaissance, pas de publication étudiant les groupes d'incompatibilité des plasmides naturellement présents dans le microbiote intestinal humain. Cependant, de nombreuses publications et revues se sont intéressées aux plasmides porteurs de gènes de résistances aux antibiotiques. Notamment, chez les entérobactéries, de nombreux plasmides conférant une résistance aux antibiotiques et appartenant à différents groupes d'incompatibilité ont été identifiés. Parmi les plus courants, on retrouve des plasmides appartenant aux groupes d'incompatibilité IncF, IncL/M, IncA/C, IncI IncH et IncN (**figure 15**) (Carattoli, 2009; Rozwandowicz *et al.*, 2018).

Le groupe d'incompatibilité IncL/M, dont fait partie le pOXA48, est le deuxième groupe d'incompatibilité le plus fréquemment retrouvé chez les entérobactéries porteuses de plasmides conférant une résistance aux antibiotiques. Le pRP4 quant à lui possède 2 groupes d'incompatibilité : IncA/C et IncP. Le groupe IncA/C est retrouvé en 3^{ème} position tandis que le groupe IncP est un groupe très peu fréquemment retrouvé.

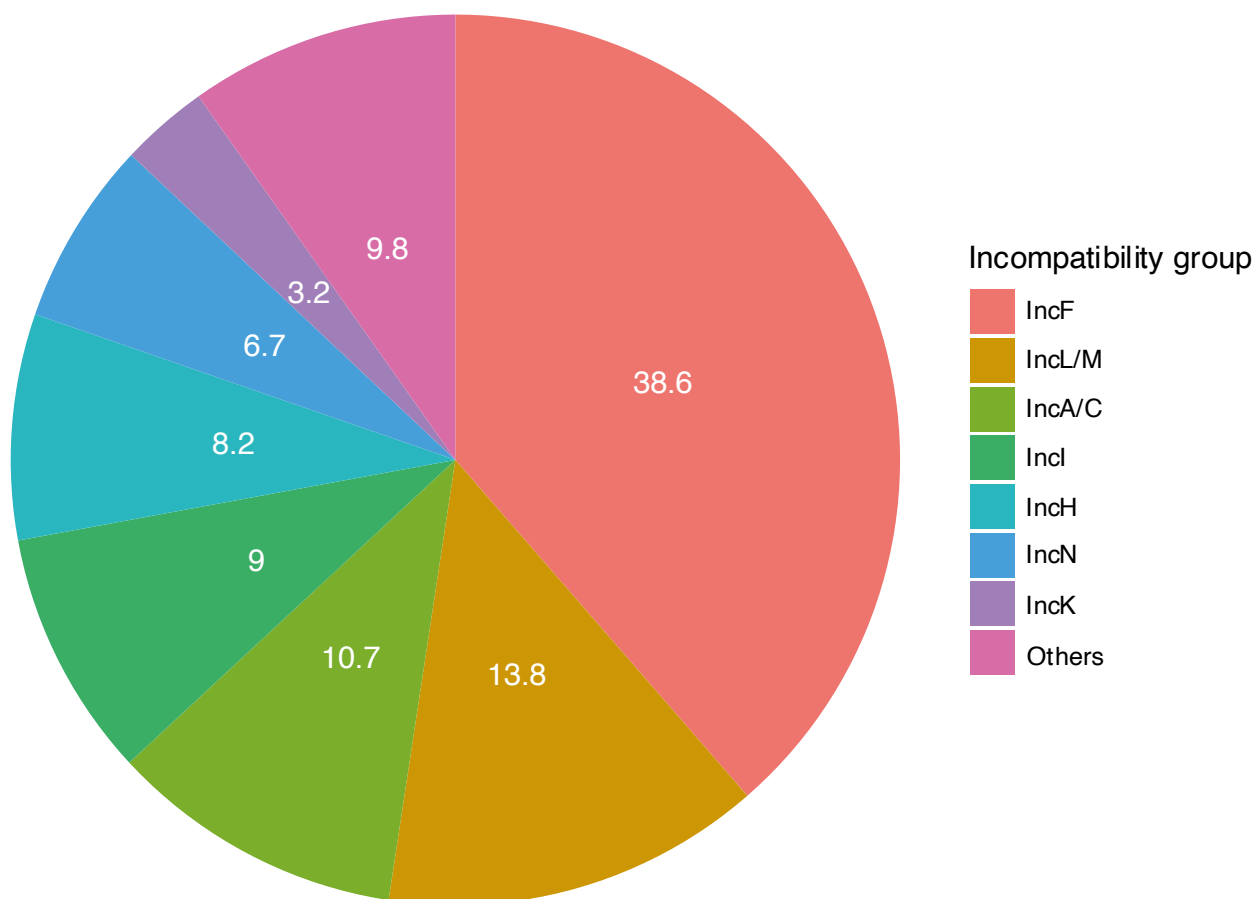


Figure 15 : Représentation de la proportion de plasmides, isolés chez l'humain, portant des gènes de résistances aux antibiotiques dans les Entérobactéries en fonction de leur groupe d'incompatibilité. Le groupe « others » regroupe les groupes d'incompatibilité : IncR, IncT, IncP, IncB/O, IncX, IncW et IncZ. Les données sont issues de l'étude Rozwandowicz et al., 2018 (sur 3186 plasmides) (Rozwandowicz et al., 2018).

Certains plasmides semblent également être associés à une gamme différente de classes de gènes de résistance aux antibiotiques, par exemple les plasmides du groupe d'incompatibilité IncI sont fortement associés aux gènes BLSE, et le gène *bla*_{OXA-48}, conférant une résistance aux carbapénèmes, est très fortement associé aux plasmides IncL/M dont fait partie le pOXA48 (Rozwandowicz *et al.*, 2018).

Ces données, nous ont poussé à nous orienter vers le plasmide pRP4 afin d'abriter notre système tueur. De plus, le pOXA48 étant un plasmide fréquemment retrouvé dans les isolats cliniques de *K. pneumoniae*, *E. coli* et *Shigella* multirésistants aux antibiotiques, si notre système tueur était abrité sur ce plasmide, nous n'aurions pas pu cibler ces isolats cliniques.

2. Développements de CoKiP spécifiques aux pathogènes sélectionnés :

Le module tueur du CoKiP est composé d'une toxine fractionnée en deux parties par une intéine. L'expression de ce module tueur est contrôlée par la présence d'un facteur de transcription activateur (comme ToxR dans le cas du module tueur spécifique à *V. cholerae*). Autrement dit, le FT activateur reconnaît la séquence d'ADN régulatrice en amont du module toxique et s'y fixe. La fixation du FT sur l'ADN induit ensuite le recrutement de l'ARN polymérase généralement par contact direct ou par changement de conformation de la région promotrice, permettant la fixation ultérieure de l'ARN polymérase (Browning and Busby, 2004). Afin de pouvoir cibler spécifiquement les bactéries pathogènes décrites précédemment, nous devons identifier pour chaque bactérie un facteur de transcription activateur spécifique et la région promotrice qu'il reconnaît afin de réguler l'expression de notre module tueur. En l'absence du facteur de transcription, l'expression du module tueur doit être la plus faible possible, c'est-à-dire qu'il faut choisir un facteur de transcription régulant l'expression de gènes qui ne sont normalement pas ou très peu exprimés. C'est notamment le cas pour les gènes jouant un rôle dans la virulence bactérienne. En effet, la virulence est en général un mécanisme coûteux pour la bactérie, et son expression est très fortement régulée. En l'absence du facteur de transcription activateur spécifique, ces gènes ne sont pas ou très peu exprimés, permettant à la bactérie d'économiser ses ressources lorsque la virulence n'est pas nécessaire.

Il est également nécessaire d'identifier le bon couple toxine-intéine capable de tuer (ou à minima de stopper la croissance) de la bactérie ciblée. Pour cela nous nous sommes basés sur une étude réalisée précédemment au sein de l'unité par R. Lopez-Igual et al (López-Igual *et al.*, 2023).

2.1. Module tueur spécifique à *Shigella*

Comme souligné précédemment, les bactéries du genre *Shigella* appartiennent à la même famille phylogénétique que les *E. coli*. La principale caractéristique les distinguant est la présence d'un plasmide de virulence nommé pINV portant les gènes de virulence du T3SS ainsi que le régulateur central de la virulence VirF. VirF est un facteur de transcription activateur spécifique aux Shigelles et EIEC, connu pour stimuler l'expression de plusieurs gènes dont *virB* et son absence ou inactivation rend la bactérie avirulente (Mills *et al.*, 1992). Autrement dit,

l'expression de VirF est nécessaire à la virulence de *Shigella*, ce qui en fait le candidat parfait pour contrôler l'expression de notre système tueur.

Nous avons tout d'abord vérifié la fonctionnalité de ce système, en clonant un gène rapporteur, ici une GFP à demi-vie courte, sur un plasmide mobilisable à faible nombre de copies (pSEVA228), sous le contrôle du promoteur *virB*. Ce plasmide a ensuite été transféré dans *E. coli* MG1655 (souche contrôle ne possédant pas le pINV) et *Shigella flexneri* 2a, possédant le pINV et donc *virF*. La fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux afin de suivre l'expression de la GFP.

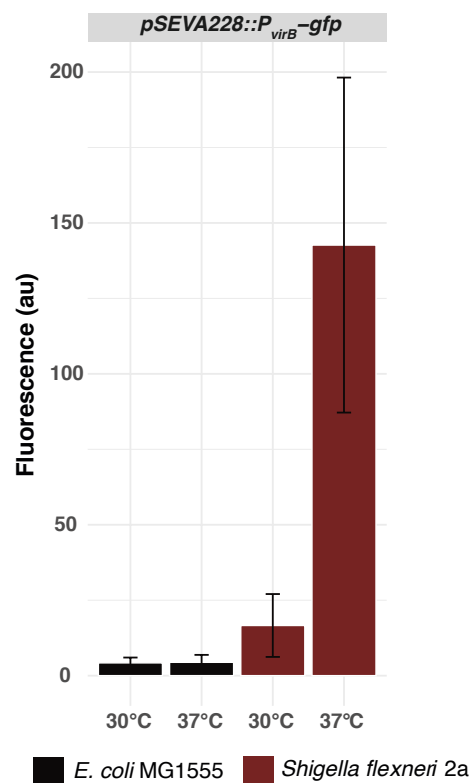


Figure 16 : Mesure de la fluorescence par cytométrie en flux des bactéries *E. coli* MG1655 et *S. flexneri* 2a possédant le plasmide pSEVA228::P_{virB}-gfp. La fluorescence a été mesurée après 3h de culture en milieu LB à 30°C ou 37°C.

Aucune fluorescence n'a été détectée chez *E. coli* que ce soit à 30°C ou 37°C. L'expression de la GFP est donc spécifique de *S. flexneri* et dépend de la présence du pINV (**figure 16**). Chez *Shigella*, la fluorescence est plus importante à 37°C, cela s'explique par le fait que l'expression de VirF est contrôlée par la température et est plus importante à 37°C qu'à 30°C. Ces résultats montrent que le promoteur du gène *virB* est activé en présence du facteur de transcription activateur VirF, et que lorsque celui-ci n'est pas présent, alors le promoteur est silencieux.

Une fois la spécificité du promoteur vérifiée, la toxine CcdB splitée par l'intéine idnaE a été clonée sur ce même plasmide sous le contrôle du promoteur virB. Ce plasmide, ainsi qu'un plasmide vide servant de contrôle, ont été transférés par conjugaison à *S. flexneri* 2a. Le taux de transfert a été calculé après 3 heures de conjugaison en divisant le nombre de transconjugants (bactéries receveuses ayant reçues le plasmide) par le nombre total de bactéries receveuses.

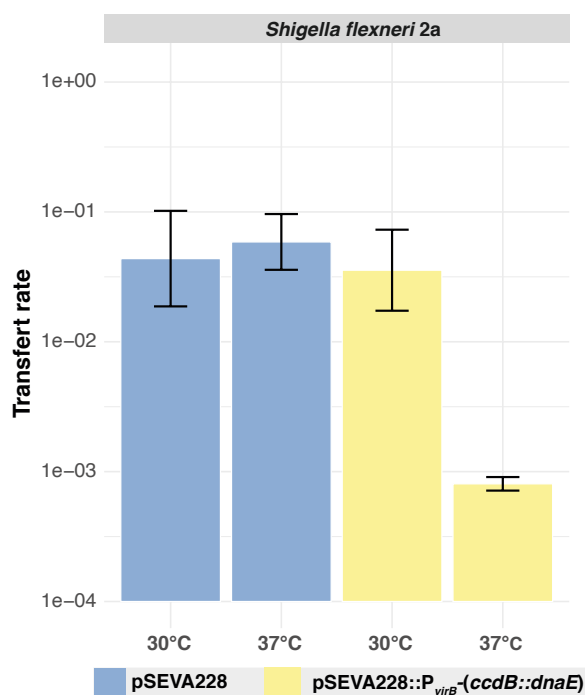


Figure 17 : Taux de transfert du plasmide contrôle (pSEVA228) et toxique (pSEVA228::P_{virB}-(ccdB::idnaE)) dans *S. flexneri* 2a à 30°C et 37°C.

Le taux de transfert du plasmide contrôle est identique entre 30°C et 37°C, cependant il est environ 80 fois plus faible pour le plasmide tueur entre 30°C et 37°C (**figure 17**). Cela signifie qu'à 37°C, lorsque VirF est exprimé, la présence du plasmide tueur est toxique et les bactéries meurent. Cependant tous les transconjugants ne sont pas éliminés, environ 1,25 % des bactéries ayant reçu le plasmide restent en vie et échappent à l'activité toxique du système tueur. Afin de comprendre quels étaient les mécanismes responsables de cet échappement, chaque transconjugant a été étudié et la présence du pINV, de virF et du système toxique ccdB::idnaE a été recherchée par PCR.

Dans la grande majorité des cas (>98 %), le transconjuguant a perdu le plasmide de virulence pINV et par extension le facteur de transcription VirF. Dans 1,3 % des cas, des recombinaisons d'IS entourant le gène *virF* ont été observées menant à la perte de *virF*. Une inactivation du système tueur, dans notre cas par insertion d'une IS dans le module toxine-intéine, n'a été observée que une seul fois ce qui représente environ 0,14 % des cas (**figure 18**). Autrement dit, dans plus de 98 % des cas la présence du système tueur dans *S. flexneri* à 37°C conduit à la mort de la bactérie et parmi les *escapers* (bactéries ayant échappées au système tueur), 99,8 % sont avirulentes. Finalement, seulement 0,0018 % des shigelles ayant reçues le plasmide tueur restent virulentes et en vie par inactivation du système toxique.

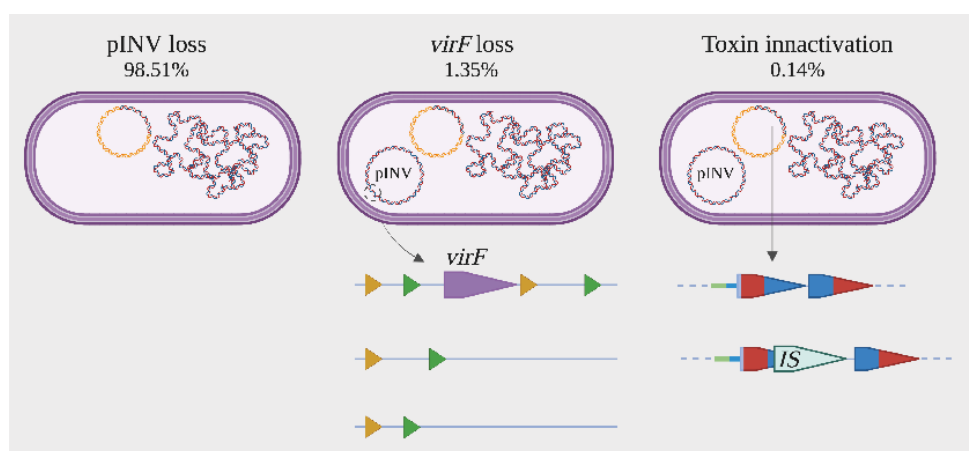


Figure 18 : Étude des « escapers » ayant échappés au système toxique.

Cependant, même si, l'efficacité de ce système tueur est importante et l'apparition de résistance faible, une limite importante réside dans la faible efficacité de transfert du plasmide mobilisable. En effet, même si quasiment toutes les bactéries ayant reçu le plasmide sont éliminées par le système tueur, seulement 8 % des shigelles reçoivent le plasmide mobilisable *in vivo* (**figure 17**). C'est pourquoi il est nécessaire d'améliorer les taux de transfert et de se rapprocher de 100 %. Cela peut être atteint en utilisant un plasmide conjugatif comme le pRP4 décrit précédemment. En effet avec ce plasmide un taux de transfert de 100 % a été observé *in vitro* (**figure 14**).

2.2. Module tueur spécifique à *Salmonella enterica*

Le génome de *Salmonella* comporte plusieurs grandes insertions appelées "îlots de pathogénicité de Salmonella" (SPI). Ces SPI codent pour des gènes essentiels à la survie de la bactérie dans l'organisme hôte. Ils sont notamment responsables de l'invasion, de la survie et

de la propagation extra-intestinale. Au total 17 SPI ont été identifiés. Le SPI-1, conservé chez tous les sérotypes de *S. enterica*, encode un T3SS nécessaire à l'invasion de l'épithélium intestinal (Kombade *et al.*, 2021). L'expression du régulon SPI-1 est dirigée par un mélange spécifique de signaux environnementaux tels que l'osmolarité, les peptides antimicrobiens, l'oxygène ou le pH. Ces signaux sont ensuite perçus par un ensemble de système de régulation à deux composants (PhoPQ, PhoBR, BarA/SirA et OmpR/EnvZ) qui vont eux même activer des facteurs de transcription centraux comme HilD ou HilE (**figure 12**) (Kombade *et al.*, 2021). Lorsque les conditions environnementales sont favorables à la virulence, le facteur de transcription HilD va être exprimé et va à son tour activer plusieurs autres gènes dont HilC, RtsA et HilA. HilD, HilC et RtsA forment une boucle de rétroaction positive, où chaque facteur promeut l'expression de lui-même, de *rtsA*, de *hilC* et de *hilA*, ce qui renforce considérablement le signal (Ellermeier *et al.*, 2005). HilA est souvent considéré comme le régulateur central de l'expression du SPI-1 puisque c'est lui qui contrôle l'expression de la majorité des gènes nécessaires à l'assemblage du T3SS et au stade précoce de l'invasion tissulaire (Kombade *et al.*, 2021). Son expression est strictement contrôlée par HilD, et sans lui, *hilA* n'est pas exprimé (Petrone *et al.*, 2014).

Comme souligné précédemment, la virulence chez *Salmonella enterica* est contrôlée par des signaux environnementaux complexe. Il a notamment été montré que des fortes concentrations en sels, ainsi qu'en magnésium étaient capables d'induire la transcription du T3SS (Tartera and Metcalf, 1993; Baxter and Jones, 2015). En effet, les systèmes à deux composants PhoPQ et PhoBR sont connus pour activer la transcription de HilE, lui-même répresseur de HilD (**figure 12**) (Kombade *et al.*, 2021). Le système PhoPQ est connu pour « sentir » la concentration en magnésium, lorsque la concentration en magnésium est faible, le senseur PhoQ cesse de déphosphoryler l'effecteur PhoP qui reste donc phosphorylé ce qui conduit à une augmentation de la transcription de *hilE* le répresseur de la virulence (Baxter and Jones, 2015). Ainsi une forte concentration en magnésium inhibe toute cette cascade et conduit à une augmentation de la transcription de *hilD* et à une activation de la virulence (**figure 12**). De plus, HilD est essentielle à l'activation de la virulence et sans lui les bactéries sont incapables d'activer le T3SS et d'envahir les cellules de l'hôte (Diard *et al.*, 2014).

Dans le cas de *Salmonella enterica* et de nombreuses autres bactéries, les facteurs de virulence nécessaires à l'invasion tissulaire de l'hôte sont exprimés de manière bimodale, une

sous-population exprime les gènes de virulence tandis qu'une seconde sous-population ne les exprime pas et est phénotypiquement avirulente. Comme souligné précédemment, l'expression des gènes de virulence est très coûteux pour la bactérie, ce qui cause un défaut de croissance. La sous-population avirulente, parfois aussi nommé *cheater* (tricheur en anglais), n'a quant-à-elle aucun défaut de croissance. Cette expression bimodale est essentielle à la pathogénicité de *Salmonella enterica* (Diard *et al.*, 2013). En effet, l'expression de la virulence et du T3SS est très coûteux pour la cellule bactérienne, tellement coûteux que la bactérie est comme « épuisée » et ne peut plus elle-même envahir le tissu de l'hôte. Cependant les *cheaters*, profitent de la dégradation des cellules épithéliales de l'hôte causée par les cellules virulentes pour envahir le tissu de l'hôte (Diard *et al.*, 2013).

Toutes ces données mènent à penser que HilD serait le facteur de transcription parfait pour activer notre système tueur spécifique à *Salmonella enterica* et la région promotrice de *hilA* parfaite pour contrôler son expression. C'est pourquoi, de la même manière que pour valider le système spécifique de *Shigella*, nous avons cloné un gène rapporteur, encore une fois une GFP à demi-vie courte, sous le contrôle du promoteur *hilA*. Cette fois, le plasmide rapporteur a été transféré par conjugaison dans *S. enterica* Typhimurium SL1344 et *E. coli* MG1655. La fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux après 4h, 8h et 16h de croissance en milieu LB Miller supplémenté par 0,08M de NaCl et 10mM de MgSO₄. La plus forte induction a été obtenue après 8 heures de croissance. Aucune fluorescence n'a été mesurée chez *E. coli*, soulignant la spécificité de l'activation de ce promoteur (**figure 19A**). Concernant *S. Typhimurium*, une expression bimodale est observée en accord avec la littérature. Entre 40 % et 60 % de la population produit la GFP et est donc virulente. Cependant, cette expression est très faible et pourrait ne pas être suffisante pour exprimer notre système toxine-intéine permettant de tuer la bactérie (**figure 19B**).

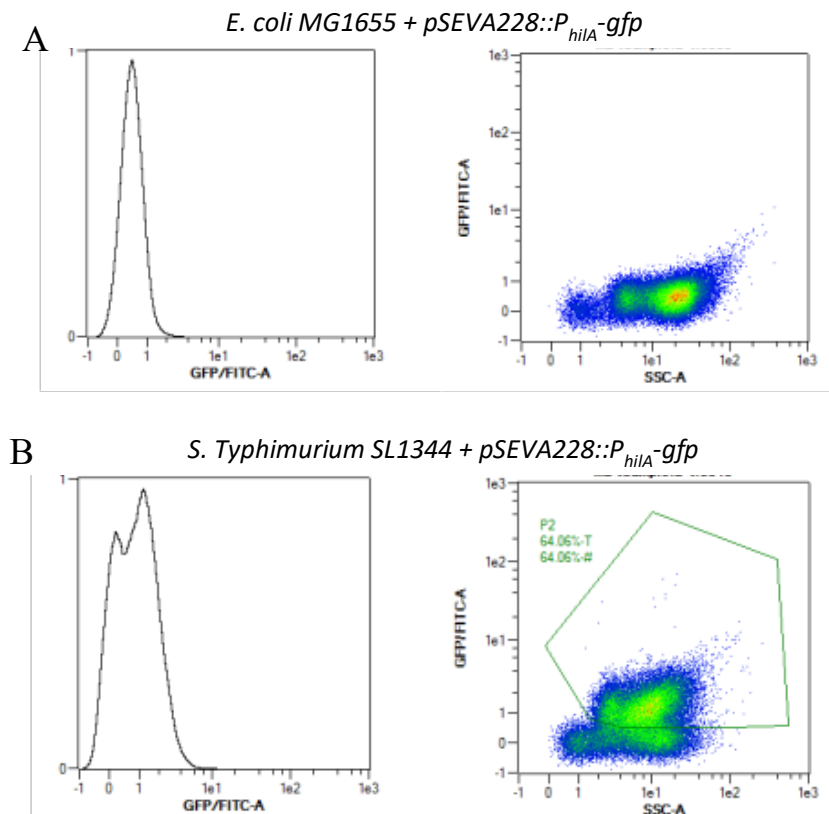


Figure 19 : Quantification de la fluorescence par cytométrie en flux après transfert du plasmide pSEVA228::P_{hilA}-gfp après 8h de croissance en milieu LB Miller supplémenté par 10mM de MgSO₄ et 0.08M de NaCl, dans une souche *E. coli* (A) ou *S. enterica* Typhimurium (B)

Il existe plusieurs options afin d'augmenter l'expression d'un gène, comme changer son promoteur, modifier son *Ribosome Binding Site* (RBS), la distance entre le codon start de la protéine et son RBS ou encore la séquence de la protéine afin de choisir des codons plus adaptés à la bactérie. Dans notre cas, la GFP utilisée est déjà rationalisée pour son usage chez les entérobactéries. Changer son promoteur risquerait de déréguler son système de contrôle par HilD, pouvant conduire à une perte de spécificité et à une expression même en l'absence de HilD, ce qui n'est pas souhaitable. Cependant, il est probablement possible de modifier la séquence du RBS ainsi que sa distance avec le codon start afin d'accroître l'expression de la GFP sans toucher au système de contrôle médié par HilD. La séquence canonique du RBS chez les entérobactéries est AGGAGG et sa distance optimale avec le codon start se situe aux alentours de 6-8 paires de bases (pb). Le RBS de *hilA* est AGAGA et est situé à 13pb de codon start (**figure 20**). Ce RBS ainsi que sa distance avec le codon start peuvent être rationalisés afin d'augmenter la transcription de la GFP. Le RBS naturel a donc été remplacé par le RBS canonique AGGAGG et placé à une distance de 8pb du codon start.

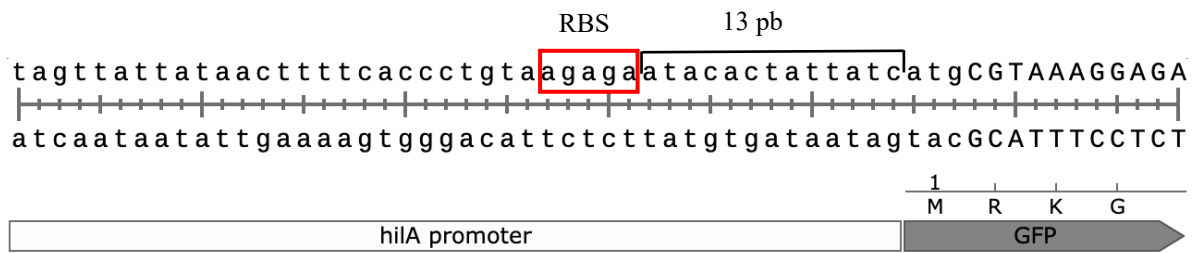


Figure 20 : Séquence régulatrice naturelle de hilA en amont du gène codant une gfp.

La spécificité ainsi que l'activité de cette nouvelle séquence régulatrice ont été étudiées de la même manière que précédemment en mesurant la fluorescence par cytométrie en flux après 8h de croissance en milieu LB Miller supplémenté en sel et magnésium. Aucune fluorescence n'a été mesurée chez *E. coli* (**figure 21A**). La modification du RBS n'a donc pas modifié la spécificité d'activation du système et celle-ci est encore dépendante de la présence de HilD. Cependant, la modification du RBS a permis une augmentation de l'expression de la GFP chez *S. Typhimurium* d'environ 50 fois (**figure 21B**). Cette expression importante devrait cette fois-ci être suffisante pour exprimer notre système toxine-intéine.

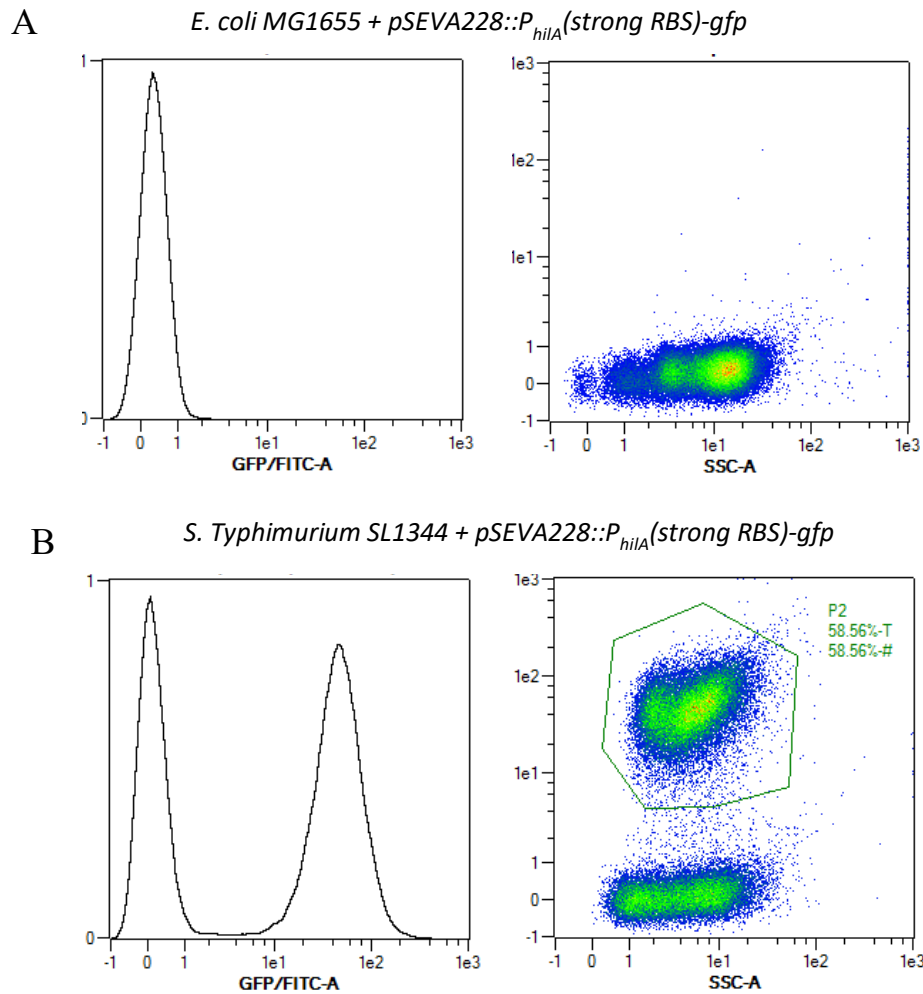


Figure 21 : Quantification de la fluorescence par cytométrie en flux après transfert du plasmide pSEVA228::P_{hilA}(strong-RBS)-gfp après 8h de croissance en milieu LB Miller supplémenté par 10mM de MgSO₄ et 0.08M de NaCl, dans une souche E. coli (A) ou S. enterica Typhimurium (B)

Le système tueur composé de la toxine HigB2 divisée en deux parties par l'intéine igyB a été cloné sur ce même plasmide sous le contrôle du promoteur de *hilA* avec le RBS modifié. La fonctionnalité du système HigB2::igyB a déjà été évaluée précédemment par une post-doctorante de l'unité (López-Igual *et al.*, 2023). Le plasmide tueur a été transmis par conjugaison à *E. coli* MG1655 et *S. enterica* Typhimurium SL1344. Après 3 heures de conjugaison sur milieu LB Miller, non supplémenté en sels et magnésium, la moitié de la biomasse a été utilisée pour évaluer le taux de transfert en divisant le nombre de transconjuguant par le nombre total de bactéries receveuses. Le reste de la biomasse a été incubé dans 5mL de milieu LB Miller supplémenté par 0,08M de NaCl et 10mM de MgSO₄ afin d'activer la transcription de *hilD* et la virulence. Après 5 heures de croissance, l'efficacité du système tueur

a été évaluée en comparant la proportion et nombre de transconjuguant avant et après l'induction de *hilD*. Cependant, aucune réduction du nombre de bactéries n'a été observée, signifiant que le système tueur n'a pas tué les bactéries activant *hilD*, représentant pourtant environ 50 % de la population totale après 5h de croissances dans nos conditions expérimentales. Plusieurs raisons peuvent expliquer cela. Il a été montré précédemment que la toxine *higB2* tue les bactéries 4h après avoir été induite (López-Igual *et al.*, 2023). Il se pourrait alors que l'induction de la toxine par *hilD* soit trop lente et faible et que la cinétique de notre expérience ne nous permette pas d'observer le *killing*. Une deuxième hypothèse serait que la présence du plasmide tueur dans la bactérie diminue/altère la virulence médiée par HilD. Afin d'étudier cette seconde hypothèse, le système rapporteur (P_{hilA} -*gfp*) a été cloné sur un second plasmide à faible nombre de copie possédant un système de réplication compatible avec celui du pSEVA228. Nous avons choisi pour cela le plasmide pSC101. Le pSC101:: P_{hilA} -*gfp* a ensuite été transféré par conjugaison à *E. coli* MG1655 et *S. enterica* Typhimurium SL1344 et l'expérience de *killing* a été répétée comme précédemment.

Cette fois-ci, en plus de mesurer le taux de transfert, nous avons mesuré par cytométrie en flux la fluorescence, permettant de suivre l'activation de la virulence médiée par HilD. Une fluorescence importante est détectée chez les bactéries ayant reçues le plasmide pSEVA228 vide sans le système tueur, signifiant que la virulence médiée par HilD est activée (**figure 22A**). Cependant, concernant les bactéries ayant reçues le plasmide pSEVA228 avec le système toxine::intéine, une fluorescence très faible est mesurée (**figure 22B**). Seulement une très faible partie de la population (environ 2 %) est fluorescente, et pour la majorité d'entre elles, l'activation est très faible laissant supposer que la présence du plasmide tueur, altère l'activation de la virulence médiée par HilD. Il se pourrait alors que le plasmide tueur empêche l'activation du SPI-1 et donc l'invasion des cellules de l'hôte, empêchant ainsi *Salmonella enterica* de causer la salmonellose.

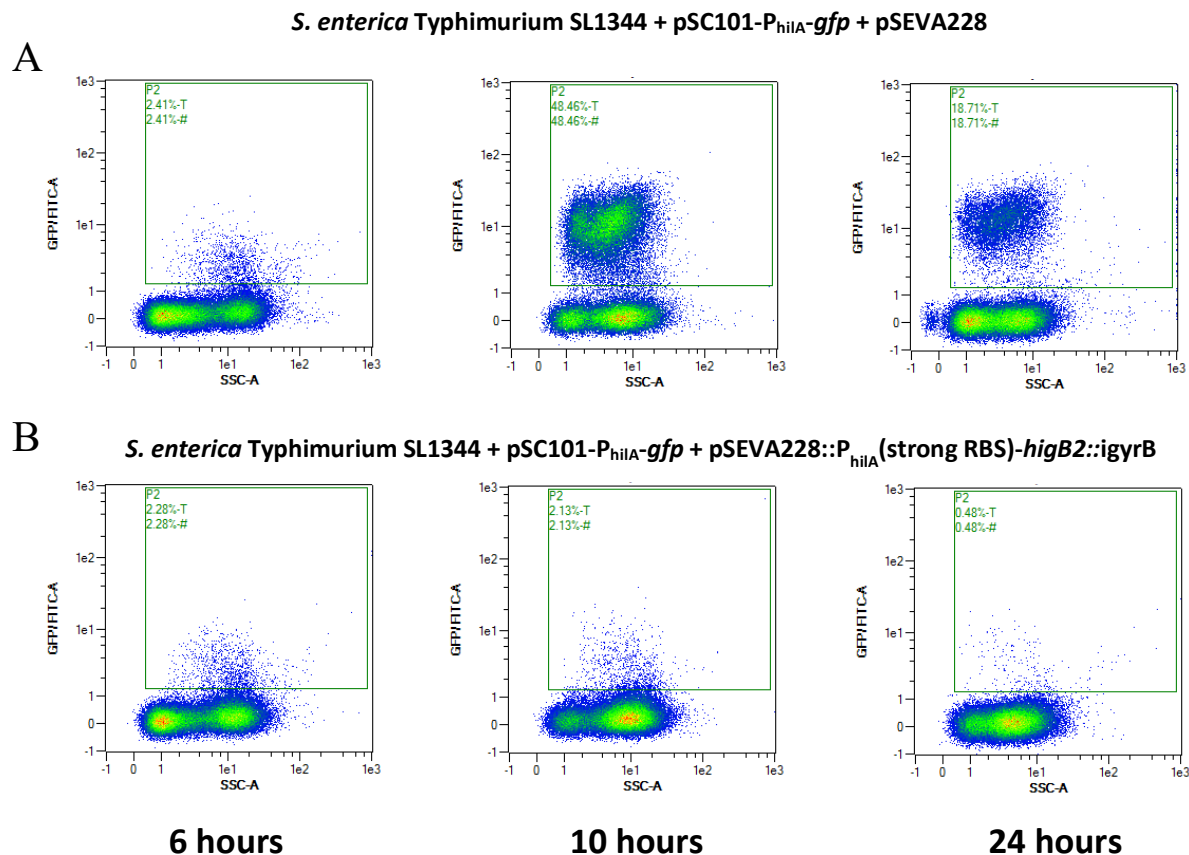


Figure 22 : Quantification de la fluorescence par cytométrie en flux après transfert du plasmide pSEVA228 vide (A) ou toxine::intéine (B) dans une souche de S. enterica Typhimurium ayant le plasmide rapporteur pSC101::P_{hilA}-gfp

La même expérience a été réalisée dans d'autres souches de *Salmonella enterica* dont *S. enterica* Typhi, Paratyphi A et Paratyphi B. Des résultats similaires ont été obtenus.

2.3. Module tueur spécifique à *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae possède plusieurs facteurs de virulence, l'un des plus communs est la présence de sidérophore permettant de chélater le fer dans l'organisme de l'hôte. La yersiniabactine est le sidérophore le plus courant, retrouvé dans 30 % à 40 % des isolats cliniques. Les gènes impliqués dans la synthèse, le transport et la régulation de ce sidérophore sont regroupé dans un HPI nommé locus ybt lui-même présent, chez *Klebsiella pneumoniae*, dans l'ICEKp.

Au sein de ce locus, le gène YbtA a été identifiée comme étant le régulateur central avec le régulateur d'absorption du fer Fur. En absence de fer, le régulateur Fur libère la région promotrice de *ybtA* permettant sa transcription puis sa traduction. Une fois traduite, la protéine

YbtA régulera la transcription des 4 opérons du locus (**figure 9**). Sa fonction est différente en fonction de l'opéron. En effet, la fixation de YbtA sur sa propre région promotrice réprime sa transcription d'environ 2,8 fois, tandis que sur les 3 autres régions promotrices de l'opéron, sa fixation active la transcription de 16, 50 et 109 fois respectivement pour l'opéron *irp2*, *psn* et *ybtP* (Perry and Fetherston, 2011).

D'après ces données, le régulateur YbtA pourrait être un candidat intéressant pour contrôler l'expression de notre système toxique. De plus, le locus *ybt* n'est pas présent que chez *Klebsiella pneumoniae*, mais aussi chez les bactéries du genre *Yersinia* comme *Yersinia pestis* ou *pseudotuberculosis* mais aussi chez certains *E. coli* uro-pathogènes (UPEC) (Henderson *et al.*, 2009). D'une manière générale cela nous permettrait de cibler toutes les bactéries possédant le locus *ybt*. Comme souligné précédemment, YbtA régule l'expression de plusieurs opérons, il existe 3 séquences promotrices connues activées par ce facteur de transcription. La région promotrice de l'opéron *ybtP* chevauche celle du gène *ybtA*, rendant plus compliqué l'identification de la vraie région promotrice nécessaire au contrôle de l'opéron *ybtP*. Cette région promotrice n'a donc pas été testée et les deux autres régions ont été privilégiées.

Plusieurs versions du plasmide rapporteur, permettant de vérifier la spécificité du système ont été construites afin de tester ces deux séquences promotrices. Pour cela les séquences promotrices de l'opéron *irp2* et *psn* ont été placées en amont d'un gène codant une GFP afin de suivre l'expression médiée par YbtA. Les plasmides ont ensuite été transférés par conjugaison dans une souche *E. coli* MG1655, et dans *Klebsiella pneumoniae* BJ1-GA (souche hypervirulente ST380, **tableau II**). Puis la fluorescence a été mesurée par cytométrie en flux après 5, 8 et 24h de croissance en milieu 63B1 supplémenté par 0,4 % de glucose. Ce milieu possède la spécificité de ne contenir que des traces de fer, suffisante pour la croissance bactérienne mais permettant d'activer le locus *ybt*. La version du plasmide rapporteur avec la région promotrice *psn*, a montré une expression chez *E. coli*, signifiant que ce promoteur permet une expression basale, non voulue pour le contrôle de notre système tueur. Cependant, aucune fluorescence n'a été détectée dans la souche d'*E. coli* avec le plasmide rapporteur pSEVA228::P_{irp2}-*gfp*, signifiant que l'activation de ce promoteur est bien dépendante de la présence de YbtA (**figure 23A**). Une expression bimodale est observée chez *K. pneumoniae*. Même si la majeure partie de la population (70 à 80 %) exprime la GFP (**figure 23B**), cette

expression est faible et de la même manière que pour *Salmonella enterica*, pourrait être améliorée en modifiant le RBS.

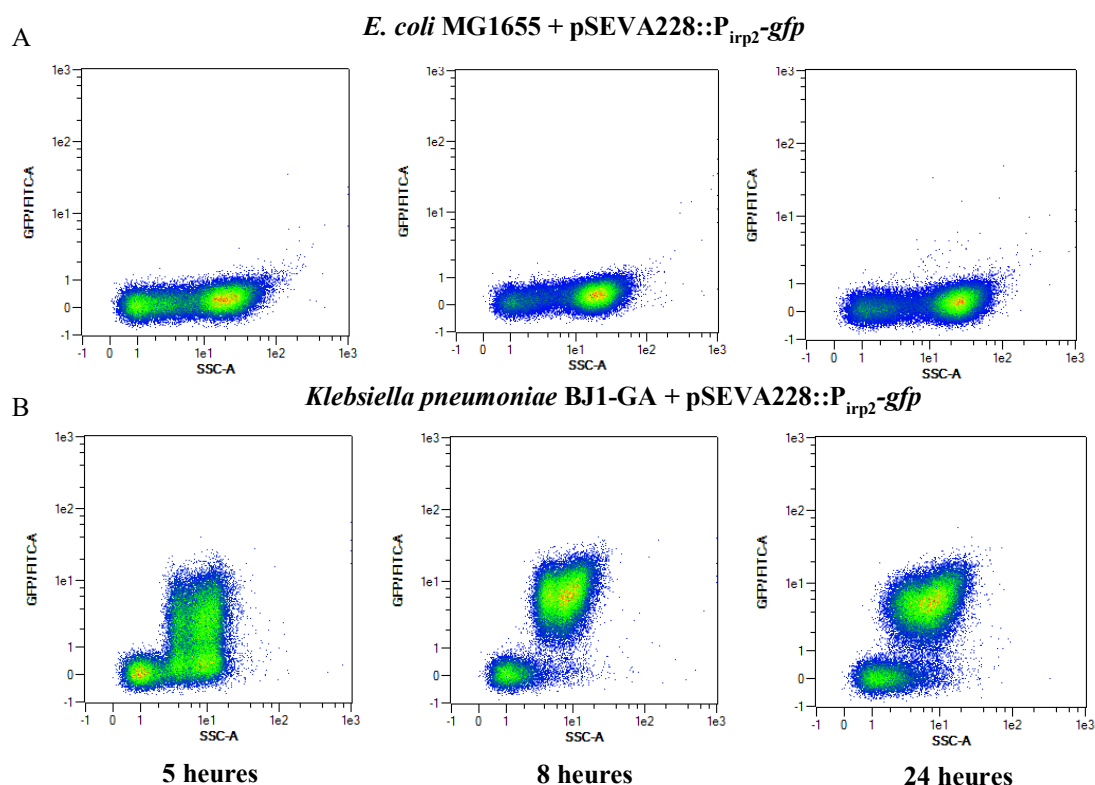


Figure 23 : Quantification de la fluorescence par cytométrie en flux après transfert du plasmide pSEVA228::P_{irp2}-gfp dans une souche *E. coli* (A) ou *K. pneumoniae* (B).

Cette fois-ci, la séquence du RBS est déjà similaire à la séquence canonique AGGAGG. Cependant la distance entre le RBS et le codon start n'est pas optimale et n'est que de 4 paires de bases (**figure 24**). Augmenter cette distance pourrait permettre une meilleure transcription.

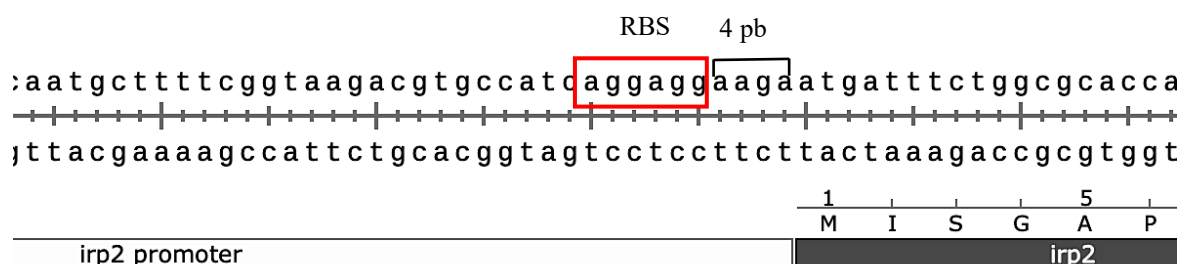


Figure 24 : Partie de la séquence régulatrice naturelle du gène *irp2* du locus *ybt*.

Plusieurs variantes ont été construites en ajoutant 1, 2, 3 ou 4 nucléotides entre le RBS et le codon de démarrage. La variante avec 2 nucléotides supplémentaires (distance totale de 6pb), permet l'expression la plus importante (environ 10 fois supérieure à la version originale) sans

perdre la spécificité de l'expression. C'est pourquoi cette région promotrice modifiée sera utilisée pour contrôler l'expression du système tueur (région promotrice de *irp2* avec 2pb supplémentaire entre le RBS et le codon de démarrage).

Actuellement le plasmide tueur spécifique à *Klebsiella pneumoniae* est toujours en cours d'étude et de développement, mais il sera très probablement composé de la toxine *parE2* divisée en deux parties par l'intéine *idnaX*. La fonctionnalité du système *parE2::idnaX* a déjà été évaluée précédemment et est détaillée dans l'article suivant (López-Igual *et al.*, 2023).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Il est communément admis que lorsque la pression de sélection exercée par les antibiotiques s'arrête, les bactéries non résistantes aux antibiotiques redeviennent majoritaires. Cependant, une revue publiée dans *Lancet* met en avant le fait que l'acquisition de mécanismes de résistances ne compromet pas nécessairement la croissance bactérienne (Holmes *et al.*, 2016). Autrement dit, la présence de gènes codant des mécanismes de résistances aux antibiotiques n'a pas forcément un coût de fitness. Cela permettrait d'expliquer la dissémination mondiale des bactéries multi-résistantes ainsi que leur persistance dans l'environnement et dans les microbiotes humains et animaux en l'absence de pression de sélection. La réversibilité de la résistance aux antibiotiques n'est donc pas obligatoire, c'est pourquoi il est essentiel de minimiser au maximum l'émergence de résistances (Holmes *et al.*, 2016).

La résistance aux antibiotiques est un phénomène global, il est nécessaire d'éviter l'usage abusif des antibiotiques aussi bien dans la médecine humaine que vétérinaire. C'est pourquoi des règles de bon usage doivent être appliquées. Il est par exemple essentiel d'utiliser le bon antibiotique. Pour cela, les antibiogrammes sont de puissants outils pour vérifier la sensibilité de la bactérie aux antibiotiques. De plus, les antibiotiques sont inefficaces sur les infections d'origine virale. Les tests rapides d'orientation de diagnostic (TROD) permettent dans certains cas d'identifier le pathogène en cause et de justifier l'utilisation d'antibiotiques pour traiter l'infection. Le développement de méthodes de diagnostic et d'identification de la souche bactérienne de plus en plus rapides et performantes permettront d'utiliser le bon antibiotique dès le début de l'infection. La posologie est également importante, une durée de traitement trop courte ou trop longue peut engendrer l'apparition d'antibiorésistance, tout comme une dose trop faible (ANSM, 2020). Le pharmacien a également un rôle important à jouer dans l'éducation thérapeutique du patient et le contrôle de la délivrance des antibiotiques afin d'éviter tout mésusage qui pourrait conduire à l'apparition de résistances. Une étude réalisée dans 100 pharmacies françaises a permis de mettre en évidence les bénéfices de la dispensation des antibiotiques à l'unité. En effet, en plus de l'intérêt économique (réduction du nombre de comprimés dispensés), la dispensation à l'unité permet de limiter le mésusage. En effet 1 patient sur 10 affirme qu'il utilise les antibiotiques dispensés en trop en automédication. En plus de ce chiffre élevé, 13 % des patients ne recyclent pas les antibiotiques, ceux-ci se retrouvent dans le circuit des déchets ménagers communs et peuvent se finir dans l'environnement (Treibich *et al.*, 2017). Les antibiotiques périmés, sous-dosés et les contrefaçons participent aussi grandement à l'apparition de résistances (Almuzaini *et al.*, 2013). Finalement, lutter contre

l'apparition des infections est probablement le meilleur moyen pour éviter le développement de l'antibiorésistance. En effet, en l'absence d'infection, les antibiotiques ne seront pas prescrits. C'est pourquoi la vaccination, l'éducation à l'hygiène et à la santé ainsi que le traitement des eaux usées sont importants.

Face à l'émergence de l'antibiorésistance, de nombreuses nouvelles stratégies sont en cours de développement afin de lutter contre les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques. Parmi elles, la thérapie phagique a une place privilégiée. Cependant, plusieurs limites compliquent son utilisation clinique. Dans de nombreux cas, la bactérie en cause de l'infection n'est pas identifiée au moment de la mise en place du traitement. Celui-ci repose sur une antibiothérapie probabiliste avec l'utilisation d'antibiotiques à large spectre, pouvant être actif sur la majorité des pathogènes responsables de ce type d'infection. La spécificité des phages, généralement envers une espèce ou une souche bactérienne, oblige l'identification précise de la bactérie causant l'infection avant leur utilisation. De plus les bactéries peuvent devenir résistantes aux bactériophages. En plus de leur utilisation dans la phagothérapie, les phages peuvent également jouer un rôle dans la délivrance d'antimicrobiens ciblés et la vaccination. Pour finir, les dépolymérase phagiques pourraient aussi jouer un rôle important dans les thérapies du futurs grâce à leurs capacités à dégrader les biofilms bactériens, sensibiliser aux antibiotiques et phages ainsi que potentialiser le système immunitaire de l'hôte. Les peptides antimicrobiens, dont la colistine est la tête de proue, occupent également une place importante dans la lutte contre l'antibiorésistance. Leurs doubles actions antimicrobiennes et modulateurs de l'immunité de l'hôte en font des candidats médicaments pouvant occuper une place privilégiée parmi les thérapies alternatives aux antibiotiques. Même si les bactéries deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques, ceux-ci restent tout de même une arme importante dans la lutte contre les infections bactériennes. Plusieurs molécules ont montré une synergie avec les antibiotiques permettant de limiter l'apparition de résistances mais aussi de sensibiliser les bactéries aux antibiotiques. Les antibiotiques peuvent également être conjugués à des nanoparticules permettant d'augmenter leur efficacité ou à des anticorps permettant d'améliorer leur spécificité. Des stratégies plus originales sont également en cours de développement, parmi elles, on retrouve les stratégies basées sur la conjugaison bactérienne. Ces stratégies reposent sur la dissémination d'un plasmide mobilisable ou conjugatif, permettant l'éradication spécifique des bactéries pathogènes et/ou résistantes aux antibiotiques grâce à l'utilisation d'un système CRISPR-Cas ou de module toxique. Au sein de ces stratégies, on retrouve celle

développée par l'unité PGB reposant sur la dissémination d'un plasmide mobilisable codant un module toxine::intéine dont l'expression est contrôlée par un facteur de transcription spécifique à la bactérie pathogène ciblée. Ce système a montré son efficacité aussi bien *in vivo* qu'*in situ* dans l'éradication de *V. cholerae*. Cependant, l'efficacité de transfert limitée du plasmide mobilisable est la principale limite de cette stratégie. Afin d'améliorer cette efficacité de transfert, une des possibilités est l'utilisation d'un plasmide conjugatif, qui serait capable de se propager au sein d'une population microbienne complexe efficacement. Pour cela, l'efficacité de transfert, de 4 plasmides conjugatifs à large gamme d'hôtes, a été étudiée.

Ces données, en plus des données bibliographiques sur la gamme d'hôtes ainsi que sur les groupes d'incompatibilités plasmidiques, nous ont permis d'identifier le plasmide RP4 comme étant le plasmide favori pour accueillir le système toxine::intéine développé précédemment. Une rationalisation (*streamlining*) du plasmide est en cours afin de supprimer les IS et gènes de résistances aux antibiotiques qui nuisent à sa stabilité et biosécurité.

Le système tueur spécifique à *Shigella* et *Salmonella enterica*, composé d'une toxine divisée en deux parties par une intéine dont l'expression est contrôlée par la présence d'un facteur de transcription activateur spécifique, est finalisé et a montré une bonne efficacité *in vivo*. Le système tueur spécifique à *Shigella*, est activé par la présence de VirF, le régulateur central de la virulence chez *Shigella*. Ce système permet, *in vivo*, de tuer ou de rendre avirulente, plus de 99,998% des bactéries ayant reçu le plasmide. Le système tueur spécifique à *Salmonella enterica*, est lui aussi finalisé et les premiers tests *in vivo*, montrent que sa présence perturbe l'activation de la virulence médiée par HilD, le régulateur central du SPI-1 chez *Salmonella enterica*, qui permet l'initiation de la virulence et de l'invasion tissulaire. Cependant, comme pour *Shigella*, des tests *in situ*, directement dans des organismes modèles comme des souris gnotobiotiques devront être réalisés afin de confirmer ces premiers résultats. Concernant *Klebsiella pneumoniae*, le système tueur n'est pas complètement finalisé. L'activation de celui-ci est dépendant de la présence du locus *ybt*, permettant la synthèse de la yersiniabactine, un sidérophore jouant un rôle important dans la virulence de *K. pneumoniae* et présent dans 30-40% des isolats cliniques.

Une fois les premières étapes de rationalisation du plasmide conjugatif RP4, permettant une meilleure biosécurité, finalisées, les systèmes tueurs déjà produits, seront transférés sur ce

plasmide afin d'évaluer leur efficacité sur un plasmide conjugatif capable de disséminer efficacement dans une population microbienne complexe.

Conclusion

De nombreuses nouvelles stratégies sont en cours de développement dans le traitement des infections bactériennes et de nouveaux vaccins et antibiotiques avec un mécanisme d'action innovant arriveront sur le marché au cours de cette décennie. L'antibiorésistance est un problème majeur de santé humaine mais des solutions existent. Continuer de sensibiliser les populations pour le bon usage des antibiotiques afin de minimiser l'apparition de résistance est primordial, tout comme investir dans la recherche afin de permettre le développement et l'étude de thérapies innovantes. Dans ce manuscrit, est détaillée, une stratégie reposant sur l'utilisation d'un plasmide conjugatif tueur, pouvant être comparé à une grenade génétique, permettant l'expression spécifique d'un module tueur directement dans la bactérie pathogène/résistante ciblée.

Références bibliographiques

- Abdi-Ali, A., Mohammadi-Mehr, M., and Agha Alaei, Y. (2006) Bactericidal activity of various antibiotics against biofilm-producing *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Antimicrob Agents* **27**: 196–200.
- Abraham, E.P., Chain, E., Fletcher, C.M., Florey, H.W., Gardner, A.D., Heatley, N.G., and Jennings, M.A. (1941) Further observations on penicillin. *Eur J Clin Pharmacol* **42**: 3–9.
- Ahmed, A., Azim, A., Gurjar, M., and Baronia, A.K. (2014) Current concepts in combination antibiotic therapy for critically ill patients. *Indian J Crit Care Med Peer-Rev Off Publ Indian Soc Crit Care Med* **18**: 310–314.
- Allard, N., Neil, K., Grenier, F., and Rodrigue, S. (2022) The Type IV Pilus of Plasmid TP114 Displays Adhesins Conferring Conjugation Specificity and Is Important for DNA Transfer in the Mouse Gut Microbiota. *Microbiol Spectr* **0**: e02303-21.
- Almuzaini, T., Choonara, I., and Sammons, H. (2013) Substandard and counterfeit medicines: a systematic review of the literature. *BMJ Open* **3**: e002923.
- Alonso-Del Valle, A., León-Sampedro, R., Rodríguez-Beltrán, J., DelaFuente, J., Hernández-García, M., Ruiz-Garbajosa, P., *et al.* (2021) Variability of plasmid fitness effects contributes to plasmid persistence in bacterial communities. *Nat Commun* **12**: 2653.
- Anderson, E.S., and Lewis, M.J. (1965) Drug resistance and its transfer in *Salmonella typhimurium*. *Nature* **206**: 579–583.
- ANSM, 2020 - Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (19 août 2020) – Bien utiliser les antibiotiques. Disponible à l'adresse : <https://archiveansm.integra.fr/Dossiers/Antibiotiques/Bien-utiliser-les-antibiotiques>
- Ares-Arroyo, M., Coluzzi, C., and P.C. Rocha, E. (2022) Origins of transfer establish networks of functional dependencies for plasmid transfer by conjugation. *Nucleic Acids Res* gkac1079.
- Arul Selvaraj, R.C., Rajendran, M., and Nagaiah, H.P. (2019) Re-Potentialization of β -Lactam Antibiotic by Synergistic Combination with Biogenic Copper Oxide Nanocubes against Biofilm Forming Multidrug-Resistant Bacteria. *Mol Basel Switz* **24**.
- Baharoglu, Z., Krin, E., and Mazel, D. (2013) RpoS plays a central role in the SOS induction by sub-lethal aminoglycoside concentrations in *Vibrio cholerae*. *PLoS Genet* **9**: e1003421.
- Baharoglu, Z., and Mazel, D. (2014) SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev* **38**: 1126–1145.
- Baxter, M.A., and Jones, B.D. (2015) Two-Component Regulators Control *hlyA* Expression by Controlling *fimZ* and *hlyE* Expression within *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Infect Immun* **83**: 978–985.
- Bennett, J.W., and Chung, K.T. (2001) Alexander Fleming and the discovery of penicillin. *Adv Appl Microbiol* **49**: 163–184.
- Bialek-Davenet, S., Criscuolo, A., Ailloud, F., Passet, V., Jones, L., Delannoy-Vieillard, A.-S., *et al.* (2014) Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis* **20**: 1812–1820.
- Biragyn, A., Ruffini, P.A., Leifer, C.A., Klyushnenkova, E., Shakhov, A., Chertov, O., *et al.* (2002) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* **298**: 1025–1029.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., *et al.* (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453–1462.
- Blázquez, J., Oliver, A., and Gómez-Gómez, J.-M. (2002) Mutation and evolution of antibiotic resistance: antibiotics as promoters of antibiotic resistance? *Curr Drug Targets* **3**: 345–349.
- Bleriot, I., Blasco, L., Pacios, O., Fernández-García, L., Ambroa, A., López, M., *et al.* (2022) The role of PemIK (PemK/PemI) type II TA system from *Klebsiella pneumoniae* clinical strains in lytic phage infection. *Sci Rep* **12**: 4488.

- Borgeaud, S., Metzger, L.C., Scignari, T., and Blokesch, M. (2015) The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science* **347**: 63–67.
- Bosse, M.J., Gruber, H.E., and Ramp, W.K. (2005) Internalization of Bacteria by Osteoblasts in a Patient with Recurrent, Long-Term Osteomyelitis: A Case Report. *JBJS* **87**: 1343.
- Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenuth-Jeanjean, S., Tournibize, R., Diancourt, L., and Grimont, P. (2009) Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PloS One* **4**: e4982.
- Browning, D.F., and Busby, S.J.W. (2004) The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**: 57–65.
- Brunel, J. (1951) Antibiosis from Pasteur to Fleming. *J Hist Med Allied Sci* **6**: 287–301.
- Burrus, V., Quezada-Calvillo, R., Marrero, J., and Waldor, M.K. (2006) SXT-Related Integrating Conjugative Element in New World *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3054–3057.
- Carattoli, A. (2009) Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2227–2238.
- Cassini, A., Högberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., *et al.* (2019) Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet Infect Dis* **19**: 56–66.
- Chain, E., Florey, H.W., Adelaide, M.B., Gardner, A.D., Heatley, N.G., Jennings, M.A., *et al.* (1940) Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Clin Orthop* 3–7.
- Chertov, O., Michiel, D.F., Xu, L., Wang, J.M., Tani, K., Murphy, W.J., *et al.* (1996) Identification of defensin-1, defensin-2, and CAP37/azurocidin as T-cell chemoattractant proteins released from interleukin-8-stimulated neutrophils. *J Biol Chem* **271**: 2935–2940.
- Citorik, R.J., Mimee, M., and Lu, T.K. (2014) Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotechnol* **32**: 1141–1145.
- Clardy, J., Fischbach, M., and Currie, C. (2009) The natural history of antibiotics. *Curr Biol CB* **19**: R437–R441.
- Clark, J.R., and March, J.B. (2004) Bacterial viruses as human vaccines? *Expert Rev Vaccines* **3**: 463–476.
- Collins, L.T., Otoupal, P.B., Campos, J.K., Courtney, C.M., and Chatterjee, A. (2019) Design of a De Novo Aggregating Antimicrobial Peptide and a Bacterial Conjugation-Based Delivery System. *Biochemistry* **58**: 1521–1526.
- Commission Européenne (22 décembre 2005) – Interdiction des antibiotiques comme facteurs de croissance dans les aliments pour animaux. Disponible à l'adresse : https://ec.europa.eu/commission/presscorner/detail/fr/IP_05_1687
- CORDIS - Community Research and Development Information Service (7 juin 2019) - Final Report Summary - NAREB (Nanotherapeutics for antibiotic resistant emerging bacterial pathogens). Disponible à l'adresse : <https://cordis.europa.eu/project/id/604237/reporting/fr>
- Costa-Gouveia, J., Aínsa, J.A., Brodin, P., and Lucía, A. (2017) How can nanoparticles contribute to antituberculosis therapy? *Drug Discov Today* **22**: 600–607.
- Craig, L., Forest, K.T., and Maier, B. (2019) Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nat Rev Microbiol* **17**: 429–440.
- Cryan, J.F., O’Riordan, K.J., Cowan, C.S.M., Sandhu, K.V., Bastiaanssen, T.F.S., Boehme, M., *et al.* (2019) The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev* **99**: 1877–2013.
- Cunha, B.A. (2004) The cause of the plague of Athens: plague, typhoid, typhus, smallpox, or measles? *Infect Dis Clin North Am* **18**: 29–43.
- Cury, J., Abby, S.S., Doppelt-Azeroual, O., Néron, B., and Rocha, E.P.C. (2020) Identifying Conjugative Plasmids and Integrative Conjugative Elements with CONJscan. *Methods Mol Biol Clifton NJ* **2075**: 265–283.
- Cuyper, W.L., Jacobs, J., Wong, V., Klemm, E.J., Deborggraeve, S., and Van Puyvelde, S. (2018) Fluoroquinolone resistance in *Salmonella*: insights by whole-genome sequencing. *Microb Genomics* **4**: e000195.

- Dabrowska, K., Swiła-Jelen, K., Opolski, A., Weber-Dabrowska, B., and Gorski, A. (2005) Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol* **98**: 7–13.
- Darmon, E., and Leach, D.R.F. (2014) Bacterial genome instability. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **78**: 1–39.
- Darwin, C. (1859) *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. .
- Delver, E.P., and Belogurov, A.A. (1997) Organization of the leading region of IncN plasmid pKM101 (R46): a regulation controlled by CUP sequence elements. *J Mol Biol* **271**: 13–30.
- D’Herelle, F. (2007) On an invisible microbe antagonistic toward dysenteric bacilli: brief note by Mr. F. D’Herelle, presented by Mr. Roux. 1917. *Res Microbiol* **158**: 553–554.
- Diard, M., Garcia, V., Maier, L., Remus-Emsermann, M.N.P., Regoes, R.R., Ackermann, M., and Hardt, W.-D. (2013) Stabilization of cooperative virulence by the expression of an avirulent phenotype. *Nature* **494**: 353–356.
- Diard, M., Sellin, M.E., Dolowschiak, T., Arnoldini, M., Ackermann, M., and Hardt, W.-D. (2014) Antibiotic treatment selects for cooperative virulence of *Salmonella typhimurium*. *Curr Biol CB* **24**: 2000–2005.
- Díaz-Muñoz, S.L., and Koskella, B. (2014) Chapter Four - Bacteria–Phage Interactions in Natural Environments. In *Advances in Applied Microbiology*. Sariaslani, S., and Gadd, G.M. (eds). Academic Press, pp. 135–183 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128002599000044>. Accessed February 26, 2023.
- Dong, H., Xiang, H., Mu, D., Wang, D., and Wang, T. (2019) Exploiting a conjugative CRISPR/Cas9 system to eliminate plasmid harbouring the *mcr-1* gene from *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* **53**: 1–8.
- Dove, A.S., Dzurny, D.I., Dees, W.R., Qin, N., Nunez Rodriguez, C.C., Alt, L.A., *et al.* (2023) Silver nanoparticles enhance the efficacy of aminoglycosides against antibiotic-resistant bacteria. *Front Microbiol* **13** <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2022.1064095>. Accessed April 25, 2023.
- Dubos, R.J., and Hotchkiss, R.D. (1941) The production of bactericidal substance by aerobic sporulating bacilli. *J Exp Med* **73**: 629–640.
- Duchesne, E. (1897) *Contribution à l’étude de la concurrence vitale chez les microorganismes, antagonisme entre les moisissures et les microbes : thèse présentée à la Faculté de médecine*. <https://gallica.bnf.fr/ark:/12148/bpt6k9766202j>. Accessed June 23, 2021.
- Dufour, N., and Debarbieux, L. (2017) La phagothérapie - Une arme crédible face à l’antibiorésistance. *médecine/sciences* **33**: 410–416.
- Dy, R.L., Richter, C., Salmond, G.P.C., and Fineran, P.C. (2014) Remarkable Mechanisms in Microbes to Resist Phage Infections. *Annu Rev Virol* **1**: 307–331.
- Ellermeier, C.D., Ellermeier, J.R., and Slauch, J.M. (2005) HilD, HilC and RtsA constitute a feed forward loop that controls expression of the SPI1 type three secretion system regulator hilA in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **57**: 691–705.
- El-Sayed Ahmed, M.A.E.-G., Zhong, L.-L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y., and Tian, G.-B. (2020) Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerg Microbes Infect* **9**: 868–885.
- Emmerich, R., Korschun, A., and Löw, O. (1902) Die bakteriolytische Wirkung der Nukleasen und Nukleasen-Immunproteïdine als Ursache der natürlichen und künstlichen Immunität. *Centralblatt für Bakteriologie* .
- Emmerich, R., and Löw, O. (1899) Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. 1–65.
- Ferry, T., Kolenda, C., Batailler, C., Gustave, C.-A., Lustig, S., Malatray, M., *et al.* (2020) Phage Therapy as Adjuvant to Conservative Surgery and Antibiotics to Salvage Patients With Relapsing *S. aureus* Prosthetic Knee Infection. *Front Med* **7**: 570572.
- Fick, J., Söderström, H., Lindberg, R.H., Phan, C., Tysklind, M., and Larsson, D.G.J. (2009) Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environ Toxicol Chem* **28**: 2522–2527.
- Filutowicz, M., Burgess, R., Gamelli, R.L., Heinemann, J.A., Kurenbach, B., Rakowski, S.A., and Shankar, R. (2008) Bacterial conjugation-based antimicrobial agents. *Plasmid* **60**: 38–44.

- Fleming, A. (1929) On the Antibacterial Action of Cultures of a *Penicillium*, with Special Reference to their Use in the Isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol* **10**: 226–236.
- Fleming, A., and Wright, A.E. (1997) On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Proc R Soc Lond Ser B Contain Pap Biol Character* **93**: 306–317.
- Fleming, R.S., and Queen, F.B. (1946) Penicillin resistance; of bacteria; strain variations in penicillin sensitivity among bacterial species encountered in war wounds and infections. *Am J Clin Pathol* **16**: 63–65.
- Frost, L.S., Leplae, R., Summers, A.O., and Toussaint, A. (2005) Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* **3**: 722–732.
- Fursova, N.K., Astashkin, E.I., Knyazeva, A.I., Kartsev, N.N., Leonova, E.S., Ershova, O.N., *et al.* (2015) The spread of blaOXA-48 and blaOXA-244 carbapenemase genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Enterobacter* spp. isolated in Moscow, Russia. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* **14**: 46.
- Garcillán-Barcia, M.P., and Cruz, F. de la (2008) Why is entry exclusion an essential feature of conjugative plasmids? *Plasmid* **60**: 1–18.
- GLASS report (2022) *World Health Organ - WHO* <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240062702>. Accessed May 22, 2023.
- Griffith, Fred. (1928) The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* **27**: 113–159.
- Gu, H., Ho, P.L., Tong, E., Wang, L., and Xu, B. (2003) Presenting Vancomycin on Nanoparticles to Enhance Antimicrobial Activities. *Nano Lett* **3**: 1261–1263.
- Guerin, É., Cambray, G., Sanchez-Alberola, N., Campoy, S., Erill, I., Re, S.D., *et al.* (2009) The SOS Response Controls Integron Recombination. *Science* **324**: 1034–1034.
- Gupta, A., Mumtaz, S., Li, C.-H., Hussain, I., and Rotello, V.M. (2019) Combatting Antibiotic-Resistant Bacteria using Nanomaterials. *Chem Soc Rev* **48**: 415–427.
- Gupta, A., Saleh, N.M., Das, R., Landis, R.F., Bigdeli, A., Motamedchaboki, K., *et al.* (2017) Synergistic antimicrobial therapy using nanoparticles and antibiotics for the treatment of multidrug-resistant bacterial infection. *Nano Futur* **1**: 015004.
- Guynet, C., Cuevas, A., Moncalián, G., and Cruz, F. de la (2011) The *stb* operon balances the requirements for vegetative stability and conjugative transfer of plasmid R388. *PLoS Genet* **7**: e1002073.
- Haag, H., Hantke, K., Drechsel, H., Stojiljkovic, I., Jung, G., and Zühner, H. (1993) Purification of yersiniabactin: a siderophore and possible virulence factor of *Yersinia enterocolitica*. *Microbiology* **139**: 2159–2165.
- Hall, R.M. (1987) pKM101 is an IS46-promoted deletion of R46. *Nucleic Acids Res* **15**: 5479.
- Hamilton, T.A., Pellegrino, G.M., Therrien, J.A., Ham, D.T., Bartlett, P.C., Karas, B.J., *et al.* (2019) Efficient inter-species conjugative transfer of a CRISPR nuclease for targeted bacterial killing. *Nat Commun* **10**: 4544.
- Hancock, R.E., and Lehrer, R. (1998) Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnol* **16**: 82–88.
- Hancock, R.E.W., and Sahl, H.-G. (2006) Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol* **24**: 1551–1557.
- Hanlon, G.W., Denyer, S.P., Olliff, C.J., and Ibrahim, L.J. (2001) Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2746–2753.
- Hargraves, S., Greub, G., and Jacquier, N. (2020) Peptides antimicrobiens: une alternative aux antibiotiques? *Pipette - Swiss Lab Med A*: 14–16.
- Harmoinen, J., Mentula, S., Heikkilä, M., Rest, M. van der, Rajala-Schultz, P.J., Donskey, C.J., *et al.* (2004) Orally administered targeted recombinant Beta-lactamase prevents ampicillin-induced selective pressure on the gut microbiota: a novel approach to reducing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 75–79.
- Harms, A., Brodersen, D.E., Mitarai, N., and Gerdes, K. (2018) Toxins, Targets, and Triggers: An Overview of Toxin-Antitoxin Biology. *Mol Cell* **70**: 768–784.

- HAS, 2019 - Haute autorité de santé (4 juin 2019) - Antibiothérapie des infections à entérobactéries et à *Pseudomonas aeruginosa* chez l'adulte : place des carbapénèmes et de leurs alternatives. Disponible à l'adresse : https://www.has-sante.fr/jcms/c_2968915/fr/antibiotherapie-des-infections-a-enterobacteries-et-a-pseudomonas-aeruginosa-chez-l-adulte-place-des-carbapenemes-et-de-leurs-alternatives
- Heidelberg, J.F., Eisen, J.A., Nelson, W.C., Clayton, R.A., Gwinn, M.L., Dodson, R.J., *et al.* (2000) DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature* **406**: 477–483.
- Henderson, J.P., Crowley, J.R., Pinkner, J.S., Walker, J.N., Tsukayama, P., Stamm, W.E., *et al.* (2009) Quantitative Metabolomics Reveals an Epigenetic Blueprint for Iron Acquisition in Uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* **5**: e1000305.
- Hérelle, F. d', Dublanchet, A., and Schwartz, M. (2017) *Autobiographie de Félix d'Hérelle 1873-1949*. .
- Heß, S., Kneis, D., Virta, M., and Hiltunen, T. (2021) The spread of the plasmid RP4 in a synthetic bacterial community is dependent on the particular donor strain. *FEMS Microbiol Ecol* **97**: fiab147.
- Holmes, A.H., Moore, L.S.P., Sundsfjord, A., Steinbakk, M., Regmi, S., Karkey, A., *et al.* (2016) Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet Lond Engl* **387**: 176–187.
- Hölzl, M.A., Hofer, J., Steinberger, P., Pfistershammer, K., and Zlabinger, G.J. (2008) Host antimicrobial proteins as endogenous immunomodulators. *Immunol Lett* **119**: 4–11.
- Horvath, P., and Barrangou, R. (2010) CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**: 167–170.
- Hutchings, M.I., Truman, A.W., and Wilkinson, B. (2019) Antibiotics: past, present and future. *Curr Opin Microbiol* **51**: 72–80.
- Huynh, B.-T., Passet, V., Rakotondrasoa, A., Diallo, T., Kerleguer, A., Hennart, M., *et al.* (2020) *Klebsiella pneumoniae* carriage in low-income countries: antimicrobial resistance, genomic diversity and risk factors. *Gut Microbes* **11**: 1287–1299.
- Institut Pasteur (Mai 2021) – Résistances aux antibiotiques. Disponible à l'adresse : <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/resistance-aux-antibiotiques>
- Jans, C., Sarno, E., Collineau, L., Meile, L., Stärk, K.D.C., and Stephan, R. (2018) Consumer Exposure to Antimicrobial Resistant Bacteria From Food at Swiss Retail Level. *Front Microbiol* **9**: 362.
- Jenssen, H., Hamill, P., and Hancock, R.E.W. (2006) Peptide Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* **19**: 491–511.
- Ji, W., Lee, D., Wong, E., Dadlani, P., Dinh, D., Huang, V., *et al.* (2014) Specific Gene Repression by CRISPRi System Transferred through Bacterial Conjugation. *ACS Synth Biol* **3**: 929–931.
- Jin, Q., Yuan, Z., Xu, J., Wang, Y., Shen, Y., Lu, W., *et al.* (2002) Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res* **30**: 4432–4441.
- Johnson, C.M., and Grossman, A.D. (2015) Integrative and Conjugative Elements (ICEs): What They Do and How They Work. *Annu Rev Genet* **49**: 577–601.
- Klein, E.Y., Van Boeckel, T.P., Martinez, E.M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S.A., *et al.* (2018) Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci* **115**: E3463–E3470.
- Kolatka, K., Kubik, S., Rajewska, M., and Konieczny, I. (2010) Replication and partitioning of the broad-host-range plasmid RK2. *Plasmid* **64**: 119–134.
- Kombade, S., Kaur, N., Kombade, S., and Kaur, N. (2021) Pathogenicity Island in *Salmonella*. In *Salmonella spp. - A Global Challenge*. IntechOpen, <https://www.intechopen.com/chapters/75674>. Accessed May 15, 2023.
- Korzybski, T., Kowszyk-Gindifer, Z., and Kurylowicz, W. (2013) *Antibiotics: Origin, Nature and Properties*. Elsevier, .
- Kothari, C., Gaiind, R., Singh, L.C., Sinha, A., Kumari, V., Arya, S., *et al.* (2013) Community acquisition of β -lactamase producing Enterobacteriaceae in neonatal gut. *BMC Microbiol* **13**: 136.

- Kröger, C., Dillon, S.C., Cameron, A.D.S., Papenfort, K., Sivasankaran, S.K., Hokamp, K., *et al.* (2012) The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: E1277–E1286.
- Kruszewska, D., Sahl, H.-G., Bierbaum, G., Pag, U., Hynes, S.O., and Ljungh, A. (2004) Mersacidin eradicates methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in a mouse rhinitis model. *J Antimicrob Chemother* **54**: 648–653.
- Lam, M.M.C., Wick, R.R., Wyres, K.L., Gorrie, C.L., Judd, L.M., Jenney, A.W.J., *et al.* (2018) Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microb Genomics* **4**: e000196.
- Lan, R., Stevenson, G., and Reeves, P.R. (2003) Comparison of Two Major Forms of the *Shigella* Virulence Plasmid pINV: Positive Selection Is a Major Force Driving the Divergence. *Infect Immun* **71**: 6298–6306.
- Landis, R.F., Li, C.-H., Gupta, A., Lee, Y.-W., Yazdani, M., Ngernyung, N., *et al.* (2018) Biodegradable Nanocomposite Antimicrobials for the Eradication of Multidrug-Resistant Bacterial Biofilms without Accumulated Resistance. *J Am Chem Soc* **140**: 6176–6182.
- Lehar, S.M., Pillow, T., Xu, M., Staben, L., Kajihara, K.K., Vandlen, R., *et al.* (2015) Novel antibody-antibiotic conjugate eliminates intracellular *S. aureus*. *Nature* **527**: 323–328.
- Lemire, S., Yehl, K.M., and Lu, T.K. (2018) Phage-Based Applications in Synthetic Biology. *Annu Rev Virol* **5**: 453–476.
- León-Sampedro, R., DelaFuente, J., Díaz-Agero, C., Crellen, T., Musicha, P., Rodríguez-Beltrán, J., *et al.* (2021) Pervasive transmission of a carbapenem resistance plasmid in the gut microbiota of hospitalized patients. *Nat Microbiol* **6**: 606–616.
- Lerminiaux, N.A., and Cameron, A.D.S. (2019) Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Can J Microbiol* **65**: 34–44.
- Letarov, A., and Kulikov, E. (2009) The bacteriophages in human- and animal body-associated microbial communities. *J Appl Microbiol* **107**: 1–13.
- Li, P., Wan, P., Zhao, R., Chen, J., Li, X., Li, J., *et al.* (2022) Targeted Elimination of blaNDM-5 Gene in *Escherichia coli* by Conjugative CRISPR-Cas9 System. *Infect Drug Resist* **15**: 1707–1716.
- Li, X., Robinson, S.M., Gupta, A., Saha, K., Jiang, Z., Moyano, D.F., *et al.* (2014) Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. *ACS Nano* **8**: 10682–10686.
- López-Igual, R., Bernal-Bayard, J., Rodríguez-Patón, A., Ghigo, J.-M., and Mazel, D. (2019) Engineered toxin-intein antimicrobials can selectively target and kill antibiotic-resistant bacteria in mixed populations. *Nat Biotechnol* **37**: 755–760.
- López-Igual, R., Dorado-Morales, P., and Mazel, D. (2023) Increasing the Scalability of Toxin–Intein Orthogonal Combinations. *ACS Synth Biol* **12**: 618–623.
- Lowbury, E.J.L., Lilly, H.A., Kidson, A., Ayliffe, G.A.J., and Jones, R.J. (1969) Sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotics: Emergence of strains highly resistant to carbenicillin. *The Lancet* **294**: 448–452.
- Lu, T.K., and Collins, J.J. (2007) Dispersing biofilms with engineered enzymatic bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 11197–11202.
- Madrid, C., Nieto, J.M., and Juárez, A. (2002) Role of the Hha/YmoA family of proteins in the thermoregulation of the expression of virulence factors. *Int J Med Microbiol IJMM* **291**: 425–432.
- Maxwell, K.L. (2016) Phages Fight Back: Inactivation of the CRISPR-Cas Bacterial Immune System by Anti-CRISPR Proteins. *PLoS Pathog* **12**: e1005282.
- Maya, S., Indulekha, S., Sukhithasri, V., Smitha, K.T., Nair, S.V., Jayakumar, R., and Biswas, R. (2012) Efficacy of tetracycline encapsulated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles against intracellular infections of *Staphylococcus aureus*. *Int J Biol Macromol* **51**: 392–399.
- McEwen, S.A., and Collignon, P.J. (2018) Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiol Spectr* **6**.

- Meyer, R.J., and Helinski, D.R. (1977) Unidirectional replication of the P-group plasmid RK2. *Biochim Biophys Acta BBA - Nucleic Acids Protein Synth* **478**: 109–113.
- Mills, J.A., Venkatesan, M.M., Baron, L.S., and Buysse, J.M. (1992) Spontaneous insertion of an IS1-like element into the virF gene is responsible for avirulence in opaque colonial variants of *Shigella flexneri* 2a. *Infect Immun* **60**: 175–182.
- MASA, 2017 - Ministère de l'Agriculture et de la Souveraineté Alimentaire (24 août 2017) – La Salmonellose non typhique. Disponible à l'adresse : <https://agriculture.gouv.fr/la-salmonellose-non-typhique>
- Monaco, M., Pimentel de Araujo, F., Cruciani, M., Coccia, E.M., and Pantosti, A. (2017) Worldwide Epidemiology and Antibiotic Resistance of *Staphylococcus aureus*. *Curr Top Microbiol Immunol* **409**: 21–56.
- Monteiro, R., Pires, D.P., Costa, A.R., and Azeredo, J. (2019) Phage Therapy: Going Temperate? *Trends Microbiol* **27**: 368–378.
- Moré, M.I., Pohlman, R.F., and Winans, S.C. (1996) Genes encoding the pKM101 conjugal mating pore are negatively regulated by the plasmid-encoded KorA and KorB proteins. *J Bacteriol* **178**: 4392–4399.
- Mugabe, C., Halwani, M., Azghani, A.O., Lafrenie, R.M., and Omri, A. (2006) Mechanism of enhanced activity of liposome-entrapped aminoglycosides against resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 2016–2022.
- Munita, J.M., and Arias, C.A. (2016) Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr* **4**: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016–2015.
- Mushtaq, N., Redpath, M.B., Luzio, J.P., and Taylor, P.W. (2005) Treatment of experimental *Escherichia coli* infection with recombinant bacteriophage-derived capsule depolymerase. *J Antimicrob Chemother* **56**: 160–165.
- NAREB (2020) *SINTEF* <https://cordis.europa.eu/project/id/604237/reporting>. Accessed April 25, 2023.
- Neil, K., Allard, N., Grenier, F., Burrus, V., and Rodrigue, S. (2020) Highly efficient gene transfer in the mouse gut microbiota is enabled by the Inc2 conjugative plasmid TP114. *Commun Biol* **3**: 1–9.
- The New-York Times (26 juin 1945) - Penicillin's finder assay its future; Sir Alexander Fleming Says Improved Dosage Method Is Needed to Extend Use Other Scientists Praised Self-Medication Decried. Disponible à l'adresse : <https://www.nytimes.com/1945/06/26/archives/penicillins-finder-assays-its-future-sir-alexander-fleming-says.html>
- “Observables” at the Royal College of Surgeons (1950) *Ann R Coll Surg Engl* **6**: 140–141.
- OMS, 2015 - Organisation Mondiale de la Santé (2015) – Commentaire : Le monde risque de sombrer dans une ère post-antibiotiques. Disponibles à l'adresse : <https://apps.who.int/mediacentre/commentaries/antibiotic-resistance/fr/index.html>
- OMS, 2017 - Organisation Mondiale de la Santé (7 novembre 2017). Communiqué de presse ; Cessons d'utiliser des antibiotiques chez des animaux en bonne santé. Disponible à l'adresse : <https://www.who.int/fr/news/item/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>
- OMS, 2017b - Organisation Mondiale de la Santé (27 février 2017). Communiqué de presse ; L'OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d'avoir de nouveaux antibiotiques. Disponible à l'adresse : <https://www.who.int/fr/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>.
- OMS, 2022 - Organisation mondiale de la Santé (24 mars 2022). Bulletin d'information sur les flambées épidémiques ; Infections à *Shigella sonnei* ultrarésistantes – Europe. Disponible à l'adresse : <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/extensively-drug-resistant-shigella-sonnei-infections---europe>
- O'Neill, J. (2014) Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev Antimicrob Resist* <https://amr-review.org/>. Accessed July 22, 2020.
- Pandey, R., Sharma, S., and Khuller, G.K. (2006) Chemotherapeutic efficacy of nanoparticle encapsulated antitubercular drugs. *Drug Deliv* **13**: 287–294.
- Pansegau, W., Lanka, E., Barth, P.T., Figurski, D.H., Guiney, D.G., Haas, D., et al. (1994) Complete Nucleotide Sequence of Birmingham IncPa Plasmids: Compilation and Comparative Analysis. *J Mol Biol* **239**: 623–663.

Paolozzi, L., Liébart, J.-C., Bauda, P., Bodilis, J., Dussurget, O., and et al. (2021) *Microbiologie : biologie des procaryotes et de leurs virus*. 2e ed., Dunod, . <https://www.dunod.com/sciences-techniques/microbiologie-biologie-procaryotes-et-leurs-virus>. Accessed July 10, 2021.

Pasteur, L., and Joubert, J. (1877) Charbon et septicémie. *Bulletin Académie des Sciences* 101–115, 781–797 et 921–926 (tome 85).

Pena-Miller, R., Laehnemann, D., Jansen, G., Fuentes-Hernandez, A., Rosenstiel, P., Schulenburg, H., and Beardmore, R. (2013) When the Most Potent Combination of Antibiotics Selects for the Greatest Bacterial Load: The Smile-Frown Transition. *PLOS Biol* **11**: e1001540.

Perrin-Guyomard, A., Jouy, E., Urban, D., Chauvin, C., Granier, S.A., Mourand, G., et al. (2020) Decrease in fluoroquinolone use in French poultry and pig production and changes in resistance among *E. coli* and *Campylobacter*. *Vet Microbiol* **243**: 108637.

Perry, R.D., and Fetherston, J.D. (2011) Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect Inst Pasteur* **13**: 808–817.

Petrone, B.L., Stringer, A.M., and Wade, J.T. (2014) Identification of HilD-regulated genes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **196**: 1094–1101.

Pherecydes Pharma *Pherecydes* <https://www.pherecydes-pharma.com/>. Accessed February 27, 2023.

Pires, D.P., Oliveira, H., Melo, L.D.R., Sillankorva, S., and Azeredo, J. (2016) Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 2141–2151.

Que, Y.-A., Haeffliger, J.-A., Piroth, L., François, P., Widmer, E., Entenza, J.M., et al. (2005) Fibrinogen and fibronectin binding cooperate for valve infection and invasion in *Staphylococcus aureus* experimental endocarditis. *J Exp Med* **201**: 1627–1635.

Ramon, G., Richou, R., and Ramon, P. (1945) Culture du *B. subtilis* en milieu de composition chimique définie, en vue de la production et de l'extraction du principe antagoniste des bactéries pathogènes et des toxines microbiennes. *Comptes Rendus Hebd Seances Acad Sci* **221**: 165–167.

Reichert, G., Hilgert, S., Fuchs, S., and Azevedo, J.C.R. (2019) Emerging contaminants and antibiotic resistance in the different environmental matrices of Latin America. *Environ Pollut Barking Essex 1987* **255**: 113140.

Reuter, A., Hilpert, C., Dedieu-Berne, A., Lematre, S., Gueguen, E., Launay, G., et al. (2021) Targeted-antibacterial-plasmids (TAPs) combining conjugation and CRISPR/Cas systems achieve strain-specific antibacterial activity. *Nucleic Acids Res* **49**: 3584–3598.

Richard, E., Darracq, B., Littner, E., Vit, C., Whiteway, C., Bos, J., et al. (2022) Genetic drivers of chromosomal integron stability. 2022.08.03.502626 <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.08.03.502626v2>. Accessed December 26, 2022.

Rios, A.C., Moutinho, C.G., Pinto, F.C., Del Fiol, F.S., Jozala, A., Chaud, M.V., et al. (2016) Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiol Res* **191**: 51–80.

Robledo, M., Álvarez, B., Cuevas, A., González, S., Ruano-Gallego, D., Fernández, L.Á., and Cruz, F. de la (2022) Targeted bacterial conjugation mediated by synthetic cell-to-cell adhesions. *Nucleic Acids Res* **50**: 12938–12950.

Rodrigues, M., McBride, S.W., Hullahalli, K., Palmer, K.L., and Duerkop, B.A. (2019) Conjugative Delivery of CRISPR-Cas9 for the Selective Depletion of Antibiotic-Resistant Enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* **63**: e01454-19.

Rohde, C., Resch, G., Pirnay, J.-P., Blasdel, B.G., Debarbieux, L., Gelman, D., et al. (2018) Expert Opinion on Three Phage Therapy Related Topics: Bacterial Phage Resistance, Phage Training and Prophages in Bacterial Production Strains. *Viruses* **10**: 178.

Roussel, C., Vial, F., Heymans, G., and Rulliére, R. (1981) Des moisissures à la pénicilline. *Histoire des Sciences Médicales* **15**: 29–38.

Rozwandowicz, M., Brouwer, M.S.M., Fischer, J., Wagenaar, J.A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., et al. (2018) Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* **73**: 1121–1137.

Ruotsalainen, P., Penttinen, R., Mattila, S., and Jalasvuori, M. (2019) Midbiotics: conjugative plasmids for genetic engineering of natural gut flora. *Gut Microbes* **10**: 643–653.

- Salmond, G.P.C., and Fineran, P.C. (2015) A century of the phage: past, present and future. *Nat Rev Microbiol* **13**: 777–786.
- Samuel, B., and Burstein, D. (2023) A diverse repertoire of anti-defense systems is encoded in the leading region of plasmids. 2023.02.15.528439 <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2023.02.15.528439v1>. Accessed February 25, 2023.
- Sandberg, A., Hessler, J.H.R., Skov, R.L., Blom, J., and Frimodt-Møller, N. (2009) Intracellular Activity of Antibiotics against *Staphylococcus aureus* in a Mouse Peritonitis Model. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 1874–1883.
- Santé Publique France (27 avril 2022) - Épidémie internationale de salmonellose chez des jeunes enfants en lien avec la consommation de produits de la marque Kinder. Disponible à l'adresse : <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2022/epidemie-internationale-de-salmonellose-chez-des-jeunes-enfants-en-lien-avec-la-consommation-de-produits-de-la-marque-kinder.-point-de-situation-au5>
- Schatz, A., Bugie, E., and Waksman, S.A. (2005) Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram-positive and gram-negative bacteria. 1944. *Clin Orthop* 3–6.
- Schnupf, P., and Sansonetti, P.J. (2019) Shigella Pathogenesis: New Insights through Advanced Methodologies. *Microbiol Spectr* **7**: 7.2.28.
- Schooley, R.T., Biswas, B., Gill, J.J., Hernandez-Morales, A., Lancaster, J., Lessor, L., *et al.* (2017) Development and Use of Personalized Bacteriophage-Based Therapeutic Cocktails To Treat a Patient with a Disseminated Resistant *Acinetobacter baumannii* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* **61**.
- Shapiro, J.W., and Putonti, C. (2020) UPΦ phages, a new group of filamentous phages found in several members of Enterobacterales. *Virus Evol* **6**: veaa030.
- Sierra, J.M., Fusté, E., Rabanal, F., Vinuesa, T., and Viñas, M. (2017) An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opin Biol Ther* **17**: 663–676.
- Smaill, F.M., and Grivell, R.M. (2014) Antibiotic prophylaxis versus no prophylaxis for preventing infection after cesarean section. *Cochrane Database Syst Rev* CD007482.
- Smillie, C., Garcillán-Barcia, M.P., Francia, M.V., Rocha, E.P.C., and Cruz, F. de la (2010) Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR* **74**: 434–452.
- Smith, G.P. (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**: 1315–1317.
- Song, Z., Yu, Y., Bai, X., Jia, Y., Tian, J., Gu, K., *et al.* (2022) Pathogen-Specific Bactericidal Method Mediated by Conjugative Delivery of CRISPR-Cas13a Targeting Bacterial Endogenous Transcripts. *Microbiol Spectr* **10**: e01300-22.
- Sonnenborn, U., and Schulze, J. (2009) The non-pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 – features of a versatile probiotic. *Microb Ecol Health Dis* **21**: 122–158.
- Sorek, R., Kunin, V., and Hugenholtz, P. (2008) CRISPR — a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nat Rev Microbiol* **6**: 181–186.
- Stiefel, U., Nerandzic, M.M., Koski, P., and Donskey, C.J. (2008) Orally administered beta-lactamase enzymes represent a novel strategy to prevent colonization by *Clostridium difficile*. *J Antimicrob Chemother* **62**: 1105–1108.
- Sullivan, A., Edlund, C., and Nord, C.E. (2001) Effect of antimicrobial agents on the ecological balance of human microflora. *Lancet Infect Dis* **1**: 101–114.
- Sünderhauf, D., Pursey, E., Klümper, U., Westra, E., Gaze, W., and Houte, S. van (2019) AMR gene removal by conjugative delivery of CRISPR-Cas9. *Access Microbiol* **1** <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/acmi/10.1099/acmi.ac2019.po0082>. Accessed February 28, 2023.
- Sweere, J.M., Van Belleghem, J.D., Ishak, H., Bach, M.S., Popescu, M., Sunkari, V., *et al.* (2019) Bacteriophage trigger antiviral immunity and prevent clearance of bacterial infection. *Science* **363**: eaat9691.

- Tarkkanen, A.-M., Heinonen, T., Jögi, R., Mentula, S., Rest, M.E. van der, Donskey, C.J., *et al.* (2009) P1A recombinant beta-lactamase prevents emergence of antimicrobial resistance in gut microflora of healthy subjects during intravenous administration of ampicillin. *Antimicrob Agents Chemother* **53**: 2455–2462.
- Tartera, C., and Metcalf, E.S. (1993) Osmolarity and growth phase overlap in regulation of *Salmonella typhi* adherence to and invasion of human intestinal cells. *Infect Immun* **61**: 3084–3089.
- Territo, M.C., Ganz, T., Selsted, M.E., and Lehrer, R. (1989) Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. *J Clin Invest* **84**: 2017–2020.
- Thomas, C.M., and Smith, C.A. (1987) Incompatibility Group P Plasmids: Genetics, Evolution, and Use in Genetic Manipulation. *Ann Rev Microbiol* **41**: 77–101.
- Thucydide (IVe siècle av. J.-C) *La Guerre du Péloponnèse. Livre II*. <https://www.lesbelleslettres.com/livre/1243-la-guerre-du-peloponnese-tome-ii-1re-partie-livre-ii>. Accessed June 23, 2021.
- Thwaites, G.E., and Gant, V. (2011) Are bloodstream leukocytes Trojan Horses for the metastasis of *Staphylococcus aureus*? *Nat Rev Microbiol* **9**: 215–222.
- Treibich, C., Lescher, S., Sagaon-Teyssier, L., and Ventelou, B. (2017) The expected and unexpected benefits of dispensing the exact number of pills. *PLOS ONE* **12**: e0184420.
- Tremblay, Y.D.N., Hathroubi, S., and Jacques, M. (2014) Les biofilms bactériens : leur importance en santé animale et en santé publique. *Can J Vet Res* **78**: 110–116.
- Twort, F.W. (1915) An Investigation on the Nature of Ultra-Microscopic Viruses. <https://zenodo.org/record/2380119>. Accessed February 26, 2023.
- Van Epps, H.L. (2006) René Dubos: unearthing antibiotics. *J Exp Med* **203**: 259.
- Virolle, C., Goldlust, K., Djermoun, S., Bigot, S., and Lesterlin, C. (2020) Plasmid Transfer by Conjugation in Gram-Negative Bacteria: From the Cellular to the Community Level. *Genes* **11**: 1239.
- Wainwright, M. (2000) André Gratia (1893–1950): Forgotten Pioneer of Research into Antimicrobial Agents. *J Med Biogr* **8**: 39–42.
- Wainwright, M., and Swan, H.T. (1986) C.G. Paine and the earliest surviving clinical records of penicillin therapy. *Med Hist* **30**: 42–56.
- Waksman, S.A., and Lechevalier, H.A. (1949) Neomycin, a New Antibiotic Active against Streptomycin-Resistant Bacteria, including Tuberculosis Organisms. *Science* **109**: 305–307.
- Waldor, M.K., and Mekalanos, J.J. (1996) Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science* **272**: 1910–1914.
- Walsh, T.R., Weeks, J., Livermore, D.M., and Toleman, M.A. (2011) Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* **11**: 355–362.
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L., and Wang, H. (2020) The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *Int J Environ Res Public Health* **17**: 6278.
- Wang, L., Hu, C., and Shao, L. (2017) The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. *Int J Nanomedicine* **12**: 1227–1249.
- Wein, T., and Dagan, T. (2020) Plasmid evolution. *Curr Biol* **30**: R1158–R1163.
- Westwater, C., Kasman, L.M., Schofield, D.A., Werner, P.A., Dolan, J.W., Schmidt, M.G., and Norris, J.S. (2003) Use of genetically engineered phage to deliver antimicrobial agents to bacteria: an alternative therapy for treatment of bacterial infections. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 1301–1307.
- Wongpayak, P., Meesungnoen, O., Saejang, S., and Subsoontorn, P. (2021) A highly effective and self-transmissible CRISPR antimicrobial for elimination of target plasmids without antibiotic selection. *PeerJ* **9**: e11996.
- Wyres, K.L., Lam, M.M.C., and Holt, K.E. (2020) Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol* **18**: 344–359.

Yang, T., Santisteban, M.M., Rodriguez, V., Li, E., Ahmari, N., Carvajal, J.M., *et al.* (2015) Gut dysbiosis is linked to hypertension. *Hypertens Dallas Tex 1979* **65**: 1331–1340.

Zheng, Y., Niyonsaba, F., Ushio, H., Nagaoka, I., Ikeda, S., Okumura, K., and Ogawa, H. (2007) Cathelicidin LL-37 induces the generation of reactive oxygen species and release of human alpha-defensins from neutrophils. *Br J Dermatol* **157**: 1124–1131.

Zuercher, A.W., Miescher, S.M., Vogel, M., Rudolf, M.P., Stadler, M.B., and Stadler, B.M. (2000) Oral anti-IgE immunization with epitope-displaying phage. *Eur J Immunol* **30**: 128–135.

ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT

Je, soussigné (e) LAMBERIOUX Morgan, déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN

N° Étudiant : 21503610

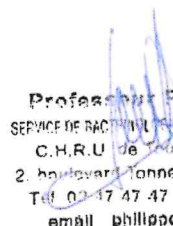
N° Thèse : 91

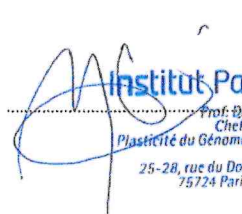
Nom et Prénom : LAMBERIOUX Morgan

Sujet : Les cibles et stratégies innovantes dans la lutte contre l'antibiorésistance

Tours, le : 26 octobre 2023

Le(s) Directeur(s) de Thèse :


Professeur Philippe LANOTTE
SERVICE DE RACIOMÉDIE, MICROLOGIE, HYGIÈNE HOSPITALIÈRE
C.H.R.U. de Tours - Hôpital Bretonneau
2, boulevard Tonnellé - 37044 Tours cedex 9
Tél. 02 47 47 47 96 - Fax 02 47 47 38 12
email philippo.lanotte@univ-tours.fr


Institut Pasteur
Prof. Didier Mazel
Chef de l'Unité
Plasticité du Génome Bactérien
25-28, rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 12

**Vu et Transmis :
Le Doyen**

Le directeur de la Faculté
des Sciences Pharmaceutiques

Pr Denys BRAND



NOM, PRÉNOM de l'étudiant : LAMBERIOUX Morgan

N° 91

TITRE DE LA THÈSE

Les cibles et stratégies innovantes dans la lutte contre l'antibiorésistance

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

La résistance croissante aux antibiotiques constitue l'une des plus grandes préoccupations en matière de santé pour le XXI^e siècle. Un nombre croissant d'infections sont causées par des bactéries multi-résistantes aux antibiotiques et si aucune alternative aux antibiotiques n'est trouvée, il est estimé, qu'en 2050, les infections bactériennes deviendront la première cause de mortalité dans le monde. Face à ce défi, plusieurs approches sont envisagées pour palier à l'inefficacité potentielle des antibiotiques. Parmi elles, se démarquent les stratégies exploitant les bactériophages, les peptides antimicrobiens et de nombreuses autres molécules capable de potentialiser les traitements antibiotiques. D'autres stratégies innovantes proposent de détourner la conjugaison bactérienne pour disséminer un élément génétique capable d'éliminer spécifiquement certaines bactéries pathogènes au sein d'une population bactérienne complexe. Celles-ci reposent sur l'utilisation d'un plasmide mobilisable ou conjugatif codant un système CRISPR-Cas ou un module toxique comme une toxine bactérienne. Dans ce contexte, le projet CoKiP (*Conjugative Killer Plasmid*) se distingue en utilisant un plasmide conjugatif à large spectre d'hôtes pour disséminer un module toxine-intéine. L'expression de ce module est strictement contrôlée par un facteur de transcription présent exclusivement chez les bactéries pathogènes visées. L'objectif est ainsi l'élimination spécifique de *Shigella spp*, *Salmonella enterica* et *Klebsiella pneumoniae*.

MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS DE SON CONTENU, ATTRIBUÉS PAR LE CANDIDAT EN LIAISON AVEC LA BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE ET LES MEMBRES DU JURY

Antibiorésistance ; Génétique bactérienne ; Bactériophage ; Peptide antimicrobien ; Plasmide ; Conjugaison ; CRISPR ; CoKiP ; Toxine-antitoxine ; Intéine ; Facteur de transcription

JURY

PRÉSIDENT :

BRAND Denys, Professeur, Faculté de Pharmacie de Tours, Pharmacien

MEMBRES :

LANOTTE Philippe, Professeur, Faculté de Pharmacie de Tours, Pharmacien

MAZEL Didier, Professeur Institut Pasteur.....

HIRON Aurélia, Maître de conférences, Faculté des Sciences de l'Université de Tours.....

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : Le jeudi 26 octobre 2023 à la faculté de Pharmacie de Tours