

Université de Montréal

Études de perturbations de l'enveloppe de *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* : mécanismes de  
vulnérabilités ou de résistances

Par

Sean Giacomucci

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de médecine

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de *Philosophiae doctor*

en microbiologie et immunologie

Août 2021

© Sean Giacomucci, 2021



Université de Montréal

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

---

Cette thèse intitulée

**Études de perturbations de l'enveloppe de *Vibrio cholerae* et  
*Escherichia coli* : mécanismes de vulnérabilités ou de  
résistances**

Présenté par  
**Sean Giacomucci**

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes

**Docteur Yves Brun**  
Président-rapporteur

**Docteure Marylise Duperthuy**  
Directrice de recherche

**Docteure Catherine Paradis Bleau**  
Codirectrice

**Docteur Mohamed Rhouma**  
Membre du jury

**Docteur Frédéric Veyrier**  
Examineur externe



## Résumé

L'augmentation de l'incidence des infections bactériennes par des souches résistantes, multirésistantes, voire même ultrarésistantes, aux antibiotiques, combinés à la crise de découverte de nouvelles molécules depuis les années 1960 et du sous-investissement chronique de certains états dans la recherche publique, pourrait coûter la vie à 10 millions d'êtres humains par an d'ici 2050. L'écrasante majorité des souches bactériennes résistantes aux antibiotiques sont des bactéries à Gram négatif. Ceci est notamment dû à la composition intrinsèque de leur enveloppe, leur permettant d'être insensibles à de nombreuses molécules pourtant létales pour d'autres types de bactéries. L'étude des composants et des mécanismes de biosynthèse de l'enveloppe, qui sont essentiels au maintien de l'intégrité des bactéries et peuvent être impliqués dans leur virulence, devrait permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Dans le premier chapitre, nous allons tout d'abord faire un tour d'horizon des éléments composant l'enveloppe des bactéries à Gram négatif, des mécanismes de résistance aux antibiotiques et du danger que représentent les bactéries à Gram négatif. Mes résultats de recherches, présentés sous forme de quatre articles aux chapitres deux à cinq, sont précédés d'une mise en contexte des recherches propres aux deux laboratoires, portant d'une part sur les biofilms et la mobilité de *Vibrio cholerae* et d'autre part sur l'enveloppe de *Escherichia coli*.

Dans le premier article, nous avons déterminé par quel mécanisme la polymyxine B en concentration sous-inhibitrice affecte la formation de biofilm chez *Vibrio cholerae*. Nous avons observé que la polymyxine B affecte principalement le flagelle par une action mécanique. La formation de biofilm nécessitant le flagelle dans ses premières étapes de formation, nous avons conclu que l'action de la polymyxine B prévenait ce changement d'état. Dans le second article, nous avons conçu un protocole d'évolution expérimentale qui nous a permis d'identifier des mutations dans différents gènes permettant à *Vibrio cholerae* de se déplacer plus rapidement en présence de concentration sous-inhibitrice de polymyxine B. Nous avons alors identifié chez plusieurs souches différentes mutations ayant probablement réduit ou anéanti la fonction des protéines IhfA, DacB, VacJ (MlaA) et MlaF. En nous basant sur la littérature, nous proposons que la perte de fonction de ces

protéines induisant l'augmentation de la mobilité en présence de polymyxine B puisse s'expliquer selon trois mécanismes, impliquant la stabilité de l'enveloppe, la sécrétion de vésicules de membrane ou une altération de l'expression de différents gènes. Dans le troisième article, nous avons étudié l'implication du stress oxydatif dans l'arrêt de la synthèse de la paroi qui est fatal au mutant  $\Delta elyC$  de *Escherichia coli*. Nous avons alors démontré que la lyse du mutant  $\Delta elyC$  est causée par la surproduction de radicaux hydroxyles dans son enveloppe. Cette molécule cause des dommages dans l'enveloppe suffisamment importants pour provoquer l'arrêt de synthèse de la paroi. Le mécanisme provoquant cette surproduction de radicaux toxiques reste encore à déterminer. Par le biais de l'étude de la fonction du facteur ElyC, nous avons découvert une nouvelle vulnérabilité dans l'homéostasie de l'enveloppe qu'il nous tarde de pouvoir exploiter. Dans le dernier article, nous avons étudié l'importance de la voie de synthèse de l'antigène commun aux entérobactéries dans le processus létal apparaissant en l'absence du facteur ElyC. Nous avons découvert que le mutant  $\Delta elyC$  accumule un élément commun aux voies de synthèse de la paroi et de l'antigène commun aux entérobactéries, l'undécaprényl pyrophosphate. Nous avons également découvert que l'augmentation du recyclage de cette dernière *via* la surexpression du gène codant pour la protéine PgpB permettait de prévenir la lyse du mutant. Notre hypothèse est que l'absence de ElyC induit une mauvaise répartition de l'undécaprényl phosphate entre les voies de synthèse de la paroi et de l'antigène commun aux entérobactéries. La suractivité de la voie de synthèse de l'antigène commun aux entérobactéries induirait l'accumulation d'undécaprényl pyrophosphate provoquant l'inhibition de Pbp1b, empêchant l'ajout de nouvelles sous-unités à la paroi conduisant ainsi à la lyse du mutant  $\Delta elyC$ .

Ainsi l'ensemble de ces travaux a permis de mieux comprendre et d'identifier des vulnérabilités de l'enveloppe de *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*, de préciser certains mécanismes ainsi que d'entrevoir le rôle de divers facteurs impliqués dans l'homéostasie de leur enveloppe.

**Mots-clés :** *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, biofilm, mobilité, virulence, résistance aux antibiotiques, peptides antimicrobiens, paroi, cibles et homéostasie de l'enveloppe.

## Abstract

The increased incidence of bacterial infections by resistant, multiresistant and even extensively drug-resistant strain, combined with the crisis of new molecules discovery since the 1960s and the chronic underinvestment of certain states in public research, could cost 10 million human lives per year by 2050. The overwhelming majority of resistant bacteria are the Gram-negative one. This is mainly due to the intrinsic composition of their envelope, allowing them to be insensitive to many molecules yet lethal for other types of bacteria. The study of envelope components and biosynthetic mechanisms, which are essential for the maintenance of bacterial integrity and could be involved in their virulence, should lead to the identification of new therapeutic targets. The first chapter gave an overview of the different elements composing Gram-negative bacteria envelope, mechanisms of resistance and the threat that Gram-negative bacteria represent. The presentation of my work, divided in four articles from chapter two to chapter five, was preceded by a contextualization of the research projects specific to both laboratories, on biofilm and motility of *Vibrio cholerae* on one hand and on *Escherichia coli* envelope from the other hand.

In the first paper, we determined the mechanism by which a sub-inhibitory concentration of polymyxin B affects biofilm formation in *Vibrio cholerae*. We observed that polymyxin B mainly affected the flagellum by a mechanical action. Since biofilm formation requires the flagellum in the early stages of its formation, we concluded that the action of polymyxin B prevented this change in *Vibrio cholerae* lifestyle. In the second paper, we designed an experimental evolution protocol which allowed us to identify mutations in different genes that increase *Vibrio cholerae* motility in the presence of sub-inhibitory concentration of polymyxin B. We then identified that different mutations had altered *ihfA*, *dacB*, *vacJ* (*m1aA*) and *m1aF* genes in different mutants. These mutations have probably induced reduction or loss of function of the proteins for which they respectively code. Based on literature, we hypothesize that the loss function of these proteins inducing increase in mobility in the presence of polymyxin B could be explained by three

mechanisms involving envelope stability, secretion of membrane vesicles or altered expression of various genes.

In the third paper, we investigated the involvement of oxidative stress in the fatal peptidoglycan synthesis arrest occurring in the  $\Delta$ *elyC* mutant of *Escherichia coli*. We then demonstrated that lysis of the  $\Delta$ *elyC* mutant is caused by the overproduction of hydroxyl radicals in its envelope. This molecule causes multiple and sufficiently important damages in the envelope to stop the synthesis of the wall. The mechanism causing this overproduction of toxic radicals has yet to be determined. By studying the function of the ElyC factor, we have discovered a new weakness in envelope homeostasis that we are eager to exploit. In the last paper, based on a previously formulated hypothesis, we investigated the importance of the enterobacterial common antigen synthesis pathway in the lethal process occurring in the absence of ElyC. We found that the  $\Delta$ *elyC* mutant accumulates common element to the cell wall and enterobacterial common antigen synthesis pathways, undecaprenyl pyrophosphate. We also observed that the  $\Delta$ *elyC* mutant lysis phenotype could be suppressed by increasing undecaprenyl pyrophosphate recycling *via* the overexpression of the gene coding for the phosphatase PgpB. We propose that the absence of ElyC induces a misallocation of undecaprenyl phosphate between the cell wall and enterobacterial common antigen synthesis pathways, in favors the latter pathway. Overactivation of the enterobacterial common antigen pathway would induce undecaprenyl phosphate accumulation, causing inhibition of Pbp1b, thus blocking addition of new subunits to the cell wall and leading to its lysis.

Ultimately, all the original data generated by my research project has led to a better understanding of envelope vulnerabilities of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*, to clarify certain mechanisms but also to glimpse the role of various factors involved in the homeostasis of their envelope.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, biofilm, motility, virulence, antibiotic resistance, antimicrobial peptides, cell wall, envelope homeostasis and targets.



## Riassunto

L'aumento dell'incidenza delle infezioni da batteri resistenti, multi-resistenti e anche estremamente resistenti agli antibiotici, combinata con la rarefazione della scoperta di nuove molecole fra gli anni 1960 e il sotto investimento cronico di certe nazioni nella ricerca pubblica, potrebbe costare la vita a 10 milioni di essere umano all'anno nel 2050. La stragrande maggioranza delle specie resistenti agli antibiotici sono batteri Gram-negativi. Questo è dovuto principalmente alla composizione intrinseca dei loro involucri che permette loro di essere insensibili a molte molecole che sono letali per altri tipi di batteri. Lo studio delle componenti e i meccanismi di sintesi dell'involucro, che sono essenziali nell'integrità dei batteri e che possono essere coinvolti nella loro virulenza, dovrebbe permettere l'identificazione di nuovi bersagli terapeutici. Nel primo capitolo, avremo una panoramica dei diversi elementi che compongono l'involucro dei batteri Gram-negativi, dei meccanismi di resistenza e della minaccia che i batteri Gram-negativi rappresentano. La presentazione del mio lavoro, diviso in quattro articoli dal capitolo due a cinque, sarà preceduta da una contestualizzazione dei progetti di ricerca specifici di ciascuno dei due laboratori, sul biofilm e la motilità di *Vibrio cholerae* da un lato e sull'involucro di *Escherichia coli* dall'altro.

Nel primo articolo, abbiamo determinato il meccanismo con cui la polimixina B in concentrazione sub-inibitoria influenza la formazione di biofilm in *Vibrio cholerae*. Abbiamo osservato che la polimixina B danneggia principalmente il flagello attraverso un'azione meccanica. Poiché la formazione del biofilm richiede il flagello nelle prime fasi della sua formazione, abbiamo concluso che l'azione della polimixina B ha impedito questo cambiamento nello stile di vita di *Vibrio cholerae*. Nel secondo articolo, abbiamo messo a punto un protocollo di evoluzione sperimentale che ci ha permesso di identificare diversi geni che aumentano la motilità di *Vibrio cholerae* in presenza di una concentrazione sub-inibitoria di polimixina B. Abbiamo quindi identificato varie mutazioni in diversi varianti che hanno probabilmente provocato la riduzione o il soppresso della funzione delle proteine IhfA, DacB, VacJ (MlaA) e MlaF. Sulla base della letteratura, proponiamo che la perdita di funzione di queste proteine inducendo un aumento della

mobilità in presenza di polimixina B può essere spiegato attraverso tre meccanismi coinvolgendo la stabilità dell'involucro, la secrezione di vescicole di membrana o l'alterazione dell'espressione di diversi geni.

Nel terzo articolo, abbiamo studiato il coinvolgimento dello stress ossidativo nell'arresto della sintesi del peptidoglicano che è fatale al mutante  $\Delta elyC$  di *Escherichia coli*. Abbiamo poi dimostrato con numerosi esperimenti che la lisi del mutante  $\Delta elyC$  è causata dalla sovrapproduzione di radicali idrossilici nel suo involucro. Questa molecola causa importanti danni nell'involucro provocando l'inibendo della sintesi del peptidoglicano. Il meccanismo che causa questa sovrapproduzione di radicali tossici deve ancora essere determinato. Studiando la funzione del fattore ElyC, abbiamo scoperto una nuova vulnerabilità nell'omeostasi dell'involucro che siamo in fretta di sfruttare. Nel nostro ultimo articolo, basandoci su un'ipotesi precedentemente formulata, abbiamo studiato l'importanza della via di sintesi dell'antigene comune agli enterobatteri nel processo letale che si svolge in assenza di ElyC. Abbiamo scoperto che il mutante  $\Delta elyC$  accumula un elemento comune alle vie di sintesi del peptidoglicano e dell'antigene comune agli enterobatteri, l'undecaprenil pirofosfato. Abbiamo anche scoperto che l'aumento del riciclaggio di quest'ultimo attraverso la sovraespressione del gene *pgpB* previene la lisi del mutante. Proponiamo che l'assenza di ElyC induce una allocazione difettosa del undecaprenil fosfato tra le vie di sintesi del peptidoglicano e dell'antigene comune agli enterobatteri. L'iperattivazione della via dell'antigene comune agli enterobatteri provoca l'accumulo di undecaprenil pirofosfato, causando l'inibizione di Pbp1b e dunque dell'aggiunta di nuove unità al peptidoglicano, provocandone quindi la lisi.

Quindi, questo lavoro ha portato a una migliore comprensione o identificazione delle vulnerabilità dell'involucro di *Vibrio cholerae* ed *Escherichia coli*, a chiarire certi meccanismi essenziali ma anche a intravedere il ruolo di vari fattori coinvolti nell'omeostasi del loro involucro.

**Parole chiave** : *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli*, resistenza agli antibiotici, peptidi antimicrobici, omeostasi e bersaglie dell'involucro, pareti, biofilm, mobilità, virulenza.

# Table des matières

|  |    |
|--|----|
| Résumé .....   | 5  |
| Abstract .....   | 7  |
| Riassunto .....  | 9  |
| Table des matières .....   | 11 |
| Liste des tableaux .....   | 19 |
| Liste des figures .....  | 21 |
| Liste des sigles et abréviations .....   | 27 |
| Remerciements .....  | 33 |
| Chapitre 1 – Introduction .....  | 35 |
| 1.1    L’enveloppe bactérienne .....   | 37 |
| 1.1.1    Classification des bactéries selon la composition de leur enveloppe .....         | 37 |
| 1.1.2    Biofilm .....   | 44 |
| 1.1.3    Capsules et couche de surface cristalline .....                                   | 49 |
| 1.1.4    Membrane externe .....  | 50 |
| 1.1.5    Le périplasme .....   | 62 |
| 1.1.6    Membrane interne .....  | 68 |
| 1.1.7    Autres éléments de l’enveloppe .....  | 70 |
| 1.2    Infections bactériennes, mécanismes d’actions et de résistances antibiotiques ..... | 73 |
| 1.2.1    Lutte contre les infections bactériennes .....                                    | 73 |
| 1.2.2    Antibiotiques et mécanismes de résistances .....                                  | 76 |
| 1.2.3    Grandes menaces bactériennes : importance des bactéries à Gram négatif .....      | 80 |

|        |   |     |
|--------|---|-----|
| 1.3    | Cibles étudiées chez <i>Vibrio cholerae</i> et <i>Escherichia coli</i> .....  | 81  |
| 1.3.1  | <i>Escherichia coli</i> et <i>Vibrio cholerae</i> .....   | 81  |
| 1.3.2  | Peptides antimicrobiens, flagelle et biofilms chez <i>Vibrio cholerae</i> .....   | 89  |
| 1.3.3  | Homéostasie de l'enveloppe chez <i>Escherichia coli</i> .....   | 98  |
|        | Préface au Chapitre 2 .....   | 105 |
|        | Chapitre 2 – 1 <sup>er</sup> Article .....  | 107 |
| 2.1    | Abstract .....  | 107 |
| 2.2    | Introduction.....   | 108 |
| 2.3    | Materials and methods .....   | 111 |
| 2.3.1  | Bacterial Strains and Culture Conditions .....  | 111 |
| 2.3.2  | Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) .....   | 111 |
| 2.3.3  | Flagellar Motility Assay .....  | 112 |
| 2.3.4  | Transmitted Electron Microscopy .....   | 112 |
| 2.3.5  | Biofilm Assay .....   | 112 |
| 2.3.6  | Flow Cytometry .....  | 113 |
| 2.3.7  | Dilution Spot Assay.....  | 113 |
| 2.3.8  | Western Blot Analysis .....   | 113 |
| 2.3.9  | Proteomic Analysis .....  | 114 |
| 2.3.10 | RT-qPCR Analysis.....   | 115 |
| 2.3.11 | Colony Forming Unit.....  | 116 |
| 2.4    | Results .....   | 116 |
| 2.4.1  | Sub-inhibitory concentration of polymyxin B inhibits <i>V. cholerae</i> biofilm formation at the initial attachment stage ..... | 116 |
| 2.4.2  | Reduction of motility in presence of polymyxin B .....  | 117 |

|  |  |     |
|--|--|-----|
| 2.4.3                                    | Sub-inhibitory concentration of polymyxin B does not interfere with the flagellin expression .....             | 118 |
| 2.4.4                                    | The quantity of flagellin associated with <i>V. cholerae</i> cells is reduced in presence of polymyxin B. .... | 119 |
| 2.4.5                                    | Addition of sub-inhibitory concentration of AMP does not induce major membrane damages.....                    | 120 |
| 2.5                                      | Discussion .....   | 121 |
| 2.6                                      | References.....  | 126 |
| 2.7                                      | Acknowledgments .....  | 131 |
| 2.8                                      | Figures .....  | 132 |
| 2.9                                      | Tables .....   | 138 |
| 2.10                                     | Supporting Information.....  | 140 |
| Préface au Chapitre 3 .....              |  | 143 |
| Chapitre 3 – 2 <sup>e</sup> Article..... |  | 145 |
| 3.1                                      | Abstract .....   | 145 |
| 3.2                                      | Introduction.....  | 146 |
| 3.3                                      | Materials and methods .....  | 148 |
| 3.3.1                                    | Bacterial strains and growth conditions .....  | 148 |
| 3.3.2                                    | Motility assays.....   | 148 |
| 3.3.3                                    | Sequencing, genome assembly and Analysis .....   | 149 |
| 3.3.4                                    | Sequences homologies, alignments and features Analysis .....   | 149 |
| 3.4                                      | Results .....  | 150 |
| 3.4.1                                    | Experimental evolution procedure .....   | 150 |
| 3.4.2                                    | Identification of mutations .....  | 151 |
| 3.5                                      | Discussion .....   | 152 |

|       |  |     |
|-------|--|-----|
| 3.6   | References.....  | 156 |
| 3.7   | Figures .....  | 164 |
| 3.8   | Supplementary Tables and Figures .....                 | 170 |
| 3.9   | Supplemental Materials and methods.....                | 183 |
| 3.9.1 | A1552-V6, MO10-V2 and MO10-V8 Selected Mutations ..... | 183 |
|       | Préface au Chapitre 4 .....                            | 187 |
|       | Chapitre 4 – 3 <sup>e</sup> Article .....              | 189 |
| 4.1   | Author Contributions .....                             | 189 |
| 4.2   | Classification.....                                    | 189 |
| 4.3   | Keywords.....  | 190 |
| 4.4   | Abstract .....   | 190 |
| 4.5   | Significance Statement.....                            | 191 |
| 4.6   | Introduction.....                                      | 191 |
| 4.7   | Results .....  | 195 |
| 4.8   | Discussion .....                                       | 204 |
| 4.9   | Materials and Methods.....                             | 207 |
| 4.9.1 | Bacterial stains .....                                 | 207 |
| 4.9.2 | Growth Conditions and Monitoring .....                 | 208 |
| 4.9.3 | PG Purification and Analysis.....                      | 209 |
| 4.9.4 | Flow Cytometry .....                                   | 210 |
| 4.9.5 | $\beta$ -galactosidase Assay.....                      | 211 |
| 4.9.6 | Microscopy .....                                       | 211 |
| 4.9.7 | CPRG Assay .....                                       | 212 |
| 4.9.8 | Statistical Analysis .....                             | 212 |

|        |  |     |
|--------|--|-----|
| 4.10   | Acknowledgements.....  | 212 |
| 4.11   | References.....  | 212 |
| 4.12   | Figures.....   | 217 |
| 4.13   | Supplemental Materials and Methods.....  | 225 |
| 4.13.1 | Batch measurement of cell area and width using ImageJ. ....                                    | 225 |
| 4.13.2 | Strains and Vectors Construction.....  | 226 |
| 4.13.3 | Primers. ....  | 227 |
| 4.14   | Supplementary Figures .....  | 229 |
| 4.15   | Supplementary Information References:.....   | 240 |
|        | Préface au Chapitre 5.....   | 241 |
|        | Chapitre 5 – 4 <sup>e</sup> Article .....  | 243 |
| 5.1    | Abstract .....   | 243 |
| 5.2    | Introduction.....  | 244 |
| 5.3    | Results .....  | 247 |
| 5.4    | Discussion.....  | 251 |
| 5.5    | Materials and Methods.....   | 254 |
| 5.5.1  | Bacterial strains and plasmids.....  | 254 |
| 5.5.2  | Growth Conditions and Monitoring.....  | 254 |
| 5.5.3  | Extraction, purification and HPLC quantification of C55-PP and C55-P from <i>E. coli</i> ..... | 254 |
| 5.5.4  | CPRG Spot Assays .....   | 255 |
| 5.5.5  | Dilution Spot Assays .....   | 255 |
| 5.5.6  | Microscopy Assay .....   | 255 |
| 5.5.7  | Statistical Analysis .....   | 256 |

|                                  |   |     |
|----------------------------------|---|-----|
| 5.6                              | References.....   | 256 |
| 5.7                              | Figures.....  | 260 |
| 5.8                              | Supplementary Information.....  | 267 |
| Chapitre 6 – Conclusions.....    |   | 283 |
| 6.1                              | Peptides antimicrobiens, flagelle et biofilm chez <i>Vibrio cholerae</i> .....  | 283 |
| 6.2                              | Facteur ElyC chez <i>Escherichia coli</i> , stress oxydatif et perturbation du recyclage de l'undécaprenyl phosphate..... | 291 |
| 6.3                              | Ouverture.....  | 296 |
| Citations.....                   |   | 299 |
| Références bibliographiques..... |   | 301 |
| Chapitre 7 – Annexes.....        |   | 333 |
| Préface au Chapitre 7.1.....     |   | 333 |
| 7.1                              | Chapitre de livre : The secretome of <i>Vibrio cholerae</i> .....   | 334 |
| 7.1.1                            | Introduction.....   | 334 |
| 7.1.2                            | Secretion systems.....  | 335 |
| 7.1.3                            | Membrane vesicles, the type 0 secretion system.....   | 358 |
| 7.1.4                            | Biofilms and flagella.....  | 362 |
| 7.1.5                            | Conclusion.....   | 366 |
| 7.1.6                            | Acknowledgments.....  | 367 |
| 7.1.7                            | References.....   | 367 |
| 7.2                              | Complément de revue de littérature.....   | 383 |
| 7.2.1                            | Coloration de Gram : rappels historiques.....   | 383 |
| 7.2.2                            | Capsules.....   | 384 |
| 7.2.3                            | Couche de surface cristalline.....  | 391 |



|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 7.2.4 | Compositions et fonctions des flagelles et des pili .....               | 397 |
| 7.2.5 | Mécanismes et origines des résistances aux antibiotiques .....          | 403 |
| 7.2.6 | Classement des plus grandes menaces bactériennes et organes cibles..... | 414 |
| 7.2.7 | Mécanisme d'action de la toxine cholérique .....                        | 419 |
| 7.2.8 | Références au complément de revue de littérature.....                   | 420 |



## Liste des tableaux

|   |     |
|---|-----|
| Tableau 1.1. Classification des <i>Escherichia coli</i> pathogènes.....   | 88  |
| Tableau 2.1. Polymyxin B increase flagella components in A1552 secretomea.....  | 138 |
| Tableau 2.2. A1552 and MO10 membrane integrity is not impaired by 25 µg/mL polymyxin B. <sup>a</sup><br>.....   | 139 |
| Tableau 2.3. Effects of polymyxin B on A1552 and MO10 on proportion of flagellated cells and<br>flagella aspecta.....   | 142 |
| Tableau 3.1. Mutation accumulated in A1552 V1.....  | 171 |
| Tableau 3.2. Mutation accumulated in A1552 V2.....  | 172 |
| Tableau 3.3. Mutation accumulated in A1552 V6.....  | 174 |
| Tableau 3.4. Mutation accumulated in MO10 V2.....   | 175 |
| Tableau 3.5. Mutation accumulated in MO10 V8.....   | 177 |
| Tableau 4.1. Table of strains, vectors and amplification fragments.....   | 226 |
| Tableau 5.1. Multiple comparison of undecaprenyl pools concentrations observed in WT, $\Delta$ <i>elyC</i> ,<br>WT pET- <i>pgbP</i> and $\Delta$ <i>elyC</i> pET- <i>pgpB</i> at 37°C.....                        | 267 |
| Tableau 5.2. Multiple comparison tests made on the concentrations of undecaprenyl pools in WT,<br>$\Delta$ <i>elyC</i> , WT pET- <i>pgbP</i> and $\Delta$ <i>elyC</i> pET- <i>pgpB</i> at 21°C. ....              | 270 |
| Tableau 5.3. Multiple comparison tests made on the concentrations of undecaprenyl pools in WT,<br>$\Delta$ <i>elyC</i> , WT pET- <i>pgbP</i> and $\Delta$ <i>elyC</i> pET- <i>pgpB</i> between 37°C and 21°C..... | 273 |
| Tableau 7.1. Résistances aux antibiotiques, les principales menaces bactériennes .....  | 415 |



## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1.1. Représentation schématique des différents types d'enveloppes bactériennes. ....  | 38 |
| Figure 1.2. Paroi des bactéries à Gram positif .....   | 40 |
| Figure 1.3. Enveloppe du groupe CMN .....  | 40 |
| Figure 1.4. Schéma simplifié de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif .....   | 42 |
| Figure 1.5. Représentation de différentes structures et composants de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif (didermes) .....  | 43 |
| Figure 1.6. Forme planctonique et biofilm.....   | 45 |
| Figure 1.7. Synthèse et sécrétion des polysaccharides extracellulaires .....   | 47 |
| Figure 1.8. Composition de la membrane externe .....   | 52 |
| Figure 1.9. Composition d'un lipopolysaccharide .....  | 53 |
| Figure 1.10. Synthèse des lipopolysaccharides.....   | 55 |
| Figure 1.11. Synthèse et export de l'antigène commun aux entérobactéries.....  | 58 |
| Figure 1.12. Flagelle et pilus.....  | 61 |
| Figure 1.13. Le périplasme. ....   | 62 |
| Figure 1.14. Sacculus bactérien.....   | 63 |
| Figure 1.15. Représentation d'une sous-unité typique de peptidoglycane de bactérie à Gram négatif.....   | 64 |
| Figure 1.16. Synthèse du peptidoglycane des bactéries à Gram négatif.....  | 66 |
| Figure 1.17. Différents types de systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif.....  | 72 |
| Figure 1.18. Aspect de deux vésicules de <i>Vibrio cholerae</i> A1552 en microscopie électronique...   | 73 |
| Figure 1.19. Mécanismes d'actions des différents antibiotiques .....   | 76 |
| Figure 1.20. Mécanismes et origines de résistances aux antibiotiques.....  | 78 |
| Figure 1.21. <i>Vibrio cholerae</i> et <i>Escherichia coli</i> .....   | 81 |
| Figure 1.22. Classification chez <i>Vibrio cholerae</i> .....  | 84 |
| Figure 1.23. Évènements d'acquisitions d'éléments génétiques mobiles et de cluster de gènes les souches de séro groupe O1 et O139 de <i>Vibrio cholerae</i> et hypothèse du chemin évolutif..... | 85 |
| Figure 1.24. Cycle de vie de <i>Vibrio cholerae</i> .....  | 91 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 1.25. Régulation de la motilité chez <i>Vibrio cholerae</i> .  | 93  |
| Figure 1.26. Mécanisme d'action de la polymyxine B.   | 96  |
| Figure 1.27. Principe du test CPRG.   | 99  |
| Figure 1.28. Topologie prédite du facteur ElyC.   | 100 |
| Figure 1.29. Le domaine DUF218 au sein du vivant.   | 101 |
| Figure 2.1. A1552 and MO10 growth are not impaired by 25 µg/mL of polymyxin B.  | 132 |
| Figure 2.2. Sub-inhibitory polymyxin B concentration inhibits <i>V. cholerae</i> A1552 and O139 biofilm formation at the early adhesion stage.  | 133 |
| Figure 2.3. Polymyxin B inhibits <i>V. cholerae</i> motility.   | 134 |
| Figure 2.4. Sub-inhibitory concentration of polymyxin B does not reduce the expression of the flagellin and the MSHA pili genes.  | 135 |
| Figure 2.5. Modification of the flagellin location in presence of sub-inhibitory polymyxin B.   | 136 |
| Figure 2.6. Polymyxin B sub-lethal concentration causes A1552 and MO10 flagella loss and misshaping.  | 137 |
| Figure 2.7. Motility reduction is dose-dependent  | 140 |
| Figure 2.8. The supernatant fraction is not contaminated with cytoplasmic proteins  | 140 |
| Figure 2.9. Sub-inhibitory concentration of PmB does not alter the cell wall integrity  | 141 |
| Figure 2.10. Colony forming units per milliliter in exponential phase.  | 142 |
| Figure 3.1. A flower-like pattern often appears in <i>Vibrio cholerae</i> motility test in presence of polymyxin B.   | 164 |
| Figure 3.2. Directed evolution experimental design.   | 165 |
| Figure 3.3. Selected samples from petals of A1552 and MO10 flower-like patterns present an increased motility.  | 166 |
| Figure 3.4. Loss of 12 nucleotides in <i>V. cholerae</i> A1552-V6 suggests a loss of an amino acid essential for <i>IhfA</i> function.  | 167 |
| Figure 3.5. MO10-V8 has a deletion of 371 bp between <i>ccmH-1</i> and <i>vacJ</i> ( <i>mIaA</i> ) locus that probably cause a loss of function of <i>CcmH</i> and an absence of translation of <i>vacJ</i> . | 167 |
| Figure 3.6. Non-sens mutation in <i>mIaF</i> results in the loss of 26% of the original product.  | 168 |
| Figure 3.7 : Deletion of 11 nucleotides in <i>dacB</i> in MO10-V2.  | 169 |

|  |     |
|--|-----|
| Figure 3.8. Putative IHF binding site in the upstream locus of <i>almG</i> open reading frame.....   | 170 |
| Figure 3.9. BPROM predictions for transcription factor binding sequence in <i>almEFG</i> locus .....   | 179 |
| Figure 3.10. PROM prediction for MO10-V8 <i>mIaA*</i> .....  | 180 |
| Figure 3.11. BPROM prediction for MO10-V2 <i>mIaF*</i> promoters (V. Solovyev & Salamov, 2011).<br>.....   | 181 |
| Figure 3.12. BPROM prediction for A1552-V6 <i>dacB*</i> promoters (V. Solovyev & Salamov, 2011)<br>.....   | 182 |
| Figure 4.1. The envelope defect and lysis phenotype of $\Delta$ <i>elyC</i> cells depend on medium aeration<br>.....                               | 217 |
| Figure 4.2. $\Delta$ <i>elyC</i> mutant cells produce high levels of HO <sup>•</sup> at 21°C .....   | 218 |
| Figure 4.3. HO <sup>•</sup> -generating free iron is necessary for $\Delta$ <i>elyC</i> PG synthesis inhibition and cell lysis at<br>21°C. ....    | 219 |
| Figure 4.4. $\Delta$ <i>elyC</i> mutant HO <sup>•</sup> overproduction does not occur in the cytoplasm.....  | 221 |
| Figure 4.5. Extra-cytoplasmic free iron is necessary for $\Delta$ <i>elyC</i> mutant PG defect and cell lysis at<br>21°C .....                     | 223 |
| Figure 4.6. Effect of <i>uppS</i> and <i>murA</i> overexpression on HO <sup>•</sup> production in $\Delta$ <i>elyC</i> mutant.....                 | 229 |
| Figure 4.7. Representative microscopy images, showing larger panels of cells grown in different<br>conditions .....                                | 231 |
| Figure 4.8. Representative microscopy images, showing larger panels of cells grown in different<br>conditions for an extended period of time ..... | 233 |
| Figure 4.9. $\Delta$ <i>elyC</i> cell lysis requires high levels of HO <sup>•</sup> .....  | 234 |
| Figure 4.10. Exogenous HO <sup>•</sup> -generating potassium chromate induces a rapid and exacerbated lysis<br>in $\Delta$ <i>elyC</i> cells.....  | 235 |
| Figure 4.11. Statistical analysis of WT and $\Delta$ <i>elyC</i> cells HPF fluorescence intensity .....  | 236 |
| Figure 4.12. Bacterial cell length, width and surface area analysis. ....  | 237 |
| Figure 4.13. PG composition is not altered in $\Delta$ <i>elyC</i> mutant cells .....  | 239 |
| Figure 5.1. Peptidoglycan and enterobacterial common antigen synthesis.....  | 261 |
| Figure 5.2. Quantification of C55-P and C55-PP pools at 37°C and room temperature.....   | 262 |

|   |     |
|---|-----|
| Figure 5.3. Overexpression of <i>bacA</i> , <i>pgpB</i> and <i>lpxT</i> but not <i>ybjG</i> suppress the CPRG <sup>+</sup> phenotype in $\Delta$ <i>elyC</i> mutant cells. .... | 263 |
| Figure 5.4. Effect of <i>bacA</i> , <i>ybjG</i> and <i>lpxT</i> overexpression in $\Delta$ <i>elyC</i> mutant growth in solid media. ....                                       | 264 |
| Figure 5.5. Effect of <i>pgpB</i> overexpression on $\Delta$ <i>elyC</i> growth in solid and liquid media and cell morphology. ....   | 266 |
| Figure 5.6. Fractions of undecaprenyl phosphate and undecaprenyl pyrophosphate proportion expressed in total undecaprenyl pool. ....  | 279 |
| Figure 5.7. Overexpression of <i>bacA</i> and <i>pgpB</i> delay emergence of pink coloration in the WT strain. ....   | 280 |
| Figure 5.8. Overexpression of <i>bacA</i> has no effect on the lysis $\Delta$ <i>elyC</i> phenotype. ....   | 281 |
| Figure 6.1. Effet de la polymyxine B en concentration sous-inhibitrice sur le flagelle de <i>Vibrio cholerae</i> et son impact sur la formation de biofilm et hypothèse. ....   | 285 |
| Figure 6.2. Hypothèses du gain de mobilité chez les souches A1552-V6, MO10-V2 et MO10-V8. ....  | 287 |
| Figure 6.3. Modèle proposé de mécanisme de lyse du mutant $\Delta$ <i>elyC</i> . ....   | 292 |
| Figure 7.1. Capsule bactérienne. ....   | 385 |
| Figure 7.2. Exemples de composition de polysaccharides de capsule. ....   | 386 |
| Figure 7.3. Différents modes de synthèses des polysaccharides capsulaires chez les bactéries à Gram négatif. ....   | 389 |
| Figure 7.4. Couche de surface cristalline. ....   | 392 |
| Figure 7.5. Différents modes de synthèse de la couche cristalline de surface. ....  | 394 |
| Figure 7.6. Différents types de flagellation. ....  | 397 |
| Figure 7.7. Différents types de pili. ....  | 400 |
| Figure 7.8. Exemple de résistance par option de voie alternative : Ampicilline et L,D-transpeptidase. ....  | 404 |
| Figure 7.9. Exemple de résistance par modification de la cible : polymyxine B et lipopolysaccharides. ....  | 405 |



|   |     |
|---|-----|
| Figure 7.10. Exemple de mécanisme de résistance à un antibiotique par absence d'activation : le métronidazole ..... | 407 |
| Figure 7.11. Résistance par dégradation de l'antibiotique : les $\beta$ -Lactamases.....                            | 408 |
| Figure 7.12. Exemples de résistances par reflux ou imperméabilité .....   | 411 |
| Figure 7.13. Organes touchés par les plus grandes menaces bactériennes. ....  | 418 |
| Figure 7.14. Mécanisme d'action de la toxine cholérique .....   | 419 |



## Liste des sigles et abréviations

ACE : Antigène commun aux entérobactéries

ADN : acide désoxyribonucléique

ATP : adénosine triphosphate

BAAR : Bacilles acido-alcoolo-résistants

C-Di-GMP : diguanosyl-monophosphate cyclique

CLO : cadre de lecture ouvert

CMB : concentration minimale bactéricide

CMI : concentration minimale inhibitrice

CMN : Corynebacterium, Mycobacterium et Nocardia

CP : chaperon-placier (pilus)

CPR :  $\beta$ -D-galactopyranoside chlorophenol (CPRG)

CPRG : rouge de  $\beta$ -D-galactopyranoside chlorophénol ; *chlorophenol, red- $\beta$ -D-galactopyranoside*)

D-Ala : D-alanine

D-Glu : acide D-glutamique

D-Lys : D-lysine

DAGP : diacylglycérolphosphate

DAGP-CDO : diacylglycérolphosphate-céto-déoxyoctulosonate

DRO : dérivé réactif de l'oxygène

DUF : *domain of unknown function*

*E. coli* : *Escherichia coli*

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène

HO• : radical hydroxyle

HPF : Hydroxyphényle Fluoresceine

L-Ala : acide L-alanine

LppB : Lipoprotéine de Braun

M-DAP : acide méso-diaminopimélique

NAG : acide N-Acétyle Glucosamine

NAM : acide N-Acétyle Muramique

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> : radical superoxyde

PBP : *pencillin-binding protein*

PG : Peptidoglycane

PmB : Polymyxine B

PmE : Polymyxine E

PSC : Polysaccharide de capsule

SDS : dodécylsulfate de sodium

T°P : température pièce

TCP : toxin-corregulated pilus

UDP : Uridine triphosphate

Undécaprenyl : Und

Undécaprényl-phosphate : C55-P

Undécaprényl-pyrophosphate : C55-PP

*V. cholerae* : *Vibrio cholerae*

VME : vésicules de membrane externe

VPS : *Vibrio* polysaccharides

$\beta$ -gal :  $\beta$ -galactosidase



*Qu'est-ce que c'est que ce style de bouffer des petits machins tout secs et trois gallons de flotte par jour ? [...] Si la jeunesse se met à croire à ces conneries, on se dirige tout droit vers une génération de dépressifs ! Le gras, c'est la vie.*

*Jean-Christophe Hembert, Kaamelott, Livre II, Corpore sano, par Alexandre Astier (2005).*





## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Docteur Yves Brun, le Docteur Mohamed Rhouma et le Docteur Frédéric Veyrier, membres de mon jury et le Docteur Daniel Dubreuil, représentant du Doyen pour avoir accepté d'évaluer ma thèse et y avoir consacré autant de temps.

Merci à ma directrice Docteure Marylise Duperthuy pour tout l'aide, les conseils et le support qu'elle m'a fourni. Merci à ma co-Directrice Docteure Catherine Paradis-Bleau pour son soutien et son aide. Merci à tout le personnel administratif du département de microbiologie, infectiologie et immunologie pour leur aide. Merci à notre ex-Directeur de département Docteur Hugo Soudeyns pour l'écoute qu'il a pu apporter aux étudiants en m'incluant et de l'aide et du soutien qu'il nous a procuré pour créer l'AGEMIIUM. Merci à mes actuels et anciens collègues, tout particulièrement à Imène, Marion et Candice pour leur aide, leur écoute et leur bonne humeur.

Un énorme merci à mon père, à toi Francis Giacomucci, pour m'avoir tant aidé, tant soutenu et tant apporté tout au long de ces années. Merci à toi ma sœur Kerry pour tout le soutien et l'attention que tu m'as portée. Merci à mes grands-parents Huguette et Umberto et Paul mon oncle pour tout ce que vous m'avez apporté. Merci à Philippe Monier et Pierrette Maranda, mon grand-oncle et ma grand-tante, promis je vous appellerais dorénavant plus souvent. Merci à toi Sandrine, pour ton infatigable patience ta gentillesse et ton aide et pour ton support.

Merci à mes amis et anciens colocataires, pour tous ces bons moments et m'avoir supporté toutes ces années, une pensée à vous Marion, Marion, Laetitia, Marie-Caroline, Prashant, Thomas, François, Émile, Marie, Yvan. Merci à mes amis de France et de Suisse, Edmond, Marion, Fanny, Éva, Nils, Victor, Juan, Andreas et Joris, c'est toujours une immense joie de vous retrouver. Merci à mes actuels et anciens camarades de l'AGEMIIUM et désolé de n'avoir pu être plus présent durant ces derniers mois. Merci à celles et ceux que j'aurais pu oublier.



# Chapitre 1 – Introduction

Les travaux sur lesquels se base cette thèse visent à apporter de nouvelles connaissances sur l'enveloppe des bactéries à Gram négatif, le but étant de participer à la lutte contre les infections bactériennes qui représentent un enjeu sanitaire toujours plus inquiétant. Mes travaux ont porté sur deux thématiques liées à l'enveloppe bactérienne.

Les objectifs initiaux de mes travaux de recherche étaient I) d'identifier chez *Vibrio cholerae* des mécanismes de régulations de facteurs de virulences, comme la formation de biofilm et la mobilité, pouvant être modulés en présence de peptides antimicrobiens II) et d'identifier des mécanismes de résistance à des peptides antimicrobiens chez *Vibrio cholerae*, III) de caractériser l'implication du stress oxydatif dans le mécanisme létal impliquant l'arrêt de la synthèse de la paroi chez le mutant  $\Delta$ elyC de *Escherichia coli* et IV) de caractériser le rôle du recyclage de l'undécaprényl phosphate dans les perturbations de l'enveloppe en absence du facteur ElyC chez *Escherichia coli*.

La première thématique porte sur l'étude de la formation de biofilm et la résistance aux antibiotiques chez *Vibrio cholerae*, une bactérie pathogène infectant l'intestin humain. En effet, *V. cholerae* est l'agent étiologique du choléra (responsable de la 7<sup>e</sup> pandémie de choléra) qui touche plusieurs millions de personnes chaque année. En concentration sous-inhibitrice les peptides antimicrobiens (PAM), une catégorie d'antibiotiques, peuvent jouer un rôle dans la régulation de divers gènes chez la bactérie et ainsi influencer leur virulence ou leur résistance. Nous avons utilisé comme modèle d'antibiotique la polymyxine B (PmB), un PAM cationique affectant l'enveloppe des bactéries à Gram négatif par un mécanisme similaire à de nombreux PAM pouvant se retrouver dans l'intestin humain. Dans le premier article (Chapitre 2 –1<sup>er</sup> Article), nous avons étudié l'effet de la PmB en concentration sous-inhibitrice sur deux souches de *V. cholerae* et avons observé une baisse de mobilité et de la formation de biofilm. Nous avons ainsi découvert que la PmB agissait sur la mobilité et la formation de biofilm par altération de l'adhésion initiale médiée par le flagelle. Dans le deuxième article (Chapitre 3 –2<sup>e</sup> Article), nous

avons conçu un protocole d'évolution expérimentale afin d'identifier différents gènes permettant à *Vibrio cholerae* de se déplacer plus rapidement en présence de concentration sous-inhibitrice de polymyxine B. Nous avons alors identifié différentes mutations chez plusieurs variants ayant acquis la capacité de se déplacer plus rapidement en présence de PmB. Nos résultats suggèrent l'intervention de divers mécanismes expliquant ce gain de mobilité.

La seconde thématique porte sur l'analyse du mécanisme induisant l'arrêt de la synthèse de la paroi et la lyse cellulaire en absence du facteur ElyC chez une autre bactérie à Gram négatif, *Escherichia coli* K12. *E. coli* est une souche de laboratoire utilisée depuis longtemps comme modèle d'étude sur de nombreux mécanismes dont certains se déroulent dans l'enveloppe. Les objectifs de cette recherche sont de définir la fonction du facteur ElyC et de caractériser le mécanisme aboutissant à la lyse du mutant afin de mieux comprendre les mécanismes fondamentaux et d'identifier potentiellement de nouvelles cibles dans l'enveloppe à Gram négatif. Le mutant  $\Delta$ elyC présente un défaut de synthèse de la paroi, un élément essentiel aux bactéries. Le troisième article (Chapitre 4 –3<sup>e</sup> Article) part d'une hypothèse impliquant un stress oxydatif dans la lyse du mutant  $\Delta$ elyC. Nos résultats montrent une surproduction de radicaux hydroxyles dans l'enveloppe du mutant inhibant la synthèse de la paroi. Dans le dernier article (Chapitre 5 –4<sup>e</sup> Article), nous nous sommes intéressés à l'implication de la voie de synthèse de l'antigène commun aux entérobactéries (ACE). Nous sommes parties de l'hypothèse que l'absence de ElyC cause un défaut de recyclage de l'undécaprényl phosphate (C55-P), un élément commun aux voies de synthèse de l'ACE et de la paroi. Nous avons découvert que le mutant  $\Delta$ elyC présente une accumulation du C55-P et que la lyse du mutant peut être supprimée par la surexpression d'un gène impliqué dans le recyclage de ce dernier.

Cette thèse est divisée en 7 chapitres reprenant l'introduction (chapitre 1), les résultats (chapitres 2 à 5), la discussion générale (chapitre 6) et les annexes (chapitre 7).

L'introduction a pour objectif de préciser différentes notions et de détailler certaines structures et certains mécanismes afin de mieux appréhender mes travaux. La première partie de l'introduction portera sur les éléments composant l'enveloppe des bactéries à Gram négatif, leurs compositions, leurs synthèses et des liens qu'ils peuvent avoir avec la virulence ou la résistance

aux antibiotiques. Les mécanismes d'action des antibiotiques suivis des différents types de mécanismes de résistance seront présentés. L'avant dernière partie de l'introduction vise à rendre compte de la menace que représentent les maladies infectieuses émergentes *via* le phénomène de résistance aux antibiotiques et ainsi d'expliquer l'intérêt particulier de l'étude de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif dans le cadre de la lutte contre ces bactéries. Finalement, le contexte dans lequel se sont développées mes recherches sera présenté en détail.

Certains éléments présentés dans l'introduction sont développés plus en profondeur en annexe, ceci dans le but de vous permettre d'approfondir certains sujets à votre guise sans saturer l'introduction d'informations non essentielles à la compréhension du corps de ce manuscrit.

## **1.1 L'enveloppe bactérienne**

### **1.1.1 Classification des bactéries selon la composition de leur enveloppe**

#### 1.1.1.1 Ambigüités autour des termes Gram positif et Gram négatif

L'enveloppe bactérienne peut être définie par l'ensemble des différentes structures enveloppant le cytoplasme bactérien (Zerbib, 2016). D'après cette définition, le règne bactérien est souvent classé en trois groupes : Les bactéries à Gram négatif, à Gram positif et le groupe des « CMN ». Le sigle de ce dernier groupe faisant référence aux genres bactériens *Corynebacterium*, *Nocardia* et *Mycobacterium* (CMN) (Burkovski, 2013; Silhavy, Kahne, & Walker, 2010).

De nos jours, les termes « Gram positif » et « Gram négatif » peuvent être utilisés pour classer les bactéries en fonction de leur phénotype observé à la coloration de Gram, mais également pour les classer en fonction de la composition de leur enveloppe. Même si cette simplification s'avère exacte dans la plupart des cas, elle ne l'est pas dans l'absolu (Radhey S. Gupta, 2005; Zerbib, 2016). Plus concrètement, deux bactéries peuvent avoir une structure d'enveloppe similaire, mais l'une apparaitre négative et l'autre positive à la coloration de Gram (R. S. Gupta, 1998). Il existe également des exemples de bactéries pouvant avoir un phénotype positif ou négatif selon la phase de croissance, elles sont dites de Gram variable (Erler, Lewkowski, Poehlein, & Forsgren, 2018; Glauert & Thornley, 1969). Vous pourrez trouver plus de détails concernant la coloration

de Gram et l'historique des découvertes sur les enveloppes bactériennes en annexe à la section 7.2.1 Coloration de Gram : rappels historiques.

Dans les chapitres suivants, les termes « Gram positif » et « Gram négatifs » seront utilisés pour classer les bactéries en fonction de la composition de leurs enveloppes et non pour indiquer leur phénotype à la coloration de Gram.

### 1.1.1.2 Compositions générales des différents types d'enveloppes

L'enveloppe bactérienne est composée minimalement, d'une ou deux membranes de nature lipidique et d'une paroi cellulaire composée d'un polymère de nature glucido-peptidique. C'est le nombre et la composition de la (ou des) membrane(s), ainsi que la composition et l'épaisseur de la paroi qui permettent de discriminer les bactéries en trois classes. À noter que, certaines rares bactéries ne possèdent pas de paroi cellulaire et disposent d'une enveloppe encore différente à celle observée dans ces trois groupes mentionnés. C'est par exemple le cas du parasite obligatoire de l'homme *Mycoplasma pneumoniae* (Waites & Talkington, 2004).

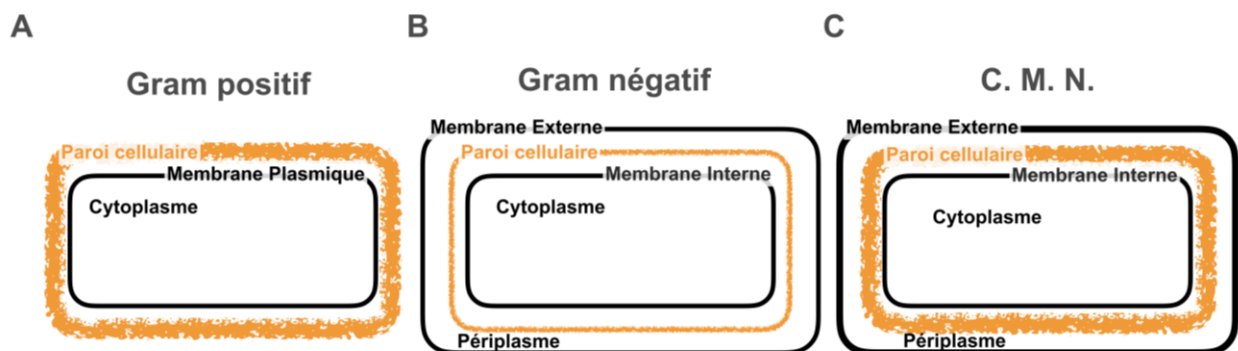


Figure 1.1. Représentation schématique des différents types d'enveloppes bactériennes.

Représentation schématique minimaliste des différents types d'enveloppes bactériennes. Les bactéries peuvent être classées selon la composition de leur enveloppe, ainsi, il y a le groupe des bactéries à Gram positif (monoderme), des bactéries à Gram négatif (diderme) et celui des CMN (*Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia*). A) Les bactéries à Gram positif possèdent généralement une épaisse paroi et une seule membrane lipidique appelée membrane plasmique (ou cytoplasmique). B) Les bactéries à Gram négatif possèdent deux membranes lipidiques, une membrane externe et une membrane interne (également appelée membrane cytoplasmique ou plasmique) ; elles possèdent une paroi cellulaire beaucoup moins épaisse que les bactéries à Gram positif. C) L'enveloppe des bactéries du groupe des CMN est composée de deux membranes lipidiques de composition très particulière ; la paroi est également plus épaisse que chez les

bactéries à Gram négatif. Les bactéries à Gram négatif et les bactéries du groupe CMN possèdent un deuxième compartiment appelé périplasma, il formé par les membranes externe et interne. Adapté de (Zerbib, 2016)

L'enveloppe des bactéries à Gram positif (**Figure 1.1**) possède une membrane et celle des bactéries à Gram négatif en possède deux, elles peuvent respectivement être appelées « monoderme » ou « diderme » (R. S. Gupta, 1998, 2011). Bien que les termes « monoderme » et « diderme » résolvent l'imprécision et l'ambiguïté des termes « Gram positif » et « Gram négatif », ils restent encore très peu utilisés (R. S. Gupta, 1998, 2011).

L'enveloppe des bactéries à Gram positif (ou monoderme) est composée d'une paroi cellulaire épaisse, entourant la membrane plasmique (**Figure 1.1A**). La paroi est généralement composée d'au moins 10 couches de peptidoglycane représentant entre 60 et 80 nm (Götz, Bannerman, & Schleifer, 2006; Que & Moreillon, 2015). Outre son épaisseur, une caractéristique spécifique à l'enveloppe des bactéries à Gram positif est la présence de longs polymères d'acides téichoïques liés à la membrane plasmique (acide lipotéichoïque), ou à la paroi cellulaire (acide téichoïques de paroi) (**voir Figure 1.2**) (Rajagopal & Walker, 2017).

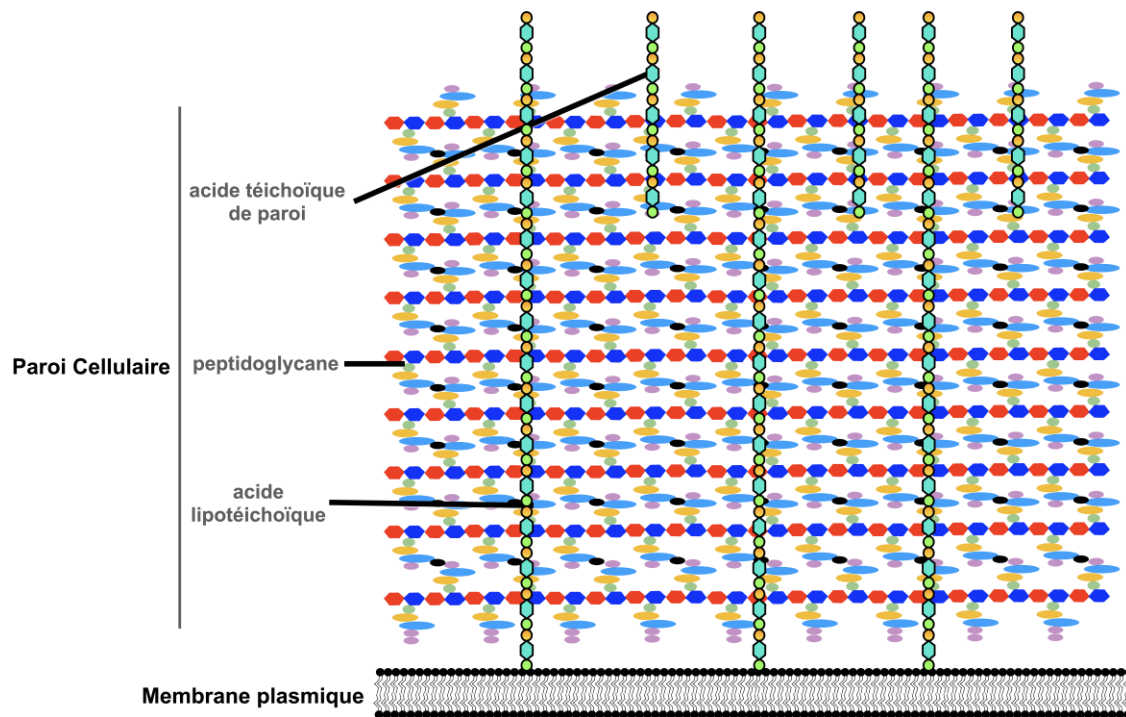


Figure 1.2. Paroi des bactéries à Gram positif

Schéma simplifié de la composition de l'enveloppe des bactéries à Gram positif. L'enveloppe est composée d'une seule membrane lipidique (membrane plasmique) et d'une épaisse paroi cellulaire. Le principal composant de la paroi, le peptidoglycane, est lié à la membrane interne par des acides lipotéichoïques, les différentes couches sont reliées entre elles par les acides teichoïques de paroi. (Rohde, 2019)

L'enveloppe des bactéries du groupe CMN est composée de deux membranes lipidiques comme les bactéries à Gram négatif et d'une paroi cellulaire (**Figure 1.1C**). Le groupe des CMN se différencie notamment dans la composition de sa membrane externe qui comporte des lipides à très longue chaîne carbonée appelés acides mycoliques. Les acides mycoliques confèrent une très grande résistance aux acides et aux alcools (Vilcheze & Kremer, 2017). Les bactéries du groupe des CMN se distinguent également dans la composition de leur paroi, qui comprend une couche d'un polymère de disaccharide, l'arabinogalactane, liée de façon covalente à la membrane externe (**voir Figure 1.3**). (Silhavy et al., 2010; Vollmer, Blanot, & de Pedro, 2008)

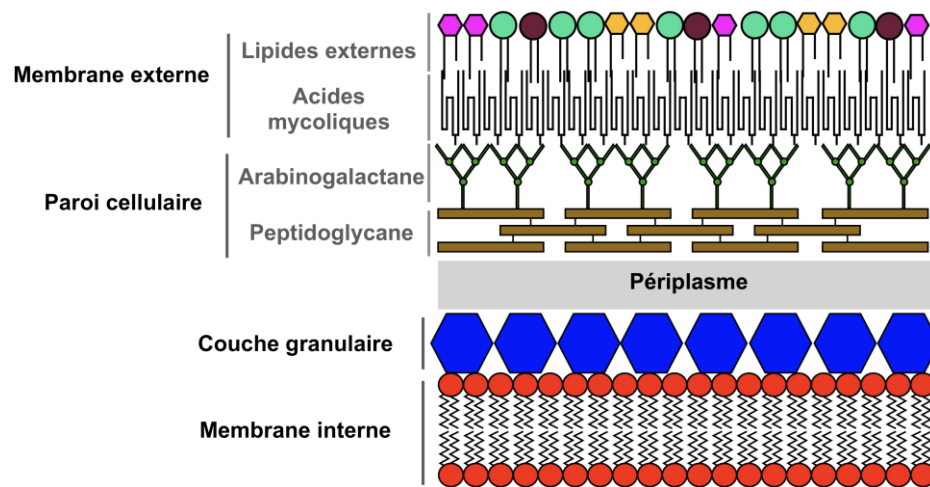


Figure 1.3. Enveloppe du groupe CMN

Schéma de l'enveloppe type retrouvée chez les bactéries du groupe des CMN. La membrane externe est asymétrique, elle est composée d'un feuillet externe composée de lipoglycane et de protéines, le feuillet interne est composé d'acides mycoliques lié à l'arabinogalactane. L'arabinogalactane est également lié au peptidoglycane formant la paroi cellulaire. La couche granulaire n'est pas présente chez toutes les bactéries du groupe des CMN, mais a été identifiée chez certaines espèces des genres *Mycobacterium* et *Corynebacterium*. La composition de la



couche granulaire est mal connue, il pourrait s'agir de protéines liées à la synthèse de la paroi, de lipoprotéines ou d'acides téichoïques ou téichuroniques. Le périplasme est le volume formé entre la couche granulaire et la paroi. Finalement la membrane interne est symétrique, elle est constituée de phospholipides. (Barksdale, 1970; Burkovski, 2013; Vincent et al., 2018). Figure traduite provenant de (Vincent et al., 2018), droits de reproduction accordés selon Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0). Copyright © 2018 Vincent, Nyongesa, Morneau, Reed, Tocheva and Veyrier.

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est composée de deux membranes lipidiques appelées membrane interne et membrane externe et d'une fine couche de paroi cellulaire (R. S. Gupta, 2011). À noter que la membrane interne peut aussi être nommée membrane plasmique ou membrane cytoplasmique. Le compartiment situé entre la membrane interne et externe forme un volume appelé périplasma où est localisée la paroi cellulaire (**Figure 1.1B**).

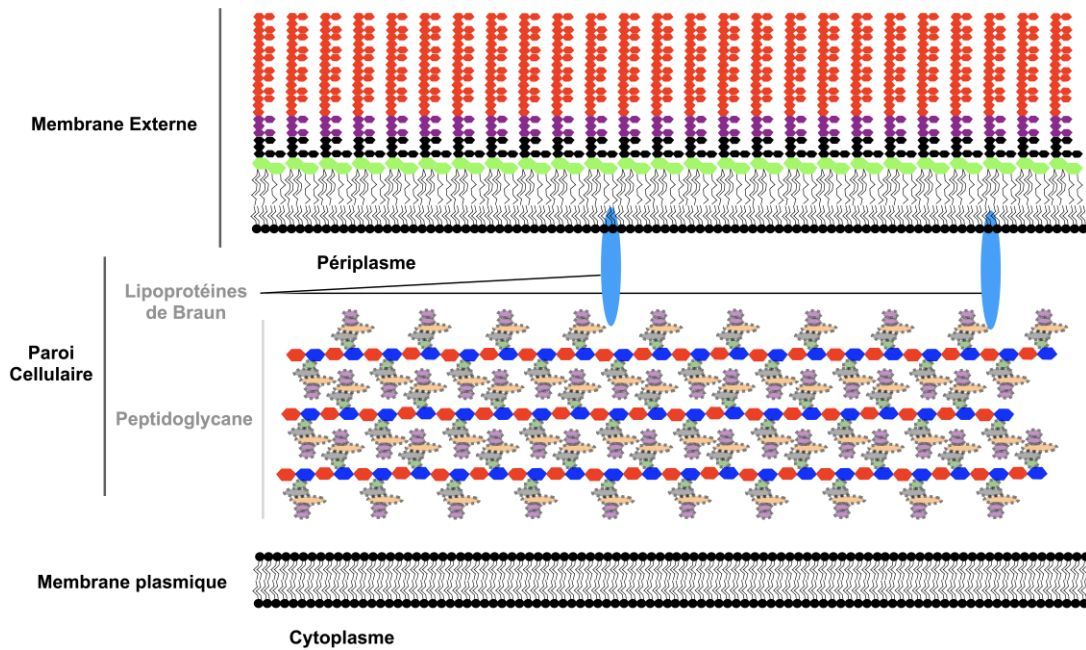


Figure 1.4. Schéma simplifié de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif, est composée de deux membranes lipidiques, la membrane externe et la membrane interne (ou membrane plasmique). Le volume situé entre les deux membranes, le périplasma, abrite notamment la paroi cellulaire.

La membrane externe de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif est intrinsèquement responsable de la résistance à de nombreux antibiotiques (détails section **1.2.3 ci-dessous**) (May & Grabowicz, 2018). L'enveloppe des bactéries à Gram négatif peut comporter de nombreuses couches et composants comme illustré **Figure 1.5**. Les sections qui vont suivre détaillent leurs compositions, modes de productions et régulations et leurs influences sur la pathogénicité, la virulence et la résistance aux antibiotiques.

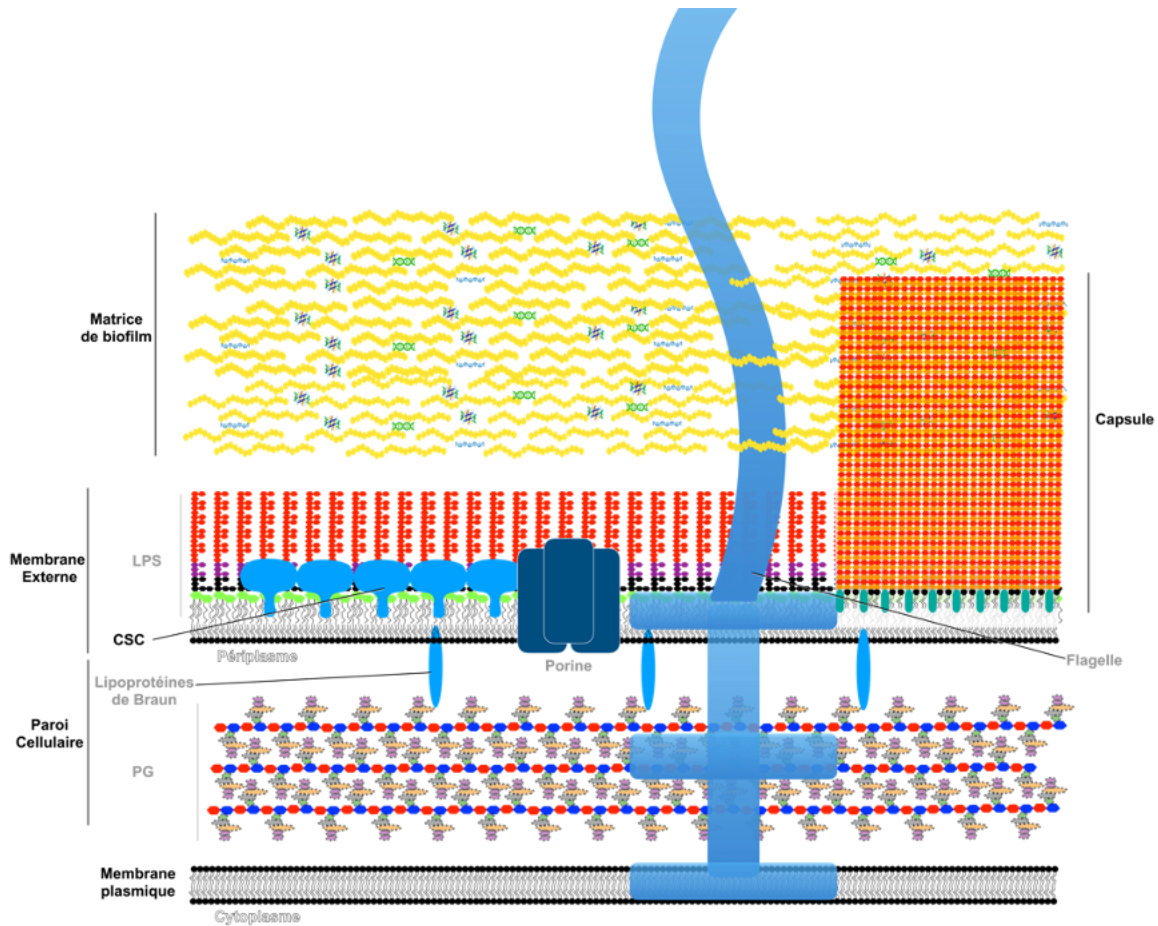


Figure 1.5. Représentation de différentes structures et composants de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif (didermes)

Représentation schématique de différents composants pouvant être trouvés dans l'enveloppe des bactéries à Gram négatif. Lorsqu'elles sont produites par des bactéries, la couche de surface cristalline et la capsule recouvrent en réalité toute la surface de la bactérie. La matrice du biofilm n'est généralement pas considérée comme incluse dans la composition de l'enveloppe, ici la notion d'enveloppe est utilisée dans un sens étendu. L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est composée d'une membrane interne (ou cytoplasmique, plasmique) composée de phospholipides, d'une membrane externe composée de lipopolysaccharide (LPS) de porines et de

bien d'autres éléments. La couche de surface cristalline (CSC) et la capsule ne sont pas produites chez toutes les bactéries. Le périplasme est l'espace situé entre la membrane plasmique et la membrane externe il contient notamment la paroi cellulaire composée de peptidoglycane (PG) et de lipoprotéines de Braun. (Sara & Sleytr, 2000; Silhavy et al., 2010; Wen & Zhang, 2015)

### **1.1.2 Biofilm**

Les bactéries se retrouvant à l'état de cellule libre en suspension dans un milieu liquide sont dites planctoniques, à l'inverse, lorsqu'elles se retrouvent enveloppées dans une matrice, entre elles ou avec d'autres microbes, elles sont dites dans un biofilm (voir **Figure 1.6**) (Flemming & Wingender, 2010; Flemming & Wuertz, 2019; Tolker-Nielsen, 2015). Excepté dans les océans, dans la nature les bactéries se retrouvent majoritairement sous forme de biofilm et la plupart sont capables de produire leur matrice (Flemming & Wuertz, 2019). Le biofilm est souvent attaché à une surface biotique ou abiotique (Hall & Mah, 2017), cependant certaines bactéries peuvent former des biofilms à l'interface entre le liquide et l'air prenant alors l'appellation de pellicule (Flemming & Wingender, 2010; Golub & Overton, 2021; Hollenbeck et al., 2014). Les bactéries ont la capacité de transiter entre l'état planctonique et le biofilm et inversement. Le passage d'un état à l'autre est médié par les conditions du milieu (pH, disponibilité nutriments ou cofacteurs, température, concentration en bactéries (détection du quorum), stress cellulaire...), cette transition d'état s'accompagne d'importants changements physiologiques chez la bactérie (Markova, Anganova, Turskaya, Bybin, & Savilov, 2018; Renner & Weibel, 2011).

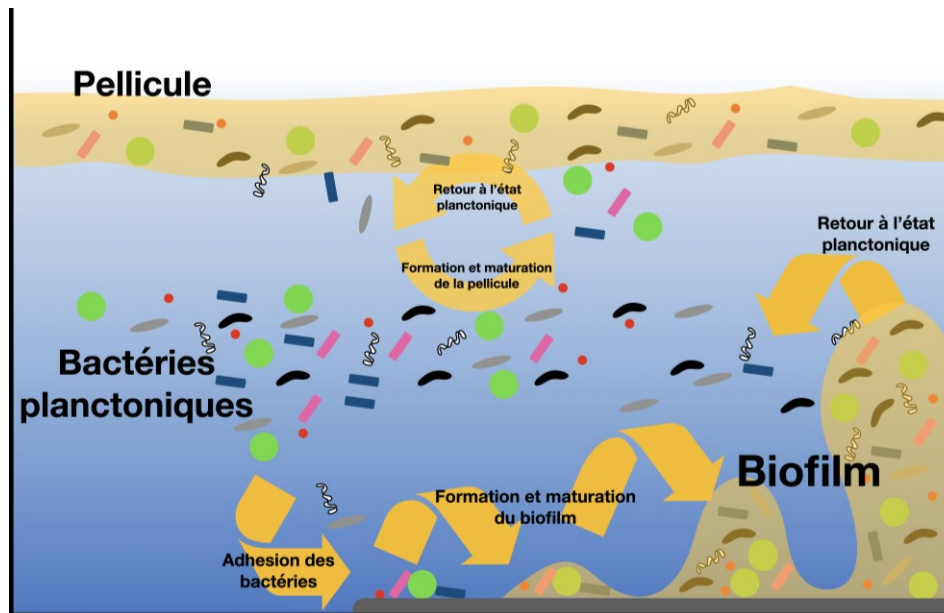


Figure 1.6. Forme planctonique et biofilm

Schéma illustrant le passage de bactéries de l'état planctonique à biofilm dans un milieu aquatique. Les bactéries peuvent être sous forme planctonique ou forme biofilm. Un biofilm peut se former sur une surface solide ou à une interface air/liquide dans ce cas le biofilm est appelé pellicule. La formation du biofilm sur une surface solide commence par l'adhésion des bactéries à cette surface, la production de la matrice extracellulaire et le développement jusqu'à l'obtention d'un biofilm mature. Le passage de la forme planctonique à biofilm et inversement est régulé fonction des conditions du milieu et de la détection du quorum (Flemming & Wingender, 2010).

La matrice du biofilm peut être produite par les bactéries elles-mêmes, d'autres microbes ou par les cellules de l'hôte (ex. : mucus intestinal de l'être humain) (Flemming & Wingender, 2010; Sicard, Le Bihan, Vogeleer, Jacques, & Harel, 2017; Winther, Gross, Hendley, & Early, 2009). Les composants principaux de la matrice des biofilms d'origine bactérienne sont des polymères. La nature et la proportion de ces polymères varient grandement selon l'espèce bactérienne et les conditions du milieu (Lembre, Lorentz, & Di, 2012; Wickramasinghe et al., 2020). Les polymères majoritaires de la matrice sont de nature polysaccharidique (voir **Figure 1.7**), aussi appelés exopolysaccharides ils permettent de donner au biofilm des propriétés visqueuse et élastique. La matrice polymérique comporte également des protéines, de l'ADN, de l'ARN et des lipides, en moyenne on considère que la matrice représente 90% du biofilm (Flemming et al., 2016; Karygianni, Ren, Koo, & Thurnheer, 2020). La voie de synthèse et d'export des exopolysaccharides

varie entre les bactéries (Nwodo, Green, & Okoh, 2012; G. B. Whitfield, Marmont, & Howell, 2015). Il existe trois différentes voies de synthèse et d'export des polysaccharides, la voie dépendante de Wzy, la voie dépendante de transporteurs ABC et la voie dépendante de synthase (**Figure 1.7**) (Schmid, Sieber, & Rehm, 2015).

Malgré la réduction de la mobilité, de la vitesse de croissance et le coût énergétique que cela induit, la production de la matrice permet de créer un espace où la diffusion des molécules est limitée ce qui a de nombreux avantages pour les bactéries (Flemming et al., 2016). La matrice du biofilm présente de nombreux avantages pour les bactéries, elle permet :

- de concentrer localement différentes molécules favorisant ainsi la coopération et la communication entre les bactéries ;
- la sorption des nutriments provenant de l'environnement ainsi que leur stockage, elle permet également le recyclage des débris cellulaires au sein du biofilm ;
- de retenir l'eau, notamment grâce aux polysaccharides ;
- de faciliter le transfert horizontal de gènes et la tolérance ou la résistance aux agressions provenant de l'intérieur ou de l'extérieur du biofilm ;
- de maintenir la cohésion des cellules entre elles et de favoriser l'adhésion du biofilm sur une surface.

(Flemming et al., 2016; Karygianni et al., 2020). (Nadell, Drescher, & Foster, 2016; Xavier & Foster, 2007)

La matrice du biofilm permet également aux bactéries de résister à certains antibiotiques/biocides en diminuant leurs diffusions. D'autres mécanismes au sein du biofilm peuvent induire une résistance à ces molécules (voir ci-dessous). Les détails de ces mécanismes sont développés en annexe, section 7.2.5.6 Résistances adaptatives. La diffusion limitée de certains antibiotiques dans le biofilm permet à la bactérie de se trouver plus longtemps en présence de concentration sous-inhibitrice de la molécule, facilitant ainsi la mise en place de mécanismes de réponse au stress (Flemming et al., 2016; Lories et al., 2020). Les cellules au sein du biofilm ont une croissance faible et certaines peuvent être en dormance, ces états peuvent induire une tolérance ou une résistance à certains antibiotiques (Ahmed, Porse, Sommer, Hoiby,

& Ciofu, 2018; Flemming et al., 2016; Mah & O'Toole, 2001; P. S. Stewart, 2002). De plus, la présence d'ADN dans la matrice facilitant le transfert horizontal de gènes, en présence d'antibiotiques en concentration sous-inhibitrice, le développement de bactéries résistantes au sein d'un biofilm est grandement facilité (Abe, Nomura, & Suzuki, 2020; Tanner et al., 2017). La dégradation de molécules, provenant de l'intérieur ou l'extérieur du biofilm, par des enzymes produites par les bactéries est d'autant plus efficace dans un biofilm, car cela permet d'accumuler localement de fortes concentrations de ces enzymes (Flemming et al., 2016; Jee, Kim, Sung, & Kadam, 2020). Finalement la matrice du biofilm permet aux bactéries de résister aux défenses immunitaires de leur hôte (Watters, Fleming, Bishop, & Rumbaugh, 2016).

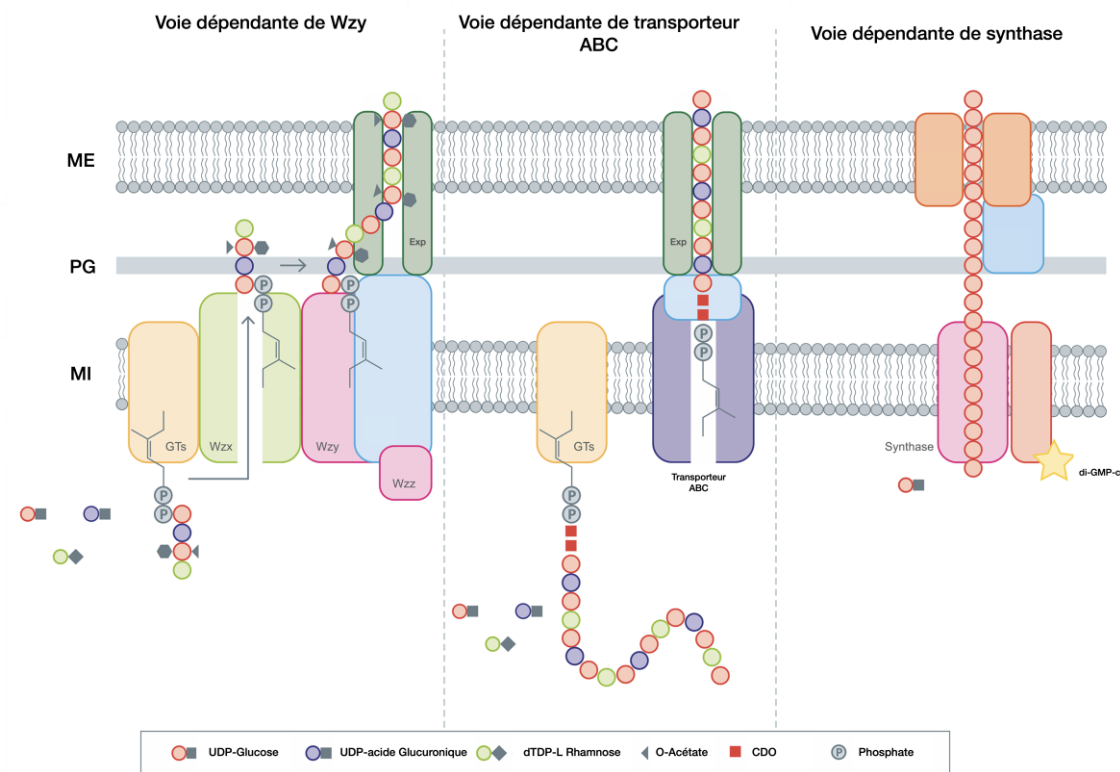


Figure 1.7. Synthèse et sécrétion des polysaccharides extracellulaires

Schéma des différents mécanismes de synthèse et d'exports des polysaccharides extracellulaires par les voies dépendantes de Wzy, de transporteur ABC et de synthase. Dans la voie dépendante de Wzy les sous-unités des polysaccharides sont associées dans le périplasma, alors que dans la voie dépendante de transporteur ABC les sous-unités sont associées dans le cytoplasme. Dans ces deux voies, les sucres sont transportés par un lipide, l'undécaprényl pyrophosphate. Dans la voie dépendante de synthase, le polysaccharide est exporté en même temps qu'il est synthétisé. GTs = Glycosyl-transférases ; Exp = protéine d'export ; CDO = céto-déoxyoctulosonate. Figure traduite

de (Schmid et al., 2015), droits de reproduction accordés selon Creative Commons Attribution License (CC BY 4.0), Copyright © 2015 Schmid, Sieber and Rehm.

Comme mentionné plus haut, les infections bactériennes sont associées à des biofilms dans 60 à 80% des cas (D. Davies, 2003; Jiang, Geng, & Bai, 2020; Lewis, 2001). Les bactéries au sein de biofilms étant plus résistantes aux ultraviolets (UV), aux antibiotiques et aux désinfectants, la formation de biofilm est un problème d'autant plus important en milieu hospitalier notamment lors de la pose d'implants, de sondes urinaires, de cathéters (P. Gupta, Sarkar, Das, Bhattacharjee, & Tribedi, 2016). La prévalence des infections bactériennes dues à des biofilms est particulièrement importante dans les fibroses kystiques (à cause de la surproduction de mucus) (Hoiby, 2002), dans les endocardites infectieuses (due à l'adhérence accrue de la matrice du biofilm à l'épithélium) (Di Domenico et al., 2019) et les infections osseuses (ostéomyélites) (Brady, Leid, Calhoun, Costerton, & Shirtliff, 2008).

La formation de biofilm sur du matériel médical peut être prévenue par le recouvrement de leur surface par des polymères de polyéthylène glycol ou des nanotubes (M. Wang & Tang, 2019). D'autres molécules ont la capacité d'inhiber la formation de biofilm en interagissant avec des éléments de l'enveloppe ou des régulateurs intervenant dans sa formation. Certains mannosides peuvent inhiber la formation de biofilm en prévenant l'adhésion de *E. coli* uropathogène sur des cellules épithéliales (Cusumano et al., 2011). Certaines petites molécules peuvent inhiber la formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*, en interférant avec des enzymes responsables de la synthèse de régulateurs (Sambanthamoorthy et al., 2014; M. Wang & Tang, 2019). Une molécule analogue aux acides oléanoïques développée récemment a montré une activité inhibitrice sur la formation de biofilm d'isolats cliniques de *E. coli* (Lawrence et al., 2020). Les biofilms peuvent également être dispersés, certaines protéases se sont montrées efficaces sur des biofilms de bactéries à Gram négatif et induisent une sensibilité accrue à certains antibiotiques (Jee et al., 2020; Y. Jiang et al., 2020; Verderosa, Totsika, & Fairfull-Smith, 2019). Des travaux récemment publiés suggèrent que l'inhibition de la synthèse d'exopolysaccharides serait une excellente stratégie pour prévenir la formation de biofilm. En effet, l'inhibition de la synthèse d'exopolysaccharides par un dérivé du 5-aryl-2-aminoimidazole chez *Salmonella* Typhimurium empêche efficacement la formation de biofilm, la rendant ainsi plus sensible à



certains désinfectants, et ce, sans aboutir à l'émergence de résistance (dans les conditions de l'expérience) (Dieltjens et al., 2020).

La formation de biofilm est un élément extrêmement important dans la virulence, la résistance et la persistance de *Vibrio cholerae*. Les informations propres à la formation de biofilm de *Vibrio cholerae* sont détaillées aux sections 1.3.1 et 1.3.2

### **1.1.3 Capsules et couche de surface cristalline**

Mes travaux n'ayant pas ou peu portés sur la capsule ni la couche de surface cristalline, ces structures ne seront que survolées dans cette introduction afin d'alléger la lecture de ma thèse. Cependant, vous pourrez trouver un complément d'information portant sur ces structures : leurs compositions, leurs voies de synthèse et leurs liens avec la résistance aux antibiotiques et la virulence en annexe aux sections 7.2.2 Capsules et 7.2.3 Couche de surface cristalline.

Peu de temps après sa mise en évidence dans les années 1880, la capsule était identifiée comme un facteur de virulence et utilisé pour classifier les bactéries, elle est également appelée antigène K, correspondant à l'allemand *kapsel*. Elle produite par de nombreuses espèces de bactériennes à Gram positif et négatif et CMN, mais ne s'exprime que dans certaines conditions (voir sections 7.2.2.1 Nature et compositions et 7.2.2.2 Synthèse et régulations) (Reid & Szymanski, 2010; Wen & Zhang, 2015). La capsule est un polymère recouvrant la surface de certaines bactéries qui est généralement de nature polysaccharidique (Waldor, Colwell, & Mekalanos, 1994; Wen & Zhang, 2015), cependant chez certaines souches ce polymère peut également être de nature protéique (Avakyan, Katz, Levina, & Pavlova, 1965; Chateau, Van der Verren, Remaut, & Fioravanti, 2020). Elle peut se retrouver chez de multiples souches de *Escherichia coli* (Azurmendi et al., 2020; Sarkar, Ulett, Totsika, Phan, & Schembri, 2014; Scholl, Adhya, & Merril, 2005) et est généralement produite par les souches de sérotype O139 de *Vibrio cholerae* (Comstock et al., 1995). La capsule peut être impliquée dans des mécanismes de résistances de virulence ou encore de persistance. En fonction des souches la capsule peut être impliquée dans des mécanismes de résistances à divers stress provenant de l'environnement (pH, salinité, dioxygène...), à la phagocytose, aux bactériophages ou à des antibactériens, elle peut également être impliquée positivement ou

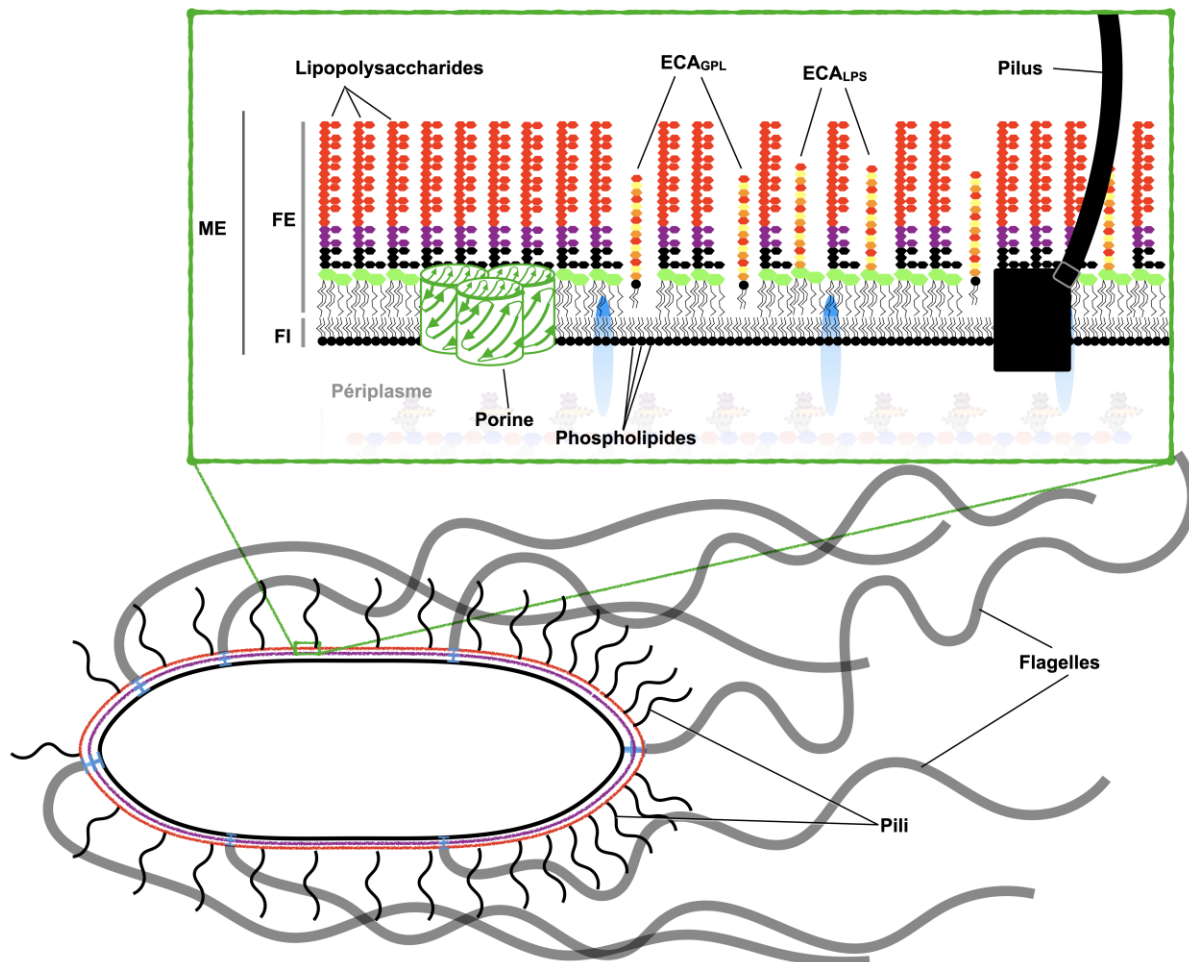
négativement dans l'adhésion des bactéries (voir section 7.2.2.3 Fonctions et Importances dans la virulence bactérienne) (Cress et al., 2014; Cross, 1990; Kim, Elliott, Di Cello, Stins, & Kim, 2003).

Contrairement à la capsule, la couche de surface cristalline est une couche de protéines ou de glycoprotéines recouvrant en permanence la surface de certaines bactéries (voir section 7.2.3.1 Synthèse) (Fagan & Fairweather, 2014; Wen & Zhang, 2015). La couche de surface cristalline (ou couche S) n'est pas présente chez toutes les espèces bactériennes, cependant elle est retrouvée dans un large éventail de bactéries à Gram négatif et positif et chez certaines espèces du groupe des CMN (U. Sleytr, 1999). Certaines espèces bactériennes à Gram négatif du genre *Aeromonas* (Kostrzynska, Dooley, Shimojo, Sakata, & Trust, 1992), *Aquaspirillum* (M. Stewart & Murray, 1982), *Caulobacter* (Bharat et al., 2017), *Campylobacter* (Braun, Kuhnert, Nicolet, Burnens, & Frey, 1999), *Deinococcus* (Misra, Basu, & Apte, 2015), *Synechococcus* (McCarren & Brahamsha, 2009) ou encore *Tannarella* (Settem et al., 2013) possèdent une couche S (non exhaustif) (Fagan & Fairweather, 2014; U. Sleytr, 1999; U. B. Sleytr, Schuster, Egelseer, & Pum, 2014). Les souches sur lesquelles se sont portées mes recherches, *in extenso*, *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*, ne possèdent pas de surface cristalline (Fagan & Fairweather, 2014; U. Sleytr, 1999; U. B. Sleytr et al., 2014). La couche S semble être impliquée chez différentes souches dans des mécanismes de résistances aux stress de l'environnement, à la phagocytose, aux bactériophages et à des antibactériens, elle serait également impliquée dans la synthèse de grosses molécules et dans la formation de biofilm (voir 7.2.3.2 Fonctions et rôles dans la virulence) (de la Fuente-Nunez et al., 2012; Fagan & Fairweather, 2014; Gerbino et al., 2015; Sara & Sleytr, 2000; U. B. Sleytr et al., 2014).

#### **1.1.4 Membrane externe**

Considérée comme une barrière aux antibiotiques à diverses autres molécules toxiques pour les bactéries (May & Grabowicz, 2018), la membrane externe a une composition complexe et finement régulée qui permet de limiter de manière sélective l'entrée des molécules (Delcour, 2009). La membrane externe est une membrane lipidique asymétrique, le feuillet externe est principalement composé de lipopolysaccharides (LPS) (ou parfois de lipooligosaccharides (LOS), le feuillet interne est majoritairement composé de phospholipides ou glycérophospholipides

(GPL) (**Figure 1.8**) (Konovalova, Kahne, & Silhavy, 2017). L'asymétrie de la membrane externe est généralement activement conservée par un système prévenant l'accumulation de phospholipides dans le feuillet externe (Konovalova et al., 2017). La charge globale de la membrane externe est négative, le feuillet externe est chargé négativement par le LPS, le feuillet interne est composé majoritairement de phospholipides zwitterioniques, mais également de lipides anioniques (Epanand & Epanand, 2009). Outre ses lipides, la membrane externe comporte de nombreux éléments, notamment des protéines et lipoprotéines, de gros complexes protéiques comme les porines des flagelles ou des pili et présente divers antigènes à la surface bactérienne, comme l'antigène O du LPS, l'antigène commun aux entérobactéries (ECA), et les filaments des pili et des flagelles (antigène H) (Kovacs-Simon, Titball, & Michell, 2011; Silhavy et al., 2010).



## Figure 1.8. Composition de la membrane externe

Schéma simplifié de la composition de la membrane externe d'une bactérie à Gram négatif, exemple avec une bactérie de la famille des Entérobactéries comme *E. coli*. La membrane externe (ME) est composée d'un feuillet externe (FE) majoritairement constitué de lipopolysaccharides (LPS) et d'un feuillet interne de phospholipides. La membrane externe des bactéries à Gram négatif contient de nombreuses porines pouvant contenir des flagelles, des pili et, chez les *Enterobacteriaceae*, l'antigène commun aux entérobactéries (ECA). *E. coli* possède généralement plusieurs flagelles répartis sur toute sa surface et peut présenter différents types de pili (un seul type a été représenté ici). L'ACE est produit uniquement chez les *Enterobacteriaceae* où il est présent dans toutes les espèces. L'ACE peut être lié sur un glycérophospholipide (GPL) ou sur la même structure que le LPS, l'ACE est nommé respectivement ACE<sub>GPL</sub> ou ACE<sub>LPS</sub> (Delcour, 2009; Hospenthal, Costa, & Waksman, 2017; Kalynych, Morona, & Cygler, 2014).

### 1.1.4.1.1 Lipopolysaccharides

Chez la plupart des bactéries à Gram négatif, le LPS est le principal composant du feuillet externe de la membrane externe (**Figure 1.9**). Chez certains genres de bactéries les lipooligosaccharides (LOS) peuvent remplacer le LPS, dont les genres *Bordetella*, *Branhamella*, *Haemophilus* et *Neisseria*, et certaines souches du genre *Campylobacter* (Preston, Mandrell, Gibson, & Apicella, 1996).

### 1.1.4.1.2 Composition du LPS

Les LPS sont composées de trois éléments, le lipide A, le core oligosaccharidique et l'antigène O (**Figure 1.9**). La structure des LOS est semblable à celle des LPS cependant la structure des LOS est dépourvu d'antigène O voir même d'une partie du core oligosaccharidique (Preston et al., 1996). Le lipide A est la partie la plus interne du LPS, sa composition est très conservée, elle comporte plusieurs groupements aliphatiques associés à un disaccharide (**Figure 1.9**). Le lipide A possède souvent deux charges négatives apportées par l'ajout d'un groupement phosphates sur chacun de ces deux sucres du disaccharide (Raetz, Reynolds, Trent, & Bishop, 2007). Le core oligosaccharidique est composé de deux différents hétéro-oligosaccharides nommés, core interne et core externe. Les sucres composant les cores interne et externe sont variables, mais sont généralement branchés (structure non linéaire), le nombre de sucres composant le core oligosaccharidique est généralement inférieur à quinze (Silipo & Molinaro, 2010). La composition du core est beaucoup plus variable que celle du lipide A cependant la composition du core interne

est plus conservé que celle du core externe (Bertani & Ruiz, 2018). L'antigène O est un polysaccharide hydrophile dont la composition varie grandement entre les bactéries (Bertani & Ruiz, 2018), c'est pourquoi il est depuis longtemps utilisé pour le sérotypage des bactéries. Les sous-unités de l'antigène O comportent entre 1 et 10 sucres qui peuvent être répétés jusqu'à cinquante fois (Silipo & Molinaro, 2010).

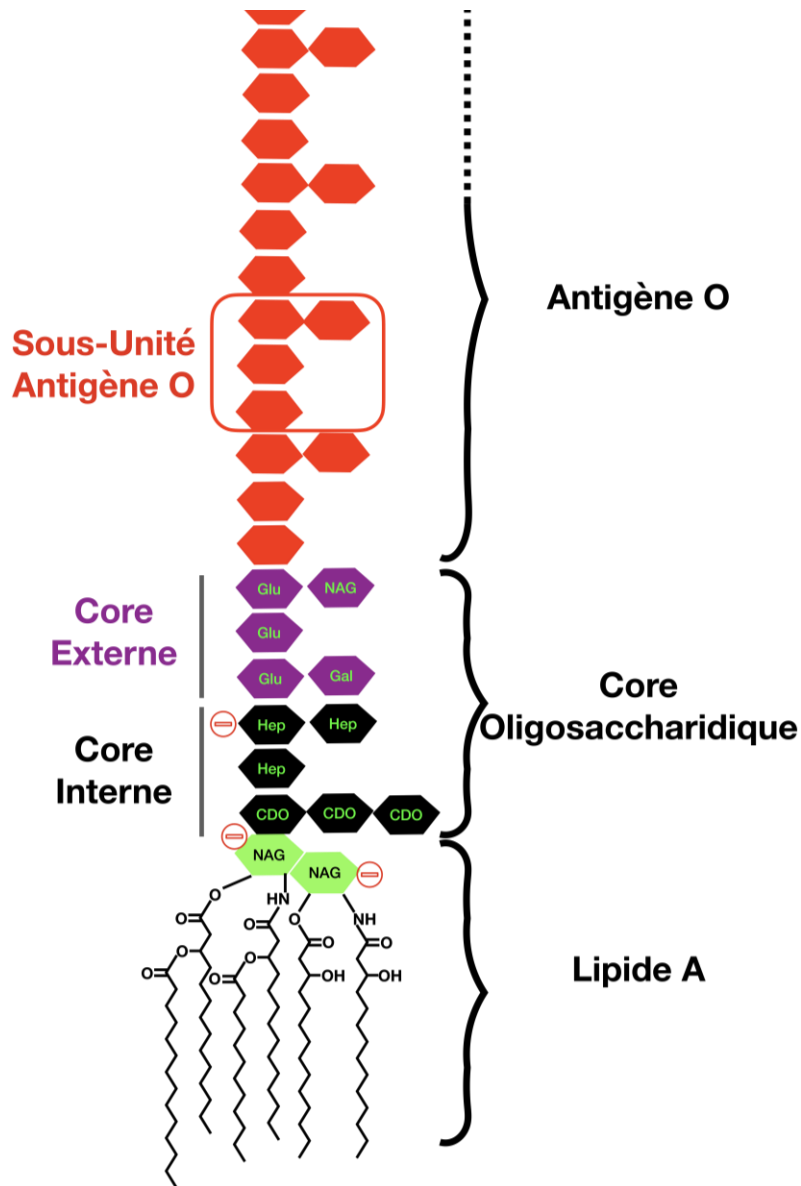


Figure 1.9. Composition d'un lipopolysaccharide

Schéma simplifié de la composition de lipopolysaccharide (LPS), exemple avec le LPS de la souche F632 de *E. coli* (Amor et al., 2000). Les groupements osidiques sont représentés par des hexagones, les signes (-) représentent des charges négatives dues à la présence d'un groupement

phosphate. Le LPS est divisé en trois parties, le lipide A, le core oligosaccharidique et l'antigène O. Le lipide A est composé de chaînes aliphatiques associées à un disaccharide d'acides N-acétylglucosamine. Le core oligosaccharidique est composé de deux oligosaccharides différents (core interne et externe). L'antigène O est un polymère d'oligosaccharides répétés de composition et de taille variable, les sous-unités de l'antigène O peuvent être répétées jusqu'à 40 fois. Glc = Glucose ; Hep = Heptose ; Gal = Galactose ; NAG = Acide N-acétylglucosamine ; CDO = céto-déoxyoctulosonate (ou acide 3-désoxy-D-manno-oct-2-ulosonique) ; Glu = Glucose. (Bertani & Ruiz, 2018; Lisa M. Willis & Whitfield, 2013).

#### 1.1.4.1.3 *Synthèse du LPS*

La synthèse du LPS est divisée en deux procédés distincts, d'un côté celui du lipide A et du core, et de l'autre celui l'antigène O (**Figure 1.10**). La synthèse du lipide A a lieu dans le cytoplasme et le feuillet interne de la membrane interne. En effet, les lipides, sucres et groupements phosphates sont associés jusqu'à former le lipide A-core puis transférés dans le périplasme (Bertani & Ruiz, 2018; Lisa M. Willis & Whitfield, 2013). L'antigène O peut être produit selon plusieurs voies, une voie dépendante de Wzy, une voie dépendante de transporteurs ABC. Certains antigènes O peuvent être synthétisés par une autre voie dite dépendante de synthase. Dans cette voie, l'export et la synthèse des polysaccharides sont effectués en même temps (**Figure 1.10**) (Bertani & Ruiz, 2018).

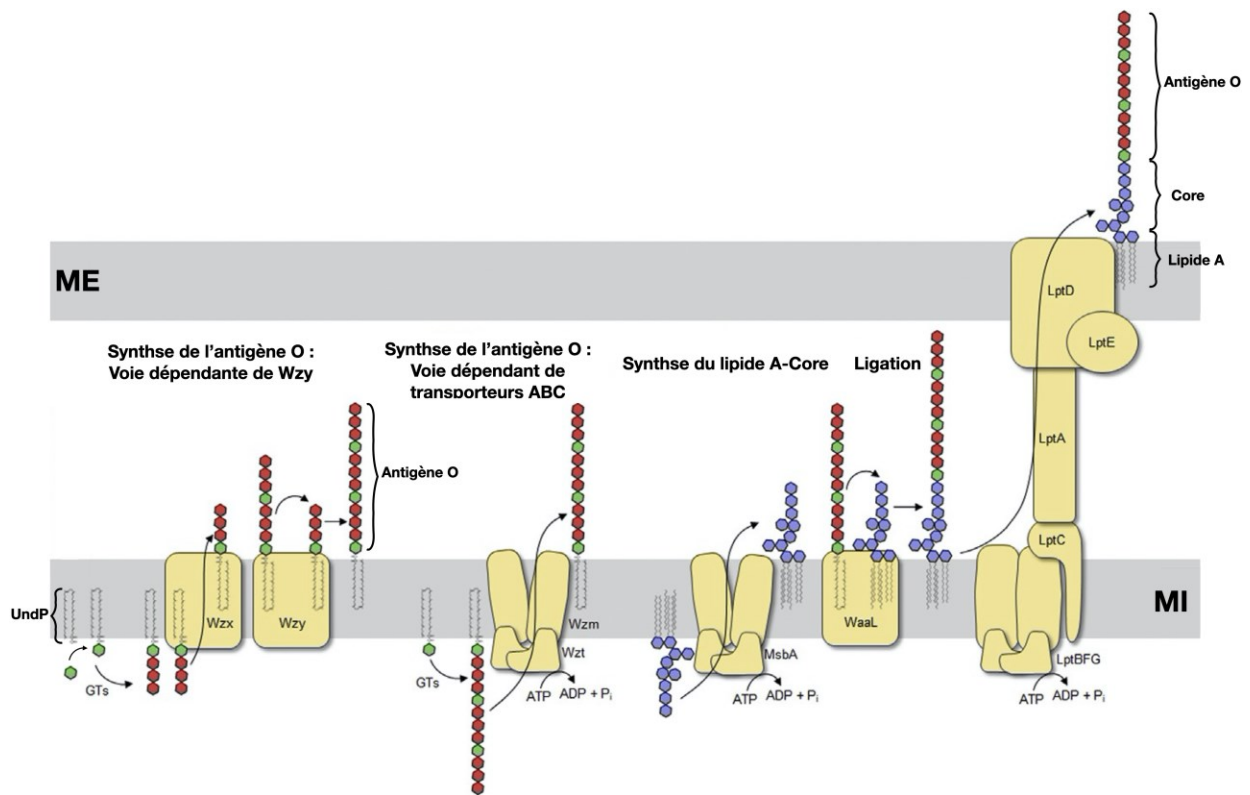


Figure 1.10. Synthèse des lipopolysaccharides

Schéma représentant les mécanismes de synthèse des divers éléments des lipopolysaccharides. La synthèse du lipide A et du core oligosaccharidique a lieu dans le cytoplasme et sur le feuillet interne de la membrane interne (non montré), le lipide A-core est ensuite transféré dans le périplasme. L'antigène O peut être produit par deux voies, une voie dépendante de Wzy et une voie dépendante d'un transporteur ABC. Dans la première, les sous-unités de l'antigène O sont formées dans le cytoplasme puis associées les unes aux autres par des glycosyl-transférases (GTs) sur le transporteur universel de sucres, l'undécaprényl phosphate (C55-P). Une fois la sous-unité formée elle est transportée dans le périplasme par Wzx, puis Wzy associe les sous-unités entre elles dans le périplasme. Dans la deuxième voie, l'ensemble des composants de l'antigène O sont synthétisés et associés sur le C55-P puis transférés au périplasme par Wzt. Finalement, l'antigène O est transféré sur le lipide A-core dans le périplasme et le LPS formé est transféré à la membrane externe. Figure provenant de (Lisa M. Willis & Whitfield, 2013).

#### 1.1.4.1.4 Fonctions et rôles dans la pathogénèse et la virulence

Le LPS est de nature amphiphile, l'antigène O est extrêmement hydrophile et la fraction interne du lipide A très hydrophobe, ces caractéristiques procurent respectivement une très bonne imperméabilité aux molécules hydrophobes et hydrophiles (Bertani & Ruiz, 2018). Les charges négatives portées par la fraction externe du lipide A ont aussi un rôle important dans l'imperméabilité de la membrane externe, notamment face aux molécules hydrophobes et aux

détergents (Delcour, 2009; Helander, Kilpelainen, & Vaara, 1997). Les charges négatives du LPS le rendent sensible à certains antibiotiques tels que les peptides antimicrobiens cationiques comme les polymyxines (Trimble, Mlynarcik, Kolar, & Hancock, 2016). Dans la plupart des cas, le LPS est une barrière extrêmement efficace contre toute sorte de molécules, dont les antibiotiques, qu'ils soient hydrophiles ou hydrophobes (Delcour, 2009). Les LPS sont connus depuis longtemps pour engendrer des réponses immunitaires violentes pouvant aboutir à des chocs septiques, notamment *via* le lipide A qui est d'ailleurs nommé endotoxine (Scott, Oyler, Goodlett, & Ernst, 2017). Le LPS est très immunogène et induit la production d'anticorps. Cependant, l'importante longueur de l'antigène O peut prévenir le dépôt des molécules du complément et ainsi rendre plus difficile la phagocytose (Bertani & Ruiz, 2018; Preston et al., 1996).

#### *1.1.4.1.5 Mécanismes de résistance*

En réponse à l'environnement, les bactéries peuvent introduire des modifications aux molécules de LPS qu'elles produisent. Les groupements aliphatiques du lipide A peuvent être modifiés, notamment en longueurs, en groupements et en saturation (Bertani & Ruiz, 2018). Les groupements phosphates portés par le disaccharide du lipide A peuvent également subir des modifications, divers groupements peuvent y être associés de manière covalente neutralisant ainsi la charge négative du lipide A (Silipo & Molinaro, 2010). Le core oligosaccharidique peut subir des modifications, mais uniquement dans sa fraction interne. Les principales modifications se font par l'ajout de divers sucres, d'autres groupements peuvent être ajoutés notamment sur les groupements phosphates présents (Bertani & Ruiz, 2018). L'antigène O peut subir de grandes modifications pouvant aller jusqu'à un remplacement complet de ces sucres, notamment *via* des transferts horizontaux de gènes (Eugenia, Romo, Coria, Ortiz, & Aquino, 2012). Les modifications du LPS résultant en la neutralisation des charges sont particulièrement efficaces pour résister aux peptides antimicrobiens comme la polymyxine B (Trimble et al., 2016). La modification du lipide A notamment *via* la dissimulation des groupements phosphates et la modulation des acylations, mais aussi la modification de l'antigène O, permet d'échapper au système immunitaire (Scott et al., 2017; Lisa M. Willis & Whitfield, 2013). La synthèse du LPS peut être inhibée par l'alpha-C-(1,5-anhydro-7-amino-2,7-didéoxy-D-manno-heptopyranosyl)-carboxy (R. Goldman, Kohlbrenner, Lartey, & Pernet, 1987) et sont transport inhibé par le L27-11 (Werneburg et al.,



2012), cependant aucune molécule inhibant la synthèse ou l'export du LPS n'est utilisée comme traitement médical à ce jour (Zhang et al., 2018). Il existe cependant de nombreux vaccins utilisant le LPS comme antigène (Zariri & van der Ley, 2015).

#### 1.1.4.2 Antigène commun aux Entérobactéries

Mis à part de rares exceptions, toutes les souches sauvages de l'ordre des *Enterobacteriales* possèdent à la surface de leur membrane externe un même polymère appelé antigène commun aux Entérobactéries (ACE) (Ursula Meier-Dieter, 1990). L'ACE est un polymère de trisaccharides associés à un composant lipidique (Figure 1.8 et Figure 1.9). Le composant lipidique peut être un glycérophospholipide (ACE<sub>GPL</sub>) ou le lipide A-core (ACE<sub>LPS</sub>) (comme l'antigène O du LPS) (Ursula Meier-Dieter, 1990). Il faut noter qu'il existe également une forme cyclique de l'ACE (ACE<sub>CYC</sub>) localisé dans le périplasme (**Figure 1.11**) (Mitchell, Srikumar, & Silhavy, 2018). Longtemps utilisé comme une référence pour la classification des bactéries des *Enterobacteriales* (Kuhn, Meier-Dieter, & Mayer, 1988), l'ACE est produit et exprimé par de nombreuses bactéries pathogènes appartenant aux genres *Escherichia*, *Salmonella*, *Yersinia* ou *Shigella*. À l'exception d'une souche de *Aeromonas hydrophila*, l'ACE n'a été trouvé dans un autre ordre bactérien. L'ACE n'est, par exemple, pas produit par les bactéries des genres *Vibrio*, *Pseudomonas* ou *Campylobacter* (A. K. Rai & Mitchell, 2020).

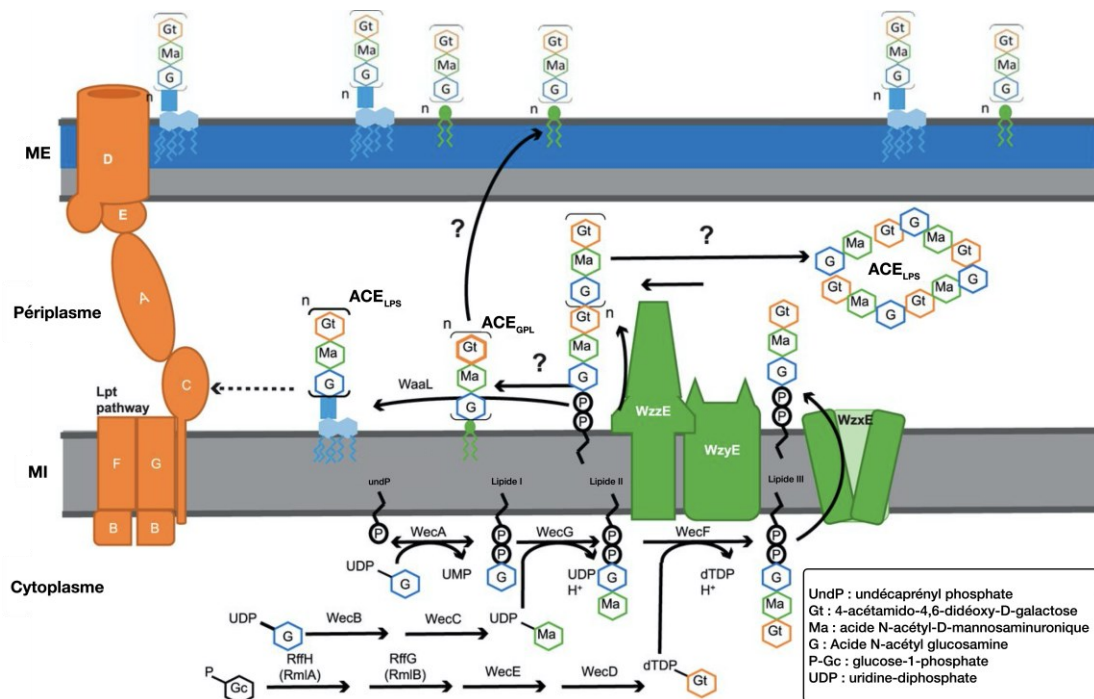


Figure 1.11. Synthèse et export de l'antigène commun aux entérobactéries

Représentation schématique du mécanisme de synthèse des composants des différents types d'antigène commun aux entérobactéries (ACE), de leur assemblage et leur export. Il existe 3 types différents d'ACE, l'ACE<sub>LPS</sub>, l'ACE<sub>GPL</sub> et l'ACE<sub>CYC</sub>, qui ont pour point commun d'être composées d'un hétéropolymère de sucres (acide N-acétyl glucosamine, acide N-acétyl-D-mannosaminuronique et le 4-acétamido-4,6-didéoxy-D-galactose) provenant de la même voie de synthèse. Le polymère de sucres de ACE<sub>LPS</sub> est associé au lipide A comme pour le LPS (voir section 1.1.4.1.2 Composition du LPS). L'ACE<sub>GPL</sub> ou l'ACE est associé à un glycérophospholipide (GPL). Enfin, l'ACE<sub>CYC</sub> ou les sous-unités de l'hétéropolymère sont associées les unes aux autres de manière circulaire. La synthèse des sucres formant les sous-unités est effectuée par divers enzymes dans le cytoplasme. Les sous-unités sont associées les unes aux autres à l'undécaprényle phosphate formant consécutivement le lipide I<sub>ACE</sub>, le lipide II<sub>ACE</sub> et le lipide III<sub>ACE</sub>, ce dernier possédant une sous unité complète de l'ACE. Le lipide III<sub>ACE</sub> est ensuite transféré du côté périplasmique de la membrane interne où les sous-unités de l'ACE sont polymérisées, transférées sur un lipide A ou un GPL ou cyclisées. Les ACE<sub>GPL</sub> et ACE<sub>LPS</sub> sont ensuite transférés à la surface de la bactérie. (Kuhn et al., 1988; A. K. Rai & Mitchell, 2020) (A. K. Rai & Mitchell, 2020; Ramos-Morales, Prieto, Beuzon, Holden, & Casadesus, 2003).. Figure provenant de (A. K. Rai & Mitchell, 2020), reproduction accordée selon Creative Commons Attribution (4.0), Copyright © 2020, American Society for Microbiology.

#### 1.1.4.2.1 Synthèse de l'antigène commun aux entérobactéries

Comme schématisé **Figure 1.11**, les sucres sont formés dans le cytoplasme et associés sur le C55-P dans le feuillet interne de la membrane interne. La sous-unité liée au C55-PP une fois formée

est alors transloquée vers le feuillet externe de la membrane interne. Par la suite, comme pour l'antigène O, les sous-unités sont associées les unes aux autres. Dans le cas de l'ACE<sub>GPL</sub> et l'ACE<sub>LPS</sub> le polysaccharide est transféré respectivement sur un GPL ou le lipide A-core et finalement transféré à la surface (A. K. Rai & Mitchell, 2020). Dans le cas de l'ACE<sub>CYC</sub> le polysaccharide est séparé du C55-PP puis circularisé dans le périplasme (Mitchell et al., 2018; A. K. Rai & Mitchell, 2020). Certains mécanismes concernant la synthèse, l'export ou l'homéostasie des ACE restent encore inconnus (**Figure 1.11**).

#### 1.1.4.2.2 Fonctions et rôles dans la pathogenèse et la virulence

Le rôle des ACE reste encore très peu connu, cependant des indices tendent à montrer que les ACE<sub>LPS</sub> et ACE<sub>CYC</sub> sont importants pour l'imperméabilité de l'enveloppe (X. Jiang et al., 2020; Mitchell et al., 2018). Chez la souris, l'infection orale par des souches mutantes de *Salmonella enterica* ne produisant pas l'ACE semblent avoir une virulence altérée. Ce qui suggère que l'ACE soit impliqué dans la résistance aux sels biliaries (Ramos-Morales et al., 2003). Contrairement à l'ACE<sub>LPS</sub>, l'ACE<sub>GPL</sub> n'est pas immunogène, la production de l'ACE<sub>GPL</sub> pourrait permettre d'échapper au système immunitaire (A. K. Rai & Mitchell, 2020). Le fait que l'ACE soit aussi bien conservé suggère fortement qu'il joue un rôle important dans l'homéostasie de l'enveloppe.

#### 1.1.4.3 Porines

Même si la membrane externe est extrêmement imperméable à de nombreuses molécules, les bactéries à Gram négatif peuvent tout de même importer ou exporter de nombreuses molécules nécessaires à leurs croissances et leur développement. Ces transports sont effectués par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques ou non spécifiques (Vergalli et al., 2020). Comme toutes les protéines intégrales de la membrane externe, ces transporteurs sont organisés en tonneaux bêta, ils peuvent être monomériques ou trimériques (Strahl & Errington, 2017). Certaines peuvent importer spécifiquement certaines molécules ou alors, ne pas avoir de spécificité si ce n'est par la charge de la molécule, comme les porines (Pages, James, & Winterhalter, 2008). Les porines sont des structures permettant d'importer ou d'exporter passivement de nombreuses molécules ne dépassant pas 600 daltons.

Certains antibiotiques peuvent passer par des porines, la réduction de l'expression de porines ou alors la modification de porines peuvent apporter une résistance à certains antibiotiques (Fernandez & Hancock, 2012). Voir détails **Figure 7.12**.

D'autres systèmes de transport de molécules sont traités dans les sections suivantes, **1.1.7.1 Pompes à efflux** et **1.1.7.2 Systèmes de sécrétion**.

#### 1.1.4.4 Flagelles et pili

De nombreuses bactéries possèdent à leur surface des organites protéiniques filiformes, les flagelles et les pili (**Figure 1.12**). Ces organites ont diverses fonctions et peuvent jouer un rôle dans la virulence bactérienne (Berry & Armitage, 1999; Jonson, Normark, & Rhen, 2005). La fonction principale du flagelle est la motilité des bactéries en milieu liquide. Il existe divers types de pili ayant diverses fonctions, comme la motilité sur milieu solide, l'adhésion, la conjugaison ou encore la sécrétion de molécules (Hospenthal et al., 2017).

Vous pourrez trouver plus de détail sur la composition et les fonctions des flagelles et des pili en annexe à la section 7.2.4 Compositions et fonctions des flagelles et des pili.

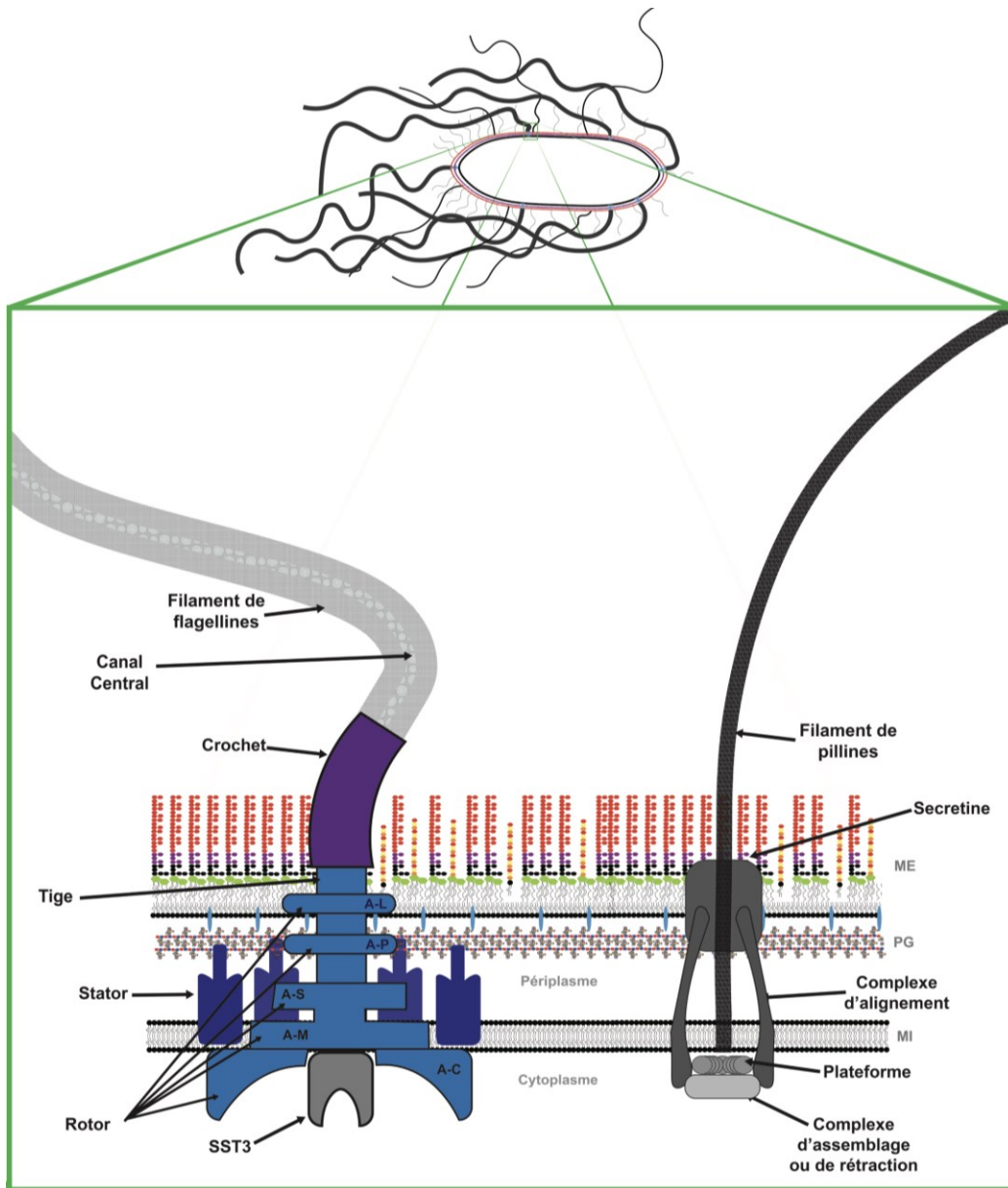


Figure 1.12. Flagelle et pilus.

Représentation simplifiée de la composition d'un flagelle et d'un pilus de type 4 en coupe transversale. Exemple observable chez certaines espèces du genre *Salmonella*. Le flagelle peut être subdivisé en trois structures, un corps basal, un crochet et un filament traversé par un canal central. Le corps basal est composé d'un système de sécrétion d'un rotor composé de plusieurs anneaux de stators et d'une tige. Le pilus de type 4 est composé d'une plateforme d'un complexe d'alignement, d'une sécrétine et du filament. La base du pilus peut être associée à un complexe d'assemblage ou de rétraction permettant de moduler la taille du filament. A-L : anneau L, A-P : anneau P, A-S : anneau S, A-M : anneau M, A-C : anneau C, SST3 : système de sécrétion de type 3. Le flagelle (Craig, Forest, & Maier, 2019; Minamino, Morimoto, Kawamoto, Terashima, & Imada, 2018)

### 1.1.5 Le périplasma

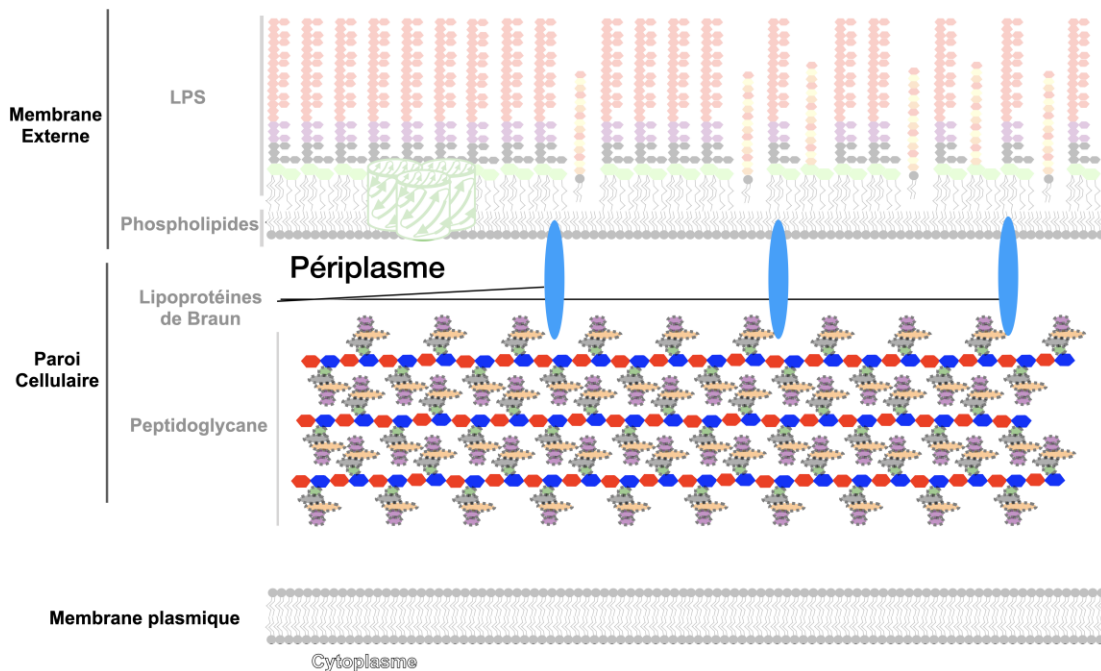


Figure 1.13. Le périplasma.

Représentation schématique du périplasma. Le périplasma est l'espace localisé entre la membrane interne et la membrane externe, il abrite et est traversé de nombreux éléments, ici seule la paroi est représentée (Miller & Salama, 2018).

Le périplasma est l'espace situé entre les membranes interne et externe (**Figure 1.13**), il représente une fraction importante du volume total de la bactérie évalué entre 10 et 40% chez *Salmonella Typhimurium* et *Escherichia coli* (Stock, Rauch, & Roseman, 1977; Van Wielink & Duine, 1990). Contrairement au cytoplasme, le périplasma est un environnement oxydant dépourvu d'ATP (Miller & Salama, 2018). Le périplasma abrite de nombreuses fonctions essentielles dont le repliement de nombreuses protéines et leurs protections face au stress oxydatif, le transport du fer et d'autres métaux, la transmission de signaux provenant de l'extérieur (Arts, Gennaris, & Collet, 2015), du maintien de la forme, de l'osmolarité et du potentiel membranaire de la bactérie (Miller & Salama, 2018). Le périplasma abrite de nombreuses structures importantes, comme la paroi cellulaire (voir section 1.1.5.1 ci-dessous), le corps des flagelles et des pili (section 1.1.4.4 ci-dessus, détails en annexe 7.2.4 Compositions et

fonctions des flagelles et des pili), des pompes à efflux (section 1.1.7.1 ci-dessous) ou des systèmes de sécrétion (section 1.1.7.2 ci-dessous) (Seltmann & Holst, 2002; Silhavy et al., 2010).

### 1.1.5.1 La paroi

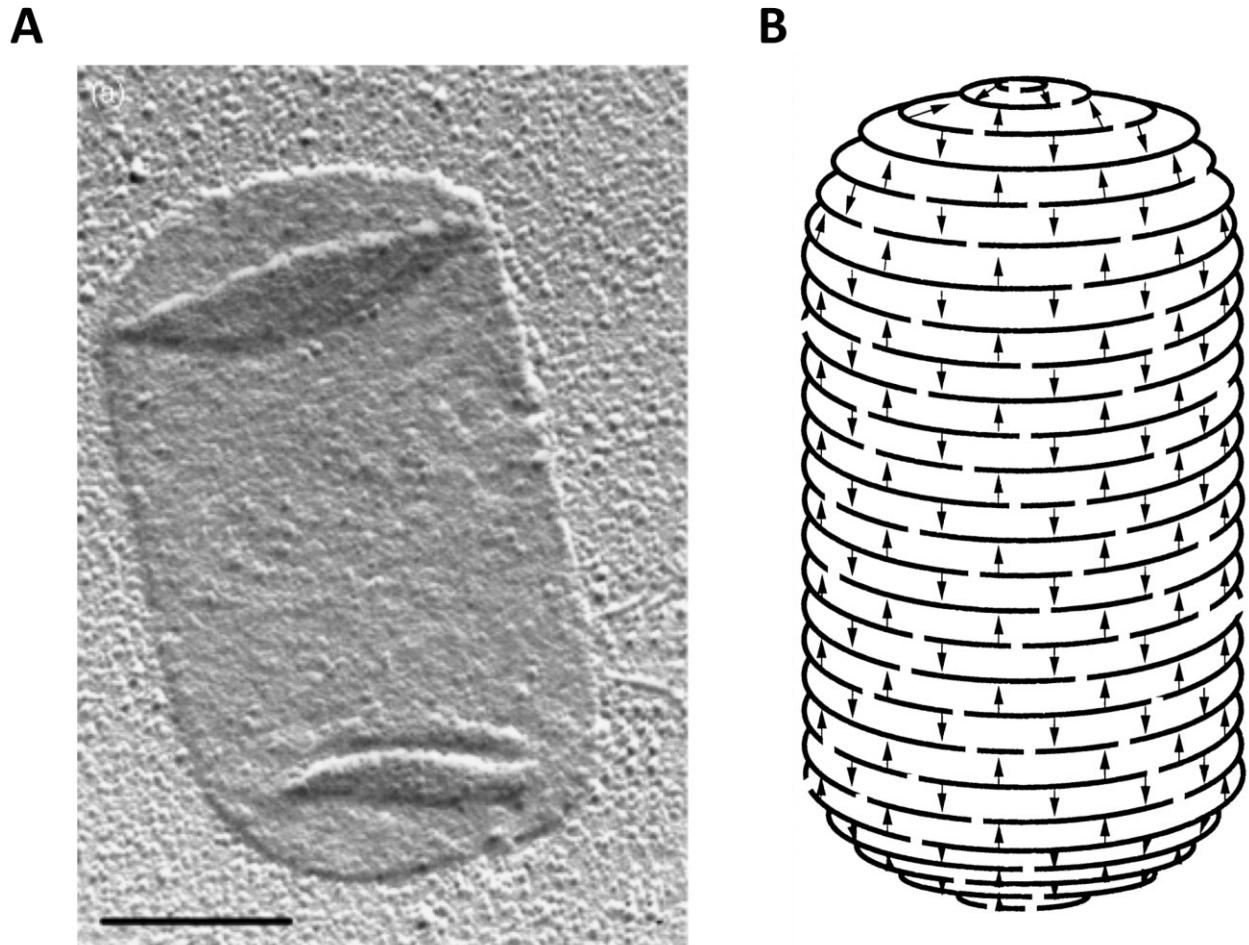


Figure 1.14. Sacculus bactérien.

La paroi bactérienne forme un « exosquelette » rigide protégeant la bactérie de la pression osmotique. A) Image en microscopie électronique d'un sacculus d'*Escherichia coli* purifié. Le sacculus purifié a perdu son volume et apparaît donc aplati. L'échelle correspond à 0,5  $\mu\text{m}$  B) Représentation schématique d'un sacculus bactérien. Les barres et les flèches représentent les principaux composants de la paroi et leurs liaisons. La figure A provient de (Vollmer, Joris, Charlier, & Foster, 2008), reproduction accordée selon Copyright © 2008, Oxford University Press. La figure panneau B provient de (Holtje, 1998), reproduction accordée selon Copyright © 1998, American Society for Microbiology.

La paroi bactérienne est un élément essentiel aux bactéries, elle recouvre l'ensemble de la bactérie formant une sorte de « squelette » rigide appelé *sacculus* qui leur permet de résister à

la pression osmotique, de maintenir la forme de la cellule et sert de plateforme d'encrage pour de nombreuses protéines la traversant (**Figure 1.14**). Un défaut dans la synthèse ou dans l'homéostasie de la paroi peut facilement entraîner la lyse de la bactérie (Koch, 2000).

#### 1.1.5.1.1 Composition de la paroi

Le composant principal de la paroi est le peptidoglycane (ou muréine), chez les bactéries à Gram négatif, le peptidoglycane est lié à des lipoprotéines appelées lipoprotéines de Braun (LppB) (Silhavy et al., 2010). Il y a d'une à trois couches de peptidoglycane représentant une épaisseur de 5 à 10 nm (Huang, Mukhopadhyay, Wen, Gitai, & Wingreen, 2008; Salton & Kim, 1996).

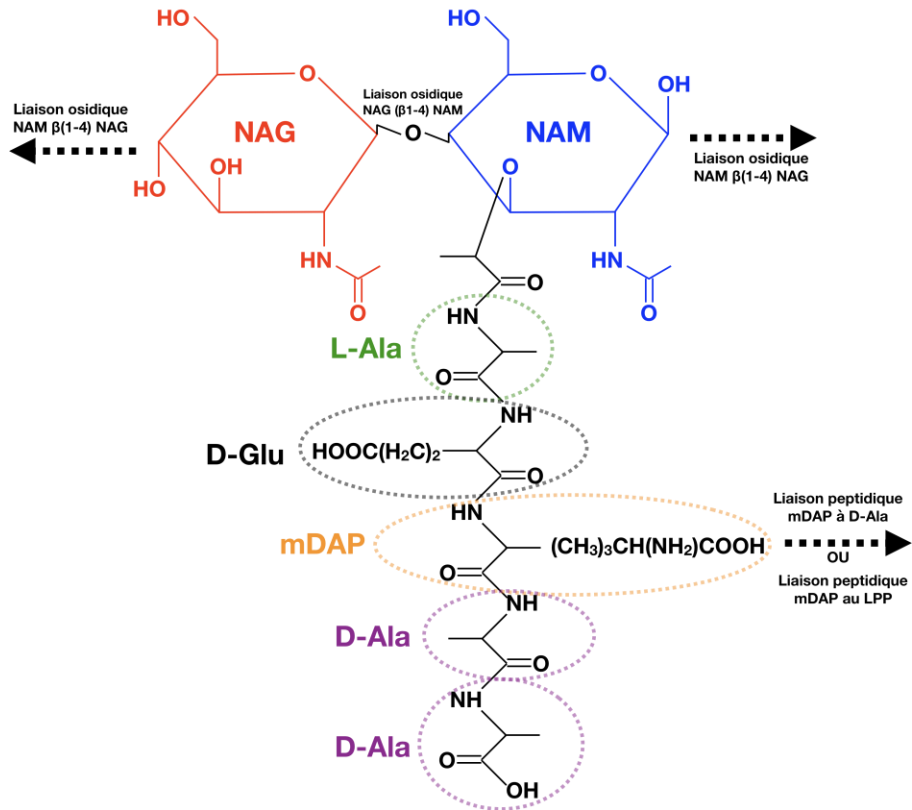


Figure 1.15. Représentation d'une sous-unité typique de peptidoglycane de bactérie à Gram négatif.

Chaque sous-unité du peptidoglycane est un disaccharide de N-acétyl-glucosamine (NAG) et d'acide N-acétyl-muramique (NAM) et d'un pentapeptide lié au carbone n°3 du NAM. Les acides aminés composant le pentapeptide peuvent différer entre les espèces. L-ala : L-alanine ; D-glu :



acide D-glutamique ; M-DAP : l'acide mesodiaminopimélique ; D-ala : D-alanine. (Vollmer, Blanot, et al., 2008).

Le peptidoglycane (PG) est un polymère dont ses sous-unités sont composées de deux sucres, l'acide N-acétyl glucosamine (NAG) et l'acide N-acétyl muramique (NAM) et d'une chaîne de cinq acides aminés (pentapeptide). NAG et NAM sont liés par une liaison osidique  $\beta(1\rightarrow4)$ , le pentapeptide est lui relié au carbone n°3 du NAM. Les sous-unités du PG sont reliées les unes aux autres par des liaisons osidiques NAM  $\beta(1\rightarrow4)$  NAG et/ou par des liaisons peptidiques entre le 3<sup>e</sup> acide aminé d'une sous-unité et le 4<sup>e</sup> acide aminé d'une autre. Les acides aminés composant le pentapeptide varient entre les espèces bactériennes, la composition présentée **Figure 1.15** est, par exemple, retrouvée chez *Escherichia coli* ou *Vibrio cholerae*. Certains des acides aminés composant le pentapeptide sont non protéinogènes comme le D-alanine (D-ala), l'acide D-glutamique (D-glu) ou l'acide mesodiaminopimélique (mDAP) (Vollmer, Blanot, et al., 2008). Comme indiqué **Figure 1.15**, les liaisons peptidiques peuvent se faire également avec les LppB (Holtje, 1998). Les LppB sont des lipoprotéines extrêmement abondantes représentant ~1 million d'exemplaires par cellule liée de façon covalente aux glycérophospholipides du feuillet interne de la membrane externe. Le rôle principal des LppB est de maintenir l'homéostasie de l'enveloppe en contrôlant la taille du périplasme en maintenant une liaison entre le peptidoglycane et la membrane externe (Asmar & Collet, 2018).

#### 1.1.5.1.2 Synthèse et homéostasie

La synthèse du peptidoglycane (PG) est similaire à celle de l'ACE (voir section 1.1.4.2), elle peut être divisée en trois étapes (**Figure 1.16**). La première étape de synthèse du PG a lieu dans le cytoplasme, où les précurseurs des sous-unités du PG sont synthétisés. La deuxième étape a lieu au niveau du feuillet interne de la membrane interne, les précurseurs sont consécutivement assemblés en sous-unités sur un lipide, l'undécaprenyl phosphate (C55-P) (également appelé transporteur universel de sucres ou lipide transporteur universel de sucres). La sous-unité finalement assemblée sur le C55-P est appelée lipide II. Le lipide II est alors transloqué vers le feuillet externe de la membrane interne et les sous-unités du PG néosynthétisées sont associées à la paroi existante par les *penicillin binding protein* (PBP) via des liaisons peptidiques et/ou osidiques. (Typas, Banzhaf, Gross, & Vollmer, 2011). Le rôle du C55-P est essentiel dans la

synthèse de la paroi, celle de l'ACE et du LPS, la régulation de sa néosynthèse ainsi que son recyclage est extrêmement important (Coker & Palittapongarnpim, 2011; Manat et al., 2014).

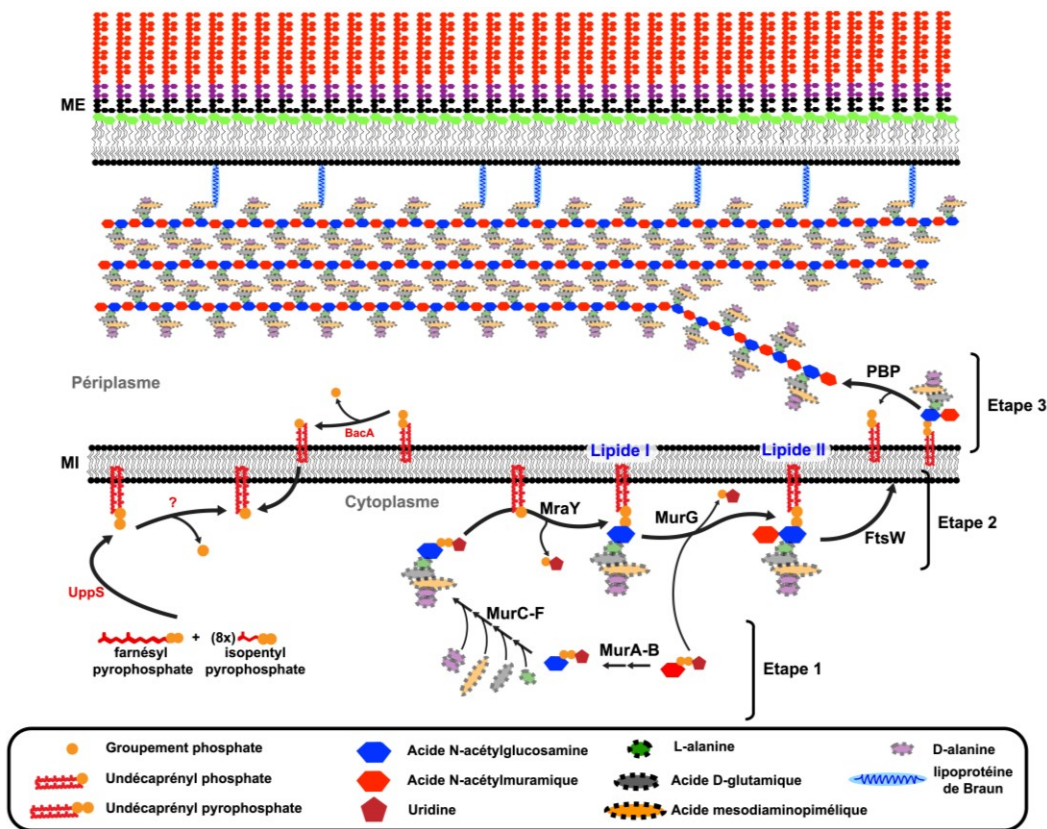


Figure 1.16. Synthèse du peptidoglycane des bactéries à Gram négatif.

Schéma simplifié de la synthèse de la paroi bactérienne. La paroi est majoritairement composée de peptidoglycane, un polymère dont les sous-unités sont formées d'un acide N-acétylglucosamine (NAG) et d'un acide N-acétylmuramique (NAM) lui-même associé à 5 acides aminés. La première étape de la synthèse de la paroi a lieu dans le cytoplasme dans lequel les précurseurs des sous-unités sont synthétisés. Le NAG lié à un uridine-diphosphate (UDP) est transformé en NAM-UDP par les enzymes MurA et MurB. Par la suite, les différents acides aminés sont successivement associés au NAM, L-alanine, acide D-glutamique, acide mésodiaminopimélique et deux D-alanines par les enzymes MurC à MurF. Lors de la seconde étape, les précurseurs sont associés les uns aux autres au feuillet interne de la membrane interne. Le NAM-pentapeptide-UDP est alors transféré sur l'undécaprényl pyrophosphate (C55-P), relarguant une molécule d'uridine-monophosphate (UMP) et formant le lipide I. Par la suite, le lipide II est formé par l'ajout d'une molécule d'UDP relarguant une molécule d'UMP. Le lipide II est alors constitué d'une sous-unité de PG associée au C55-PP. Le lipide II est ensuite transloqué du côté périplasmique de la membrane interne. La dernière étape a lieu au niveau du feuillet externe de la membrane interne, la sous-unité du PG est associée par une *penicillin-binding protein* (PBP) à la paroi existante. Une molécule de C55-PP est alors libérée dans la membrane interne. Le transporteur universel de sucres est néosynthétisé sous forme de C55-PP par UppS à

partir de farnésyl pyrophosphate et de 8 molécules d'isopentyl pyrophosphate. Avant de pouvoir être lié à des sucres il est déphosphorylé en C55-P par une enzyme inconnue. Les molécules de C55-PP relarguées après l'incorporation de nouvelles sous-unités dans la paroi doivent être déphosphorylées en C55-P avant de pouvoir être rétrotransloquées dans le feuillet interne de la membrane interne. BacA ainsi que d'autres enzymes comme YbjG, PgpB et LpxT sont connues pour avoir cette fonction. Une fois rétrotransloqué, le C55-P peut être réutilisé pour la synthèse de la paroi, mais également celle du LPS ou de l'ACE. PBP : *penicillin-binding protein* ; MI : membrane interne ; ME : membrane externe. (Alvarez, Espailat, Hermoso, de Pedro, & Cava, 2014; Manat et al., 2014; Tian et al., 2020; Typas et al., 2011)

Pendant toute la vie de la bactérie ou lors de sa division, la paroi bactérienne est en remodelage permanent. Ses sous-unités sont modifiées, ajoutée De nombreuses autres enzymes sont impliquées dans s ou relarguées dans l'environnement, les différentes liaisons peptidiques et osidiques sont créées ou supprimées (Irazoki, Hernandez, & Cava, 2019). Il existe différentes PBP, pouvant avoir des activités glycosyltransférases, DD-transpeptidases, DD-endopeptidases ou plusieurs de ces activités. De nombreuses autres enzymes sont impliquées dans l'encrage, la structuration ou le remodelage de la paroi, comme des glycosyltransférases, des transglycosylases lytiques ou encore des transpeptidases. Récemment Paradis-Bleau *et al* ont identifié deux lipoprotéines, LpoA et LpoB, essentielles à la fonction des PBP (Paradis-Bleau et al., 2010). Les défauts dans ces enzymes impliquent généralement une modification de la composition de la paroi, contrairement à celles intervenant dans la synthèse de la paroi. Leurs compositions et leurs rôles ne seront pas détaillés ici, mais sont très bien décrits dans la littérature (Alvarez et al., 2014; Bouhss, Trunkfield, Bugg, & Mengin-Lecreulx, 2008; Cava & de Pedro, 2014; Egan, Biboy, van't Veer, Breukink, & Vollmer, 2015; Nguyen-Disteche et al., 1974; Pollock et al., 1974; Tamaki, Nakajima, & Matsushashi, 1977; Typas et al., 2011; van Heijenoort & van Heijenoort, 1980).

#### 1.1.5.1.3 Cible thérapeutique et résistances

Il existe de nombreuses classes d'antibiotiques ciblant différentes enzymes impliquées dans la synthèse ou l'homéostasie du peptidoglycane ou dégradant sa structure (Koch, 2000). Les  $\beta$ -lactames bloquent la synthèse de la paroi en inhibant les PBP (Lima, Silva, Barbosa, & Barreiro, 2020). Le lysozyme, une glycoside hydrolase, dégrade la structure de la paroi (Hakenbeck, Brückner, & Henrich, 2010). Les glycopeptides et les acides phosphomiques, inhibent la synthèse de la paroi en bloquant la synthèse de ses précurseurs (Bush, 2012). Des peptides antimicrobiens

comme la colicine M ou la pectocine M1 bloquent la synthèse de la paroi en empêchant le recyclage du C55-PP (Barreteau et al., 2012; Cherier et al., 2016).

Cette grande diversité d'antibiotique ciblant le peptidoglycane ne représente cependant pas une panacée concernant les bactéries à Gram négatif. En effet, de nombreux antibiotiques ne sont pas efficaces contre les bactéries à Gram négatif, car leurs membranes externes y sont imperméables (Arzanlou, Chai, & Venter, 2017). Il existe d'autres mécanismes de résistances, impliquant la dégradation des antibiotiques, leurs rejets de la cellule, la modification de la composition de la paroi (Nikolaidis, Favini-Stabile, & Dessen, 2014; Rossolini, Arena, & Giani, 2017; Yadav, Espaillat, & Cava, 2018) (voir section 1.2.2.2 Résistances aux antibiotiques ci-dessous).

La paroi n'est pas uniquement importante en tant que cible d'antibiotiques ou comme source de résistance, mais a également une importance dans la virulence bactérienne. De nombreux systèmes essentiels aux bactéries sont étroitement liés à la paroi et dépendent de la bonne structuration de cette dernière. C'est par exemple le cas de la motilité, de la division cellulaire, de la sécrétion, de l'imperméabilité de la membrane externe, de l'adhésion ainsi que de la formation de biofilm (Juan, Torrens, Barcelo, & Oliver, 2018).

## **1.1.6 Membrane interne**

### *1.1.6.1.1 Composition*

La composition de la membrane interne est très différente de celle de la membrane externe. La membrane interne est une membrane symétrique, les feuillettes internes et externes qui la composent sont tous deux formés majoritairement de phospholipides, qui plus est les protéines la traversant sont repliées en hélice- $\alpha$  (Strahl & Errington, 2017). Chez *E. coli* la membrane interne est composée à ~75% de phosphatidyléthanolamine un lipide zwitterionique, à ~20% de phosphatidylglycérol (anion), à ~5% d'anions glycérol bisphosphatidyle (aussi appelé cardiolipide), d'un peu d'anion phosphatidylsérine et d'undécaprenyl phosphate et pyrophosphate (voir section 1.1.5.1.2) (Dowhan, 1997; Gidden, Denson, Liyanage, Ivey, & Lay, 2009).

La membrane interne soutient de nombreuses fonctions essentielles, elle contient les éléments de la chaîne de transport d'électrons nécessaire à la respiration (Borisov & Verkhovsky, 2015) et est le lieu de la synthèse des lipides (Silhavy et al., 2010). Elle supporte une bonne partie des éléments nécessaires à la synthèse de la paroi (section 1.1.5.1.2) et de son homéostasie (Egan et al., 2015; Paradis-Bleau et al., 2010). Elle est le lieu de la production des lipides Elle supporte également les moteurs des flagelles (section 1.1.4.4, détails en annexe 7.2.4 Compositions et fonctions des flagelles et des pili), une partie des composants de certains systèmes de sécrétions (section 1.1.7.2) ou de certains pili (rappel section 1.1.4.4 Flagelles et pili, précisions en annexe 7.2.4.1.2 Compositions et fonctions des pili), détails en annexe 7.2.4.1.2 Compositions et fonctions des pili) (Silhavy et al., 2010). La composition des lipides est très finement régulée afin de conserver la même fluidité à différentes températures, notamment par la proportion d'insaturation. En effet, lorsque la température diminue la viscosité de la membrane augmente, les bactéries peuvent contrer cet effet en augmentant la proportion de lipides insaturés de leurs membranes (Mansilla, Cybulski, Albanesi, & de Mendoza, 2004). Un défaut de fluidité de la membrane peut entraîner de graves conséquences pour la bactérie et peut même être létal. Cela peut par exemple engendrer une déstabilisation de la chaîne de transport d'électrons et l'apparition d'un stress oxydatif (Budin et al., 2018).

#### *1.1.6.1.2 Cibles*

Il existe de nombreux antibiotiques ciblant les phospholipides comme l'aptomycine, la telomycine la cinnamycine, la duramycine et la lysocine, cependant, ils ne peuvent, pour la plupart, pas traverser la membrane externe et sont inefficace contre les bactéries à Gram négatif (Erand, Walker, Erand, & Magarvey, 2016). Ces molécules peuvent agir de différentes façons. L'interaction spécifique de ces antibiotiques à certains lipides peut entraîner une modification de la disposition des lipides dans l'espace et modifier leurs interactions entre eux et/ou avec les composants de la membrane pouvant induire une perte de perméabilité ou un dysfonctionnement de mécanismes essentiels (Erand et al., 2016).

## 1.1.7 Autres éléments de l'enveloppe

### 1.1.7.1 Pompes à efflux

Les pompes à efflux sont des structures protéiques permettant le relargage de petites molécules depuis le cytoplasme vers le périplasme ou directement dans le milieu extracellulaire (Amaral, Martins, Spengler, & Molnar, 2014). Il existe différents types de pompes à efflux possédant des structures et affinité différente selon les molécules et différentes sources d'énergie pour le relargage des molécules comme l'ATP ou l'antiport de protons (Amaral et al., 2014; Du et al., 2018). Ces systèmes sont des sources majeures de résistances et multirésistances aux antibiotiques, notamment adaptatives (voir section 1.2.2.2 Résistances aux antibiotiques, détails 7.2.5.6 Résistances adaptatives) (Li, Plesiat, & Nikaido, 2015). Certains systèmes peuvent relarguer plusieurs types d'antibiotiques différents et ainsi augmenter jusqu'à 64 fois leur résistance à certains antibiotiques (Li & Nikaido, 2004). La résistance peut provenir de l'activation de la transcription des gènes codants pour les pompes à efflux par des systèmes à deux composants. La résistance peut également être acquise (voir section 1.2.2.2 Résistances aux antibiotiques, détails 7.2.5.5 Acquisition de résistance), par une mutation induisant ou augmentant directement la transcription ou indirectement en inactivant un répresseur (Amaral et al., 2014). Les pompes à efflux peuvent aussi participer à la virulence en exportant des toxines et des molécules de signalisation entre cellules (Du et al., 2018).

Les recherches de molécules capables d'inhiber spécifiquement des pompes à efflux et réduisant la résistance à certains antibiotiques ont permis d'identifier un certain nombre de molécules, cependant aujourd'hui aucun traitement inhibiteur efficace et non nocif pour l'être humain n'a été trouvé (AlMatar, Albarri, Makky, & Koksai, 2021; Marshall et al., 2020; Pages, Masi, & Barbe, 2005).

## 1.1.7.2 Systèmes de sécrétion

### 1.1.7.2.1 Systèmes de sécrétion de I à VI

Chez les bactéries à Gram négatif, la sécrétion des protéines peut être effectuée par divers complexes protéiques. Il existe deux systèmes permettant l'export de protéines dans le périplasme, les systèmes Tat et Sec, le système Sec permet également d'insérer des protéines dans la membrane interne ( **Figure 1.17**) (Natale, Bruser, & Driessen, 2008). Les systèmes de type II et V permettent de sécréter les protéines du périplasme au milieu extracellulaire, le système de type II permet également d'insérer des protéines dans la membrane externe (Korotkov & Sandkvist, 2019; Leo, Grin, & Linke, 2012). Le système de sécrétion de types I permet quant à lui de sécréter des protéines directement du cytoplasme au milieu extracellulaire (Delepelaire, 2004). Comme vu précédemment (1.1.4.4 Flagelles et pili, détails en annexe 7.2.4.1.2 Compositions et fonctions des pili), les systèmes de sécrétion, ou pili, de type III, IV, permettent d'injecter des protéines directement dans une cellule hôte (Fronzes, Remaut, & Waksman, 2008). Le système de sécrétion de type VI permet également cela, il a la particularité de fonctionner telle une seringue rétractable (Crisan & Hammer, 2020). Les effecteurs sécrétés peuvent avoir des fonctions très variées. De manière générale les systèmes de sécrétions sont souvent impliqués dans la virulence bactérienne et peuvent également l'être dans résistance aux antibiotiques (Boudaher & Shaffer, 2019; Depluvere, Devos, & Devreese, 2016). Il est important de noter que certains de ces systèmes de sécrétion peuvent transporter des effecteurs non protéiques (Sgro et al., 2019). Le rôle de certains systèmes de sécrétion dans la résistance et la virulence sont plus amplement traités dans le cadre des recherches effectuées au laboratoire de la Docteure Duperthuy aux sections 1.3.2 Peptides antimicrobiens, flagelle et biofilms chez *Vibrio cholerae* et 7.1 Chapitre de livre : The secretome of *Vibrio cholerae*.

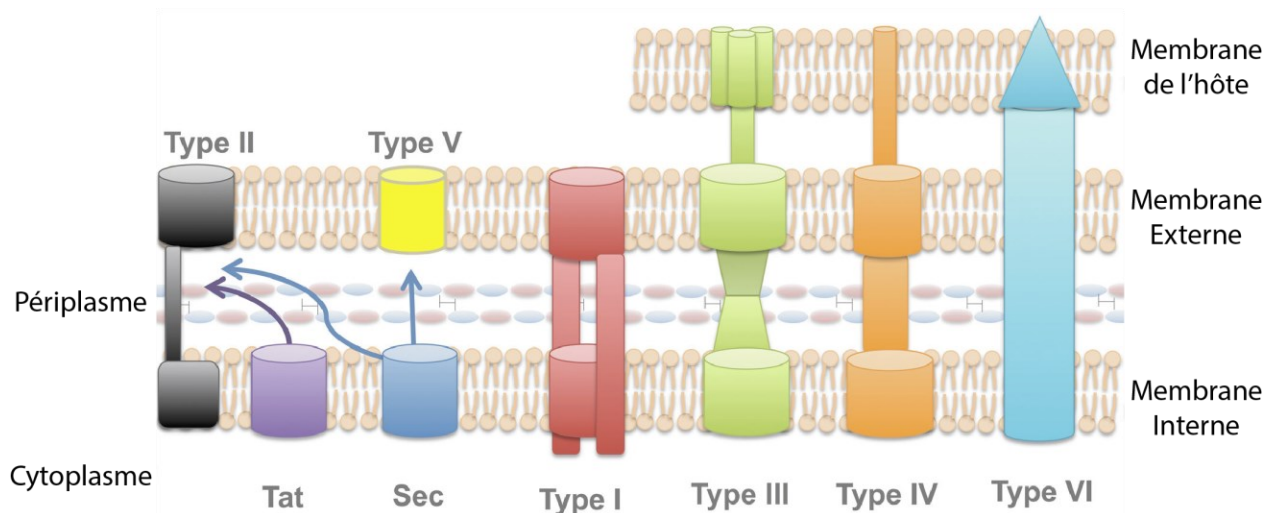


Figure 1.17. Différents types de systèmes de sécrétion chez les bactéries à Gram négatif.

Représentation schématique des différents systèmes de sécrétion des protéines chez les bactéries à Gram négatif. Les systèmes Tat et Sec permettent d'exporter les protéines du cytoplasme au périplasma ou dans la membrane interne concernant le système Sec. Les systèmes II et V permettent de sécréter les protéines dans le milieu extracellulaire depuis le périplasma. Les protéines provenant du système de sécrétion Tat ne peuvent pas emprunter le système de sécrétion de type V. Le système de sécrétion de type I permet de sécréter les protéines du cytoplasme au milieu extracellulaire directement. Les systèmes de sécrétion de type III, IV et VI permettent d'injecter des protéines directement dans une cellule hôte. (Costa et al., 2015; Natale et al., 2008). Figure provenant de (Green & Mecsas, 2016), reproduit avec accord selon Copyright © 2016, ASM Press.

#### 1.1.7.2.2 Vésicules membranaires, le système de sécrétion de type 0

Les bactéries à Gram négatifs ont la possibilité de sécréter des vésicules membranaires, des portions de membrane externe et parfois également de membrane interne expulsées activement de la cellule sous forme de sphère (**Figure 1.18**) (Schwechheimer & Kuehn, 2015). La composition et la quantité des vésicules sécrétées peut varier grandement en fonction de l'environnement et selon les bactéries. Les vésicules membranaires peuvent contenir entre autres, des facteurs protéiques de virulences et/ou de résistance, de l'ADN et de l'ARN, des lipides et des fragments de paroi (Beveridge, 1999; Guerrero-Mandujano, Hernandez-Cortez, Ibarra, & Castro-Escarpulli, 2017). Les vésicules membranaires sont traitées plus amplement en annexe, dans la revue de



littérature section 7.1.3 Membrane vesicles, the type 0 secretion system et à la section 7.2.5.3 Résistance par relargage de l'antibiotique

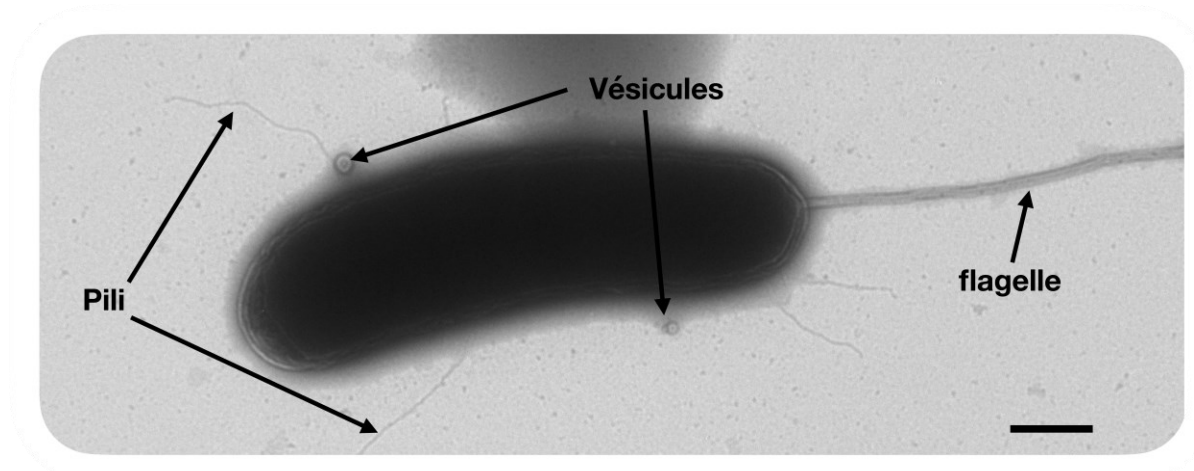


Figure 1.18. Aspect de deux vésicules de *Vibrio cholerae* A1552 en microscopie électronique

Image de *Vibrio cholerae* A1552 en microscopie électronique à transmission montrant deux vésicules d'environ 140 nm et 80 nm de diamètre. L'échantillon a été cultivé en présence de polymyxine B et a été fixé au glutaraldéhyde puis marqué à l'acide phosphotungstique. L'acquisition a été effectuée au microscope électronique à transmission à 75 kV Hitachi H-7100 et une caméra numérique AMT XR111. Échantillon préparé par Sean Giacomucci, acquisition effectuée par Arnaldo Nakamura à la Plateforme de Microscopie Electronique de l'Institut Armand-Frappier, INRS.

## 1.2 Infections bactériennes, mécanismes d'actions et de résistances antibiotiques

### 1.2.1 Lutte contre les infections bactériennes

Au cours du XXe siècle, la lutte contre les infections bactériennes s'est vue dotée de nouveaux outils, les antibiotiques. Ces molécules pouvant être définies comme n'importe quelles molécules ayant une activité antimicrobienne bactériostatique ou bactéricide *via* une action spécifique sur sa cible (J. Davies & Davies, 2010). Les peptides antimicrobiens seront ici considérés comme une catégorie d'antibiotiques ayant pour caractéristiques spécifiques d'être de petits peptides généralement cationiques produits par des microbes ou les cellules de l'hôte (Mahlapuu,

Hakansson, Ringstad, & Bjorn, 2016). L'utilisation thérapeutique des antibiotiques à partir des années 40 a permis de sauver des millions d'individus dans le monde et certainement contribué à l'accroissement de l'espérance de vie au cours du XXe siècle (Ventola, 2015). Cependant, l'augmentation exponentielle des infections par des bactéries résistantes et multirésistantes aux antibiotiques lors des dernières décennies inquiète le secteur de la santé et de la recherche. Le développement d'antibiotiques est grandement ralenti depuis les années 90 (De Oliveira et al., 2020) et chaque année les infections causées par des bactéries résistantes aux antibiotiques représentent un nombre de décès effroyables : au minimum 38 000 décès en Thaïlande (Sumpradit et al., 2017), 58 000 décès d'enfants en Inde (Laxminarayan et al., 2013), 35 000 décès aux États-Unis (CDC, 2019) et plus de 23 000 au sein de l'Union européenne (ECDC and EMA, 2009). On estime que chaque année au moins 700 000 individus meurent d'infections microbiennes résistantes et le nombre de morts par an pourrait monter à 10 000 000 d'ici 2050 si l'augmentation de l'apparition des résistances continue sur cette tendance (une part importante de ces infections étant d'origine bactérienne) (Munita & Arias, 2016; O'Neill, 2016; World Health Organization, 2014). Au Canada, le nombre de décès dus à des infections par des bactéries résistantes en 2018 était de l'ordre de 5 400 par an et pourrait atteindre 13 700 par an en 2050, pour un total cumulatif de près de 400 000 décès en 30 ans (Council of Canadian Academies, 2019). La résistance aux antimicrobiens a été définie en 2016 comme une « menace fondamentale » par la docteure Margaret Chan, directrice de l'OMS (World Health Organization, 2016).

La résistance à un antibiotique peut avoir une définition clinique, vétérinaire, pharmacologique ou microbiologique (Hernando-Amado, Coque, Baquero, & Martinez, 2020; Kahlmeter, 2014). D'un point de vue clinique ou vétérinaire, la résistance à un antibiotique se caractérise par le fort taux d'échec d'un traitement contre une infection chez l'homme ou l'animal (Hernando-Amado et al., 2020). Selon ces points de vue, on peut également dire d'une souche qu'elle est résistante, lorsque la concentration en antibiotique pour éliminer cette souche dépasse la concentration que l'organisme de l'hôte peut tolérer pour cette molécule (Munita & Arias, 2016). D'un point de vue pharmacologique, la résistance d'une bactérie à un antibiotique se caractérise par l'efficacité clinique d'un traitement selon la biodisponibilité de la molécule et/ou de sa concentration

minimale inhibitrice (Sanders & Laurentie, 2012). Du point de vue de la microbiologie, une souche est dite résistante à un antibiotique, lorsque la concentration minimale inhibitrice (CMI) de cet antibiotique est significativement supérieure à la CMI d'une souche définie préalablement sur une souche sauvage, c'est-à-dire n'ayant pas acquis de mécanisme de résistance contre cette molécule (Munita & Arias, 2016; Sanders & Laurentie, 2012).

Le phénomène de multi-résistances est l'accumulation de résistances par une bactérie. Le seuil minimal de la multi-résistance peut être défini par la faculté d'une bactérie à résister à au moins une molécule pour trois différentes classes d'antibiotiques (Magiorakos et al., 2012). Le nombre de molécules auxquelles une bactérie est résistante peut être tellement élevé que l'on parle d'ultrarésistance (*extensively drug-resistant*) (Magiorakos et al., 2012) ou de pan-résistance dans le cas de bactéries résistantes à tous les antibiotiques connus (Miriagou, Tzelepi, Daikos, Tassios, & Tzouvelekis, 2005). Les causes de l'augmentation de la prévalence de bactéries résistantes aux antibiotiques sont dues à divers phénomènes biologiques (voir 1.2.2.2 Résistances aux antibiotiques, détails en annexe aux sections 7.2.5.5 Acquisition de résistance, 7.2.5.6 Résistances adaptatives et 7.2.5.7 Résistance intrinsèque), mais sont grandement amplifiées par : la surprescription d'antibiotiques ou le mauvais suivi des prescriptions, l'utilisation intensive et souvent prophylactique d'antibiotiques dans l'agriculture et l'aquaculture, la contamination des sols et des eaux par les antibiotiques, du manque d'hygiène, du manque de contrôle des infections dans les établissements de soin et du faible nombre de traitements découverts récemment (E. Y. Klein et al., 2018; Kraemer, Ramachandran, & Perron, 2019; O'Neill, 2016; Ventola, 2015). Les solutions visant à réduire la sélection et la dissémination des bactéries résistantes et multi-résistantes aux antibiotiques sont multiples, elles sont bien résumées par divers organismes gouvernementaux et intergouvernementaux, elles préconisent entre autres la surveillance, la prévention et le contrôle des infections, l'utilisation judicieuse et contrôlée des antibiotiques (en évitant leurs utilisations en prophylaxie et en vérifiant la nature microbiologique de l'infection) et finalement par le développement de la recherche fondamentale et appliquée (ASPC, 2017; ECDC and EMA, 2009; O'Neill, 2016; World Health Organization, 2014, 2017).

## 1.2.2 Antibiotiques et mécanismes de résistances

### 1.2.2.1 Mode d'action des antibiotiques

Afin que l'antibiotique puisse avoir une action bactéricide ou bactériostatique sur la bactérie, celui-ci doit entrer en contact avec sa cible (Eyler & Shvets, 2019). Les cibles des antibiotiques sont diverses. Ainsi, certains vont cibler la paroi bactérienne alors que d'autres vont cibler les ribosomes ou des enzymes clés de la réplication comme les gyrases, les topoisomérases ou les polymérases. Une fois sa cible atteinte, l'antibiotique entraîne une interruption ou une perturbation d'un mécanisme ou détériore une structure essentielle à la bactérie. Divers modes d'action des antibiotiques ont été élucidés et impliquent l'inhibition des voies de biosynthèse de la paroi, des protéines ou des acides nucléiques, l'inhibition de la réplication bactérienne ou du métabolisme de l'acide folique. Quelques exemples sont représentés dans la **Figure 1.19**.

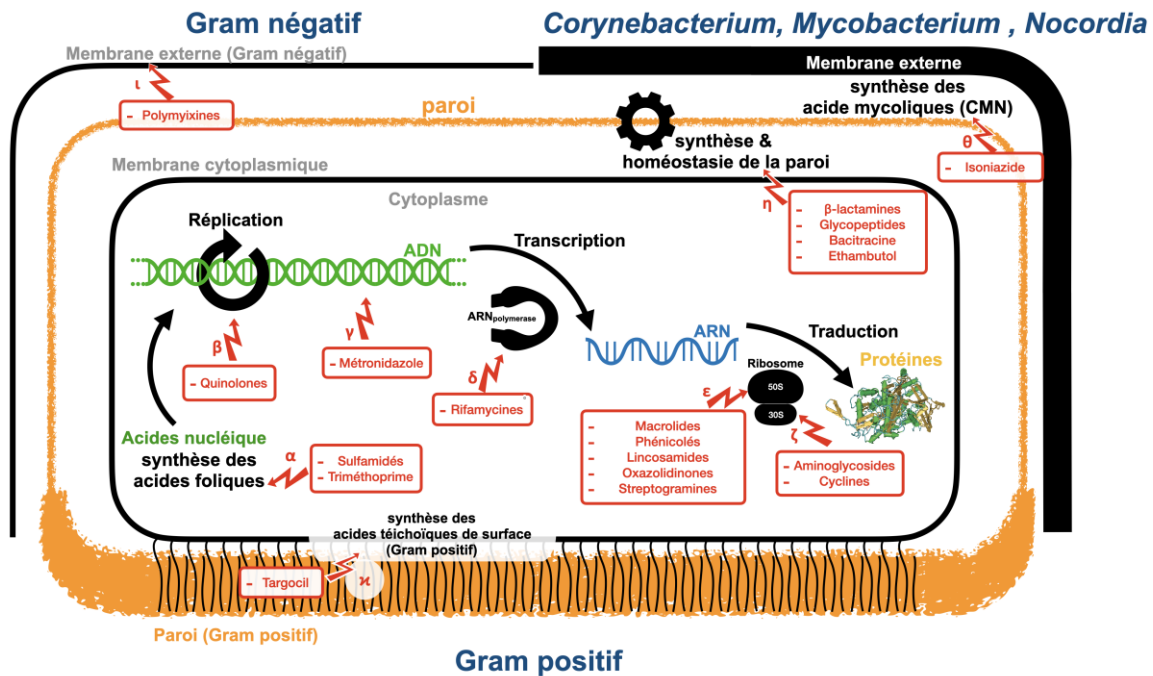


Figure 1.19. Mécanismes d'actions des différents antibiotiques

Représentation schématique des cibles et des mécanismes d'actions des différents antibiotiques ou classes d'antibiotiques. Ce schéma représente les bactéries à Gram positif et négatif ainsi que les bactéries du groupe des *Corynebacterium*, *Mycobacterium* et *Nocardia* (CMN). La membrane externe n'étant présente que chez ces deux dernières et les acides mycoliques n'étant présents que chez les CMN (voir Figure 1.3).  $\alpha$  : Les antibiotiques sulfamidés et la triméthoprime sont utilisés contre des bactéries à Gram positif et négatif (à large spectre), ils inhibent la synthèse

d'acide folique entraînant ainsi une inhibition de la production d'acides nucléiques et aussi de nucléotides (non montré sur le schéma), il s'agit d'antibiotiques bactériostatiques.  $\beta$  : Les quinolones sont des antibiotiques pouvant être bactéricides ou bactériostatiques selon leurs concentrations, ils ciblent l'ADN gyrase et des topoisomérase empêchant ainsi la réplication de l'ADN, ils sont utilisés contre des bactéries à Gram positif et négatif.  $\gamma$  : le métronidazole induit la production de molécules radicalaires dans le cytoplasme, causant des dommages à l'ADN et la mort de la bactérie, fonctionne surtout sur les bactéries anaérobies à Gram négatif et positif.  $\delta$  : les rifamycines sont un antibiotique bactéricide qui inhibe l'ARN polymérase empêchant ainsi la transcription, ils sont efficaces contre certaines bactéries à Gram positif négatif et mycobactéries.  $\epsilon$  : Les Macrolides, Phénicolés, Lincosamides, Oxazolidinones et Streptogramines sont des antibiotiques bactériostatiques qui empêchent la traduction en inhibant le ribosome au niveau de la sous-unité 50S, ils ont des spectres d'action différents.  $\zeta$  : Les aminoglycosides et cyclines (les cyclines sont un groupe de molécules ayant une structure commune à la tétracycline) sont des familles d'antibiotiques respectivement bactéricides et bactériostatiques qui empêchent la traduction en inhibant le ribosome au niveau de la sous-unité 30S. Les cyclines sont efficaces sur une grande variété de bactéries à Gram négatif et positif, alors que les aminoglycosides sont surtout efficaces contre les bactéries aérobies à Gram négatif.  $\eta$  : Les  $\beta$ -lactamines, glycopeptides et bacitracines sont des groupes d'antibiotiques principalement bactéricides agissant sur la paroi et causant une lyse bactérienne, ces antibiotiques sont principalement efficaces contre les bactéries à Gram positifs seuls certaines  $\beta$ -lactamines sont efficaces sur les bactéries à Gram négatif ou sur les CMN ; l'éthambutol est bactériostatique et fonctionne chez les bactéries du groupe des CMN.  $\theta$  : L'isoniazide est un antibiotique bactériostatique fonctionnant contre les bactéries du genre *Mycobacterium*, cet antibiotique inhibe la synthèse des acides mycolique, un élément important de la membrane externe.  $\iota$  : Les polymyxines sont des antibiotiques agissant sur la membrane externe des bactéries à Gram négatif.  $\kappa$  : Le targocil est un antibiotique bactériostatique inhibant la synthèse des acides téichoïques de surface (voir Figure 1.2) déstabilisant ainsi la paroi de certaines bactéries à Gram positif (Cambau & Guillard, 2012; Campbell et al., 2012; Chopra & Roberts, 2001; Eldweik, McClelland, Stein, Blachley, & Lee, 2019; Eyler & Shvets, 2019; Schubert et al., 2017; F. Silva, Lourenco, Queiroz, & Domingues, 2011; Trimble et al., 2016; Unissa, Subbian, Hanna, & Selvakumar, 2016).

#### 1.2.2.2 Résistances aux antibiotiques

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent être séparés en 4 catégories : l'absence d'affinité de l'antibiotique pour sa cible (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015; Hedge & Spratt, 1985), l'inactivation ou la dégradation de l'antibiotique par la bactérie (Lin et al., 2017), le relargage de l'antibiotique par la bactérie (S. Wang et al., 2016) et la diminution de l'accessibilité à la cible de l'antibiotique (**Figure 1.20A-F**) (P. Gupta et al., 2018). Les mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent également être classés selon leurs origines (Arzanlou et al., 2017). Ils peuvent résulter de diverses voies de régulations au sein de la bactérie, ils sont alors

adaptatifs (**Figure 1.20α**) (Narendrakumar, Chandrika, & Thomas, 2020). Certains mécanismes de résistances peuvent être acquis, par transferts horizontaux de gènes ou par mutation (**Figure 1.20β**) (Tirumalai et al., 2019). Les mécanismes de résistances peuvent également provenir d'une caractéristique spécifique à une espèce bactérienne ou toute une catégorie de bactéries, ils sont alors appelés résistances intrinsèque (**Figure 1.20γ**) (Cox & Wright, 2013; Impey, Hawkins, Sutton, & Soares da Costa, 2020; Massad & Oliver, 1987).

Vous pourrez trouver plus de détails et d'exemples sur les mécanismes de résistance aux antibiotiques en annexe, section 7.2.5 Mécanismes et origines des résistances aux antibiotiques.

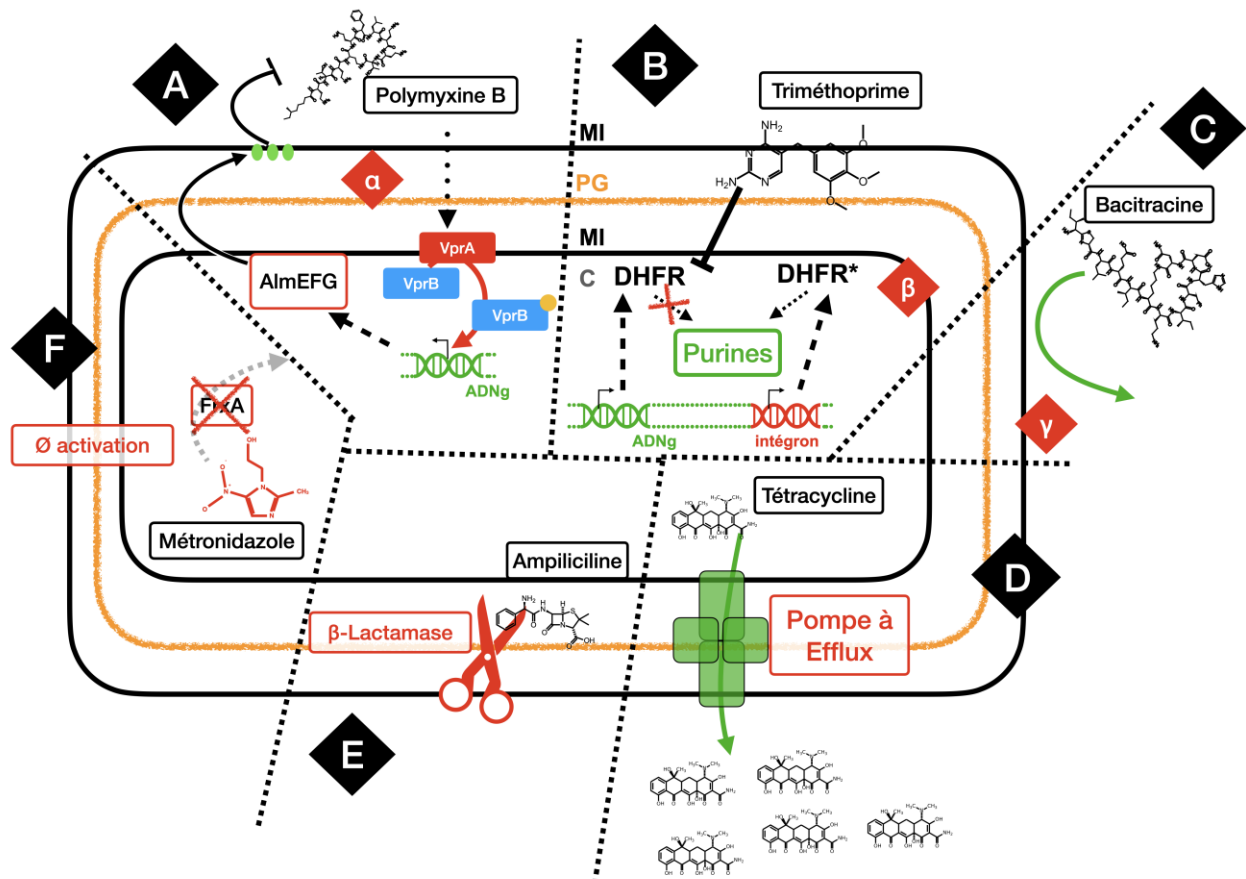


Figure 1.20. Mécanismes et origines de résistances aux antibiotiques

Schéma des différents types de mécanismes de résistances aux antibiotiques et de leurs classements en fonction de leurs origines. Exemples de résistances identifiés chez des souches de *V. cholerae* et *Escherichia coli*. **A**) Résistance par modification de la cible de l'antibiotique. La polymyxine B est un peptide antimicrobien cationique déstabilisant la membrane externe en se fixant sur les lipopolysaccharides (LPS) (**Figure 1.19**). Chez *Vibrio cholerae* O1 El tor le transfert de

groupements glycine ou diglycine sur les molécules de LPS (ovales verts) grâce aux protéines AlmE, AlmF et AlmG. Cette modification du LPS induit un changement de charge qui réduit l'affinité de la polymyxine B pour sa cible (Herrera et al., 2014). **B**) Mécanisme de résistance par utilisation d'une voie alternative. Le triméthoprim est un antibiotique de la classe des sulfamides. Le triméthoprim a une action inhibitrice dans sur la dihydrofolate réductase (DHFR), une enzyme essentielle à la voie de synthèse des purines (**Figure 1.19**). L'analyse de souches de *Escherichia coli* isolées en Corée du Sud entre 1994 et 1996 a révélé la présence d'intégrons contenant une version du gène codant pour une DHFR résistante au triméthoprim. (Lee et al., 2001). **C**) Résistance par imperméabilité. La bacitracine est un antibiotique de haut poids moléculaire ciblant la voie de synthèse de la paroi (**Figure 1.19**). Comme la plupart des bactéries à Gram négatif, *Vibrio cholerae* est résistante aux antibiotiques de haut poids moléculaire comme la bacitracine. (Dorr et al., 2016). **D**) Résistance par absence d'activation de l'antibiotique. Le métronidazole est un antibiotique provoquant des dégâts à l'ADN (**Figure 1.19**). Cette molécule est qualifiée de promédicament, car elle doit subir une modification chimique avant de devenir active. L'activation du métronidazole s'effectue par son oxydation par une nitroréductase (Dingsdag & Hunter, 2018). *Escherichia coli* est généralement connu comme résistante au métronidazole, elle a pu être rendue sensible à cette molécule en introduisant le gène *frxA* codant pour une NAD(P)H nitroréductase. (Goodwin et al., 1998; Kwon, El-Zaatari, et al., 2000; Kwon, Kato, El-Zaatari, Osato, & Graham, 2000). L'absence d'activité de cette nitroréductase rend par exemple *Helicobacter pylori* résistante au métronidazole (M. A. Smith & Edwards, 1997). **E**) Résistance par dégradation de l'antibiotique. Exemple de résistance à l'ampicilline par l'action d'une bêta-lactamase. L'ampicilline est un antibiotique de la classe des  $\beta$ -lactame inhibant la synthèse de la paroi (**Figure 1.19**). Certaines bactéries possèdent des  $\beta$ -lactamases, des enzymes capables de dégrader les  $\beta$ -lactames. Certaines souches de *Vibrio cholerae* El Tor serovar Ogawa, isolées lors d'une épidémie au sud de l'Afrique en 2008, ont montré de multiples résistances dont une à l'ampicilline. Ces résistances étaient dues à leur capacité à produire la  $\beta$ -lactamase TEM-63 (Ismail et al., 2011). **F**) Résistance par relargage de l'antibiotique, exemple de résistances à la tétracycline par la présence de pompes à efflux chez des souches émergées en Inde en 2016. La tétracycline fait partie du groupe des cyclines (**Figure 1.19**) qui inhibe la synthèse des protéines. Durant l'épidémie de 2016 à l'Est de l'Inde, des souches O1 El tor présentaient une résistance à la tétracycline, probablement causée par la présence de type *major facilitator superfamily* (MFS). (Jain, Kumar, & Goel, 2016). **α**) Mécanisme de résistance adaptatif. La résistance à la polymyxine B observée **Figure 1.20A** est un exemple de mécanisme de résistance adaptatif, car il découle d'une régulation. Le système à deux composants VprA-VprB induit l'expression des gènes *almEFG* impliqués dans la résistance à la polymyxine B. Le système VprA-VprB s'active en fonction du pH ou en présence de peptide antimicrobiens (Herrera et al., 2014). **β**) Résistance acquise. La cassette de résistance au triméthoprim représentée **Figure 1.20B** provient d'un intégron inséré dans le génome de *E. coli*. Cet élément mobile a été retrouvé dans diverses souches de *E. coli* prélevées en Corée du Sud entre les années 1994 et 1996, suggérant un transfert horizontal de gènes (Lee et al., 2001). **γ**) Résistance intrinsèque. La résistance à certains antibiotiques de haut poids moléculaire comme la bacitracine, représenté **Figure 1.20C** est une caractéristique commune à la plupart des bactéries à Gram négatif. Cette caractéristique peut être considérée comme une résistance intrinsèque (Delcour, 2009; Dorr et al., 2016). D'une manière plus triviale, on peut également considérer que la résistance au targocil ou à l'isoniazide est une

caractéristique intrinsèque des bactéries à Gram négatif, car ces dernières ne possèdent pas les mécanismes ciblés par ces antibiotiques (**Figure 1.19**, **θ**). ME: membrane externe ; PG: peptidoglycane ; MI : membrane interne ; C : cytoplasme.

### **1.2.3 Grandes menaces bactériennes : importance des bactéries à Gram négatif**

L'écrasante majorité des menaces bactériennes sont des bactéries à Gram négatif (plus de détails en annexe section 7.2.6) (World Health Organization, 2014, 2017). Ceci est principalement dû à la résistance intrinsèque de ces bactéries à de multiples antibiotiques qui est conférée par leur membrane externe (Zgurskaya, Lopez, & Gnanakaran, 2015), et à la faible fréquence de découverte d'antibiotiques efficaces contre ces bactéries (Mauldin, Salgado, Hansen, Durup, & Bosso, 2010). Les infections bactériennes d'origine nosocomiales représentent une part très importante des infections par des souches résistantes aux antibiotiques (De Oliveira et al., 2020; Mulani, Kamble, Kumkar, Tawre, & Pardesi, 2019; Santajit & Indrawattana, 2016). Elles sont particulièrement difficiles à prévenir et surviennent souvent lors de la pose de cathéter, de sonde urinaire, lors d'opération, de pose d'endoprothèse (Khatoon, McTiernan, Suuronen, Mah, & Alarcon, 2018). Certaines de ces bactéries peuvent affecter un nombre d'organes considérable (détails en annexe section 7.2.6 Classement des plus grandes menaces bactériennes). D'autre part, la capacité des bactéries à former des biofilms est souvent associée à l'infection (Jamal et al., 2018; Khatoon et al., 2018) et plus de 60% des infections impliquent des bactéries en biofilm (Lewis, 2001). C'est particulièrement le cas de bactéries à Gram négatif comme *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* et *Acinetobacter baumannii* (Solis-Velazquez et al., 2020). La capacité des bactéries à former des biofilms est également un problème concernant les infections d'origine environnementale. C'est notamment le cas de *Vibrio cholerae* dont la formation de biofilm lui confère une grande résistance à certains antibiotiques comme la ciprofloxacine et l'azithromycine (P. Gupta et al., 2018), mais lui permet également de persister dans l'environnement (Sultana et al., 2018).



### 1.3 Cibles étudiées chez *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*

Lors de mes recherches j'ai travaillé principalement sur deux modèles bactériens, *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*) au laboratoire de la Docteure Marylise Duperthuy et *Escherichia coli* (*E. coli*) au laboratoire de la Docteure Catherine Paradis-Bleau.

#### 1.3.1 *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*

##### 1.3.1.1 Caractéristiques générales et habitats

*V. cholerae* et *E. coli* sont toutes deux des bactéries à Gram négatif de la classe des *Gammaproteobacteria*, la première étant de l'ordre *Vibrionales* et la seconde de l'ordre des *Enterobacterales* (voir **Figure 1.21A**). *V. cholerae* est un bacille incurvé d'environ 1 à 3  $\mu\text{m}$  de long, elle est généralement munie d'un seul flagelle polaire (Bauerfeind, Von Graevenitz, Kimmig, & Schiefer, 2016), *E. coli* est un bacille droit faisant généralement 1 à 2  $\mu\text{m}$  de long et multiflagellé (voir **Figure 1.21**) (Council, 1999).

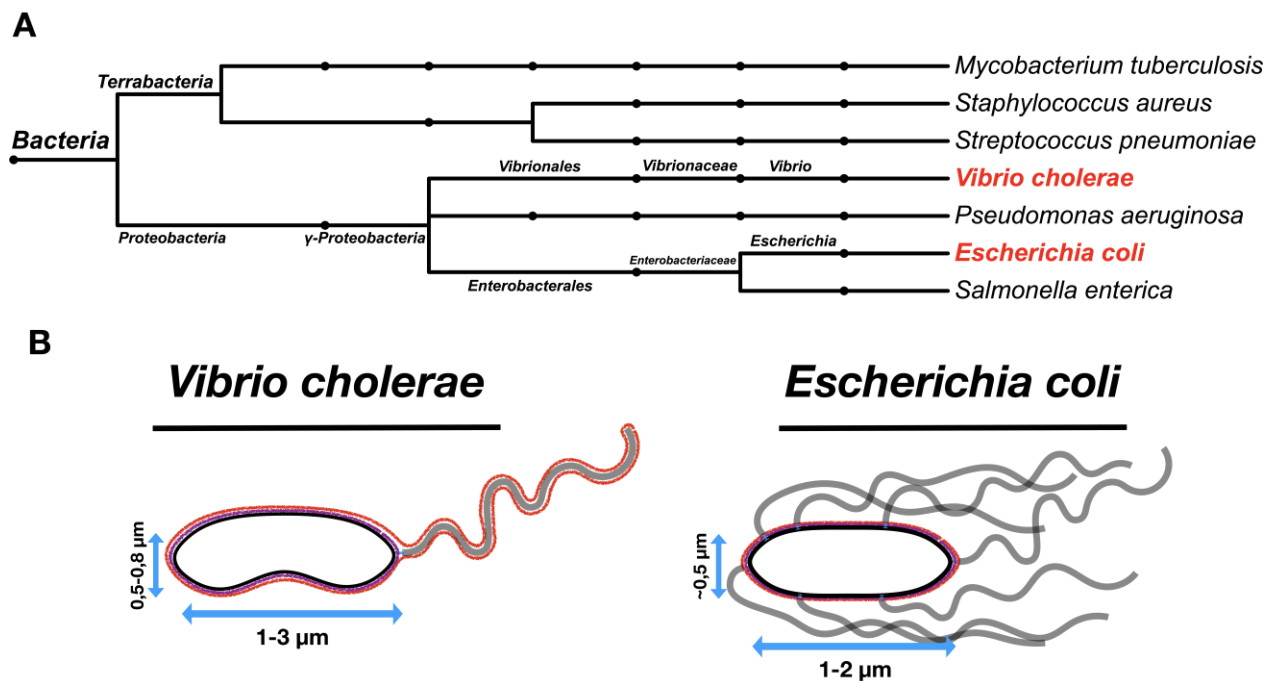


Figure 1.21. *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*

A) Arbre phylogénétique représentant les liens entre *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli* et des espèces bactériennes pathogènes, à Gram négatif (*Salmonella enterica* et *Pseudomonas*

*aeruginosa*), à Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*) et CMN (*Mycobacterium tuberculosis*). Les rangs taxonomiques sont séparés par les embranchements ou les nœuds (points). La distance entre les espèces n'est pas pondérée. Ils indiquent successivement (de gauche à droite) le règne, l'embranchement, la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce. L'arbre phylogénétique a été créé grâce au logiciel iTOL V5 (Letunic & Bork, 2021) B) Représentation schématique de *Vibrio cholerae* et *Escherichia coli*. *Vibrio cholerae* est un bacille incurvé d'environ 1-3 µm de long pour ~0,5 µm de large pourvu d'un flagelle polaire enveloppé. *Escherichia coli* est un bacille droit de 1 à 2 µm de long pour ~0,5-0,8 µm de large généralement muni de multiples flagelles répartis sur l'ensemble de son enveloppe. (Bauerfeind et al., 2016; Council, 1999)

*E. coli* est une bactérie commensale du microbiote intestinal de la plupart des vertébrés, elle peut se retrouver dans de l'eau douce ou des aliments contaminés par des déjections animales ou humaines (Chekabab, Paquin-Veillette, Dozois, & Harel, 2013). L'habitat naturel de *V. cholerae* est l'eau salée des estuaires. *V. cholerae* se retrouve notamment sur l'exosquelette de chitine des crustacés (Lutz, Erken, Noorian, Sun, & McDougald, 2013). Elle peut également se retrouver dans des cours d'eau douce, des nappes phréatiques ou des aliments contaminés par des déjections humaines (Harris, LaRocque, Qadri, Ryan, & Calderwood, 2012). Contrairement à *E. coli*, *V. cholerae* n'a pas de réservoir naturel chez d'autres mammifères que l'être humain (Lutz et al., 2013). Il existe différentes souches pathogènes de *E. coli* et *V. cholerae* pouvant toucher divers organes, la plupart causent des infections intestinales plus ou moins sévères, voire mortelles (Oh et al., 2014; Tenailon, Skurnik, Picard, & Denamur, 2010).

### 1.3.1.2 Epidémiologie

#### 1.3.1.2.1 Epidémiologie du choléra.

Le choléra est une maladie saisonnière qui sévit majoritairement dans des régions tropicales (Harris et al., 2012). La bactérie, *Vibrio cholerae* est l'agent étiologique du choléra, chaque année *Vibrio cholerae* infecte entre 1,3 et 4 millions d'êtres humains causant entre 21.000 et 143.000 décès (Ali, Nelson, Lopez, & Sack, 2015; Global Task Force on Cholera Control, 2017). Depuis 1817, sept pandémies de choléra ont été recensées dans le monde, la dernière a débuté en 1961 et sévit encore de nos jours (Deen, Mengel, & Clemens, 2020). Les symptômes caractéristiques du choléra résultent principalement de l'effet de la toxine cholérique sécrétée par *V. cholerae* sur les

cellules intestinales, et se résument à des vomissements et des diarrhées aqueuses extrêmement abondantes (Harris et al., 2012).

Une fois ingérée, *V. cholerae* colonise l'intestin grêle où elle sécrète la toxine cholérique. Une fois activée et internalisée dans les cellules épithéliales de l'intestin grêle, la toxine induit le relargage d'ions Cl<sup>-</sup> ce qui provoque une fuite d'eau massive depuis les cellules vers le lumen (Wernick, Chinnapen, Cho, & Lencer, 2010). En une heure, la perte d'eau chez un patient atteint de choléra peut aller jusqu'à 10 mL/kg, pouvant induire la mort par déshydratation et déséquilibre électrolytique (Harris et al., 2012). Le détail du mécanisme d'action de la toxine cholérique est présenté en annexe section 7.2.7. Les infections par *Vibrio cholerae* peuvent provenir d'une transmission d'être humain à être humain par la voie fécale-orale, mais interviennent le plus souvent indirectement *via* l'ingestion d'eau, mal ou non traitée, contaminée par des excréments ou des vomissures (Conner, Teschler, Jones, & Yildiz, 2016). L'accès à une eau saine est primordial, l'absence ou la mauvaise qualité des infrastructures d'épuration d'eau et d'hygiène sont souvent en cause dans l'explosion des contaminations (D'Mello-Guyett et al., 2020).

Le principal traitement du choléra est la réhydratation avec de l'eau chargée en électrolytes (Harris et al., 2012). Dans des formes très sévères, la réhydratation par voie orale peut être impossible, elle doit alors être effectuée par voie intraveineuse (Harris et al., 2012). Certains antibiotiques permettent de réduire la charge bactérienne ainsi que la durée des symptômes et ce faisant, la propagation de la maladie, mais ne sont généralement utilisés qu'en dernier recours afin d'éviter l'émergence de souches résistantes (Harris et al., 2012). En effet, la plupart des souches aujourd'hui impliquées dans la pandémie possèdent déjà des résistances à de nombreux antibiotiques (Das, Verma, Kumar, Ghosh, & Ramamurthy, 2020). *Vibrio cholerae* a également la particularité d'acquérir de l'ADN et de muter particulièrement rapidement et donc d'engendrer facilement des résistances (Baharoglu & Mazel, 2011).

Les différentes souches de *V. cholerae* sont classées en fonction de la composition de leur antigène O (rappel section 1.1.4.1.1 Lipopolysaccharides). Sur environ 200 antigènes O répertoriés seuls, les souches des sérogroupes O1 et O139 sont responsables du choléra ( **Figure 1.22**) (Harris et al., 2012). Les sérogroupes dits « non-O1/non-O139 » ne produisent pas la toxine

cholérique et ne causent pas les mêmes symptômes que le choléra, certaines peuvent cependant causer des gastroentérites ou des infections cutanées (Morris, 2011). Le sérotype O1 est divisé en deux biotypes, le biotype « classique » responsable des 6 premières pandémies et le biotype El Tor responsable de l'émergence de la pandémie actuelle (voir **Figure 1.22**) (Harris et al., 2012). Depuis 1991, des souches O1 El Tor atypiques et hybrides ont émergées, partageant des caractéristiques génétiques jusqu'alors identifiées seulement dans les souches classiques (Figure 1.23) (Bhandari, Jennison, Rathnayake, & Huygens, 2021). Les souches de sérotype O139 dérivent d'une souche O1 El Tor (Sack, Sack, Nair, & Siddique, 2004), elles ont émergé en Asie au cours de l'année 1992 (Basu et al., 2000). Les souches O139 sont depuis retrouvées sporadiquement lors d'épidémies localisées (Bhandari et al., 2021).

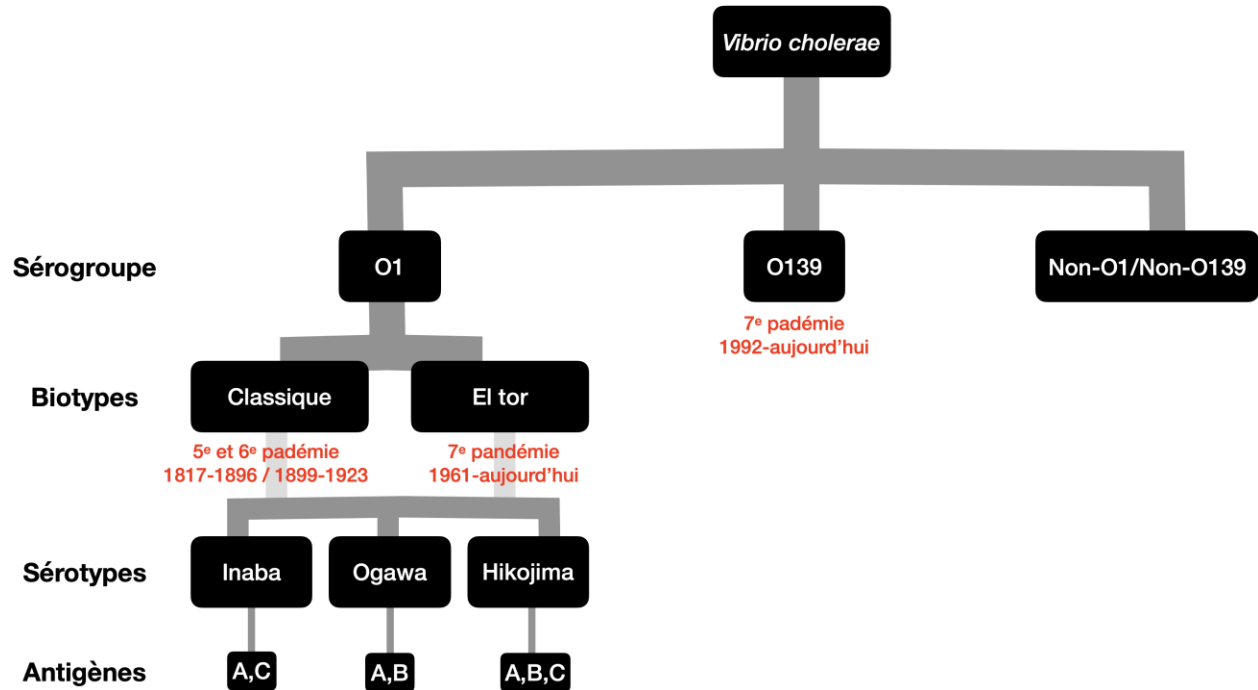


Figure 1.22. Classification chez *Vibrio cholerae*

Diagramme de classification de *Vibrio cholerae* et prévalence du sérotype lors de la 5<sup>e</sup>, 6<sup>e</sup> ou 7<sup>e</sup> pandémie. *Vibrio cholerae* est divisé en 3 sérogroupes, O1, O139 et non-O1/non-O139. Le sérotype O1 est divisé en biotypes classiques et El tor qui peut être de 3 sérotypes. Le sérotype Inaba possède les antigènes A et C, Ogawa les antigènes A et B et Hikojima A, B et C. (Basu et al., 2000; Harris et al., 2012; Ogg, Ogg, Shrestha, & Poudayl, 1979)

Les différences majeures entre ces sérogroupes proviennent de l'acquisition d'éléments génétiques mobiles ou de clusters de gènes dans leur génome *via* des événements de

conjugaison, de transduction ou de conjugaison (**Figure 1.23**) (Banerjee, Das, Balakrish Nair, & Basak, 2014). L'évènement le plus notable est certainement l'acquisition des gènes codant pour la toxine cholérique provenant du prophage CTX $\phi$ . Divers plasmides ont été identifiés chez *Vibrio cholerae* dont certains contenaient des gènes de résistances au chloramphénicol, à l'ampicilline, à la kanamycine, à la tétracycline, ou encore à la gentamicine (Banerjee et al., 2014; Ceccarelli, Salvia, Sami, Cappuccinelli, & Colombo, 2006).

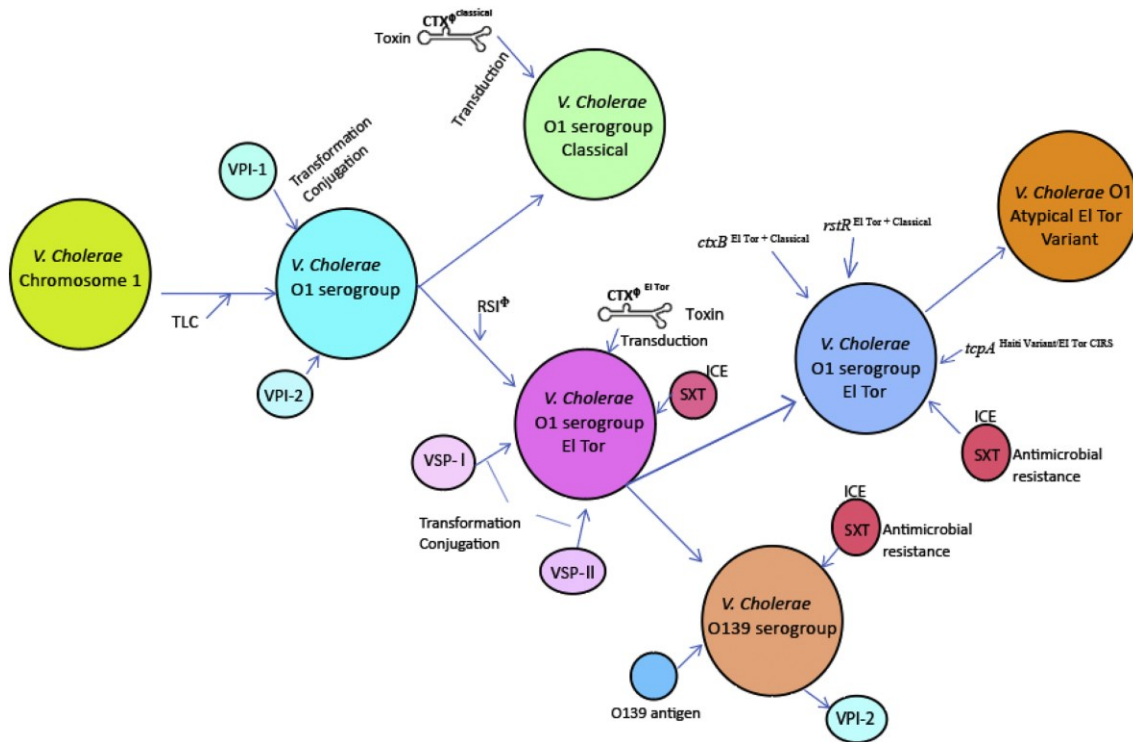


Figure 1.23. Évènements d'acquisitions d'éléments génétiques mobiles et de cluster de gènes les souches de sérogroupes O1 et O139 de *Vibrio cholerae* et hypothèse du chemin évolutif.

De nombreux événements de transductions, conjugaisons (*conjugation*) ou transformations ont permis l'intégration des divers gènes dans le génome de *Vibrio cholerae*, dont certains sont impliqués dans la virulence. L'îlot de pathogénicités de *Vibrio* (VPI) VPI-1 porte le gène codant pour le pilus TCP qui est nécessaire pour l'intégration de prophages CTX $\phi$  et essentiel à la colonisation (voir section 1.3.2 Peptides antimicrobiens, flagelle et biofilms chez *Vibrio cholerae*). Le prophage VPI-2 porte entre autres des gènes permettant de dégrader certains sucres. Les îlots de pathogénicité de la septième pandémie de *Vibrio* (VSP) VSP-1 et VSP2 sont présents presque exclusivement chez les souches O1 El Tor, VSP-2 comporte des gènes de virulences dont certains sont impliqués dans l'adhésion et le chimiotactisme. Certains éléments de conjugaisons ou d'intégration (ICE) comme STX peuvent porter des gènes de résistances aux antibiotiques. Il en existe de multiples variations dans les sérogroupes O1 El tor et O139 portant des gènes de

résistance pour différents antibiotiques. D'autres éléments mobiles comme le prophage portant la toxine cholérique (CTX  $\phi$ ), le prophage  $\phi$ RS1 et l'élément cryptique lié à la toxine cholérique (TLC, *Toxin-linked cryptic*). À noter qu'il existe des différences notables entre les prophages CTX $\phi$  El tor et classique, ils se caractérisent par la présence de  $\phi$ RS1 aux extrémités de CTX $\phi$  et une variation de séquence dans le gène *ctxB*. Les souches O1 atypiques portent un prophage CTX $\phi$  altéré ou hybride qui possède des analogies de séquence pour ces deux prophages. (Banerjee et al., 2014; Bhandari et al., 2021; Rubin, Lin, Mekalanos, & Waldor, 1998). Image provenant de (Bhandari et al., 2021) avec accord de reproduction sans modification (CC BY NC ND), © 2021 M. Bhandari, A. V. Jennison, I. U. Rathnayake, F. Huygens. Published by Elsevier B.V.

Les souches des biotypes O1 classiques et El tor présentent certaines divergences. Les manifestations cliniques d'une infection sont moins importantes avec le biotype El tor qu'avec le biotype classique (Kaper, Morris, & Levine, 1995). Leurs systèmes de détection du quorum influent différemment sur la régulation de leurs voies de virulence et sur la formation de biofilm (Hammer & Bassler, 2009). Les souches El tor semblent en revanche plus adaptées à l'environnement aquatique que les souches classiques, ce qui pourrait expliquer la prolifération de ces premières au « détriment » de ces dernières (Pradhan, Baidya, Ghosh, Paul, & Chowdhury, 2010). Cette faculté pourrait provenir en partie du fait de leurs meilleures capacités à métaboliser la chitine (Yoon & Mekalanos, 2006). Une caractéristique qui a longtemps permis de distinguer les souches El tor des souches classiques est leurs résistances aux antibiotiques. La résistance à la polymyxine B était une caractéristique spécifique aux souches El tor (mécanismes d'action de la polymyxine B détaillé section 1.3.2.2 Peptides antimicrobiens) (Matson, Yoo, Hakansson, & Dirla, 2010). Cependant, il a récemment été démontré que des souches O1 El tor sensibles à la polymyxine B se propagent actuellement en Inde (Samanta et al., 2018). Les souches O139 dérivées ont pour particularité de posséder une capsule (détails en annexe section 7.2.2 Capsules) (Waldor et al., 1994). Des travaux chez le souriceau ont montré que l'absence de cette capsule réduisait l'infectiosité de 30 fois et permettait notamment de résister au système immunitaire inné (Nesper et al., 2002).

Les recherches effectuées au laboratoire de la Docteure Duperruy se sont portées sur l'effet des peptides antimicrobiens sur la mobilité et la formation de biofilm de *Vibrio cholerae*. Ainsi, la

section 1.3.2 introduira les derniers éléments utiles à la compréhension des articles 1 et 2 (Chapitre 2 –1<sup>er</sup> Article et Chapitre 3 –2<sup>e</sup> Article).

#### 1.3.1.2.2 *Maladies causées par Escherichia coli*

Chaque année entre 200.000 et 500.000 personnes meurent d'infections causées par des souches pathogènes de *E. coli* (Rafael Lozano et al., 2012; R. Lozano et al., 2012). La plupart des maladies causées par *E. coli* sont des troubles intestinaux plus ou moins sévères, mais certaines souches peuvent également causer des septicémies, des cystites, des pyélonéphrites, des dysenteries ou encore des méningites (**Tableau 1.1**) (Bhunia, 2018). Les différentes souches de *E. coli* peuvent être classées en fonction de leurs pathogénicités (voir **Tableau 1.1**). Elles peuvent également être classées en fonction de leurs antigènes O (près de 200 types différents identifiés) (B. Liu et al., 2020), ou des antigènes H de flagelle (plus de 50) (L. Wang, Rothmund, Curd, & Reeves, 2003)) et/ou de l'antigène K de capsule (60) (Yang et al., 2018).

Les souches de laboratoire *E. coli* K-12 sont probablement les modèles bactériens les plus utilisés (Blount, 2015). L'appellation K-12 ne correspond pas à l'antigène K, elle est dépourvue de capsule (Peleg et al., 2005). Elle a également la particularité de ne pas produire d'antigène O (D. Liu & Reeves, 1994). De nombreux mécanismes fondamentaux ont été découverts chez ces souches, notamment ceux impliqués dans la formation et de l'homéostasie de l'enveloppe (Blattner et al., 1997; Silhavy et al., 2010; Stromberg et al., 2018). Il s'agit donc d'un modèle d'étude bien établi permettant la réalisation de nombreuses études sur les mécanismes fondamentaux des bactéries à Gram négatif.

Les recherches effectuées au laboratoire de la Docteure Catherine Paradis-Bleau se sont portées sur les mécanismes fondamentaux de l'homéostasie de l'enveloppe avec pour modèle *E. coli* K-12 MG1655 (voir ci-dessous **section 1.3.3.2**). Pour cette raison, la pathogénèse et la virulence de *E. coli* ne seront pas détaillées dans cette thèse. De nombreuses revues ou chapitres de livres portent sur ces sujets et sont par ailleurs disponibles (Bhunia, 2018; Braz, Melchior, & Moreira, 2020; Kaper, Nataro, & Mobley, 2004; Morabito, 2014).

Tableau 1.1. Classification des *Escherichia coli* pathogènes

| Pathogènes*   | Organe infecté /<br>Symptôme  | Mécanisme   | Sérogroupe<br>souvent associés  |
|---|---|---|---|
| <i>Escherichia coli</i><br>entérotoxique<br>(ECET)      | Intestin grêle :<br>Diarrhée aqueuse<br>sévère                            | Sécrétion des<br>toxines ST et LT :<br>sécrétion d'ion Cl <sup>-</sup><br>et fuite d'eau<br>depuis cellules<br>épithéliales | O6, O8, O11, O15,<br>O20, O25, O27,<br>O78, O128, O148,<br>O149, O159 et<br>O173  |
| <i>Escherichia coli</i><br>entérohémorragique<br>(ECEH) | Gros intestin /<br>Lésion intestinales<br>et diarrhée<br>sanglante        | Sécrétion d'une<br>shigatoxine ou une<br>toxine similaire :<br>inhibition de la<br>synthèse de<br>protéines.                | O4, O5, O16, O26,<br>O45, O55, O91,<br>O103, O111ab,<br>O113, O121, O117,<br>O145, O157, O172,<br>O176, O177, O178<br>O180 et O181. |
| <i>Escherichia coli</i><br>entéropathogène<br>(ECEP)    | Intestin grêle /<br>Diarrhée et décès<br>chez les enfants                 | Adhésions aux<br>cellules épithéliale<br>suppression des<br>villosités et<br>déformations<br>cellulaire<br>(piédestal)      | O26, O55, O86,<br>O111, O114, O119,<br>O125, O126, O127,<br>O128, O142 et<br>O158   |
| <i>Escherichia coli</i><br>entéroaggrégative<br>(ECEA)  | Intestin grêle et<br>gros intestin /<br>Diarrhée glaireuse<br>persistante | Adhésion,<br>réduction et<br>nécrose des<br>villosités  | O3, O15, O44, O86,<br>O77, O104, O111<br>O127   |



|   |   |  |   |
|---|---|--|---|
| <i>Escherichia coli</i><br>entéroinvasive<br>(EIEC)           | Gros intestin /<br>Diarrhée aqueuse<br>et dysenterie                        | Invasion des<br>cellules épithéliales<br>et prolifération<br>dans les cellules de<br>l'hôte                        | O28, O29, O112,<br>O124, O136, O143,<br>O144, O152, O159,<br>O164 et O167 |
| <i>Escherichia coli</i><br>uroropathogène<br>(ECUP)           | Voies urinaires,<br>reins et système<br>sanguin / Cystite,<br>pyélonéphrite | Colonisation,<br>adhésion et<br>sécrétion de<br>toxines  | K1, K5, K30, K92,<br>O4, O6, O14, O22,<br>O75 et O83                      |
| <i>Escherichia coli</i><br>responsable de<br>méningite (ECMn) | Voies sanguine,<br>cerveau / troubles<br>ou séquelles<br>neurologiques      | Colonise le rachis à<br>partir du tube<br>digestif en passant<br>par la voie<br>sanguine et la<br>BHM <sup>‡</sup> | K1  |

\* : La liste des souches pathogène de *E. coli* n'est pas exhaustive. Sources : (Bhunja, 2018; Brumbaugh & Mobley, 2012; Stenutz, Weintraub, & Widmalm, 2006; Terlizzi, Gribaudo, & Maffei, 2017). ‡ : BHM, barrière hématoencéphalique.

### 1.3.2 Peptides antimicrobiens, flagelle et biofilms chez *Vibrio cholerae*

La capacité de *Vibrio cholerae* à coloniser et survivre dans deux environnements aussi différents et hostiles, que sont le milieu aquatique et le système gastrointestinal humain, est permise par la régulation de ses divers mécanismes permettant sa virulence. Mes travaux au laboratoire de la Docteure Duperthuy se sont principalement portés sur l'analyse des effets des peptides antimicrobiens sur la formation de biofilm et la mobilité de *Vibrio cholerae* O1 El tor et O139.

#### 1.3.2.1 Biofilms et mobilité chez *Vibrio cholerae*

La régulation de la mobilité et la formation de biofilm sont notamment effectuées *via* les systèmes de détection du quorum (voir **Figure 1.24A**) (Jemielita, Wingreen, & Bassler, 2018) .

Comme présenté précédemment à la section 1.1.2 Biofilm, la formation de biofilm est un mécanisme essentiel à la persistance et à la virulence pour de nombreuses bactéries, c'est également le cas de *Vibrio cholerae* (voir **Figure 1.24**). La persistance de *Vibrio cholerae* dans l'environnement aquatique et l'émergence de pic épidémique sont extrêmement liées à la formation de biofilm (Teschler et al., 2015). La formation de biofilm par *V. cholerae* est également très importante pour la colonisation de l'intestin humain. En effet, il a été démontré que l'adhérence de *V. cholerae* aux cellules de l'intestin induit la formation de biofilm (Sengupta, Mukherjee, & Chowdhury, 2016). De plus, il a été démontré que *Vibrio cholerae* pouvait être beaucoup infectieux sous forme de biofilm que sous forme planctonique (Tamayo, Patimalla, & Camilli, 2010). La formation de biofilm permet à *Vibrio cholerae* de résister aux stress oxydatif et osmotique (A. J. Silva & Benitez, 2016; H. Wang et al., 2018), à la bile de l'estomac (acidité) (Hung, Zhu, Sturtevant, & Mekalanos, 2006), aux antibiotiques (Tamayo et al., 2010) et aussi aux attaques par le système de sécrétion de type 6 d'autres bactéries (Toska, Ho, & Mekalanos, 2018). La matrice du biofilm de *Vibrio cholerae* est composée en majorité d'exopolysaccharides appelés *Vibriopolysaccharides* (VPS) (Teschler et al., 2015). Les gènes *vps* codent pour les protéines nécessaires à la synthèse et l'export des VPS par la voie dépendant de Wzy (rappel **Figure 1.7**) (Schwechheimer et al., 2020).

La formation d'un biofilm mature chez *Vibrio cholerae* peut être divisée en 4 étapes (Teschler et al., 2015). Lors de la première étape, la bactérie, propulsée par son flagelle, scanne mécaniquement une surface à l'aide de ses pili (notamment par le pili MSHA), produisant des adhésions réversibles. Une fois que ses pili atteignent une zone de haute affinité, l'adhésion est définitive, un signal est alors transduit *via* le moteur du flagelle qui initie la formation de biofilm et inhibe la mobilité (Utada et al., 2014). Les composants de la matrice sont sécrétés, notamment les VPS et des facteurs d'adhésion entre cellule-cellule ou surface-cellule, dont RbmA, Bap1 et RbmC (**Figure 1.24C**) (Mathieu-Denoncourt, Giacomucci, & Duperthuy, 2021). Les cellules se multiplient et les composants de la matrice s'accumulent commençant à former une structure tridimensionnelle. Le processus de formation de biofilm chez *Vibrio cholerae* est détaillé dans le chapitre de livre section 7.1.4 Biofilms and flagella.

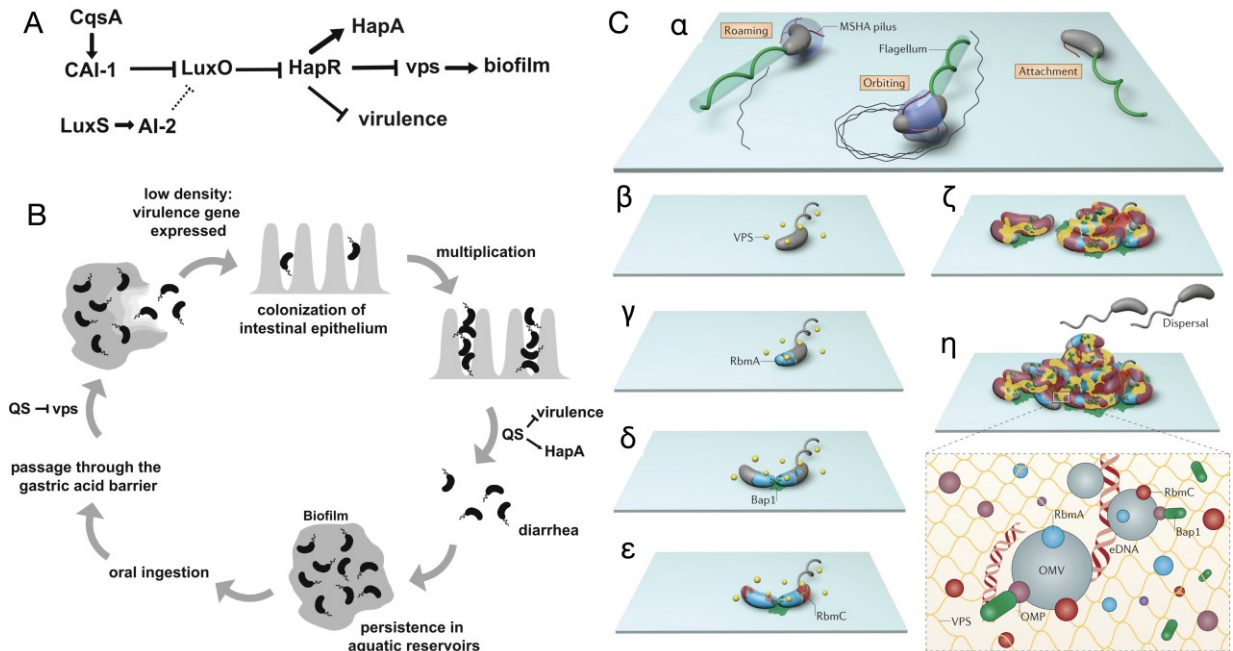


Figure 1.24. Cycle de vie de *Vibrio cholerae*

**A)** Voies de régulation de la virulence par les systèmes de sensation du quorum. Chez *Vibrio cholerae* la virulence et la formation de biofilm sont modulées par deux systèmes de détection du quorum, l'autoinducteur CAI-1 produits par CqsA et l'autoinducteur AI-2 produit par LuxS (Jemielita et al., 2018). En grande concentration d'autoactivateur (haute densité cellulaire), LuxO est inhibé ce qui relâche l'inhibition du gène codant pour régulateur HapR. HapR inhibe la formation de biofilm notamment en réprimant les gènes *vps* codants pour les polysaccharides de la matrice et inhibe la transcription des gènes de virulence (J. Zhu & Mekalanos, 2003). HapR induit la transcription de HapA qui facilite l'évasion du biofilm (Mewborn, Benitez, & Silva, 2017).

**C)** Schéma du cycle de vie de *Vibrio cholerae*. Dans son environnement naturel (aquatique) *V. cholerae* se retrouve sous forme planctonique et biofilm. La formation de biofilm chez *Vibrio cholerae* lui permet de persister dans l'environnement (Teschler et al., 2015). Ingéré sous forme de biofilm *V. cholerae* est beaucoup plus infectieux, car cela lui confère notamment une plus grande résistance à l'acidité de l'estomac (Hung et al., 2006). La forte concentration en bactérie au sein du biofilm induit la dispersion des cellules *via* les mécanismes de sensation du quorum (QS). La faible concentration en cellule induit l'activation des mécanismes de virulence permettant la colonisation de l'épithélium. L'augmentation de la concentration en bactéries induit *via* le QS une répression des gènes de virulences et une activation de la voie HapA, par HapR (non montré), qui induit le détachement des cellules de l'épithélium. À noter que *V. cholerae* peut également former des biofilms dans l'intestin (non montré) (Sengupta et al., 2016). Les cellules peuvent retourner dans l'environnement poursuivant le cycle d'infections. Figure provenant de (J. Zhu & Mekalanos, 2003), reproduction approuvée sans droit de modification selon Copyright © 2003 Cell Press. **C)** Schéma représentant les étapes de formation du biofilm chez *Vibrio cholerae* et de divers facteurs et structures qui y sont associées. α) L'étape initiale de la formation de biofilm est l'adhésion. Chez *Vibrio cholerae* l'adhésion requiert la mobilité médiée par le flagelle (*flagellum*) et un ou plusieurs facteurs d'adhésion, ici médiés par le pilus MSHA. La

cellule se déplace à la surface, le pilus MSHA entre en contact avec la surface et induit initialement une interaction faible et répétée insuffisante pour créer l'attachement (*roaming*). Le pilus finit par avoir une interaction suffisamment forte avec la surface pour induire l'attachement. Le flagelle étant encore en activité, la cellule fait des mouvements circulaires autour de son point de fixation (*orbiting*). Des signaux médiés par le moteur du flagelle induisent l'arrêt de la mobilité, et la sécrétion des premiers facteurs composant la matrice et nécessaire à sa formation, la cellule est définitivement attachée à la surface (*attachment*). β) La cellule produit et sécrète rapidement après son adhésion les *Vibriopolysaccharides* (VPS) qui s'accumulent tout au long de la formation du biofilm. γ) Par la suite, le facteur d'adhésion cellule-cellule RbmA est sécrété à la surface de la cellule, permettant à la future cellule fille de rester attachée à la cellule mère. δ) Vient ensuite la sécrétion de Bap1 qui vient recouvrir la surface entre les bactéries et la surface d'adhésion, facilitant le groupement futur des cellules. ε) La protéine RbmC est par la suite sécrétée à la surface de la bactérie. ζ) Les protéines Bap1, RbmC et le VPS enveloppent les bactéries en cours de division, permettant leur maintien à proximité ainsi une microcolonie. η) Les différents composants continuent à être produits et sécrétés de façon organisée et les bactéries de se diviser. D'autres composants sont sécrétés dans la matrice comme de l'ADN extracellulaire (*eDNA*) et des vésicules de membrane (OMV), formant ainsi un biofilm mature. La dispersion des cellules (*dispersal*) est médiée par divers facteurs notamment *via* la détection quorum voir panneau B (Bridges, Fei, & Bassler, 2020; Floyd et al., 2020; Kanampalliar & Singh, 2020; Teschler et al., 2015; Yasir, Willcox, & Dutta, 2018). Figure provenant de (Teschler et al., 2015), droit de reproduction accordé sans modification, Copyright © 2015, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.

Chez *V. cholerae* O1 El Tor et O139, le flagelle est impliqué dans virulence, mais n'est cependant pas essentiel. Guidé par le chimiotactisme, le flagelle permet d'accéder efficacement au site optimal de colonisation (Häse, 2001). Des essais de vaccination sur l'homme par des souches vivantes non mobiles de *V. cholerae* O1 El tor et O139 ont montré que les souches étaient toujours capables de coloniser l'intestin, mais provoquaient des symptômes atténués du choléra (Kenner et al., 1995; Killeen et al., 1995). Le défaut de colonisation de *V. cholerae* El Tor a également été confirmé sur modèle animal (Syed et al., 2009). La membrane enveloppant le flagelle est également impliquée dans l'adhésion notamment *via* ses LPS (Fuerst & Perry, 1988).

*V. cholerae* possède 5 différents gènes codants pour des flagellines, *flgA-E*, mais seule la flagelline FlgA est essentielle à la formation du filament du flagelle (Klose & Mekalanos, 1998). Les gènes nécessaires à la mobilité sont co-régulés avec certains gènes codants pour des facteurs d'adhésion comme *frhA* (**Figure 1.25A-B**) (Mewborn et al., 2017). En revanche la régulation de la mobilité est opposée à la formation de biofilm et aux facteurs de virulence, notamment en réduisant la production de VPS, de toxine cholérique, l'expression du TCP et l'expression du

système de sécrétion de type VI (Z. Liu et al., 2015; Syed et al., 2009; S. Zhu, Kojima, & Homma, 2013) (voir **Figure 1.25A**). L'importance des systèmes de sécrétions dans la virulence de *Vibrio cholerae* est détaillée à la section **7.1.2 Secretion systems**.

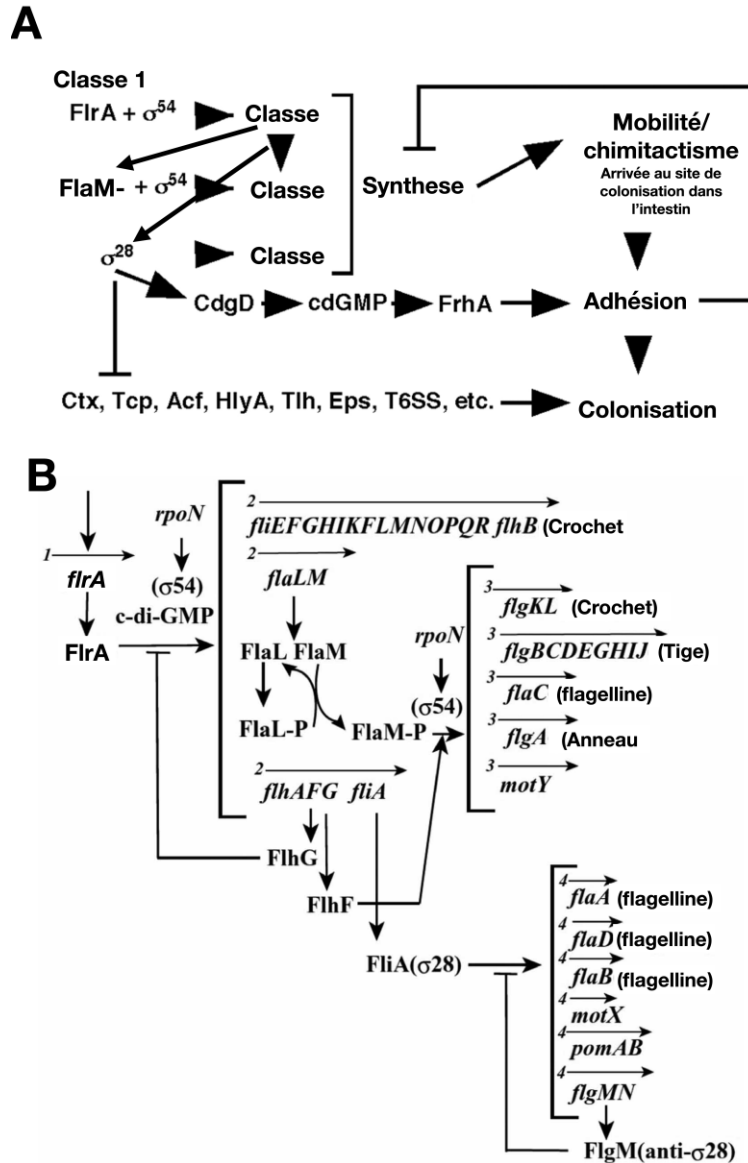


Figure 1.25. Régulation de la motilité chez *Vibrio cholerae*.

A) Régulation de la voie de synthèse du flagelle en relation avec l'expression des gènes de virulence. Les gènes entrant dans la voie de synthèse du flagelle sont divisés en 4 classes. Le gène de classe I active les gènes de classe II qui activent les gènes de classe III et de classe IV. Les gènes de classe IV induisent l'expression de diguanosyl-monophosphate (C-D-GMP) et répriment l'expression des gènes de virulences. Le flagelle aidé par le chimiotactisme permet à la cellule de

se déplacer à son site de colonisation. Une fois l'adhésion initiale effectuée, les gènes de mobilité sont réprimés, ce qui relâche la répression des facteurs de virulence et permet la colonisation. B) Régulation des gènes au sein de la voie de synthèse du flagelle. L'activateur du seul gène de classe I, *flrA* est inconnu. FlrA active les gènes de classe II associés au facteur  $\sigma^{54}$  (RpoN). FlhM une fois phosphorylé (P, activé) active avec FlhF et RpoN les gènes de classe III. Le facteur  $\sigma^{54}$  (FliA) active de son côté les gènes de classe IV. Il y a un rétrocontrôle de l'activation des gènes de classe II et IV respectivement par FlhG (classe II) et FlhM (classe IV). (Mewborn et al., 2017; Syed et al., 2009; S. Zhu et al., 2013) Figure A) Figure éditée de (Syed et al., 2009), Copyright © 2009, American Society for Microbiology (S. Zhu et al., 2013). Figure B) éditée de (S. Zhu et al., 2013), Copyright © 2013 Zhu, Kojima and Homma, Creative Commons Attribution License (CC BY 3.0).

### 1.3.2.2 Peptides antimicrobiens

Que ce soit dans son milieu naturel ou lors de la colonisation de l'intestin de l'être humain, *Vibrio cholerae* est soumis aux agressions d'une multitude de molécules toxiques, dont de nombreux peptides antimicrobiens (Destoumieux-Garzon, Duperthuy, Vanhove, Schmitt, & Wai, 2014).

La plupart des êtres vivants produisent des peptides antimicrobiens (PAM), de petites protéines de 12 à 80 acides aminés (mais généralement moins de 50) ayant une action antimicrobienne (Boparai & Sharma, 2020; Grassi, Maisetta, Esin, & Batoni, 2017). Au moins 800 PAM ont été découverts à ce jour (Izadpanah & Gallo, 2005) et la majorité ont une action antibactérienne (Huan, Kong, Mou, & Yi, 2020). Cette grande diversité de molécule représente une excellente source de solutions pour de nouveaux traitements antibiotiques (Mahlapuu et al., 2016). Les PAM présentent une grande diversité, tant par leur conformation leur charge, ou leurs cibles (Magana et al., 2020). Cependant, la plupart des PAM sont généralement cationiques et ciblent les membranes bactériennes (Mahlapuu et al., 2016).

L'être humain produit en permanence des PAM, principalement dans certains globules blancs ou sécrétés par les cellules épithéliales du mucus ou de la peau (Mahlapuu et al., 2016). Les principaux PAM produits au niveau du tractus digestif sont de la famille des cathelicidines comme le LL-37 et les  $\alpha$ - et  $\beta$ -défensines (Sivieri, Bassan, Peixoto, & Monti, 2017). La modulation de la production PAM participe à l'homéostasie de l'intestin en régulant le microbiote, mais permet également influencer le système immunitaire (Sivieri et al., 2017).

Certains PAM d'origines bactériennes sont utilisés comme antibiotiques, comme la polymyxine B (PmB) produite par la bactérie à Gram positif *Paenibacillus polymyxa* (Trimble et al., 2016), la colistine (polymyxine E, PmE) par le variant *colistinus* de *P. polymyxa* (Baron, Hadjadj, Rolain, & Olaitan, 2016). Ils peuvent également être utilisés comme des agents de conservation des aliments comme la nisine qui est produite par de multiples souches de bactéries à Gram positif du genre *Lactococcus* et *Streptococcus* (M. Rai, Pandit, Gaikwad, & Kovics, 2016; Shin et al., 2016). Les PAM produits par les bactéries du microbiote intestinal, communément appelées bactériocines, jouent un rôle dans la régulation des populations bactériennes, mais peuvent également avoir une influence sur les cellules de l'hôte (Cole & Nizet, 2016).

Le mécanisme d'action de la PmB sur les membranes bactériennes est similaire à celui de nombreux PAM produits par les mammifères (Vaara, 1992), c'est pourquoi elle est souvent utilisée comme molécule modèle et que nous l'avons utilisée dans nos expériences (Chapitre 2 – 1<sup>er</sup> Article et Chapitre 3 – 2<sup>e</sup> Article).

La PmB est un peptide antimicrobien cationique cyclique bactéricide perturbant l'enveloppe des bactéries à Gram négatif (**Figure 1.26**) (Trimble et al., 2016). Grâce à son affinité avec les molécules de LPS la PmB s'insère dans la membrane externe, l'interaction se fait principalement entre les charges positives de la PmB et les charges négatives au niveau du CDO-lipide A du LPS généralement présentes et recouvertes de contre-ions (rappel Figure 1.9) (Fu, Wan, Zhang, Gao, & Fang, 2020; Mares, Kumaran, Gobbo, & Zerbe, 2009). Le déplacement des contre-ions engendre un désalignement des molécules de LPS qui perméabilise la membrane externe (Fu et al., 2020). Cela permet également l'entrée de la PmB à l'intérieur de l'enveloppe, l'interaction de la PmB avec les phospholipides induisant alors une rigidification de la membrane interne et pouvant provoquer une adhésion de la membrane interne à la membrane externe (Fu et al., 2020; Trimble et al., 2016). L'ensemble de ces perturbations induisent la mort de la bactérie probablement *via* le ralentissement ou l'arrêt de multiples mécanismes essentiels se déroulant dans les membranes interne et externe (Fu et al., 2020).

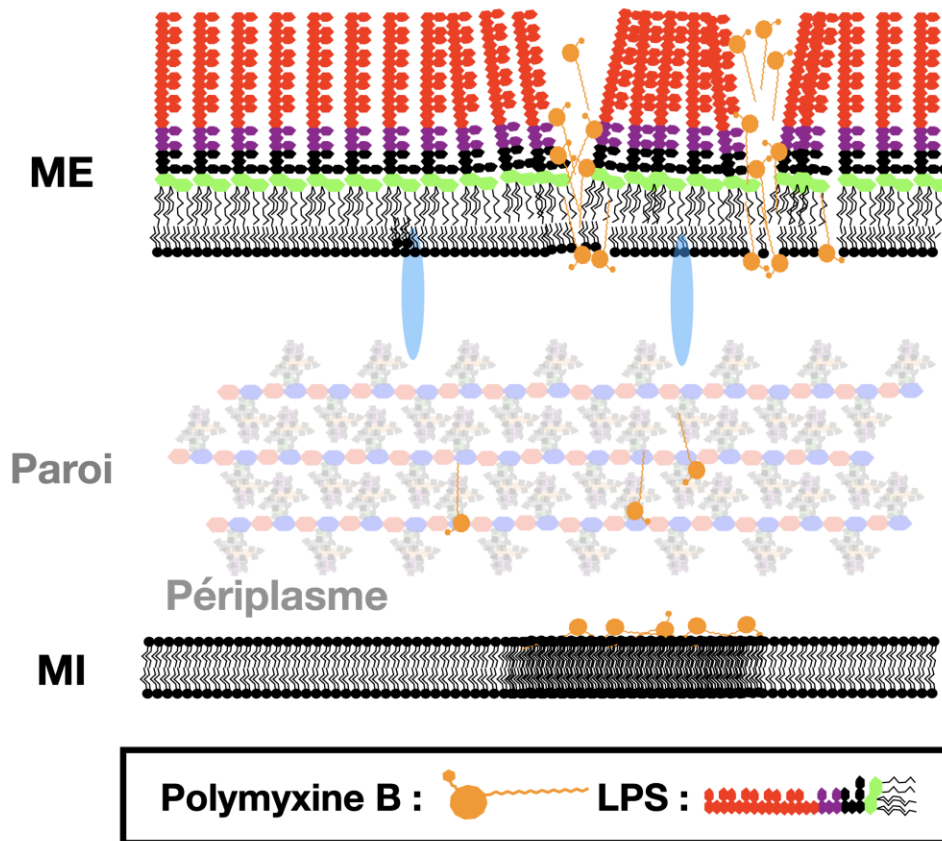


Figure 1.26. Mécanisme d'action de la polymyxine B

L'interaction de la PmB avec l'enveloppe des bactéries à Gram négatives induit une perméabilité de la membrane externe, une rigidité de la membrane externe et même une interaction entre les deux membranes (non montré). La mort de la bactérie serait due à l'interruption ou au ralentissement de nombreux mécanismes essentiels se déroulant dans les membranes interne et externe. (Fu et al., 2020; Mares et al., 2009; Trimble et al., 2016)

Comme mentionné précédemment (section 1.3.1 *Escherichia coli* et *Vibrio cholerae*) la plupart des souches *Vibrio cholerae* O1 El tor ont la faculté de résister à la polymyxine B en modifiant la charge de ses LPS (**Figure 7.9**) (Matson et al., 2010). Divers gènes sont impliqués dans la résistance à la polymyxine B, notamment *msbB*, *almEFG* et *carR* et *vprAB*. Le gène *msbB* code pour une enzyme dont la fonction est de transférer un groupement acyle sur le LPS. Cette acylation modifie la charge du LPS et réduit son affinité avec la polymyxine B (**Figure 7.9**) (Matson et al., 2010). Les gènes *vprA* et *vprB* codent pour le système à deux composants VprA-VprB qui régule l'expression des gènes *almEFG* impliqués dans l'ajout de groupement glycine sur le lipide A (Herrera et al.,



2014). Le gène *carR* est un régulateur positif des gènes *almEFG* et induit la formation de biofilm (Bilecen et al., 2015).

Outre les mécanismes de résistance spécifiques au PAM, il a été démontré sur de nombreuses bactéries que des concentrations sous-inhibitrices en PAM pouvait moduler l'expression de facteurs de virulence ou influencer les mécanismes de résistance ou de persistance (Duperthuy, 2020). Chez *V. cholerae* il a notamment été démontré que des concentrations sous-inhibitrices de PmB induisaient une résistance croisée avec le LL-37. En concentration sous-létale de PmB *V. cholerae* produit de grosses vésicules de membrane dans lesquelles s'accumulent OmpT (rappel section 1.1.4.3 Porines) et Bap1, un composant de la matrice du biofilm ayant de l'affinité pour LL-37. La résistance se faisait par la réduction du LL-37 libre dans le milieu (Duperthuy et al., 2013). Plus récemment, il a été démontré que le LL-37 en concentration sous-létale induisait l'augmentation de la sécrétion de PrtV, ainsi qu'une résistance à la LL-37 (Rompikuntal et al., 2015).

### 1.3.2.3 Résultats préliminaires aux 1<sup>er</sup> et 2<sup>e</sup> articles

Mes travaux ont démarré sur la base de résultats obtenus avant mon arrivée au laboratoire de la Docteure Duperthuy. Il s'agissait de résultats de quantification du protéome et du sécrétome de *Vibrio cholerae* O1 El tor A1552 en présence et en absence de PmB en concentration sous-inhibitrice (Mathieu-Denoncourt A and Duperthuy M, *submitted*). Nous avons observé une augmentation importante de flagellines dans le milieu extracellulaire, notamment FlaA, FlaB et FlaC.

Dans le premier article (**Chapitre 2 –1er Article**) nous avons étudié les effets de la PmB sur la mobilité et la formation de biofilm de *Vibrio cholerae* O1 El Tor et O139 afin de comprendre le mécanisme causant la perte de composant du flagelle. Dans ce 1<sup>er</sup> article nous avons entre autres effectué des tests de mobilité sur gélose molle en présence et en absence de concentration sous-inhibitrice de PmB. En plus de montrer une réduction de la mobilité en présence de PmB nous avons observé que la mobilité des deux souches était particulièrement hétérogène sur les boîtes pourvues de PmB (**Figure 3.1**). Nous avons soupçonné que cette hétérogénéité était le résultat de mutations spontanées, des mutants ayant la faculté de se déplacer plus rapidement en

présence de PmB que les souches sauvages. Dans le 2<sup>e</sup> article nous avons mis au point un protocole d'évolution expérimentale afin d'identifier les gènes responsables de cette plus grande mobilité en présence de PmB (**Chapitre 3 –2e Article**). L'objectif général de ces recherches est de mieux comprendre les mécanismes de virulences et de résistances impliqués dans l'enveloppe de *Vibrio cholerae*, afin de pouvoir, à long terme, mieux lutter contre ce pathogène.

### **1.3.3 Homéostasie de l'enveloppe chez *Escherichia coli***

Dans le but d'identifier de nouveaux gènes impliqués dans l'homéostasie de l'enveloppe, Catherine Paradis-Bleau *et al.* (Paradis-Bleau, Kritikos, Orlova, Typas, & Bernhardt, 2014), ont mis au point une méthode de criblage sur milieu solide permettant de distinguer facilement les bactéries ayant un défaut dans leur enveloppe.

#### **1.3.3.1 Criblage de souches présentant un défaut de l'enveloppe**

Le principe du test consiste à mettre dans le milieu une molécule ne pouvant pas traverser une enveloppe bactérienne saine et changeant de couleur une fois hydrolysée par la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal). La molécule utilisée ici est le rouge de  $\beta$ -D-galactopyranoside chlorophénol (ou *chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside* en anglais, CPRG). Le CPRG a une couleur jaune, la  $\beta$ -gal l'hydrolyse en rouge de chlorophénol (CPR) qui a une couleur rose/violette. Les bactéries sont déposées sur géloses complémentées en CPRG et en IPTG (afin d'induire la synthèse de la  $\beta$ -gal) et incubées selon la température choisie (voir **Figure 1.27**) (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). Étant donné qu'en fin de croissance il y a toujours une lyse cellulaire, le CPRG finit par être hydrolysé. Le phénotype d'une souche est toujours observé en fonction d'un témoin après un certain temps d'incubation et avant que le contrôle ne change de couleur. Ici le témoin choisi est la souche sauvage de *E. coli* MG1655, ainsi une souche obtenant une coloration rose avant la souche sauvage est dite de phénotype CPRG positif (CPRG<sup>+</sup>), si aucune différence n'est observée avec la souche sauvage le phénotype est dit CPRG négatif (CPRG<sup>-</sup>) (voir **Figure 1.27**). Il faut noter que le test CPRG sur milieu solide produit trop de bruit de fond et a été utilisé à température pièce (21-22°C, RT) et à 30°C (Paradis-Bleau *et al.*, 2014). Cette technique a été employée pour cribler une banque de 3985 mutants de simple délétion, la banque KEIO (Baba *et al.*, 2006), préalablement rendue *lacZ*<sup>+</sup> (Paradis-Bleau *et al.*, 2014).

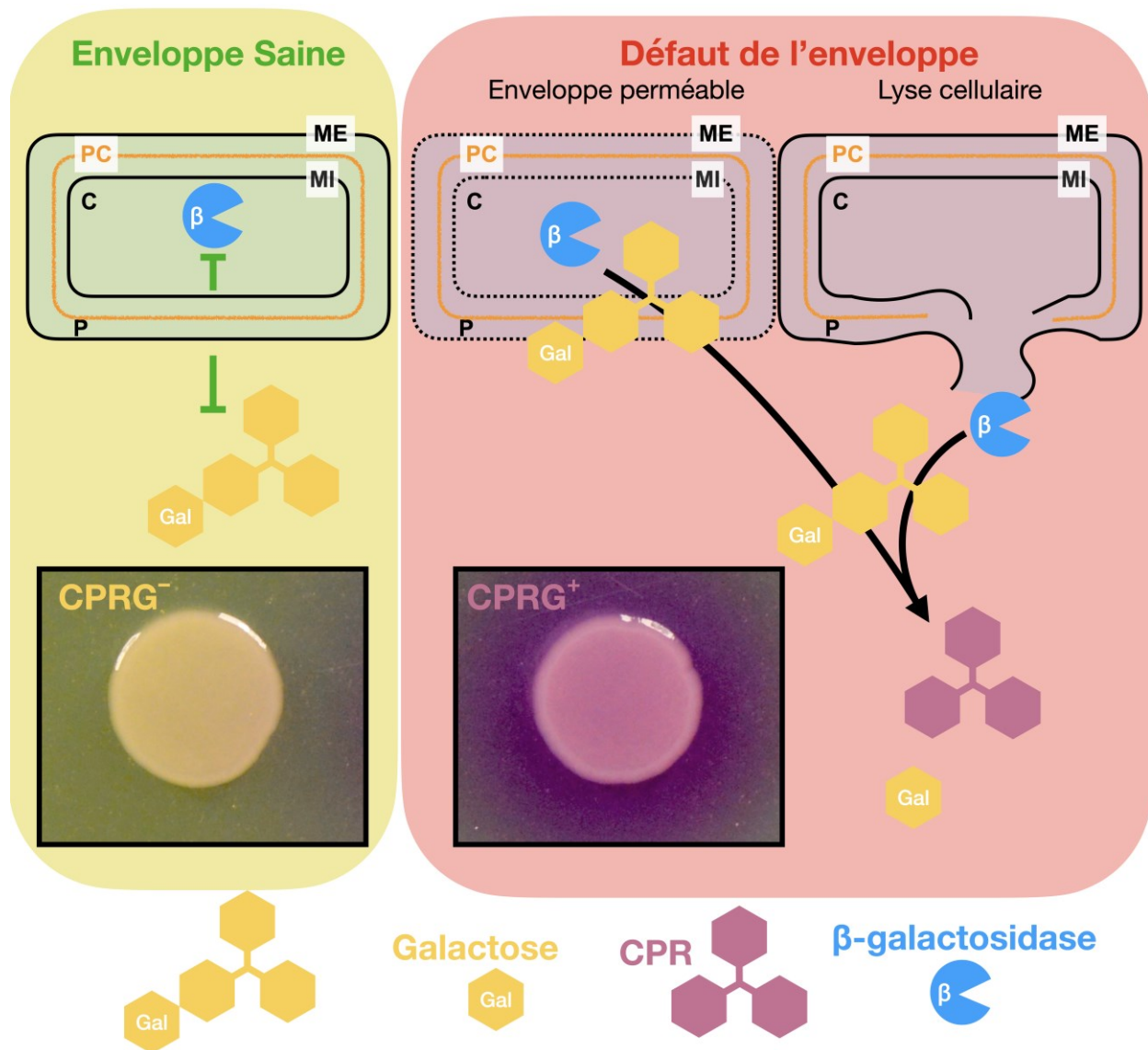


Figure 1.27. Principe du test CPRG

Le CPRG est un substrat de la  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal), il passe d'une couleur jaune à une couleur rose/violette lorsqu'hydrolysé par la  $\beta$ -gal. Le CPRG ne peut pas traverser une enveloppe saine (gauche), cependant, si une bactérie a un défaut dans son enveloppe qui la rend perméable ou que la bactérie lyse, permettant le CPRG d'entrer en contact avec la  $\beta$ -gal qui l'hydrolyse en CPR produisant une coloration du milieu et des bactéries. On peut observer à gauche un phénotype CPRG négatif (CPRG<sup>-</sup>) tel qu'observé chez la souche sauvage de *E. coli* MG1655. À droite on peut observer un phénotype CPRG positif (CPRG<sup>+</sup>) tel qu'on peut l'observer chez un mutant  $\Delta elyC$  de *E. coli* MG1655. Les photographies représentent le résultat d'un test CPRG après 16 heures de cultures à 21°C sur boîte LB contenant 50  $\mu$ M IPTG et 20  $\mu$ g/ml CPRG, 5  $\mu$ l de culture bactérienne suspendues dans du LB 1% NaCl. ME, membrane externe ; PC, paroi cellulaire ; MI, membrane interne ; C, cytoplasme et P, périplasma. (Paradis-Bleau et al., 2014)

### 1.3.3.2 Facteur ElyC chez *Escherichia coli*, synthèse de la paroi et stress oxydatif

Le criblage a permis d'identifier 102 gènes de fonction inconnue impliqués dans l'intégrité de l'enveloppe chez *E. coli* dont le gène *ybcC* qui avait un phénotype CPRG<sup>+</sup> particulièrement prononcé (Paradis-Bleau et al., 2014). Le gène *ybcC* a été renommé *elyC* pour « *elevated lysis factor C* ». Le gène *elyC* code pour une protéine intégrale de la membrane interne avec deux domaines transmembranaires et un domaine périplasmique DUF218 (Paradis-Bleau et al., 2014) (voir **Figure 1.28**).

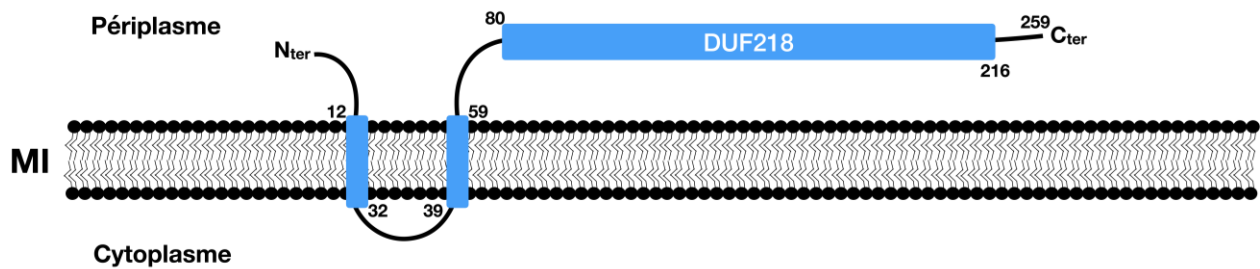


Figure 1.28. Topologie prédite du facteur ElyC

Représentation schématique du facteur ElyC. Les numéros indiquent les positions identifiées des acides aminés aux extrémités des deux domaines transmembranaires et du domaine DUF218. (Paradis-Bleau et al., 2014)

Le domaine DUF218 (DUF, *domain of unknown function*) est répandu dans presque tous les embranchements du monde vivant, on le retrouve chez de nombreuses bactéries, *Archae*, *Fungi* et même chez des êtres vivants pluricellulaires comme certaines plantes, certains chordés ou encore des crustacés (**Figure 1.28**) (Finn et al., 2008; S. Lu et al., 2020; Nina Mian, 2015). Chez *E. coli* il existe trois autres protéines contenant un domaine DUF218, SanA, YdcF et YgjQ, mais dont les fonctions ne sont pas encore déterminées. SanA est une protéine cytoplasmique impliquée dans la résistance à la vancomycine (Rida, Caillet, & Alix, 1996) et au dodécylsulfate de sodium (SDS) (Mitchell, Wang, & Silhavy, 2017). YdcF est une protéine dont la localisation est prédite dans la membrane interne ou le cytoplasme, elle semble avoir un rôle dans la respiration anaérobie (Chao et al., 2008). Le gène codant pour la protéine YgjQ a été observé surexprimé en présence d'hydrolysat de cellulose (Sandoval et al., 2012).

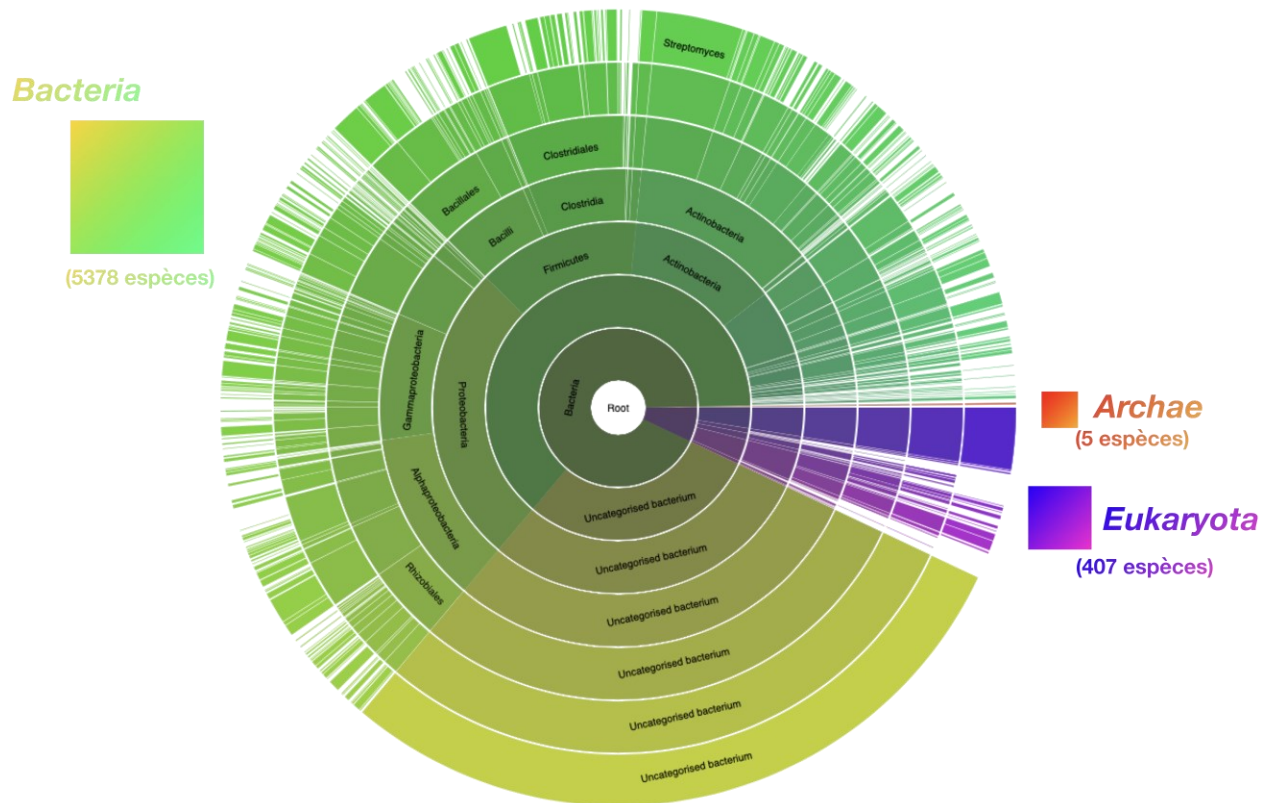


Figure 1.29. Le domaine DUF218 au sein du vivant

Représentation des espèces vivantes dans lesquelles il a été identifié une ou plusieurs protéines contenant un domaine DUF218. On recense (en mai 2021) 9895 séquences de protéine contenant un domaine DUF218 dans 5378 espèces bactériennes, 407 espèces eucaryotes et 5 espèces chez les *Archae*. Image provenant du site <https://pfam.xfam.org> le 15 mai 2021. (Finn et al., 2008; Nina Mian, 2015; Sonnhammer, Eddy, & Durbin, 1997)

### 1.3.3.3 Défauts du mutant $\Delta elyC$

L'étude du mutant  $\Delta elyC$  a montré peu ou pas de défaut à 37°C. Cependant elle a révélé un phénotype de lyse en milieu liquide en fin de phase exponentielle à température pièce (T°P, 21-22°C) sans retard de croissance préalable et une difficulté de croissance en milieu solide à T°P. La lyse se manifeste par une protrusion de l'enveloppe de façon similaire à ce que l'on peut observer lorsqu'on met *E. coli* en présence d'une concentration létale d'un  $\beta$ -lactame (Paradis-Bleau et al., 2014). L'analyse de la production de la paroi du mutant  $\Delta elyC$  a montré un arrêt de l'incorporation de nouvelles sous-unités de PG (rappel 1.1.5.1.2 Synthèse et homéostasie de la paroi) (Paradis-Bleau et al., 2014). La surexpression de différents gènes impliqués dans la synthèse de la paroi a

permis de supprimer le phénotype de lyse du mutant  $\Delta elyC$ . C'est le cas de *murA*, *uppS* et *mrcB* (rappel 1.1.5.1.2 Synthèse et homéostasie de la paroi), intervenant respectivement dans une des premières étapes de la formation des précurseurs, dans la néo-synthèse du transporteur universel de sucres (C55-P) et dans l'ajout de sous-unités à la paroi (Pbp1b) (Paradis-Bleau et al., 2014). La lyse du mutant  $\Delta elyC$  a également pu être supprimée par la délétion de gènes impliqués dans les premières étapes de la synthèse de l'ACE, comme *wecA* (ou *rfe*), *wecG*, *wecB* (rappel 1.1.4.2.1 Synthèse de l'antigène commun aux entérobactéries) (Paradis-Bleau et al., 2014). Les défauts du mutant ont été aggravés par la délétion de gènes impliqués dans les dernières étapes de la voie de synthèse de l'ACE, comme *rmlA* et *wecF* (Paradis-Bleau et al., 2014). L'ensemble de ces résultats indiquant que la lyse du mutant  $\Delta elyC$  est causée par un arrêt de la synthèse de la paroi, probablement provenant d'une mauvaise distribution du C55-P en faveur de la voie de synthèse de l'ACE (Paradis-Bleau et al., 2014).

Des résultats plus récents ont montré que le mutant subissait une accumulation de protéines dans le périplasme et que la lyse pouvait être supprimée par la surexpression de gènes codants pour deux protéines chaperonnes DbsG et Spy (Kouidmi, Alvarez, Collet, Cava, & Paradis-Bleau, 2018). Il a également été démontré que le mutant  $\Delta elyC$  possédait certains défauts à 37°C similaires, mais en moindre proportion qu'observé à 21°C, comme un défaut de synthèse de la paroi et une sensibilité aux  $\beta$ -lactames (Kouidmi, 2018). De plus l'analyse du transcriptome du mutant à 21°C a montré une forte expression de facteurs de stress de l'enveloppe (Kouidmi, 2018).

#### 1.3.3.4 Résultats préliminaires aux 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> articles

Lors de ses recherches sur ElyC, Docteure Paradis-Bleau s'est rendue compte que la cinétique de croissance du mutant cultivé en milieu liquide à 21°C variait en fonction des conditions du milieu. Afin de pouvoir observer la lyse du mutant il était nécessaire de le cultiver dans un large contenant avec une faible proportion du  $\frac{\text{Volume du milieu de culture}}{\text{Volume du contenant}}$  et une bonne agitation. Cultivé dans un tube de culture étroit avec une forte proportion de  $\frac{\text{Volume du milieu de culture}}{\text{Volume du contenant}}$ , il n'était possible d'observer qu'une cinétique de croissance ralentie ou un plateau précoce, mais pas de lyse. Docteure Paradis-Bleau a alors soupçonné l'implication de stress oxydatif dans le phénotype de

lyse du mutant  $\Delta elyC$ . Les recherches que j'ai effectuées se sont donc portées sur l'analyse de l'implication du stress oxydatif chez le mutant  $\Delta elyC$  et ont abouties à la préparation de l'article 3 (Chapitre 3 – 2<sup>e</sup> Article). Dans le 4<sup>e</sup> article je me suis intéressé à l'homéostasie du transporteur universel de sucres en lien avec les voies de synthèse du PG et de l'ACE avec la lyse du mutant  $\Delta elyC$  (Chapitre 5 – 4<sup>e</sup> Article). L'objectif principal de ces recherches est de déterminer la fonction du facteur ElyC dans l'homéostasie de l'enveloppe de *Escherichia coli*. Via l'étude de ces mécanismes nous pensons participer à l'identification de nouvelles vulnérabilités dans l'enveloppe des bactéries à Gram négatif et ainsi au développement de nouvelles stratégies permettant de lutter contre les infections bactériennes résistantes aux antibiotiques.





## Préface au Chapitre 2

- **Introduction**

Dans l'article « Flagella-dependent inhibition of biofilm formation by sub-inhibitory concentration of polymyxin B in *Vibrio cholerae* » publié le 20 août 2019 dans la revue PLoS ONE, nous nous sommes intéressés aux mécanismes par lequel la polymyxine B réduit la formation de biofilm et la mobilité chez *Vibrio cholerae* O1 El Tor et O139.

- **Liste des autrices et auteurs**

Sean Giacomucci, Candice Danabé-Nieto Cros, Xavier Perron, Annabelle Mathieu-Denoncourt and Marylise Duperthuy.

- **Contribution des auteurs**

Docteure Marylise Duperthuy a conceptualisé, supervisé la recherche, acquis et géré les fonds nécessaires à l'aboutissement du projet et a écrit l'article. En tant que premier auteur j'ai réalisé plus de la moitié des expériences de l'article, j'ai également participé à la méthodologie, à l'analyse des résultats, à la rédaction de l'article et à la conception des figures. Candice Danabé-Nieto Cros, Xavier Perron et Annabelle Mathieu-Denoncourt ont participé à une partie de la réalisation des résultats et de la méthodologie.



## Chapitre 2 – 1<sup>er</sup> Article

### **Flagella-dependent inhibition of biofilm formation by sub-inhibitory concentration of polymyxin B in *Vibrio cholerae***

Sean Giacomucci, Candice Danabé-Nieto Cros, Xavier Perron, Annabelle Mathieu-Denoncourt and Marylise Duperthuy\*.

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, Université de Montréal Succ. centre-ville, Montréal, Québec, Canada.

Current adress : INRS-Institut Armand-Frappier, Laval Québec, Canada.

\* : marylise.duperthuy@umontreal.ca

Keywords : *Vibrio cholerae*, biofilm, antimicrobial peptides, flagella, polymyxin B

DOI : <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221431>

### **2.1 Abstract**

Biofilm formation is a common strategy used by bacteria in order to survive and persist in the environment. In *Vibrio cholerae* (*V. cholerae*), a Gram-negative pathogen responsible for the cholera disease, biofilm-like aggregates are important for the pathogenesis and disease transmission. Biofilm formation is initiated by the attachment of the bacteria to a surface, followed by maturation stages involving the formation of a biofilm matrix. In *V. cholerae*, flagella are essential for the initial step of biofilm formation, allowing the bacteria to swim and to detect a surface. In this study, we explored the effect of polymyxin B (PmB), a cationic antimicrobial peptide, on biofilm formation in pathogenic *V. cholerae* strains belonging to the O1 and O139 serotypes. We found that sub-inhibitory concentration of PmB induces a reduction of the biofilm formation by *V. cholerae* O1 and O139. Experiment on preformed biofilm demonstrated that the biofilm formation inhibition occurs at the initial step of biofilm formation, where the flagella are

essential. We further characterize the effect of PmB on *V. cholerae* flagellation. Our results demonstrate that the flagellin expression is not reduced in presence of sub-inhibitory concentration of PmB. However, a decrease of the abundance of flagellin associated with the bacterial cells together with an increase in the secretome was observed. Electron microscopy observations also suggest that the abundance of aflagellated bacteria increases upon PmB supplementation. Finally, in agreement with the effect on the flagellation, a reduction of the bacterial motility is observed. Altogether, our results suggest that the PmB affect *V. cholerae* flagella resulting in a decrease of the motility and a compromised ability to form biofilm.

## 2.2 Introduction

*Vibrio cholerae* is the causative agent of the cholera disease. Infection usually occurs by consumption of food or water contaminated with *V. cholerae*. There are two serogroups that can cause the cholera disease, *i.e.* O1 and O139 (Clemens, Nair, Ahmed, Qadri, & Holmgren, 2017). Inside the O1 serogroup, 2 distinct biotypes have been described: the Classical biotype was responsible for 6 pandemics, which occurred before 1961, and the El Tor biotype, which is responsible for the ongoing 7<sup>th</sup> pandemic after displacing the Classical biotype. The serogroup O139 has been identified in the early 1990s during an epidemic in Asia and is genetically derived from an O1 El Tor biotype (Faruque et al., 2003). The main virulence factors of the O1 and O139 serogroups are the cholera toxin and the toxin co-regulated pilus, responsible for the massive fluid loss and dehydration characteristic of cholera (Clemens et al., 2017). The non-O1/non-O139 strains of *V. cholerae* are also responsible for diarrheal diseases, which are less severe than the O1 and O139 serotypes (Lee et al., 2007).

To survive in their environment, majority of the bacteria form biofilms. A biofilm is a microbial community embedded in a self-produced extracellular matrix. The bacteria in the biofilm are more resistant to the immune system, to antibiotic treatments and to osmotic, oxidative and acidic stresses (Davies, 2003; Fux, Costerton, Stewart, & Stoodley, 2005). It has been estimated that around 80% of the bacterial infections are related to biofilms with a resistance up to 1,000 times higher in biofilm compared to planktonic lifestyle (Davies, 2003). In *V. cholerae*, it has been established that biofilm forms in the human gut (Faruque et al., 2006) and that the biofilm

formation is induced by the adherence to the human intestinal cells (Sengupta, Mukherjee, & Chowdhury, 2016). In the environment, *V. cholerae* can form biofilm on biotic and abiotic surfaces, including the chitin of zooplankton (Lutz, Erken, Noorian, Sun, & McDougald, 2013). This biofilm lifestyle in the environment is important for the persistence and survival between epidemic seasons but also drastically increases the infectivity of *V. cholerae* (Tamayo, Patimalla, & Camilli, 2010). The biofilm matrix of *V. cholerae* is mainly composed of exopolysaccharides (VPS), whose synthesis is encoded by two *vps* operons (*VpsI* and *VpsII*). In addition, the matrix proteins RbmA, RbmC and Bap1 are key determinants of the 3 dimensional structure of the biofilm (Berk et al., 2012; Yan, Sharo, Stone, Wingreen, & Bassler, 2016). Bap1 is also involved in antimicrobial peptide cross-resistance in *V. cholerae* (Duperthuy et al., 2013). The biofilm formation is tightly regulated by a complex network involving a positive regulation by two major transcriptional regulators, *VpsR* and *VpsT* (Casper-Lindley & Yildiz, 2004; Yildiz, Dolganov, & Schoolnik, 2001) and a negative regulation by the quorum-sensing master regulator HapR. In addition, the stringent response (44), the C-D-GMP signaling pathway (Tischler & Camilli, 2004) and other regulators such as the calcium-controlled negative regulator CarR (Bilecen & Yildiz, 2009) are also involved in the regulation of biofilm formation in *V. cholerae*.

Biofilm formation can be divided in 5 main stages: the reversible attachment of planktonic cells, the irreversible attachment, the early development with the production of the matrix components, the maturation with the formation of the 3D structure and the dispersion, which result in planktonic bacterial release. In *V. cholerae* O1, the flagella and the mannose-sensitive hemagglutinin (MSHA) pili are essential during the first stages of biofilm development. The flagella are involved in the swimming motility necessary for the bacteria to reach a surface. Then, the bacteria use the flagella and the MSHA pili synergistically to irreversibly attach to the surface (Utada et al., 2014). Conversely, the MSHA pili is not required for *V. cholerae* O139 biofilm formation (Watnick, Lauriano, Klose, Croal, & Kolter, 2001). The flagella rotor is essential for both O1 and O139 strains in the transmission of the signal of the bacterial contact with a surface, which activates the expression of the *vpsI* and *vpsII* operons allowing the biofilm to enter the third stage of its development, *i.e.* the early development stage (Bilecen & Yildiz, 2009; Watnick et al., 2001).

The flagellum of *V. cholerae* is composed of 5 highly homologous flagellin subunits, FlaA, FlaB, FlaC, FlaD and FlaE, arranged in two *loci*, i.e., *flaAC* and *flaEDB* (Klose & Mekalanos, 1998). FlaA is the only flagellin essential for the filament synthesis and the motility in *V. cholerae*, the four others being dispensable (Echazarreta, Kepple, Yen, Chen, & Klose, 2018; Klose & Mekalanos, 1998). In addition, *V. cholerae* flagellum is coated by an outer membrane sheath (Fuerst & Perry, 1988). Flagellum driven motility is not only essential for biofilm formation and for intestine colonization of mice (Watnick & Kolter, 1999; Watnick et al., 2001). Several adhesion genes are co-regulated with the flagellum genes, whereas virulence genes are inversely regulated, including the cholera toxin and the toxin co-regulated pilus (Gardel & Mekalanos, 1996; Syed et al., 2009).

Antimicrobial peptides (AMPs) are oligopeptides of 12 to 50 amino-acids, mainly cationic and amphiphilic, with antimicrobial or immunomodulatory properties (Choi, Chow, & Mookherjee, 2012; Mukherjee & Hooper, 2015). Because of their multiple intracellular and membrane targets in the bacterial cells, the development of resistance is expected to be limited (Hancock & Sahl, 2006). Therefore, AMPs are considered as valuable candidates for food preservatives and alternatives therapeutic agents (Mahlapuu, Hakansson, Ringstad, & Bjorn, 2016). AMPs can have eukaryotic or prokaryotic origin (Bahar & Ren, 2013). In the case of a eukaryotic origin, they are commonly named as host defense peptides and represent essential molecular effectors of the innate immunity (Choi et al., 2012). The AMPs secreted by bacteria, also known as bacteriocins, are involved in inter-bacterial competition in order to protect their niche against foreign bacteria (Zheng, Gänzle, Lin, Ruan, & Sun, 2015). The lethal mechanism of cationic AMPs usually involves electrostatic interactions with the bacterial cell wall, integration in the membrane and pore formation, leading to the loss of the periplasmic and cytoplasmic components and, ultimately, to the death of the cell. More recently, a role of the AMPs as signaling molecules modulating the virulence of bacterial pathogens has been proposed (Gottschalk et al., 2015; Gryllos et al., 2008; Stempel et al., 2013; Velarde, Ashbaugh, & Wessels, 2014). In *V. cholerae*, our previous studies have clearly established that virulence and antimicrobial resistance proteins associated to membrane vesicles are up-regulated in response to the presence of sub-inhibitory concentrations of AMPs (Duperthuy et al., 2013; Rompikuntal et al., 2015). We demonstrated that the association of the biofilm matrix protein Bap1 to the membrane vesicles is increased in presence of sub-

inhibitory concentration of polymyxin B (PmB), a cationic bacterial AMP produced by *Bacillus polymyxa*, leading to the cross-resistance with the human cathelicidin LL-37 (Duperthuy et al., 2013). In contrary to O1 classical strains, O1 El Tor strains and O139 strains are known to be resistant to PmB (Chatterjee & Chaudhuri, 2003; Pajni et al., 1995) In this study, we have focused on the effect of sub-inhibitory concentration of PmB in the modulation of biofilm formation in *V. cholerae* O1 El Tor and O139. Using *V. cholerae* strains from both serogroups related to cholera disease, *i.e.* O1 and O139, we found that sub-inhibitory concentration of PmB can significantly impair *V. cholerae* biofilm formation during the initial adhesion step, by affecting the flagellar synthesis and shape.

## **2.3 Materials and methods**

### **2.3.1 Bacterial Strains and Culture Conditions**

A1552 (O1, El Tor, Inaba) and MO10 (O139) *V. cholerae* strains have been isolated from a traveler from Peru who contracted cholera in 1992 (Allue-Guardia, Echazarreta, Koenig, Klose, & Eppinger, 2018) and during a cholera outbreak in India in 1992 (O'Shea, Reen, Quirke, & Boyd, 2004; Waldor & Mekalanos, 1994), respectively. Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth at 37°C with shaking. Then, overday cultures were grown from 1:50 diluted overnight culture. Both overnight and overday cultures are grown in LB medium under shaking condition at 120 RPM. When overday cultures reach optical density (OD<sub>600nm</sub>) of 0.3, final cultures are started with or without 25 µg/mL PmB (Polymyxin B sulfate, Millipore, CAS#1405-20-5 lot:1305RP30930) by diluting to a theoretical OD<sub>600nm</sub> of 0.006 in 2 mL LB within 5 mL polystyrene tube (Falcon ref.: 352058) and incubated at 37°C under shaking condition (230 RPM). PmB working concentrations were defined as ¼ of minimal inhibitory concentration and were determined as sub-inhibitory concentration using the culture conditions described above.

### **2.3.2 Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC)**

The MIC was determined using the culture condition described in the Bacterial strain and culture condition section. For the motility assay, MIC was determined on LB agar plate. Serial dilutions of

PmB were tested ranging from 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 6.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Growth (OD) was monitored spectrophotometrically at 600 nm after 16 h at 37°C. MIC values are expressed as the lowest concentration that causes 100% growth inhibition ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### **2.3.3 Flagellar Motility Assay**

Overnight and overday cultures were performed as described above. Overday cultures in early-exponential phase were adjusted to  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.3$  then 3  $\mu\text{l}$  were spotted on motility plates and incubated at 37°C. Motility plates were made from 0.5 % NaCl LB and 0.3 % (w/v) agar, with 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to 0.39  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PmB or without (PmB solution was replaced by ddH<sub>2</sub>O). Diameters of motility were measured after 12h, 24h and 48h. Results were done in technical duplicates and at least in biological triplicates.

### **2.3.4 Transmitted Electron Microscopy**

Samples from exponential growth phase cultures were washed in phosphate buffer and fixed in 2.5% glutaraldehyde prepared in cacodylic acid 100 mM pH 7.4 buffer. Fifty microliters of fixed cells were placed on a 200 Mesh hexagonal slim bar grids covered with formvar and carbon. Samples were washed 3 times with 50 mM cacodylate acid saccharose 3% pH 7.4 buffer. Then samples were labeled with 1% phosphotungstic acid for 2 seconds and dried with blotting paper. Acquisitions were realized with transmitted electron microscope (TEM Hitachi H-7100 and AMT XR111 camera) at 75 kV and captured by digital camera (AMT XR-111, Advanced Microscopy Techniques).

### **2.3.5 Biofilm Assay**

Biofilm quantifications were performed after 24h growth in LB medium with or without 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of PmB. Final  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  was measured using the planktonic fraction before emptying and washing the tubes with ultrapure water. Biofilm quantification was performed using the crystal violet method (Goodman, 1957). Briefly, tubes were stained with 0.1% crystal violet (Alfa Aesar, #22866) and rinsed twice with ultrapure water. Finally, biofilms were dissolved in 33% acetic acid



after 1 hour drying. Optical densities were measured in technical duplicates within, at least, biological triplicates. For biofilm kinetics measurements, series of tubes were filled with a common mix of the proper equilibrated overday culture and PmB solution or sterile water and biofilm quantification as describe in the Bacterial strains and culture conditions section.

### **2.3.6 Flow Cytometry**

Samples were taken from final culture tube after 3 hours incubation at 37°C 230 RPM, which corresponded to an  $OD_{600nm} = 1$ , and diluted 500 times with LB medium. Viability was evaluated using propidium iodide staining and bacteria DNA were labeled with Syto9 (Invitrogen, ex./em. : 485nm / 598 nm). Cells were incubated in LB medium 30 min at 37°C with propidium iodide (PI) (15 µg/ml) and Syto9 (5 µM), then washed and resuspended in PBS. Propidium iodide control cells were treated with 1 mg/mL PmB during staining. Proportion of PI positive events were appreciated through Syto9 positive population ( $n \geq 10\ 000$  events) within SSC/FSC selected bacterial population. Analyses were performed with FACS Calibur flow cytometry (Becton Dickinson).

### **2.3.7 Dilution Spot Assay**

Samples were taken from 24 hours final cultures and serial dilutions were performed in PBS. Ten microliters of diluted cultures were spotted on LB agar plate and incubated overnight at 37°C. Experiments were done in technical triplicates within biological triplicates.

### **2.3.8 Western Blot Analysis**

Bacteria growth was performed for 24h in LB medium with or without 25 µg/mL PmB. Pellets and supernatant from 1 mL culture were separated by centrifugation at 5500 x g. One mL of supernatant or 1 mL of total culture (bacteria and supernatant compartment not divided) extracts were precipitated at 4°C with trichloroacetic acid (TCA) at 87.5 µg/mL, then centrifuged 20 min

at 20,000 x g and suspended in 50  $\mu$ L of phosphate saline buffer. The pellet from 1 mL culture was suspended in 100  $\mu$ L of phosphate saline buffer. Then, the proteins were subjected to polyacrylamide gel electrophoresis (10  $\mu$ L of pellet or 5 $\mu$ L of supernatant or total culture extract) using the method described by Laemmli (1970) before blotting onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Proteins were identified using anti-flagellin ( $\alpha$ Fla) and anti-cAMP receptor protein ( $\alpha$ CRP) polyclonal antisera (Karched et al., 2008; Nakao, Ramstedt, Wai, & Uhlin, 2012). Anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibody preparation (Invitrogen) was used as a secondary antiserum at a final dilution of 1:20,000. The ECL Prime chemiluminescence system (GE Healthcare) was used to detect chemiluminescence, which was recorded using an Amersham imager 600 (GE Healthcare). Quantification was performed using the signal intensity with ImageJ software and expressed as the percentage of the signal intensity relative to the control without PmB.

### 2.3.9 Proteomic Analysis

*V. cholerae* A1552 was grown with or without of 12  $\mu$ g/mL of PmB in LB supplemented with 2% NaCl. When the bacterial culture reached an OD<sub>600nm</sub> of 2, the cultures were centrifuged at 5500 x g. The supernatants (Secretome) were precipitated at 4°C with 87.5  $\mu$ g/mL of TCA. Bacterial cell pellets and precipitated supernatants were reconstituted in 50 mM ammonium bicarbonate with 10 mM TCEP [Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride; Thermo Fisher Scientific], and vortexed for 1 h at 37°C. Chloroacetamide (Sigma-Aldrich) was added for alkylation to a final concentration of 55 mM. Samples were vortexed for another hour at 37°C. One microgram of trypsin was added, and digestion was performed for 8 h at 37°C. Samples were dried down and solubilized in 5% ACN-0.2% formic acid (FA). The samples were loaded on a 1.5 $\mu$ l C18 precolumn from Optimize Technologies connected directly to the switching valve. They were separated on a home-made reversed-phase column (150- $\mu$ m i.d. by 150 mm) with a 56-min gradient from 10 to 30% ACN-0.2% FA and a 600-nl/min flow rate on a Ultimate 3000 (Eksigent, Dublin, CA) connected to an Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA). Each full MS spectrum acquired at a resolution of 70,000 was followed by 12 tandem-MS (MS-MS) spectra on the most abundant

multiply charged precursor ions. Tandem-MS experiments were performed using collision-induced dissociation (HCD) at a collision energy of 27%. The data were processed using PEAKS 8.5 (Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON) and a vibrio cholerae database (96965 entries). Mass tolerances on precursor and fragment ions were 10 ppm and 0.01 Da, respectively. Variable selected posttranslational modifications were carbamidomethyl (C), oxidation (M), deamidation (NQ) and acetyl (N-ter). The data were visualized with Scaffold 4.3.0 (protein threshold, 99%, with at least 2 peptides identified and a false-discovery rate [FDR] of 1% for peptides).

### 2.3.10 RT-qPCR Analysis

RNA was extracted in early log phase from A1552 and MO10 grown with or without 25 µg/mL PmB and A1552  $\Delta rpoN$  as negative control for flagellin expression (Qiagen RNeasy Protect Bacteria reagent and RNeasy Protect Bacteria kits and ThermoFisher TURBO DNA-free kit). RNAs were retrotranscribed to cDNA (Qiagen QuantiNova Reverse Transcription kit). Flagellin genes *flaA* (primers : *flaA*-F2 : 5'-CCGTTTGACCGTTGATGTA-3' and *flaA*-R2 : 5'-CTCGTGACCTGAAGTTTGAA-3') and *flaE* (primers : *flaE*-F3 5'-TCTGCGTCCGTGAATGAAA-3', *flaE*-R3 5'-CTAAACTGCCACTGAACGACAA-3') and *mshA* (primers : *mshA*-F3 5'- CCTGGAACAGTTATTGATGGC-3', *mshA*-R3 5'- ACTCACTCGAAGTATCTAGCG-3') expressions were evaluated in RT-qPCR with SYBR green (Qiagen QuantiNova SYBR Green PCR Kit and measured on Corbett RotorGene<sup>®</sup> 6000) and *recA* was used as house housekeeping gene using the primers from Wardman et al. (Wardman, 2007). RT-qPCR mix contains 10 µl 2x SYBR Green mix, 2 µl template, 2.8 µl of 5 µM forward and reverse primers and 5.2 µl H<sub>2</sub>O for a final volume of 20 µl. RT-qPCR reactions were performed as following : 1x 95°C for 10 min ; 40x 95°C 30 sec, 58°C 8 sec, 72°C 20 sec. Then melting curves were performed 72°C for 90 sec, and 72°C to 95°C at 1°C per step and 5 sec per step. Each sample was analyzed in technical triplicates and biological duplicates. No template controls were also added for each gene analyzed in each run. A1552, MO10 and A1552  $\Delta rpoN$   $\Delta Ct$  were calculated for *flaA* and *flaE*  $\Delta Ct$  were calculated as :  $\Delta\Delta Ct = [Ct_{flaA \text{ or } flaE} - Ct_{recA}]_{+PmB} - [Ct_{flaA \text{ or } flaE} - Ct_{recA}]_{-PmB}$ . Standard deviation was calculated on each  $\Delta\Delta Ct$  combinations between technical replicates.

### 2.3.11 Colony Forming Unit

A1552 and MO10 strains were grown with or without PmB, samples were taken from 2 hours final cultures and serial dilutions were performed in PBS. One hundred microliters of diluted cultures ( $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-8}$  and  $10^{-9}$ ) were plated on LB agar medium and incubated overnight at 37°C. Experiments were done in technical triplicate for each dilution and biological duplicate.

## 2.4 Results

### 2.4.1 Sub-inhibitory concentration of polymyxin B inhibits *V. cholerae* biofilm formation at the initial attachment stage

To determine the effect of sub-inhibitory concentration of PmB on biofilm formation by *V. cholerae*, we quantified the biofilm of two strains belonging to the O1 and O139 serogroups, *i.e.* A1552 and MO10, respectively. To do so, the bacteria were grown in presence of 25µg/mL of PmB ( $\frac{1}{4}$  of the MIC), a concentration that did not alter the growth rate or yield (**Figure 2.1A and B**). A dilution spot assay on mid-exponential and stationary phase cultures was performed and the results demonstrate that no difference in CFU can be observed in presence or in absence of PmB (**Figure 2.1C and Supporting Information Figure 2.10**). Then, a quantification of the biomass on a 24h biofilm by crystal violet has been performed in presence and in absence of sub-inhibitory concentration of PmB. As demonstrated in **Figure 2.2A**, the quantity of biofilm is significantly reduced in presence of PmB, with a decrease of around 60% for both strains. The turbidity in the medium surrounding the biofilm has also been measured to estimate the quantity of planktonic bacteria. The results show that the turbidity is not modified in presence of PmB (**Figure 2.2C**).

To identify at which stage of biofilm formation the inhibition occurs, we analyzed the effect of PmB addition on a preformed biofilm. At this stage, the initial bacterial adhesion stage is complete, and the maturation stage leading to the development of a mature biofilm is initiated. To do so, we first determined the kinetic of the biofilm formation for both *V. cholerae* strains. Our results show that after 1h, the biofilm has started to form and is quantifiable using the crystal violet method, meaning that the initial stage of biofilm formation is achieved (**Figure 2.2D and E**).

Then, we analyzed the effect of an addition of PmB at sub-inhibitory concentration (25 µg/mL) on the 1h-preformed biofilm. The results demonstrate that the biofilm formation is not affected when the PmB is added on a preformed biofilm (**Figure 2.2B**). Therefore, our results demonstrate that the presence of PmB at sub-inhibitory concentration results in a reduction of the biofilm formation at the initial stage, suggesting an impairment of the bacterial adhesion.

#### **2.4.2 Reduction of motility in presence of polymyxin B**

The flagella are essential for the initiation of biofilm formation in *V. cholerae* by providing the movement leading to the contact of the bacterial cell with the surface, by physically adhering to the surface and by signaling the bacterial adhesion, leading to the secretion of the biofilm matrix components. Therefore, since flagella are essential effectors of the initial adhesion steps of biofilm formation, we analyzed the effect of sub-inhibitory concentration of PmB on flagellation.

Because of the essential role of flagella in motility, a determination of the effect of sub-inhibitory concentration of PmB on *V. cholerae* A1552 and MO10 motility was performed. To do so, the *V. cholerae* strains A1552 and MO10 were grown to an early exponential phase in presence of PmB and 3 µL were spotted on soft agar containing 25 µg/mL (sub-inhibitory concentration) of PmB and incubated at 37°C. A control without PmB has been performed in parallel. The motility was determined after 12h, 24h and 48h. Our results demonstrate a statistically significant reduction of the bacterial motility at 12, 24 and 48h for both strains upon PmB supplementation, with a final diameter after 48h reduced from an average of 33% and 46% for *V. cholerae* O1 and O139, respectively (**Figure 2.3A and B**). Using the mutant of the positive regulator of flagellin expression RpoN ( $\Delta rpoN$ ) as non-motile control (Prouty, Correa, & Klose, 2001), we determined that the motility is not entirely abolished in presence of PmB. Calculation of the motility speed at different time points (**Figure 2.3C**) demonstrated that *V. cholerae* A1552 reaches its fastest motility between 12 and 24h with a tendency to reduce the speed between 24 and 48h. Conversely, MO10 strain motility is constantly accelerating all over the 48h of the experiment time course. The trend of the bacterial speed is not altered in presence of PmB, but the motility speed is reduced at all the different time points tested (12h, 24h, 48h), suggesting a constant effect of PmB on *V.*

*cholerae* motility (**Figure 2.3C**). In addition, a dose-dependent effect of the PmB motility has been observed with a reduction for concentration as low as 3.12 µg/mL at 24h (**Supporting Information Figure 2.7**). Similar results have been obtained using colistin, another antimicrobial peptide, on *V. cholerae* A1552 motility (**Supporting Information Figure 2.7**). Thus, growing *V. cholerae* O1 and O139 strains in presence of sub-inhibitory concentration of PmB results in a significant dose-dependent reduction of the motility.

### 2.4.3 Sub-inhibitory concentration of polymyxin B does not interfere with the flagellins expression

Since we observed a reduction of the motility of *V. cholerae* in presence of sub-inhibitory concentration of PmB, we examined whether this reduction was due to a global down regulation of flagella-related genes expression. Thus, real-time PCR analyses were performed in presence of sub-inhibitory concentration of PmB and compared with the control without PmB. The housekeeping gene *recA* was used as internal control. The main component of the flagella are the flagellin subunits and, in *V. cholerae*, they are organized in two distinct operons, *i.e.*, *flaAC* and *flaEDB*. Therefore, we determined the relative expression of *flaA* and *flaE*, the first genes of both operons as markers of the global flagellin expression. Our results demonstrated that the expression of *flaA* and *flaE* is not reduced in presence of sub-inhibitory of PmB for both strains (**Figure 2.4**Figure 2.4. Sub-inhibitory concentration of polymyxin B does not reduce the expression of the flagellin and the MSHA pili genes.). Conversely, an increase of *flaE* expression is observed in MO10 in presence of sub-inhibitory concentration of PmB (**Figure 2.4**). In addition, we also measured the expression of *mshA* as a marker of the expression of the MSHA pili, the other structural element involved in *V. cholerae* adhesion and biofilm formation. We observed no significant effect of the PmB supplementation on *mshA* expression (**Figure 2.4**). As expected, the  $\Delta rpoN$  control display a significant down regulation of *flaA* and *flaE*. To confirm the real-time PCR results, we quantified the flagellin protein in *V. cholerae* A1552 and MO10 total culture extracts by western-blot. Our results demonstrated that no difference in flagellin quantity can be observed in the total culture extract (**Figure 2.5A**). Altogether, these results suggest that sub-inhibitory

concentration of PmB does not reduce the expression of the flagellin genes or the quantity of flagellin produced.

#### **2.4.4 The quantity of flagellin associated with *V. cholerae* cells is reduced in presence of polymyxin B.**

To understand the motility reduction, we analyzed the flagellin localization in the total culture extract. To do so, we separated the bacterial cells from the secreted proteins by centrifugation and determined the relative abundance of the flagellin by western-blot in both compartments. Our western-blot results show a decrease of 86% and 83% of the signal corresponding to the flagellins upon PmB supplementation in *V. cholerae* A1552 and MO10 cells, respectively. Conversely, an increase of the flagellin in the supernatant upon PmB supplementation is observed in the western-blot analysis of secreted flagellin, especially in the *V. cholerae* O1 strain A1552 (**Figure 2.5-C**). The signal quantification demonstrated an increase of 156% and 45% of the signal for A1552 and MO10, respectively. Using a CRP antibody, we confirmed that the supernatant preparation is free of cytoplasmic proteins (**Supporting Information Figure 2.8**). A quantitative mass spectrometry analysis of the secretome (**Tableau 2.1**) confirmed that FlaA, FlaB, FlaC and FlaD but not FlaE were detected in the secretome of *V. cholerae* and their abundance increases between 1.4 and 2.1 in presence of PmB in comparison with the control without PmB (**Tableau 2.1**).

Finally, electronic microscopy observations of *V. cholerae* O1 and O139 strains in early exponential phase of growth were performed. Images indicate that a supplementation in PmB during bacterial growth is associated with a reduction of the number of flagellated bacterial cells, especially for A1552 with a reduction of 57% of the number of flagellated bacteria (**Figure 2.6A, and Supporting Information Tableau 2.3**). Regarding MO10, the number of flagellated cells is not drastically reduced (**Supporting Information Tableau 2.3**). However, the flagella observed in presence of PmB are significantly shorter than the control without PmB (**Figure 2.6A**). Finally, a bulb-like structure can be observed at the tip of some of the flagella attached to bacterial cells,

especially when they are grown with PmB, with an increase of around 2395% and 355% for A1552 and MO10 respectively. A magnification of this bulb structure is shown in **Figure 2.6B**.

Altogether, our results strongly suggest that a large portion of the flagellin subunits are localized in the secretome instead of attached to the bacterial cells upon PmB supplementation, which can be explained by a reduction of the number of flagellated cells or by an increase in the proportion of misshaped flagella.

#### **2.4.5 Addition of sub-inhibitory concentration of AMP does not induce major membrane damages**

Since we observed an increase of the flagellin quantity in the supernatant fraction of the *V. cholerae* O1 culture in presence of sub-inhibitory concentration of PmB, we wondered if the presence of PmB may have affected the cell wall integrity even though the bacterial growth was not affected. To do so, we performed flow cytometry analysis using propidium iodide, a marker of the cell wall integrity. Three independent experiments were performed on mid-exponential phase culture for both *V. cholerae* O1 and O139 strains grown in presence and in absence of sub-inhibitory concentration of PmB (25 µg/mL). For both strains, no significant increase of the propidium iodide positive bacteria was observed (**Tableau 2.2 and Supporting Information Figure 2.9**). The PI<sup>+</sup> population represents 3.4 % ± 2.0 % and 3.9% ± 0.7 % without PmB, and 4.0 % ± 2.2 % and 2.0 % ± 1.0 % with 25 µg/mL PmB for *V. cholerae* A1552 and MO10, respectively. A positive control consisting of a short treatment with lethal concentration of PmB has also been performed and demonstrated that, as expected, the PmB can form pores inducing major damages in *V. cholerae* cell wall, with 87.8% and 91.7% of propidium iodide positive cells for *V. cholerae* A1552 and MO10, respectively (**Tableau 2.2**). Therefore, our results clearly establish that growing *V. cholerae* in presence of sub-inhibitory concentration of PmB did not drastically alter the cell wall integrity.



## 2.5 Discussion

Flagellum is the apparatus responsible for the movement of the bacteria, and the direction is guided by the chemotaxis system. In several pathogens, including *V. cholerae*, flagella are important for the colonization and the virulence inside the host (Guentzel & Berry, 1975; Haiko & Westerlund-Wikstrom, 2013; Häse, 2001; Watnick et al., 2001). In the context of antibiotic resistance, a global effort is currently ongoing to discover alternatives to antibiotics including new antimicrobial drugs, phage therapy or virulence blockers (Rios et al., 2016). Several studies have focused on the antimicrobial peptides for their potential role as an alternative to antibiotics (Baltzer & Brown, 2011; da Costa, Cova, Ferreira, & Vitorino, 2015; Wang, Zeng, Yang, & Qiao, 2016). An effect of antimicrobials on bacterial motility has been reported for several Gram-negative bacteria. In *Campylobacter jejuni*, the carvacrol, a component of essential oil with antibacterial activity, at sub-inhibitory concentration inhibits bacterial motility and invasion of eukaryotic cells without affecting the flagella structure (van Alphen, Burt, Veenendaal, Bleumink-Pluym, & van Putten, 2012). In *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cenocepacia*, the motility reduction in presence of cationic antimicrobial peptides was associated with a down-regulation of the flagella synthesis (de la Fuente-Nunez et al., 2012; Loutet, Di Lorenzo, Clarke, Molinaro, & Valvano, 2011). Similarly, the antibiotic azythromycin reduces the flagellation of *Salmonella enterica* (Matsui et al., 2005). Here, we observe a diminution of the motility of *V. cholerae* in presence of sub-inhibitory concentration of PmB. Even though the motility of *V. cholerae* is not entirely inhibited in comparison with the aflagellated mutant  $\Delta rpoN$ , it remains impaired at concentration as low as 3.12  $\mu\text{g/mL}$ , which represents 1/16 of the minimal inhibitory concentration in the conditions tested here. In addition, we observed a similar dose-dependent effect with colistin, another AMP, which suggests that this effect is not limited to PmB.

*V. cholerae* has a single polar flagellum essentially composed of the flagellin subunits and coated by a membrane sheath (Fuerst & Perry, 1988; Klose & Mekalanos, 1998). Here, we observed a decrease in the quantity of flagellin associated with the bacterial cells. This decrease could be due to a reduction in the number of flagellated bacteria or a reduction of the flagella size. Our electronic microscopy analysis suggests that the proportion of aflagellated bacteria increases and that the flagella length decreases upon PmB supplementation. The reduction of the flagellin

associated with the bacterial cells is correlated with an increased abundance in the secretome, as demonstrated by immunoblot and mass-spectrometry analysis. Indeed, in the mass-spectrometry analysis, 4 out of 5 flagellin subunits, *i.e.* FlaA, FlaB, FlaC and FlaD, are more abundant in presence of PmB in comparison with the control without antimicrobial peptide. FlaA is the only flagellin subunit essential for the flagellum synthesis in *V. cholerae* (Echazarreta et al., 2018; Klose & Mekalanos, 1998). In addition, we observe no down-regulation of the flagellin of the MSHA pili expression and no modification of the global flagellin quantity in the whole culture extracts. However, the increase in flagellin in the secretome upon PmB supplementation is equivalent to the amount lost in the cell extract sample, according to the immunoblot quantification analysis. Therefore, the reduction of the number of flagellated cells is not due to a global down regulation of the flagella synthesis, but more probably to a flagellum miss assembly or miss-anchoring.

The sensitivity of the *Vibrio* to antimicrobial peptides varies according to the strain. Regarding the pathogenic *V. cholerae*, the strains belonging to the O1 serogroup are divided in two biotypes that display different sensitivity toward the PmB. Indeed, the *V. cholerae* O1 Classical strains are sensitive to PmB whereas the El Tor strains are resistant, a phenotype that has been historically used to differentiate between the biotypes (Gangarosa, Bennett, & Boring, 1967). The O139 serogroup is also resistant to PmB. In addition, it has been demonstrated that *V. cholerae* O1 El Tor and Classical use different pathways to control biofilm formation (Hammer & Bassler, 2009). In the condition of biofilm formation used here, we were unable to observe biofilm formation with the Classical biotype strains tested (569B and O395) after 72 hours. Therefore, we focused on the O1 El Tor A1552 and the O139 MO10 strains, which are both resistant to PmB and form strong biofilm after 24h in the conditions used in this study.

Resistance to antimicrobial peptides in *Vibrio* species involves different mechanisms, some of them most probably occurring simultaneously. Those mechanisms are membrane remodeling, AMP trapping by the bacterial membrane vesicles, induction of an envelope stress response, efflux systems and inhibition of antimicrobial peptide expression (Destoumieux-Garzon, Duperthuy, Vanhove, Schmitt, & Wai, 2014). Conformational modification of the outer membrane leading to the OmpU-dependent activation of the alternative sigma factor  $\sigma E$  has also been reported in presence of antimicrobial peptides (Mathur, Davis, & Waldor, 2007). The  $\sigma E$  regulon

of *V. cholerae* is involved in antimicrobial peptide resistance, intestinal survival and virulence (Kovacikova & Skorupski, 2002; Mathur et al., 2007). In addition, we have previously reported a modification of the outer membrane vesicles with the stronger association of the biofilm matrix protein Bap1 to the OmpT porin at the surface of the vesicles, which is responsible for the cross-resistance to the human cathelicidin LL-37. Altogether those studies clearly indicate that the membranes of *V. cholerae* undergo structural and protein abundance modifications under antimicrobial pressure. In this study we demonstrate that *V. cholerae* flagellin subunits, the main component of the flagella, are less associated with the bacterial cells. The flow cytometry analysis established that *V. cholerae* cell wall is not damaged in presence of sub-inhibitory concentration of PmB. However, it is possible that the PmB-dependent membrane remodeling might result in a miss-anchoring of the flagella to the bacterial cell wall, leading to the release of the flagella in the supernatant and decrease of bacterial motility.

The PmB is a cationic AMP that binds to the lipid A of the lipopolysaccharide of the Gram-negative bacteria (Morrison & Jacobs, 1976). At high concentration, it was demonstrated that PmB can induce a membrane depolarization leading to the formation of pores in the cytoplasmic membrane (Daugelavicius, Bakiene, & Bamford, 2000). As discussed above, no major membrane damages have been observed in this study upon PmB supplementation. However, at lower concentration of PmB, an accumulation of lipophilic anions in the cytoplasmic membrane coupled with a leakage of the potassium anion has been reported in *E. coli* (Daugelavicius et al., 2000). This leakage is responsible for the dissipation of the potassium gradient on the cytoplasmic membrane without formation of pores. Similarly to *E. coli*, a disturbance in the ion flux in the cytoplasmic membrane might also occur in presence of sub-inhibitory concentration of PmB in *V. cholerae*. This membrane potential disturbance could lead to a compromised ability to assemble the flagellum and to the free secretion of the flagellin instead of their assembly to form the flagellum. Therefore, the increase of flagellin abundance in the secretome in correlation with a decrease in association with *the V. cholerae* cells might also be due to a compromised ability to assemble the flagellum leading to the secretion of free flagellin subunits.

Besides the reduction of the number of flagellated cells, we also observed a large proportion of flagella with bulb-like structures upon PmB supplementation, but very rarely in the cultures without the antimicrobial peptide. Basal bulbs have already been observed in *V. metschnikovii* flagella, which consist of a single spherical fragment of the membrane (Vaituzis & Doetsch, 1969). In *V. fisheri*, bead-like structures have been observed at the distal end of the flagellum (Millikan & Ruby, 2004), but their structure seems to be very different from what we observed in this study. Bulb-like structures on the flagella are, however, characteristic to *Helicobacter pylori*, where it is a common structure under normal growth conditions (Geis, Suerbaum, Forsthoff, Laying, & Opferkuch, 1993). The flagella of *H. pylori* is important for motility and has a role in colonization of the mucosa (Gu, 2017). Similarly to *V. cholerae*, the flagella of *H. pylori* are coated with a sheath composed of LPS and proteins (Fuerst & Perry, 1988; Hranitzky, Mulholland, Larson, Eubanks, & Hart, 1980). A role for this sheath in the release of immunogenic LPS has been proposed in *V. fisheri* (Brennan et al., 2014). However, the role of the bulb-like structure, which seems to be a dilatation of the flagella sheath at the tip of the flagella of *H. pylori* (Geis et al., 1993), and the impact of this structure on the motility of the bacteria, remains unknown.

Biofilm formation is a common virulence trait of bacterial pathogens (Antunes & Ferreira, 2011). In *V. cholerae*, biofilm formation is initiated by the movement of the flagellum, which allows the bacteria to reach the support and initiate the first reversible attachment. Upon contact, *V. cholerae* O1 flagellum induces a counter-rotation leading to the contact of the mannose-sensitive hemagglutinin pili with the surface. At this stage, the attachment is irreversible leading to the initiation of the early development stage of biofilm formation (Utada et al., 2014). This initiation is mediated by the flagellum rotor, which induces the expression of the exopolysaccharide, the main component of the biofilm matrix (Lauriano, Ghosh, Correa, & Klose, 2004). In this study, we have clearly established that the inhibition of the biofilm formation by sub-lethal concentration of polymyxin B is occurring at the initial stage of the biofilm formation, as demonstrated by the experiment on preformed biofilm. We further investigated the effect of the PmB on the flagellum

and demonstrated that the number of aflagellated cells increases together with an augmentation of the flagellin in the secretome. These observations are correlated with a significant reduction of motility. In addition, no modification in the flagellin genes expression was observed. Therefore, our results strongly suggest that, in presence of sub-inhibitory concentration of PmB, the reduction in biofilm formation is most likely due to an increase in the proportion of aflagellated or misshaped flagella for *V. cholerae* A1552 cells, and shorter and/or misshaped flagella for MO10 strain. These phenotypes most probably explain the impaired ability to attach to a surface and to form biofilms for both strains.

In the context of antibiotic resistance, inhibiting biofilm formation has been proposed as a new way to cope with multidrug-resistant pathogenic bacteria (Doiron, Beaulieu, St-Louis, & Lemarchand, 2018; Moreno, Lombardi, & Di Luca, 2017; Narendrakumar, Das, Paramasivan, Rasu, & Thomas, 2018; Yasir, Willcox, & Dutta, 2018). An inhibition of the biofilm formation by synthetic cationic antimicrobial peptides has already been reported for the *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cenocepacia*, and *Listeria monocytogenes* (de la Fuente-Nunez et al., 2012). Similarly, a reduction in biofilm formation has been observed in *Pseudomonas aeruginosa* in presence of PmB but the mechanism of biofilm inhibition is still unknown. This reduction is accentuated by the combination of PmB with Gramicidin S, another AMP (Berditsch et al., 2015). Conversely, the PmB can exert a pro-biofilm effect as recently reported for *Acinetobacter baumannii* (Sato, Unno, Ubagai, & Ono, 2018). Regarding *V. cholerae*, a recent study demonstrated that the cranberry extract can inhibit the biofilm formation at the maturation stage by inhibiting the C-D-GMP pathway. In addition, a study from Rasmussen and collaborators identified a promising inhibitor of the sodium-driven flagellar motor of *V. cholerae* (Rasmussen et al., 2011), which is important for biofilm formation (Lauriano et al., 2004). Interestingly, this chemical inhibitor can also reduce the expression of cholera toxin and toxin-coregulated pilus, the main virulence factors of *V. cholerae*, and decrease biofilm formation and fluid secretion in a rabbit ileal loop model (Rasmussen et al., 2011). Here we demonstrated that sub-lethal concentration of PmB can inhibit the biofilm formation in *V. cholerae* at the initial adhesion stage. Our results also suggest that the maturation stage of the biofilm formation is not affected by a PmB

supplementation since no difference, or even a slight but not significant increase, in biofilm formation can be observed when PmB is added on preformed biofilm. Since the flagella is essential for the initiation of the biofilm formation, we hypothesize that the flagella loss is responsible for the drastic biofilm reduction observed at the initial stage of biofilm formation in presence of sub-lethal concentration of PmB. Therefore, as proposed for other antimicrobial peptides with strong anti-biofilm activity (Lin, Deslouches, Montelaro, & Di, 2018), PmB might represent a good candidate for the prevention of biofilm formation.

## 2.6 References

- Allue-Guardia, A., Echazarreta, M., Koenig, S. S. K., Klose, K. E., & Eppinger, M. (2018). Closed Genome Sequence of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba Strain A1552. *Genome Announc*, *6*(9). DOI:10.1128/genomeA.00098-18
- Antunes, L. C. M., & Ferreira, R. B. R. (2011). Biofilms and bacterial virulence. *Reviews in Medical Microbiology*, *22*(1), 12-16. DOI:10.1097/MRM.0b013e3283410d22
- Bahar, A. A., & Ren, D. (2013). Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals (Basel)*, *6*(12), 1543-1575. DOI:10.3390/ph6121543
- Baltzer, S. A., & Brown, M. H. (2011). Antimicrobial peptides: promising alternatives to conventional antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol*, *20*(4), 228-235. DOI:10.1159/000331009
- Berditsch, M., Jäger, T., Stempel, N., Schwartz, T., Overhage, J., & Ulrich, A. S. (2015). Synergistic effect of membrane-active peptides polymyxin B and gramicidin S on multidrug-resistant strains and biofilms of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, *59*(9), 5288-5296. DOI:10.1128/AAC.00682-15
- Berk, V., Fong, J. C., Dempsey, G. T., Develioglu, O. N., Zhuang, X., Liphardt, J., Yildiz, F. H., & Chu, S. (2012). Molecular architecture and assembly principles of *Vibrio cholerae* biofilms. *Science*, *337*(6091), 236-239. DOI:10.1126/science.1222981
- Bilecen, K., & Yildiz, F. H. (2009). Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ Microbiol*, *11*(8), 2015-2029. DOI:10.1111/j.1462-2920.2009.01923.x
- Brennan, C. A., Hunt, J. R., Kremer, N., Krasity, B. C., Apicella, M. A., McFall-Ngai, M. J., & Ruby, E. G. (2014). A model symbiosis reveals a role for sheathed-flagellum rotation in the release of immunogenic lipopolysaccharide. *Elife*, *3*, e01579. DOI:10.7554/eLife.01579
- Casper-Lindley, C., & Yildiz, F. H. (2004). VpsT is a transcriptional regulator required for expression of vps biosynthesis genes and the development of rugose colonial morphology in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J Bacteriol*, *186*(5), 1574-1578. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14973043>
- Chatterjee, S. N., & Chaudhuri, K. (2003). Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim Biophys Acta*, *1639*(2), 65-79. DOI:10.1016/j.bbadis.2003.08.004

- Choi, K. Y., Chow, L. N., & Mookherjee, N. (2012). Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. *J Innate Immun*, 4(4), 361-370. DOI:10.1159/000336630
- Clemens, J. D., Nair, G. B., Ahmed, T., Qadri, F., & Holmgren, J. (2017). Cholera. *Lancet*, 390(10101), 1539-1549. DOI:10.1016/S0140-6736(17)30559-7
- da Costa, J. P., Cova, M., Ferreira, R., & Vitorino, R. (2015). Antimicrobial peptides: an alternative for innovative medicines? *Appl Microbiol Biotechnol*, 99(5), 2023-2040. DOI:10.1007/s00253-015-6375-x
- Daugelavicius, R., Bakiene, E., & Bamford, D. H. (2000). Stages of polymyxin B interaction with the Escherichia coli cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(11), 2969-2978. DOI:10.1128/aac.44.11.2969-2978.2000
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*, 2(2), 114-122. DOI:10.1038/nrd1008
- de la Fuente-Nunez, C., Korolik, V., Bains, M., Nguyen, U., Breidenstein, E. B., Horsman, S., . . . Hancock, R. E. (2012). Inhibition of bacterial biofilm formation and swarming motility by a small synthetic cationic peptide. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(5), 2696-2704. DOI:10.1128/AAC.00064-12
- Destoumieux-Garzon, D., Duperthuy, M., Vanhove, A. S., Schmitt, P., & Wai, S. N. (2014). Resistance to Antimicrobial Peptides in Vibrios. *Antibiotics (Basel)*, 3(4), 540-563. DOI:10.3390/antibiotics3040540
- Doiron, K., Beaulieu, L., St-Louis, R., & Lemarchand, K. (2018). Reduction of bacterial biofilm formation using marine natural antimicrobial peptides. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 167, 524-530. DOI:10.1016/j.colsurfb.2018.04.051
- Duperthuy, M., Sjostrom, A. E., Sabharwal, D., Damghani, F., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2013). Role of the Vibrio cholerae matrix protein Bap1 in cross-resistance to antimicrobial peptides. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003620. DOI:10.1371/journal.ppat.1003620
- Echazarreta, M. A., Kepple, J. L., Yen, L. H., Chen, Y., & Klose, K. E. (2018). A Critical Region in the FlaA Flagellin Facilitates Filament Formation of the Vibrio cholerae Flagellum. *J Bacteriol*, 200(15). DOI:10.1128/JB.00029-18
- Faruque, S. M., Biswas, K., Udden, S. M., Ahmad, Q. S., Sack, D. A., Nair, G. B., & Mekalanos, J. J. (2006). Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(16), 6350-6355. DOI:10.1073/pnas.0601277103
- Faruque, S. M., Sack, D. A., Sack, R. B., Colwell, R. R., Takeda, Y., & Nair, G. B. (2003). Emergence and evolution of Vibrio cholerae O139. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3), 1304-1309. DOI:10.1073/pnas.0337468100
- Fuerst, J. A., & Perry, J. W. (1988). Demonstration of lipopolysaccharide on sheathed flagella of Vibrio cholerae O:1 by protein A-gold immunoelectron microscopy. *J Bacteriol*, 170(4), 1488-1494. DOI:10.1128/jb.170.4.1488-1494.1988
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol*, 13(1), 34-40. DOI:10.1016/j.tim.2004.11.010
- Gangarosa, E. J., Bennett, J. V., & Boring, J. R. (1967). Differentiation between vibrio cholerae and Vibrio cholerae biotype El Tor by the polymyxin B disc test: comparative results with TCBS,

- Monsur's, Mueller-Hinton and nutrient agar media. *Bull World Health Organ*, 36(6), 987-990. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4295003>
- Gardel, C. L., & Mekalanos, J. J. (1996). Alterations in *Vibrio cholerae* motility phenotypes correlate with changes in virulence factor expression. *Infect Immun*, 64(6), 2246-2255. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8675334>
- Geis, G., Suerbaum, S., Forsthoff, B., Leying, H., & Opferkuch, W. (1993). Ultrastructure and biochemical studies of the flagellar sheath of *Helicobacter pylori*. *J Med Microbiol*, 38(5), 371-377. DOI:10.1099/00222615-38-5-371
- Goodman, F. D. (1957). Combined acid-fast and gram-staining procedure for bacterial films. *Am J Clin Pathol*, 28(4), 427-428. DOI:10.1093/ajcp/28.4\_ts.427
- Gottschalk, S., Gottlieb, C. T., Vestergaard, M., Hansen, P. R., Gram, L., Ingmer, H., & Thomsen, L. E. (2015). Amphibian antimicrobial peptide fallaxin analogue FL9 affects virulence gene expression and DNA replication in *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol*, 64(12), 1504-1513. DOI:10.1099/jmm.0.000177
- Gryllos, I., Tran-Winkler, H. J., Cheng, M. F., Chung, H., Bolcome, R., Lu, W., . . . Wessels, M. R. (2008). Induction of group A *Streptococcus* virulence by a human antimicrobial peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(43), 16755-16760. DOI:10.1073/pnas.0803815105
- Gu, H. (2017). Role of Flagella in the Pathogenesis of *Helicobacter pylori*. *Curr Microbiol*, 74(7), 863-869. DOI:10.1007/s00284-017-1256-4
- Guentzel, M. N., & Berry, L. J. (1975). Motility as a virulence factor for *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 11(5), 890-897. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1091563>
- Haiko, J., & Westerlund-Wikstrom, B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)*, 2(4), 1242-1267. DOI:10.3390/biology2041242
- Hammer, B. K., & Bassler, B. L. (2009). Distinct sensory pathways in *Vibrio cholerae* El Tor and classical biotypes modulate cyclic dimeric GMP levels to control biofilm formation. *J Bacteriol*, 191(1), 169-177. DOI:10.1128/JB.01307-08
- Hancock, R. E., & Sahl, H. G. (2006). Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nat Biotechnol*, 24(12), 1551-1557. DOI:10.1038/nbt1267
- Häse, C. C. (2001). Analysis of the role of flagellar activity in virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*, 147(Pt 4), 831-837. DOI:10.1099/00221287-147-4-831
- Hranitzky, K. W., Mulholland, A., Larson, A. D., Eubanks, E. R., & Hart, L. T. (1980). Characterization of a flagellar sheath protein of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 27(2), 597-603. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7380541>
- Karched, M., Ihalin, R., Eneslätt, K., Zhong, D., Oscarsson, J., Wai, S. N., . . . Asikainen, S. E. (2008). Vesicle-independent extracellular release of a proinflammatory outer membrane lipoprotein in free-soluble form. *BMC Microbiol*, 8, 18. DOI:10.1186/1471-2180-8-18
- Klose, K. E., & Mekalanos, J. J. (1998). Differential regulation of multiple flagellins in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 180(2), 303-316. DOI:10.1128/JB.180.2.303-316.1998
- Kovacikova, G., & Skorupski, K. (2002). The alternative sigma factor sigma(E) plays an important role in intestinal survival and virulence in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 70(10), 5355-5362. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12228259>
- Lauriano, C. M., Ghosh, C., Correa, N. E., & Klose, K. E. (2004). The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 186(15), 4864-4874. DOI:10.1128/JB.186.15.4864-4874.2004



- Lee, Y. L., Hung, P. P., Tsai, C. A., Lin, Y. H., Liu, C. E., & Shi, Z. Y. (2007). Clinical characteristics of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolates and polymerase chain reaction analysis of their virulence factors. *J Microbiol Immunol Infect*, *40*(6), 474-480. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18087626>
- Lin, Q., Deslouches, B., Montelaro, R. C., & Di, Y. P. (2018). Prevention of ESKAPE pathogen biofilm formation by antimicrobial peptides WLBU2 and LL37. *Int J Antimicrob Agents*, *52*(5), 667-672. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2018.04.019
- Loutet, S. A., Di Lorenzo, F., Clarke, C., Molinaro, A., & Valvano, M. A. (2011). Transcriptional responses of *Burkholderia cenocepacia* to polymyxin B in isogenic strains with diverse polymyxin B resistance phenotypes. *BMC Genomics*, *12*, 472. DOI:10.1186/1471-2164-12-472
- Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S., & McDougald, D. (2013). Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol*, *4*, 375. DOI:10.3389/fmicb.2013.00375
- Mahlapuu, M., Hakansson, J., Ringstad, L., & Bjorn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol*, *6*, 194. DOI:10.3389/fcimb.2016.00194
- Mathur, J., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2007). Antimicrobial peptides activate the *Vibrio cholerae* sigmaE regulon through an OmpU-dependent signalling pathway. *Mol Microbiol*, *63*(3), 848-858. DOI:10.1111/j.1365-2958.2006.05544.x
- Matsui, H., Eguchi, M., Ohsumi, K., Nakamura, A., Isshiki, Y., Sekiya, K., . . . Omura, S. (2005). Azithromycin inhibits the formation of flagellar filaments without suppressing flagellin synthesis in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Antimicrob Agents Chemother*, *49*(8), 3396-3403. DOI:10.1128/AAC.49.8.3396-3403.2005
- Millikan, D. S., & Ruby, E. G. (2004). *Vibrio fischeri* flagellin A is essential for normal motility and for symbiotic competence during initial squid light organ colonization. *J Bacteriol*, *186*(13), 4315-4325. DOI:10.1128/JB.186.13.4315-4325.2004
- Moreno, M. G., Lombardi, L., & Di Luca, M. (2017). Antimicrobial peptides for the control of biofilm formation. *Curr Top Med Chem*. DOI:10.2174/15680266176661701051
- Morrison, D. C., & Jacobs, D. M. (1976). Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry*, *13*(10), 813-818. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/187544>
- Mukherjee, S., & Hooper, L. V. (2015). Antimicrobial defense of the intestine. *Immunity*, *42*(1), 28-39. DOI:10.1016/j.immuni.2014.12.028
- Nakao, R., Ramstedt, M., Wai, S. N., & Uhlin, B. E. (2012). Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. *PLoS One*, *7*(12), e51241. DOI:10.1371/journal.pone.0051241
- Narendrakumar, L., Das, B., Paramasivan, B., Rasu, J., & Thomas, S. (2018). Quorum Quenching and Biofilm Inhibition: Alternative Imminent Strategies to Control the Disease Cholera. In V. C. Kalia (Ed.), *Biotechnological Applications of Quorum Sensing Inhibitors* (pp. 63-85). Singapore: Springer Singapore. ISBN: 978-981-10-9026-4. [http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-9026-4\\_4](http://dx.doi.org/10.1007/978-981-10-9026-4_4).
- O'Shea, Y. A., Reen, F. J., Quirke, A. M., & Boyd, E. F. (2004). Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide

- sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. *J Clin Microbiol*, 42(10), 4657-4671. DOI:10.1128/JCM.42.10.4657-4671.2004
- Pajni, S., Sharma, C., Bhasin, N., Ghosh, A., Ramamurthy, T., Nair, G. B., . . . Roychowdhury, S. (1995). Studies on the genesis of *Vibrio cholerae* O139: identification of probable progenitor strains. *J Med Microbiol*, 42(1), 20-25. DOI:10.1099/00222615-42-1-20
- Prouty, M. G., Correa, N. E., & Klose, K. E. (2001). The novel sigma54- and sigma28-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, 39(6), 1595-1609. DOI:10.1046/j.1365-2958.2001.02348.x
- Rasmussen, L., White, E. L., Pathak, A., Ayala, J. C., Wang, H., Wu, J. H., . . . Silva, A. J. (2011). A high-throughput screening assay for inhibitors of bacterial motility identifies a novel inhibitor of the Na<sup>+</sup>-driven flagellar motor and virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(9), 4134-4143. DOI:10.1128/AAC.00482-11
- Rios, A. C., Moutinho, C. G., Pinto, F. C., Del Fiol, F. S., Jozala, A., Chaud, M. V., . . . Balcão, V. M. (2016). Alternatives to overcoming bacterial resistances: State-of-the-art. *Microbiol Res*, 191, 51-80. DOI:10.1016/j.micres.2016.04.008
- Rompikuntal, P. K., Vdovikova, S., Duperthuy, M., Johnson, T. L., Ahlund, M., Lundmark, R., . . . Wai, S. N. (2015). Outer Membrane Vesicle-Mediated Export of Processed PrtV Protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS One*, 10(7), e0134098. DOI:10.1371/journal.pone.0134098
- Sato, Y., Unno, Y., Ubagai, T., & Ono, Y. (2018). Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *PLoS One*, 13(3), e0194556. DOI:10.1371/journal.pone.0194556
- Sengupta, C., Mukherjee, O., & Chowdhury, R. (2016). Adherence to Intestinal Cells Promotes Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis*, 214(10), 1571-1578. DOI:10.1093/infdis/jiw435
- Stempel, N., Neidig, A., Nusser, M., Geffers, R., Vieillard, J., Lesouhaitier, O., . . . Overhage, J. (2013). Human host defense peptide LL-37 stimulates virulence factor production and adaptive resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*, 8(12), e82240. DOI:10.1371/journal.pone.0082240
- Syed, K. A., Beyhan, S., Correa, N., Queen, J., Liu, J., Peng, F., . . . Klose, K. E. (2009). The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. *J Bacteriol*, 191(21), 6555-6570. DOI:10.1128/JB.00949-09
- Tamayo, R., Patimalla, B., & Camilli, A. (2010). Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 78(8), 3560-3569. DOI:10.1128/IAI.00048-10
- Tischler, A. D., & Camilli, A. (2004). Cyclic diguanylate (c-di-GMP) regulates *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol*, 53(3), 857-869. DOI:10.1111/j.1365-2958.2004.04155.x
- Utada, A. S., Bennett, R. R., Fong, J. C. N., Gibiansky, M. L., Yildiz, F. H., Golestanian, R., & Wong, G. C. L. (2014). *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment. *Nat Commun*, 5, 4913. DOI:10.1038/ncomms5913
- Vaituzis, Z., & Doetsch, R. N. (1969). Relationship between cell wall, cytoplasmic membrane, and bacterial motility. *J Bacteriol*, 100(1), 512-521. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5344110>

- van Alphen, L. B., Burt, S. A., Veenendaal, A. K., Bleumink-Pluym, N. M., & van Putten, J. P. (2012). The natural antimicrobial carvacrol inhibits *Campylobacter jejuni* motility and infection of epithelial cells. *PLoS One*, *7*(9), e45343. DOI:10.1371/journal.pone.0045343
- Velarde, J. J., Ashbaugh, M., & Wessels, M. R. (2014). The human antimicrobial peptide LL-37 binds directly to CsrS, a sensor histidine kinase of group A *Streptococcus*, to activate expression of virulence factors. *J Biol Chem*, *289*(52), 36315-36324. DOI:10.1074/jbc.M114.605394
- Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (1994). ToxR regulates virulence gene expression in non-O1 strains of *Vibrio cholerae* that cause epidemic cholera. *Infect Immun*, *62*(1), 72-78. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7903285>
- Wang, S., Zeng, X., Yang, Q., & Qiao, S. (2016). Antimicrobial Peptides as Potential Alternatives to Antibiotics in Food Animal Industry. *Int J Mol Sci*, *17*(5). DOI:10.3390/ijms17050603
- Wardman, P. (2007). Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med*, *43*(7), 995-1022. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2007.06.026
- Watnick, P. I., & Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Mol Microbiol*, *34*(3), 586-595. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10564499>
- Watnick, P. I., Lauriano, C. M., Klose, K. E., Croal, L., & Kolter, R. (2001). The absence of a flagellum leads to altered colony morphology, biofilm development and virulence in *Vibrio cholerae* O139. *Mol Microbiol*, *39*(2), 223-235. DOI:10.1046/j.1365-2958.2001.02195.x
- Yan, J., Sharo, A. G., Stone, H. A., Wingreen, N. S., & Bassler, B. L. (2016). *Vibrio cholerae* biofilm growth program and architecture revealed by single-cell live imaging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *113*(36), E5337-5343. DOI:10.1073/pnas.1611494113
- Yasir, M., Willcox, M. D. P., & Dutta, D. (2018). Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Materials (Basel)*, *11*(12). DOI:10.3390/ma11122468
- Yildiz, F. H., Dolganov, N. A., & Schoolnik, G. K. (2001). VpsR, a Member of the Response Regulators of the Two-Component Regulatory Systems, Is Required for Expression of vps Biosynthesis Genes and EPS(ETr)-Associated Phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *J Bacteriol*, *183*(5), 1716-1726. DOI:10.1128/JB.183.5.1716-1726.2001
- Zheng, J., Gänzle, M. G., Lin, X. B., Ruan, L., & Sun, M. (2015). Diversity and dynamics of bacteriocins from human microbiome. *Environ Microbiol*, *17*(6), 2133-2143. DOI:10.1111/1462-2920.12662

## 2.7 Acknowledgments

We would like to thank Dr. Sun Nyunt Wai for generously providing all the *V. cholerae* strains and the anti-flagellin and anti-CRP antibodies. Proteomic analyses were performed by the Center for Advanced Proteomics Analyses, a Node of the Canadian Genomic Innovation Network that is

supported by the Canadian Government through Genome Canada. Electron microscopy acquisitions were performed by Arnaldo Nakamura from the Plateforme de Microscopie Électronique de l'Institut Armand-Frappier, INRS.

## 2.8 Figures

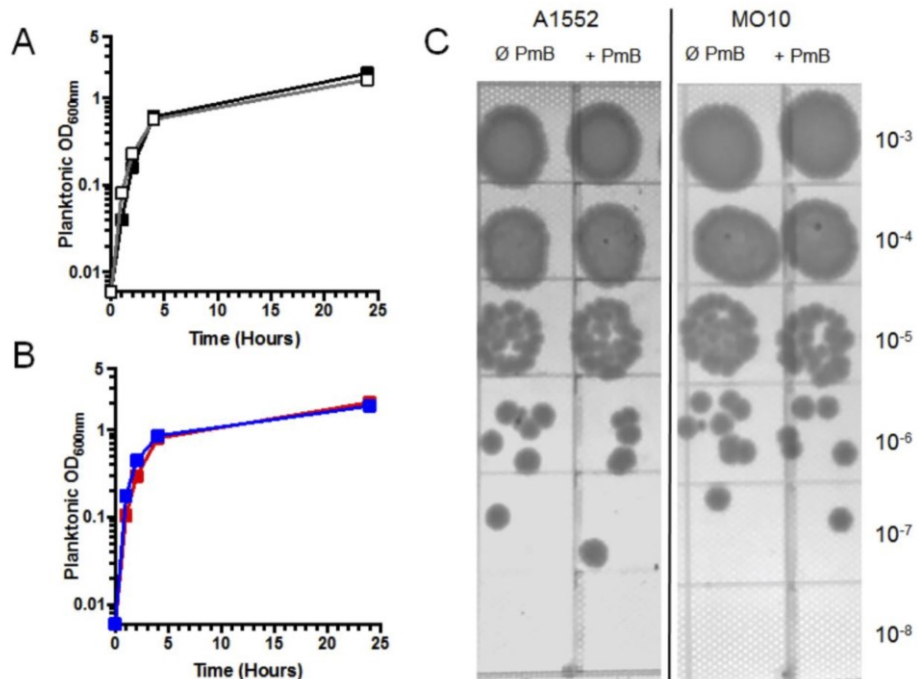


Figure 2.1. A1552 and MO10 growth are not impaired by 25 µg/mL of polymyxin B

(A) A1552 and MO10 growth curves, means of technical duplicates within biological triplicates. A1552 grown without PmB (white) and with 25 µg/mL PmB (black); (B) MO10 grown without PmB (blue) and with 25 µg/mL PmB (red). (C) A1552 and MO10 dilution spot assay with or without 25 µg/mL PmB. Representative picture of experiments done in technical triplicates within biological triplicates.

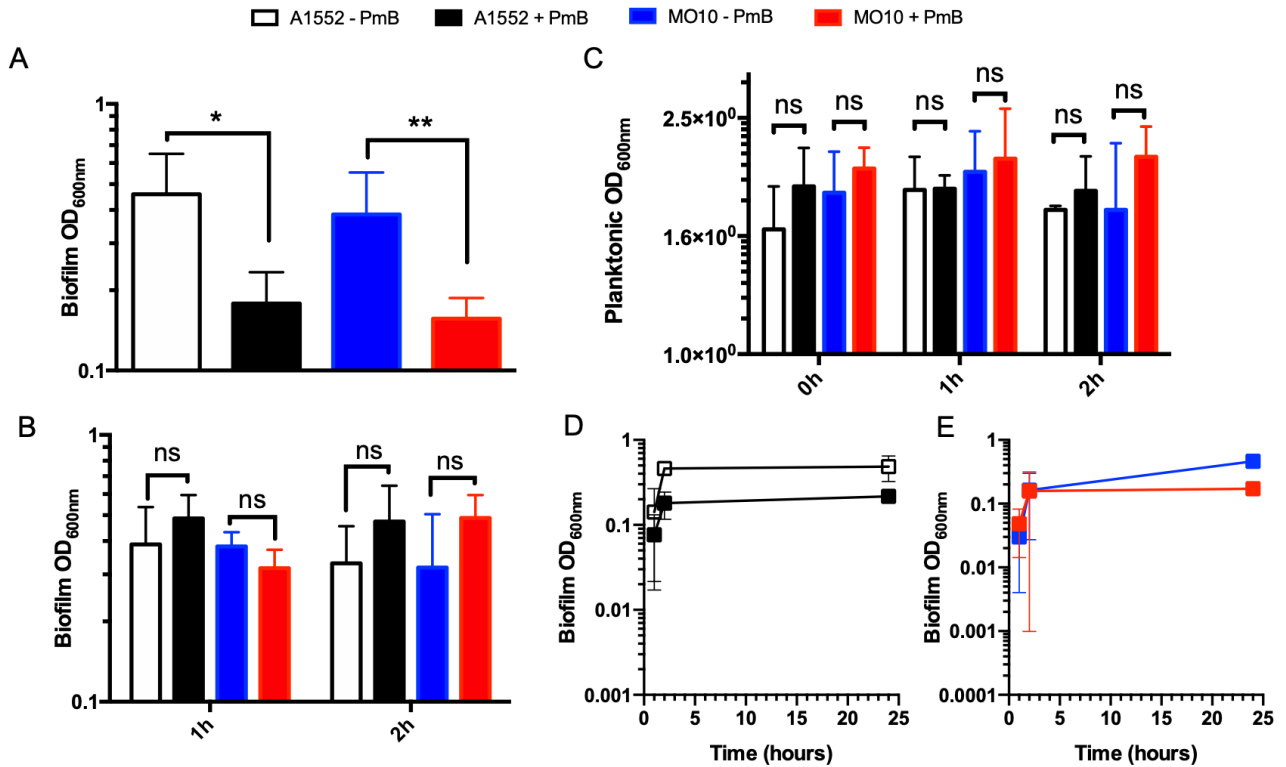


Figure 2.2. Sub-inhibitory polymyxin B concentration inhibits *V. cholerae* A1552 and O139 biofilm formation at the early adhesion stage.

(A) and (B) Biofilm quantification and (C) planktonic optical density of A1552 and MO10 strain cultures after 24h incubation. (A) Polymyxin B (PmB) or water (control) were added from the beginning, and (B) at one hour (1h) or two hours (2h) after culture starts. A1552 without (-) PmB (white) and A1552 with (+) 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PmB (black) ; MO10 without (-) PmB (blue) and MO10 with (+) 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PmB (red). Biofilm formation kinetics of A1552 (C) and MO10 (D), PmB is added at the beginning of culture. (A, B, C and D) All results were done in technical duplicates within biological triplicates. Data correspond to mean  $\pm$  SD. (A and B) Two-Way ANOVA with Tukey correction was performed to compare each condition (ns ; \*  $P < 0.01$  ; \*\*  $P < 0.005$ ).

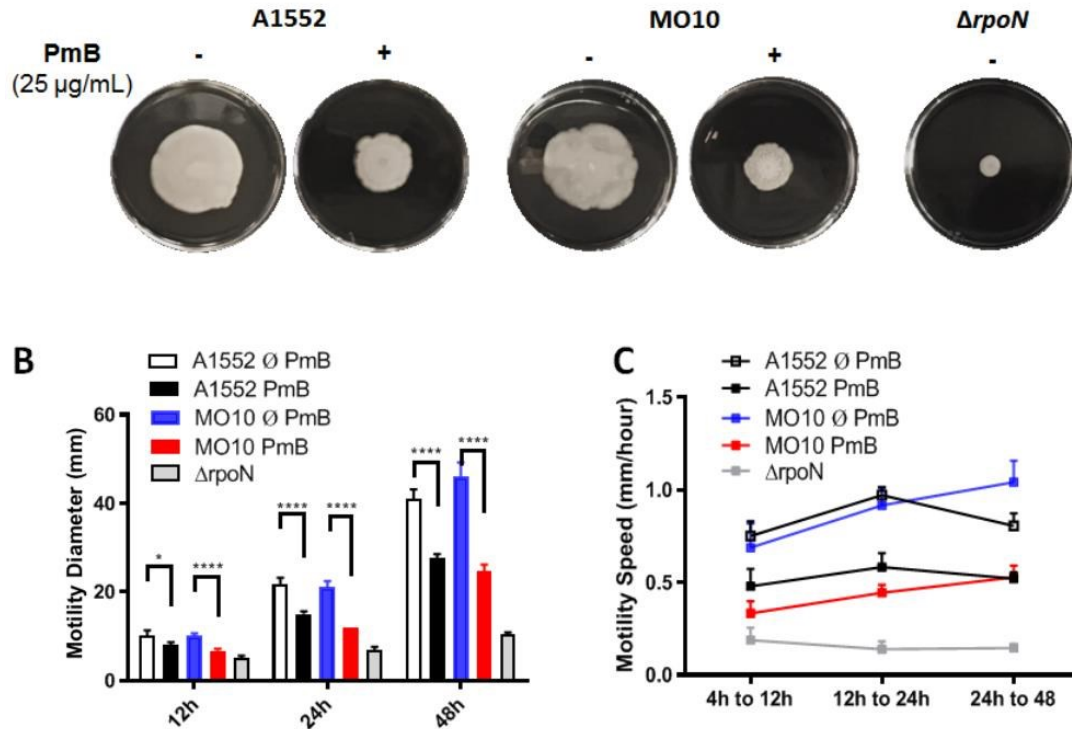


Figure 2.3. Polymyxin B inhibits *V. cholerae* motility.

(A) Swimming motility assays. Aliquots of A1552 or MO10 in exponential phase of growth were spotted in the center of a Petri dish containing LB LB agar 0.3%. An A1552  $\Delta rpoN$  was used as non-motile control. Photographs were taken after 48h incubation at 37°C. (B) A1552 and MO10 *V. cholerae* strains swimming diameter on plates at 12h, 24h and 48h. A1552 without (white) and with (black) 25 µg/mL polymyxin (PmB) ; MO10 without (blue) and with (red) 25 µg/mL PmB. (C) Speed motility in mm/hour calculated based on the growth diameter difference on Petri dishes containing LB agar 0.3%. Data correspond to technical triplicates within biological triplicates mean  $\pm$  SD. Two-Way ANOVA with Tukey correction was performed to compare each condition (\*\*\*\* P < 0.0001).

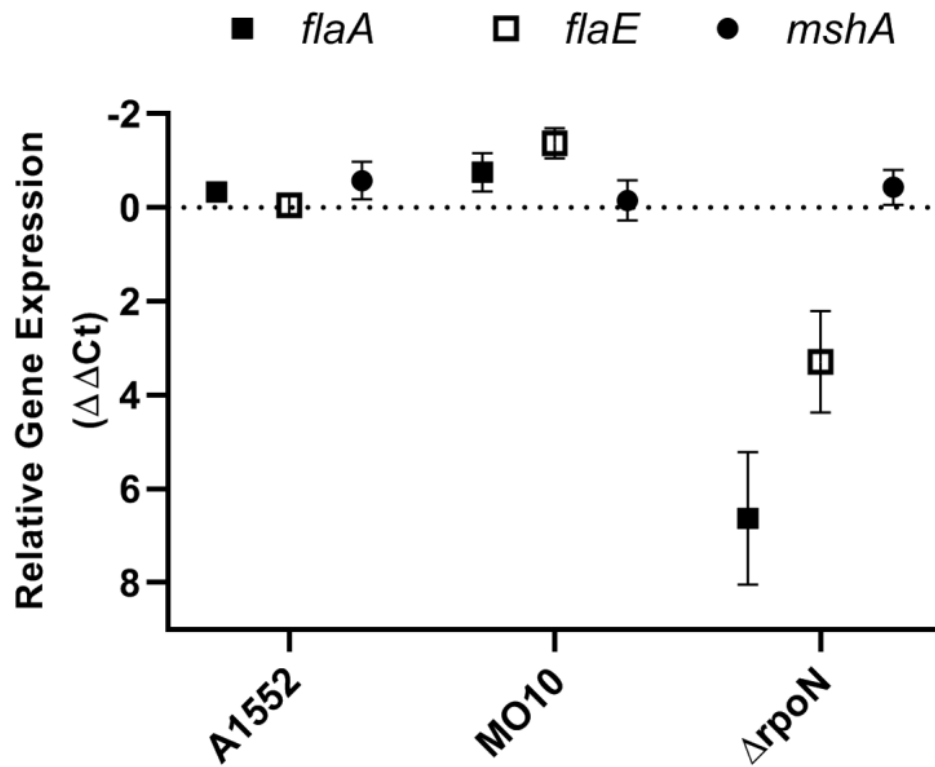


Figure 2.4. Sub-inhibitory concentration of polymyxin B does not reduce the expression of the flagellin and the MSHA pili genes.

Relative gene expression ( $\Delta\Delta Ct$ ) for *flaA*, *flaE* and *mshA* in A1552 and MO10 in presence of PmB 25 $\mu$ g/mL in exponential phase of growth in comparison with a control without PmB. The  $\Delta rpoN$  strain was used as negative control of the flagellins expression. Data correspond to technical triplicates within biological duplicates mean  $\pm$  SD. A positive  $\Delta\Delta Ct$  value indicates an increase in gene expression, conversely a negative  $\Delta\Delta Ct$  value indicates a decrease in gene expression.

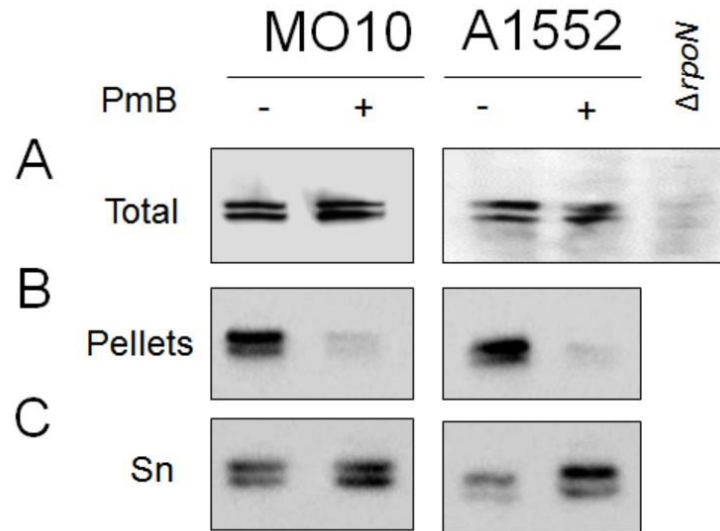


Figure 2.5. Modification of the flagellin location in presence of sub-inhibitory polymyxin B.

Presence of flagellin was evaluated by western-blot using anti-flagellin antibody on A1552 and MO10 in total culture (bacteria and supernatant compartment not divided) (A), in cell pellets (B) and in culture supernatant (C) (Sn), in absence (-) and presence (+) of 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  PmB. A negative control of flagellin signal consisting of the *ΔrpoN* mutant of A1552 is shown for the total culture extract. Picture is representative of  $\geq$  three biological replicates.



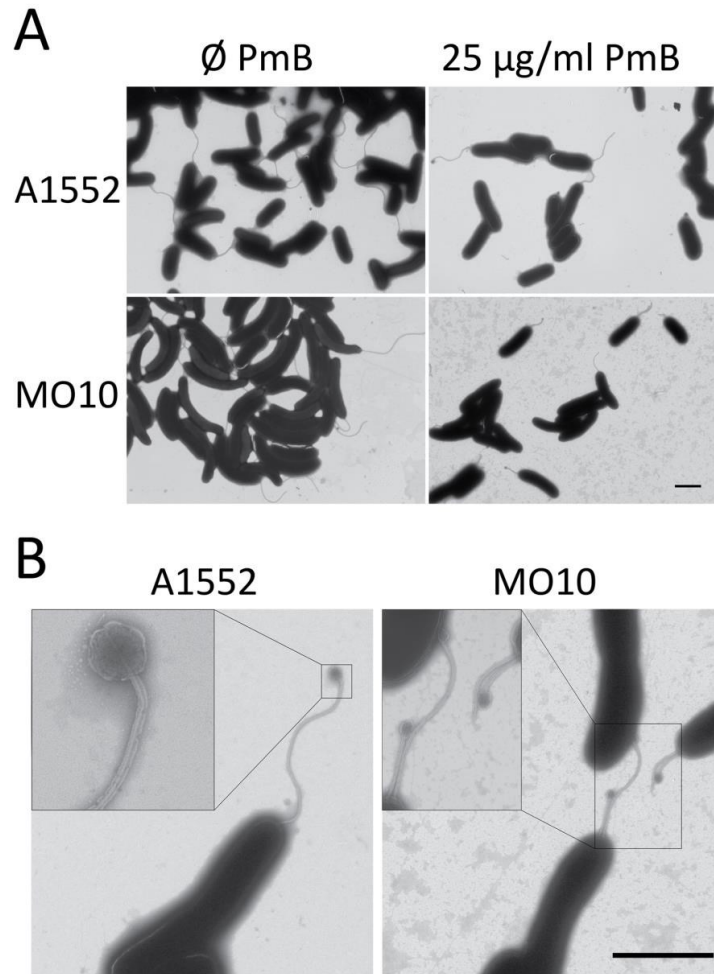


Figure 2.6. Polymyxin B sub-lethal concentration causes A1552 and MO10 flagella loss and misshaping.

(A) Transmitted electronic microscopy pictures of *V. cholerae* A1552 and MO10 strain, grown in absence (-) or in presence (+) of 25 µg/mL PmB. Pictures are representative of 3 replicates. (B) Transmitted electronic microscopy pictures of *V. cholerae* A1552 and MO10 strains, grown in presence 25 µg/mL PmB. Scale bar corresponds to 2 µm. Pictures show elements seen in 3 biological replicates.

## 2.9 Tables

Tableau 2.1. Polymyxin B increase flagella components in A1552 secretomea

| Protein | Relative abundance <sup>b</sup> |
|---------|---------------------------------|
| FlaA    | 2.1                             |
| FlaB    | 1.6                             |
| FlaC    | 1.8                             |
| FlaD    | 1.4                             |
| FlaE    | <i>N.D.</i>                     |

<sup>a</sup> Quantitative mass-spectrometry analysis in presence or absence of PmB. Relative abundance of the five flagellin subunits in the culture supernatant of *V. cholerae* O1 strain A1552 grown in presence of 12,5 µg/mL of PmB in comparison with the control without PmB. (*N.D.: not detected*).

<sup>b</sup> Fold change difference in terms of spectrum counts between A1552 grown with 12,5 µg/mL PmB and the control grown without PmB.

Tableau 2.2. A1552 and MO10 membrane integrity is not impaired by 25 µg/mL polymyxin B.<sup>a</sup>

|                      |         | N. SYTOX9<br>pos.Events | Freq. of SSC/FSC sub.<br>(%) | Freq. of SYTO9 pos.<br>(%) | Geometric<br>Means | Freq. of PI pos.<br>(%) |
|----------------------|---------|-------------------------|------------------------------|----------------------------|--------------------|-------------------------|
| <b>A1552 ∅ PmB</b>   | Mean    | 29317,67                | 20,67                        | 40,27                      | 6,11               | 3,36                    |
|                      | SD      | 12663,00                | 6,45                         | 3,88                       | 2,87               | 2,02                    |
|                      | N       | 3,00                    | 3,00                         | 3,00                       | 3,00               | 3,00                    |
| <b>A1552 + PmB</b>   | Mean    | 20679,33                | 32,20                        | 39,87                      | 8,24               | 3,99                    |
|                      | SD      | 10817,08                | 6,98                         | 6,46                       | 1,87               | 2,15                    |
|                      | N       | 3,00                    | 3,00                         | 3,00                       | 3,00               | 3,00                    |
| <b>MO10 ∅ PmB</b>    | Mean    | 28227,33                | 17,30                        | 78,83                      | -4,10              | 3,86                    |
|                      | SD      | 963,44                  | 3,44                         | 5,28                       | 0,81               | 0,67                    |
|                      | N       | 3,00                    | 3,00                         | 3,00                       | 3,00               | 3,00                    |
| <b>MO10 + PmB</b>    | Mean    | 27037,00                | 24,23                        | 76,00                      | -8,83              | 2,01                    |
|                      | SD      | 2938,94                 | 5,76                         | 10,79                      | 3,87               | 1,00                    |
|                      | N       | 3,00                    | 3,00                         | 3,00                       | 3,00               | 3,00                    |
| <b>A1552 Control</b> | Mean    | 48687,00                | 28,70                        | 74,70                      | 361,00             | 87,80                   |
|                      | Pos. SD | –                       | –                            | –                          | –                  | –                       |
|                      | N       | 1                       | 1                            | 1                          | 1                  | 1                       |
| <b>MO10 Control</b>  | Mean    | 45628,00                | 25,20                        | 72,30                      | 464,00             | 91,70                   |
|                      | Pos. SD | –                       | –                            | –                          | –                  | –                       |
|                      | N       | 1                       | 1                            | 1                          | 1                  | 1                       |

<sup>a</sup> : Membrane viability of A1552 and MO10 *V. cholerae* strains grown with and without PmB were appreciated via flow cytometry experiments using propidium iodide (PI) and DAPI probes. PI positive events represent cells with impaired membrane integrity. Cell populations were primarily gated in SSC/FSC then DAPI positive strains were selected. Frequency in parental population ( $\geq 35000$  events), geometric mean (geomean) and proportion of PI positive and negative cells were measured in biological triplicates  $\pm$  SD. Two-Way ANOVA with Tukey correction was performed to compare geomean and PI positive and negative cell proportion of the two strains grown with or without PmB. Only comparison of PI signal geomean between A1552 grown with (+) and without PmB (-) show a significant difference with ( $P < 0.0001$ ).

## 2.10 Supporting Information

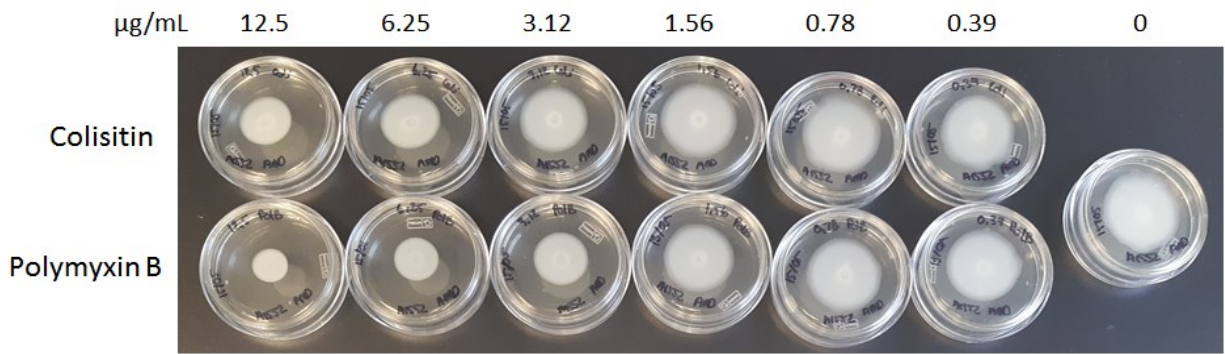


Figure 2.7. Motility reduction is dose-dependent

Aliquots of A1552 in exponential phase of growth were dropped in the center of a Petri dish containing LB agar 0.3% and decreasing concentration of PmB or colistin (12.5µg/mL to 0.39µg/mL). A control without AMP is shown on the right (0). Photographs were taken after 24h incubation at 37°C and are representative of 3 independent experiments.

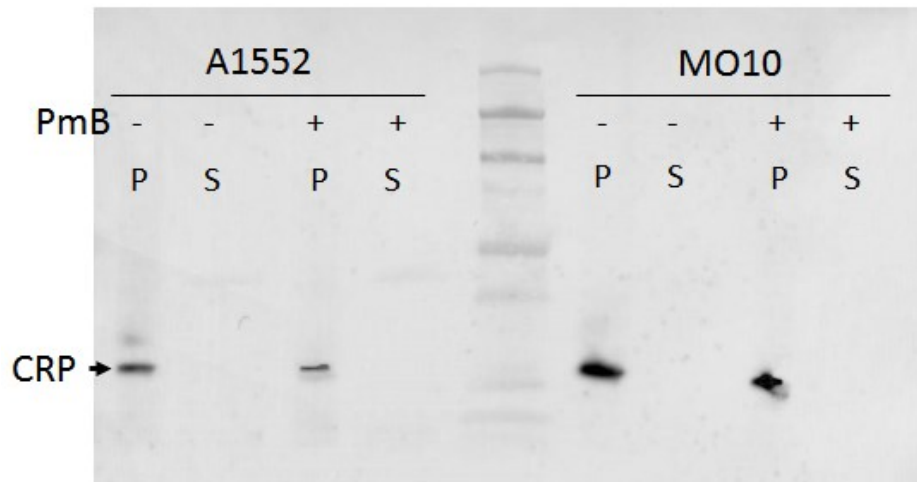


Figure 2.8. The supernatant fraction is not contaminated with cytoplasmic proteins

Immunoblot analysis of the cytoplasmic cyclic AMP receptor protein (CRP) evaluated using-CRP antibody in the pellets and in supernatant of A1552 and MO10 in absence (-) and presence (+) of 25 µg/mL PmB. P: Pellet, S: Supernatant.

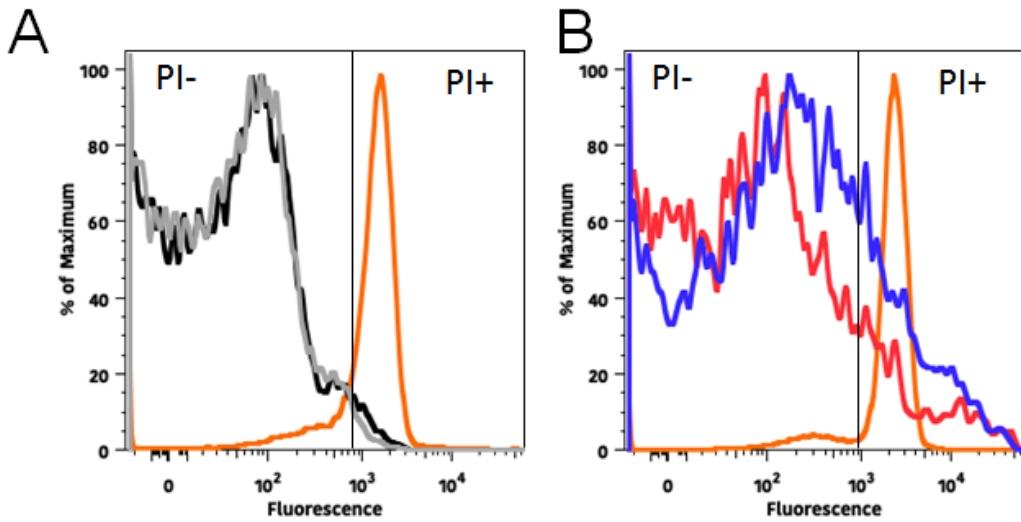


Figure 2.9. Sub-inhibitory concentration of PmB does not alter the cell wall integrity

*V. cholerae* A1552 (A) and MO10 (B) cell-wall integrity in presence (black and red) in absence (gray and blue) of 25 μg/mL of PmB appreciated via flow cytometry using propidium iodide probe (PI). PI fluorescence is correlated with envelope impaired cells. A positive control of pore formation (orange) consisting on a short incubation of the bacteria with high concentration of PmB (1 mg/mL) has been performed in parallel. Cell population was primarily selected in SSC/FSC then DAPI positive strains were selected. The positive control was used to set up the PI positive (PI+) and negative (PI-) threshold. Number of subpopulation events  $\geq 35000$ .

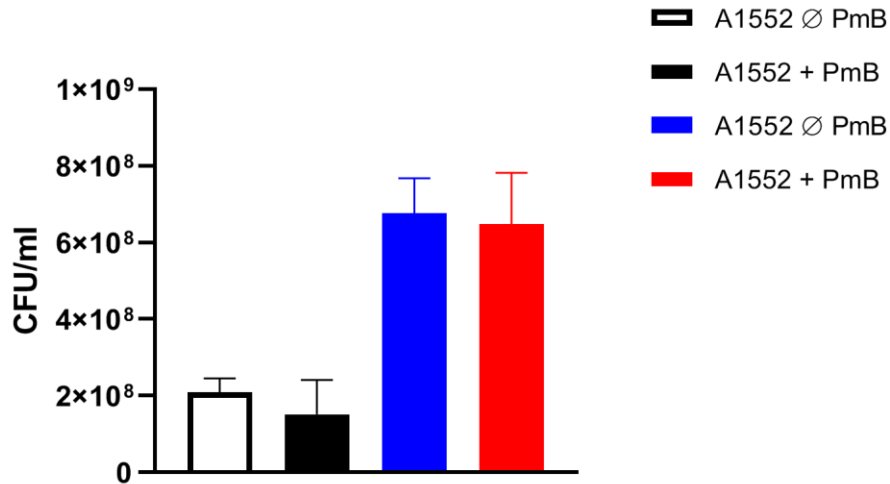


Figure 2.10. Colony forming units per milliliter in exponential phase

V. cholerae A1552 and MO10 CFU/mL in absence (white and blue) and in presence (black and red) of 25µg/mL of PmB after 2 hours final culture. Slight but no significant decrease in CFU/mL were observed in presence of PmB in mid-exponential phase.

Tableau 2.3. Effects of polymyxin B on A1552 and MO10 on proportion of flagellated cells and flagella aspecta

|       |                                    | Flagellated bacteria | Misshapen or uncoated flagella | Flagella with bulb |
|-------|------------------------------------|----------------------|--------------------------------|--------------------|
| A1552 | Ø PmB                              | 44,6%                | 5,4%                           | 2,0%               |
|       | + PmB                              | 19,1%                | 61,4%                          | 50,6%              |
|       | <b>Relative change +PmB / ØPmB</b> | -57,1%               | +1036,7%                       | +2396,4%           |
| MO10  | Ø PmB                              | 51,2%                | 11,1%                          | 9,5%               |
|       | +PmB                               | 45,1%                | 46,1%                          | 43,3%              |
|       | <b>Relative change +PmB / ØPmB</b> | -11,9%               | +315,0%                        | +355,0%            |

<sup>a</sup>: Effects of PmB on A1552 and MO10 cells proportion having flagellum was evaluated in electron microscopy. Aspect of flagella, misshapen (bulb-like structure) or membrane loss, has also been evaluated. Cells were incubated with 25 µg/mL PmB (+PmB) or without PmB (Ø PmB), samples were taken in mid-exponential phase and treated for electron microscopy acquisitions. For each strain and conditions ≥ 170 cells were counted for presence or absence of flagella and ≥ 63 flagella for flagella aspect.

## Préface au Chapitre 3

- **Introduction**

Dans l'article « Experimental evolution of *Vibrio cholerae*: Identification of genes involved in motility in the presence of polymyxin B. » que nous allons soumettre au cours du mois de juillet 2021 à la revue *Frontiers in Microbiology*, nous avons cherché à identifier de nouveaux facteurs facilitant la mobilité de *Vibrio cholerae* O1 El Tor et O139 en présence de polymyxine B. L'article a été prépublié sur BioRxiv <https://doi.org/10.1101/2021.07.12.451780>, mais a subi quelques modifications.

- **Liste des autrices et auteurs**

Sean Giacomucci, Antony T. Vincent and Marylise Duperthuy

- **Contribution des auteurs**

Docteure Marylise Duperthuy a conceptualisé, supervisé la recherche, acquis et géré les fonds nécessaires à son aboutissement et elle a écrit l'article. En tant que premier auteur j'ai réalisé plus de la moitié des expériences de l'article, j'ai également participé à la rédaction de l'article, à la conceptualisation, à la méthodologie, à l'analyse des résultats, et à la conception des figures. Docteur Antony T. Vincent a participé à l'analyse des résultats notamment au traitement des résultats de séquençage.





## Chapitre 3 – 2<sup>e</sup> Article

### Experimental evolution of *Vibrio cholerae*: Identification of genes involved in motility in the presence of polymyxin B

Sean Giacomucci<sup>1</sup>, Antony T. Vincent<sup>2</sup> and Marylise Duperthuy<sup>1\*</sup>

1. Département de Microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montreal, H3T 1J4, Quebec, Canada.
2. Département des Sciences animales, Faculté des Sciences de l'agriculture et de l'alimentation, Université Laval, Quebec City, Quebec, G1V 0A6, Canada.

\*Corresponding author : marylise.duperthuy@umontreal.ca

### 3.1 Abstract

*Vibrio cholerae* is the bacteria responsible for the cholera disease and a natural inhabitant of aquatic environments. Biofilm formation is important for human colonization and environmental survival. Motility is essential for adhesion and biofilm formation by *V. cholerae*. In a previous study, we showed that motility and biofilm formation are altered in the presence of sub-inhibitory concentrations of polymyxin B in *V. cholerae*. In this study, we performed an experimental evolution to identify genes restoring rescuing the motility in the presence of polymyxin B. We identified different mutations which probably provoked a loss or an impairment in the function of 5 genes: *ihfA*, *vacJ* (*m1aA*), *m1aF*, *dacB* and *ccmH*. We concluded that the increase in motility observed in these mutants may result from three different mechanisms, providing polymyxine B

resistance or improving flagellar synthesis or stability: increase in production of membrane vesicles, improvement of envelope stability or modification of gene regulation.

### 3.2 Introduction

*Vibrio cholerae* is a Gram-negative pathogenic bacterium responsible for the cholera disease, which infect millions of people per year worldwide. More than 200 serotypes have been reported but only the O1 and O139 cause the cholera (Harris, LaRocque, Qadri, Ryan, & Calderwood, 2012). The O1 strains are further divided in 2 biotypes: Classical and El Tor. The Classical biotype was responsible for 6 pandemics and has been replaced by the El Tor biotype in 1961, which is responsible for the ongoing 7<sup>th</sup> pandemic (Harris et al., 2012). The O139 serotype, which causes local epidemics, appeared in 1992 and is derived from the O1 El Tor biotype (Faruque et al., 2003). The non O1 / non O139 serogroups can cause less serious gastroenteritis (Morris, 2011).

For most of the pathogenic bacteria, motility is essential for host colonization and virulence (Josenhans & Suerbaum, 2002). Different types of motilities exist: swimming, swarming, twitching, gliding and sliding, the latest being a passive process that does not involve energy (Kearns, 2010). Swarming, twitching, gliding and sliding are surface motility mechanisms whereas swimming allows bacteria to move in liquid suspensions and involves active propulsion by the flagella. Flagella are filamentous apparatus anchored to the bacterial envelope and divided in three major structures: the basal body, the hook and the filament (Echazarreta & Klose, 2019). The movement is ensured by the rotation of the flagella filament driven by a motor-like structure. In most of the bacteria, the motor uses a H<sup>+</sup> gradient as energy source (Nakamura & Minamino, 2019). In *Vibrio*, the rotation of the flagella is driven by a Na<sup>+</sup> motor (Kojima, Yamamoto, Kawagishi, & Homma, 1999), which provides a rotation speed up to 5 times faster than the H<sup>+</sup> driven flagella of *E. coli* (Magariyama et al., 1994).

*V. cholerae* is motile and possesses a single polar flagellum. The filament is composed of five homologous subunits: FlaA, FlaB, FlaC, FlaD and FlaE, and the flagellum is coated by an outer membrane sheet (Fuerst & Perry, 1988; Klose & Mekalanos, 1998). Besides its essential role in

motility, *Vibrio* flagellum is also essential for biofilm formation, colonization and virulence (Echazarreta & Klose, 2019). In *V. cholerae*, the expression of the flagellar gene expression is tightly regulated and is organized in a 4-steps hierarchical process, resulting in 4 classes of genes. There is only one class I gene, the  $\sigma^{54}$ -dependant master regulator of the flagella regulation hierarchy *flrA*. This regulator is essential for flagella synthesis and its expression is activated by the histone-like nucleoid structuring protein (H-NS or VicH) (A. Ghosh, Paul, & Chowdhury, 2006) and repressed by FlhG, which regulates the number of flagella (Correa, Peng, & Klose, 2005). FlrA control the expression of the class II genes that include genes encoding for structural components of the flagella such as the MS (membrane/supramembrane) ring, the ATPase and the export apparatus. In addition, *flhG* and *flhF* also belongs to the class II genes and control the number and polar localization of the flagella (Kusumoto et al., 2008). Among the class II genes, *flrBC* and *fliA* are the main activators of the class III and class IV genes, respectively. The class III genes contain other genes encoding for proteins essential for the structure of the flagella including the inner membrane apparatus, the proximal and distal rod and the hook-related proteins, among others (Echazarreta & Klose, 2019). The FlaA flagellin gene (*flaA*) also belongs to the class II gene and is the only flagellin essential for motility (Klose & Mekalanos, 1998). The class IV genes contains those encoding for the other flagellins (*flaB*, *flaC*, *flaD* and *flaE*), the anti-sigma factor FlgM and the motor (MotA, MotB and MotX) (Echazarreta & Klose, 2019). FlgM is a negative regulator of *fliA* and prevent the expression of class IV genes until the flagella apparatus is successfully assembled and enable the secretion of FlgM (Correa, Barker, & Klose, 2004).

In our previous study, we showed that the biofilm formation was impaired in presence of subinhibitory concentrations of polymyxin B, due to a significant reduction in the proportion of flagellated *V. cholerae* O1 and O139 (Giacomucci, Cros, Perron, Mathieu-Denoncourt, & Duperthuy, 2019). In addition, a motility reduction was observed in the presence of polymyxin B and was associated with non-homogenous flower-like motility pattern on soft agar. In this study, we investigated the mechanisms explaining the motility reduction in the presence of polymyxin B. To do so, we took advantage of the flower-like motility pattern and performed an experimental evolution in the presence of polymyxin B in two strains of *V. cholerae*, *i.e.* O1 El Tor strain A1552 and O139 strain MO10. After sequencing, we identified mutations in genes involved in global

regulation (*ihfA*), in outer membrane lipid asymmetry maintenance (*vacJ* and *mlaF*) and in cell wall synthesis (*dacB*).

### **3.3 Materials and methods**

#### **3.3.1 Bacterial strains and growth conditions**

Two *V. cholerae* strains have been used in this study: A1552 (O1, El Tor, Inaba) and MO10 (O139), initially isolated from patients in Peru and India, respectively (Allue-Guardia, Echazarreta, Koenig, Klose, & Eppinger, 2018; O'Shea, Reen, Quirke, & Boyd, 2004). Bacterial growth was performed in LB media supplemented with 25 µg/mL of polymyxin B (Polymyxin B sulfate, Millipore) when indicated, as previously described (Giacomucci et al., 2019). Briefly, bacteria were grown overnight at 37°C under shaking condition in LB media followed by a dilution in fresh LB media. These cultures were then incubated in similar conditions to an OD of 0.3 and used to perform the motility assays.

#### **3.3.2 Motility assays**

Motility assays were performed as previously described (Giacomucci et al., 2019). Briefly, bacteria were spotted on LB plates containing 0.3% agar (soft agar) and incubated for 12 to 48 hours at 37°C. The motility was evaluated by measuring the diameter of bacterial growth. Polymyxin B was added to the plate at a concentration of 25 µg/mL, a subinhibitory concentration that does not cause pore formation in the membrane (Giacomucci et al., 2019), when indicated. Selection of variants was performed on technical triplicates. Experiments using variants were performed in biological triplicates. Statistical analyses were performed using a one-way ANOVA test ( $p < 0.05$ ).

### 3.3.3 Sequencing, genome assembly and Analysis

The DNA extraction of the bacterial strains was performed using Promega Wizard™ Genomic DNA Purification Kit according to the manufacturer guidelines. The wild-type strains MO10 and A1552 were sequenced by PacBio RS II and Illumina MiSeq at the Génome Québec Innovation Center (Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montreal, Canada). The PacBio sequencing reads were assembled with Flye 2.8.1 (Kolmogorov, Yuan, Lin, & Pevzner, 2019). The sequences corresponding to chromosomes I and II were circularized with various tools from the EMBOSS version 6.6.0 suite (Rice, Longden, & Bleasby, 2000). Illumina reads were subsequently used to polish assemblies with BWA version 0.7.17-r1188 (Heng Li, 2013), SAMtools version 1.12 (H. Li et al., 2009) and Pilon version 1.23 (Walker et al., 2014). The sequences were deposited in the NCBI database (CP072847.1; CP072848.1; CP072849.1 and CP072850.1).

The DNA of the variants sequenced by Illumina MiSeq at the Génome Québec Innovation Center (McGill University, Montreal, Canada). The reads were filtered using fastp version 0.20.1 (Chen, Zhou, Chen, & Gu, 2018). The mutations were identified and validated in relation to the genomes of the parental strains, beforehand annotated with Prokka version 1.14.5 (Seemann, 2014), with both Snippy version 4.6.0 ("Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads," 2015) and Breseq version 0.35.2 (Barrick & Lenski, 2009; Barrick et al., 2009).

### 3.3.4 Sequences homologies, alignments and features Analysis

*Escherichia coli* K12 MG1655 and *Vibrio cholerae* IhfA protein sequence identity and similarity were calculated with protein-protein BLAST (Altschul et al., 1997; Altschul et al., 2005). Alignment of two or multiple sequences were respectively performed using semi-global alignment "glocal" (Brudno et al., 2003) and MUSCLE (Edgar, 2004) from Snapgene®. **Figure 3.5** were edited from Easyfig graphical sequence alignment (Sullivan, Petty, & Beatson, 2011), **Figure 3.4**, **Figure 3.6**, **Figure 3.7** and **Supplementary Figure 3.8** were edited from Snapgene® alignments. Signal peptide was identified with protcompB (V9.0) ("ProtCompB - Prediction subcellular protein localization,") and SignalP 5.0 (Nielsen, Tsirigos, Brunak, & von Heijne, 2019). Putative -35 and -10 promoter box were identified with BPPROM service from Softberry (V. Solovyev & Salamov, 2011). *Vibrio*

*cholerae* gene and protein sequences homology was compared to *Escherichia coli* K12 MG1655 (NC\_000913.3).

## 3.4 Results

### 3.4.1 Experimental evolution procedure

In some of our previous study, we observed a heterogenous motility pattern on soft agar in the presence of polymyxin B. Indeed, protuberances of various sizes were observed around the inner circle of bacteria (**Figure 3.1**). These protuberances were never observed in the control without polymyxin B (**Figure 3.1**). We hypothesize that these protuberances correspond to mutation in the bacterial chromosome which compensate the loss of motility in the presence of polymyxin B. Therefore, we performed an experimental evolution to select for adaptive variants that gain motility in presence of polymyxin B (**Figure 3.2**). To do so, we plated the wild-type strains on soft agar supplemented with 25 µg/mL of polymyxin B. After 48 hours, we sampled bacteria at the edge of the protuberances and streaked them on LB media to obtain isolated colonies. Two wild-type mother strains were used: *V. cholerae* O1 El Tor A1552 and O139 MO10. Eight samplings have been performed for each strain have been tested and one colony representative of each sample has been selected and conserved for a total of 16 variants: A1552 V1-8 and MO10-V1-8. Then, we tested the motility phenotype of these variants in presence of polymyxin B on soft agar. After 48h, 6 were selected based on their increased motility in presence of polymyxin B in comparison with the wild-type strains (**Figure 3.3**). From the 6 variants, 3 originated from *V. cholerae* A1552 (A1552-V1, A1552-V2 and A1552-V6) and 3 from MO10 (MO10-V1, MO10-V7 and MO10-V8). The motility of these variants are comparable to the motility of the wild-type strains in absence of polymyxin B (Giacomucci et al., 2019) with a motility diameter of ~4.3 cm on average (**Figure 3.3**). As expected, the wild-type strains in presence of polymyxin B demonstrated a reduced motility with a diameter ~2.5 cm. Finally, the motility pattern was comparable with the control without polymyxin B displaying a more circular pattern (data not shown). Altogether, these results suggest that the variants have compensated the loss of motility observed in presence of polymyxin B.

### 3.4.2 Identification of mutations

To determine the genes involved in the motility restoration of the variants in presence of polymyxin B, we performed a comparative genomic analysis. To do so, we first sequenced the genome of the wild-type strains using a PacBio technology. The genomes are available on the NCBI biosample database: accession number SAMN18636297 and variants using a MiSeq technology and compared it to the genome of the wild-type strains. The results of the comparative genomic analyses are presented in **Supplementary Tableau 3.1 to Supplementary Tableau 3.5**.

The most significant mutation detected in A1552 variant occurs in the A1552-V6 variant and consists on a deletion of 12 nucleotides in *ihfA* (VC1222) gene (**Figure 3.4**). This mutation results in the loss of 4 amino-acids (67-70) and a mutation of one amino-acid in position 66 (K66N). A comparison of *ihfA* sequence in A1552 with its homologue in *E. coli* demonstrates that the sequence is highly conserved (94% similarity and 81% identity). Interestingly, the amino-acids responsible for IHF function in *E. coli* have been identified (P65 and K66) and are conserved in the wild-type sequence of A1552. Conversely, K66 is deleted in A1552-V6 (**Figure 3.4**). Therefore, it is possible that the protein remains transcribed but with an attenuated functionality.

Regarding MO10, two variants presented mutations in the Mla pathway, involved in phospholipid asymmetry maintenance. In MO10-V8, we noticed a deletion of 371 nucleotides in a region covering *ccmH* (VC2050) and *vacJ* (*mIaA*, VC2048) genes (**Figure 3.5**), while we observed a point mutation resulting in the insertion of a stop codon in *mIaF* (VC2520) sequence in MO10-V2 (**Figure 3.6**). Regarding *vacJ*, the 17 first codons were deleted, which result in the loss of the signal peptide for the secretion through the outer membrane as determined using SignalP 5.0 software (Almagro Armenteros et al., 2019). Therefore, it is expected that both mutations in *vacJ* and *mIaF* induce a loss of function of these genes and proteins, and consequently of the Mla pathway. In *ccmH*, which encodes a c-type cytochrome maturation protein (Braun & Thony-Meyer, 2005; Thony-Meyer, 1997), the mutation result in the modification of 4 amino-acids and the deletion of the 85

subsequent amino-acids in C-terminal, which represent more than 20% of the sequence and the periplasmic domain of the protein.

In addition, we observed a 11-nucleotide deletion in *dacB* (Vch1786\_I0040) in MO10-V2 in position 1013-1023 (**Figure 3.7**) This deletion result in a shift in the open reading frame and the emergence of a stop codon. In addition, DacB protein has lost ~30% of its C-terminal residues. Therefore, it is very likely that *dacB* mutation in MO10-V2 result in a loss of function.

### 3.5 Discussion

To identify genes important for motility in the presence of sub-inhibitory concentration of polymyxin B, we performed a short experimental evolution protocol. Experimental evolution has been widely used to validate evolutionary theories and to identify genes involved in responses to various stresses in bacteria (McDonald, 2019). In the latter case, *de novo* mutations driven by stresses led to the identification of genes important for survival in presence of oxidative stress and antibiotics, or during a temperature shift (Hoffmann & Hercus, 2000; Justin et al., 2019). In this study, we identified mutations in genes potentially important for motility in the presence of polymyxin B in two different strains of *V. cholerae*: A1552 (O1 El Tor) and MO10 (O139): *vacJ-ccmH mlaF*, *dacB* and *ihfA*. These mutations have been identified in 3 variants, two in MO10 and one in A1552.

In our previous study, we demonstrated that the loss of motility in the presence of polymyxin B was due to a high proportion of aflagellated bacteria (Giacomucci et al., 2019). The absence of flagella was not resulting from a repression of the flagellins genes, but most likely to either a default in the flagellum assembly or a flagella miss-anchoring. In any cases, the absence of flagella is related to envelope perturbations due to polymyxin B, while no pores in the membrane were observed (Giacomucci et al., 2019). Therefore, it was not surprising to identify in our analysis genes involved in the maintenance of the cell envelope integrity. It is the case of *vacJ* (*mlaA*) and *mlaF*, which belong to the maintenance of lipid asymmetry (Mla) pathway. VacJ is homologue to MlaA, an alpha-helical outer membrane lipoprotein, while MlaF is an ATPase associated to the



inner membrane in complex with MlaD and MlaE. MlaC and MlaB are periplasmic and cytoplasmic proteins, respectively (Du Toit, 2019). It has been previously described in *E. coli* that the Mla pathway is essential for preserving the outer membrane lipid asymmetry by preventing phospholipid accumulation in the outer leaflet through an anterograde phospholipid transport (Du Toit, 2019; Malinverni & Silhavy, 2009). The Mla pathway is important for antimicrobial tolerance in several Gram-negative bacteria, including *Burkholderia* and *Pseudomonas* (Bernier, Son, & Surette, 2018; Munguia et al., 2017). In *Vibrio cholerae* and other Gram-negative pathogens, it has been demonstrated that the Mla pathway is involved in membrane vesicles biogenesis and is important for serum resistance (Roier et al., 2016). The authors proposed that the hypervesiculation mediated by defects in the Mla pathway is a conserved bacterial mechanism to prevent phospholipid accumulation in the outer membrane (Roier et al., 2016). It has been demonstrated that polymyxin B disturb the outer membrane and stiffen the phospholipid bilayer (Fu, Wan, Zhang, Gao, & Fang, 2020). Thus, it is reasonable to hypothesize that the loss of *vacJ* or *miaF* in presence of subinhibitory concentrations of polymyxin B might have a significant effect on outer membrane fluidity through vesiculation. Since the increased ratio of aflagellated bacteria is likely due to the membrane perturbation (Giacomucci et al., 2019), it is possible that the mutation in the Mla pathway observed in this study participate in stabilizing the membrane integrity, which would result in the preservation of the flagella and restored motility.

The deletion identified in MO10-V8 in *vacJ* also affect the sequence of the adjacent gene *ccmH*, which encodes for a protein involved in a c-type cytochrome maturation. Cytochromes are important in bacteria metabolism as they function as electron transfer proteins. C-type cytochromes are characterized by the covalent liaison of the polypeptide with an heme (Kranz, Richard-Fogal, Taylor, & Frawley, 2009). In MO10-V8, a deletion of 371 nucleotide is observed, which represent ~20% of the protein. Therefore, it is likely that CcmH has lost its function in this variant. In *V. cholerae*, there are 14 proteins containing a CXXCH motif and a signal peptide in N-terminal for the association with the membrane (Braun & Thony-Meyer, 2005). Among them, 7 have been characterized for their function in respiration in aerobic and anaerobic conditions and one is a peroxidase probably involved in oxidative stress response (Braun & Thony-Meyer, 2005).

CcmH is part of the 6 other c-types cytochromes maturation proteins that are clustered together (*ccmA-I*) on *V. cholerae* chromosome and are not required for growth under aerobic conditions in rich media (Braun & Thony-Meyer, 2005). To our knowledge, there is no evidence that *ccmH* is important for motility or membrane integrity, and its role in bacterial metabolism is probably very limited in our experimental conditions. Therefore, the implication of the deletion that covers both *ccmH* and *vacJ* sequences in bacterial motility recovery in the presence of polymyxin B most probably rely on the inactivation of *vacJ*.

In another variant of the O139 strain MO10 strain, a mutation has been observed in *dacB*, which encodes PBP4, a low molecular weight cell wall-synthesizing enzymes/penicillin-binding proteins (PBPs) involved in the peptidoglycan biosynthesis pathway (Typas, Banzhaf, Gross, & Vollmer, 2011). In *Vibrio parahaemolyticus*, *dacB* has a role in the formation of abnormal cell shape during the transition to a viable but not culturable state (Hung, Jane, & Wong, 2013). In *E. coli*, low molecular weight PBPs also have a role in cell shape maintenance (Nelson & Young, 2001). The *dacB* mutant cells are wider and display localized transparent bulges at the poles (Yang et al., 2018). The authors also demonstrated that an accumulation of soluble peptidoglycan occurs in a *dacB* mutant. Additionally, it has been demonstrated that peptidoglycan remodeling, especially the alteration of the peptidoglycan-outer membrane cross-linking, regulates the formation of membrane vesicles (Schwechheimer, Rodriguez, & Kuehn, 2015). This alteration involves the endopeptidase activities of PBP4 and another protein, Spr, under the regulation by Nlpl. Altogether, the roles of *dacB* in cell shape maintenance, peptidoglycan biosynthesis and vesicles formation, pinpoint its importance in cell wall remodeling that might be important for the stability of the flagella in *V. cholerae*.

The only mutation identified in the O1 El Tor strain A1552 is a deletion of 12 nucleotides in *ihfA*. *ihfA* encodes IfhA, one the Integration Host Factors (IHF) subunit together with IhfB. IHF is a histone-like DNA-binding protein that regulates many functions in bacterial cells, including transcription, replication and virulence (Freundlich, Ramani, Mathew, Sirko, & Tsui, 1992). In *V. cholerae*, IHF is essential for conjugation and virulence gene expression (McLeod, Burrus, & Waldor, 2006). The deletion of 12 nucleotides likely result in an attenuation of IHF function since one of the two essential amino acids for DNA binding has been deleted. It has been demonstrated

in a *V. cholerae* O1 El tor that IHF bind to *rpoN* and *flrA*, two major regulator of flagella genes expression (H. Wang, Ayala, Benitez, & Silva, 2012). The binding of IHF to *rpoN* and *flrA* promoters regions leads to a limitation of H-NS binding to these regions (H. Wang et al., 2012). The role of H-NS as a negative regulator of *rpoN* and *flrA* has previously been described (Prouty, Correa, & Klose, 2001). Thus, an IHF inactivation would lead to the binding of H-NS and eventually to the repression of the flagella-related genes. However, we previously demonstrated that the expression of the flagellin subunits is not reduced in presence of polymyxin B (Giacomucci et al., 2019). Therefore, it is possible that the IHF regulation of the flagellin in the presence of polymyxin B is minimal. Polymyxin B resistance of *Vibrio cholerae* has been related to different genes, including *almEFG* (Trimble, Mlynarcik, Kolar, & Hancock, 2016). Products of *almEFG* are known to increase polymyxin B resistance in *Vibrio cholerae* by modifying glycine or diglycine group of lipid A (Bilecen et al., 2015; Herrera et al., 2014). *In silico* analysis of *almEFG* revealed a putative IHF adhesion sequence at the upstream of *almG* open reading frame (**Supplementary Figure 3.8** and **Supplementary Figure 3.9**). Therefore, a loss of *IhfA* function in A1552-V6 mutant might have increased *almG* expression. Since IHF binding sites have been identified all over the bacterial genomes (Prieto et al., 2012; Reverchon et al., 2021), it is reasonable to hypothesize that the mechanism behind the gain in motility in presence of polymyxin B involving *ihfA* mutation might not be related to the flagella itself. As stated above, the loss of motility in presence of polymyxin B is likely due to a structural defect in the flagella or in the cell envelop. It has been recently demonstrated that a deletion of *ihfA* in *Dickeya*, a bacteria belonging to the *Enterobacteriaceae*, result in modifications of the cell envelope (Reverchon et al., 2021). In addition, the expression of major porins of *E. coli* are controlled by IHF (Huang, Tsui, & Freundlich, 1990; Ramani, Huang, & Freundlich, 1992). In *Salmonella enterica*, an *ihfA* mutation induces the expression of genes involved in peptidoglycan and lipopolysaccharides biosynthesis (Mangan et al., 2006). Therefore, similarly to the *Mla* pathway and *dacB*, a mutation in *ihfA* might influence the expression of genes that strengthen the bacterial envelop, leading to the retention of the flagella in presence of polymyxin B.

Regarding the other variants that have been sequenced, no significant genetic mutations were observed. It is thus possible that the gain of motility observed in these variants is due to a

transcriptional or an epigenetic regulation of gene expression. An increasing amount of evidence suggests that epigenetic regulation through methylation is an important process for gene expression regulation, including antibiotic resistance and virulence (Gaultney et al., 2020; D. Ghosh, Veeraraghavan, Elangovan, & Vivekanandan, 2020). Regarding flagella, a methylation site has been reported in the *flh* operon in *E. coli* (M. X. Wang & Church, 1992). In addition, it has been demonstrated that the expression of genes involved in membrane integrity are also highly regulated, including through small regulatory RNAs (Guillier & Gottesman, 2006). Therefore, it is possible that the increase motility observed in these variants is due to a modulation in the expression of genes involved in flagella structure or in membrane integrity maintenance.

### 3.6 References

- Allue-Guardia, A., Echazarreta, M., Koenig, S. S. K., Klose, K. E., & Eppinger, M. (2018). Closed Genome Sequence of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba Strain A1552. *Genome Announc*, 6(9). DOI:10.1128/genomeA.00098-18
- Almagro Armenteros, J. J., Tsirigos, K. D., Sonderby, C. K., Petersen, T. N., Winther, O., Brunak, S., . . . Nielsen, H. (2019). SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. *Nat Biotechnol*, 37(4), 420-423. DOI:10.1038/s41587-019-0036-z
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, 25(17), 3389-3402. DOI:10.1093/nar/25.17.3389
- Altschul, S. F., Wootton, J. C., Gertz, E. M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schaffer, A. A., & Yu, Y. K. (2005). Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *FEBS J*, 272(20), 5101-5109. DOI:10.1111/j.1742-4658.2005.04945.x
- Barrick, J. E., & Lenski, R. E. (2009). Genome-wide mutational diversity in an evolving population of *Escherichia coli*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 74, 119-129. DOI:10.1101/sqb.2009.74.018
- Barrick, J. E., Yu, D. S., Yoon, S. H., Jeong, H., Oh, T. K., Schneider, D., . . . Kim, J. F. (2009). Genome evolution and adaptation in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Nature*, 461(7268), 1243-1247. DOI:10.1038/nature08480

- Bernier, S. P., Son, S., & Surette, M. G. (2018). The Mla Pathway Plays an Essential Role in the Intrinsic Resistance of *Burkholderia cepacia* Complex Species to Antimicrobials and Host Innate Components. *J Bacteriol*, *200*(18). DOI:10.1128/JB.00156-18
- Bilecen, K., Fong, J. C., Cheng, A., Jones, C. J., Zamorano-Sanchez, D., & Yildiz, F. H. (2015). Polymyxin B resistance and biofilm formation in *Vibrio cholerae* are controlled by the response regulator CarR. *Infect Immun*, *83*(3), 1199-1209. DOI:10.1128/IAI.02700-14
- Braun, M., & Thony-Meyer, L. (2005). Cytochrome c maturation and the physiological role of c-type cytochromes in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, *187*(17), 5996-6004. DOI:10.1128/JB.187.17.5996-6004.2005
- Brudno, M., Malde, S., Poliakov, A., Do, C. B., Couronne, O., Dubchak, I., & Batzoglou, S. (2003). Global alignment: finding rearrangements during alignment. *Bioinformatics*, *19 Suppl 1*, i54-62. DOI:10.1093/bioinformatics/btg1005
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, *34*(17), i884-i890. DOI:10.1093/bioinformatics/bty560
- Correa, N. E., Barker, J. R., & Klose, K. E. (2004). The *Vibrio cholerae* FlgM homologue is an anti-sigma28 factor that is secreted through the sheathed polar flagellum. *J Bacteriol*, *186*(14), 4613-4619. DOI:10.1128/JB.186.14.4613-4619.2004
- Correa, N. E., Peng, F., & Klose, K. E. (2005). Roles of the regulatory proteins FlhF and FlhG in the *Vibrio cholerae* flagellar transcription hierarchy. *J Bacteriol*, *187*(18), 6324-6332. DOI:10.1128/JB.187.18.6324-6332.2005
- Du Toit, A. (2019). Phospholipid export from the inside out. *Nat Rev Microbiol*, *17*(9), 528. DOI:10.1038/s41579-019-0239-9
- Echazarreta, M. A., & Klose, K. E. (2019). *Vibrio* Flagellar Synthesis. *Front Cell Infect Microbiol*, *9*, 131. DOI:10.3389/fcimb.2019.00131
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*, *32*(5), 1792-1797. DOI:10.1093/nar/gkh340
- Faruque, S. M., Sack, D. A., Sack, R. B., Colwell, R. R., Takeda, Y., & Nair, G. B. (2003). Emergence and evolution of *Vibrio cholerae* O139. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(3), 1304-1309. DOI:10.1073/pnas.0337468100

- Freundlich, M., Ramani, N., Mathew, E., Sirko, A., & Tsui, P. (1992). The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, *6*(18), 2557-2563. DOI:10.1111/j.1365-2958.1992.tb01432.x
- Fu, L., Wan, M., Zhang, S., Gao, L., & Fang, W. (2020). Polymyxin B Loosens Lipopolysaccharide Bilayer but Stiffens Phospholipid Bilayer. *Biophys J*, *118*(1), 138-150. DOI:10.1016/j.bpj.2019.11.008
- Fuerst, J. A., & Perry, J. W. (1988). Demonstration of lipopolysaccharide on sheathed flagella of *Vibrio cholerae* O:1 by protein A-gold immunoelectron microscopy. *J Bacteriol*, *170*(4), 1488-1494. DOI:10.1128/jb.170.4.1488-1494.1988
- Gaultney, R. A., Vincent, A. T., Lorigou, C., Coppee, J. Y., Sismeiro, O., Varet, H., . . . Picardeau, M. (2020). 4-Methylcytosine DNA modification is critical for global epigenetic regulation and virulence in the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nucleic Acids Res*, *48*(21), 12102-12115. DOI:10.1093/nar/gkaa966
- Ghosh, A., Paul, K., & Chowdhury, R. (2006). Role of the histone-like nucleoid structuring protein in colonization, motility, and bile-dependent repression of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, *74*(5), 3060-3064. DOI:10.1128/IAI.74.5.3060-3064.2006
- Ghosh, D., Veeraraghavan, B., Elangovan, R., & Vivekanandan, P. (2020). Antibiotic Resistance and Epigenetics: More to It than Meets the Eye. *Antimicrob Agents Chemother*, *64*(2). DOI:10.1128/AAC.02225-19
- Giacomucci, S., Cros, C. D., Perron, X., Mathieu-Denoncourt, A., & Duperthuy, M. (2019). Flagella-dependent inhibition of biofilm formation by sub-inhibitory concentration of polymyxin B in *Vibrio cholerae*. *PLoS One*, *14*(8), e0221431. DOI:10.1371/journal.pone.0221431
- Guillier, M., & Gottesman, S. (2006). Remodelling of the *Escherichia coli* outer membrane by two small regulatory RNAs. *Mol Microbiol*, *59*(1), 231-247. DOI:10.1111/j.1365-2958.2005.04929.x
- Harris, J. B., LaRocque, R. C., Qadri, F., Ryan, E. T., & Calderwood, S. B. (2012). Cholera. *The Lancet*, *379*(9835), 2466-2476. DOI:10.1016/s0140-6736(12)60436-x

- Herrera, C. M., Crofts, A. A., Henderson, J. C., Pingali, S. C., Davies, B. W., & Trent, M. S. (2014). The *Vibrio cholerae* VprA-VprB two-component system controls virulence through endotoxin modification. *mBio*, 5(6). DOI:10.1128/mBio.02283-14
- Hoffmann, A. A., & Hercus, M. J. (2000). Environmental Stress as an Evolutionary Force. *BioScience*, 50(3). DOI:10.1641/0006-3568(2000)050[0217:Esaaef]2.3.Co;2
- Huang, L., Tsui, P., & Freundlich, M. (1990). Integration host factor is a negative effector of in vivo and in vitro expression of ompC in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 172(9), 5293-5298. DOI:10.1128/jb.172.9.5293-5298.1990
- Hung, W. C., Jane, W. N., & Wong, H. C. (2013). Association of a D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase gene with the formation of aberrantly shaped cells during the induction of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl Environ Microbiol*, 79(23), 7305-7312. DOI:10.1128/AEM.01723-13
- Josenhans, C., & Suerbaum, S. (2002). The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol*, 291(8), 605-614. DOI:10.1078/1438-4221-00173
- Justin, T., Connor A., O., Joon Ho, P., Anand V., S., Patrick V. Phaneuf, Laurance, Y., . . . Bernhard O., P. (2019). Experimental evolution reveals the genetic basis and systems biology of superoxide stress tolerance. DOI:10.1101/749887
- Kakkanat, A., Phan, M. D., Lo, A. W., Beatson, S. A., & Schembri, M. A. (2017). Novel genes associated with enhanced motility of *Escherichia coli* ST131. *PLoS One*, 12(5), e0176290. DOI:10.1371/journal.pone.0176290
- Kearns, D. B. (2010). A field guide to bacterial swarming motility. *Nat Rev Microbiol*, 8(9), 634-644. DOI:10.1038/nrmicro2405
- Klose, K. E., & Mekalanos, J. J. (1998). Differential regulation of multiple flagellins in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 180(2), 303-316. DOI:10.1128/JB.180.2.303-316.1998
- Kojima, S., Yamamoto, K., Kawagishi, I., & Homma, M. (1999). The polar flagellar motor of *Vibrio cholerae* is driven by an Na<sup>+</sup> motive force. *J Bacteriol*, 181(6), 1927-1930. DOI:10.1128/JB.181.6.1927-1930.1999
- Kolmogorov, M., Yuan, J., Lin, Y., & Pevzner, P. A. (2019). Assembly of long, error-prone reads using repeat graphs. *Nat Biotechnol*, 37(5), 540-546. DOI:10.1038/s41587-019-0072-8

- Kranz, R. G., Richard-Fogal, C., Taylor, J. S., & Frawley, E. R. (2009). Cytochrome c biogenesis: mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control. *Microbiol Mol Biol Rev*, 73(3), 510-528, Table of Contents. DOI:10.1128/MMBR.00001-09
- Kusumoto, A., Shinohara, A., Terashima, H., Kojima, S., Yakushi, T., & Homma, M. (2008). Collaboration of FlhF and FlhG to regulate polar-flagella number and localization in *Vibrio alginolyticus*. *Microbiology (Reading)*, 154(Pt 5), 1390-1399. DOI:10.1099/mic.0.2007/012641-0
- Lee, E. C., Hales, L. M., Gumport, R. I., & Gardner, J. F. (1992). The isolation and characterization of mutants of the integration host factor (IHF) of *Escherichia coli* with altered, expanded DNA-binding specificities. *The EMBO Journal*, 11(1), 305-313. DOI:10.1002/j.1460-2075.1992.tb05053.x
- Li, H. (2013). Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM. *arXiv*. Retrieved from <https://arxiv.org/abs/1303.3997>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., . . . Genome Project Data Processing, S. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078-2079. DOI:10.1093/bioinformatics/btp352
- Magariyama, Y., Sugiyama, S., Muramoto, K., Maekawa, Y., Kawagishi, I., Imae, Y., & Kudo, S. (1994). Very fast flagellar rotation. *Nature*, 371(6500), 752. DOI:10.1038/371752b0
- Malinverni, J. C., & Silhavy, T. J. (2009). An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the gram-negative outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(19), 8009-8014. DOI:10.1073/pnas.0903229106
- Mangan, M. W., Lucchini, S., Danino, V., Croinin, T. O., Hinton, J. C., & Dorman, C. J. (2006). The integration host factor (IHF) integrates stationary-phase and virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*, 59(6), 1831-1847. DOI:10.1111/j.1365-2958.2006.05062.x
- McDonald, M. J. (2019). Microbial Experimental Evolution - a proving ground for evolutionary theory and a tool for discovery. *EMBO Rep*, 20(8), e46992. DOI:10.15252/embr.201846992



- McLeod, S. M., Burrus, V., & Waldor, M. K. (2006). Requirement for *Vibrio cholerae* integration host factor in conjugative DNA transfer. *J Bacteriol*, *188*(16), 5704-5711. DOI:10.1128/JB.00564-06
- Morris, J. G. (2011). Infections due to non-O1/O139 *Vibrio cholerae*. UpToDate.
- Munguia, J., LaRock, D. L., Tsunemoto, H., Olson, J., Cornax, I., Pogliano, J., & Nizet, V. (2017). The Mla pathway is critical for *Pseudomonas aeruginosa* resistance to outer membrane permeabilization and host innate immune clearance. *J Mol Med (Berl)*, *95*(10), 1127-1136. DOI:10.1007/s00109-017-1579-4
- Nakamura, S., & Minamino, T. (2019). Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules*, *9*(7). DOI:10.3390/biom9070279
- Nelson, D. E., & Young, K. D. (2001). Contributions of PBP 5 and DD-carboxypeptidase penicillin binding proteins to maintenance of cell shape in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *183*(10), 3055-3064. DOI:10.1128/JB.183.10.3055-3064.2001
- Nielsen, H., Tsigos, K. D., Brunak, S., & von Heijne, G. (2019). A Brief History of Protein Sorting Prediction. *Protein J*, *38*(3), 200-216. DOI:10.1007/s10930-019-09838-3
- O'Shea, Y. A., Reen, F. J., Quirke, A. M., & Boyd, E. F. (2004). Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. *J Clin Microbiol*, *42*(10), 4657-4671. DOI:10.1128/JCM.42.10.4657-4671.2004
- Prieto, A. I., Kahramanoglou, C., Ali, R. M., Fraser, G. M., Seshasayee, A. S., & Luscombe, N. M. (2012). Genomic analysis of DNA binding and gene regulation by homologous nucleoid-associated proteins IHF and HU in *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res*, *40*(8), 3524-3537. DOI:10.1093/nar/gkr1236
- ProtCompB - Prediction subcellular protein localization. Retrieved from <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=pcompb&group=programs&subgroup=proloc>
- Prouty, M. G., Correa, N. E., & Klose, K. E. (2001). The novel sigma54- and sigma28-dependent flagellar gene transcription hierarchy of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, *39*(6), 1595-1609. DOI:10.1046/j.1365-2958.2001.02348.x

- Ramani, N., Huang, L., & Freundlich, M. (1992). In vitro interactions of integration host factor with the ompF promoter-regulatory region of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, 231(2), 248-255. DOI:10.1007/BF00279798
- Reverchon, S., Meyer, S., Forquet, R., Hommais, F., Muskhelishvili, G., & Nasser, W. (2021). The nucleoid-associated protein IHF acts as a 'transcriptional domainin' protein coordinating the bacterial virulence traits with global transcription. *Nucleic Acids Res*, 49(2), 776-790. DOI:10.1093/nar/gkaa1227
- Rice, P., Longden, I., & Bleasby, A. (2000). EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends in Genetics*, 16(6), 276-277. DOI:10.1016/s0168-9525(00)02024-2
- Roier, S., Zingl, F. G., Cakar, F., Durakovic, S., Kohl, P., Eichmann, T. O., . . . Schild, S. (2016). A novel mechanism for the biogenesis of outer membrane vesicles in Gram-negative bacteria. *Nat Commun*, 7, 10515. DOI:10.1038/ncomms10515
- Schwechheimer, C., Rodriguez, D. L., & Kuehn, M. J. (2015). NlpI-mediated modulation of outer membrane vesicle production through peptidoglycan dynamics in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen*, 4(3), 375-389. DOI:10.1002/mbo3.244
- Seemann, T. (2014). Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*, 30(14), 2068-2069. DOI:10.1093/bioinformatics/btu153
- Snippy: fast bacterial variant calling from NGS reads. (2015). [Mobile application software]. Retrieved from <https://github.com/tseemann/snippy>
- Sullivan, M. J., Petty, N. K., & Beatson, S. A. (2011). Easyfig: a genome comparison visualizer. *Bioinformatics*, 27(7), 1009-1010. DOI:10.1093/bioinformatics/btr039
- Thony-Meyer, L. (1997). Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(3), 337-376. DOI:1092-2172/97/\$04.00?0
- Trimble, M. J., Mlynarcik, P., Kolar, M., & Hancock, R. E. (2016). Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(10). DOI:10.1101/cshperspect.a025288
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A., & Vollmer, W. (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol*, 10(2), 123-136. DOI:10.1038/nrmicro2677

- V. Solovyev, & Salamov, A. (2011). Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. . In *Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine, and environmental studies* (pp. 61-78). Retrieved from <http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>; <https://public.ebookcentral.proquest.com/choice/publicfullrecord.aspx?p=3020875>
- Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., . . . Earl, A. M. (2014). Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement. *PLoS One*, *9*(11), e112963. DOI:10.1371/journal.pone.0112963
- Wang, H., Ayala, J. C., Benitez, J. A., & Silva, A. J. (2012). Interaction of the histone-like nucleoid structuring protein and the general stress response regulator RpoS at *Vibrio cholerae* promoters that regulate motility and hemagglutinin/protease expression. *J Bacteriol*, *194*(5), 1205-1215. DOI:10.1128/JB.05900-11
- Wang, M. X., & Church, G. M. (1992). A whole genome approach to in vivo DNA-protein interactions in *E. coli*. *Nature*, *360*(6404), 606-610. DOI:10.1038/360606a0
- Yang, H., Lu, X., Hu, J., Chen, Y., Shen, W., & Liu, L. (2018). Boosting Secretion of Extracellular Protein by *Escherichia coli* via Cell Wall Perturbation. *Appl Environ Microbiol*, *84*(20). DOI:10.1128/AEM.01382-18

### 3.7 Figures

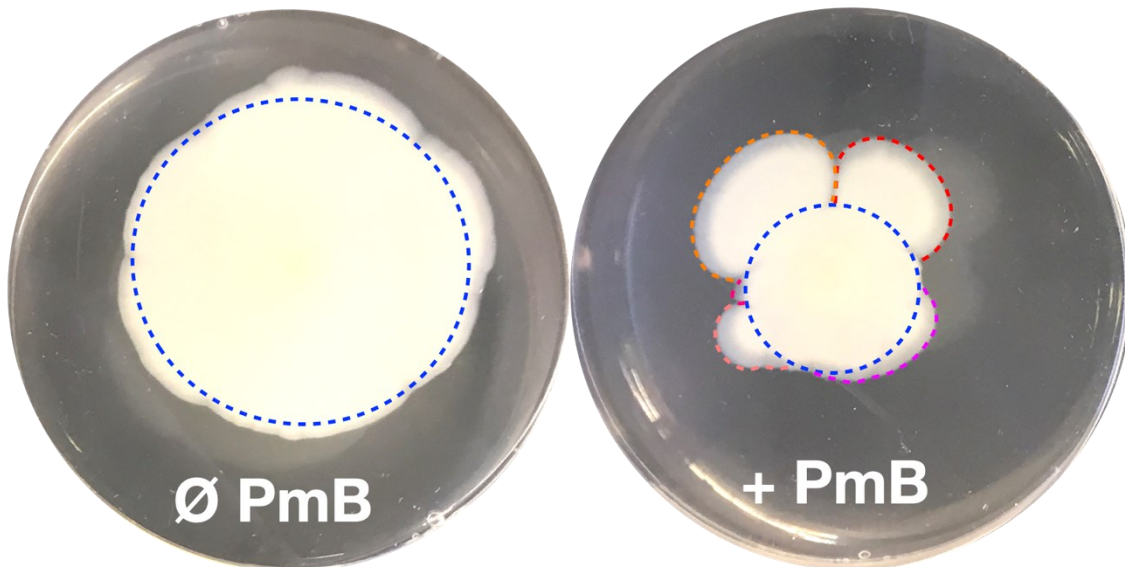


Figure 3.1. A flower-like pattern often appears in *Vibrio cholerae* motility test in presence of polymyxin B.

Motility test on 0.3% soft agar in absence (Ø) or in presence (+) of 25 µg/mL polymyxin B (PmB). In the presence of PmB, motility pattern of *V. cholerae* is not symmetrical as we could expect (blue dotted circles) but show protrusions (red, orange, violet, salmon and pink curved lines). In absence of PmB, the motility pattern is much less heterogenous than in the presence of PmB. These “petals” suggest a spontaneous emergence of mutants more motile.

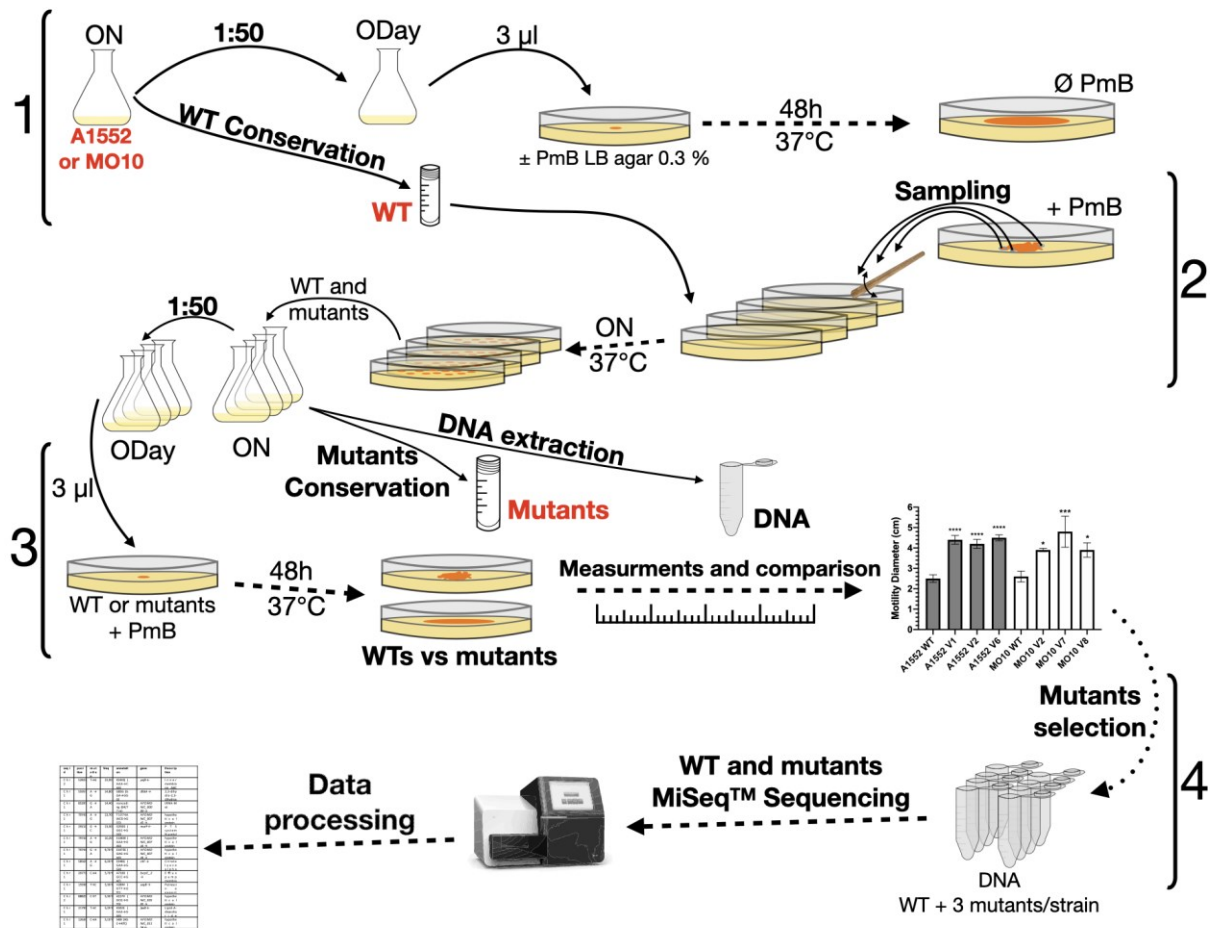


Figure 3.2. Directed evolution experimental design.

In step 1, *V. cholerae* A1552 and MO10 strains were grown overnight, cells were conserved at this point as WT control and overday were started with 1:50 overnight culture. Then, 3 µl of both strains were spotted in technical triplicates on motility plates containing ± 25 µg/ml polymyxin B and incubated 48h at 37°C. In the second step, 4 samples were taken from the edge of different “petals” or protuberances of flower-like pattern of the different strains replicates then streaked on Petri dish. A colony from the different WT and putative mutant’s samples were grown overnight. Overnight cultures were diluted 1:50 to a fresh medium overday. A fraction of the mutants cultures were conserved at -80 °C. In the third step, the motility of the WT and selected variants were tested on plates containing PmB and grown at 37 °C for 48h. Motility diameters of the variants were measured and compared to their respective WT mother strains. In the last step, selected fast motility mutants and WT genomic DNA were sequenced using MiSeq™ technology. Data sequences were processed and analyzed. See material and methods for more information.

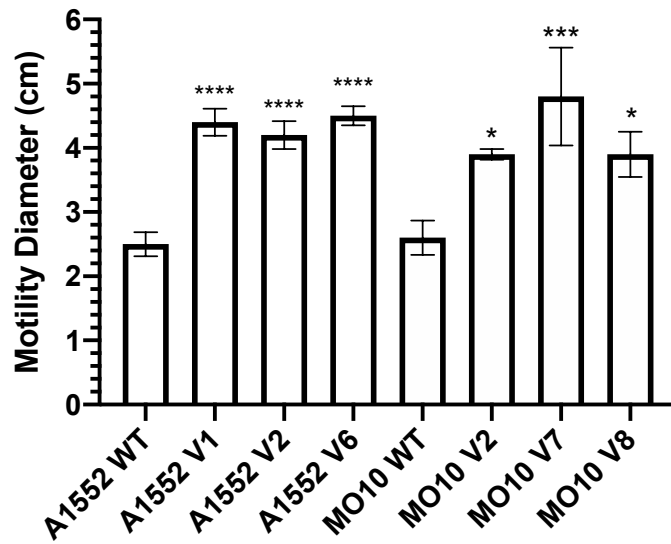


Figure 3.3. Selected samples from petals of A1552 and MO10 flower-like patterns present an increased motility.

Swimming motility assay of A1552 and MO10 WT and corresponding variants. Exponential phase of growth aliquots of each strain was spotted in the center of a Petri dish containing LB agar 0.3% supplemented with 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of PmB. Motility diameters  $\pm$  SD was measured after 48h incubation at 37°C. Statistical significance between the variants motility diameter to their respective WT stains were tested by Dunnett one-way ANOVA on biological triplicates for each strain. (\* P<0.05) ; (\*\* P<0.01) ; (\*\*\*) P<0.001) ; (\*\*\*\* P<0,0001).

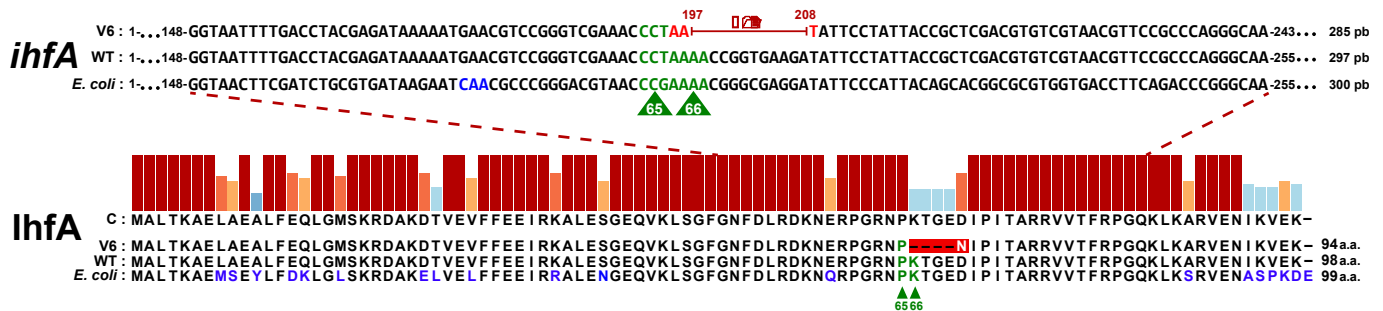


Figure 3.4. Loss of 12 nucleotides in *V. cholerae* A1552-V6 suggests a loss of an amino acid essential for IhfA function.

Translated protein sequence alignment between *V. cholerae* A1552-V6 and WT strains and *E. coli* MG1655 strain. Sequence of *ihfA* gene (Kakkanat, Phan, Lo, Beatson, & Schembri, 2017) from *V. cholerae* A1552-V6 (V6) and *E. coli* MG1655 (*E. coli*) were translated and aligned to *V. cholerae* A1552 (WT) using MUSCLE (Edgar, 2004) on Snappgene®. *V. cholerae* A1552 WT strain and *E. coli* IhfA protein sequence share 81% identity. The 2 amino acids P65 and K66 amino acids, essentials for IhfA function in *E. coli* (Lee, Hales, Gumport, & Gardner, 1992), are also present in *Vibrio cholerae* A1552 WT strain. Modification in *ihfA* gene sequence leading to amino acid modifications in IhfA protein sequences are shown in blue. A1552-V6 variant had lost 12 nucleotides (197 to 208) in *ihfA* which induces 66 lysin replacement by asparagine (white letter) and loss of 4 amino acids.

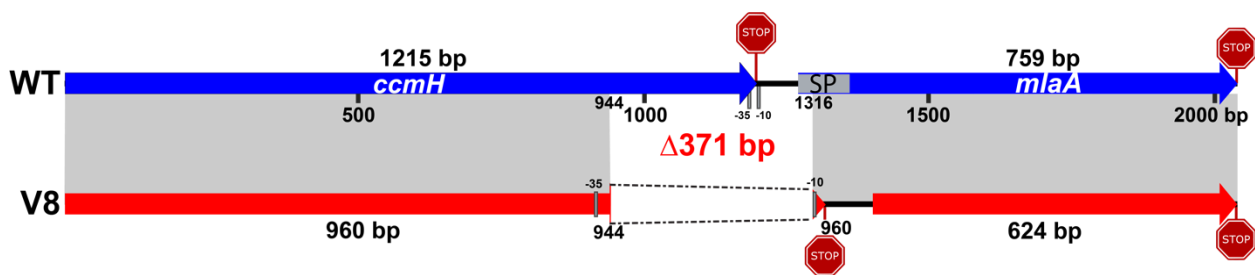


Figure 3.5. MO10-V8 has a deletion of 371 bp between *ccmH*-1 and *vacJ* (*mlaA*) locus that probably cause a loss of function of CcmH and an absence of translation of *vacJ*.

Schematic representation of *ccmH*-1 (*VchoM\_01282*) and *vacJ* (*mlaA*, *VchoM\_01281*) locus alignment (in gray) between *V. cholerae* MO10 WT (blue) and MO10 V8 (red). The 371 bp deletion in V8 leads to the loss of ~20% of *ccmH* 3'-end, including *ccmH* stop codon, and a frameshift leading to the emergence of a new stop codon in the *vacJ*'s 5'-ORF region. The *vacJ* gene has also lost an important feature, like its -35 and -10 promoter regions and the first 30 coding nucleotides

in outer membrane signal peptide (SP) sequence (nucleotides 1-51, codon 1-17). In V8 mutant, MlaA first AUG codon is compromised, the new predicted ORF starts 123 nucleotides (41 codons) forward. We detected new putative -35 and -10 promoter regions for *vacJ* in V8 but the signal peptide has been deleted. Figure were edited from Easyfig graphical sequence alignment (Sullivan et al., 2011). The signal peptide was confirmed with protcompB (V9.0) ("ProtCompB - Prediction subcellular protein localization,") and SignalP 5.0 (Nielsen et al., 2019). Putative -35 and -10 box for *vacJ* \* at 923 and 944 using BPPROM service from Softberry (V. Solovyev & Salamov, 2011), see **Supplementary Figure 3.10**.

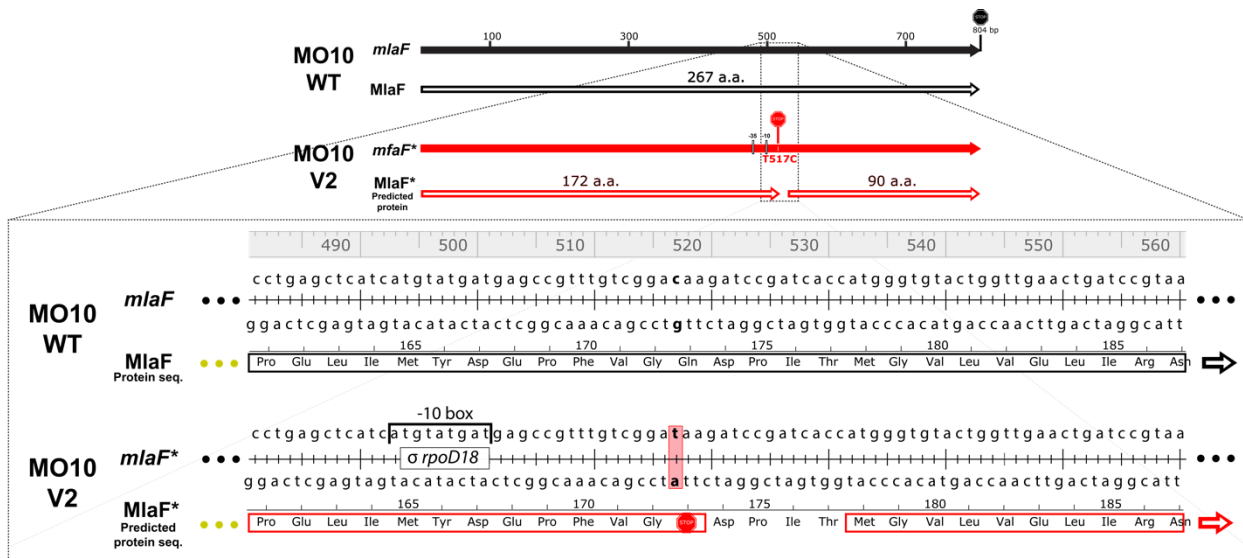


Figure 3.6. Non-sens mutation in *mlaF* results in the loss of 26% of the original product.

MiSeq sequencing result alignment of MO10 WT *mlaF* gene and MlaF protein sequence and MO10-V2 (V2) corresponding mutated gene (*mlaF\**) and predicted protein sequence (MlaF\*). Transversion of 517 thymine to cytosine in MO10-V2 resulted in a premature stop codon (codon 173). Compared to the WT MO10-V2 MlaF\* has lost 95 amino acids (a. a.) corresponding to the ~36% C-terminal end. A new ORF of 90 codons is created in the same reading frame, and a new promoter is predicted. Alignment was performed using MUSCLE (Edgar, 2004) on Snappgene® and promoters and were predicted using BPPROM software see **Supplementary Figure 3.11** (V. Solovyev & Salamov, 2011).



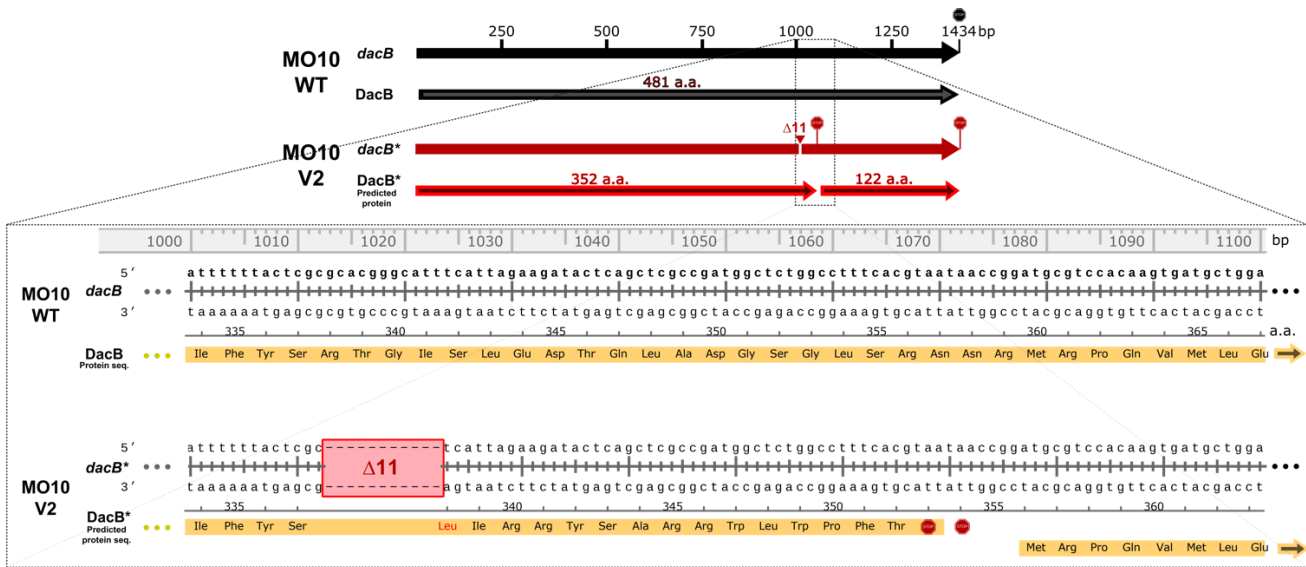


Figure 3.7 : Deletion of 11 nucleotides in *dacB* in MO10-V2.

MiSeq sequencing result alignment of MO10 WT *dacB* gene and DacB protein sequence and MO10-V2 (V2) corresponding mutated gene (*dacB\**) and predicted protein sequence (*DacB\**). MO10-V2 had lost 11 nucleotides (1013 to 1023) resulting in a frame shift, causing modification of 16 amino acids, emergence of two early stop codons (STOP signs) and a new ORF starting at codon 360 of WT sequence. Alignment was performed using MUSCLE (Edgar, 2004) on Snapgene®. Promoters were predicted using BPRM software see **Supplementary Figure 3.12** (V. Solovyev & Salamov, 2011).

### 3.8 Supplementary Tables and Figures

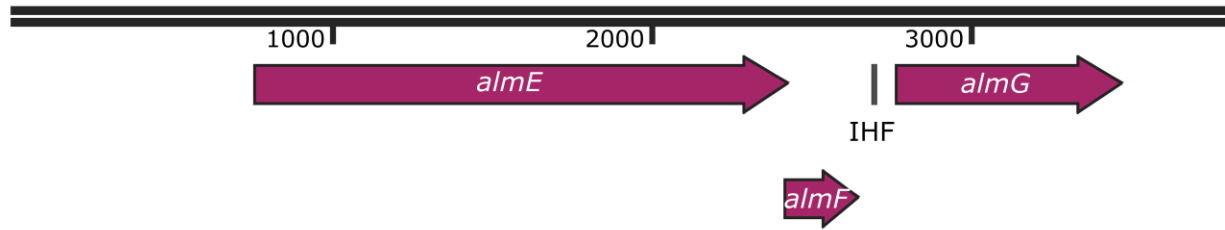


Figure 3.8. Putative IHF binding site in the upstream locus of *almG* open reading frame

BPRON prediction for transcription factors in *almEFG* locus detected a putative IHF transcription factor binding site just upstream of *almG* open reading frame. See **Supplementary Figure 3.9**. (V. Solovyev & Salamov, 2011)

Tableau 3.1. Mutation accumulated in A1552 V1

| Chromosome | Position        | Mutation | Frequency | Annotation           | Gene name or locus <sup>a</sup> | Description  |
|------------|-----------------|----------|-----------|----------------------|---------------------------------|--|
| Chr 2      | 528<br>239      | T→G      | 22,0<br>% | K244Q (AAA<br>→CAA)  | <i>yejB</i> ←                   | Inner membrane ABC transporter permease protein YejB     |
| Chr 1      | 559<br>574      | A→G      | 14,8<br>% | G83G (GGA<br>→GGG)   | <i>dhbA</i> →                   | 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase          |
| Chr 1      | 853<br>97       | G→A      | 14,4<br>% | noncoding (64/77 nt) | <i>J9265_0043</i><br>0 →        | tRNA-Met   |
| Chr 1      | 797<br>412      | A→G      | 13,7<br>% | T1074A (AC<br>G→GCG) | <i>J9265_0369</i><br>0 →        | hypothetical protein                                     |
| Chr 1      | 292<br>101<br>0 | G→C      | 13,3<br>% | G292G (GG<br>C→GGG)  | <i>murP</i> ←                   | PTS system N-acetylmuramic acid-specific EIIBC component |
| Chr 1      | 797<br>441      | A→G      | 10,2<br>% | E1083E (GA<br>A→GAG) | <i>J9265_0369</i><br>0 →        | hypothetical protein                                     |
| Chr 1      | 797<br>417      | G→A      | 9,7<br>%  | E1075E (GA<br>G→GAA) | <i>J9265_0369</i><br>0 →        | hypothetical protein                                     |
| Chr 1      | 585<br>650      | A→G      | 6,2<br>%  | E348G (GAA<br>→GGA)  | <i>citF</i> →                   | Citrate lyase alpha chain                                |
| Chr 1      | 297<br>719<br>6 | C→A      | 5,7<br>%  | A710D (GCC<br>→GAC)  | <i>bepE_2</i> →                 | Efflux pump membrane transporter BepE                    |
| Chr 1      | 159<br>365<br>4 | T→C      | 5,3<br>%  | V289V (GTT<br>→GTC)  | <i>sapB</i> →                   | Putrescine export system permease protein SapB           |
| Chr 2      | 888<br>250      | C→T      | 5,3<br>%  | A157V (GCG<br>→GTG)  | <i>J9265_1810</i><br>5 →        | hypothetical protein                                     |
| Chr 1      | 217<br>950<br>1 | T→C      | 5,2<br>%  | K302E (AAA<br>→GAA)  | <i>lpxB</i> ←                   | Lipid-A-disaccharide synthase                            |
| Chr 1      | 126<br>303<br>1 | C→A      | 5,1<br>%  | S48I (AGC→<br>ATC)   | <i>ccoS</i> ←                   | cbb3-type cytochrome oxidase assembly protein CcoS       |

a : Gene or locus name corresponding to *Vibrio cholerae* A1552 chromosome 1 CP072847.1 or chromosome 2 : CP072848.1.

Tableau 3.2. Mutation accumulated in A1552 V2

| Chromosome | Position    | Mutation | Frequency | Annotation               | Gene name or locus <sup>a</sup>                        | Description  |
|------------|-------------|----------|-----------|--------------------------|--|--|
| Chr 1      | 8538<br>5   | C→T      | 15,6%     | noncoding (5<br>2/77 nt) | <i>J9265_00430</i> →                                   | tRNA-Met   |
| Chr 1      | 2286<br>86  | C→A      | 12,6%     | M292I (ATG<br>→ATT)      | <i>metK</i> ←  | S-adenosylmet<br>hionine<br>synthase                           |
| Chr 1      | 3108<br>64  | C→T      | 12,6%     | intergenic (+1<br>3/-44) | <i>J9265_01575</i> → / → <i>J</i><br><i>9265_01580</i> | tRNA-Arg/tRN<br>A-Arg  |
| Chr 1      | 1207<br>946 | G→T      | 9,1%      | G164V (GGC<br>→GTC)      | <i>dnaK_2</i> →  | Chaperone<br>protein DnaK                                      |
| Chr 1      | 9369<br>10  | T→C      | 8,5%      | Y247Y (TAT→<br>TAC)      | <i>hisF</i> →  | Imidazole<br>glycerol<br>phosphate<br>synthase<br>subunit HisF |
| Chr 1      | 1731<br>673 | T→C      | 7,6%      | K109K (AAA→<br>AAG)      | <i>J9265_07800</i> ←                                   | hypothetical<br>protein  |
| Chr 1      | 2668<br>056 | Δ1 bp    | 6,6%      | coding (642/2<br>322 nt) | <i>yhgF</i> →  | Protein YhgF   |
| Chr 1      | 2729<br>296 | A→G      | 6,6%      | M314T (ATG<br>→ACG)      | <i>ftsY_2</i> ←  | Signal<br>recognition<br>particle<br>receptor FtsY             |

|       |             |       |       |                          |                      |  |
|-------|-------------|-------|-------|--------------------------|----------------------|--|
| Chr 1 | 2602<br>710 | G→T   | 6,5%  | Q2K (CAA→A<br>AA)        | <i>yibN</i> ←        | putative<br>protein YibN                         |
| Chr 1 | 2668<br>058 | Δ1 bp | 6,5%  | coding (644/2<br>322 nt) | <i>yhgF</i> →        | Protein YhgF                                     |
| Chr 1 | 1349<br>691 | G→T   | 6,4%  | A510D (GCT<br>→GAT)      | <i>J9265_06075</i> ← | hypothetical<br>protein                          |
| Chr 1 | 4008<br>89  | G→T   | 6,2%  | P50P (CCC→C<br>CA)       | <i>mepM_2</i> ←      | Murein<br>DD-endopepti<br>dase MepM              |
| Chr 1 | 2337<br>536 | C→A   | 6,0%  | D26Y (GAC→<br>TAC)       | <i>mutT</i> ←        | 8-oxo-dGTP<br>diphosphatase                      |
| Chr 1 | 2473<br>170 | C→A   | 0,058 | E201* (GAG<br>→TAG)      | <i>rapA</i> ←        | RNA<br>polymerase-as<br>sociated<br>protein RapA |
| Chr 1 | 9564<br>5   | G→C   | 5,5%  | G51A (GGT→<br>GCT)       | <i>hflC</i> →        | Modulator of<br>FtsH protease<br>HflC            |
| Chr 2 | 5813<br>86  | T→C   | 5,3%  | K534E (AAG→<br>GAG)      | <i>J9265_16790</i> ← | hypothetical<br>protein                          |
| Chr 2 | 6643<br>26  | G→T   | 5,3%  | L655F (TTG→<br>TTT)      | <i>yccS</i> →        | Inner<br>membrane<br>protein YccS                |
| Chr 1 | 4865<br>53  | G→A   | 5,2%  | R95C (CGC→T<br>GC)       | <i>bamD</i> ←        | Outer<br>membrane<br>protein                     |

|       |             |     |      |                |               |                           |
|-------|-------------|-----|------|----------------|---------------|---------------------------|
|       |             |     |      |                |               | assembly factor BamD      |
| Chr 1 | 2639<br>649 | C→A | 5,1% | P86H (CCT→CAT) | <i>sodA</i> → | Superoxide dismutase [Mn] |

a : Gene or locus name corresponding to *Vibrio cholerae* A1552 chromosome 1 CP072847.1 or chromosome 2 : CP072848.1.

Tableau 3.3. Mutation accumulated in A1552 V6

| Chromosome | Position    | Mutation | Frequency | Annotation              | Gene name or locus <sup>a</sup> | Description   |
|------------|-------------|----------|-----------|-------------------------|---------------------------------|---|
| Chr 1      | 10296<br>17 | Δ12 bp   | 100,0%    | coding (187-198/297 nt) | <i>ihfA</i> →                   | Integration host factor subunit alpha                 |
| Chr 2      | 10482<br>34 | G→T      | 12,3%     | A463E (GCA→GAA)         | <i>J9265_1881</i><br>5 ←        | hypothetical protein                                  |
| Chr 1      | 14585<br>43 | T→A      | 12,0%     | D84E (GAT→GAA)          | <i>macB_2</i> →                 | Macrolide export ATP-binding/permease protein<br>MacB |
| Chr 1      | 20916<br>93 | A→T      | 6,3%      | N74I (AAT→ATT)          | <i>wrbA</i> →                   | NAD(P)H dehydrogenase (quinone)                       |
| Chr 1      | 11703<br>44 | A→C      | 6,0%      | L1318F (TTA→TTC)        | <i>rscC_4</i> →                 | Sensor histidine kinase RscC                          |

|       |             |     |      |                     |                          |   |
|-------|-------------|-----|------|---------------------|--------------------------|---|
| Chr 1 | 79710<br>8  | C→A | 5,9% | P972P (CCC→CCA<br>) | <i>J9265_0369</i><br>0 → | hypothetical<br>protein                                       |
| Chr 1 | 909         | C→T | 5,5% | V280V (GTC→GTT<br>) | <i>dnaA</i> →            | Chromosomal<br>replication<br>initiator protein<br>DnaA       |
| Chr 1 | 12545<br>70 | T→C | 5,5% | N52S (AAC→AGC)      | <i>ydcV</i> ←            | Inner membrane<br>ABC transporter<br>permease<br>protein YdcV |
| Chr 1 | 19343<br>32 | G→A | 5,3% | W59* (TGG→TGA<br>)  | <i>J9265_0869</i><br>0 → | hypothetical<br>protein                                       |
| Chr 1 | 14530<br>32 | A→G | 5,2% | L82P (CTC→CCC)      | <i>syrM1</i> ←           | HTH-type<br>transcriptional<br>regulator SyrM 1               |
| Chr 2 | 75022<br>7  | C→A | 5,2% | H359N (CAT→AAT<br>) | <i>rnb</i> →             | Exoribonuclease<br>2  |

a : Gene or locus name corresponding to *Vibrio cholerae* A1552 chromosome 1 CP072847.1 or chromosome 2 : CP072848.1.

Tableau 3.4. Mutation accumulated in MO10 V2

| Chromosome | Position   | Mutation | Frequency | Annotation      | Gene name or locus | Description                                       |
|------------|------------|----------|-----------|-----------------|--------------------|---|
| Chr 1      | 3759<br>72 | C→T      | 100%      | Q173* (CAA→TAA) | <i>m1aF</i> →      | Intermembrane<br>phospholipid<br>transport system |

|       |             |            |       |                                |                 |   |
|-------|-------------|------------|-------|--------------------------------|-----------------|---|
|       |             |            |       |                                |                 | ATP-binding protein MlaF                          |
| Chr 1 | 2467<br>074 | Δ11 b<br>p | 100%  | coding (1013-1023/<br>1446 nt) | <i>dacB</i> →   | D-alanyl-D-alanine<br>carboxypeptidase<br>DacB    |
| Chr 1 | 1774<br>887 | T→G        | 22,7% | L57* (TTA→TGA)                 | <i>hutI</i> →   | Imidazolonepropi<br>onase                         |
| Chr 2 | 6349<br>38  | G→T        | 6,5%  | L176L (CTC→CTA)                | <i>fbpC</i> ←   | Fe(3+) ions import<br>ATP-binding<br>protein FbpC |
| Chr 1 | 7832<br>79  | C→A        | 6,0%  | A363D (GCT→GAT)                | <i>flaD_2</i> → | Flagellin D                                       |
| Chr 1 | 2999<br>226 | G→T        | 6,0%  | Q48K (CAA→AAA)                 | <i>ilvC</i> ←   | Ketol-acid<br>reductoisomerase<br>(NADP(+))       |
| Chr 1 | 2285<br>167 | C→T        | 5,9%  | R238* (CGA→TGA)                | <i>rdgC</i> →   | Recombination-as<br>sociated protein<br>RdgC      |
| Chr 2 | 1031<br>122 | C→G        | 5,8%  | W399C (TGG→TGC)                | <i>menE_2</i> ← | 2-succinylbenzoat<br>e—CoA ligase                 |
| Chr 1 | 5645<br>52  | C→A        | 5,6%  | L341I (CTT→ATT)                | <i>thrC</i> →   | Threonine<br>synthase                             |
| Chr 2 | 5699<br>37  | G→T        | 5,5%  | S17* (TCG→TAG)                 | <i>sdaA_2</i> ← | L-serine<br>dehydratase 1                         |



|       |             |     |       |                 |                          |   |
|-------|-------------|-----|-------|-----------------|--------------------------|---|
| Chr 1 | 1245<br>901 | G→T | 5,4%  | A80E (GCG→GAG)  | <i>ynjF</i> ←            | Inner membrane protein YnjF               |
| Chr 1 | 2273<br>204 | G→T | 0,052 | R107R (CGC→CGA) | <i>pstB</i> ←            | Phosphate import ATP-binding protein PstB |
| Chr 1 | 2454<br>795 | C→A | 5,2%  | E221* (GAG→TAG) | <i>infB</i> ←            | Translation initiation factor IF-2        |
| Chr 1 | 2627<br>880 | G→T | 5,2%  | L137L (CTC→CTA) | <i>argP_1</i> ←          | HTH-type transcriptional regulator ArgP   |
| Chr 2 | 6957<br>23  | G→T | 5,2%  | W113C (TGG→TGT) | <i>KAF59_172</i><br>25 → | hypothetical protein                      |
| Chr 1 | 1178<br>677 | G→T | 5,0%  | M51I (ATG→ATT)  | <i>glgC_1</i> →          | Glucose-1-phosphate adenylyltransferase   |

a : Gene or genome locus corresponding to *Vibrio cholerae* MO10 chromosome 1 : CP072849.1 or chromosome 2 : CP072850.1.

Tableau 3.5. Mutation accumulated in MO10 V8

| Chromosome | Position   | Mutation | Frequency | Annotation | Gene name or locus <sup>a</sup> | Description   |
|------------|------------|----------|-----------|------------|---------------------------------|---|
| Chr 1      | 87587<br>1 | Δ371 bp  | 100%      |            | <i>ccmH-mlaA</i>                | Cytochrome c-type biogenesis protein CcmH — Intermembrane |

|       |             |     |       |                     |                          |  |
|-------|-------------|-----|-------|---------------------|--------------------------|--|
|       |             |     |       |                     |                          | phospholipid<br>transport system<br>lipoprotein MlaA           |
| Chr 2 | 64443<br>7  | A→G | 20,8% | A64A (GCT→G<br>CC)  | <i>KAF59_1697</i><br>5 ← | hypothetical<br>protein  |
| Chr 1 | 24482<br>39 | G→T | 16,1% | Q22K (CAG→A<br>AG)  | <i>nlpI</i> ←            | Lipoprotein NlpI   |
| Chr 1 | 18314<br>5  | G→T | 6,2%  | E45* (GAG→T<br>AG)  | <i>epsL</i> →            | Type II secretion<br>system protein L                          |
| Chr 1 | 83805<br>8  | G→T | 6,2%  | E296* (GAG→T<br>AG) | <i>sucC</i> →            | Succinate—CoA<br>ligase<br>[ADP-forming]<br>subunit beta       |
| Chr 1 | 18488<br>06 | T→C | 6,2%  | T221A (ACT→G<br>CT) | <i>hisF</i> ←            | Imidazole<br>glycerol<br>phosphate<br>synthase subunit<br>HisF |
| Chr 1 | 13224<br>24 | A→G | 6,1%  | F52L (TTC→CT<br>C)  | <i>KAF59_0608</i><br>5 ← | hypothetical<br>protein  |
| Chr 1 | 25394<br>88 | G→T | 5,5%  | E90* (GAG→T<br>AG)  | <i>yhcB</i> →            | Inner membrane<br>protein YhcB                                 |
| Chr 1 | 18856<br>82 | C→A | 5,2%  | A28S (GCC→TC<br>C)  | <i>KAF59_0856</i><br>0 ← | hypothetical<br>protein  |

a : Gene or genome locus corresponding to *Vibrio cholerae* MO10 chromosome 1 : CP072849.1 or chromosome 2 : CP072850.1.

```

>almEFG
Length of sequence-      3791
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      9
Promoter Pos:  2708 LDF-  4.60
-10 box at pos.  2693 gtttatttt Score  49
-35 box at pos.  2674 ttaaaa Score  37
Promoter Pos:  1534 LDF-  3.64
-10 box at pos.  1519 tgatatttt Score  48
-35 box at pos.  1496 ttgact Score  61
Promoter Pos:  825 LDF-  3.16
-10 box at pos.  806 gggtatggt Score  50
-35 box at pos.  791 ttgtta Score  45
Promoter Pos:  3288 LDF-  2.23
-10 box at pos.  3273 gcataaaact Score  48
-35 box at pos.  3250 tcggca Score  1
Promoter Pos:  412 LDF-  2.21
-10 box at pos.  397 acctaaagt Score  38
-35 box at pos.  376 ttatca Score  30
Promoter Pos:  2060 LDF-  2.13
-10 box at pos.  2045 tggtatcgt Score  52
-35 box at pos.  2023 tttcca Score  42
Promoter Pos:  3607 LDF-  1.75
-10 box at pos.  3592 cttcataaa Score  18
-35 box at pos.  3572 ttgacc Score  44
Promoter Pos:  2406 LDF-  1.43
-10 box at pos.  2391 ctttacaac Score  28
-35 box at pos.  2371 tggcaa Score  18
Promoter Pos:  106 LDF-  0.62
-10 box at pos.  91 cggtgaatt Score  25
-35 box at pos.  71 ctgctt Score  13

Oligonucleotides from known TF binding sites:

For promoter at 2708:
  lrp: TATTTTTT at position 2664 Score - 11
  argR2: TTTATTTT at position 2694 Score - 7
  ihf: TTTTATTT at position 2698 Score - 13
For promoter at 1534:
  lrp: TATTTTTT at position 1522 Score - 11
For promoter at 825:
  rpoD19: ACAGATTT at position 785 Score - 6
  soxS: ATTTGTTA at position 789 Score - 10
  crp: TAACCAAT at position 823 Score - 6
  fnr: ATCAATAA at position 833 Score - 5
For promoter at 3288:
  fis: ACAATTAT at position 3243 Score - 8
  rpoD17: CGCCTTTT at position 3257 Score - 7
  rpoD17: TTTTCCTT at position 3263 Score - 7
For promoter at 412:
  fnr: ATCAATTT at position 378 Score - 8
  rpoD17: TACCTAAA at position 396 Score - 11
No such sites for promoter at 2060
No such sites for promoter at 3607
For promoter at 2406:
  rpoS17: CAGACATA at position 2414 Score - 10
No such sites for promoter at 106

```

Figure 3.9. BPROM predictions for transcription factor binding sequence in *almEFG* locus

*In silico* analysis of A1552 *almEFG* locus with BPROM indicated a putative IHF binding sequence see *Supplemental material and methods*. (V. Solovyev & Salamov, 2011)

```

>ccmH-vacJ MO10-V8
Length of sequence-      1661
Threshold for promoters - 0.20
Number of predicted promoters -      4
Promoter Pos:      959 LDF- 3.51
-10 box at pos.      944 TTTCACACT Score      34
-35 box at pos.      923 TTAAGG      Score      14
Promoter Pos:      1554 LDF- 1.97
-10 box at pos.      1539 CCTTACAGT Score      35
-35 box at pos.      1521 TTACAA      Score      32
Promoter Pos:      598 LDF- 1.60
-10 box at pos.      583 CTGGATAAT Score      47
-35 box at pos.      565 ATGAAG      Score      24
Promoter Pos:      268 LDF- 0.91
-10 box at pos.      253 CAGGAAAAT Score      33
-35 box at pos.      230 TTCCAA      Score      35

Oligonucleotides from known TF binding sites:

For promoter at      959:
    crp: TCACACTT at position      946 Score - 11
    carP: CACTTTTT at position      949 Score - 8
    lexA: TTTTTTTA at position      952 Score - 16
For promoter at      1554:
    phoB3: TCCTTACA at position      1538 Score - 13
No such sites for promoter at      598
No such sites for promoter at      268

```

Figure 3.10. PROM prediction for MO10-V8 *miaA*\*

In MO10-V8 mutation in *ccmH* and *miaF* resulted in apparition of a new ORF at position +624 see *Supplemental material and methods*. (V. Solovyev & Salamov, 2011)

```

> mlaF*_MO10-V2

Length of sequence-          804

Threshold for promoters -    0.20

Number of predicted promoters -      2

Promoter Pos:    108 LDF-    3.56

-10 box at pos.    93 aggtaaagt Score    58

-35 box at pos.    68 atgaca    Score    36

Promoter Pos:    508 LDF-    3.25

-10 box at pos.    493 atgtatgat Score    66

-35 box at pos.    470 ttgcac    Score    33

Oligonucleotides from known TF binding sites:

For promoter at    108:

    ihf:  CTTCGGGA at position    119 Score -    12

For promoter at    508:

    rpoD18:  TGTATGAT at position    494 Score -    7

```

Figure 3.11. BPROM prediction for MO10-V2 *mlaF\** promoters (V. Solovyev & Salamov, 2011).

In MO10-V2 mutation in *mlaF* resulted in apparition of a new ORF at position +532 see *Supplemental material and methods*.

```

>dacB* A1552-V6

Length of sequence-      1434

Threshold for promoters - 0.20

Number of predicted promoters -      3

Promoter Pos:      306 LDF- 2.44

-10 box at pos.      291 ttggatcat Score      33
-35 box at pos.      270 tttaat      Score      36

Promoter Pos:      1141 LDF- 2.19

-10 box at pos.      1126 tggtttaat Score      56
-35 box at pos.      1105 ttatca      Score      30

Promoter Pos:      728 LDF- 1.59

-10 box at pos.      713 cactaaaat Score      63
-35 box at pos.      689 tagccc      Score      2

Oligonucleotides from known TF binding sites:

For promoter at      306:

      rpoD17:  GACCCCAC at position      313 Score - 10

No such sites for promoter at      1141

No such sites for promoter at      728

```

Figure 3.12. BPROM prediction for A1552-V6 *dacB*\* promoters (V. Solovyev & Salamov, 2011)

In A1552-V6, mutation in *bacA* resulted in the apparition of a new ORF at position +1067 see *Supplemental material and methods*.

## 3.9 Supplemental Materials and methods

### 3.9.1 A1552-V6, MO10-V2 and MO10-V8 Selected Mutations

Full open reading frame sequences of *ihfA*, *dacB*, *ccmH-vacJ* and *mIaF*. Sequences starts at first nucleotide of indicated gene ORF.

> *ihfA*\* A1552-V6

```
ATGGCGCTCACAAAGGCCGAATTGGCTGAAGCCCTGTTCGAACAGCTCGGCATGAGCAAGCGGGATGC
CAAGGATACGGTTGAGGTGTTTTTTGAAGAAATTCGTAAAGCACTCGAAAGTGGCGAACAGGTAAAAC
CTCCGGTTTTGGTAATTTTTGACCTACGAGATAAAAATGAACGTCCGGGTCGAAACCCTAATATTCCTATTA
CCGCTCGACGTGTCGTAACGTTCCGCCAGGGCAAAAATTGAAAGCCCGTGTGAGAACATCAAAGTCG
AAAAATAA
```

> *dacB*\* A1552-V6

```
ATGCTTTTTTCGCTTCATACCTGTTTGGTACTCTCTATTAGCGGTTTTCTAATAGCCTCTCCGATTTACGCAC
AAACACCATTGACTGCCGCAACGACTAACTTCCTCAAGGGGCACGTTATAGCCTATTGATTGAAGATGT
CGCATTACAGCAGAACACTCTCGAACTCAATACTCATCTGTACTATCCCCCGCTAGCACCCAGAAGATTT
TGACGGCACTCGCCGCAAATTAGAACTGGGTGATAAGTTTTCGCTTTCACACTGATTTAATGCGTTCAGG
GCAAGATTGGATCATTTCGCTTTTCAGGCGACCCACCCTGACCACCGCAGATTTAACGACATTGCTCAA
GCGATGAAAGCGCAAAGTGGCGGTAGGATTGAGGGCGATTTGTGGCTGGATAATAGTGTATTTAGTGG
ATATGAGCGTGCGGTAGGCTGGCCATGGGATATTTTAGGCGTCTGCTATAGCGCCCCAGCCAGTGCCAT
CAACCTCGATGCTAACTGTATCCAGGCGTCTATTTATACCGAACCACAAGGTAAAACGCGCGTTTTATGTA
CCAGAGCACTACCCTGTGCATGTTTCAGTCGCAAGCCATCAGCGTGACACAGAGCGAACAAGAGAGTTTA
CTGTGTGACTTAGAACTGACGGCAACGCCTGAGAATCACTATACGCTGGATGGCTGTTTAGCCCTACGAG
ACAAACCCTTACCACTAAAATTTGCGGTGCAAGATACTGGGATCTACACCCAGCGAGTGGTCTATCGTCT
CCTCAGCCAGCTAAACATCGAGCTCAAAGGGAAGATAAAAAGTCGGTAAAGCAAATACCAAACAAGCGCA
GAAAATCGCTTCTCATCACTCCCAGCCGCTGCCTGTGTTACTGAAAACCATGTTGCAAGAGTCCGACAAC
CTGATCGCCGATACCTTGACCAAAGCCTTGGGACACCGTTTTTACTCTCAACCCGGTAGCTTTACCAACGG
AACACAAGCCATTAAACAGATTTTTTACTCGCTCATTAGAAGATACTCAGCTCGCCGATGGCTCTGGCCTT
TCACGTAATAACCGGATGCGTCCACAAGTGATGCTGGAAACTCTTCGCTACCTTTATCAGCACGAAGCTG
```

AGCTTGGTTTAATTGCTATGCTGCCTTCAGCGGGAGAATCGGGCACTTTGCAATATCGACGCAGTATGCG  
TGCGCCGCAAATCAGTGGCCAAATTAAGCGAAAAGTGGTTCACTTTATGGCACTTACAATATGGCGGG  
CTTTGTGATGGACGAAAATCAGCGCCCTAAGACTCTGTTTGTTC AATTCGTCACCGACTATTTCCCTCCGA  
GATCCAATCCTGAGGTAGCGGTTGAGCCGCCGATTATCCAGTTTGAAACTCAGCTCTATCAAGAGCTTAT  
TCAGTTTAATCGTTTGGCATCTAAGCCAAACTA

>*ccmH*\*-*vacJ*\* MO10-V8

ATGTGGATGTTTTGGATCTCGACCCTATTACTGGTGGCGATTGCGGTGGTTTTCGTCATCATTCCGTTTAT  
TCAAAGCGTGCGAATAACGATCAGGCTTTGCGCGATGAGCTGAATAAAGCGTTTTACAAAGACCGCTT  
GAAAGAGCTTGAAGAGGAAACCGAAGAAGGCATTGTTGCCGATCAACAAGATTTGATTGCCGACTTAAA  
ACAGACTCTGCTTGACGACATTCCAACCCAGCAAAAACATCAGCAGGAAAATCGTGTTTCACTGTGGATG  
GTTGCCCTGCCTTCAGTATTGTTGGTAGTCGGATTGAGTTATGCGCTGTACGCCAAGTTTGGTCACTATCA  
GCATGTTCCAGGCTTGGCAGCAAGTGTGAGCACAACCTGCCTGAATTGTCAAAAAAATCATGTGCCACAA  
GCGGAACTCAGTGACGAAGAGATGAATGATTTGACGTTGGCACTGCGCACTCGACTGCATTATCAGCCT  
GATGATGTTACCGTTGGTTGTTGCTGGGTCGGATTGGCCTTGCTAATCGCGATCTGGAAACCGCGATTG  
GCGCGATGAAGAAAGCTTTTGCTCTGGATAATGAAGATCCGGATGTGAAATTTGGTTACGCACAAGCTTT  
GATGCTTTCGAATGATCCTGTGACCAGCAAGAAGCGAAGTCGATTCTGCTCAAGTTAGCCCAACGTGGT  
TATGCTGATTTACGCGTCTATTCATTATTGGCGTTTGATGCTTTTTGAAAGTGGAGATTTTCCTGCTGCAAT  
CAAGTACTGGAGTTTGATGCAACAAGCGATTGGTCTGACGATGCTCGTTATGAGATGCTCAGCCGCAG  
TATTGAAAGCGCTCGTAAGAGAATGGGCGAGGGCATGGCAGAGGGTCAATCGGTGAAAGTCACCATTA  
ATCTAGGCGAGCAGGTTAAGGTTGATCCTAACGCAGTTTCACACTTTTTTTAGTTGGGTGCAGCAGTGCA  
CCTGATGACTCCTCCCCTCATTGCGAGGTGAACGATCCTCTGGAAAGTTTCAACCGGCAAATGTGGACAA  
TTAACTATGACTACCTAGACCCTTATGTGGTGGTCCGGTCTCTCTATTTTATGTCGGTTATGTACCTAAGC  
CTGTACGCAGTGGCATTGCCAACTTCTCTCTAACTTAGACGAGCCTGCCAGCATGGTGAATAACCTGCT  
GATGGGCAATGGGACAAAAGCGGTGATCACTTTAATCGTTTTTGGATTAATACCAGCTTTGGTTTACTC  
GGTTTGATTGATATCGCTTCTGAAGCAGGCATCAAAAATACGATGATAAGGCGTTCAGTGATGCGGTA  
GGCCATTACGGTGTGGGCAATGGCCCCTATTTAATGGTCCCAGGTTATGGTCCCTATACGGTACGCGAA  
GTGACCGATGTGGTGGATGGCATGTATTTCCCGCTTGCTATCTCAATATCTGGGCTGGGGTTCGGCAAAT



GGGCACTTGAAGGCATGGAAACGCGCGCTGCGTTAGTTTTGCAAGAGGCCTTATTACAAGACTCACCTG  
ATCCTTACAGTTTGGCTCGCGATGCTTATCTCCAACGGCAAGCTTTCAAAGCGGAGATCCAAGTGGATGA  
CTATGACCCTGAGGAAGAAGAGTATCTCGATGAGTATTTAAATGAAGGGTTATGA

>*mIaF\** MO10-V2

ATGTCTCAATCTGACTTAGTCACCATCAAAAATTTGCGTTTTTCGCGCTCGCAGCGCGTCATTTTTGATGA  
CATAGATCTGCATGTCCCAAAGGTAAAGTGACAGCAATTATGGGGCCTTCGGAATCGGTAAAACCAC  
ACTGCTGCGTTTGATCGGCGGTCAACTCCTGCCAGAACAGGGAGAGATCTGGTTCGATGGTGAAAATAT  
TCCCACCCTCAGTCGCCGCAAACCTGTATCGTGCTCGTAAGAAGATGAGCATGCTGTTCCAATCAGGCGCG  
CTGTTTACCGATCTTAATGTGTTTGACAATGTGGCTTACCCATTGCGCGAGCATACCGAACTTGATGAAGC  
CATGATTAACCTTGGTGCTGCTGAAATTAGAGGCGGTTGGACTGCGTGGTGCTGCGTATTTAATGCCT  
AGTGAGCTTTCAGGCGGTATGGCGCGCCGCGCCGCACTGGCAAGGGCTATTGCACTCGATCCTGAGCTC  
ATCATGTATGATGAGCCGTTTGTGGATAAGATCCGATCACCATGGGTGTAAGTGGTTGAACTGATCCGTA  
ACCTTAATCGAGCCTTGGGTGTCACCTCTGTGGTGGTATCGCACGATGTACCGGAAGTATGAGCATTGC  
GGATTGGGTTTATCTGTTGGCCGATGGTAAGGTGATTGCGCAAGGTTACCTCAAGCATTGCGCGACAA  
CCCTGATCCGCGTGTACAACAATTTTTATGCGGCGATGCAGATGGCCCTGTGCCATTTGTTTTCTGCGC  
AGCCGATAGAACAGGAGCTGTTTAGTGCTAAATGA



## Préface au Chapitre 4

- **Introduction**

Dans l'article «*Hydroxyl radical overproduction in the envelope: an Achilles' heel in peptidoglycan synthesis*» qui a été soumis le 6 août 2021 à la revue *Microbiology Spectrum* et en correction depuis le 8 septembre 2021, nous avons cherché à identifier l'implication du stress oxydatif dans le phénotype de lyse du mutant  $\Delta$ *elyC* d'*Escherichia coli*.

- **Liste des autrices et auteurs**

Sean Giacomucci, Laura Alvarez, Felipe Cava, Christopher D. A. Rodrigues and Catherine Paradis-Bleau.

- **Contribution des auteurs**

Docteure Catherine Paradis-Bleau a conceptualisé et supervisé la recherche, acquis et géré les fonds nécessaires à son aboutissement et a participé à la révision de l'article. En tant que premier auteur j'ai réalisé plus de la moitié des expériences de l'article, j'ai également participé à la conceptualisation, à la méthodologie, à l'analyse des résultats, à la majorité de la rédaction de l'article et la conception des figures. Docteure Laura Alvarez a participé à la réalisation des résultats notamment ceux portant sur la concentration et la composition du peptidoglycane. Docteur Christopher D. A. Rodrigues a participé à la révision du texte et à la réécriture de la partie discussion. Docteur Felipe Cava a participé à la méthodologie et a fourni du matériel d'analyse



## Chapitre 4 – 3<sup>e</sup> Article

### Hydroxyl radical overproduction in the envelope: an Achilles' heel in peptidoglycan synthesis

Sean Giacomucci<sup>\*†</sup>, Laura Alvarez<sup>‡</sup>, Christopher D. A. Rodrigues<sup>§</sup>, Felipe Cava<sup>‡</sup>, and Catherine Paradis-Bleau<sup>\*†</sup>.

(<sup>†</sup>): Catherine Paradis-Bleau Laboratory, Département de microbiologie, infectiologie et immunologie, faculté de médecine, locaux R-615/616, Université de Montréal C.P. 6128, Succ. Centre-ville Montréal (Québec) H3C 3J7; sean.giacomucci@umontreal.ca, catherine.paradis-bleau@umontreal.ca.

(<sup>‡</sup>): Felipe Cava Laboratory, Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS) and Umea Center for Microbial Research (UCMR), Umea University, Laboratory 6k-146. Office 6L-142, SE-901 87 Umeå. Sweden; laura.alvarez@umu.se; felipe.cava@umu.se.

(<sup>§</sup>): Christopher Rodrigues Laboratory, The ithree Institute, University of Technology Sydney (UTS), Sydney NSW, Australia, christopher.rodrigues@uts.edu.au.

#### 4.1 Author Contributions

Sean Giacomucci: \*Corresponding author, performed research, analyzed data, designed research, wrote the paper.

Laura Alvarez: Performed research, contributed analytic tools, analyzed data.

Felipe Cava: Contributed analytic tools, scientific conclusions on data analysis.

Christopher D. A. Rodrigues: Wrote the paper.

Catherine Paradis-Bleau: \*Corresponding author, designed research, performed research, analyzed data, wrote the paper.

#### 4.2 Classification

BIOLOGICAL SCIENCES: Microbiology

### 4.3 Keywords

Oxidative stress, peptidoglycan synthesis, bacterial envelope biology, reactive oxygen species, hydroxyl radical, Fenton reaction, iron homeostasis.

### 4.4 Abstract

Mechanisms governing bacterial envelope homeostasis remain poorly understood. To decipher these processes, we previously developed an assay in the Gram-negative model *Escherichia coli* to identify genes involved in maintenance of envelope integrity. One such gene was ElyC, which was shown to be required for envelope integrity and peptidoglycan synthesis at room temperature. ElyC is predicted to be an integral inner membrane protein with a highly conserved domain of unknown function (DUF218). In this study, and stemming from a further characterization of the role of ElyC in maintaining cell envelope integrity, we serendipitously discovered an unappreciated form of oxidative stress in the bacterial envelope. Here we characterized the role oxidative stress in the  $\Delta$ *elyC* mutant defective phenotype. We found that cells lacking ElyC overproduce hydroxyl radicals (HO<sup>•</sup>) in their envelope compartment and that HO<sup>•</sup> overproduction is responsible for the peptidoglycan synthesis arrest, cell envelope integrity defects and cell lysis of the  $\Delta$ *elyC* mutant. Consistent with these observations, we show that the  $\Delta$ *elyC* mutant defect is suppressed during anaerobiosis. To our knowledge HO<sup>•</sup> is known to cause DNA damage but has not been shown to interfere with peptidoglycan synthesis. Thus, our work reveals the existence of a new pathway for oxidative stress generation in the envelope and opens the door to future studies deciphering the mechanisms that make peptidoglycan synthesis sensitive to oxidative stress.

## 4.5 Significance Statement

Oxidative stress is caused by the production and excessive accumulation of oxygen reactive species. In bacterial cells, oxidative stress mediated by hydroxyl radicals is typically associated with DNA damage in the cytoplasm. Here, we reveal the existence of a pathway for oxidative stress in the periplasm of *E. coli*. The current study reported, for the first time, that HO<sup>•</sup> overproduction specifically in periplasmic compartment causes inhibition of peptidoglycan synthesis and eventually bacterial cell lysis.

## 4.6 Introduction

The creation of new antibacterial molecules is essential to respond to the global problem of antibiotic resistance. As such, new bacterial targets must be found. Most antibiotics targeting Gram-positive bacteria are inefficient against Gram-negative bacteria, primarily due to the presence of an outer membrane in the Gram-negatives (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu, & Piddock, 2015). The peptidoglycan (PG) layer is an essential element of the bacterial envelope. It is required for envelope integrity, it defines the cell shape and is essential for coping with changes in osmotic pressure (Holtje, 1998). Bacteria need to constantly produce and remodel their PG to preserve cellular integrity and adaptability, allow growth and division. PG is located in the periplasmic compartment between the inner and outer membranes in Gram-negative bacteria. It is a complex polymer composed of chains made of two alternating sugars, crosslinked by short peptides. Sugar moieties are N-acetylglucosamine (GlcNAc), and N-acetylmuramic acid (MurNAc) that is bound to a peptide moiety (Caparros, Pisabarro, & de Pedro, 1992; Vollmer, Blanot, & de Pedro, 2008). PG precursors are produced in the cytoplasm and assembled on the lipid carrier undecaprenyl phosphate (UndP) in the inner leaflet of the inner membrane. This precursor, named lipid II, is then flipped to the outer leaflet of the inner membrane, and added to pre-existing PG chains by PG synthases (Manat *et al.*, 2014).

The molecular pathways governing Gram-negative bacteria envelope biogenesis, dynamics and homeostasis are highly complex and are still not well understood. To discover processes governing envelope biology, we previously developed an assay to identify all the non-essential genes required to maintain cell envelope integrity in the Gram-negative model system *E. coli* (Paradis-Bleau, Kritikos, Orlova, Typas, & Bernhardt, 2014). This assay involves the yellow-coloured LacZ substrate chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG) which cannot cross healthy cell envelopes. The cytoplasmic LacZ enzyme thus does not have access to this envelope-impermeable substrate unless the integrity of the envelope is comprised. Envelope integrity defects lead to CPRG being hydrolyzed by LacZ into the pink-coloured CPR product for a positive readout in the assay (a CPRG<sup>+</sup> phenotype) (Paradis-Bleau et al., 2014). This screen identified over a hundred genes of unknown function as being required for Gram-negative envelope integrity. The  $\Delta$ *elyC* (formerly  $\Delta$ *ycbC*) mutant had one of the strongest CPRG<sup>+</sup> phenotype. ElyC is predicted to be an inner membrane protein with a highly conserved domain of unknown function, DUF218 (Finn et al., 2008). This domain is ubiquitous in the tree of life, being present in almost all bacterial *phyla* (Finn et al., 2008; Nina Mian, 2015). In bacteria, DUF218 domain-containing proteins from *E. coli* and *Salmonella* Typhimurium have been implicated in vancomycin resistance, envelope integrity and anaerobic respiration (Chao et al., 2008; Mitchell, Wang, & Silhavy, 2017; Mouslim, Cano, & Casadesus, 1998; Rida, Caillet, & Alix, 1996).

We previously demonstrated that cells lacking *elyC* display a lysis phenotype caused by a PG synthesis arrest at room temperature. The cell lysis phenotype could be suppressed by overexpressing genes involved in PG synthesis, that encode for MurA which performs the first committed step of PG precursor synthesis in the cytoplasm, the periplasmic PG synthase PBP1B, and UppS which is responsible for the production of the lipid carrier UndP. The  $\Delta$ *elyC* mutant cell lysis phenotype was also suppressed by deleting certain



genes involved in the biogenesis of enterobacterial common antigen (ECA), a surface polysaccharide whose synthesis also involves UndP. These observations led to the hypothesis that the  $\Delta$ *elyC* cell lysis phenotype is suppressed by increasing the availability of the lipid carrier UndP (Paradis-Bleau et al., 2014). Furthermore, we found that the defective phenotypes of  $\Delta$ *elyC* mutant cells can be suppressed by the overexpression of *dsbG*. Interestingly, periplasmic DsbG suppressed the mutant defects independently of its reductase activity, but rather by its chaperone activity. The periplasmic chaperone Spy could also suppress the mutant defects, but cytoplasmic chaperones could not. Importantly, we detected protein aggregation in the periplasm of  $\Delta$ *elyC* cells, which indicates a perturbation of the biology of this compartment in absence of ElyC (Kouidmi, Alvarez, Collet, Cava, & Paradis-Bleau, 2018).

Interestingly, in this work, while attempting to decipher the mechanistic origin of the PG synthesis arrest in  $\Delta$ *elyC*, we discovered that the mutant lysis phenotype is dependent on aeration. This observation leads us to hypothesize that the PG synthesis arrest in  $\Delta$ *elyC* is related to oxidative stress. During aerobic respiration, cells produce reactive oxygen species (ROS) that can alter proteins, DNA, RNA and even lipids (Catala, 2009; Imlay, 2013). ROS are produced from molecular oxygen ( $O_2$ ) and include the following: superoxide radical ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radical ( $HO^{\bullet}$ ). The most damaging ROS is  $HO^{\bullet}$  and it is produced from  $H_2O_2$  in presence of free ferrous iron ( $Fe^{2+}$ ) through the Fenton reaction (Koppenol, 2001; Liochev & Fridovich, 1999). While  $O_2^{\bullet-}$  and  $H_2O_2$  oxidizing efficiency are respectively lowered by a negative charge and a stable oxygen-oxygen bond,  $HO^{\bullet}$  is highly unstable, has no charge and can react with almost all molecules within the bacterial cell (Imlay, 2003).  $HO^{\bullet}$  has an extremely high reactivity with a half-life of  $10^{-9}$  seconds, which makes it the most hazardous ROS (Imlay, 2003; Pryor, 1986). Although iron is essential for bacteria, free iron pools in bacteria are tightly controlled due to its high reactivity with ROS and therefore toxicity. The import, export, redox state, storage, scavenging and release of iron are regulated to avoid excess of free

iron within bacterial cells and to ensure iron is available for incorporation into proteins (Almiron, Link, Furlong, & Kolter, 1992; Andrews, Robinson, & Rodríguez-Quiñones, 2003; Chiancone & Ceci, 2010; Imlay, 2003; Kehrer, 2000; Zhao et al., 2002). HO<sup>•</sup> radicals are known to be produced in the cytoplasm by the release of iron from its scavengers (Dps or ferritin-like proteins). As iron has a high affinity for nucleic acids, DNA is extremely susceptible to oxidation mediated by Fenton-generated HO<sup>•</sup>, which leads to damaged bases and DNA breaks. Chromosomal breaks activate the SOS response, which delays cell division and thereby causes bacterial filamentation (bacteria continue growing but are unable to divide) (Imlay, 2003, 2013; Imlay, S., & S., 1988). Although the *ΔelyC* mutant phenotype differs from what is generally observed in cases of HO<sup>•</sup> overproduction, we decided to investigate its susceptibility to O<sub>2</sub> and test the hypothesis that inhibition of PG synthesis and cell lysis in *ΔelyC* cells are related to ROS production.

In this study, we show that *ΔelyC* mutant cells overproduce HO<sup>•</sup>. The inhibition of the Fenton reaction or anaerobic growth conditions restored the *ΔelyC* mutant phenotypes to WT levels, including PG synthesis. We also found that *ΔelyC* mutant cells are highly susceptible to Cr (VI)-mediated oxidative stress. Importantly, we show that HO<sup>•</sup> production in *ΔelyC* mutant cells does not damage DNA and thus HO<sup>•</sup> are not likely produced in the cytoplasm but in the envelope, a result that is consistent with our previous work showing protein aggregation in the periplasm of *ΔelyC* mutant cells (Kouidmi et al., 2018). To our knowledge, HO<sup>•</sup> has not previously been described to have an impact on PG synthesis. Even though this phenotype might occur in a specific genetic context and under specific conditions, we have identified an unappreciated weakness in PG biosynthetic biology, involving a likely molecular cascade leading to HO<sup>•</sup> overproduction in the bacterial envelope.

## 4.7 Results

### **The $\Delta$ elyC mutant envelope defect and terminal lysis phenotype are dependent on medium oxygenation.**

Our previous study demonstrated that ElyC is important for bacterial cell envelope integrity, and more specifically for proper PG biogenesis (Paradis-Bleau et al., 2014). In an effort to discover how ElyC functions in PG biogenesis, we investigated the  $\Delta$ elyC phenotypes under different conditions. Interestingly, we noticed that the growth dynamics of  $\Delta$ elyC cells differed depending on the specific glassware used for cultivation and the volume of liquid media they contained. We have previously shown that, when a subculture of  $\Delta$ elyC cells grown at 37°C was transferred to 21°C,  $\Delta$ elyC cells grew as well as WT cells until an OD<sub>600nm</sub> of approximately 0.6, but then stopped growing and lysed (Paradis-Bleau et al., 2014). When we cultured  $\Delta$ elyC cells at 21°C in 25 ml of liquid media in 250 ml Erlenmeyer flasks (one tenth of the total glassware volume), under agitation at 250 rpm, mutant cells grew as well as WT cells until an OD<sub>600nm</sub> of 0.5-0.6 and then lysed (**Figure 4.1A, D**). In contrast, when  $\Delta$ elyC cells were cultured at 21°C in 5 ml of liquid media in narrow 10 ml culture tubes (half of the total glassware volume), under agitation, we did not observe the complete cell lysis phenotype, but only a reduction in growth rate in comparison to WT cells (**Figure 4.1B**). When observed under the microscope, some  $\Delta$ elyC cells grown in the narrow tubes, but not all, displayed signs of envelope defects: some cells had lysed while others appeared as bacterial ghosts (empty cell envelopes) (Zweifel & Hagstrom, 1995) (**Figure 4.1D, Supplementary Figure 4.7 and Figure 4.8**). The severity of the lysis phenotype of the  $\Delta$ elyC cells thus varied depending on growth conditions. We reasoned that the main difference in the culture conditions was the medium-oxygenation from the agitation. Indeed, the potential for medium aeration, and thus oxygenation, is much higher in the flask condition than in the culture tube condition. We reasoned that increasing medium aeration by growing  $\Delta$ elyC mutant cells in large flasks with low volume

of liquid media pre-empted the terminal phenotype of lysis, whereas growing mutant cells in small, half-full culture tubes reduced the  $\Delta elyC$  defects. We conclude that the lysis phenotype of  $\Delta elyC$  mutant cells is dependent on medium aeration and hypothesized that the envelope defect of the  $\Delta elyC$  mutant is dependent upon the presence of molecular oxygen.

We reasoned that, if our hypothesis is correct, growing  $\Delta elyC$  cells in absence of oxygen would completely alleviate all defective phenotypes. Indeed, we observed no differences in  $\Delta elyC$  and WT growth kinetics (**Figure 4.1C**) and cellular morphologies (**Figure 4.1D**, **Supplementary Figure 4.8**) under anaerobic conditions. Furthermore,  $\Delta elyC$  cells did not display a CPRG<sup>+</sup> phenotype, indicative of envelope defects, when the assay was performed anaerobically (**Figure 4.1E**), indicating that  $\Delta elyC$  cells maintain envelope integrity in the absence of oxygen. Importantly, the  $\Delta mrcB$  mutant (a gene implicated in PG synthesis/remodeling and used as an envelope-defective control strain in the assay) maintained its CPRG<sup>+</sup> phenotype without oxygen exposure (**Figure 4.1E**).

Altogether, these results show that an increase in medium aeration exacerbates the  $\Delta elyC$  defects, while anaerobic conditions completely suppress them. This establishes that molecular oxygen is involved in the development of envelope defects in  $\Delta elyC$  cells.

#### **$\Delta elyC$ mutant cells produce high levels of hydroxyl radicals (HO<sup>•</sup>) at 21°C.**

Since oxygen is the most potent electron acceptor, oxidative stress is inevitably present under aerobic conditions. We hypothesized that oxidative stress is the underlying cause of the oxygen dependency of the envelope defect in  $\Delta elyC$ , and that mutant cells would contain higher, detrimental amounts of ROS. As HO<sup>•</sup> is by far the most reactive and hazardous ROS, and that O<sub>2</sub><sup>•-</sup> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production can result in HO<sup>•</sup> formation (Imlay, 2003; Kehrer, 2000), we identified it as the best potential candidate for triggering such a

severe phenotype as cell lysis. We measured HO<sup>•</sup> by flow cytometry using the hydroxyphenyl fluorescein (HPF) probe. Fluorescence develops from HPF when it reacts with HO<sup>•</sup>, leading to HPF oxidation and its cleavage into fluorescein (Setsukinai, Urano, Kakinuma, Majima, & Nagano, 2003; Zamojc, Zdrowowicz, Jacewicz, Wyrzykowski, & Chmurzynski, 2016). As a positive control in the assay, we used potassium chromate (K<sub>2</sub>CrO<sub>4</sub>) which induces the production of HO<sup>•</sup> through a Fenton-like reaction (Cervantes et al., 2001; Ramirez-Diaz et al., 2008) (**Figure 4.2**). We compared HO<sup>•</sup> production in *ΔelyC* and WT cells grown in flasks at 21°C and 37°C until OD<sub>600nm</sub> of 0.35, about one generation before lysis for *ΔelyC* cells (**Figure 4.1A**).

The addition of potassium chromate increased fluorescence emission 2-fold in WT cells at 21°C and 3-fold at 37°C, indicating that the HO<sup>•</sup> detection assay was functional (**Figure 4.2B** and **Supplementary Figure 4.11A-B**). Fluorescence intensity was overall higher at 37 °C than at 21°C. At 21°C, *ΔelyC* cells produced a fluorescence signal that was 3-fold higher than WT cells, and 1.5-fold higher than WT cells treated with potassium chromate (**Figure 4.2B** and **Supplementary Figure 4.11A**). Conversely, *ΔelyC* and WT cells had an identical fluorescence signal at 37°C (**Figure 4.2B** and **Supplementary Figure 4.11B**). As the terminal lysis phenotype of *ΔelyC* cells occurred in flasks at 21°C but not at 37°C (Paradis-Bleau et al., 2014), these data indicate that mutant cells produce elevated levels of HO<sup>•</sup> specifically in growth conditions leading to the phenotype of lysis.

#### **Excess production of HO<sup>•</sup> by the iron-dependent Fenton reaction triggers *ΔelyC* cell lysis through PG synthesis inhibition.**

We hypothesized that the elevated HO<sup>•</sup> production in *ΔelyC* cells induces bacterial lysis through PG synthesis inhibition. Since HO<sup>•</sup> formation requires free iron as an electron donor to feed the Fenton reaction (Imlay, 2003) (**Figure 4.2A**), we reasoned that chelating iron would inhibit the Fenton reaction and consequently decrease HO<sup>•</sup> production, thereby suppressing the *ΔelyC* cell lysis phenotype. We used the iron chelator 2,2'-

dipyridyl, which freely diffuses into bacterial membranes (Petrat, de Groot, Sustmann, & Rauen, 2002; Yongzhang Luo, Zhengxu Han, S. Michael Chin, & Linn, 1994). We titrated 2,2'-dipyridyl to define the precise minimum concentration required to rescue the mutant from lysis. The addition of 375  $\mu\text{M}$  2,2'-dipyridyl was sufficient to restore  $\Delta\text{elyC}$  growth kinetics to WT levels (**Figure 4.3D**). As 2,2'-dipyridyl chelates cellular iron, an essential cofactor in many metabolic processes (Andrews et al., 2003), bacterial growth was consistently slower for both strains in the Fe-depleted condition (**Figure 4.3A, D**). As expected, addition of 375  $\mu\text{M}$  2,2'-dipyridyl resulted in  $\Delta\text{elyC}$  cells producing the same amount of HFP signal as WT cells (**Figure 4.3B, E**). Thus, limiting the  $\text{HO}^\bullet$  production in  $\Delta\text{elyC}$  cells by inhibiting the Fenton reaction with 2,2'-dipyridyl alleviated the lysis, growth and morphological defects of the mutant at 21°C (**Figure 4.3A-F, Supplementary Figure 4.7 and Supplementary Figure 4.8**). Furthermore, when 2,2'-dipyridyl was added to  $\Delta\text{elyC}$  cell cultures after 6 hours of growth at 21°C, about 2 hours before lysis, it successfully rescued the mutant terminal phenotype, and no lysis was observed (**Supplementary Figure 4.9**). These results support our hypothesis that the high level of  $\text{HO}^\bullet$  produced in  $\Delta\text{elyC}$  cells triggers bacterial lysis. These results are also consistent with free ferrous iron generating the toxic levels of  $\text{HO}^\bullet$  in  $\Delta\text{elyC}$  cells through the Fenton reaction.

To test this model further, we tested if addition of free ferrous iron to cultures of  $\Delta\text{elyC}$  cells containing 2,2'-dipyridyl would bring back the toxic levels of  $\text{HO}^\bullet$ . Indeed, we found that 100  $\mu\text{M}$  of ferrous iron in the form of  $\text{FeSO}_4$  led to the generation of native levels of  $\text{HO}^\bullet$  in  $\Delta\text{elyC}$  cells, and reproduced the terminal lysis phenotype at 21°C (**Figure 4.3G-I, Supplementary Figure 4.11A**). Thus, the addition of ferrous iron reverts the chelating effect of 2,2'-dipyridyl and reestablishes the excess  $\text{HO}^\bullet$  level in  $\Delta\text{elyC}$  cells, along with lysis. To further confirm that the excess production of detrimental  $\text{HO}^\bullet$  by the iron-dependent Fenton reaction in  $\Delta\text{elyC}$  cells promote bacterial lysis, we optimized a third condition where the concentration of 2,2'-dipyridyl was raised at 600  $\mu\text{M}$  to chelate the additional

iron introduced to the cultures in the Fe-undepleted condition, therefore creating the Fe-redepleted condition. The production of HO• in *ΔelyC* cells was then reduced to the WT level (**Figure 4.3K**). As expected, the higher iron chelator concentration reversed the lethal lysis phenotype of *ΔelyC* cells, with the mutant mimicking WT growth and cellular morphology (**Figure 4.3J, L, Supplementary Figure 4.7 and Supplementary Figure 4.8**).

We have previously demonstrated that PG synthesis is completely blocked in *ΔelyC* cells grown in flasks at 21°C (Paradis-Bleau et al., 2014). Next, we aimed to determine if HO• overproduction was responsible for the PG synthesis defect in the *ΔelyC* mutant. To do so, we purified PG from WT and *ΔelyC* cells grown with and without 375 μM 2,2'-dipyridyl until OD<sub>600nm</sub> of 0.5, before the first signs of cell lysis in mutant cells. Quantification of PG material showed that *ΔelyC* cells contained significantly less (about one third) of the PG material retrieved in WT cells when grown without 2,2'-dipyridyl (**Figure 4.3M**). Interestingly, no significant difference in PG material was observed between *ΔelyC* and WT cells when grown with the iron chelator, suggesting that PG synthesis is restored in the *ΔelyC* mutant by decreasing the HO• levels back to WT levels. Furthermore, the analysis of the PG profiles revealed that, despite some differences in relative PG amounts, the structure and composition of PG was almost identical in all the samples analyzed (**Supplementary Figure 4.13A, C and E**). These results indicate that the excess level of HO• produced by the iron-dependent Fenton reaction in *ΔelyC* cells triggers a block to PG synthesis leading to cell lysis.

#### **HO• overproduction occurs in the envelope of *ΔelyC* cells.**

HO•-mediated oxidative stress is known to induce a filamentation phenotype (Brandi, Salvaggio, Cattabeni, & Cantoni, 1991; Imlay, 2003). As the main pool of ferrous iron in bacterial cells is in the cytoplasm and nucleic acids have a high affinity for ferrous iron, the Fenton reaction predominantly occurs near DNA (Imlay, 2003). HO• are non-selective

and avid oxidants that quickly react with molecules in their close vicinity, they are thus unlikely to diffuse from their origin of production (Imlay, 2013; Imlay & Linn, 1988; Pryor, 1986). Generated HO<sup>•</sup> can cause DNA damage such as DNA strand breaks which activates the SOS stress response (Baharoglu & Mazel, 2014), inducing the production of the FtsZ inhibitor Sula (also known as *sfiA*), which blocks cell division (Simmons, Cohen, Foti, & Walker, 2008). Bacteria then grow without dividing and form longer cells as a coping mechanism to allow the completion of DNA repair and replication before cell division resumes (Imlay, 2013). Since the excess level of HO<sup>•</sup> produced by the Fenton reaction in  $\Delta$ *elyC* cells induces a lytic phenotype through PG synthesis inhibition rather than a filamentation phenotype through cell division inhibition, we reasoned that HO<sup>•</sup> production in  $\Delta$ *elyC* cells occurs differently than what has been typically described for bacteria. We hypothesized that, in  $\Delta$ *elyC* cells, toxic HO<sup>•</sup> are not generated in the cytoplasmic compartment where DNA is located, but rather in the envelope compartment where PG is located.

To test this hypothesis, we studied SOS response activation in  $\Delta$ *elyC* and WT cells by measuring expression from the *sulA* promoter (*sulAp*). Using the Lambda Red homologous recombination system (Yu et al., 2000), we substituted the chromosomal *sulA* gene with the *lacZ* reporter gene to create a *sulAp-lacZ* transcriptional fusion in  $\Delta$ *elyC* and WT cells that contained a deletion of their native *lac* operon. We then measured the expression levels from *sulAp* by quantifying LacZ activity with the colorimetric  $\beta$ -galactosidase assay in cells grown in flasks at 21°C until OD<sub>600nm</sub> of 0.35, about one generation before lysis in  $\Delta$ *elyC* cells. WT and  $\Delta$ *elyC* cells displayed the same levels of reporter  $\beta$ -galactosidase activity (**Figure 4.4A**). This result suggests that, although the  $\Delta$ *elyC* mutant produce high levels of HO<sup>•</sup>, the SOS response is not activated in its cytoplasm (**Figure 4.2B** and **Figure 4.4A**).

To ensure that the *sulAp-lacZ* transcriptional fusion was a functional reporter system for the SOS response, we used potassium chromate as a HO<sup>•</sup> generator to induce SOS stress.



Potassium chromate is a chromium salt in its VI oxidation state, which is known to access the periplasm before entering the cytoplasm through sulfate transporters in the inner membrane (Viti, Marchi, Decorosi, & Giovannetti, 2014). Chromium can be reduced to its more reactive forms, mainly at the oxidation states V and III, to drive HO<sup>•</sup> production through a Fenton-like reaction in all bacterial compartments (**Figure 4.2A**) (Ramirez-Diaz et al., 2008; Rossman, 1981). Interestingly, adding potassium chromate to the cultures at growth initiation did not alter the growth kinetic of WT cells but was severely detrimental for *ΔelyC* cells. When chromate is added to the mutant at growth initiation, it is caused a more rapid and drastic lysis at an OD<sub>600nm</sub> of ~0.25, more than one generation earlier than for untreated cells (**Supplementary Figure 4.10**). When added to the mutant culture 6 hours after growth initiation, chromate is also causing a more rapid and drastic lysis at an OD<sub>600nm</sub> of ~0.35, about one generation earlier than for untreated cells (**Figure 4.4B** and **Supplementary Figure 4.10**). This is consistent with the previous results showing that high levels of HO<sup>•</sup> block PG synthesis, leading to bacterial cell lysis.

Since *ΔelyC* cells lysed quite earlier after addition of potassium chromate, in order to test if they can induce the SOS response, we added potassium chromate to the mutant cultures at time zero but collected the sample at an early OD. This allowed the recovery of a sufficient number of mutant cells to quantify LacZ activity with the colorimetric β-galactosidase assay. The growth kinetic of WT cells was not affected by potassium chromate (**Figure 4.4B**), and cells were collected at an OD<sub>600nm</sub> of 0.35 as described above for untreated cells. WT cells grown with potassium chromate had a two-fold increase in β-galactosidase activity (**Figure 4.4A**), confirming that potassium chromate induced the SOS response, and that the reporter fusion was functional. The addition of potassium chromate to the *ΔelyC* culture at growth initiation (T0) or at 6-hour time point also exacerbated the mutant phenotype as cell lysis occurred respectively at an OD<sub>600nm</sub> of 0.35 and 0.25, about one and almost two generation earlier than for untreated mutant

cells (**Figure 4.4B**, **Supplementary Figure 4.10**). To this end, we harvested  $\Delta elyC$  cells at an  $OD_{600nm}$  of 0.15, before the premature lysis, and observed a similar two-fold increase in  $\beta$ -galactosidase activity, as in WT cells (**Figure 4.4A**). This result supports the idea that toxic  $HO^\bullet$  radicals that are typically present in  $\Delta elyC$  cells at 21°C are not generated in the cytoplasm and thus do not generate an SOS response. Microscopy images confirmed that, while potassium chromate induced the SOS filamentation phenotype in WT cells, it triggered an acute lysis phenotype in  $\Delta elyC$  cells (**Figure 4.4C**). Altogether, these results suggest that potassium chromate-induced  $HO^\bullet$  production adds to the already elevated and toxic  $HO^\bullet$  pool in  $\Delta elyC$  mutant cells, thus worsening the terminal lysis phenotype.

Next, we hypothesized that alleviating the excess of  $HO^\bullet$  in  $\Delta elyC$  cells would lead to filamentation instead of lysis upon potassium chromate treatment. We thus added 375  $\mu M$  of 2,2'-dipyridyl to the cultures, in addition to potassium chromate, to study the resulting phenotypes. Indeed, when the iron chelator was added (reducing the levels of  $HO^\bullet$  in  $\Delta elyC$  cells to WT levels), potassium chromate caused a moderate filamentation phenotype in  $\Delta elyC$  cells that phenocopied WT cells (**Figure 4.4B-D**). The filamentation phenotype was less impressive with 2,2'-dipyridyl than in its absence (**Figure 4.4C**). This is probably due to the growth rate inhibition caused by 2,2'-dipyridyl iron chelation and the reduced synergistic effect of iron and potassium chromate in the production of  $HO^\bullet$ . Altogether, these data support our hypothesis that  $HO^\bullet$  overproduction occurs in the envelope compartment of  $\Delta elyC$  cells, thereby weakening the envelope structure.

#### **Free extra-cytoplasmic iron is necessary for the elevated $HO^\bullet$ production in $\Delta elyC$ cells.**

Since ROS appeared to be produced in the envelope compartment in  $\Delta elyC$  cells and as  $Fe^{2+}$  crosses the outer membrane passively through porins (Lau, Krewulak, & Vogel, 2016), we hypothesized that chelation of extra-cytoplasmic iron would be sufficient to suppress

the  $\Delta elyC$  PG synthesis arrest and lytic phenotype. To test this, we used ethylenediamine-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetic) acid (EDDHA) which is known to chelate extra-cytoplasmic iron (Bergan, Klaveness, & Aasen, 2001; Brandel et al., 2012; Butterson & Calderwood, 1994; Cook et al., 1998). We used EDDHA and combinations of EDDHA and  $Fe^{2+}$  under three different conditions and monitored growth, analyzed PG, measured  $HO^{\bullet}$  production and examined cell morphology at 21°C.

First, we determined the minimal EDDHA concentration required to suppress  $\Delta elyC$  mutant lysis. The so-called “EDDHA Fe-depleted condition” was obtained by adding EDDHA to the medium at a final concentration of 250  $\mu M$ . Importantly, in this condition, the  $\Delta elyC$  mutant grew as well as the WT, without any defect in its growth kinetics (**Figure 4.5A**). As EDDHA does not cross the inner membrane and does not chelate free cytoplasmic iron, it did not cause any growth defect to  $\Delta elyC$  or WT. As expected, in the EDDHA Fe-depleted condition,  $HO^{\bullet}$  production and cell morphology were similar between  $\Delta elyC$  and WT cells (**Figure 4.5B-C, Supplementary Figure 4.7, Supplementary Figure 4.8 and Supplementary Figure 4.11C**). The addition of EDDHA also restored PG synthesis in the  $\Delta elyC$  (**Figure 4.5J, Supplementary Figure 4.13B, D and F**). These results support our hypothesis that extra-cytoplasmic iron chelation prevents lysis of the mutant by inhibiting the Fenton reaction occurring in the envelope compartment of  $\Delta elyC$  cells.

To verify these results, we titrated the minimal  $Fe^{2+}$  concentration capable of reverting the effect of the extra-cytoplasmic chelator, thus recreating  $\Delta elyC$  mutant lysis when added to the EDDHA Fe-depleted condition. We found that addition of 100  $\mu M$   $Fe^{2+}$  to the EDDHA-containing medium (EDDHA Fe-undepleted condition) recreated the mutant lysis phenotype (**Figure 4.5D**). Consistent with this result, the mutant  $HO^{\bullet}$  production in EDDHA Fe-undepleted condition increased back to control condition levels (**Figure 4.5E**

and **Supplementary Figure 4.11C**) and lysis was observed under the microscope (**Figure 4.5F** and **Supplementary Figure 4.8**). Interestingly, compared to the control condition, we also observed an increase in cell length, width and volume in the mutant but not in the WT (**Figure 4.5I** and **Supplementary Figure 4.11A-E**).

To further assess the involvement of free extra-cytoplasmic  $\text{Fe}^{2+}$  in  $\Delta\text{elyC}$  mutant cell lysis, we developed a third condition referred to as the EDDHA Fe-redepleted condition where the lytic phenotype of the mutant should be alleviated, as in the first EDDHA Fe-depleted condition. We observed that the  $\Delta\text{elyC}$  mutant could indeed be rescued from lysis with 600  $\mu\text{M}$  EDDHA in presence of 100 $\mu\text{M}$   $\text{Fe}^{2+}$ . In EDDHA Fe-redepleted conditions, the  $\Delta\text{elyC}$  and WT growth kinetics appeared similar, as well as their  $\text{HO}^\bullet$  production (**Figure 4.5G** and **H**, **Supplementary Figure 4.11C**). The mutant cells were slightly larger than WT cells, but no other morphological defects could be observed (**Figure 4.5I** and **Supplementary Figure 4.7** and **Supplementary Figure 4.8**). Altogether, these results support the idea that extra-cytoplasmic free iron plays a key role in  $\text{HO}^\bullet$  overproduction, PG biogenesis arrest and the lytic phenotype of the  $\Delta\text{elyC}$  mutant.

## 4.8 Discussion

Critical to a better understanding of the bacterial cell envelope is a detailed appreciation of the processes that influence its assembly and dynamics. Here, through the characterization of the  $\Delta\text{elyC}$  mutant, we reveal the existence of a pathway for ROS production in the envelope that impacts PG synthesis, an important component of the cell envelope and drug target in the treatment of bacterial infections. Building our on previous work, our data support a model whereby, in cells lacking ElyC, damaging  $\text{HO}^\bullet$  produced via the Fenton reaction result in protein aggregation in the periplasm, inhibition of PG synthesis and cell lysis.

Several results reported in this study support the idea that ROS are produced mainly in the envelope of *elyC* mutant, and not in the cytoplasm, where they lead to toxic accumulation of HO• via de Fenton reaction, inhibition of PG synthesis and cell lysis. First, we demonstrate that the  $\Delta$ *elyC* mutant phenotypes are suppressed in anaerobic conditions. Second, we show that the mutant PG synthesis and lysis defect are suppressed by the iron chelator 2,2'-dipyridyl and extra-cytoplasmic iron chelator EDDHA which inhibit the Fenton reaction. Third, we show that despite the fact that the  $\Delta$ *elyC* mutant produces significantly higher levels of HO• compared to WT grown in presence of potassium chromate, it did not activate the SOS-response. Thus, while it is formerly possible that small amount of HO• are produced in the cytoplasm of the  $\Delta$ *elyC* mutant, our data are consistent with the idea that most of HO• is produced in the envelope of mutant cells, where it quickly reacts and causes damages to the PG synthetic machinery.

Previous work indicates that HO• is too reactive to diffuse more than few nanometers (Pryor, 1986) and is not likely able to cross a membrane without reacting with a cellular component (G.M. Makrigiorgos, 1999; Imlay, 2008). Thus, HO• can only alter molecules in very close proximity to where the Fenton reaction occurs. In further support of the notion that HO• production is localized in the envelope of the  $\Delta$ *elyC* mutant, we show that addition of potassium chromate induces the cytoplasmic SOS-response and its characteristic cell filamentation phenotype in  $\Delta$ *elyC* mutant cells, when the iron chelator 2,2'-dipyridyl is present to annihilate the native production of HO•. This important result indicates that the  $\Delta$ *elyC* mutant can exhibit two separate ROS-induced phenotypes, based on the location of the source of ROS: (I) an SOS response-independent PG synthesis arrest and cell lysis phenotype that depends on HO• production in the envelope and can be suppressed by the inner membrane impermeable iron chelator EDDHA and (II) an SOS response-dependent, cell filamentation phenotype that depends on ROS production in

the cytoplasm and is only apparent in the mutant if the primary phenotypes (PG synthesis inhibition and cell lysis) are suppressed by iron chelation (**Figure 4.4**).

Although the exact function of ElyC remains unclear, it is tempting to speculate on its role and how it contributes to maintaining ROS homeostasis in the envelope at lower temperatures. One hypothesis is that ElyC functions in the stabilization of the electron transport chain (ETC) components at lower temperatures. It has been shown that, at lower temperatures, there is increase in saturated lipids, which in turn impacts membrane fluidity (Magnuson, Jackowski, Rock, & Cronan, 1993; Parsons & Rock, 2013). Changes in membrane fluidity have been shown to reduce the diffusion of proteins in the ETC (Budin et al., 2018) which may lead to leakage of electrons from the ETC chain components. This uncontrolled leakage of electrons to molecular oxygen from the ETC in the envelope would subsequently generate superoxide and hydrogen peroxide. Through reactivity with iron sulphur cluster-containing proteins (e.g. cytochromes) in the envelope, this toxic cascade would lead to the liberation of free iron, thus feeding the Fenton reaction and generating HO<sup>•</sup> in the envelope. The formation of HO<sup>•</sup> would then lead to protein damage and aggregation, inhibiting PG synthesis and therefore causing bacterial cell lysis. Consistent with this hypothesis, (I) we previously showed that the  $\Delta$ *elyC* mutant PG synthesis arrest and cell lysis phenotype can be suppressed by the overexpression of periplasmic chaperones (but not by cytoplasmic chaperones) (Paradis-Bleau et al., 2014) and (II) we now show that anaerobic conditions, as well as the addition of iron chelators suppress these  $\Delta$ *elyC* defects. Interestingly, examination of HO<sup>•</sup> production in  $\Delta$ *elyC* mutant multi-copy suppressors involved in PG synthesis (Paradis-Bleau et al., 2014), revealed that they still accumulate HO<sup>•</sup>, although to a lesser degree than the  $\Delta$ *elyC* mutant. That the PG synthesis and cell lysis defects of the  $\Delta$ *elyC* mutant can be suppressed, despite the higher levels of HO<sup>•</sup> production, suggests that the PG synthesis and cell lysis phenotypes are an indirect effect of HO<sup>•</sup> production. One idea is

that ElyC function is likely linked to maintaining ROS homeostasis in the envelope, possibly through stabilization of the ETC complexes, as hypothesized above. Alternative hypotheses where ElyC functions directly in iron homeostasis in the envelope are also possible. In future work, deciphering the protein-protein interaction network of ElyC may reveal its exact role in envelope biology.

Overall, our results provide evidence of a molecular cascade whereby ROS production in the envelope leads to inhibition of PG synthesis and cell lysis. Understanding the mechanistic basis for ROS production in the  $\Delta elyC$  mutant will likely reveal molecular targets in otherwise-WT cells that can lead to the development of new antibiotics, thus contributing to more effective strategies dealing with antibiotic resistant infections in Gram-negative pathogens. Finally, considering that the immune system utilizes ROS as means to cope with bacterial pathogens, a better understanding of how ROS are generated in the envelope and interfere with PG synthesis, could lead to strategies that potentiate the immune ROS effect in the killing of bacteria.

## 4.9 Materials and Methods

### 4.9.1 Bacterial strains

In our study, we compared the phenotypic differences between *Escherichia coli* K12 MG1655 “WT”,  $\Delta elyC$  mutant (MG1655, *elyC::FRT*) and  $\Delta mrcB$  (MG1655, *mrcB::FRT*). For quantification of SOS response activation, we constructed “WT  $\Phi(sulAp-lacZ)$ ” corresponding to strain SG24 (MG1655,  $\Delta(lacI-lacZp)\Phi(Kan^R-sulAp-lacZ)$ ) and “ $\Delta elyC \Phi(sulAp-lacZ)$ ” corresponding to strain SG25 (EM9,  $\Delta(lacI-lacZp)\Phi(Kan^R-sulAp-lacZ)$ ). In SG24 and SG25, the *lacZ* promoter was replaced by the *sulA* promoter fused with the

functional *lacZ* gene, the *lacI* gene was deleted and the kanamycin resistance gene was added. More information is available in supplementary material and methods.

#### 4.9.2 Growth Conditions and Monitoring

For all experiments involving growing bacteria in liquid medium, cells were initially grown as overnight cultures in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C in culture tubes under agitation on a culture rotator. LB medium was prepared with 1% peptone (Biobasic<sup>®</sup>), 0.5% yeast extract (Biobasic<sup>®</sup>) and 0.5% NaCl (Sigma-Aldrich), in distilled water. Then, bacteria optical density was measured at 600 nm ( $OD_{600nm}$ ) and day cultures were started from dilution of overnight cultures to  $OD_{600nm}$  of 0.02 in LB medium 1% NaCl (Miller's LB Broth from Biobasic<sup>®</sup>). Under control conditions, bacteria were grown in 25 ml LB 1% NaCl in 250 ml flask with shaking at 250 rpm (New Brunswick, Innova™ 4230) at 21°C. For the culture narrow tube condition, bacteria were grown in 5 ml LB 1% NaCl in 10 ml culture tubes under agitation on a culture rotator. Anaerobic growth conditions were achieved by growing bacteria in hermetically closed glass bottles completely filled in with LB 1% NaCl, where atmospheric air in the medium were chased by O<sub>2</sub>-free argon (Hallenbeck, Clark, & Barrett, 1989).

For Fe-depleted conditions, LB medium was supplemented with 375 μM 2,2'-dipyridyl from Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. For EDDHA Fe-depleted conditions, LB medium was supplemented with 250 μM ethylenediamine-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetic) acid from Alfa Chemistry<sup>®</sup>, Cat. num. ACM117002. For Fe-undepleted conditions, LB medium was supplemented with 375 μM 2,2'-dipyridyl and 100 μM FeSO<sub>4</sub> purchased from Sigma<sup>®</sup>. For EDDHA Fe-undepleted conditions, LB medium was supplemented with 250 μM EDDHA and 100 μM FeSO<sub>4</sub>. For Fe-redepleted conditions, LB medium was supplemented with 100 μM FeSO<sub>4</sub> and 600 μM 2,2'-dipyridyl. For EDDHA Fe-redepleted conditions, LB medium was supplemented with 100 μM FeSO<sub>4</sub> and 600 μM EDDHA. For potassium chromate



treatments, bacteria were grown in the control condition in medium supplemented with 120  $\mu\text{M}$  potassium chromate ( $\text{K}_2\text{CrO}_4$ , Sigma-Aldrich®).

Absorbance was measured on each sample at 600 nm with Fisherbrand™ Cell Density Meter at indicated timepoints. Growth curves are representative of at least 3 biological replicates.

### **4.9.3 PG Purification and Analysis**

PG sacculi were prepared from MG1655 and EM9 overday cultures in control, Fe-depleted and EDDHA Fe-depleted conditions at 21°C. When  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  reached 0.5, cultures were centrifuged during 10 min at 4,000 g at 4°C and resuspended in 5 ml phosphate buffered saline (PBS) buffer. Cells were added, drop by drop, in 10 ml of boiling 5% sodium dodecyl sulfate (SDS, Sigma). Liebig condenser was used to avoid evaporation during boiling steps. Cells were boiled for 2 hours, and preparations were cooled overnight at room temperature.

PG samples were processed and analyzed as described previously (Alvarez, Hernandez, de Pedro, & Cava, 2016; Desmarais, De Pedro, Cava, & Huang, 2013). PG sacculi were pelleted by ultracentrifugation for 15 min at 60,000 rpm (TLA100 Beckman rotor, Optima Max-TL Ultracentrifuge, Beckman) and washed 3 times by repeated cycles of centrifugation and resuspension in Milli-Q water. Afterwards, samples were digested with pronase E (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) in Tris-HCl 10 mM pH 7.5 buffer for 1 hour at 60°C to remove Braun's lipoproteins. After addition of SDS 1% (w/v) (final concentration), reactions were heat-inactivated and SDS detergent was removed by further washing steps. The samples were treated with muramidase (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 16 hours at 37°C, in 50 mM phosphate buffer, pH 4.9. Muramidase digestion was stopped by boiling, coagulated proteins were removed by centrifugation (10 min, 14,000 rpm) and the supernatants were reduced with

15  $\mu$ l 0.5 M sodium borate pH 9.5 and sodium borohydride (10 mg/ml final concentration, 30 min at room temperature). Finally, samples (100  $\mu$ l) were adjusted to pH 3.5 with phosphoric acid.

Ultra-Performance Liquid Chromatography (UPLC) analyses of muropeptides were performed on a Waters UPLC system (Waters Corporation, USA) equipped with an ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130 $\text{\AA}$ , 1.7  $\mu$ m, 2.1 mm X 150 mm (Waters, USA). Elution of muropeptides was detected at 204 nm. Muropeptides were separated at 35 $^{\circ}$ C using a linear gradient from buffer A (phosphate buffer 50 mM pH 4.35) to buffer B (phosphate buffer 50 mM pH 4.95 methanol 15% (v/v)) in a 20-minute run, with a 0.25 ml/min flow.

Identification of each muropeptide was performed by comparison of the retention-times and mass spectrometric data to known samples. Quantification was done by integrating peak areas of each muropeptide in the chromatogram and normalized to their molar ratio. Main PG features were calculated as follows: percentage of monomers, dimers, trimers and tetramers was calculated by adding the relative molar abundances of the different oligomers; overall crosslink was calculated as dimers + (trimers  $\times$  2) + (tetramers  $\times$  3); percentage of anhydro muropeptides was calculated by adding the relative molar abundances of the different anhydro species; and average glycan chain length was calculated by dividing 100 by the percentage of anhydro muropeptides. Samples were analyzed in triplicates and t-tests performed for statistical comparisons.

#### **4.9.4 Flow Cytometry**

Once a culture OD<sub>600nm</sub> reached 0.35, 1 ml of cells were centrifuged at 12,000 rpm at the respective culture temperature. Cells were washed twice, resuspended in 1 ml of PBS

buffer and transferred to a polycarbonate flow cytometry tube. Then, 2  $\mu$ l of 2-[6-(4'-hydroxy)phenoxy-3*H*-xanthen-3-on-9-yl]benzoic acid (HPF) (Sigma<sup>®</sup>, #H4290) was added. After 30 min of incubation with HPF, cells were analyzed in a Becton Dickinson FACScalibur<sup>®</sup>. The threshold was set on forward and side scatter on WT populations grown in control conditions at 21°C or 37°C. HPF fluorescence signal settings (ex./em.: 490/515 nm) threshold were normalized to WT populations grown in control conditions without the HPF probe at 21°C or 37°C. At least 30,000 events were acquired per sample.

#### 4.9.5 $\beta$ -galactosidase Assay

SOS response activation through *suA* promoter fusion with *lacZ* reporter were measured by the Miller assay (Miller, 1992). Blocking solution was made of Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M; O-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) 4 mg/ml and sodium phosphate buffer 0.1M pH 7. Lysis solution is composed of 25 ml  $\beta$ -mercaptoethanol, 5 ml toluene, 5 ml MnSO<sub>4</sub> 0.02 M and 5 ml 10% SDS. The blank consisted of 500  $\mu$ l Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 M, 800  $\mu$ l sodium phosphate buffer, 200  $\mu$ l ONPG 4 mg/ml and 50  $\mu$ l lysis solution. Cells were grown until OD<sub>600nm</sub> of 0.35 and cooled on ice for 10 minutes. Cells were lysed using lysis buffer for 10 min at 28°C and incubated at 28°C with ONPG solution and sodium phosphate buffer until coloration appeared. The reaction was stopped using 500  $\mu$ l of the Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution. Enzyme activities were represented in Miller Units (Miller, 1992), OD<sub>420nm</sub> and OD<sub>550nm</sub> were measured with Beckman Coulter DU-64 UV-VIS<sup>™</sup>.

#### 4.9.6 Microscopy

For bacterial morphology observations, 1  $\mu$ l of fresh culture was applied to an agarose pad on a slide and covered by a cover slip. Images were captured on a Nikon Eclipse<sup>™</sup> 80i with Plan Fluor 100x Oil Ph3 DLL objective and Color Camera Nikon DS-Ri2.

### 4.9.7 CPRG Assay

The CPRG phenotype was observed on CPRG agar plates as described previously (Paradis-Bleau et al., 2014). One colony of each strain was plated to form an X and incubated overnight at 21°C in aerobic or anaerobic condition. CPRG agar plates were made of LB broth, 1.5% agar (Biobasic<sup>®</sup>), 20 mg/ml CPRG and 50 µM IPTG. Anaerobic conditions for CPRG agar plates were performed with a BD™ GazPak™ system.

### 4.9.8 Statistical Analysis

GraphPad PRISM<sup>®</sup> Software (Inc., San Diego CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) was used for all statistical analyses. To determine significance of the data ( $p < 0.05$ ), t-test (unpaired) or ANOVA was performed. All experiments were performed at least in biological triplicates.

## 4.10 Acknowledgements

We thank Pr. Hallenbeck for providing advice and materials, and Gary Sharples for critical reading of the manuscript. Research performed in the Paradis-Bleau laboratory was funded by Université de Montréal and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). Research at the Cava Laboratory was funded by the Laboratory of Molecular Infection Medicine Sweden (MIMS), the Swedish Research Council, the Kempe Foundation, and the Knut and Alice Wallenberg Foundation (KAW).

## 4.11 References

- Almiron, M., Link, A. J., Furlong, D., & Kolter, R. (1992). A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes Dev*, 6(12B), 2646-2654. DOI:10.1101/gad.6.12b.2646
- Alvarez, L., Hernandez, S. B., de Pedro, M. A., & Cava, F. (2016). Ultra-Sensitive, High-Resolution Liquid Chromatography Methods for the High-Throughput Quantitative Analysis of Bacterial Cell Wall Chemistry and Structure. In H.-J. Hong (Ed.), *Bacterial Cell Wall Homeostasis: Methods and Protocols* (pp. 11-27). New

- York, NY: Springer New York. ISBN: 978-1-4939-3676-2.  
[http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3676-2\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-3676-2_2).
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 215-237. DOI:10.1016/s0168-6445(03)00055-x
- Baharoglu, Z., & Mazel, D. (2014). SOS, the formidable strategy of bacteria against aggressions. *FEMS Microbiol Rev*, 38(6), 1126-1145. DOI:10.1111/1574-6976.12077
- Bergan, T., Klaveness, J., & Aasen, A. J. (2001). Chelating agents. *Chemotherapy*, 47(1), 10-14. DOI:10.1159/000048495
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 13(1), 42-51. DOI:10.1038/nrmicro3380
- Brandel, J., Humbert, N., Elhabiri, M., Schalk, I. J., Mislin, G. L., & Albrecht-Gary, A. M. (2012). Pyochelin, a siderophore of *Pseudomonas aeruginosa*: physicochemical characterization of the iron(III), copper(II) and zinc(II) complexes. *Dalton Trans*, 41(9), 2820-2834. DOI:10.1039/c1dt11804h
- Brandi, G., Salvaggio, L., Cattabeni, F., & Cantoni, O. (1991). Cytocidal and filamentous response of *Escherichia coli* cells exposed to low concentrations of hydrogen peroxide and hydroxyl radical scavengers. *Environ Mol Mutagen*, 18(1), 22-27. DOI:10.1002/em.2850180105
- Budin, I., de Rond, T., Chen, Y., Chan, L. J. G., Petzold, C. J., & Keasling, J. D. (2018). Viscous control of cellular respiration by membrane lipid composition. *Science*, 362(6419), 1186-1189. DOI:10.1126/science.aat7925
- Butterton, J. R., & Calderwood, S. B. (1994). Identification, cloning, and sequencing of a gene required for ferric vibriobactin utilization by *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 176(18), 5631-5638. DOI:10.1128/jb.176.18.5631-5638.1994
- Caparros, M., Pisabarro, A. G., & de Pedro, M. A. (1992). Effect of D-amino acids on structure and synthesis of peptidoglycan in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174(17), 5549-5559. DOI:10.1128/jb.174.17.5549-5559.1992
- Catala, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids*, 157(1), 1-11. DOI:10.1016/j.chemphyslip.2008.09.004
- Cervantes, C., Campos-Garcia, J., Devars, S., Gutierrez-Corona, F., Loza-Tavera, H., Torres-Guzman, J. C., & Moreno-Sanchez, R. (2001). Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol Rev*, 25(3), 335-347. DOI:10.1111/j.1574-6976.2001.tb00581.x
- Chao, K. L., Lim, K., Lehmann, C., Doseeva, V., Howard, A. J., Schwarz, F. P., & Herzberg, O. (2008). The *Escherichia coli* YdcF binds S-adenosyl-L-methionine and adopts an

- alpha/beta-fold characteristic of nucleotide-utilizing enzymes. *Proteins*, 72(1), 506-509. DOI:10.1002/prot.22046
- Chiancone, E., & Ceci, P. (2010). The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. *Biochim Biophys Acta*, 1800(8), 798-805. DOI:10.1016/j.bbagen.2010.01.013
- Cook, G. M., Loder, C., Soballe, B., Stafford, G. P., Membrillo-Hernandez, J., & Poole, R. K. (1998). A factor produced by *Escherichia coli* K-12 inhibits the growth of *E. coli* mutants defective in the cytochrome bd quinol oxidase complex: enterochelin rediscovered. *Microbiology (Reading)*, 144 ( Pt 12), 3297-3308. DOI:10.1099/00221287-144-12-3297
- Desmarais, S. M., De Pedro, M. A., Cava, F., & Huang, K. C. (2013). Peptidoglycan at its peaks: how chromatographic analyses can reveal bacterial cell wall structure and assembly. *Mol Microbiol*, 89(1), 1-13. DOI:10.1111/mmi.12266
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H. R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L., & Bateman, A. (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue), D281-288. DOI:10.1093/nar/gkm960
- G.M. Makrigiorgos. (1999). Detection of Chromatin-Associated Hydroxyl Radicals Generated by DNA-Bound Metal Compounds and Antitumor Antibiotics. *Metal Ions in Biological Systems*, Volume 36, 521-546. DOI:https://doi.org/10.1201/9780203747605
- Hallenbeck, P. C., Clark, M. A., & Barrett, E. L. (1989). Characterization of anaerobic sulfite reduction by *Salmonella* Typhimurium and purification of the anaerobically induced sulfite reductase. *J Bacteriol*, 171(6), 3008-3015. DOI:10.1128/jb.171.6.3008-3015.1989
- Holtje, J. V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(1), 181-203. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529891>
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*, 57, 395-418. DOI:10.1146/annurev.micro.57.030502.090938
- Imlay, J. A. (2008). Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annu Rev Biochem*, 77, 755-776. DOI:10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. *Nat Rev Microbiol*, 11(7), 443-454. DOI:10.1038/nrmicro3032
- Imlay, J. A., & Linn, S. (1988). DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240(4857), 1302-1309. DOI:10.1126/science.3287616
- Imlay, J. A., S., C. M., & S., L. (1988). Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science, New Series, Vol. 240, No. 4852 (Apr. 29, 1988), pp. 640-642.*

- Kehrer, J. P. (2000). The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149(1), 43-50. DOI:10.1016/s0300-483x(00)00231-6
- Koppenol, W. H. (2001). The Haber-Weiss cycle--70 years later. *Redox Rep*, 6(4), 229-234. DOI:10.1179/135100001101536373
- Kouidmi, I., Alvarez, L., Collet, J. F., Cava, F., & Paradis-Bleau, C. (2018). The Chaperone Activities of DsbG and Spy Restore Peptidoglycan Biosynthesis in the *elyC* Mutant by Preventing Envelope Protein Aggregation. *J Bacteriol*, 200(19). DOI:10.1128/JB.00245-18
- Lau, C. K., Krewulak, K. D., & Vogel, H. J. (2016). Bacterial ferrous iron transport: the Feo system. *FEMS Microbiol Rev*, 40(2), 273-298. DOI:10.1093/femsre/fuv049
- Liochev, S. I., & Fridovich, I. (1999). Superoxide and iron: partners in crime. *IUBMB Life*, 48(2), 157-161. DOI:10.1080/713803492
- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. O., & Cronan, J. E., Jr. (1993). Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 57(3), 522-542. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8246839>
- Manat, G., Roure, S., Auger, R., Bouhss, A., Barreteau, H., Mengin-Lecreux, D., & Touze, T. (2014). Deciphering the metabolism of undecaprenyl-phosphate: the bacterial cell-wall unit carrier at the membrane frontier. *Microb Drug Resist*, 20(3), 199-214. DOI:10.1089/mdr.2014.0035
- Miller, J. H. (1992). *A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for and related bacteria* (C. S. H. L. Press Ed.).
- Mitchell, A. M., Wang, W., & Silhavy, T. J. (2017). Novel RpoS-Dependent Mechanisms Strengthen the Envelope Permeability Barrier during Stationary Phase. *J Bacteriol*, 199(2). DOI:10.1128/JB.00708-16
- Mousslim, C., Cano, D. A., & Casadesus, J. (1998). The *sfiX*, *rfe* and *metN* genes of *Salmonella Typhimurium* and their involvement in the His(c) pleiotropic response. *Mol Gen Genet*, 259(1), 46-53. DOI:10.1007/s004380050787
- Nina Mian, Alex Bateman. (2015). Species distribution of DUF218 protein domain (PF02698). Retrieved from <http://pfam.xfam.org/family/PF02698#tabview=tab7>
- Paradis-Bleau, C., Kritikos, G., Orlova, K., Typas, A., & Bernhardt, T. G. (2014). A genome-wide screen for bacterial envelope biogenesis mutants identifies a novel factor involved in cell wall precursor metabolism. *PLoS Genet*, 10(1), e1004056. DOI:10.1371/journal.pgen.1004056
- Parsons, J. B., & Rock, C. O. (2013). Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Prog Lipid Res*, 52(3), 249-276. DOI:10.1016/j.plipres.2013.02.002
- Petrat, F., de Groot, H., Sustmann, R., & Rauen, U. (2002). The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity. *Biol Chem*, 383(3-4), 489-502. DOI:10.1515/BC.2002.051
- Pryor, W. A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu Rev Physiol*, 48(1), 657-667. DOI:10.1146/annurev.ph.48.030186.003301

- Ramirez-Diaz, M. I., Diaz-Perez, C., Vargas, E., Riveros-Rosas, H., Campos-Garcia, J., & Cervantes, C. (2008). Mechanisms of bacterial resistance to chromium compounds. *Biometals*, *21*(3), 321-332. DOI:10.1007/s10534-007-9121-8
- Rida, S., Caillet, J., & Alix, J. H. (1996). Amplification of a novel gene, *sanA*, abolishes a vancomycin-sensitive defect in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *178*(1), 94-102. DOI:10.1128/jb.178.1.94-102.1996
- Rossmann, T. G. (1981). Effect of metals on mutagenesis and DNA repair. *Environ Health Perspect*, *40*, 189-195. DOI:10.1289/ehp.8140189
- Setsukinai, K., Urano, Y., Kakinuma, K., Majima, H. J., & Nagano, T. (2003). Development of novel fluorescence probes that can reliably detect reactive oxygen species and distinguish specific species. *J Biol Chem*, *278*(5), 3170-3175. DOI:10.1074/jbc.M209264200
- Simmons, L. A., Cohen, S. E., Foti, J. J., & Walker, G. C. (2008). The SOS Regulatory Network. *EcoSal Plus*, *3*(1). DOI:10.1128/ecosalplus.5.4.3
- Viti, C., Marchi, E., Decorosi, F., & Giovannetti, L. (2014). Molecular mechanisms of Cr(VI) resistance in bacteria and fungi. *FEMS Microbiol Rev*, *38*(4), 633-659. DOI:10.1111/1574-6976.12051
- Vollmer, W., Blanot, D., & de Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*, *32*(2), 149-167. DOI:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x
- Yongzhang Luo, Zhengxu Han, S. Michael Chin, & Linn, A. S. (1994). Three chemically distinct types of oxidants formed by iron-mediated Fenton reactions in the presence of DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci., Vol. 91*, pp. 12438-12442.
- Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., & Court, D. L. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*(11), 5978-5983. DOI:10.1073/pnas.100127597
- Zamojca, K., Zdrojowicz, M., Jacewicz, D., Wyrzykowski, D., & Chmurzynski, L. (2016). Fluorescent and Luminescent Probes for Monitoring Hydroxyl Radical under Biological Conditions. *Crit Rev Anal Chem*, *46*(2), 160-169. DOI:10.1080/10408347.2015.1045118
- Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T. M., Chiancone, E., & Chasteen, N. D. (2002). Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, *277*(31), 27689-27696. DOI:10.1074/jbc.M202094200
- Zweifel, U. L., & Hagstrom, A. (1995). Total counts of marine bacteria include a large fraction of non-nucleoid-containing bacteria (ghosts). *Appl Environ Microbiol*, *61*(6), 2180-2185. DOI:10.1128/AEM.61.6.2180-2185.1995



## 4.12 Figures

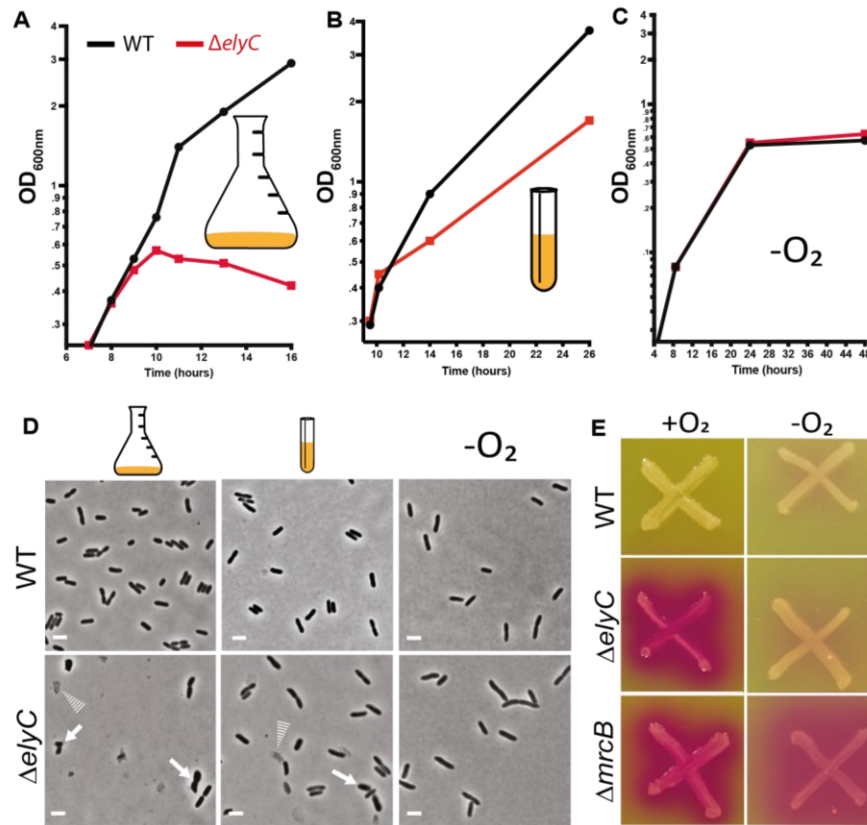


Figure 4.1. The envelope defect and lysis phenotype of  $\Delta$ elyC cells depend on medium aeration

(A-C) Growth curves of WT (black curves) and  $\Delta$ elyC (red curves) cells at 21°C, monitored at OD<sub>600nm</sub>. Cultures were grown as follows: (A) 25 ml in 250 ml Erlenmeyer flasks, (B) 5 ml in narrow 10 ml culture tubes; and (C) in anaerobic conditions (-O<sub>2</sub>), representative data set from experiments performed in biological triplicates. (D) Phase contrast microscopy imaging at 100X showing cell morphology observed after 12 hours of culture in flasks and culture tubes or after 24 hours for anaerobic growth. Cells were grown in the same conditions as in (A-C). Conditions are indicated by pictograms; respectively from left to right: Erlenmeyer flask, culture tube and anaerobic conditions. Solid arrows point to misshaped, bulging or lysing cells and dotted arrows point bacterial ghosts, scale bar = 3  $\mu$ m. (E) CPRG assay plate for the WT,  $\Delta$ elyC and  $\Delta$ mrcB strains incubated at 21°C in aerobic (+O<sub>2</sub>) and anaerobic conditions (-O<sub>2</sub>).

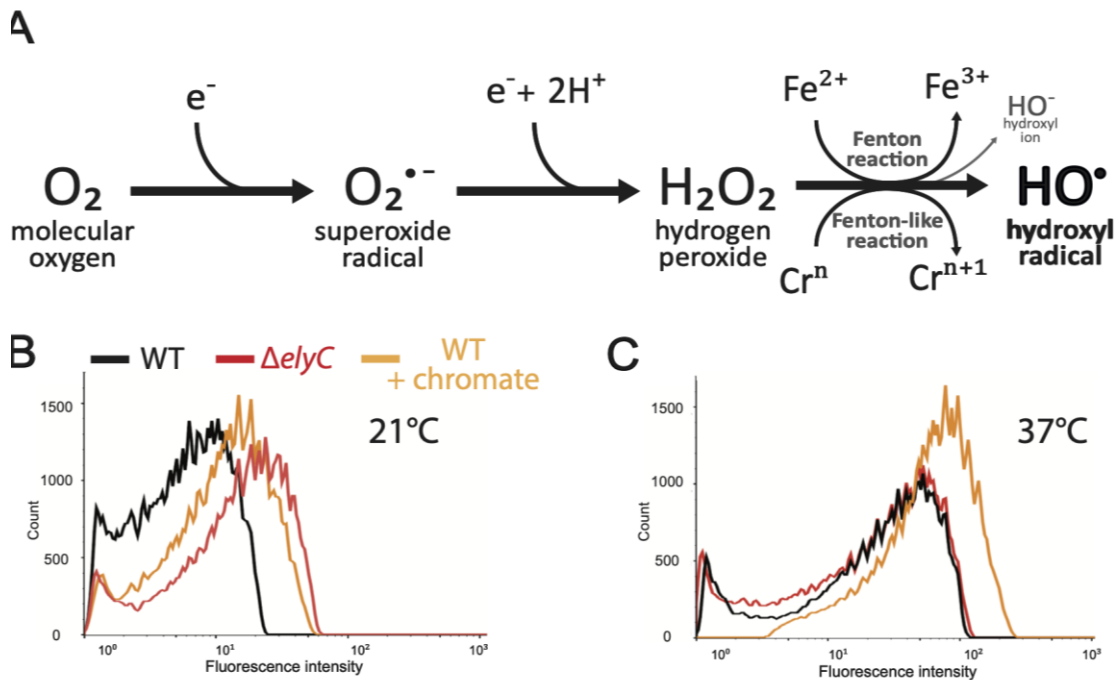


Figure 4.2.  $\Delta elyC$  mutant cells produce high levels of  $\text{HO}^\bullet$  at  $21^\circ\text{C}$

(A) Simplified molecular scheme representing the production of ROS, superoxide radical ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and hydroxyl radical ( $\text{HO}^\bullet$ ). Successive univalent electron ( $e^-$ ) leakages to oxygen form  $\text{O}_2^{\bullet-}$  and  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the presence of protons and free ferrous iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ).  $\text{HO}^\bullet$  are generated from  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the presence of  $\text{Fe}^{2+}$  through the Fenton reaction, releasing a hydroxyl ion ( $\text{HO}^-$ ) and ferric iron ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Chromium at its III or V ( $\text{Cr}^n$ ) oxidation state induces  $\text{HO}^\bullet$  production through a Fenton-like reaction (Ramirez-Diaz et al., 2008). (B and C) Flow cytometry histograms showing fluorescein detection at 515 nm ( $\pm 50$  nm) by the number of events from the HPF probe used to evaluate  $\text{HO}^\bullet$  levels at  $21^\circ\text{C}$  (B) and  $37^\circ\text{C}$  (C). WT cells (black curves),  $\Delta elyC$  cells (red curves), and WT cells grown with  $120 \mu\text{M}$  potassium chromate as a positive control on the assay for increased  $\text{HO}^\bullet$  production (orange curves).

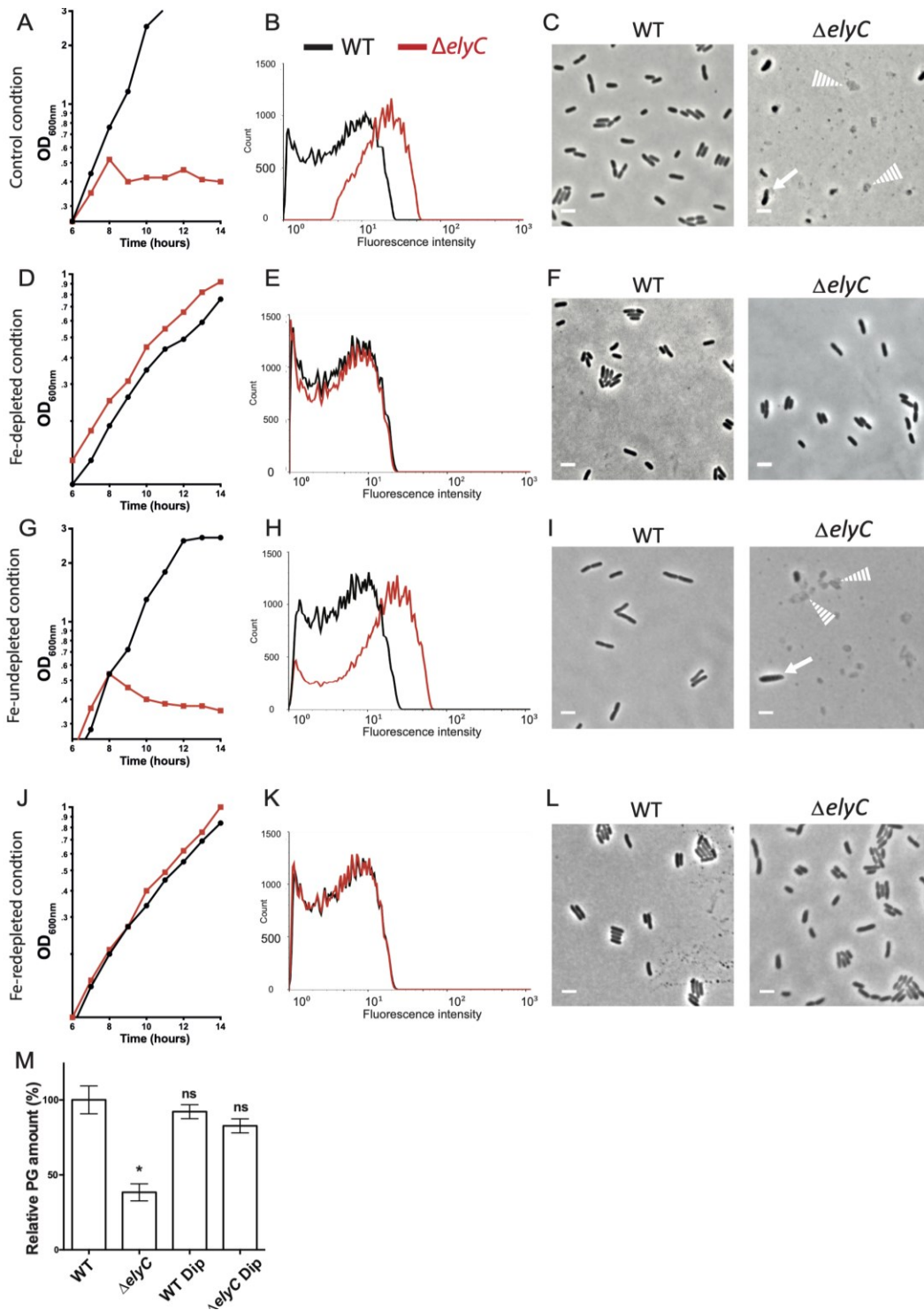


Figure 4.3. HO•-generating free iron is necessary for  $\Delta elyC$  PG synthesis inhibition and cell lysis at 21°C.

(A, D, G and J) Growth curves of WT (black curves) and  $\Delta elyC$  (red curves) cells grown in flasks. (B, E, H and K) Flow cytometry histograms reporting HPF probe fluorescence signal to measure HO<sup>•</sup> levels in WT (black curves) and  $\Delta elyC$  (red curves) cells grown until OD<sub>600nm</sub> = 0.35. (C, F, I and L) Phase contrast microscopy imaging at 100X showing cell morphology observed after 12 hours of culture. Solid arrows point to lysing or misshaped cells, dotted arrows point to bacterial ghosts, scale bar = 3  $\mu$ m. Specific growth conditions are indicated on the left of each serial figure line; A–C = control condition, D–F = Fe-depleted condition (cultures supplemented with 375  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl), G–I = Fe-undepleted condition (cultures supplemented with 375  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl and 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>), J–L = Fe-redepleted condition (cultures supplemented with 600  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl and 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>). (M) Bar graph showing the relative PG amount of WT and  $\Delta elyC$  cells grown with or without 375  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl (Dip) until OD<sub>600nm</sub> = 0.5. The total PG amount of WT cells was defined as the 100% reference point. Data expressed as mean  $\pm$  SEM, asterisk indicates a significant difference from the reference condition \* ( $P < 0.05$ ).

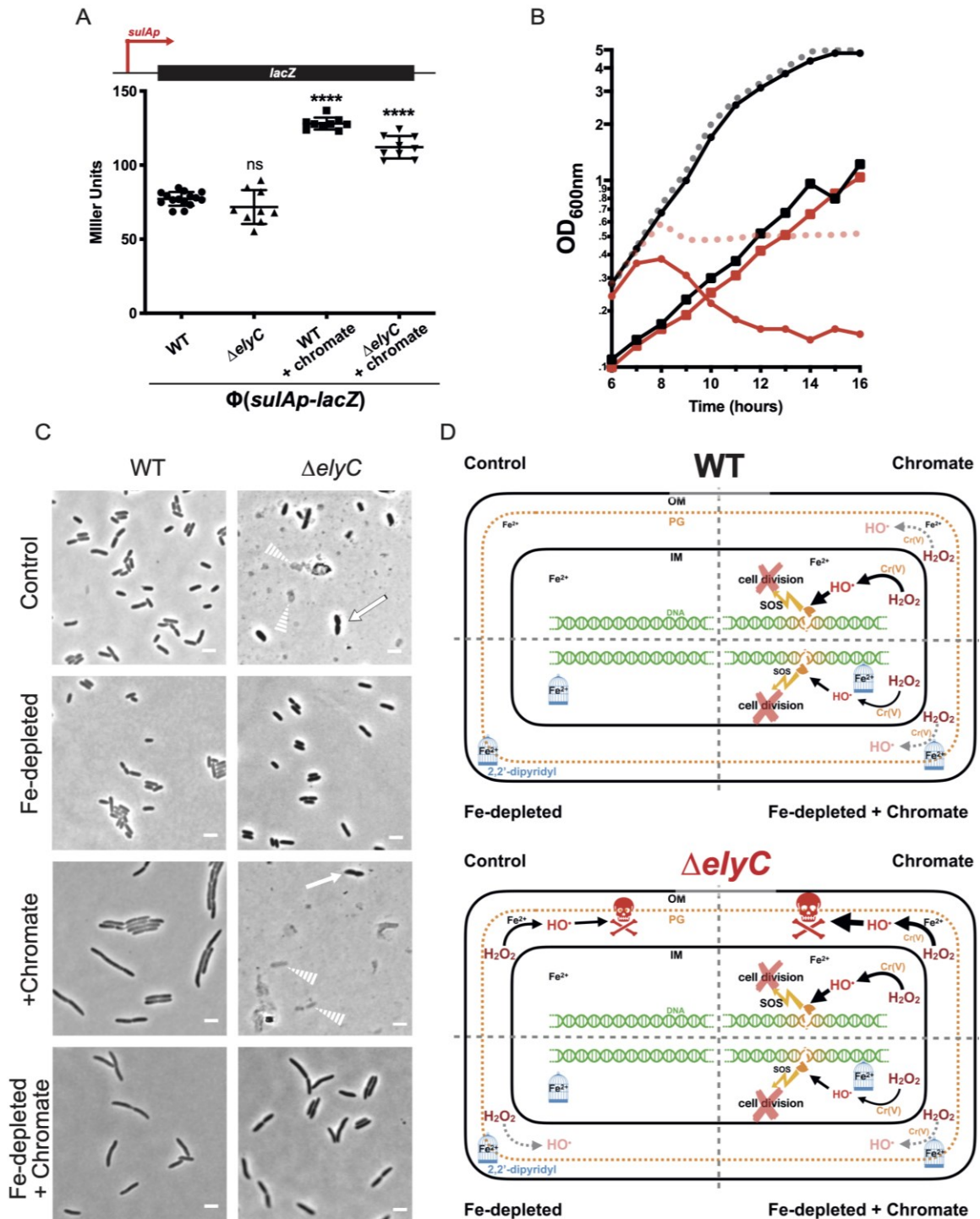


Figure 4.4.  $\Delta$ *elyC* mutant  $\text{HO}^\bullet$  overproduction does not occur in the cytoplasm  
 (A) Expression levels of the SOS-regulated *suIA* promoter, reported by LacZ  $\beta$ -galactosidase activity (measured in Miller Units) in WT and  $\Delta$ *elyC* (EM9) derived strains,

respectively SG24 and SG25. SG24 (MG1655,  $\Delta(lacI-lacZp)\Phi(Kan^R-sulAp-lacZ)$ ) and SG25 (EM9,  $\Delta(lacI-lacZp)\Phi(Kan^R-sulAp-lacZ)$ ). Promoter fusion is represented on top. Cells were grown under control conditions and with potassium chromate (chromate) at 125  $\mu$ M as a positive control for SOS response activation and was added upon culture set-up. Cells were harvested at  $OD_{600nm} = 0.35$ , except for chromate-treated  $\Delta elyC$  cells that were collected at  $OD_{600nm} = 0.15$ . Asterisks indicate a significant difference for chromate-treated cells compared to control WT cells,  $*(P < 0.05)$ . (B) Growth curves of WT (black curves) and  $\Delta elyC$  (red curves) cells. Cells were grown in control condition (dotted faint lines), or with 125  $\mu$ M chromate (full lines) added after 6 hours of incubation (T+6h). Cells were also grown without (●) or with (■) 375  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl a growth initiation (Fe-depleted, see Materials and Methods). (C) Phase contrast microscopy imaging at 100X of WT and  $\Delta elyC$  cells from growth curves in B harvested after 14 hours of growth. Solid arrows point to lysing or misshaped cells, dotted arrows point to bacterial ghosts, scale bar = 3  $\mu$ m. Chromate or 2,2'-dipyridyl was added at growth initiation. (D) Model representing the impact of oxidative stress in WT and  $\Delta elyC$  cells in control, Fe-depleted, chromate and Fe-depleted+chromate conditions. Skull represents lethal PG damages, blue cages represent 375  $\mu$ M of 2,2'-dipyridyl chelating free ferrous iron ( $Fe^{2+}$ ), Cr(V) represents chromium salt at his fifth oxidation state produced from oxidation of chromate (Cr(VI)) occurring in cells (it could also be represented as Cr(III)), lightning symbols represent SOS response activation (SOS). In the control condition, the overproduction of  $HO^*$  in the envelope of  $\Delta elyC$  cells through the Fenton reaction induces lethal PG defects. In the Fe-depleted condition,  $HO^*$  overproduction is inhibited by iron chelation, relieving the  $\Delta elyC$  mutant from the PG defect and lysis. When chromate is added to  $\Delta elyC$  mutant cells,  $HO^*$  produced from Fenton and Fenton-like reactions are adding up in the envelope, causing more damages than in the control condition, and accelerating the lysis phenotype. In the cytoplasm of WT and  $\Delta elyC$  cells,  $HO^*$  generated by the Fenton-like reaction induced by chromate causes DNA damages leading to SOS response activation and cell division inhibition. Adding chromate in the Fe-depleted condition leads to cell division inhibition in  $\Delta elyC$  cells. As the Fenton reaction is inhibited by the iron chelator, the native production of high levels of toxic  $HO^*$  in the envelope of  $\Delta elyC$  cells is suppressed. The  $\Delta elyC$  cells then phenocopy WT cells in reaction to chromate treatment. OM: outer membrane, PG: peptidoglycan, IM: inner membrane.

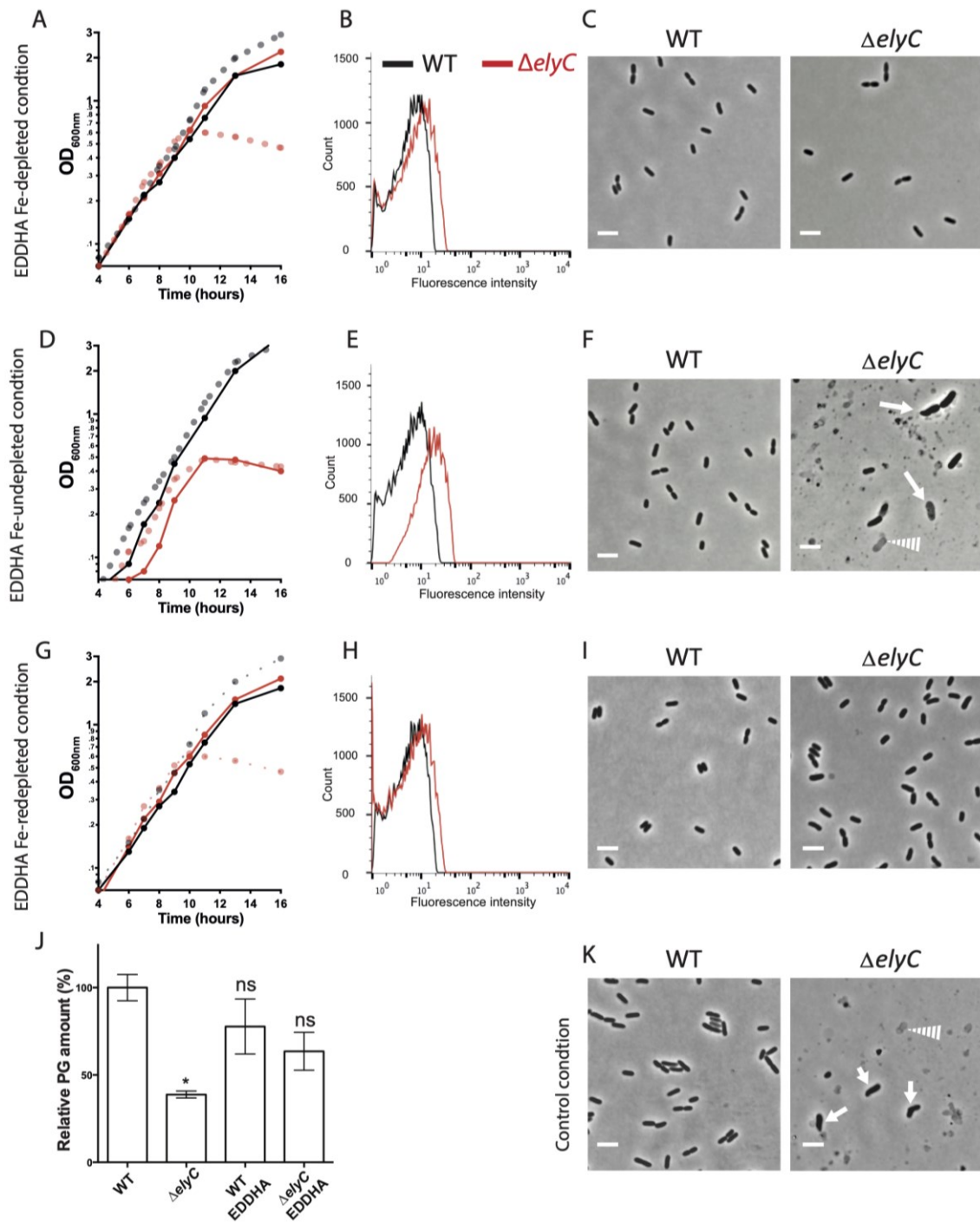


Figure 4.5. Extra-cytoplasmic free iron is necessary for  $\Delta$ elyC mutant PG defect and cell lysis at 21°C

(A, D and G) Growth curves of WT (black curves) and  $\Delta$ elyC (red curves) at 21°C. Solid growth curves represent bacteria grown in the condition annotated on the left of the

figure, bacteria grown in control conditions are represented in dotted lines. (B, E and H) Flow cytometry histograms using HPF probe for measuring HO<sup>•</sup> production in cells grown at 21°C at an OD<sub>600nm</sub> = 0.35, WT in black and *ΔelyC* in red. (C, F, I and K) Microscopy photographs of WT and *ΔelyC* cells at ~14h culture. Solid arrows point to lysing or misshaped cells, dotted arrows point to bacterial ghosts, 100X phase contrast objective. Scale bars = 3 μm. Corresponding growth conditions are indicated on the left: (A–C) EDDHA Fe-depleted condition (culture supplemented with 250 μM EDDHA); (D–F) EDDHA Fe-undepleted condition (culture supplemented with 250 μM EDDHA and 100 μM FeSO<sub>4</sub>); (G–I) EDDHA Fe-redepleted condition (culture supplemented with 100 μM FeSO<sub>4</sub> and 600 μM EDDHA); (K) Control condition. (J) Relative PG in amount of WT and *ΔelyC* cells grown under control conditions or in EDDHA Fe-depleted condition (EDDHA). Mean ± SEM. Asterisks indicate significant differences to WT grown without EDDHA \*(*P* < 0.05).



## 4.13 Supplemental Materials and Methods

### 4.13.1 Batch measurement of cell area and width using ImageJ.

For the different conditions, at least 100 cells were measured. Cells were counted using ImageJ (v. 1.53i). Images were converted and treated with the following macro in ImageJ Batch Process utility.

```
setOption("ScaleConversions", true);

run("16-bit");

setAutoThreshold("Default");

//run("Threshold...");

setAutoThreshold("Default");

run("Convert to Mask");
```

Then, cells measurement were batch processed using the following macro in ImageJ Batch Process utility.

```
title = getTitle;

    path = getInfo("image.directory");

print(title);

    print(path);

    //ids[i]=getImageID;

run("Analyze Particles...", "size=1-10 circularity=0.00-.9 display excludes clear summarize");

///For bacteria grown in presence of chromate

///run("Analyze Particles...", "size=1-50 circularity=0.00-.6 display excludes clear summarize");

selectWindow("Results");
```

Statistical analysis were processed using Graphpad® Prism 8.

### 4.13.2 Strains and Vectors Construction.

Plasmid pSG3 (**Tableau 4.1**) was constructed from the pKD13 (Datsenko & Wanner, 2000) derivative; vector pCB126 (**Tableau 4.1**). The *sulA* promoter was amplified on *E. coli* MG1655 with primers “P<sub>sulA</sub>-Sall-FWD” and “P<sub>sulA</sub>-EcoRI-REV”. Then, pCB126 and the Sall-*sulA*-EcoRI PCR fragment (**Tableau 4.1**) were digested with the Sall and EcoRI enzymes. Ligation was performed with T4 ligase. *E. coli* DH5 $\alpha$  was transformed with pSG3 using the Chung protocol (Chung et al., 1989). The recombining fragment “ $\Delta$ *lacI-lacZp\_kanR\_sulAp-lacZ*” containing: -107 to -68 bp upstream of the native *lacI* ORF region, kanamycin resistance gene, *sulA* promoter and -16 to +24 bp of the *lacZ* ORF, was constructed by overlap extension with primers “FusionPromLac-For” and “FusionPromLac-Rev” using pSG3 as a template. SG23 strain was constructed by electroporation of recombinant fragments “ $\Delta$ *lacI-lacZp\_kanR\_sulAp-lacZ*” on  $\lambda$  red recombinase competent *E. coli* TB10 strain (Johnson et al., 2004), with D. Yu *et al.* protocol (Yu et al., 2000). MG1655 and EM9 strains were transduced with SG23 P1 phage lysate were, creating respectively SG24 and SG25 strains. SG23, SG24 and SG25 strains containing the *sulA* promoter fusion with *lacZ* were verified by PCR and by Sanger sequencing using primer “*kanR-forward*” and “*lacZ-reverse*”. Restriction enzymes and T4 ligase were purchased from New England Biolab<sup>®</sup> Ltd, mini-prep kit were purchased from Fermentas<sup>®</sup>, kanamycin from Biobasic<sup>®</sup>, and JumpStart<sup>®</sup> taq polymerase from Sigma-Aldrich<sup>®</sup>.

Tableau 4.1. Table of strains, vectors and amplification fragments

| Strain                        | Genotype                 | Source                       |
|-------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| MG1655                        | <i>rph1 ilvG rfb-50</i>  | –                            |
| “ $\Delta$ <i>elyC</i> ”, EM9 | MG1655, <i>elyC::FRT</i> | (Paradis-Bleau et al., 2014) |

| " $\Delta mrcB$ ", MM39   | MG1655, <i>mrcB</i> ::FRT  |                                   | (Paradis-Bleau et al., 2014) |
|---------------------------|--|-----------------------------------|------------------------------|
| TB10                      | MG1655, <i>nadA</i> ::Tn10 $\lambda cl857 \Delta(cro-bioA)$              |                                   | (Johnson et al., 2004)       |
| SG23                      | TB10, $\Delta(lacI-lacZp)\Phi(Kan^R-sulAp-lacZ)$                         |                                   | This study                   |
| SG24                      | MG1655, $\Delta(lacI-lacZp)\Phi(Kan^R-sulAp-lacZ)$                       |                                   | This study                   |
| SG25                      | EM9, $\Delta(lacI-lacZp)\Phi(Kan^R-sulAp-lacZ)$                          |                                   | This study                   |
| Vectors                   | Features   | Origin                            | Source                       |
| pKD13                     | Amp <sup>R</sup> , <i>rgnB</i> (Ter), tL3 $\lambda$ (Ter)                | R6K $\gamma$                      | (Datsenko & Wanner, 2000)    |
| pCB126                    | Amp <sup>R</sup> , <i>rgnB</i> (Ter), <i>sodAP</i> , tL3 $\lambda$ (Ter) | R6K $\gamma$                      | (Paradis-Bleau et al., 2014) |
| pSG3                      | Amp <sup>R</sup> , <i>rgnB</i> (Ter), <i>sulAP</i> , tL3 $\lambda$ (Ter) | R6K $\gamma$                      | This study                   |
| <i>pMob-uppS</i>          | Amp <sup>R</sup> , <i>lacI</i> $\Omega$ , <i>tacP</i> :: <i>uppS</i>     | pBR322                            | (Paradis-Bleau et al., 2014) |
| <i>pMob-sanA</i>          | Amp <sup>R</sup> , <i>lacI</i> $\Omega$ , <i>tacP</i> :: <i>sanA</i>     | pBR322                            | (Paradis-Bleau et al., 2014) |
| <i>pMob-murA</i>          | Amp <sup>R</sup> , <i>lacI</i> $\Omega$ , <i>tacP</i> :: <i>murA</i>     | pBR322                            | (Paradis-Bleau et al., 2014) |
| PCR fragment              | Template   | Primers                           | Source                       |
| Sall- <i>sulAP</i> -EcoRI | <i>E. coli</i> MG1655  | Psfia-Sall-FWD<br>Psfia-EcoRI-Rev | This study                   |

#### 4.13.3 Primers.

Oligonucleotides were purchased from BioCorp®.

PsuIA-Sall-FWD: ATCGATGTCGACCGAGGCTCTTTCCGAAAATAGGGT

PsuIA-EcoRI-REV: GCGCATGAATTCAATCAATCCAGCCCCTGTGAGTTAC

FusionPromLac-For:

CGGAAGGCGAAGCGGCATGCATTTACGTTGACACCATCGTTGAGCGATTGTGTAGGCTG

FusionPromLac-Rev:

CAGTGAATCCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGTATCGTGAGGATGCGTCATC

kanR-forward: ATTCATCGACTGTGGCCGGC

*lacZ*-reverse: AGTTGGGTAACGCCAGGGTT

## 4.14 Supplementary Figures

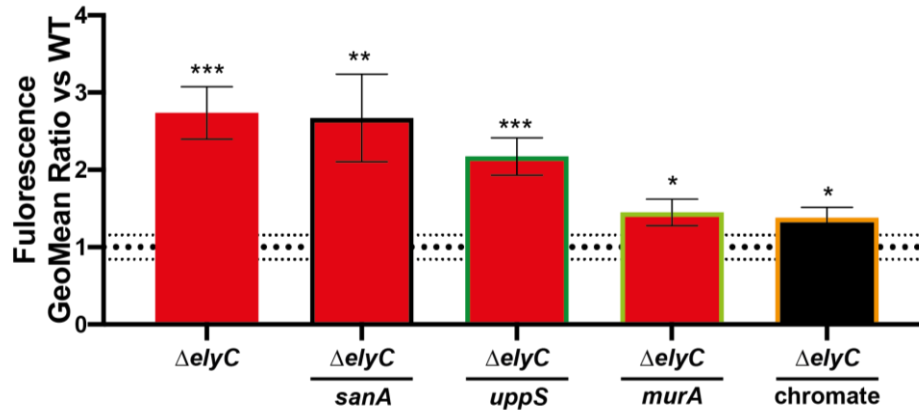


Figure 4.6. Effect of *uppS* and *murA* overexpression on HO<sup>•</sup> production in  $\Delta elyC$  mutant

Overexpression of the *uppS* and *murA* genes partially reduces HO<sup>•</sup> production in  $\Delta elyC$  mutant cells. Relative HPF fluorescence intensity geomean of WT and  $\Delta elyC$  cells, relative to the WT control grown at 21°C. All strains were cultivated in control condition (see materials and methods and supplemental material and methods), cells carrying a vector were grown in presence of 100  $\mu$ M IPTG. Overexpression of the *sanA* gene coding for another DUF218-containing protein in *E. coli* represents a negative control in the assay as it was shown to have no impact on  $\Delta elyC$  mutant phenotype (Paradis-Bleau et al., 2014). All experiments were performed in at least 3 biological replicates except for overexpression of *murA* which was performed in duplicate. Large dotted lines represent WT control fluorescence geomean ratio and the small dotted line represents its confidence interval. Culture conditions and vector construction are indicated in materials and methods and supplemental material and methods. Error bar represents geomean confidence intervals. Ordinary one-way ANOVA with Graphpad<sup>®</sup> Prism 8, ns(P>0.05), \*(P>0.05), \*\*(P>0.01), \*\*\*(P>0.001) and \*\*\*\*(P=0.0001).

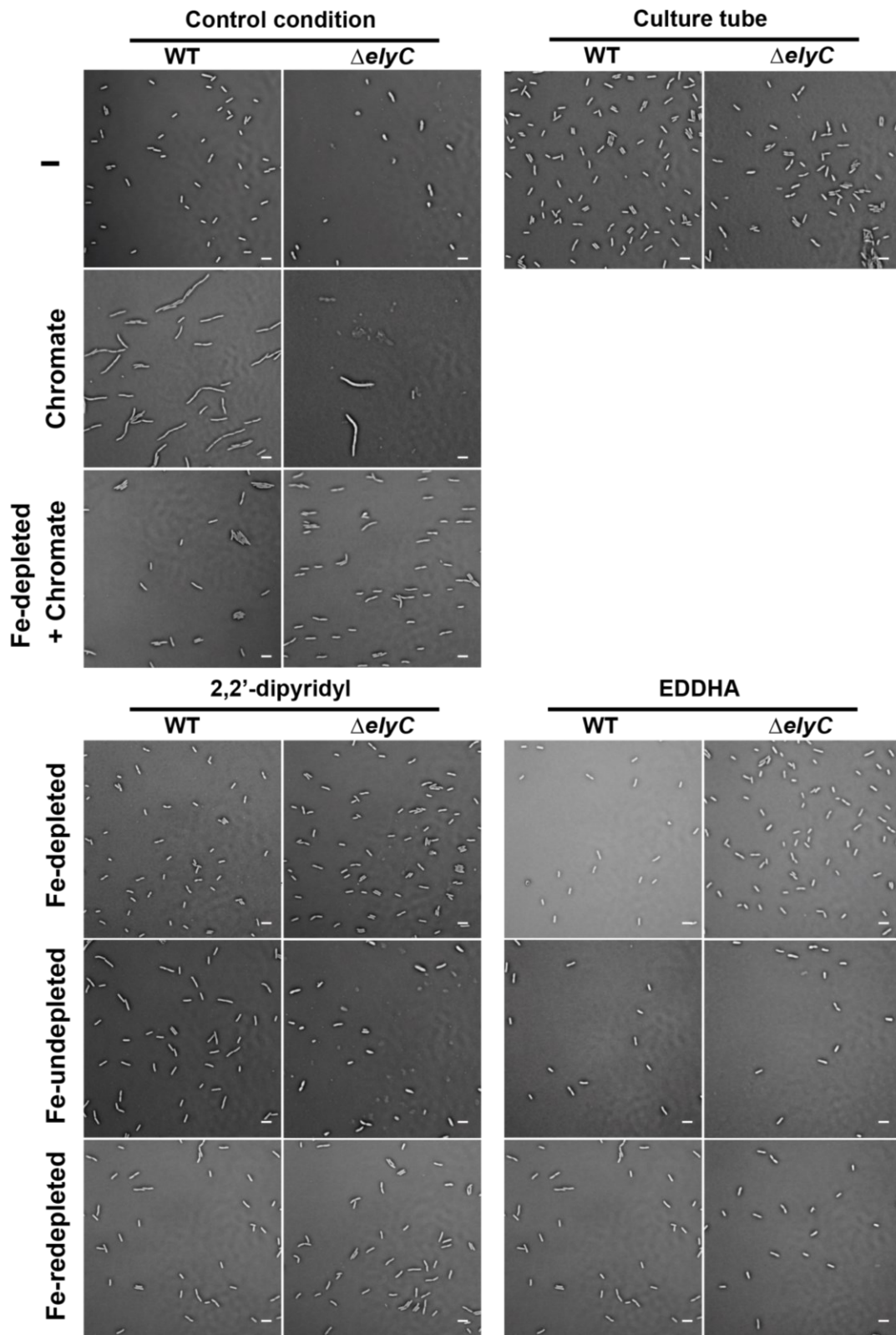


Figure 4.7. Representative microscopy images, showing larger panels of cells grown in different conditions

Microscopy photographs of fresh WT and  $\Delta e/yC$  mutant cells when  $OD_{600}$  reached 0.35 in the different conditions except for  $\Delta e/yC$  cells grown with chromate ( $OD_{600nm} \sim 0.20$  during lysis at  $\sim 8$  hours, when WT cells grown with chromate reached  $OD_{600nm}$  of 0.35). Fe-depleted condition (cultures supplemented with 375  $\mu M$  2,2'-dipyridyl), Fe-undepleted condition (cultures supplemented with 375  $\mu M$  2,2'-dipyridyl and 100  $\mu M$   $FeSO_4$ ), Fe-redepleted condition (cultures supplemented with 600  $\mu M$  2,2'-dipyridyl and 100  $\mu M$   $FeSO_4$ ), chromate condition (cultures supplemented with 125  $\mu M$  potassium chromate), Fe-depleted + chromate condition (cultures supplemented with 375  $\mu M$  2,2'-dipyridyl and 125  $\mu M$  potassium chromate), EDDHA Fe-depleted condition (culture supplemented with 250  $\mu M$  EDDHA), EDDHA Fe-undepleted condition (culture supplemented with 250  $\mu M$  EDDHA and 100  $\mu M$   $FeSO_4$ ); EDDHA Fe-redepleted condition (culture supplemented with 100  $\mu M$   $FeSO_4$  and 600  $\mu M$  EDDHA). Culture conditions are indicated in materials and methods. Scale bars = 5  $\mu m$ .

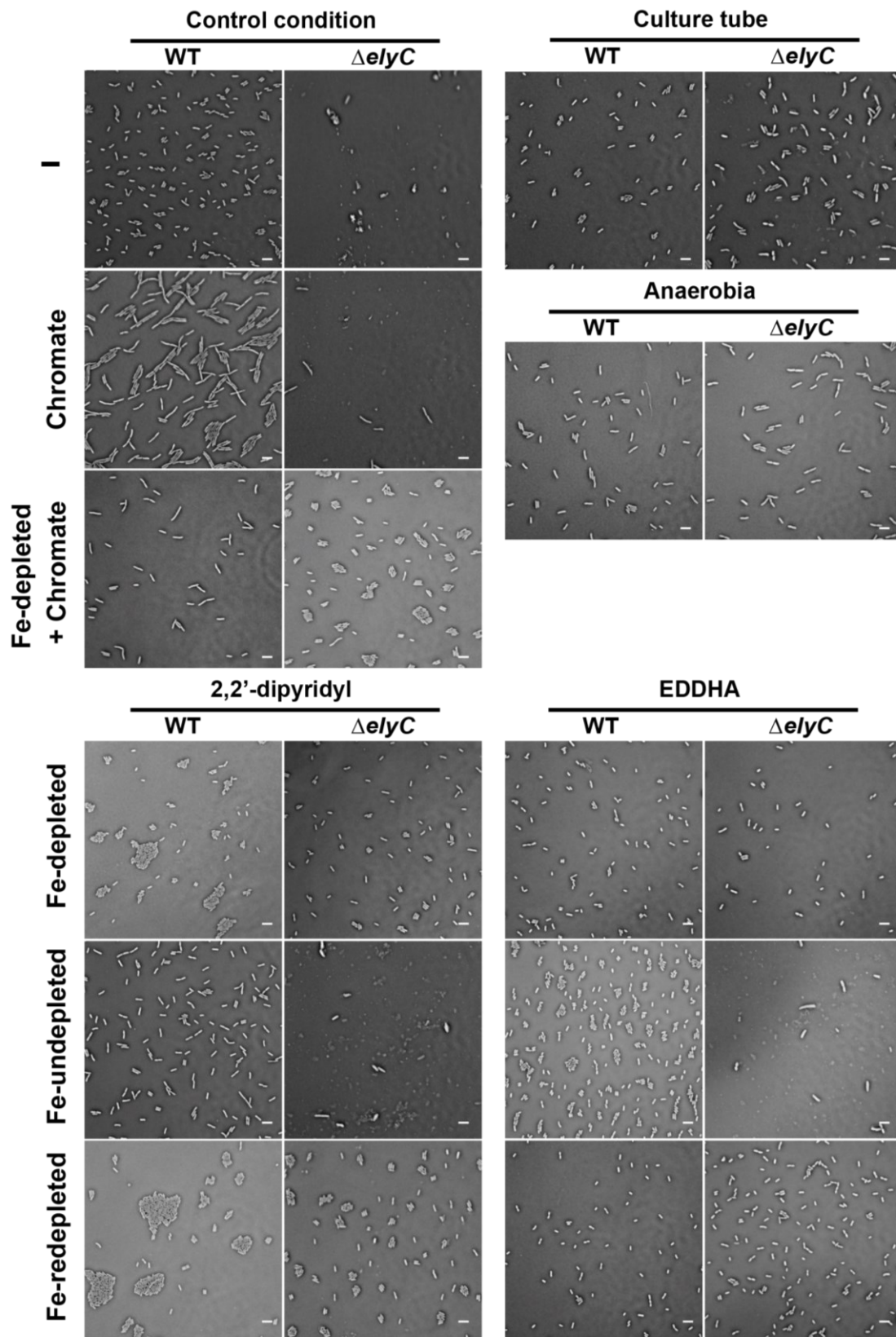




Figure 4.8. Representative microscopy images, showing larger panels of cells grown in different conditions for an extended period of time

Microscopy photographs of fresh WT and  $\Delta$ elyC mutant cells cultures after 14 hours in the different conditions, except for anaerobia (after 24 hours, OD<sub>600nm</sub> ~0.5). Fe-depleted condition (cultures supplemented with 375  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl); Fe-undepleted condition (cultures supplemented with 375  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl and 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>); Fe-redepleted condition (cultures supplemented with 600  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl and 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>); chromate condition (cultures supplemented with 125  $\mu$ M potassium chromate); Fe-depleted + chromate condition (cultures supplemented with 375  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl and 125  $\mu$ M potassium chromate); EDDHA Fe-depleted condition (culture supplemented with 250  $\mu$ M EDDHA); EDDHA Fe-undepleted condition (culture supplemented with 250  $\mu$ M EDDHA and 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>); EDDHA Fe-redepleted condition (culture supplemented with 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> and 600  $\mu$ M EDDHA). Culture conditions details are indicated in materials and methods. Scale bars = 5  $\mu$ m.

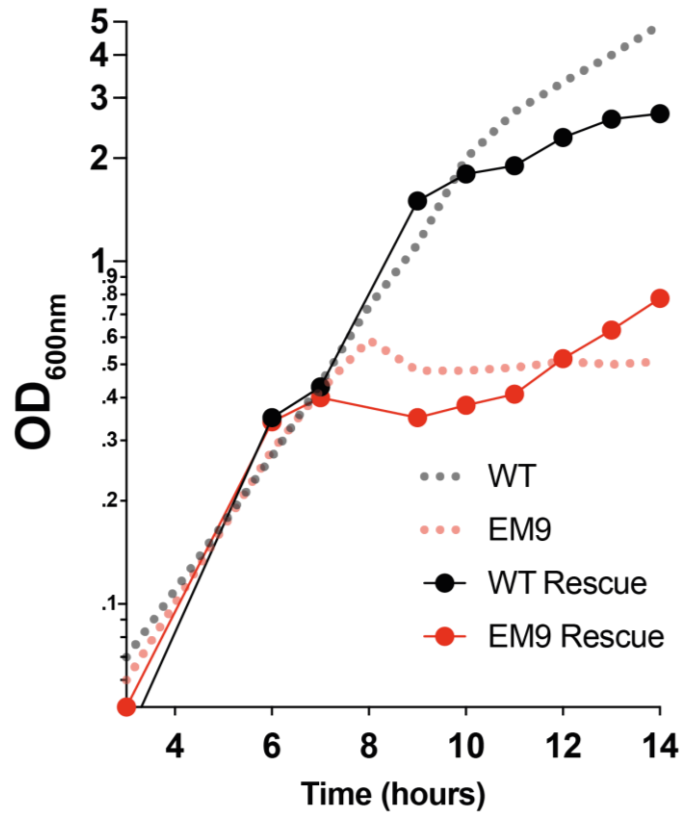


Figure 4.9.  $\Delta elyC$  cell lysis requires high levels of  $HO^{\bullet}$

Growth curves of WT (black curves) and  $\Delta elyC$  (red curves) cells grown in control condition (dotted faint lines) and with the addition of  $375 \mu M$  2,2'-dipyridyl after 6 hours (solid lines, "Rescue"). Adding 2,2'-dipyridyl 6 hours after growth initiation rescued the mutant from lysis. Culture conditions are indicated in materials and methods.

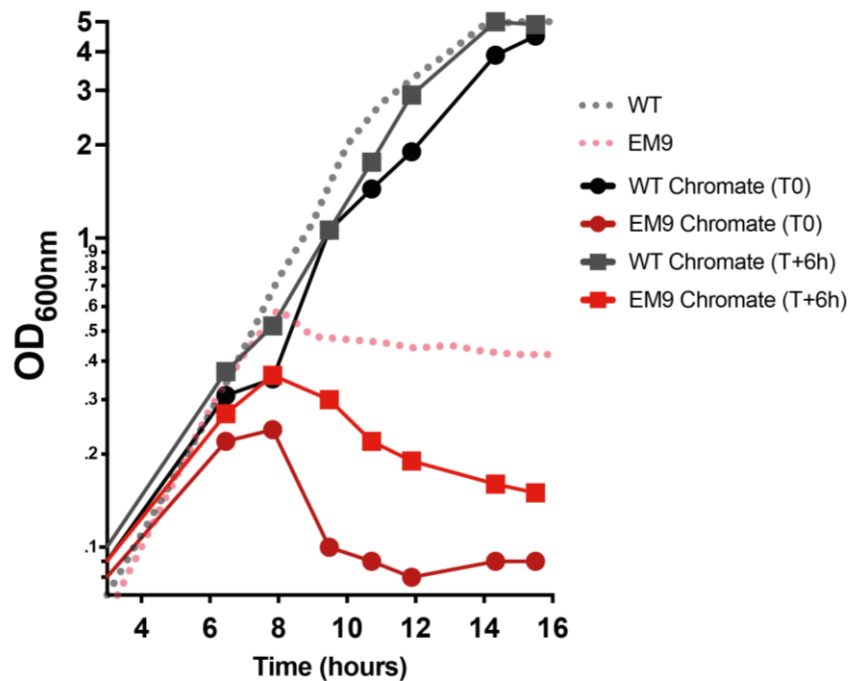


Figure 4.10. Exogenous HO<sup>•</sup>-generating potassium chromate induces a rapid and exacerbated lysis in  $\Delta eiyC$  cells.

Growth curves of WT (black curves) and  $\Delta eiyC$  (red curves) cells grown in control condition (dotted faint lines) or grown in presence of 125  $\mu$ M potassium chromate (solid curves). Chromate were added at growth initiation (T0) or was added 6 hours after growth initiation (H+6h). Adding potassium chromate to  $\Delta eiyC$  mutant cells at both growth initiation or 6 hours after growth initiation accelerated and worsened the lysis phenotype. Culture conditions are indicated in materials and methods. Representative growth curves of biological a triplicate.

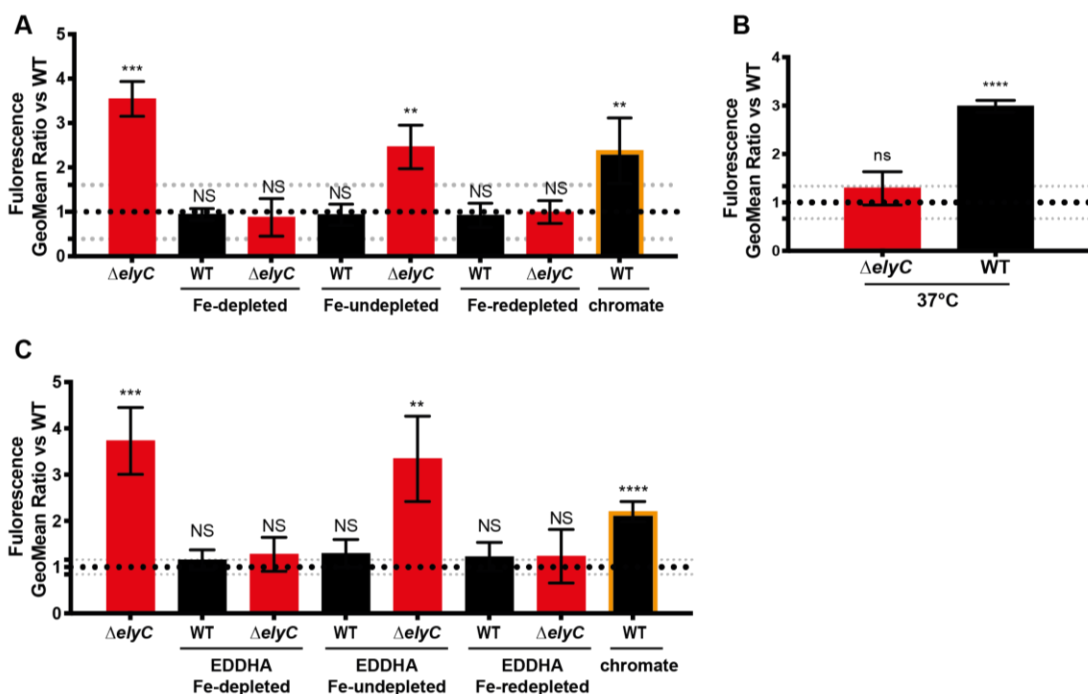


Figure 4.11. Statistical analysis of WT and  $\Delta$ elyC cells HPF fluorescence intensity

(A-C) Relative HPF fluorescence intensity geomean of WT and  $\Delta$ elyC cells, relative to the corresponding WT control (control condition at 21°C or 37°C). Large dotted lines represent WT control fluorescence geomean ratio and the small dotted line its confidence interval. Error bar represents confidence intervals. (A) Bacteria grown at 21°C in control condition, Fe-depleted condition (cultures supplemented with 375  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl); Fe-undepleted condition (cultures supplemented with 375  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl and 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>); Fe-redepleted condition (cultures supplemented with 600  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl and 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>); chromate condition (cultures supplemented with 125  $\mu$ M potassium chromate) as indicated in material and methods. Cells grown in presence of chromate were used as HO<sup>•</sup> overproducing cells positive control in the cytometry assay. (B) Bacteria grown at 37°C in control condition or with chromate for positive control. (C) Bacteria grown at 21°C in control condition, with chromate for positive control; EDDHA Fe-depleted condition (culture supplemented with 250  $\mu$ M EDDHA); EDDHA Fe-undepleted condition (culture supplemented with 250  $\mu$ M EDDHA and 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>); EDDHA Fe-redepleted condition (culture supplemented with 100  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub> and 600  $\mu$ M EDDHA) as indicated in material and methods. Ordinary one-way ANOVA were performed with Graphpad<sup>®</sup> Prism 8, ns( $P$ >0.05), \*( $P$ >0.05), \*\*( $P$ >0.01), \*\*\*( $P$ >0.001) and \*\*\*\*( $P$ =0.0001).

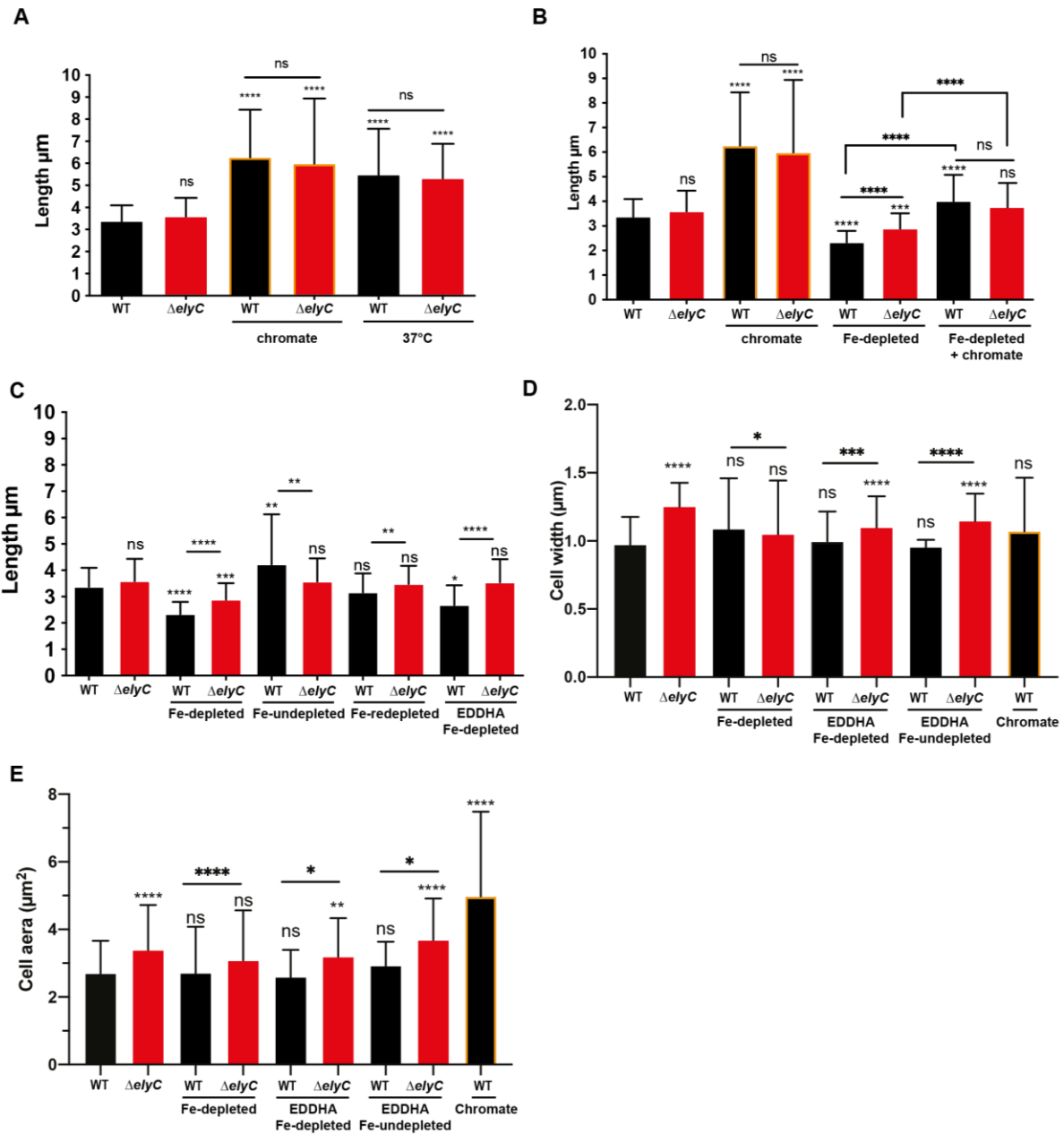


Figure 4.12. Bacterial cell length, width and surface area analysis.

Means  $\pm$  SD of WT and  $\Delta$ elyC cell length, width and surface in different conditions. No specification indicates that strains were grown in control conditions at 21°C. Measurements were performed on microscopy images collected at an OD<sub>600nm</sub> of 0.3 using ImageJ, see material and methods for culture conditions and supplemental material and methods for microscopy image analysis protocol. Cell length, width or surface area was compared to the WT grown in control condition. In this case statistical significance is represented by stars or “NS” directly above the corresponding

error bar. For comparisons between WT and mutant cells in the same condition, the statistical significance is indicated on top of the black line, placed above the corresponding bars. For facilitating value comparisons, measurements on WT and  $\Delta elyC$  cells grown in control condition were systematically reported on each graph. (A–C) Mean cell length ( $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ ) and cells were collected at  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  of 0.35. (A) Mean cell length in control condition at 21°C, in presence of 125  $\mu\text{M}$  potassium chromate (chromate) or grown at 37°C. Measurement of  $\Delta elyC$  mutant cells grown with chromate does not include lysed cells and cells were collected when WT cells reached  $\text{OD}_{600\text{nm}} = 0.3$ . (B) Effects of chromate and/or 375  $\mu\text{M}$  2,2'-dipyridyl (Fe-depleted) on cell length. (C) Mean cell length in Fe-depleted condition, Fe-undepleted condition (cultures supplemented with 375  $\mu\text{M}$  2,2'-dipyridyl and 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ ), Fe-redepleted condition (cultures supplemented with 600  $\mu\text{M}$  2,2'-dipyridyl and 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ ) and EDDHA Fe-depleted condition (culture supplemented with 250  $\mu\text{M}$  EDDHA). (D) Mean cell width ( $\mu\text{m} \pm \text{SEM}$ ) in control condition; Fe-depleted condition; chromate condition; EDDHA Fe-depleted condition; EDDHA Fe-undepleted condition. (E) Mean cell area ( $\mu\text{m}^2 \pm \text{SEM}$ ) of WT and  $\Delta elyC$  strain in control condition, Fe-depleted condition, chromate condition, EDDHA Fe-depleted condition and EDDHA Fe-undepleted condition. Ordinary one-way ANOVA was performed with Graphpad<sup>®</sup> Prism 8, ns( $P>0.05$ ), \*( $P>0.05$ ), \*\*( $P>0.01$ ), \*\*\*( $P>0.001$ ) and \*\*\*\*( $P=0.0001$ ).

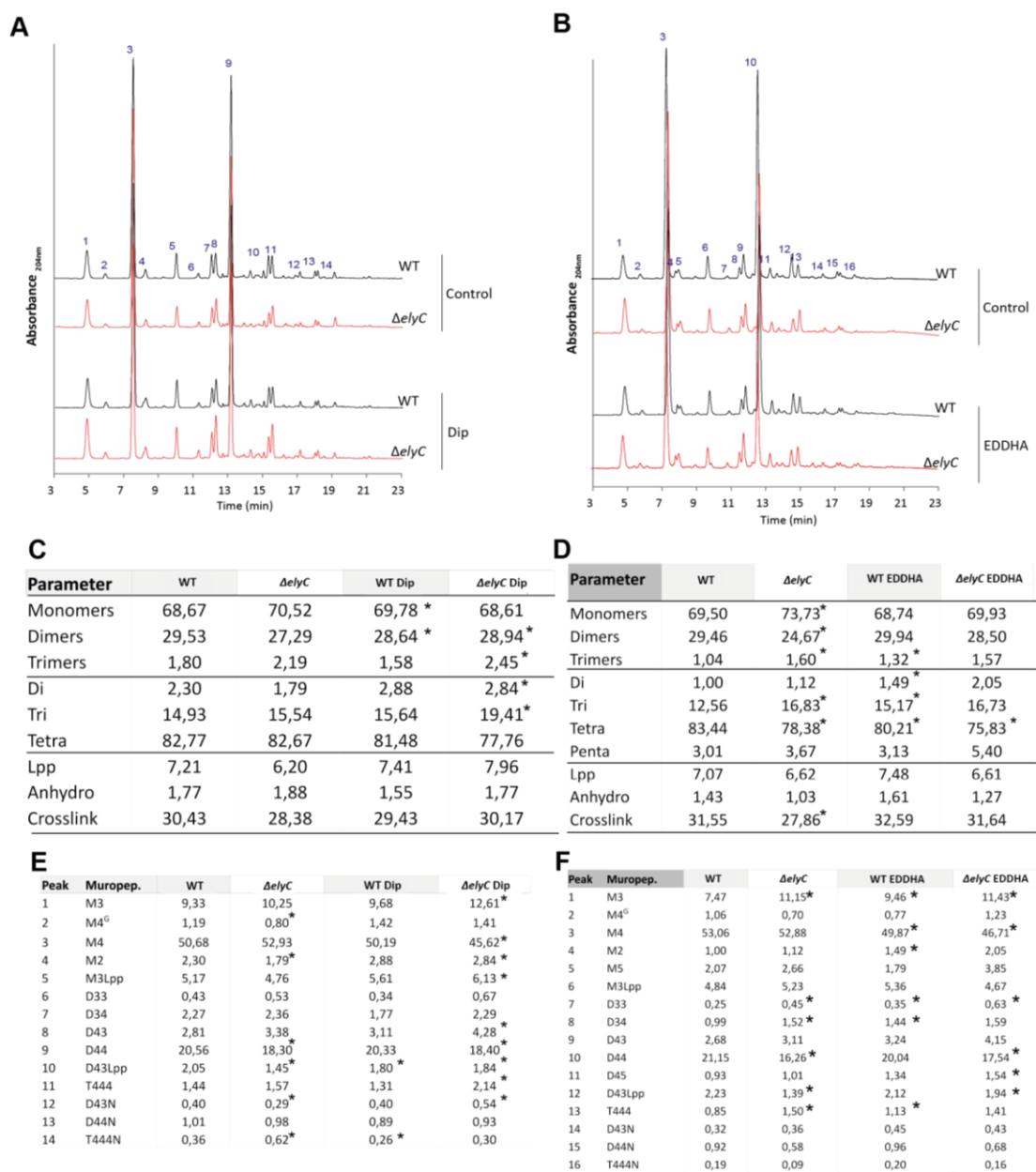


Figure 4.13. PG composition is not altered in  $\Delta$ elyC mutant cells

(A-B) PG profiles of WT and  $\Delta$ elyC mutant strains at 21°C. Representative chromatograms of muramidase-digested PG samples of WT and  $\Delta$ elyC cells at 21°C. (C-D) Tables summarize the relative molar abundance (%) of monomers, dimers, trimers, dipeptide (di), tripeptide (tri) and tetrapeptide (tetra) containing muropeptides, lipoprotein-bound muropeptides (Lpp) and muropeptides with a residue of (1-6 anhydro) N-acetylmuramic acid (anhydro). Data regarding the % of cross-linkage (proportion of crosslinked peptide side chains, calculated on dimers and trimers content) is also included. (E-F) Relative molar abundance of the interesting peaks

indicated in the chromatograms is calculated from the relative area of every peak and expressed as mean % value from three independent samples. (A, C and E) PG chromatograph, compositions and cross-linkage of WT and  $\Delta$ elyC cells grown with or without 375  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl (Dip). (B, D and F) PG chromatograph, compositions and cross-linkage of WT and  $\Delta$ elyC cells grown with or without 250  $\mu$ M ethylenediamin'-N,N'-bis(2-hydroxyphenylacetic) acid (EDDHA). Statistical analysis: t-test comparing each sample to the WT, in each condition. Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.01$ ). Culture conditions are indicated in materials and methods. Values represent mean from three independent cultures. M4: [N-acetylglucosamine (NAG)-N-acetylmuramic acid (NAM)]-tetrapeptide; M3: NAG-NAM-tripeptide ; M2: NAG-NAM-dipeptide ; M3-Lpp: NAG-NAM-tripeptide-Braun's lipoprotein (Lpp) ; N denotes termination in an anhydro-residue.

#### 4.15 Supplementary Information References:

- Chung, C. T., Niemela, S. L., & Miller, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(7), 2172-2175. DOI:10.1073/pnas.86.7.2172
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), 6640-6645. DOI:10.1073/pnas.120163297
- Johnson, J. E., Lackner, L. L., Hale, C. A., & de Boer, P. A. (2004). ZipA is required for targeting of DMinC/DicB, but not DMinC/MinD, complexes to septal ring assemblies in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 186(8), 2418-2429. DOI:10.1128/jb.186.8.2418-2429.2004
- Paradis-Bleau, C., Kritikos, G., Orlova, K., Typas, A., & Bernhardt, T. G. (2014). A genome-wide screen for bacterial envelope biogenesis mutants identifies a novel factor involved in cell wall precursor metabolism. *PLoS Genet*, 10(1), e1004056. DOI:10.1371/journal.pgen.1004056
- Yu, D., Ellis, H. M., Lee, E. C., Jenkins, N. A., Copeland, N. G., & Court, D. L. (2000). An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(11), 5978-5983. DOI:10.1073/pnas.100127597



## Préface au Chapitre 5

- **Introduction**

Dans l'article « *Overexpression of undecaprenyl pyrophosphate phosphatase *pgpB* suppresses the peptidoglycan synthesis defect of the  $\Delta$ *elyC* mutant* » que nous allons soumettre au cours de l'année 2021 à la revue *Journal of Bacteriology*, nous avons étudié l'importance du recyclage de l'undécaprenyl phosphate dans le phénotype de lyse du mutant  $\Delta$ *elyC*.

- **Liste des autrices et auteurs**

Sean Giacomucci, Hélène Barreteau, Thierry Touzé and Catherine Paradis-Bleau.

- **Contribution des auteurs**

Docteure Catherine Paradis-Bleau a conceptualisé, supervisé la recherche, acquis et géré les fonds nécessaires à son aboutissement et a participé à la correction de l'article. En tant que premier auteur, j'ai réalisé plus de la moitié des expériences de l'article, j'ai également participé à la conceptualisation, à la méthodologie et à l'analyse des résultats. J'ai effectué la rédaction de l'article et ai conçu les figures. Docteure Hélène Barreteau a participé à la réalisation des résultats notamment ceux portant sur la concentration de l'undécaprenyl phosphate et pyrophosphate. Docteur Thierry Touzé a construit les plasmides nécessaires à cette étude.



## Chapitre 5 – 4<sup>e</sup> Article

### Overexpression of undecaprenyl pyrophosphate phosphatase *pgpB* suppresses the peptidoglycan synthesis defect of the $\Delta$ *elyC* mutant

Sean Giacomucci\*, Hélène Barreteau<sup>‡</sup>, Thierry Touz  <sup>‡</sup> and Catherine Paradis-Bleau\*.

\*: Département de Microbiologie, infectiologie et immunologie, Faculté de Médecine, Université de Montréal, Montréal, QC H3T 1J4, Canada.

‡ : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France.

#### 5.1 Abstract

Peptidoglycan (PG) is an essential component of bacteria, protecting them against variations in osmotic pressure and preserving cell shape. We previously established the involvement of the ElyC factor in PG homeostasis in *Escherichia coli*, as the absence of ElyC caused a PG synthesis inhibition leading to lysis at room temperature. This defective phenotype could be suppressed by either disrupting the first biosynthesis step of the enterobacterial common antigen (ECA) biosynthesis pathway catalyzed by the *wecA*, or by overexpressing *uppS*, a gene involved in the *de novo* synthesis of the undecaprenyl pyrophosphate (C55-PP). Indeed, C55-PP is the precursor of the essential undecaprenyl phosphate (C55-P) lipid carrier used by both ECA and PG biosynthetic pathways. C55-PP requires to be dephosphorylated into C55-P before being used as such. Four enzymes are known to display a C55-PP phosphatase activity in *E. coli*: BacA, PgpB, YbjG and LpxT. We hypothesized that the absence of ElyC causes an imbalance in C55-P pool distribution in favor of ECA synthesis and to the detriment of PG production. To assess this hypothesis, we analyzed here the undecaprenyl pools (C55P and C55PP) in *E. coli* cells in the absence of *elyC*, *wecA*, or both genes. We also assessed the overexpression effect of the four genes coding for a C55-PP phosphatase *bacA*, *pgpB*, *ybjG* and *lpxT* in the  $\Delta$ *elyC* mutant. Our study showed an accumulation of C55-PP in the  $\Delta$ *elyC* mutant, and that the overexpression of *pgpB*

suppressed the  $\Delta$ elyC mutant PG synthesis defects by increasing recycling of the C55-P lipid carrier.

Keywords: ElyC, undecaprenyl pyrophosphate recycling, peptidoglycan, enterobacterial common antigen, PgpB

## 5.2 Introduction

Gram-negative bacteria envelope is a complex structure which play a crucial role in antibiotic resistance (Zgurskaya, Lopez, & Gnanakaran, 2015). This envelope is composed by two lipid membranes, the outer and inner membrane. Both membranes form a compartment in which the cell wall is located.

The cell wall is a rigid structure covering whole bacteria, which is essential for the resistance to osmotic pressure and the preservation of cell shape (Huang, Mukhopadhyay, Wen, Gitai, & Wingreen, 2008; Silhavy, Kahne, & Walker, 2010; Vollmer, Blanot, & de Pedro, 2008). The cell wall also represents the main source of targets for antibiotics (Hakenbeck, Brückner, & Henrich, 2010). The main component of the cell wall the peptidoglycan (PG), a polymer in which subunits are composed by N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid along with a pentapeptide (NAG-NAM-pentapeptide). These subunits are in association with others in linear strands through glycosidic linkages and the strands are cross-linked through peptide bonds (Vollmer et al., 2008). Synthesis of PG can be divided into three steps, firstly, UDP-NAM and UDP-NAG are formed in the cytoplasm and UDP-NAM is consecutively associated with five amino acids (**Figure 5.1**) (Typas, Banzhaf, Gross, & Vollmer, 2011). The second step occurs on the inner leaflet of the inner membrane, where the NAM-pentapeptide moiety is then transferred by MraY to the “universal lipid carrier” undecaprenyl phosphate (C55-P), to form the lipid I. The complete structure of the PG subunit ends with the addition of the NAG moiety, by the MurG enzyme, on the NAM moiety of lipid I, which forms the lipid II (Typas et al., 2011). Lipid II is then translocated to the outer leaflet of the membrane, and the final step consists in transferring the subunit to the existing cell wall macromolecule by the penicillin-binding proteins (PBPs), releasing the lipid carrier as

undecaprenyl pyrophosphate (C55-PP) (Typas et al., 2011). PG is constantly and finely rearranged, subunits are permanently added, modified, cleaved or cross-linked to allow cells to grow, maintain their shape and divide (Egan, Errington, & Vollmer, 2020; Typas et al., 2011).

In our previous study (Paradis-Bleau, Kritikos, Orlova, Typas, & Bernhardt, 2014), we developed an assay allowing screening of an entire *E. coli* single-gene knockout library of 3985 mutants, the Keio collection (Baba et al., 2006). Among others, the ElyC factor was identified. ElyC protein is predicted to be an intrinsic membrane protein of the inner membrane, with two membrane-spanning domains and a large periplasmic DUF218 domain of unknown function (Finn et al., 2008; Paradis-Bleau et al., 2014). DUF218 domain is highly conserved in all super kingdoms, but little is known about its function (Finn et al., 2008; Nina Mian, 2015). There are three other proteins containing a DUF218 domain in *E. coli*, i.e., SanA, YqjG and YdcF. Overexpression of *sanA* revealed to complement a vancomycin-susceptible mutant of *E. coli* (Rida, Caillet, & Alix, 1996). The YqjQ factor is predicted to be located in the inner membrane like ElyC, but no function has been found. Finally, YdcF is suspected to bind S-adenosyl-L-methionine, but for which no specific function has been identified and it may be implicated in anaerobic respiration (Chao et al., 2008).

The characterization of the  $\Delta$ *elyC* mutant showed no major defects at 37°C, but it featured lysis at late-exponential phase with a bulging morphology at room temperature (21–22°C) (Paradis-Bleau et al., 2014). The lysis observed in the  $\Delta$ *elyC* mutant proved to be caused by a PG synthesis defect as the incorporation of new PG subunits stopped at mid-exponential phase. Moreover, we previously reported that the overexpression of genes encoding enzymes involved in PG synthesis, i.e., MurA, or PBP1b or others that are involved in C55-P synthesis, like undecaprenyl pyrophosphate synthase (UppS), suppressed the cell-lysis phenotype of the  $\Delta$ *elyC* mutant (Paradis-Bleau et al., 2014).

Interestingly, deletion of genes coding for enzymes involved in early steps of enterobacterial common antigen (ECA) synthesis, i.e., WecA (Rfe), WecB and WecG was also shown to suppress the lysis phenotype of  $\Delta$ *elyC* strain (Paradis-Bleau et al., 2014). Conversely, deletion of genes

encoding enzymes involved in later steps, like RmlA and WecF, exacerbated the phenotype (Paradis-Bleau et al., 2014). Then, as ECA and PG biosynthetic pathways use the same lipid carrier C55-P, it was suggested that both pathways were competing for C55-P pool in a detrimental way in  $\Delta$ *elyC* strain.

C55-PP *de novo* synthesized or released from lipid II or lipid III<sup>ECA</sup> requires to be dephosphorylated into undecaprenyl phosphate (C55-P) to be used in ECA or PG biosynthesis (Manat et al., 2014; Rai & Mitchell, 2020; T. Touzé & D. Mengin-Lecreux, 2008). Consequently, when C55-PP is released from lipid II or lipid III<sup>ECA</sup>, it needs to be dephosphorylated and flipped back to the inner leaflet to be reused (Manat et al., 2014; Rai & Mitchell, 2020). Undecaprenyl recycling is very important for bacteria, as a default in C55-PP provoke cell lysis (Cherier et al., 2016; El Ghachi, Derbise, Bouhss, & Mengin-Lecreux, 2005). In *E. coli*, there are four enzymes known for having C55-PP phosphatase activity, BacA (also known as UppP), PgpB, YbjG and LpxT (YeiU) (T. Touzé & D. Mengin-Lecreux, 2008). But only simultaneous deletion of *bacA*, *ybjG* and *pgpB* is lethal, indicating that phosphatase activity is redundant, and mostly maintained by these three enzymes (El Ghachi et al., 2005).

BacA is an inner membrane protein that has phosphatase activity with C55-PP, in the periplasmic compartment (El Ghachi et al., 2018; Manat et al., 2015). *Escherichia coli* phosphatidyl glycerophosphate phosphatase or PgpB is located in inner membrane (Icho, 1988; Tian et al., 2020) and have its activity in the periplasm (Lu, Guan, Zhao, & Raetz, 2011). Indeed, PgpB possesses phosphatase activity with multiple substrates, namely lysophosphatidic acid, phosphatidic acid, phosphatidylglycerol pyrophosphate, diacylglycerol pyrophosphate, farnesyl pyrophosphate and, of course, C55-PP (Dillon et al., 1996; Ichio & Raetz, 1983; Lu et al., 2011; Tian et al., 2020). However, YbjG is an inner membrane protein and has a single known phosphatase activity on C55-PP (El Ghachi et al., 2005). The absence of this protein is associated with an increase in bacitracin sensitivity while its overexpression has been reported to induce resistance to bacitracin (Harel, Bailone, & Bibi, 1999). Finally, LpxT is an inner membrane enzyme which

transfers a phosphate group from C55-PP to Kdo2-lipid A (Tatar, Marolda, Polischuk, van Leeuwen, & Valvano, 2007; Touze, Tran, Hankins, Mengin-Lecreulx, & Trent, 2008).

In a previous study, we hypothesized that the absence of ElyC protein was causing at RT an imbalance in C55-P pool in favor of ECA over PG biosynthetic pathway. To assess this hypothesis, we analyzed the C55-P and C55-PP pools in  $\Delta elyC$ ,  $\Delta wecA$  and  $\Delta elyC \Delta wecA$  mutants. We observed a large accumulation of C55-PP in the  $\Delta elyC$  mutant, but that it was not the case in the  $\Delta wecA \Delta elyC$  double mutant. While overexpression of *lpxT*, *bacA* or *ybjG* did not suppress lysis in the mutant  $\Delta elyC$ , overexpression of *pgpB* did. However, *pgpB* overexpression in WT and  $\Delta elyC$  strains induced a reduction in growth kinetics and caused morphology defects. These results suggest that in the absence of ElyC protein an imbalance between ECA and PG biosynthetic pathways causing an accumulation of C55-PP, causing PG synthesis inhibition which could be reverted by *pgpB* overexpression through increased C55-P phosphatase activity.

## 5.3 Results

### Undecaprenyl Pools Analysis

We previously demonstrated that the lysis in the  $\Delta elyC$  mutant at room temperature is caused by a defect in PG synthesis (Paradis-Bleau et al., 2014). It was suggested at this time that the ECA biosynthetic pathway detrimentally competes with PG biosynthesis for the C55-P lipid carrier availability, in the absence of ElyC. To assess this hypothesis, we quantified the C55-P pool and C55-PP cellular pools in WT,  $\Delta elyC$ ,  $\Delta wecA$  and  $\Delta elyC \Delta wecA$  strains at 37°C and RT (**Figure 5.2, Supplementary Tableau 5.1-Tableau 5.3**) according to a previously described procedure (Barreteau et al., 2009).

At room temperature, compared to the WT, no significant difference could be observed in the different C55 pools, in  $\Delta wecA$  and  $\Delta wecA \Delta elyC$  mutants (**Figure 5.2A** and **Supplementary Tableau 5.2**). On the contrary, comparing the  $\Delta elyC$  mutant to the WT strain featured a 100% increase in

total C55 pool concentration in the mutant. This increase resulted from a 700% higher value in C55-PP (**Figure 5.2A** and **Supplementary Tableau 5.2**).

At RT, compared to 37°C, we observed that the  $\Delta elyC$  mutant C55-PP concentration was increasing significantly (about +129%) (**Figure 5.2AB** and **Supplementary Tableau 5.3**). Moreover, no significant difference could be noticed in the total C55 nor C55-P pools in  $\Delta elyC$ . Total C55 pool of WT strain grown at RT is more than 50% lower in concentration, as compared to 37°C (**Figure 5.2AB** and **Supplementary Tableau 5.3**). The reduction in C55 pool resulting from a 50% reduction of C55-P and an 80% reduction in C55-PP. Interestingly, it is also reduced in  $\Delta wecA$  and  $\Delta elyC\Delta wecA$  strains, but not in the  $\Delta elyC$  mutant (**Figure 5.2AB** and **Supplementary Tableau 5.3**).

At 37°C, by comparing to the WT strain,  $\Delta elyC$ ,  $\Delta wecA$  and  $\Delta elyC \Delta wecA$  mutants show a significantly lower concentration for total undecaprenyl pool, a decrease of 31%, 38% and 23% respectively (**Figure 5.2B** and **Supplementary Tableau 5.1**). In the  $\Delta elyC$  strain both pools are lower, C55-P (-31%) and C55-PP (-30%) being low. In contrast, in  $\Delta wecA$  and  $\Delta elyC \Delta wecA$  strains there is mainly a decrease of C55-PP values (-80% and -70% respectively) (**Figure 5.2B** and **Supplementary Tableau 5.1**). Also, C55-P concentration slightly but significantly higher in  $\Delta elyC\Delta wecA$  than in the  $\Delta elyC$  mutant (**Figure 5.2B** and **Supplementary Tableau 5.1**).

The most striking data between all strains and conditions is that we observed a higher C55-PP than C55-P concentration only in the  $\Delta elyC$  mutant at RT (**Figure 5.2**). In other words, the proportion of C55-PP over C55-P was by far the highest in the  $\Delta elyC$  mutant at RT (**Supplementary Figure 5.6**). Moreover, even at RT, the C55-P concentration in the  $\Delta elyC$  mutant is not significantly different from the WT, it is the lowest value observed in the whole experiment. As the disruption of the ECA synthesis pathway in a  $\Delta elyC$  context reduces the C55-PP concentration to the level observed in the WT strain, it suggests that the PG synthesis inhibition observed in the  $\Delta elyC$  mutant at RT may be caused by a defect in C55-PP recycling.



### Overexpression of *bacA*, *lpxT*, *pgpB* and *lpxT* Observed in the CPRG Assay

If the  $\Delta$ *elyC* mutant PG synthesis defects result from a default in C55-PP recycling, the overexpression of C55-PP phosphatase should suppress its defects. For this reason, we transformed the WT and  $\Delta$ *elyC* strains of *E. coli* with vectors carrying *bacA*, *pgpB*, *lpxT*, or *ybjG* gene under control of an IPTG-inducible promoter. We verified the CPRG phenotypes of the transformant at different IPTG concentrations, at RT and 30°C according to CPRG assay previously described (Paradis-Bleau et al., 2014). As a reminder, the CPRG assay is a qualitative test that indicates if bacteria exhibit increased cellular permeability or an increased tendency to lyses. A strain has a CPRG<sup>+</sup> phenotype if the bacterial spot turns pink while the WT does not. After a certain amount of time even the WT turns pink, CPRG phenotype is observed before the WT strain turns pink at precise time points, depending on the incubation temperature. In order to avoid too high background occurring at 37°C CPRG assay was used at 30°C and RT (Paradis-Bleau et al., 2014).

As shown in **Figure 5.3A**, at RT, *bacA* overexpression also suppressed the CPRG<sup>+</sup> phenotype in the  $\Delta$ *elyC* mutant at each IPTG concentration, while the overexpression of *pgpB* and *lpxT* required 250  $\mu$ M IPTG for a total suppression of CPRG<sup>+</sup> phenotype. Overexpression of *ybjG* did not restore the WT phenotype (**Figure 5.3A**).

At 30°C, overexpression of *bacA*, *pgpB* and *lpxT* totally suppressed the CPRG<sup>+</sup> phenotype in the  $\Delta$ *elyC* mutant, whichever the IPTG concentration tested (**Figure 5.3B**). On the other hand, overexpression of *ybjG* did not suppress it.

The WT strain turns pink after ~22 hours or ~8 hours while incubated at RT (21-22°C) or at 30°C respectively (not shown), but WT cells carrying pET-*bacA* did not display CPRG<sup>+</sup> phenotype, even after 36 hours at RT, neither after 24 hours at 30°C (**Supplementary Figure 5.7AB**). Equivalent results were obtained with the pET-*pgpB* vector at both temperatures, but to a lesser extent at 30°C, and also with pET-*ybjG* only at RT (**Supplementary Figure 5.7AB**). This effect was not observed with *lpxT*.

Overexpression of *bacA*, *pgpB* and *lpxT* suppress the  $\Delta$ *elyC* mutant defects at room temperature, but not overexpression of *ybjG*. Interestingly, *bacA* overexpression also delayed the apparition of pink color in WT. Besides these results,  $\Delta$ *elyC* strains carrying pET-*bacA* and pET-*lpxT* did not seem to grow as well as the WT strain, which could be more easily seen at (**Supplementary Figure 5.7AB**).

#### Overexpression of *bacA*, *pgpB* and *lpxT* did not suppress $\Delta$ *elyC* mutant growth defect on solid media

Growth capabilities of WT and  $\Delta$ *elyC* strains carrying *bacA*, *ybjG* or *lpxT* plasmids were tested at RT in a dot spot assay. Serial dilutions of cells grown at 37°C were spotted on LB agar medium supplemented with 0.5% glucose to repress the T7/lac operator promoter or in medium supplemented with IPTG at different concentrations and incubated at RT (see **Figure 5.4**).

As expected, overexpression of *ybjG* did not suppress the  $\Delta$ *elyC* mutant growth defect on solid media (**Figure 5.4**). Unexpectedly, as shown in **Figure 5.4** both *bacA* and *lpxT* overexpression did not suppress the  $\Delta$ *elyC* mutant growth defect at RT. Absence of *bacA* overexpression effect on  $\Delta$ *elyC* and WT strains were also confirmed by monitoring growth in liquid media (**Supplementary Figure 5.8**).

Overexpression of the *lpxT* gene also caused important growth defects to both WT and  $\Delta$ *elyC* strains (**Figure 5.4**). As growth of WT and  $\Delta$ *elyC* strains carrying pET-*lpxT* decrease when IPTG concentration increases, it indicates that overexpression of *lpxT* is toxic at RT.

#### Overexpression of *pgpB* Suppress Growth Defect of $\Delta$ *elyC* Mutant

Overexpression of *pgpB* at room temperature (RT, 21-22°C), unlike overexpression of *bacA* and *lpxT*, totally suppressed the  $\Delta$ *elyC* mutant growth defect on solid media at RT, with a least 100 or 250  $\mu$ M IPTG (**Figure 5.5A**). The fact that the  $\Delta$ *elyC* strain carrying pET-*pgpB* plasmid displayed the same behavior in presence of 0.5% glucose than the  $\Delta$ *elyC* strain indicates that the suppressive effect is specific to *pgpB* overexpression (**Figure 5.4** and **Figure 5.5A**).

Overexpression of the *pgpB* gene in WT had a significant reduction in growth kinetics in liquid media (**Figure 5.5B**). As expected, *pgpB* overexpression in the  $\Delta$ *elyC* strain suppressed the lysis in the mutant and restored growth kinetics similar to those of the WT carrying the same plasmid (**Figure 5.5B**).

WT strain carrying pET-*pgpB* grown in presence of 250  $\mu$ M IPTG after 10 h at RT showed a significant increase in cell length and filamentation, compared to the WT (**Figure 5.5D-E**). Similar phenotypic defects were observed in the  $\Delta$ *elyC* mutant, indicating that overexpression of *pgpB* was suppressing lysis, but was also inducing morphological defects.

## 5.4 Discussion

To assess the hypothesis that the absence of ElyC is responsible to a lack of C55-P availability for the PG synthesis pathway (Paradis-Bleau et al., 2014), we determined the concentrations of both C55-P and C55-PP cellular pools in WT,  $\Delta$ *elyC*,  $\Delta$ *wecA* and  $\Delta$ *elyC*  $\Delta$ *wecA* strains at RT and 37°C.

We observed in the  $\Delta$ *elyC*,  $\Delta$ *wecA* and  $\Delta$ *elyC*  $\Delta$ *wecA* mutants, significant differences in C55-P and C55-PP concentrations, compared to the WT at both 37°C and RT. In fact, at 37°C, we noticed a significantly lower total C55 pool in the  $\Delta$ *elyC* mutant than in the WT strain. Most importantly, at RT, compared to the WT strain we observed in the  $\Delta$ *elyC* mutant 100% more total C55 pool, corresponding to a 700% higher C55-PP concentration and a non-significant decrease in C55-P. This high C55-PP concentration in the  $\Delta$ *elyC* mutant seems to cause a huge imbalance in C55 pool.

In the  $\Delta$ *wecA*  $\Delta$ *elyC* double mutant, compared to the  $\Delta$ *elyC* mutant, disruption of the ECA biosynthesis reduced the mutant C55-PP concentration to WT level at RT and even below the WT level at 37°C. These results suggest that the defect in PG synthesis of the  $\Delta$ *elyC* mutant may be caused by a lack of C55-PP recycling. The disruption of ECA synthesis pathway may have increased the availability in C55-P for the PG synthesis pathway in the  $\Delta$ *elyC* mutant. Since the  $\Delta$ *elyC* mutant accumulates the C55-PP at RT, overexpression of genes coding for undecaprenyl pyrophosphate phosphatase should suppress  $\Delta$ *elyC* mutant defects.

Our hypothesis was further assessed by overexpressing *bacA*, *ybjG*, *lpxT* and *pgpB* under control of the T7 promoter/lac operator in the  $\Delta$ *elyC* mutant and looking at their CPRG phenotype. We noticed that overexpression of *bacA*, *pgpB* and *lpxT* totally suppressed the  $\Delta$ *elyC* mutant CPRG<sup>+</sup> phenotype at RT, while *ybjG* overexpression had no effect. Unexpectedly, overexpression of both *lpxT* and *bacA* did not improve growth of the  $\Delta$ *elyC* mutant at any IPTG concentration on solid media. Moreover, overexpression of *lpxT* was revealed to be toxic at RT, with reducing growth capabilities of both WT and  $\Delta$ *elyC* strains. This result is not surprising given that *lpxT* overexpression was also reported toxic for *E. coli* at 37°C (Falchi et al., 2020), we hypothesized that the suppression of CPRG<sup>+</sup> is caused by reduction in growth rates. The contradictory results observed in the CPRG and dot plot assay with the overexpression of *bacA* in the  $\Delta$ *elyC* mutant may result from a partial suppression of the mutant defect. As the CPRG assay is an indirect indicator of cell envelope viability, these opposite results may also result from a side effect of *bacA* overexpression on the cells envelope preventing CPRG and  $\beta$ -galactosidase encounter. In any case, the activity of BacA on CPRG<sup>+</sup> phenotype in  $\Delta$ *elyC* and WT and the absence of correlation with the growth assay results remains unclear.

Overexpression of *pgpB* successfully suppressed the  $\Delta$ *elyC* growth defect at RT on solid and in liquid media. Growth kinetics resulting from *pgpB* overexpression in the WT and  $\Delta$ *elyC* strain were similar, but the growth kinetics were significantly reduced compared to the WT in control condition. Observation under the microscope revealed no lysis nor bulging but an equivalent increase in cell length for both strains. As PgpB has a phosphatase activity on other substrates than C55-PP, like farnesyl pyrophosphate, diacylglycerol pyrophosphate and phosphatidylglycerol-phosphate (Lu et al., 2011; Manat et al., 2015), side effects of its overexpression could come from an increase in activity on other substrates than C55-PP. As growth kinetics and cell morphologies were equivalent but not similar to the WT strain under control conditions, we cannot conclude without a doubt that overexpression of *pgpB* suppress lysis in the  $\Delta$ *elyC* mutant by decreasing C55-PP or increasing C55-P concentrations.

The absence of WecA protein was previously shown to totally disrupt ECA synthesis from the first step (Amer & Valvano, 2002; Lehrer, Vigeant, Tatar, & Valvano, 2007), and as we observed it reduced C55-PP concentration at 37°C and RT. Thus, indicating that when the ECA pathway is functional it is causing accumulation of C55-PP, suggesting that this pathway is slowing down the recycling turnover. Therefore the C55-PP recycling turnover was also apparently reduced in the  $\Delta$ *elyC* mutant, the default is restored upon ECA synthesis disruption. These data are thus consistent with the hypothesis that loss of ElyC induces an imbalance between PG and ECA biosynthetic pathways, in favor of the latter for the C55-P pool.

C55-PP is an important inhibitor of Pbp1B, moreover, PgpB and also *bacA* to a lesser extent was shown to restore Pbp1B activity through C55-PP dephosphorylation *in vitro* (Hernandez-Rocamora et al., 2018). Since lysis in the  $\Delta$ *elyC* mutant is caused by a PG synthesis deficiency and could be suppressed through *mrcB*, *uppS* or *pgpB* overexpression (Giacomucci, Alvarez, Rodrigues, Cava, & Paradis-Bleau, manuscript submitted to review; Paradis-Bleau et al., 2014), it strongly suggests that the elevated C55-PP concentration observed in the  $\Delta$ *elyC* mutant at RT (**Figure 5.1**) had a direct effect on the mutant PG synthesis, and that there is a strong default of C55-PP recycling.

We previously showed that the  $\Delta$ *elyC* mutant PG synthesis was altered, here we propose that in the absence of ElyC at RT, the ECA biosynthetic pathway is enhanced to the detriment of the PG synthesis pathway. C55-PP is accumulating in the outer leaflet of the inner membrane therefore inhibiting PBP1b. As consequence, less C55-P is available for PG synthesis, and addition of a new PG subunit is too slow to maintain bacteria growth. While diverse enzymes involved in remodeling PG are active, cell wall is too weak and finally do not resist to osmotic pressure, extracellular medium flows into cells, membranes bulge, up to lysis.

While some insight has been made, the exact role of ElyC remains undetermined; further analysis is necessary to understand it, and deciphers PG and ECA homeostasis. Such as quantifying undecaprenyl-linked ECA and PG intermediates in absence of ElyC. It was also interesting to

observe that a lower temperature induces reduction of C55-P and C55-PP concentrations in WT (**Figure 5.2**) when we noticed a higher PG synthesis at RT over 37°C (data not published).

## 5.5 Materials and Methods

### 5.5.1 Bacterial strains and plasmids

Strains used in this study derive from *Escherichia coli* K12, wild type (WT) refers to MG1655 strain (Blattner et al., 1997), and the  $\Delta$ *elyC* mutant (MG1655, *elyC*ΦFRT). Single mutant  $\Delta$ *wecA* correspond to (MG1655, *wecA*::FRT) except for HPLC assays, where it refers to (MG1655, *wecA*::kanR), double mutant  $\Delta$ *elyC*  $\Delta$ *wecA* to CB380 (MG1655, *elyC*::FRT *wecA*::FRT) (Paradis-Bleau et al., 2014). Overexpression vectors in cells that carry *bacA*, *pgpB*, *ybjG* and *lpxT* were cloned downstream of the T7 promoter/*lac* operator on pET vector carrying ColE1 replication origin and ampicillin resistance genes.

### 5.5.2 Growth Conditions and Monitoring

Overday culture was prepared using 10 ml LB 1% NaCl in 250 ml flask at initial OD<sub>600nm</sub> of 0.02 from an overnight culture, as previously described as control conditions (Giacomucci et al., manuscript submitted to review). Room temperature corresponds to 21-22°C. Monitoring was performed on overday culture as indicated in Giacomucci et al. (2021) (Giacomucci et al., manuscript in preparation). Overnight cultures of strains carrying pET plasmid were grown in presence of 50 µg/ml carbenicillin (ThermoFisher #10177012). Each growth curve is representative of at least three biological replicates, error bars represent SD.

### 5.5.3 Extraction, purification and HPLC quantification of C55-PP and C55-P from *E. coli*

Cell pellets harvested from 100 mL cultures of the four different strains (3 independent cultures in each case) were treated essentially as described previously (Barreteau et al., 2009). One half of the cell pellet was first submitted to the procedure of Kato et al. (Kato et al., 1999) allowing the

conversion of C55-PP to C55-P, and lipids were in all cases extracted according to the Bligh and Dyer procedure (Bligh & Dyer, 1959) with slight modifications (Barreteau et al., 2009). All extracts were analyzed by HPLC as described previously, following injections of standard commercial isoprenoid lipids under the same conditions to ensure the calibration and the quantification of these lipids in cell extracts.

#### **5.5.4 CPRG Spot Assays**

CPRG phenotype was observed on chlorophenol red- $\beta$ -D-galactopyranoside (CPRG, Roche<sup>®</sup> #10884308001) agar plates with a slight modification of the protocol previously described (Paradis-Bleau et al., 2014). For each strain, two colonies were gently solubilized in 40  $\mu$ l LB 1% NaCl medium. Then, 5  $\mu$ l droplets were spotted on plates and incubated at RT or 37°C, photographs were taken respectively after 19 hours and 5 hours. CPRG plates were made of LB medium with 1% NaCl, 1.5% agar (Biobasic<sup>®</sup>), 20 mg/ml CPRG and 50, 100, 250, 500 or 1000  $\mu$ M IPTG (Thermo Scientific<sup>™</sup>, #R0392).

#### **5.5.5 Dilution Spot Assays**

Overnight cultures, with OD<sub>600nm</sub> adjusted at 2 and containing 50  $\mu$ g/ml ampicillin when necessary, were serially diluted from 10<sup>-1</sup> to 10<sup>-6</sup>. Five microliter aliquots of each dilution were spotted on LB agar plates containing 1% NaCl, and 0.5% NaCl glucose or 50, 100, 250, 500 or 1000  $\mu$ M IPTG. Plates were incubated at 21°C, and photographs were taken after three days.

#### **5.5.6 Microscopy Assay**

Microscopy samples were collected at 10 hours after initiation of overday growth, as described previously (Giacomucci et al., manuscript in preparation). Shots were taken with Nikon Eclipse<sup>™</sup> 80i, equipped with Plan Fluor 100x Oil Ph3 DLL Objective and Nikon DS-Ri2 Color Camera. To improve visibility, lookup tables were inverted. Bacterial cell length and width were determined by using Fiji 1.53i batch tools for measurements. For WT and  $\Delta$ *elyC* strains, surface range was set from 1 to 5  $\mu$ m<sup>2</sup> or from 1 to 20  $\mu$ m<sup>2</sup> for those carrying a pET-*pgpB* vector. For each replicate, 388

to 1534 cells were measured, averaging length and width statistically compared between strains using a two-way ANOVA. Cell measurement was done on biological triplicates for WT,  $\Delta$ *elyC*,  $\Delta$ *elyC* pET-*pgpB* strains and on duplicates for WT pET-*pgpB* strain.

### 5.5.7 Statistical Analysis

GraphPad PRISM® Software (Inc., San Diego, CA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) was used for all statistical analyses. To determine if data is significant ( $p < 0.05$ ), t-test (unpaired) or ANOVA was performed. All experiments were performed at least in biological triplicates.

## 5.6 References

- Amer, A. O., & Valvano, M. A. (2002). Conserved aspartic acids are essential for the enzymic activity of the WecA protein initiating the biosynthesis of O-specific lipopolysaccharide and enterobacterial common antigen in *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading)*, 148(Pt 2), 571-582. DOI:10.1099/00221287-148-2-571
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2, 2006 0008. DOI:10.1038/msb4100050
- Barreteau, H., Magnet, S., El Ghachi, M., Touze, T., Arthur, M., Mengin-Lecreulx, D., & Blanot, D. (2009). Quantitative high-performance liquid chromatography analysis of the pool levels of undecaprenyl phosphate and its derivatives in bacterial membranes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877(3), 213-220. DOI:10.1016/j.jchromb.2008.12.010
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453-1462. DOI:10.1126/science.277.5331.1453
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol*, 37(8), 911-917. DOI:10.1139/o59-099
- Chao, K. L., Lim, K., Lehmann, C., Doseeva, V., Howard, A. J., Schwarz, F. P., & Herzberg, O. (2008). The *Escherichia coli* YdcF binds S-adenosyl-L-methionine and adopts an alpha/beta-fold characteristic of nucleotide-utilizing enzymes. *Proteins*, 72(1), 506-509. DOI:10.1002/prot.22046
- Cherier, D., Giacomucci, S., Patin, D., Bouhss, A., Touze, T., Blanot, D., Mengin-Lecreulx, D., & Barreteau, H. (2016). Pectocin M1 (PcaM1) Inhibits *Escherichia coli* Cell Growth and

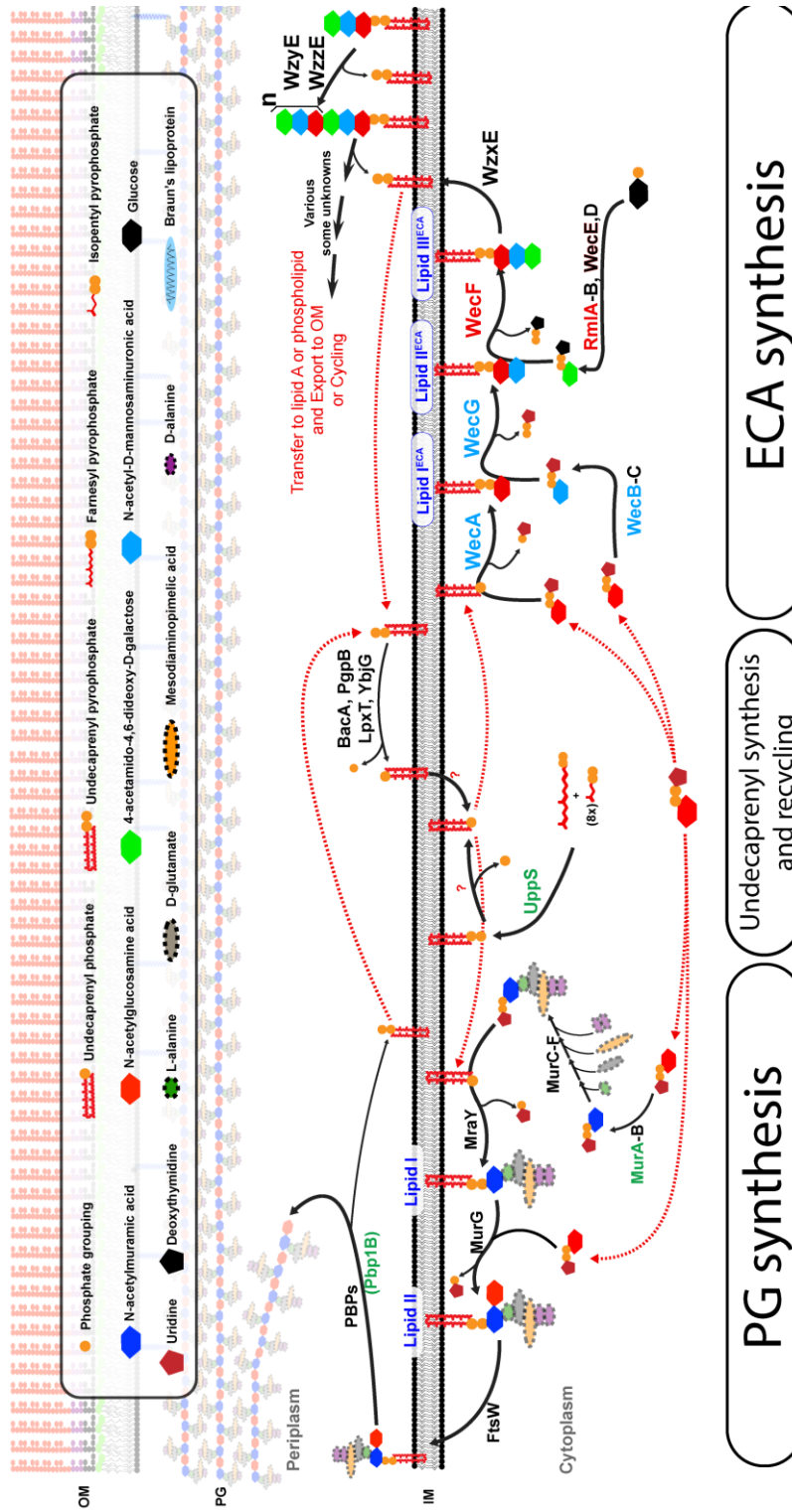


- Peptidoglycan Biosynthesis through Periplasmic Expression. *Antibiotics (Basel)*, 5(4). DOI:10.3390/antibiotics5040036
- Dillon, D. A., Wu, W. I., Riedel, B., Wissing, J. B., Dowhan, W., & Carman, G. M. (1996). The *Escherichia coli* *pgpB* gene encodes for a diacylglycerol pyrophosphate phosphatase activity. *J Biol Chem*, 271(48), 30548-30553. DOI:10.1074/jbc.271.48.30548
- Egan, A. J. F., Errington, J., & Vollmer, W. (2020). Regulation of peptidoglycan synthesis and remodelling. *Nat Rev Microbiol*, 18(8), 446-460. DOI:10.1038/s41579-020-0366-3
- El Ghachi, M., Derbise, A., Bouhss, A., & Mengin-Lecreulx, D. (2005). Identification of multiple genes encoding membrane proteins with undecaprenyl pyrophosphate phosphatase (UppP) activity in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 280(19), 18689-18695. DOI:10.1074/jbc.M412277200
- El Ghachi, M., Howe, N., Huang, C. Y., Olieric, V., Warshamanage, R., Touze, T., Weichert, D., Stansfeld, P. J., Wang, M., Kerff, F., & Caffrey, M. (2018). Crystal structure of undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase and its role in peptidoglycan biosynthesis. *Nat Commun*, 9(1), 1078. DOI:10.1038/s41467-018-03477-5
- Falchi, F. A., Di Lorenzo, F., Pizzoccheri, R., Casino, G., Paroni, M., Forti, F., Molinaro, A., & Briani, F. (2020). Overexpression of *lpxT* Gene in *Escherichia coli* Inhibits Cell Division and Causes Envelope Defects without Changing the Overall Phosphorylation Level of Lipid A. *Microorganisms*, 8(6). DOI:10.3390/microorganisms8060826
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H. R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L., & Bateman, A. (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue), D281-288. DOI:10.1093/nar/gkm960
- Giacomucci, S., Alvarez, L., Rodrigues, C. D. A., Cava, F., & Paradis-Bleau, C. (manuscript in preparation). *Hydroxyl radical overproduction in the envelope: an Achilles' heel in peptidoglycan synthesis*.
- Hakenbeck, R., Brückner, R., & Henrich, B. (2010). *Cell Wall Targeted Antibiotics*.
- Harel, Y. M., Bailone, A., & Bibi, E. (1999). Resistance to bacitracin as modulated by an *Escherichia coli* homologue of the bacitracin ABC transporter BcrC subunit from *Bacillus licheniformis*. *J Bacteriol*, 181(19), 6176-6178. DOI:10.1128/JB.181.19.6176-6178.1999
- Hernandez-Rocamora, V. M., Otten, C. F., Radkov, A., Simorre, J. P., Breukink, E., VanNieuwenhze, M., & Vollmer, W. (2018). Coupling of polymerase and carrier lipid phosphatase prevents product inhibition in peptidoglycan synthesis. *Cell Surf*, 2, 1-13. DOI:10.1016/j.tcs.2018.04.002
- Huang, K. C., Mukhopadhyay, R., Wen, B., Gitai, Z., & Wingreen, N. S. (2008). Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(49), 19282-19287. DOI:10.1073/pnas.0805309105
- Icho, T. (1988). Membrane-bound phosphatases in *Escherichia coli*: sequence of the *pgpB* gene and dual subcellular localization of the *pgpB* product. *J Bacteriol*, 170(11), 5117-5124. DOI:10.1128/jb.170.11.5117-5124.1988

- Icho, T., & Raetz, C. R. (1983). Multiple genes for membrane-bound phosphatases in *Escherichia coli* and their action on phospholipid precursors. *J Bacteriol*, *153*(2), 722-730. DOI:10.1128/JB.153.2.722-730.1983
- Kato, J., Fujisaki, S., Nakajima, K., Nishimura, Y., Sato, M., & Nakano, A. (1999). The *Escherichia coli* homologue of yeast RER2, a key enzyme of dolichol synthesis, is essential for carrier lipid formation in bacterial cell wall synthesis. *J Bacteriol*, *181*(9), 2733-2738. DOI:10.1128/JB.181.9.2733-2738.1999
- Lehrer, J., Vigeant, K. A., Tatar, L. D., & Valvano, M. A. (2007). Functional characterization and membrane topology of *Escherichia coli* WecA, a sugar-phosphate transferase initiating the biosynthesis of enterobacterial common antigen and O-antigen lipopolysaccharide. *J Bacteriol*, *189*(7), 2618-2628. DOI:10.1128/JB.01905-06
- Lu, Y. H., Guan, Z., Zhao, J., & Raetz, C. R. (2011). Three phosphatidylglycerol-phosphate phosphatases in the inner membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, *286*(7), 5506-5518. DOI:10.1074/jbc.M110.199265
- Manat, G., El Ghachi, M., Auger, R., Baouche, K., Olatunji, S., Kerff, F., Touze, T., Mengin-Lecreulx, D., & Bouhss, A. (2015). Membrane Topology and Biochemical Characterization of the *Escherichia coli* BacA Undecaprenyl-Pyrophosphate Phosphatase. *PLoS One*, *10*(11), e0142870. DOI:10.1371/journal.pone.0142870
- Manat, G., Roure, S., Auger, R., Bouhss, A., Barreateau, H., Mengin-Lecreulx, D., & Touze, T. (2014). Deciphering the metabolism of undecaprenyl-phosphate: the bacterial cell-wall unit carrier at the membrane frontier. *Microb Drug Resist*, *20*(3), 199-214. DOI:10.1089/mdr.2014.0035
- Nina Mian, Alex Bateman. (2015). Species distribution of DUF218 protein domain (PF02698). Retrieved from <http://pfam.xfam.org/family/PF02698#tabview=tab7>
- Paradis-Bleau, C., Kritikos, G., Orlova, K., Typas, A., & Bernhardt, T. G. (2014). A genome-wide screen for bacterial envelope biogenesis mutants identifies a novel factor involved in cell wall precursor metabolism. *PLoS Genet*, *10*(1), e1004056. DOI:10.1371/journal.pgen.1004056
- Rai, A. K., & Mitchell, A. M. (2020). Enterobacterial Common Antigen: Synthesis and Function of an Enigmatic Molecule. *mBio*, *11*(4). DOI:10.1128/mBio.01914-20
- Rida, S., Caillet, J., & Alix, J. H. (1996). Amplification of a novel gene, sanA, abolishes a vancomycin-sensitive defect in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, *178*(1), 94-102. DOI:10.1128/jb.178.1.94-102.1996
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *2*(5), a000414. DOI:10.1101/cshperspect.a000414
- T. Touzé, & D. Mengin-Lecreulx. (2008). Undecaprenyl Phosphate Synthesis. *EcoSal Plus*, *3*(1). DOI:10.1128/ecosalplus.4.7.1.7
- Tatar, L. D., Marolda, C. L., Polischuk, A. N., van Leeuwen, D., & Valvano, M. A. (2007). An *Escherichia coli* undecaprenyl-pyrophosphate phosphatase implicated in undecaprenyl phosphate recycling. *Microbiology (Reading)*, *153*(Pt 8), 2518-2529. DOI:10.1099/mic.0.2007/006312-0

- Tian, X., Auger, R., Manat, G., Kerff, F., Mengin-Lecreulx, D., & Touze, T. (2020). Insight into the dual function of lipid phosphate phosphatase PgpB involved in two essential cell-envelope metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, *10*(1), 13209. DOI:10.1038/s41598-020-70047-5
- Touze, T., Tran, A. X., Hankins, J. V., Mengin-Lecreulx, D., & Trent, M. S. (2008). Periplasmic phosphorylation of lipid A is linked to the synthesis of undecaprenyl phosphate. *Mol Microbiol*, *67*(2), 264-277. DOI:10.1111/j.1365-2958.2007.06044.x
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A., & Vollmer, W. (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol*, *10*(2), 123-136. DOI:10.1038/nrmicro2677
- Vollmer, W., Blanot, D., & de Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*, *32*(2), 149-167. DOI:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x
- Zgurskaya, H. I., Lopez, C. A., & Gnanakaran, S. (2015). Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. *ACS Infect Dis*, *1*(11), 512-522. DOI:10.1021/acsinfecdis.5b00097

## 5.7 Figures



PG synthesis

Undecaprenyl synthesis and recycling

ECA synthesis

Figure 5.1. Peptidoglycan and enterobacterial common antigen synthesis.

Simplified representation of peptidoglycan (PG) and enterobacterial common antigen (ECA) biosynthetic pathways. The genes that suppress  $\Delta$ elyC mutant defects when overexpressed or deleted are respectively shown in green or blue. Genes coding for enzymes that worsen  $\Delta$ elyC mutant defects are shown in red. Undecaprenyl phosphate (C55-P) and N-acetylmuramic acid are both essential molecules used in PG and ECA biosynthetic pathways (red dotted arrows). For simplification purposes, activated sugars will be named without their UDP or dTDP moiety. PG biosynthetic pathway is initiated in the cytoplasm, N-acetylglucosamine acid (NAG) transformed in N-acetylmuramic acid (NAM) by MurA-B enzymes, then five amino acids are associated with NAM thanks to MurC, E and F enzymes forming the NAM-pentapeptide. The latter is afterward associated with MraY to bind to the universal lipid carrier, undecaprenyl phosphate (C55-P), forming lipid I. Then NAG is associated with MurG to bind to NAM carried by lipid I, forming the complete PG subunit carrier with C55-P, the lipid II. Lipid II is transferred to the periplasmic leaflet of the inner membrane by FtsW, and next the PG subunit (NAG-NAM-pentapeptide) is connected to the existing cell wall by penicillin-binding proteins (PBPs). Lipid carrier is released as undecaprenyl pyrophosphate from lipid II. ECA biosynthetic pathway starts with formation of sugar precursor N-acetyl-manosaminuronic acid (NAMA) from NAM by WecB and C, and 4-acetamid-4,6-dideoxy-D-galactose (ADDG) from glucose-1-phosphate (G1P) by RmlA, B, and WecE and D. NAG is associated with WecA to bind to C55-P forming lipid I<sup>ECA</sup>. Then, ADDG is added to lipid I<sup>ECA</sup>-carried NAG, forming lipid II<sup>ECA</sup>. Finally, the ECA subunit is produced by addition of NAMA to NAG-ADDG carried by lipid II<sup>ECA</sup>, forming lipid III<sup>ECA</sup>. Lipid III<sup>ECA</sup> is afterward transferred to the periplasmic leaflet of the inner membrane by WzxE. ECA subunits (NAG-ADDG-NAMA) are polymerized by WzyE and WzzE, and then transferred to lipid A or a phospholipid and in turn to the outer membrane or being cyclized in the periplasm. As in PG biosynthetic pathway, the lipid moiety of lipid III<sup>ECA</sup> is released as C55-PP. The undecaprenyl pool is de novo synthesized as C55-PP by UppS, from farnesyl pyrophosphate and eight molecules of isopentenyl pyrophosphate. As C55-PP cannot be used for PG or ECA synthesis, it must be dephosphorylated by an unknown enzyme to undecaprenyl phosphate (C55-P). When C55-PP is released in the periplasmic leaflet of the inner membrane, it has to be in turn dephosphorylated to be transferred back to the inner leaflet. Few enzymes are known to have this activity like BacA (UppP), PgpB, YbjG and LpxT (YeiU). (Manat et al., 2014; Rai & Mitchell, 2020; Typas et al., 2011)

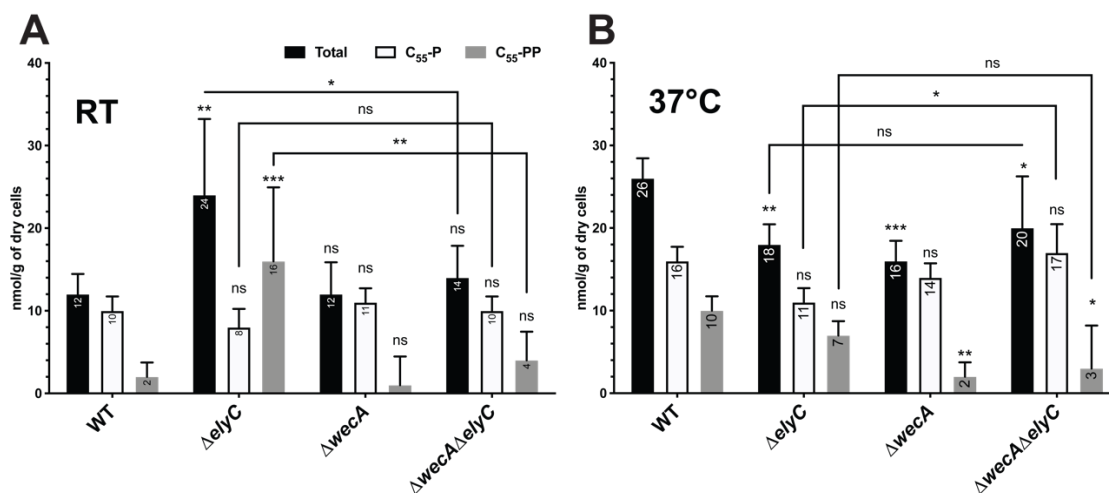


Figure 5.2. Quantification of C55-P and C55-PP pools at 37°C and room temperature.

Undecaprenyl pools (concentration  $\pm$  SD) of WT,  $\Delta$ elyC,  $\Delta$ wecA and  $\Delta$ wecA  $\Delta$ elyC strains were grown either at 37°C or at room temperature (RT) in LB medium containing 1% NaCl. In all cases, cultures were stopped at an OD<sub>600nm</sub> of  $\sim$ 0.35, divided into two 50-ml samples which were treated according to Bligh and Dyer (Bligh & Dyer, 1959) and the Kato procedures (Kato et al., 1999), respectively, as previously described (Barreteau et al., 2009). The extracted lipids were analyzed as described in Materials and Methods section. Quantification results are expressed by means  $\pm$  SD of three independent biological replicates. Asterisk and “ns” represent results of a statistical test between a sample and the corresponding means from WT strain at same temperature. Statistical testing with other specific samples is shown with a bar topped by an asterisk or “ns”. Two-way ANOVA  $\alpha = 0.05$ . C<sub>55</sub>-P: undecaprenyl phosphate, C<sub>55</sub>-PP: undecaprenyl pyrophosphate, ns = not significant. ns : ( $P \geq 0.05$ ), \* : ( $P < 0.05$ ), \*\* : ( $P < 0.01$ ) and \*\*\* : ( $P < 0.001$ ).

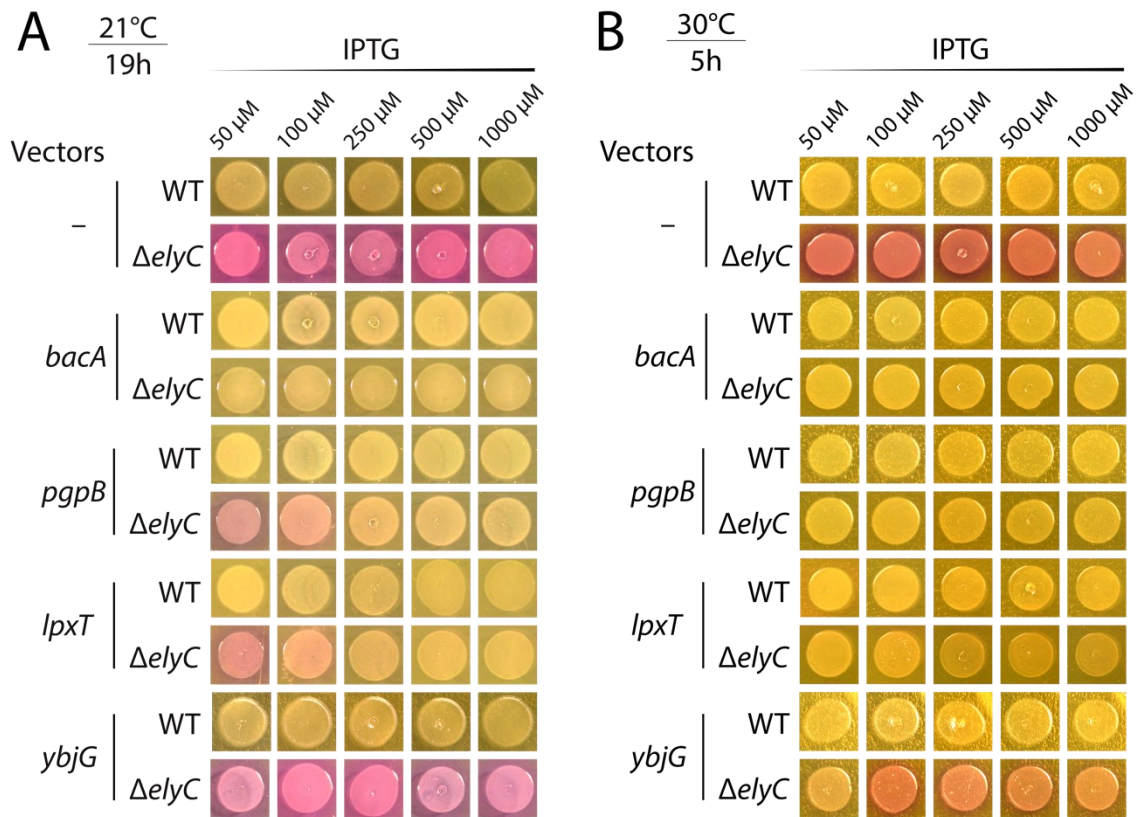


Figure 5.3. Overexpression of *bacA*, *pgpB* and *lpxT* but not *ybjG* suppress the CPRG<sup>+</sup> phenotype in  $\Delta\text{elyC}$  mutant cells.

CPRG spot assay: A) after 5 hours, incubation at 30°C and B) after 19 hours, at 21°C, exposed to 50, 100, 250, 500 and 1000  $\mu\text{M}$  IPTG in WT and  $\Delta\text{elyC}$  strains carrying pET overexpression vectors for *bacA*, *pgpB*, *lpxT* and *ybjG*, or without vector (-).

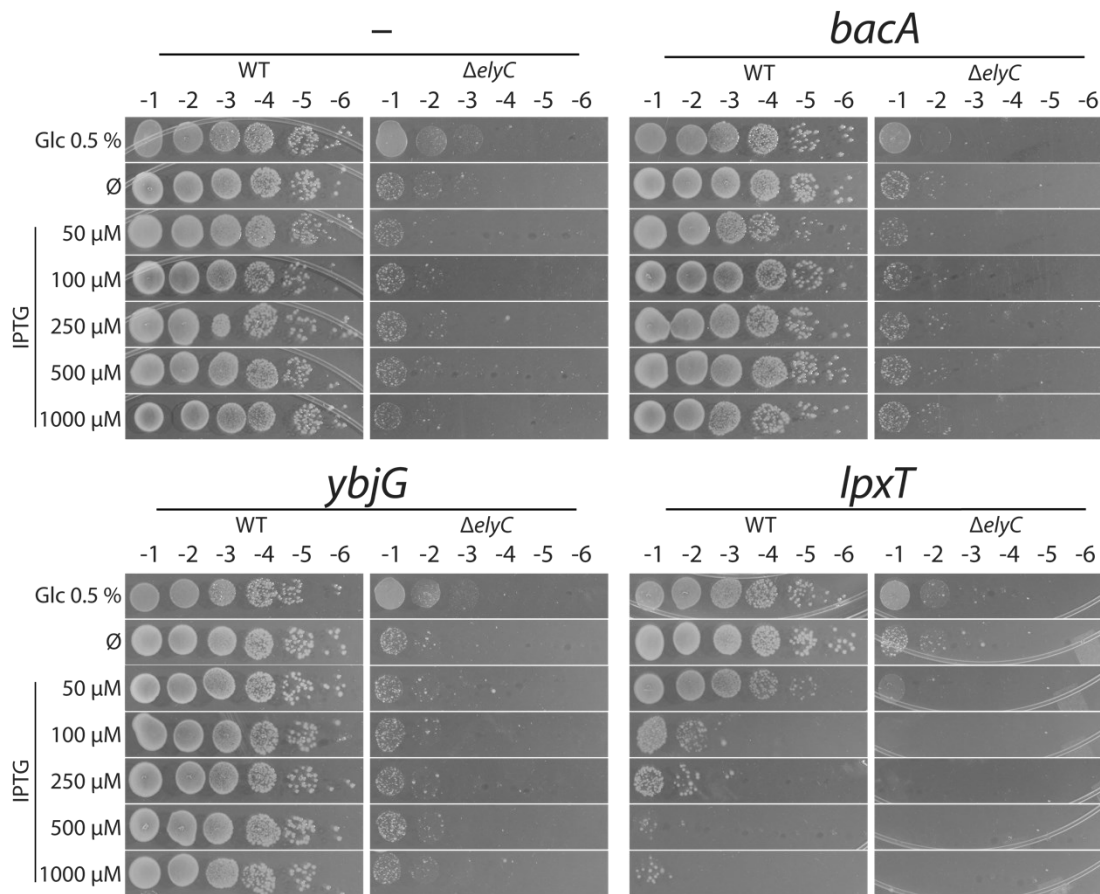


Figure 5.4. Effect of *bacA*, *ybjG* and *lpxT* overexpression in  $\Delta$ *elyC* mutant growth in solid media.

Dilution spot assays for WT and  $\Delta$ *elyC* strains transformed with pET vector carrying the *bacA*, *lpxT* or *ybjG* gene that contained the IPTG-inducible promoter (*T7 promoter/lac operator*). Photographs of agar plates after three days of incubation, at room temperature (21°C), are representative of biological triplicates. Overnight cultures were serially diluted 1:10, having an  $OD_{600nm}$  from  $2 \times 10^{-1}$  to  $2 \times 10^{-6}$  (-1 to -6), and 3  $\mu$ l was spotted on LB agar plate ( $\emptyset$ ), containing 0.5% glucose for repression of *tacP* (Glc 0.5%), exposed to 50, 100, 250, 500 or 1000  $\mu$ M IPTG.



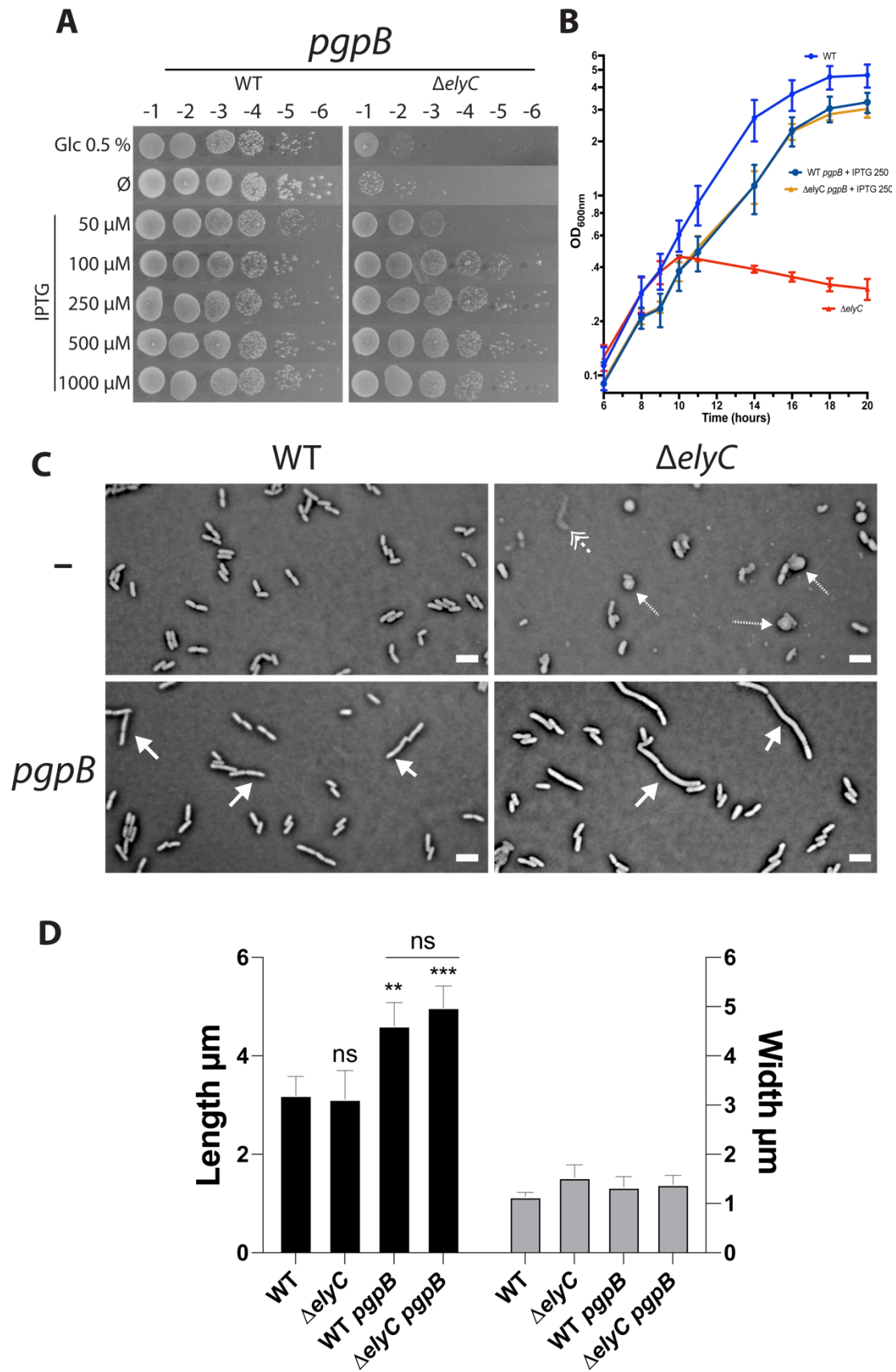


Figure 5.5. Effect of *pgpB* overexpression on  $\Delta$ *elyC* growth in solid and liquid media and cell morphology.

A) Dilution spot assays for WT and  $\Delta$ *elyC* strains transformed with pET vector carrying the *pgpB* gene that contained the IPTG-inducible promoter (*tacP*). Photographs of agar plates after three days of incubation at 21°C are representative of biological triplicates. Overnight cultures were serially diluted 1:10, having an OD<sub>600nm</sub> from  $2 \times 10^{-1}$  to  $2 \times 10^{-6}$  (-1 to -6), and 3  $\mu$ l was spotted on LB agar plate ( $\emptyset$ ), containing 0.5% glucose for repression of T7 promoter/*lac operator* (Glc 0.5%), exposed to 50, 100, 250, 500 or 1000  $\mu$ M IPTG. B) Growth monitoring at OD<sub>600nm</sub>  $\pm$  SD in WT and  $\Delta$ *elyC* strains carrying or not pET-*pgpB* (*pgpB*) plasmid under control conditions at 21°C. All cultures were initiated at an OD<sub>600nm</sub> of 0.025 from overnight incubation and done in biological triplicates. Strains that carried pET-*pgpB* were in presence of 250  $\mu$ M IPTG. C) Photon microscopy images of WT,  $\Delta$ *pgpB*,  $\Delta$ *elyCpgpBgpB* and  $\Delta$ *elyC* pET-*pgpB* grown for 10 hours under control conditions at 21°C. Images were representative of three biological replicates (two in the case of WT pET-*pgpB*), scale bar represents 3  $\mu$ m. Arrows indicate cell filamentation or abnormally long cells, dotted arrows for lysing or bulging cells, dotted double arrows for ghost cells. E) Cell length and width are expressed by means *pgpB* in WT,  $\Delta$ *elpgpBWT* pET-*pgpB* and  $\Delta$ *elyC* pET-*pgpB*, incubated for 10 hours under control conditions at 21°C. Statistical significance compared to the WT strain is represented by asterisks or “ns”, between two samples by the same symbol on top of corresponding horizontal bar. No statistically significant difference was identified between two distinct strains for cell width. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA, ns : ( $P \geq 0.05$ ), \* : ( $P < 0.05$ ), \*\* ( $P < 0.01$ ), \*\*\* ( $P < 0.001$ ) and \*\*\*\* ( $P < 0.0001$ ).

## 5.8 Supplementary Information

Tableau 5.1. Multiple comparison of undecaprenyl pools concentrations observed in WT,  $\Delta$ *elyC*, WT pET-*pgbP* and  $\Delta$ *elyC* pET-*pgbP* at 37°C

|  | Predicted <sup>a</sup><br>(LS) mean<br>diff. | 95.00%<br>CI of diff.       | Significant? | Summary | Individual <i>P</i><br>Value |
|--|--|-----------------------------|--------------|---------|------------------------------|
| <b>Total<sup>b</sup></b>                                     |  | 2.805969                    |              |         |                              |
| WT vs. $\Delta$ <i>elyC</i>                                  | 8  | to<br>13.19403              | Yes          | **      | 0.004                        |
| WT vs. $\Delta$ <i>wecA</i>                                  | 10   | 4.805969<br>to<br>15.19403  | Yes          | ***     | 0.0006                       |
| WT vs. $\Delta$ <i>wecA</i> <i>elyC</i>                      | 6  | 0.8059692<br>to<br>11.19403 | Yes          | *       | 0.0254                       |
| $\Delta$ <i>elyC</i> vs. $\Delta$ <i>wecA</i>                | 2  | -3.194031<br>to<br>7.194031 | No           | ns      | 0.4346                       |
| $\Delta$ <i>elyC</i> vs. $\Delta$ <i>wecA</i><br><i>elyC</i> | -2   | -7.194031<br>to<br>3.194031 | No           | ns      | 0.4346                       |
| $\Delta$ <i>wecA</i> vs. $\Delta$ <i>wecA</i><br><i>elyC</i> | -4   | -9.194031<br>to<br>1.194031 | No           | ns      | 0.125                        |

|  | Predicted<br>(LS) mean<br>diff. | 95.00% CI<br>of diff.          | Significant? | Summary | Individual <i>P</i><br>Value |
|--|---------------------------------|--------------------------------|--------------|---------|------------------------------|
| <b>C<sub>55</sub>-P<sup>c</sup></b>                |                                 |                                |              |         |                              |
| WT vs. $\Delta$ <i>elyC</i>                        | 5                               | -0.1940308<br>to<br>10.19403   | No           | ns      | 0.0585                       |
| WT vs. $\Delta$ <i>wecA</i>                        | 2                               | -3.194031<br>to<br>7.194031    | No           | ns      | 0.4346                       |
| WT vs. $\Delta$ <i>wecA elyC</i>                   | -1                              | -6.194031<br>to<br>4.194031    | No           | ns      | 0.6946                       |
| $\Delta$ <i>elyC</i> vs. $\Delta$ <i>wecA</i>      | -3                              | -8.194031<br>to<br>2.194031    | No           | ns      | 0.2449                       |
| $\Delta$ <i>elyC</i> vs. $\Delta$ <i>wecA elyC</i> | -6                              | -11.19403<br>to -<br>0.8059692 | Yes          | *       | 0.0254                       |
| $\Delta$ <i>wecA</i> vs. $\Delta$ <i>wecA elyC</i> | -3                              | -8.194031<br>to<br>2.194031    | No           | ns      | 0.2449                       |
| <b>C<sub>55</sub>-PP<sup>d</sup></b>               |                                 |                                |              |         |                              |
|  | Predicted<br>(LS) mean<br>diff. | 95.00% CI<br>of diff.          | Significant? | Summary | Individual <i>P</i><br>Value |

|  |    |                              |     |    |        |
|--|----|------------------------------|-----|----|--------|
| WT vs. $\Delta$ <i>elyC</i>                                  | 3  | -2.194031<br>to<br>8.194031  | No  | ns | 0.2449 |
| WT vs. $\Delta$ <i>wecA</i>                                  | 8  | 2.805969<br>to<br>13.19403   | Yes | ** | 0.004  |
| WT vs. $\Delta$ <i>wecA</i> <i>elyC</i>                      | 7  | 1.805969<br>to<br>12.19403   | Yes | *  | 0.0104 |
| $\Delta$ <i>elyC</i> vs. $\Delta$ <i>wecA</i>                | 5  | -0.1940308<br>to<br>10.19403 | No  | ns | 0.0585 |
| $\Delta$ <i>elyC</i> vs. $\Delta$ <i>wecA</i><br><i>elyC</i> | 4  | -1.194031<br>to<br>9.194031  | No  | ns | 0.125  |
| $\Delta$ <i>wecA</i> vs. $\Delta$ <i>wecA</i><br><i>elyC</i> | -1 | -6.194031<br>to<br>4.194031  | No  | ns | 0.6946 |

a: alpha level = 0.05, two-way ANOVA with unprotected Fisher's LSD tests on three to five biological replicates; b: Total undecaprenyl intermediate pools are equivalent to adding C55-P and C55-PP means concentrations for corresponding samples, standard deviation is calculated as indicated in Material and Methods; c: C55-P = undecaprenyl phosphate; d: C55-PP = undecaprenyl pyrophosphate.

Tableau 5.2. Multiple comparison tests made on the concentrations of undecaprenyl pools in WT,  $\Delta elyC$ , WT pET-*pgbP* and  $\Delta elyC$  pET-*pgbB* at 21°C.

|   | Predicted <sup>a</sup><br>(LS) mean<br>diff. | 95.00%<br>CI of diff.         | Significant? | Summary | Individual<br>P Value |
|---|--|-------------------------------|--------------|---------|-----------------------|
| <b>Total<sup>b</sup></b>                    |  |                               |              |         |                       |
| WT vs. $\Delta elyC$                        | -12  | -19.81657<br>to -<br>4.183433 | Yes          | **      | 0.0038                |
| WT vs. $\Delta wecA$                        | 0  | -8.739187<br>to<br>8.739187   | No           | ns      | > 0.9999              |
| WT vs. $\Delta wecA elyC$                   | -2   | -10.73919<br>to<br>6.739187   | No           | ns      | 0.6436                |
| $\Delta elyC$ vs. $\Delta wecA$             | 12   | 4.183433<br>to<br>19.81657    | Yes          | **      | 0.0038                |
| $\Delta elyC$ vs. $\Delta wecA \Delta elyC$ | 10   | 2.183433<br>to<br>17.81657    | Yes          | *       | 0.0139                |
| $\Delta wecA$ vs. $\Delta wecA \Delta elyC$ | -2   | -10.73919<br>to<br>6.739187   | No           | ns      | 0.6436                |
|   | Predicted<br>(LS) mean<br>diff.              | 95.00% CI<br>of diff.         | Significant? | Summary | Individual<br>P Value |

| <b>C<sub>55</sub>-P<sup>c</sup></b>                             |     |  |                               |                     |                |                               |
|---|-----|--|-------------------------------|---------------------|----------------|-------------------------------|
| WT vs. $\Delta$ <i>elyC</i>                                     | 2   | -5.816567<br>to<br>9.816567              | No                            | ns                  | 0.6051         |                               |
| WT vs. $\Delta$ <i>wecA</i>                                     | -1  | -9.739187<br>to<br>7.739187              | No                            | ns                  | 0.8168         |                               |
| WT vs. $\Delta$ <i>wecA elyC</i>                                | 0   | -8.739187<br>to<br>8.739187              | No                            | ns                  | > 0.9999       |                               |
| $\Delta$ <i>elyC</i> vs. $\Delta$ <i>wecA</i>                   | -3  | -10.81657<br>to<br>4.816567              | No                            | ns                  | 0.4393         |                               |
| $\Delta$ <i>elyC</i> vs. $\Delta$ <i>wecA \Delta<i>elyC</i></i> | -2  | -9.816567<br>to<br>5.816567              | No                            | ns                  | 0.,6051        |                               |
| $\Delta$ <i>wecA</i> vs. $\Delta$ <i>wecA \Delta<i>elyC</i></i> | 1   | -7.739187<br>to<br>9.739187              | No                            | ns                  | 0.8168         |                               |
| <b>C<sub>55</sub>-PP<sup>d</sup></b>                            |     |  |                               |                     |                |                               |
|   |     | <b>Predicted<br/>(LS) mean<br/>diff.</b> | <b>95.00% CI<br/>of diff.</b> | <b>Significant?</b> | <b>Summary</b> | <b>Individual<br/>P Value</b> |
| WT vs. $\Delta$ <i>elyC</i>                                     | -14 | -21.81657<br>to -<br>6.183433            | Yes                           | ***                 | 0.001          |                               |

|   |    |                             |     |     |        |
|---|----|-----------------------------|-----|-----|--------|
| WT vs. $\Delta wecA$                        | 1  | -7.739187<br>to<br>9.739187 | No  | ns  | 0.8168 |
| WT vs. $\Delta wecA \Delta elyC$            | -2 | -10.73919<br>to<br>6.739187 | No  | ns  | 0.6436 |
| $\Delta elyC$ vs. $\Delta wecA$             | 15 | 7.183433<br>to<br>22.81657  | Yes | *** | 0.0005 |
| $\Delta elyC$ vs. $\Delta wecA \Delta elyC$ | 12 | 4.183433<br>to<br>19.81657  | Yes | **  | 0.0038 |
| $\Delta wecA$ vs. $\Delta wecA \Delta elyC$ | -3 | -11.73919<br>to<br>5.739187 | No  | ns  | 0.4887 |

a: alpha level = 0.05, two-way ANOVA with unprotected Fisher's LSD tests on three to five biological replicates; b: Total undecaprenyl intermediate pools are equivalent to adding C55-P and C55-PP means concentrations for corresponding samples, standard deviation is calculated as indicated in Material and Methods; c: C55-P = undecaprenyl phosphate; d: C55-PP = undecaprenyl pyrophosphate.



Tableau 5.3. Multiple comparison tests made on the concentrations of undecaprenyl pools in WT,  $\Delta elyC$ , WT pET-*pgbP* and  $\Delta elyC$  pET-*pgbB* between 37°C and 21°C.

|   | Predicted <sup>a</sup><br>(LS) mean<br>diff. | 95.00% CI<br>of diff.        | Significant? | Summary | Individual<br>P Value |
|---|--|------------------------------|--------------|---------|-----------------------|
| <b>Total<sup>b</sup></b>                        |  |                              |              |         |                       |
| WT 37°C vs. WT 21°C                             | 14   | 6.774738<br>to<br>21.22526   | Yes          | ***     | 0.0003                |
| WT 37°C vs.<br>$\Delta elyC$ 21°C               | 2  | -4.462471<br>to<br>8.462471  | No           | ns      | 0.5376                |
| WT 37°C vs. $\Delta wecA$<br>21°C               | 14   | 6.774738<br>to<br>21.22526   | Yes          | ***     | 0.0003                |
| WT 37°C vs. $\Delta wecA$<br>$\Delta elyC$ 21°C | 12   | 4.774738<br>to<br>19.22526   | Yes          | **      | 0.0016                |
| $\Delta elyC$ 37°C vs. WT<br>21°C               | 6  | -1.225262<br>to<br>13.22526  | No           | ns      | 0.1017                |
| $\Delta elyC$ 37°C vs.<br>$\Delta elyC$ 21°C    | -6   | -12.46247<br>to<br>0.4624707 | No           | ns      | 0.0681                |
| $\Delta elyC$ 37°C vs. $\Delta wecA$<br>21°C    | 6  | -1.225262<br>to<br>13.22526  | No           | ns      | 0.1017                |

|   |    |                               |     |    |        |
|---|----|-------------------------------|-----|----|--------|
| <i>ΔelyC</i> 37°C vs. <i>ΔwecA</i><br><i>ΔelyC</i> 21°C | 4  | -3.225262<br>to<br>11.22526   | No  | ns | 0.2719 |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs. WT<br>21°C                        | 4  | -3.225262<br>to<br>11.22526   | No  | ns | 0.2719 |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs.<br><i>ΔelyC</i> 21°C              | -8 | -14.46247<br>to -<br>1.537529 | Yes | *  | 0.0162 |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs.<br><i>ΔwecA</i> 21°C              | 4  | -3.225262<br>to<br>11.22526   | No  | ns | 0.2719 |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs.<br><i>ΔwecA ΔelyC</i> 21°C        | 2  | -5.225262<br>to<br>9.225262   | No  | ns | 0.5812 |
| <i>ΔwecA ΔelyC</i> 37°C vs.<br>WT 21°C                  | 8  | 0.7747381<br>to<br>15.22526   | Yes | *  | 0.0306 |
| <i>ΔwecA ΔelyC</i> 37°C vs.<br><i>ΔelyC</i> 21°C        | -4 | -10.46247<br>to<br>2.462471   | No  | ns | 0.22   |
| <i>ΔwecA ΔelyC</i> 37°C vs.<br><i>ΔwecA</i> 21°C        | 8  | 0.7747381<br>to<br>15.22526   | Yes | *  | 0.0306 |
| <i>ΔwecA ΔelyC</i> 37°C vs.<br><i>ΔwecA ΔelyC</i> 21°C  | 6  | -1.225262<br>to<br>13.22526   | No  | ns | 0.1017 |

| $C_{55}$ -P <sup>c</sup>                                   | Predicted (LS) mean diff. | 95.00% CI of diff.    | Significant? | Summary | Individual P Value |
|--|---------------------------|-----------------------|--------------|---------|--------------------|
| WT 37°C vs. WT 21°C  | 6                         | -1.225262 to 13.22526 | No           | ns      | 0.1017             |
| WT 37°C vs. $\Delta$ <i>elyC</i> 21°C                      | 8                         | 1.537529 to 14.46247  | Yes          | *       | 0.0162             |
| WT 37°C vs. $\Delta$ <i>wecA</i> 21°C                      | 5                         | -2.225262 to 12.22526 | No           | ns      | 0.171              |
| WT 37°C vs. $\Delta$ <i>wecA</i> $\Delta$ <i>elyC</i> 21°C | 6                         | -1.225262 to 13.22526 | No           | ns      | 0.1017             |
| $\Delta$ <i>elyC</i> 37°C vs. WT 21°C                      | 1                         | -6.225262 to 8.225262 | No           | ns      | 0.7825             |
| $\Delta$ <i>elyC</i> 37°C vs. $\Delta$ <i>elyC</i> 21°C    | 3                         | -3.462471 to 9.462471 | No           | ns      | 0.3561             |
| $\Delta$ <i>elyC</i> 37°C vs. $\Delta$ <i>wecA</i> 21°C    | 0                         | -7.225262 to 7.225262 | No           | ns      | > 0.9999           |

|   |   |                                  |     |    |        |
|---|---|----------------------------------|-----|----|--------|
| <i>ΔelyC</i> 37°C vs. <i>ΔwecA</i><br><i>ΔelyC</i> 21°C | 1 | -6.225262<br>to<br>8.225262      | No  | ns | 0.7825 |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs. WT<br>21°C                        | 4 | -3.225262<br>to<br>11.22526      | No  | ns | 0.2719 |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs.<br><i>ΔelyC</i> 21°C              | 6 | -<br>0.4624707<br>to<br>12.46247 | No  | ns | 0.0681 |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs.<br><i>ΔwecA</i> 21°C              | 3 | -4.225262<br>to<br>10.22526      | No  | ns | 0.4088 |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs.<br><i>ΔwecA ΔelyC</i> 21°C        | 4 | -3.225262<br>to<br>11.22526      | No  | ns | 0.2719 |
| <i>ΔwecA ΔelyC</i> 37°C vs.<br>WT 21°C                  | 7 | -<br>0.2252619<br>to<br>14.22526 | No  | ns | 0.0573 |
| <i>ΔwecA ΔelyC</i> 37°C vs.<br><i>ΔelyC</i> 21°C        | 9 | 2.537529<br>to<br>15.46247       | Yes | ** | 0.0072 |
| <i>ΔwecA ΔelyC</i> 37°C vs.<br><i>ΔwecA</i> 21°C        | 6 | -1.225262<br>to<br>13.22526      | No  | ns | 0.1017 |

| <i>ΔwecA ΔelyC</i> 37°C vs.<br><i>ΔwecA ΔelyC</i> 21°C | 7                               | 0.2252619<br>to<br>14.22526   | No           | ns      | 0.0573                |
|--|---------------------------------|-------------------------------|--------------|---------|-----------------------|
|  | Predicted<br>(LS) mean<br>diff. | 95.00% CI<br>of diff.         | Significant? | Summary | Individual<br>P Value |
| <b>C<sub>55</sub>-PP<sup>d</sup></b>                   |                                 |                               |              |         |                       |
| WT 37°C vs. WT 21°C                                    | 8                               | 0.7747381<br>to<br>15.22526   | Yes          | *       | 0.0306                |
| WT 37°C vs.<br><i>ΔelyC</i> 21°C                       | -6                              | -12.46247<br>to<br>0.4624707  | No           | ns      | 0.0681                |
| WT 37°C vs. <i>ΔwecA</i><br>21°C                       | 9                               | 1.774738<br>to<br>16.22526    | Yes          | *       | 0.0156                |
| WT 37°C vs. <i>ΔwecA</i><br><i>ΔelyC</i> 21°C          | 6                               | -1.225262<br>to<br>13.22526   | No           | ns      | 0.1017                |
| <i>ΔelyC</i> 37°C vs. WT<br>21°C                       | 5                               | -2.225262<br>to<br>12.22526   | No           | ns      | 0.171                 |
| <i>ΔelyC</i> 37°C vs.<br><i>ΔelyC</i> 21°C             | -9                              | -15.46247<br>to -<br>2.537529 | Yes          | **      | 0.0072                |

|   |           |                               |     |      |          |
|---|-----------|-------------------------------|-----|------|----------|
| <i>ΔelyC</i> 37°C vs. <i>ΔwecA</i><br>21°C              | 6         | -1.225262<br>to<br>13.22526   | No  | ns   | 0.1017   |
| <i>ΔelyC</i> 37°C vs. <i>ΔwecA</i><br><i>ΔelyC</i> 21°C | 3         | -4.225262<br>to<br>10.22526   | No  | ns   | 0.4088   |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs. WT<br>21°C                        | -1,78E-15 | -7.225262<br>to<br>7.225262   | No  | ns   | > 0.9999 |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs.<br><i>ΔelyC</i> 21°C              | -14       | -20.46247<br>to -<br>7.537529 | Yes | **** | < 0.0001 |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs.<br><i>ΔwecA</i> 21°C              | 1         | -6.225262<br>to<br>8.225262   | No  | ns   | 0.7825   |
| <i>ΔwecA</i> 37°C vs.<br><i>ΔwecA</i> <i>ΔelyC</i> 21°C | -2        | -9.225262<br>to<br>5.225262   | No  | ns   | 0.5812   |
| <i>ΔwecA</i> <i>ΔelyC</i> 37°C vs.<br>WT 21°C           | 1         | -6.225262<br>to<br>8.225262   | No  | ns   | 0.7825   |
| <i>ΔwecA</i> <i>ΔelyC</i> 37°C vs.<br><i>ΔelyC</i> 21°C | -13       | -19.46247<br>to -<br>6.537529 | Yes | ***  | 0.0002   |
| <i>ΔwecA</i> <i>ΔelyC</i> 37°C vs.<br><i>ΔwecA</i> 21°C | 2         | -5.225262<br>to<br>9.225262   | No  | ns   | 0.5812   |

|                                    |    |           |    |    |        |
|------------------------------------|----|-----------|----|----|--------|
| $\Delta wecA \Delta elyC$ 37°C vs. |    | -8.225262 |    |    |        |
| $\Delta wecA \Delta elyC$ 21°C     | -1 | to        | No | ns | 0.7825 |
|                                    |    | 6.225262  |    |    |        |

a: alpha level = 0.05, two-way ANOVA with unprotected Fisher's LSD tests on three to five biological replicates; b: Total undecaprenyl intermediate pools are equivalent to adding C55-P and C55-PP means concentrations for corresponding samples, standard deviation is calculated as indicated in Material and Methods; c: C55-P = undecaprenyl phosphate; d: C55-PP = undecaprenyl pyrophosphate.

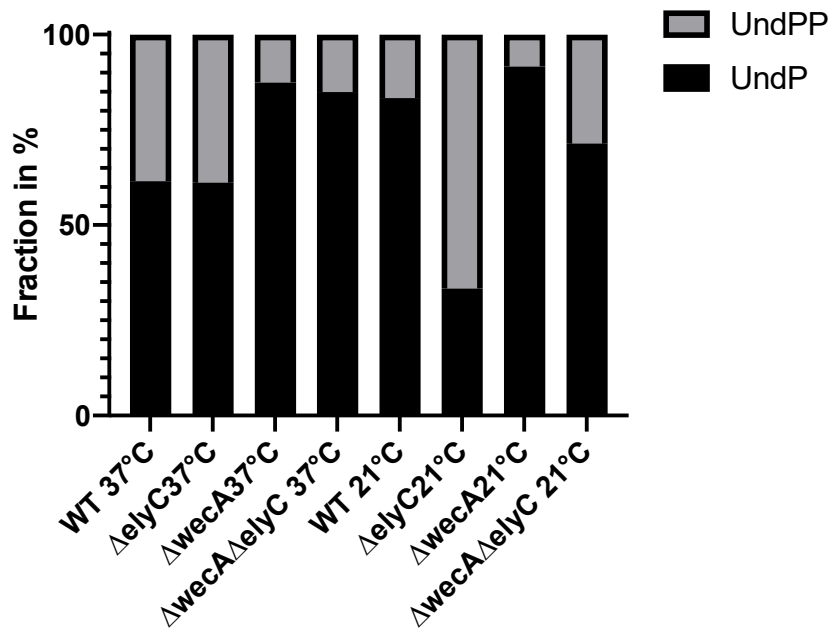


Figure 5.6. Fractions of undecaprenyl phosphate and undecaprenyl pyrophosphate proportion expressed in total undecaprenyl pool.

Fraction percentage of undecaprenyl phosphate (C55-P, black) and undecaprenyl pyrophosphate (C55-PP, gray) on total undecaprenyl pool. This figure is a different representation of results shown in Figure 5.2. Total undecaprenyl pool is equivalent to adding C55-P and C55-PP = 100%.

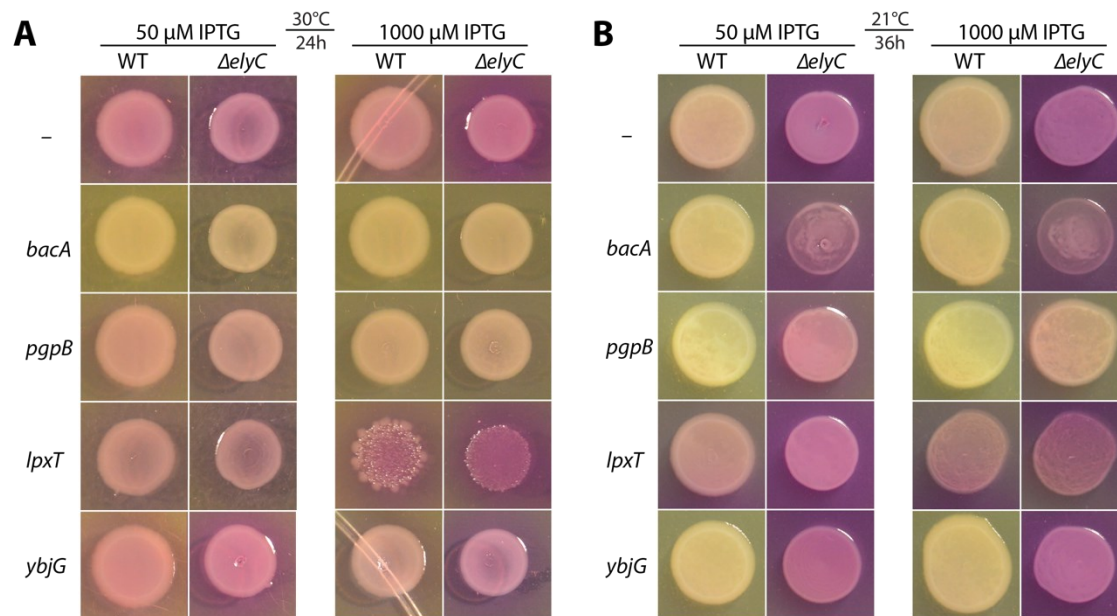


Figure 5.7. Overexpression of *bacA* and *pgpB* delay emergence of pink coloration in the WT strain.

CPRG spot assay: A) after 24 hours, incubation at 30°C and B) after 36 hours, at 21°C in WT and  $\Delta$ elyC strains carrying, or not (-), pET-*bacA*, pET-*pgpB*, pET-*lpxT* and pET-*ybjG* overexpression vectors. Bacteria were incubated on LB agar containing 20 μg/ml CPRG and 50 or 1000 μM IPTG.



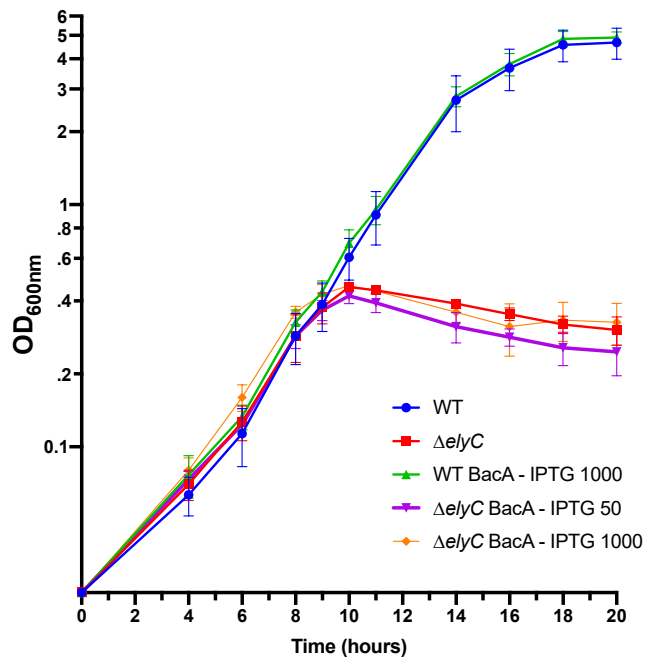


Figure 5.8. Overexpression of *bacA* has no effect on the lysis  $\Delta elyC$  phenotype.

Growth monitoring at  $OD_{600nm}$  in WT and  $\Delta elyC$  strains carrying or not pET-*BacA* vector under control conditions at 21°C. Strains carrying pET-*bacA* were incubated in presence of 50 or 1000  $\mu M$  IPTG.



## Chapitre 6 – Conclusions

Les travaux que j'ai effectués lors de mon doctorat se sont inscrits dans la problématique de la lutte contre les infections bactériennes causées par les bactéries à Gram négatif. Les infections causées par des bactéries résistantes à panrésistantes aux antibiotiques représentent un enjeu sanitaire majeur qui ne cesse de s'accroître (ASPC, 2017; O'Neill, 2016). Du fait, principalement de la composition intrinsèque de leur enveloppe et de leur capacité à former des biofilms, les bactéries à Gram négatif sont surreprésentées dans la liste des plus grandes menaces bactériennes (Organisation Mondiale de la Santé, 2017). D'autres bactéries, comme *Vibrio cholerae*, représentent une telle menace qu'elles sont l'objet de groupes de travail dédiés à l'OMS (Global Task Force on Cholera Control, 2017). J'ai souhaité participer à cette lutte dont l'objectif consiste à identifier de nouvelles cibles chez ces bactéries afin de proposer des pistes permettant le développement de nouveaux traitements antibiotiques. Et ici, sur deux thématiques particulières liées à l'enveloppe de deux bactéries à Gram négatif. L'une des thématiques, au laboratoire de la Docteure Duperthuy, se concentrant sur l'étude de mécanismes de résistance et de vulnérabilités aux antibiotiques liés à l'enveloppe. Avec pour modèle d'étude la bactérie pathogène chez l'homme *Vibrio cholerae* et pour modèle d'antibiotique la polymyxine B. L'autre thématique, au laboratoire de la Docteure Paradis-Bleau, portant sur la recherche de vulnérabilités de l'enveloppe et la caractérisation de mécanismes étant impliqués dans l'homéostasie chez la souche de laboratoire *Escherichia coli* K12. Notamment par la caractérisation des mécanismes entraînant la lyse de la cellule en absence du facteur ElyC.

### 6.1 Peptides antimicrobiens, flagelle et biofilm chez *Vibrio cholerae*

Initialement, l'objectif de mon projet de recherche au laboratoire de la Docteure Duperthuy était d'identifier de nouveaux mécanismes de régulation que *Vibrio cholerae* pourrait mettre en place, lorsque cette dernière se trouve en présence d'antibiotiques particuliers, les peptides antimicrobiens (PAM). Les souches responsables de l'actuelle pandémie de choléra étant de sérotype O1 biotype El tor ou de sérotype O139, j'ai donc concentré mes travaux sur ces

deux souches, A1552 (O1 El tor) et MO10 (O139). Nous avons choisi comme modèle principal de PAM la polymyxine B (PmB), car ses caractéristiques chimiques et son mode d'action sur l'enveloppe bactérienne est similaire à de nombreux PAM cationiques présent dans l'intestin humain et cette molécule est facile à obtenir en grande quantité. Je me suis donc focalisé sur l'effet que la PmB en concentration sous-inhibitrice pourrait avoir sur deux mécanismes, la formation de biofilm et la mobilité, mécanismes étant liés à l'enveloppe et impliqués dans la virulence de *V. cholerae*.

Nous avons observé chez ces deux souches que la PmB en concentration sous-inhibitrice provoquait une aflagellation d'une grande partie des cellules et causait une importante réduction de la formation de biofilm. Nous n'avons pas identifié de mécanisme de régulation lié à ce phénotype, mais avons découvert que la PmB affecte le flagelle et la formation de biofilms par une action mécanique. La PmB décroche, déstabilise ou prévient la synthèse du flagelle, ce qui empêche l'étape d'adhésion de la bactérie, une étape essentielle à la formation de biofilm (**Figure 6.1**).

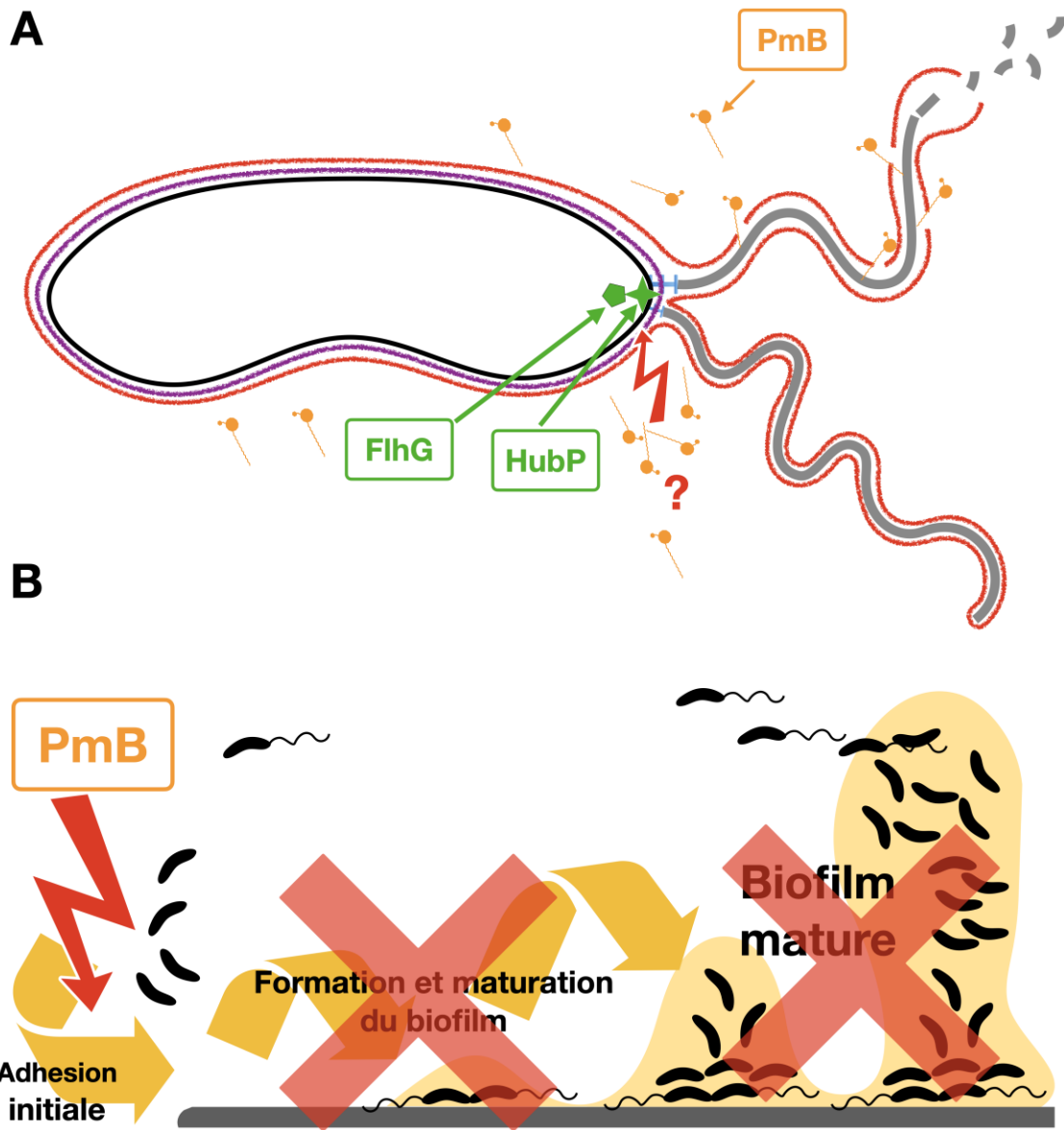


Figure 6.1. Effet de la polymyxine B en concentration sous-inhibitrice sur le flagelle de *Vibrio cholerae* et son impact sur la formation de biofilm et hypothèse

**A)** Schéma du mécanisme causant la perte du flagelle de *V. cholerae* et de son potentiel effet sur HubP et FlhG. La PmB induit principalement des dommages à l'enveloppe et/ou à la structure du flagelle. Ici la membrane du flagelle est dégradée, le filament du flagelle ne peut s'assembler correctement et se dégrade. La PmB pourrait perturber le complexe FlhG-HubP, provoquant la formation de flagelle surnuméraire. La PmB pourrait également induire un stress osmotique responsable de la formation d'un bulbe à l'extrémité du flagelle **B)** L'absence de flagelle ou la présence de flagelle surnuméraire ou difforme empêche la formation de biofilm.

La suite de mes travaux de recherches découle des observations faites lors des essais de mobilité sur gélose molle. Nous avons observé qu'en présence de PmB le diamètre de mobilité était bien plus hétérogène qu'en condition contrôle sans PmB nous laissant suggérer l'apparition de mutants spontanés ayant acquis une plus grande capacité de se mouvoir en présence de PmB. Nous avons alors mis au point un protocole d'évolution expérimentale avec *V. cholerae* A1552 et MO10, qui nous a permis d'identifier différents gènes, *dacB*, *vacJ*, *mIaF* et *ihf $\alpha$* , dont l'absence pourrait induire directement une plus grande mobilité ou augmenter la résistance à la PmB. Nos recherches de la fonction de ces gènes dans la littérature nous laissent suggérer que trois mécanismes seraient en jeu dans le gain de mobilité de ces souches (voir **Figure 6.2**). 1) La perte de fonction du régulateur transcriptionnel IHF pourrait induire la surexpression des gènes codants pour les éléments du flagelle. 2) L'absence de fonctionnalité de DacB, VacJ ou MlaF offrirait un gain de résistance à la PmB par augmentation du relargage de vésicules membranaires 3) La perte de fonction de Ihf $\alpha$  pourrait induire une augmentation de la résistance à la PmB par modification des LPS.

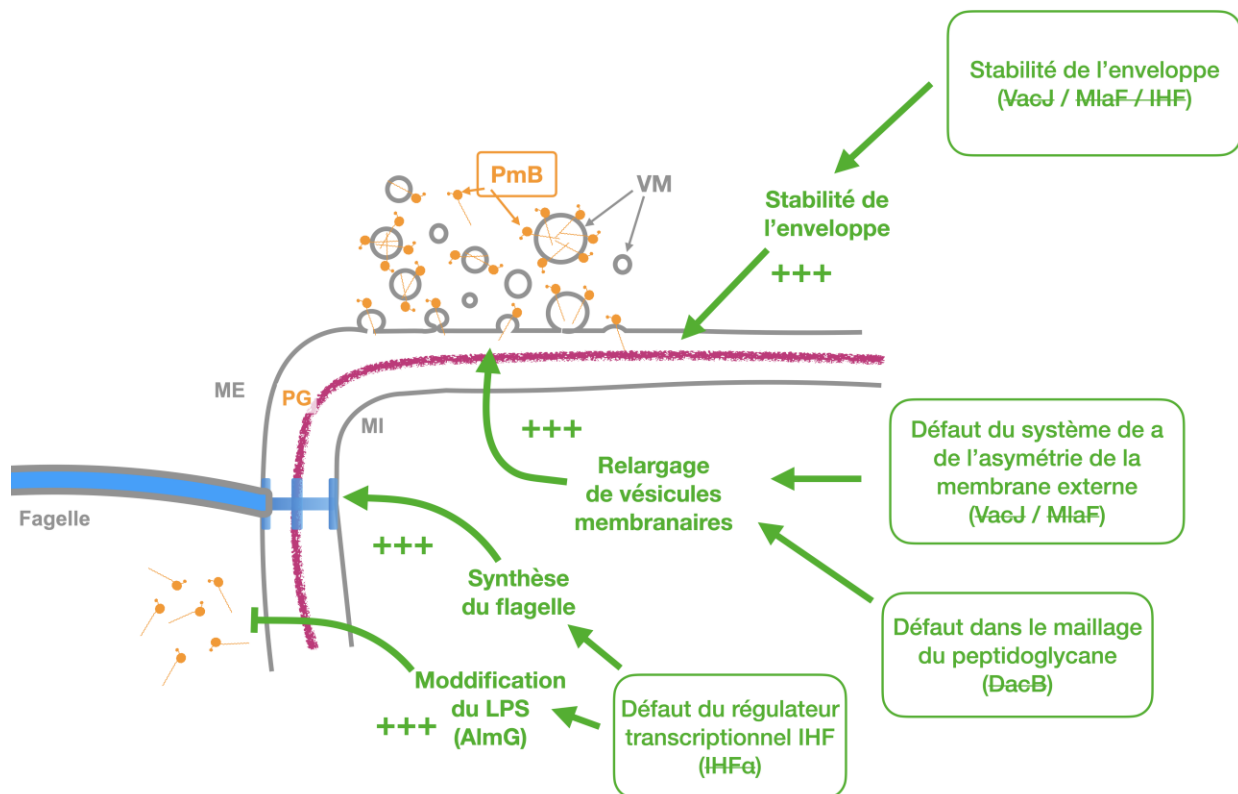


Figure 6.2. Hypothèses du gain de mobilité chez les souches A1552-V6, MO10-V2 et MO10-V8

Schéma représentatif des effets supposés des mutations observés chez A1552-V6, MO10-V2 et MO10-V8, permettant une meilleure mobilité en présence de polymyxine B. Les mutations identifiées ont probablement causées la perte de fonction des protéines IHF $\alpha$ , DacB, VacJ et MlaF, et ainsi entrainer le gain de mobilités observé chez le mutant de A1552 et ceux de MO10. L'absence de DacB, VacJ et MlaF pourrait avoir fourni une résistance à la PmB *via* une hypervésiculation ou une augmentation de la stabilité membranaire. Dans l'hypothèse où la régulation des gènes de mobilité de A1552 par IHF est similaire à celle de *E. coli* UPEC. La perte de fonction de Ihf $\alpha$  pourrait avoir induit une plus grande expression de gènes codants pour les éléments du flagelle, permettant ainsi de conserver une mobilité. Les protéines AlmEFG sont des enzymes impliquées dans un mécanisme de résistance à la PmB chez *Vibrio cholerae* O1 El Tor *via* la modification de la composition du LPS (Herrera et al., 2014). Or, nos analyses *in silico* ont prédit la présence d'un site de fixation de IHF en amont du cadre de lecture ouvert de *almG*. La perte de fonction de IHF chez A1552-V6 pourrait induire une plus grande expression de AlmG et ainsi induire une augmentation de la résistance à la PmB. La perte de fonction de VacJ, MlaF et IHF $\alpha$  pourrait également permettre une résistance à la PmB en stabilisant l'enveloppe ou en induisant l'expression de gènes permettant de stabiliser l'enveloppe. ME, membrane externe; PG, peptidoglycane ; MI, membrane interne; PmB, polymyxine B; VM vésicules membranaires.

La raison pour laquelle le filament du flagelle et/ou la membrane l'entourant sont plus sensibles à la PmB que le reste de la cellule reste à définir. Cependant, l'aspect des flagelles traités à la PmB peut nous pousser à quelques hypothèses. L'association du stress causé par la PmB et celui d'un stress mécanique, comme le mouvement du flagelle, pourrait rendre la membrane particulièrement fragile. Il serait intéressant de voir comment la PmB affecte le flagelle, si elle induit un décrochage ou prévient sa formation. Nous pourrions envisager de fusionner une ou plusieurs flagellines avec des fluorochrome (A. Klein, Toth, Jankovics, Muskotal, & Vonderviszt, 2012) afin d'observer en temps réel l'effet de la PmB sur le flagelle de *V. cholerae* au microscope à fluorescence. Il serait également intéressant de voir si le système de modification du LPS AlmEFG (Herrera et al., 2014) est localisé à proximité de la membrane enveloppant le flagelle. Bien que l'on ne sache pas si cette structure est handicapante pour la mobilité de *V. cholerae*, la structure en bulbe observée à l'extrémité des flagelles peut suggérer un stress osmotique. Il a été démontré chez *E. coli* que la présence de faible concentration en PmB pouvait induire une accumulation d'anions lipophiles dans la membrane (Daugelavicius, Bakiene, & Bamford, 2000). Il serait intéressant de mesurer le niveau de stress osmotique causé par la PmB au niveau membranaire chez *V. cholerae* et de déterminer le niveau de formation de bulbes en fonction de la concentration en PmB présente dans le milieu. Le fait que la PmB ait induit la formation de multiples flagelles, comme observé pour une faible proportion de bactéries (la majorité étant dépourvues de flagelles), pourrait également être une piste. Chez *V. cholerae* la régulation du nombre de flagelles fait intervenir deux protéines cytoplasmiques FlhF et FlhG (Correa, Peng, & Klose, 2005). La délétion de *flhG* ou la surexpression de *flhF* induisent la production de flagelles surnuméraires au pôle causant une réduction de la mobilité (Correa et al., 2005; Loutet, Di Lorenzo, Clarke, Molinaro, & Valvano, 2011). La fonction de FlhG semble nécessiter la protéine HubP, une protéine localisée au pôle de *V. cholerae* et prédite comme ayant un site d'attache à la paroi. La perte de HubP induit également la production de plusieurs flagelles chez *V. cholerae* (Yamaichi et al., 2012). Le système de régulation de la quantité de flagelles pourrait être particulièrement sensible aux perturbations causées par la PmB. Des études de l'expression des



gènes régulant le nombre et la localisation du flagelle seraient donc particulièrement intéressantes dans ce contexte. Étant donné que nous avons déterminé que la PmB prévient la production de biofilm par action mécanique et que la PmB est déjà envisagée pour prévenir la formation de biofilms sur des surfaces biotiques et abiotiques (Mohorcic et al., 2010; Souza Ribeiro Costa et al., 2019), il serait intéressant d'évaluer l'efficacité de ces traitements de surface sur *Vibrio cholerae* et de caractériser l'effet d'autres peptides antimicrobiens comme le LL37 ou la lactocine.

Les plasmides portant les gènes *ihfA*, *vacJ*, *miaF* et *dacB* sont actuellement en construction, ils nous permettront de nous assurer de l'implication de l'absence de fonction respective de ces gènes dans le gain de mobilité que nous avons observé en présence de PmB. Nous allons également voir l'effet de la surexpression de ces gènes et de la délétion de ces gènes sur la mobilité des souches sauvages. Étant donné l'importance du flagelle dans la formation de biofilm nous allons également évaluer la capacité des mutants que nous avons identifiés à former un biofilm en présence de PmB. Afin d'évaluer si IHF contrôle l'expression des gènes *almEFG* nous allons mesurer la différence d'expression des gènes *almEFG* en présence et en absence de *IhfA*. Dans le génome de la souche A1552, j'ai pu observer qu'en amont de différents gènes la séquence consensus nécessaire à la fixation de IHF était absente alors qu'elle est présente sur d'autres souches de *V. cholerae*. D'un point de vue évolutif, il serait intéressant d'évaluer l'ensemble des gènes que contrôle IHF sur un grand éventail de souches de *V. cholerae*, cela pourrait permettre d'identifier quels sont les mécanismes qui ont pu favoriser l'émergence de différentes souches. Les mutations, notamment dans les gènes *dacB*, *vacJ*, *miaF*, mais aussi dans *ihfA* suggérant l'implication d'une hypervésiculation dans le gain de mobilité en présence de PmB, il sera important d'évaluer la production et la dimension des vésicules ainsi que leur capacité à piéger la PmB dans nos différents mutants. Étant donné que l'absence de DacB est impliquée dans le phénomène d'hipervésiculation (Schwechheimer, Rodriguez, & Kuehn, 2015) et que cette enzyme peut avoir deux activités DD-carboxypeptidase et DD-endopeptidase (Pollock et al., 1974), il serait intéressant d'évaluer laquelle de ces deux fonctions influence la formation de

vésicule chez *V. cholerae*. Certaines stratégies envisagent de prévenir la formation de biofilms, d'inhiber leur maturation ou de les disperser, notamment en agissant sur la détection du quorum ou en dégradant certains éléments de la matrice (Fleming & Rumbaugh, 2018; Paluch, Rewak-Soroczynska, Jedrusik, Mazurkiewicz, & Jermakow, 2020). Cependant, certaines bactéries peuvent répondre de façon opposée pour une mêmes molécules et la dispersion de bactéries peut être nuisible pour l'hôte (Fleming & Rumbaugh, 2018; Lahiri et al., 2021; Muhammad et al., 2020). Mis en parallèle avec la diversité d'interactions que peuvent avoir les bactéries dans leur environnement naturel ou celui de l'intestin humain et de l'incidence que le premier environnement peut avoir avec le second, mène à penser qu'il faudrait complexifier nos protocoles d'études. Nous analysons en ce moment l'effet des de la polymyxine B et d'autres antimicrobiens (lactocine et LL37) sur le transcriptome de *Vibrio cholerae* O1 El Tor et O139. Nous espérons que cette analyse complémentaire à l'analyse de protéomiques réalisée au laboratoire (Annabelle Mathieu-Denoncourt), nous permettra de mieux comprendre les mécanismes d'adaptation de *V. cholerae* aux antimicrobiens, des molécules essentielles en santé publique et retrouvées aussi bien dans l'environnement (utilisées en agriculture/aquaculture et santé humaine) que dans l'hôte (produits par l'hôte et par le microbiote).

Bien que mes travaux aient déviées de l'objectif initial, ils nous ont menés à la caractérisation de la sensibilité de deux éléments de virulence à un antibiotique et à découvrir de nombreuses pistes pouvant contribuer à l'avancement des sur les mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *Vibrio cholerae*. Ces deux articles soulignent l'importance et la diversité des effets de PmB sur l'enveloppe des bactéries à Gram négatif, mais aussi, dans la régulation des facteurs de virulence et de persistance des bactéries. L'effet de la PmB sur la formation de biofilm démontre la source considérable de traitement potentiels que représentent les peptides antimicrobiens. Ils soulignent également le fait que de nombreux mécanismes restent à caractériser chez *V. cholerae*, notamment dans la régulation de sa mobilité.

## 6.2 Facteur ElyC chez *Escherichia coli*, stress oxydatif et perturbation du recyclage de l'undécaprenyl phosphate

L'objectif de mes travaux au laboratoire de la Docteure Paradis-Bleau était de caractériser les mécanismes aboutissant à l'arrêt de la synthèse de la paroi et la lyse du mutant  $\Delta elyC$  de *E. coli* à température pièce. Ce, dans le but d'identifier de nouvelles cibles et vulnérabilités d'éléments impliqués dans l'homéostasie de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif.

Partant de l'hypothèse de l'implication du stress oxydatif, dans le phénotype de lyse du mutant  $\Delta elyC$  à température de la pièce (T°P, 21-22°C), nous avons pu démontrer la présence d'une surproduction de radicaux hydroxyles (HO•) dans l'enveloppe du mutant. Nous avons également montré que cette surproduction de HO• provoque l'arrêt de la synthèse de la paroi et aboutit à la lyse des cellules en absence du facteur ElyC. En effet, la lyse du mutant  $\Delta elyC$  nécessite la surproduction de HO• afin d'entraîner l'arrêt de la synthèse de la paroi. Mes investigations se sont poursuivies à partir de l'hypothèse que l'arrêt de la synthèse de la paroi en absence du facteur ElyC à T°P est dû à un défaut de recyclage de l'undécaprényl phosphate (C55-P) et que la voie de synthèse de l'ECA pourrait être impliquée. Nous avons montré que le mutant  $\Delta elyC$  présentait un défaut de recyclage du C55-P, se caractérisant par une accumulation d'undécaprényl pyrophosphate (C55-PP), et que cette accumulation pouvait être rétablie à un niveau similaire à celui observé chez la souche sauvage par la disruption de la voie de synthèse de l'ACE. Nous avons également montré que la surexpression de *pgpB*, codant pour une enzyme possédant une activité C55-PP-phosphatase et phosphatidylglycérol-phosphatase, permettait de supprimer la lyse du mutant  $\Delta elyC$ .

Un des mécanismes aboutissant à la lyse du mutant  $\Delta elyC$  que nous privilégions suggère que l'absence de ElyC entraînerait une perturbation de la chaîne de transport d'électrons entraînant une fuite d'électrons et à la surproduction de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO) et notamment de HO• dans l'enveloppe. La surproduction de HO• entraînerait de multiples dommages dans l'enveloppe, en provoquant notamment l'agrégation et la précipitation de protéines et peut être

une peroxydation des lipides de la membrane interne pouvant alors entraîner à son tour une augmentation de la production de HO•. De nombreux facteurs essentiels à l'homéostasie de l'enveloppe seraient perturbés, notamment dans l'utilisation de C55-P dans les voies de synthèse du PG et de l'ACE entraînant une accumulation de C55-PP ou alors inhibant l'ajout de nouvelles sous-unités à la paroi due à un mauvais repliement des *penicillin binding proteins* (PBP). L'accumulation de C55-PP pourrait également entraîner l'inhibition des PBP notamment de PBP1b. Le ralentissement de la synthèse de la paroi pourrait provoquer une plus grande production de HO• en déstabilisant davantage la chaîne de transport d'électrons. L'intégrité de la cellule finirait par céder face à la pression osmotique par un défaut de paroi.

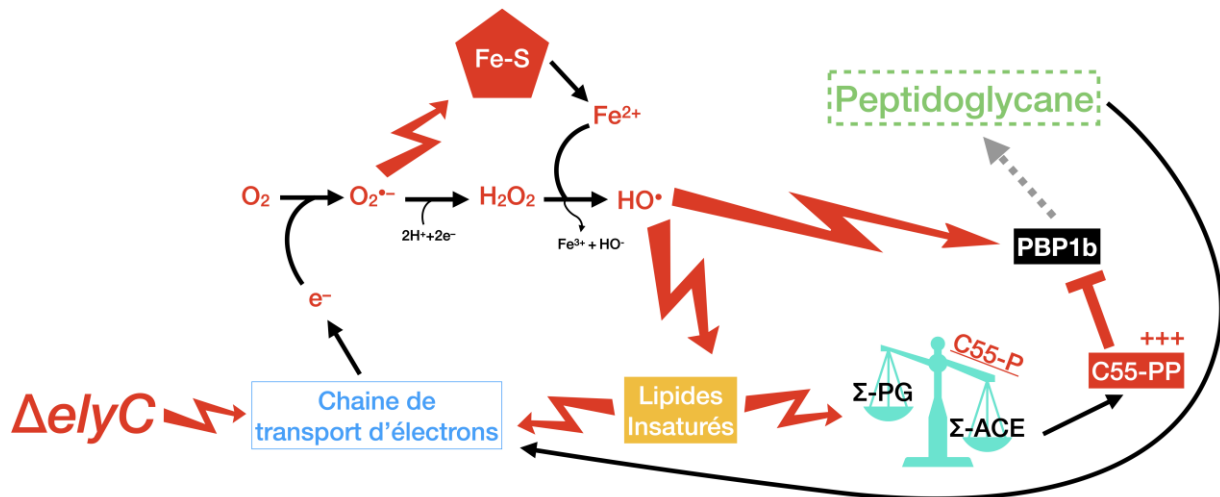


Figure 6.3. Modèle proposé de mécanisme de lyse du mutant  $\Delta elyC$

Schéma représentant le mécanisme aboutissant à la lyse du mutant  $\Delta elyC$  à température pièce. L'absence d'ElyC cause une déstabilisation de la membrane provoquant la fuite d'électrons ( $e^-$ ). Ces électrons en présence de dioxygène ( $O_2$ ) forment des radicaux superoxydes ( $O_2^{\bullet-}$ ) et entraînent la libération de fer dans le milieu en dégradant les protéines fer-soufre (Fe-S). Le peroxyde d'hydrogène en présence de  $Fe^{2+}$  libre produit des radicaux hydroxyles ( $HO^\bullet$ ). Les  $HO^\bullet$  causent une peroxydation des lipides entraînant une plus grande déstabilisation de la chaîne de transport d'électron et dégradent les protéines du périplasme dont PBP1b. La peroxydation des lipides entraîne également un déséquilibre dans l'utilisation de l'undécaprenyl phosphate (C55-P) en faveur de la voie de synthèse de l'antigène commun aux entérobactéries ( $\Sigma$ -ACE) et en défaveur de la synthèse de la paroi ( $\Sigma$ -PG). La surproduction de l'ACE entraîne l'inhibition de PBP1b qui entraîne une réduction et un arrêt de l'ajout de nouvelles sous-unités au

peptidoglycane. Le défaut de paroi de la bactérie provoque finalement la lyse sous la pression osmotique.

Le rôle de la protéine ElyC reste à définir, à ce jour de multiples fonctions pourraient lui être imputées. ElyC pourrait intervenir dans, la stabilisation de la chaîne de transport d'électrons, ou dans la régulation de l'activité des voies de synthèse de l'ECA ou du PG ou dans le recyclage du C55-P. ElyC pourrait également être impliquée dans le repliement des protéines de la membrane interne ou du périplasma ainsi que dans l'homéostasie du fer ou dans la régulation de la saturation des lipides. Elle pourrait encore être impliquée dans des mécanismes de régulation du type senseur thermique. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer la surproduction de HO<sup>•</sup> dans le périplasma du mutant  $\Delta elyC$ . Le stress oxydatif périplasmique pourrait être provoqué par la déstabilisation de la membrane interne, perturbant la chaîne de transport d'électrons induisant la fuite importante d'électrons, résultant à la production de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et finalement de HO<sup>•</sup> (Imlay, 2003). La surproduction de HO<sup>•</sup> dans les cellules mutantes  $\Delta elyC$  pourrait également résulter de l'accumulation de fer ferreux dans le périplasma, engendré, par exemple, par un défaut dans l'activité des protéines réductases de fer ferrique (Schroder, Johnson, & de Vries, 2003), dans le transporteur de fer ferreux ou du système d'efflux, dans l'activité des ferrisidérophores ou des protéines liantes périplasmiques (Andrews, Robinson, & Rodríguez-Quiñones, 2003). La surproduction de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, induit la libération de fer des protéines fer-souffre (Imlay, 2003), le processus de dégradation des protéines et de production de production DRO pourrait ainsi s'autoamplifier. Nous pourrions vérifier ces hypothèses en quantifiant la concentration de fer libre des cellules par résonance paramagnétique (Yan, Waite-Cusic, Kuppusamy, & Yousef, 2013). La question suivante est, pourquoi le mutant  $\Delta elyC$  présente les principaux défauts à température pièce ? Ici la raison la plus évidente pourrait se trouver dans la composition des lipides de la membrane. Lorsque la température chute, les bactéries augmentent la proportion de lipides insaturés permettant ainsi de maintenir la fluidité de leur membrane, *Escherichia coli* produit des phospholipides mono-insaturés ou di-insaturés à basse température (Magnuson, Jackowski, Rock, & Cronan, 1993). Or, les lipides polyinsaturés sont très sensibles au HO<sup>•</sup> car ils peuvent entrer dans une réaction en chaîne appelée peroxydation des lipides (Catala,

2009; Imlay, 2003). Le lipide altéré peut transformer le lipide adjacent, et ainsi de suite, menant à l'altération totale des propriétés membranaires, pouvant compromettre les processus métaboliques dépendant de la membrane. Une analyse des profils lipidiques membranaires et de leurs modifications dans le mutant ElyC permettrait de vérifier cette hypothèse. L'undécaprenyl phosphate et pyrophosphate semblent jouer un rôle dans la lyse du mutant  $\Delta$ elyC, comme montré précédemment le mutant accumule l'undécaprenyl pyrophosphate. Or, c'est un lipide insaturé qui pourrait être vecteur de peroxydation. Une hypothèse un peu opposée pourrait être que le processus de production du stress oxydatif pourrait provenir d'une trop faible concentration en lipide insaturé. En effet, il a été démontré qu'une diminution importante de lipide insaturé causait une déstabilisation de la chaîne de transport d'électrons et provoquait un stress oxydatif (Budin et al., 2018). Nous pourrions observer l'effet sur le mutant  $\Delta$ elyC de la surexpression des gènes *fabA* et *fabB*, codants pour des gènes impliqués dans l'insaturation des lipides (My et al., 2013). Une étude récente a montré que la mitochondrie possédait un système de protection contre la peroxydation des lipides par la dihydroorotate déshydrogénase (Garcia-Bermudez & Birsoy, 2021), une protéine également présente chez *E. coli* (Nørager, Jensen, Björnberg, & Larsen, 2002). ElyC pourrait alors jouer un rôle particulier dans le processus de protection. Encore ici, l'analyse des profils lipidiques offrirait certainement une réponse à certaines de nos interrogations concernant la peroxydation des lipides. Il serait intéressant de voir si le mutant  $\Delta$ elyC est plus sensible que la souche sauvage à la phagocytose à 37°C.

Nous allons effectuer de multiples expériences afin de nous assurer que la surexpression de *pgpB* supprime la lyse du mutant  $\Delta$ elyC par l'activité C55-PP phosphatase et non par l'activité phosphatidylglycerolphosphate (PGP) phosphatase. Nous allons tout d'abord comparer le niveau de l'activité C55-PP et PGP phosphatase d'extraits membranaires du mutant  $\Delta$ elyC et de la souche sauvage. Par la suite nous allons surexprimer *pgpA* et *pgpC* chez le mutant, des gènes codants pour deux autres PGP phosphatase chez *E. coli* (Y. H. Lu, Guan, Zhao, & Raetz, 2011). Nous allons également surexprimer des versions mutées du gène *pgpB* ayant perdu les activités PGP et C55-PP phosphatase ou n'ayant qu'une des deux activités fonctionnelles (Tian et al., 2020). Étant

donné que l'affinité de certaines C55-PP phosphatases avec certaines PBP, comme PgpB avec Pbp1b, facilite l'ajout de nouvelles sous-unités au PG en prévenant l'inhibition des PBP par le C55-PP (Hernandez-Rocamora et al., 2018), le facteur ElyC pourrait être impliqué dans le maintien de l'affinité entre ces protéines. La voie de synthèse de l'ACE utilisant le C55-P de façon similaire à la voie de synthèse du PG (Lisa M. Willis & Whitfield, 2013), ElyC pourrait alors maintenir l'affinité d'autre C55-PP phosphatase avec Wzy. Nous pourrions vérifier l'affinité de ElyC avec Wzy, Pbp1b, PgpB, BacA, YbjG et LpxT par co-immunoprécipitation. Nous pourrions également observer si ElyC colocalise avec certaines de ces protéines en produisant des protéines de fusion avec différents fluorochromes. Une des particularités à *E. coli* K12 est de ne pas produire d'antigène O (D. Liu & Reeves, 1994), comme le C55-P est nécessaire à cette voie (Lisa M. Willis & Whitfield, 2013), il serait intéressant de voir si le rétablissement cette voie de synthèse modifie le phénotype de lyse mutant  $\Delta$ elyC. De la même manière, notre souche de laboratoire ne produit pas de capsule, mais d'autres souches de *E. coli* en produisent en utilisant le C55-PP (Sachdeva, Palur, Sudhakar, & Rathinavelan, 2017; C. Whitfield, 2006), il serait intéressant de voir l'effet de la délétion de ElyC sur ces souches à 37°C ou T°P. L'accumulation d'intermédiaires à l'antigène O pouvant causer des défauts dans la synthèse du PG en séquestrant le C55-P (Jorgenson & Young, 2016), il serait intéressant de vérifier si les intermédiaires du PG ou de ECA s'accumulent dans l'enveloppe du mutant  $\Delta$ elyC par HPLC. Finalement, il sera nécessaire à plus ou moins court terme de produire la structure cristallographique de la protéine ElyC.

Le peptidoglycane est à la fois essentiel et spécifique aux bactéries, la découverte de la surproduction de HO<sup>•</sup> inhibant la synthèse du PG doit être considérée comme une découverte importante dans la lutte contre les maladies infectieuses. En particulier parce que certains antibiotiques sont des DRO comme le métronidazole, et que ce dernier s'est avéré efficace contre certaines bactéries à Gram négatif (Dingsdag & Hunter, 2018; Paiva & Bozza, 2014). Qui plus est, certains éléments du système immunitaire comme les macrophages produisent des DRO pour éliminer les bactéries (Herb & Schramm, 2021; Slauch, 2011). Même si la fonction de ElyC reste à définir et que les défauts les plus importants n'apparaissent qu'à température pièce, nous avons

identifié de nouvelles composantes du phénotype de lyse du mutant  $\Delta$ *elyC*. ElyC contient un domaine de fonction inconnu DUF218 partagé avec presque toutes les bactéries du même *phyla* et il est présent chez les champignons, les archées, les algues, les amibes et plantes. Il est attendu que la découverte de la fonction de cette protéine ait un très grand impact. D'autres stratégies de lutte contre les résistances aux antibiotiques sont envisagées dans notre laboratoire, comme par exemple la sélection par *phage display* de protéines ayant la capacité d'inhiber plusieurs mur ligases.

### 6.3 Ouverture

L'enveloppe des bactéries à Gram négatif est autant une formidable opportunité de cibles qu'une arme redoutable contre les antibiotiques. Les résultats de mes travaux de recherche m'ont mené à étudier plusieurs éléments liés à l'enveloppe, comme les membranes, les flagelles, la paroi ou encore les biofilms. Dans cette thèse, j'ai voulu rendre compte de la complexité des différents composants de l'enveloppe et des divers liens de causalité qui peuvent exister avec la virulence, la persistance et la résistance aux antibiotiques ainsi qu'identifier des éléments qui sont déjà ou feraient de bonnes cibles pour de nouveaux traitements antibactériens. À ce titre, dans le but ultime d'identifier de nouvelles cibles pour le développement de traitements alternatifs aux antibiotiques, il me paraît plus qu'essentiel de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans l'homéostasie de l'enveloppe. Il semble ainsi que les facteurs essentiels à l'étape initiale de la formation de biofilms et que les facteurs dont l'absence peut causer une sensibilité au stress oxydatif, représentent des cibles prometteuses pour de nouveaux traitements antibiotiques. Il est également essentiel de limiter l'émergence de bactéries résistances et ainsi de poursuivre les efforts visant à réduire l'utilisation des antibiotiques chez l'être humain ou l'animal sans analyse microbiologique préalable ou en prophylaxie.

Feux de forêt records, canicules records, inondations records, pandémie virale mondiale : Ces événements récents ou actuels nous montrent à quel point notre modèle de société est à la fois nuisible pour l'être humain et l'environnement et extrêmement vulnérable sur de nombreux



aspects. Le réchauffement climatique et la destruction des écosystèmes pourraient sévèrement augmenter l'incidence et la fréquence des futures épidémies ou nouvelles pandémies (Chowdhury, Nur, Hassan, von Seidlein, & Dunachie, 2017; Hornborg, 2021; Rodo, San-Jose, Kirchgatter, & Lopez, 2021; K. R. Smith et al., 2014; Trinanes & Martinez-Urtaza, 2021; Vezzulli et al., 2016). Bien que certains microorganismes soient surveillés de près, il est impossible de prédire quand et lesquels de ces microbes pourraient nous mener à une nouvelle pandémie (Global Task Force on Cholera Control, 2017; Global Tuberculosis Programme, 2020; World Health Organization, 2017). Il apparaît alors impératif d'intensifier la recherche fondamentale avec le plus grand angle possible, ce qui impose un effort substantiel de financement de la recherche partout dans le monde. Il est parallèlement essentiel de faire évoluer notre société vers un modèle focalisé sur la réduction au minimum de notre impact sur l'environnement et la sauvegarde de la biodiversité, et sur la mise en œuvre rapide, globale et concrète de plans d'actions à vocations préventives et curatives des prochaines catastrophes. Il est indispensable que ce modèle se base sur la coopération, afin que de telles mesures soient acceptées par le plus grand nombre et appliquées par les gouvernements et leurs populations, au-delà des intérêts partisans et économiques de courts termes.



## Citations

« « Ne se courber devant aucune autorité, si respectée qu'elle soit ; n'accepter aucun principe, tant qu'il n'est pas établi par la raison. » »

**LA MORALE ANARCHISTE, *Piotr Kropotkine (1889)***

« Les pensées de la classe dominante sont aussi, à toutes les époques, les pensées dominantes, autrement dit la classe qui est la puissance matérielle dominante de la société est aussi la puissance dominante spirituelle. La classe qui dispose des moyens de la production matérielle dispose, du même coup, des moyens de la production intellectuelle, si bien que, l'un dans l'autre, les pensées de ceux à qui sont refusés les moyens de production intellectuelle sont soumises du même coup à cette classe dominante. Les pensées dominantes ne sont pas autre chose que l'expression idéale des rapports matériels dominants, elles sont ces rapports matériels dominants saisis sous forme d'idées, donc l'expression des rapports qui font d'une classe la classe dominante ; autrement dit, ce sont les idées de sa domination. Les individus qui constituent la classe dominante possèdent, entre autres choses, également une conscience, et en conséquence ils pensent; pour autant qu'ils dominent en tant que classe et déterminent une époque historique dans toute son ampleur, il va de soi que ces individus dominent dans tous les sens et qu'ils ont une position dominante, entre autres, comme êtres pensants aussi, comme producteurs d'idées, qu'ils règlent la production et la distribution des pensées de leur époque; leurs idées sont donc les idées dominantes de leur époque. »

**L'IDÉOLOGIE ALLEMANDE, *Karl Marx et Friedrich Engels (1845-1846)***

« C'était, à l'époque, le contenu des cours qui passait pour de la marchandise, au profit des clients, qui se révélaient être les étudiants. Enseignants et professeurs se compromettaient pour attirer chez eux des étudiants tiraillés par la concurrence entre les institutions. [...] On n'avait encore rien vu. Aujourd'hui, les étudiants ne sont plus ces consommateurs de l'enseignement et des diplômes offerts sur les campus, ils sont passés au rang de produits eux-mêmes. L'université vend ce qu'elle fait d'eux aux entreprises privées et autres institutions qui la financent, ses nouveaux clients, donc. Le recteur de l'Université de [...] l'a affirmé sur le ton de l'évidence à l'automne 2011 : « Les cerveaux doivent correspondre aux besoins des entreprises. » »

**LA MÉDIOCRATIE, *Alain Deneault (2015)*.**

« Le courage dans le désordre infini de la vie qui nous sollicite de toutes parts, c'est de choisir un métier et de le bien faire, quel qu'il soit ; c'est de ne pas se rebuter du détail minutieux ou monotone ; c'est de devenir, autant que l'on peut, un technicien accompli ; c'est d'accepter et de comprendre cette loi de la spécialisation du travail qui est la condition de l'action utile, et cependant de ménager à son regard, à son esprit, quelques échappées vers le vaste monde et des perspectives plus étendues. Le courage, c'est d'être tous ensemble, et quel que soit le métier, un praticien et un philosophe. Le courage, c'est de comprendre sa propre vie, de la préciser, de l'approfondir, de l'établir et de la coordonner cependant à la vie générale. Le courage, c'est de surveiller exactement sa machine à filer ou à tisser, pour qu'aucun fil ne se casse, et de préparer

cependant un ordre social plus vaste et plus fraternel où la machine sera la servante commune des travailleurs libérés. Le courage, c'est d'accepter les conditions nouvelles que la vie fait à la science et à l'art, d'accueillir, d'explorer la complexité presque infinie des faits et des détails, et cependant d'éclairer cette réalité énorme et confuse par des idées générales, de l'organiser et de la soulever par la beauté sacrée des formes et des rythmes. Le courage, c'est de dominer ses propres fautes, d'en souffrir, mais de n'en pas être accablé et de continuer son chemin. Le courage, c'est d'aimer la vie et de regarder la mort d'un regard tranquille ; c'est d'aller à l'idéal et de comprendre le réel ; c'est d'agir et de se donner aux grandes causes sans savoir quelle récompense réserve à notre effort l'univers profond, ni s'il lui réserve une récompense. Le courage, c'est de chercher la vérité et de la dire ; c'est de ne pas subir la loi du mensonge triomphant qui passe, et de ne pas faire écho, de notre âme, de notre bouche et de nos mains aux applaudissements imbéciles et aux huées fanatiques. »

**DISCOURS À LA JEUNESSE, *Jean Jaurès (Albi, 1903)***

## Références bibliographiques

- Abe, K., Nomura, N., & Suzuki, S. (2020). Biofilms: hot spots of horizontal gene transfer (HGT) in aquatic environments, with a focus on a new HGT mechanism. *FEMS Microbiol Ecol*, 96(5). DOI:10.1093/femsec/fiaa031
- Ahmed, M. N., Porse, A., Sommer, M. O. A., Hoiby, N., & Ciofu, O. (2018). Evolution of Antibiotic Resistance in Biofilm and Planktonic *Pseudomonas aeruginosa* Populations Exposed to Subinhibitory Levels of Ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(8). DOI:10.1128/AAC.00320-18
- Ali, M., Nelson, A. R., Lopez, A. L., & Sack, D. A. (2015). Updated global burden of cholera in endemic countries. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(6), e0003832. DOI:10.1371/journal.pntd.0003832
- AlMatar, M., Albarri, O., Makky, E. A., & Koksai, F. (2021). Efflux pump inhibitors: new updates. *Pharmacol Rep*, 73(1), 1-16. DOI:10.1007/s43440-020-00160-9
- Alvarez, L., Espallat, A., Hermoso, J. A., de Pedro, M. A., & Cava, F. (2014). Peptidoglycan remodeling by the coordinated action of multispecific enzymes. *Microb Drug Resist*, 20(3), 190-198. DOI:10.1089/mdr.2014.0047
- Amaral, L., Martins, A., Spengler, G., & Molnar, J. (2014). Efflux pumps of Gram-negative bacteria: what they do, how they do it, with what and how to deal with them. *Front Pharmacol*, 4, 168. DOI:10.3389/fphar.2013.00168
- Amor, K., Heinrichs, D. E., Frirdich, E., Ziebell, K., Johnson, R. P., & Whitfield, C. (2000). Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 68(3), 1116-1124. DOI:10.1128/IAI.68.3.1116-1124.2000
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2-3), 215-237. DOI:10.1016/s0168-6445(03)00055-x
- Arts, I. S., Gennaris, A., & Collet, J. F. (2015). Reducing systems protecting the bacterial cell envelope from oxidative damage. *FEBS Lett*, 589(14), 1559-1568. DOI:10.1016/j.febslet.2015.04.057
- Arzanlou, M., Chai, W. C., & Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochem*, 61(1), 49-59. DOI:10.1042/EBC20160063
- Asmar, A. T., & Collet, J. F. (2018). Lpp, the Braun lipoprotein, turns 50-major achievements and remaining issues. *FEMS Microbiol Lett*, 365(18). DOI:10.1093/femsle/fny199
- ASPC. (2017). *Lutter contre la résistance aux antimicrobiens et optimiser leur utilisation : un cadre d'action pancanadien*. Ottawa, Ontario.
- Avakyan, A. A., Katz, L. N., Levina, K. N., & Pavlova, I. B. (1965). Structure and composition of the *Bacillus anthracis* capsule. *J Bacteriol*, 90(4), 1082-1095. DOI:10.1128/jb.90.4.1082-1095.1965
- Azurmendi, H. F., Veeramachineni, V., Freese, S., Lichaa, F., Freedberg, D. I., & Vann, W. F. (2020). Chemical structure and genetic organization of the *E. coli* O6:K15 capsular polysaccharide. *Sci Rep*, 10(1), 12608. DOI:10.1038/s41598-020-69476-z
- Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-

- gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol*, 2, 2006 0008. DOI:10.1038/msb4100050
- Baharoglu, Z., & Mazel, D. (2011). *Vibrio cholerae* triggers SOS and mutagenesis in response to a wide range of antibiotics: a route towards multiresistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(5), 2438-2441. DOI:10.1128/AAC.01549-10
- Banerjee, R., Das, B., Balakrish Nair, G., & Basak, S. (2014). Dynamics in genome evolution of *Vibrio cholerae*. *Infect Genet Evol*, 23, 32-41. DOI:10.1016/j.meegid.2014.01.006
- Barksdale, L. (1970). *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol Rev*, 34(4), 378-422. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4322195>
- Baron, S., Hadjadj, L., Rolain, J. M., & Olaitan, A. O. (2016). Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int J Antimicrob Agents*, 48(6), 583-591. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023
- Barreteau, H., El Ghachi, M., Barneoud-Arnoulet, A., Sacco, E., Touze, T., Duche, D., Gerard, F., Brooks, M., Patin, D., Bouhss, A., Blanot, D., van Tilbeurgh, H., Arthur, M., Lloubes, R., & Mengin-Lecreulx, D. (2012). Characterization of colicin M and its orthologs targeting bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis. *Microb Drug Resist*, 18(3), 222-229. DOI:10.1089/mdr.2011.0230
- Basu, A., Garg, P., Datta, S., Chakraborty, S., Bhattacharya, T., Khan, A., Ramamurthy, S., Bhattacharya, S. K., Yamasaki, S., Takeda, Y., & Nair, G. B. (2000). *Vibrio cholerae* O139 in Calcutta, 1992-1998: incidence, antibiograms, and genotypes. *Emerg Infect Dis*, 6(2), 139-147. DOI:10.3201/eid0602.000206
- Bauerfeind, R., Von Graevenitz, A., Kimmig, P., & Schiefer, H. G. (2016). *Zoonoses : infectious diseases transmissible between animals and humans* (Fourth edition. ed.). Washington, DC: ASM Press.
- Bayan, N., Houssin, C., Chami, M., & Leblon, G. (2003). Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J Biotechnol*, 104(1-3), 55-67. DOI:10.1016/s0168-1656(03)00163-9
- Berry, R. M., & Armitage, J. P. (1999). The Bacterial Flagella Motor. In R. K. Poole (Ed.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 41, pp. 291-337): Academic Press. ISBN: 0065-2911. [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60169-1](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60169-1).
- Bertani, B., & Ruiz, N. (2018). Function and Biogenesis of Lipopolysaccharides. *EcoSal Plus*, 8(1). DOI:10.1128/ecosalplus.ESP-0001-2018
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J Bacteriol*, 181(16), 4725-4733. DOI:10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999
- Bhandari, M., Jennison, A. V., Rathnayake, I. U., & Huygens, F. (2021). Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae* - A review. *Infect Genet Evol*, 89, 104726. DOI:10.1016/j.meegid.2021.104726
- Bharat, T. A. M., Kureisaiite-Ciziene, D., Hardy, G. G., Yu, E. W., Devant, J. M., Hagen, W. J. H., Brun, Y. V., Briggs, J. A. G., & Lowe, J. (2017). Structure of the hexagonal surface layer on *Caulobacter crescentus* cells. *Nat Microbiol*, 2, 17059. DOI:10.1038/nmicrobiol.2017.59

- Bhunja, A. K. (2018). *Escherichia coli*. In *Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis* (pp. 249-269). New York, NY: Springer New York. ISBN: 978-1-4939-7349-1. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1\\_14](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-7349-1_14).
- Bilecen, K., Fong, J. C., Cheng, A., Jones, C. J., Zamorano-Sanchez, D., & Yildiz, F. H. (2015). Polymyxin B resistance and biofilm formation in *Vibrio cholerae* are controlled by the response regulator CarR. *Infect Immun*, *83*(3), 1199-1209. DOI:10.1128/IAI.02700-14
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, *13*(1), 42-51. DOI:10.1038/nrmicro3380
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F., Gregor, J., Davis, N. W., Kirkpatrick, H. A., Goeden, M. A., Rose, D. J., Mau, B., & Shao, Y. (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, *277*(5331), 1453-1462. DOI:10.1126/science.277.5331.1453
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*, *4*. DOI:10.7554/eLife.05826
- Boparai, J. K., & Sharma, P. K. (2020). Mini Review on Antimicrobial Peptides, Sources, Mechanism and Recent Applications. *Protein Pept Lett*, *27*(1), 4-16. DOI:10.2174/0929866526666190822165812
- Borisov, V., & Verkhovskiy, M. (2015). Oxygen as Acceptor. *EcoSal Plus*. DOI:doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2015
- Boudaher, E., & Shaffer, C. L. (2019). Inhibiting bacterial secretion systems in the fight against antibiotic resistance. *Medchemcomm*, *10*(5), 682-692. DOI:10.1039/c9md00076c
- Bouhss, A., Trunkfield, A. E., Bugg, T. D., & Mengin-Lecreulx, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev*, *32*(2), 208-233. DOI:10.1111/j.1574-6976.2007.00089.x
- Brady, R. A., Leid, J. G., Calhoun, J. H., Costerton, J. W., & Shirtliff, M. E. (2008). Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *52*(1), 13-22. DOI:10.1111/j.1574-695X.2007.00357.x
- Braun, M., Kuhnert, P., Nicolet, J., Burnens, A. P., & Frey, J. (1999). Cloning and characterization of two bistructural S-layer-RTX proteins from *Campylobacter rectus*. *J Bacteriol*, *181*(8), 2501-2506. DOI:10.1128/JB.181.8.2501-2506.1999
- Braz, V. S., Melchior, K., & Moreira, C. G. (2020). *Escherichia coli* as a Multifaceted Pathogenic and Versatile Bacterium. *Front Cell Infect Microbiol*, *10*, 548492. DOI:10.3389/fcimb.2020.548492
- Bridges, A. A., Fei, C., & Bassler, B. L. (2020). Identification of signaling pathways, matrix-digestion enzymes, and motility components controlling *Vibrio cholerae* biofilm dispersal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(51), 32639-32647. DOI:10.1073/pnas.2021166117
- Brumbaugh, A. R., & Mobley, H. L. (2012). Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. *Expert Rev Vaccines*, *11*(6), 663-676. DOI:10.1586/erv.12.36

- Budin, I., de Rond, T., Chen, Y., Chan, L. J. G., Petzold, C. J., & Keasling, J. D. (2018). Viscous control of cellular respiration by membrane lipid composition. *Science*, *362*(6419), 1186-1189. DOI:10.1126/science.aat7925
- Burkovski, A. (2013). Cell envelope of *corynebacteria*: structure and influence on pathogenicity. *ISRN Microbiol*, *2013*, 935736. DOI:10.1155/2013/935736
- Bush, K. (2012). Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. *Rev Sci Tech*, *31*(1), 43-56. DOI:10.20506/rst.31.1.2096
- Bylund, J., Burgess, L. A., Cescutti, P., Ernst, R. K., & Speert, D. P. (2006). Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. *J Biol Chem*, *281*(5), 2526-2532. DOI:10.1074/jbc.M510692200
- Cambau, E., & Guillard, T. (2012). Antimicrobials that affect the synthesis and conformation of nucleic acids. *Rev Sci Tech*, *31*(1), 77-87, 65-76. DOI:10.20506/rst.31.1.2102
- Campbell, J., Singh, A. K., Swoboda, J. G., Gilmore, M. S., Wilkinson, B. J., & Walker, S. (2012). An antibiotic that inhibits a late step in wall teichoic acid biosynthesis induces the cell wall stress stimulon in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, *56*(4), 1810-1820. DOI:10.1128/AAC.05938-11
- Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompert, C. M., Alberti, S., & Bengoechea, J. A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*, *72*(12), 7107-7114. DOI:10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004
- Catala, A. (2009). Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids*, *157*(1), 1-11. DOI:10.1016/j.chemphyslip.2008.09.004
- Cava, F., & de Pedro, M. A. (2014). Peptidoglycan plasticity in bacteria: emerging variability of the murein sacculus and their associated biological functions. *Curr Opin Microbiol*, *18*, 46-53. DOI:10.1016/j.mib.2014.01.004
- CDC. (2019). Antibiotic Resistance Threats in the United States. [www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html](http://www.cdc.gov/DrugResistance/Biggest-Threats.html). DOI:10.15620/cdc:82532
- Ceccarelli, D., Salvia, A. M., Sami, J., Cappuccinelli, P., & Colombo, M. M. (2006). New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integron in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. *Antimicrob Agents Chemother*, *50*(7), 2493-2499. DOI:10.1128/AAC.01310-05
- Chao, K. L., Lim, K., Lehmann, C., Doseeva, V., Howard, A. J., Schwarz, F. P., & Herzberg, O. (2008). The *Escherichia coli* YdcF binds S-adenosyl-L-methionine and adopts an alpha/beta-fold characteristic of nucleotide-utilizing enzymes. *Proteins*, *72*(1), 506-509. DOI:10.1002/prot.22046
- Chateau, A., Van der Verren, S. E., Remaut, H., & Fioravanti, A. (2020). The *Bacillus anthracis* Cell Envelope: Composition, Physiological Role, and Clinical Relevance. *Microorganisms*, *8*(12). DOI:10.3390/microorganisms8121864
- Chekabab, S. M., Paquin-Veillette, J., Dozois, C. M., & Harel, J. (2013). The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett*, *341*(1), 1-12. DOI:10.1111/1574-6968.12078



- Cherier, D., Giacomucci, S., Patin, D., Bouhss, A., Touze, T., Blanot, D., Mengin-Lecreulx, D., & Barreteau, H. (2016). Pectocin M1 (PcaM1) Inhibits *Escherichia coli* Cell Growth and Peptidoglycan Biosynthesis through Periplasmic Expression. *Antibiotics (Basel)*, 5(4). DOI:10.3390/antibiotics5040036
- Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 65(2), 232-260 ; second page, table of contents. DOI:10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
- Chowdhury, F. R., Nur, Z., Hassan, N., von Seidlein, L., & Dunachie, S. (2017). Pandemics, pathogenicity and changing molecular epidemiology of cholera in the era of global warming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 16(1), 10. DOI:10.1186/s12941-017-0185-1
- Cleary, P. P., & Larkin, A. (1979). Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A streptococci. *J Bacteriol*, 140(3), 1090-1097. DOI:10.1128/JB.140.3.1090-1097.1979
- Coker, O. O., & Palittapongarnpim, P. (2011). Current understanding of de novo synthesis of bacterial lipid carrier (undecaprenyl phosphate): More enzymes to be discovered. *African Journal of Microbiology Research*, 5(18), 2555-2565. DOI:10.5897/AJMR11.339
- Cole, J. N., & Nizet, V. (2016). Bacterial Evasion of Host Antimicrobial Peptide Defenses. *Microbiol Spectr*, 4(1). DOI:10.1128/microbiolspec.VMBF-0006-2015
- Comstock, L. E., Maneval, D., Jr., Panigrahi, P., Joseph, A., Levine, M. M., Kaper, J. B., Morris, J. G., Jr., & Johnson, J. A. (1995). The capsule and O antigen in *Vibrio cholerae* O139 Bengal are associated with a genetic region not present in *Vibrio cholerae* O1. *Infect Immun*, 63(1), 317-323. DOI:10.1128/iai.63.1.317-323.1995
- Conner, J. G., Teschler, J. K., Jones, C. J., & Yildiz, F. H. (2016). Staying Alive: *Vibrio cholerae*'s Cycle of Environmental Survival, Transmission, and Dissemination. *Microbiol Spectr*, 4(2). DOI:10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015
- Correa, N. E., Peng, F., & Klose, K. E. (2005). Roles of the regulatory proteins FlhF and FlhG in the *Vibrio cholerae* flagellar transcription hierarchy. *J Bacteriol*, 187(18), 6324-6332. DOI:10.1128/JB.187.18.6324-6332.2005
- Costa, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*, 13(6), 343-359. DOI:10.1038/nrmicro3456
- Costerton, J. W., Irvin, R. T., & Cheng, K. J. (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*, 35, 299-324. DOI:10.1146/annurev.mi.35.100181.001503
- Council, N. R. (1999). *Size Limits of Very Small Microorganisms: Proceedings of a Workshop*. Washington, DC: The National Academies Press.
- Council of Canadian Academies. (2019). *When Antibiotics Fail*. Ottawa, Canada.
- Cox, G., & Wright, G. D. (2013). Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol*, 303(6-7), 287-292. DOI:10.1016/j.ijmm.2013.02.009
- Craig, L., Forest, K. T., & Maier, B. (2019). Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nat Rev Microbiol*, 17(7), 429-440. DOI:10.1038/s41579-019-0195-4

- Cress, B. F., Englaender, J. A., He, W., Kasper, D., Linhardt, R. J., & Koffas, M. A. (2014). Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiol Rev*, *38*(4), 660-697. DOI:10.1111/1574-6976.12056
- Crisan, C. V., & Hammer, B. K. (2020). The *Vibrio cholerae* type VI secretion system: toxins, regulators and consequences. *Environ Microbiol*, *22*(10), 4112-4122. DOI:10.1111/1462-2920.14976
- Cross, A. S. (1990). The biologic significance of bacterial encapsulation. In *Curr Top Microbiol Immunol* (1990/01/01 ed., Vol. 150, pp. 87-95). ISBN: 0070-217X (Print)
- 0070-217X (Linking). [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-74694-9\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-74694-9_5).
- Cusumano, C. K., Pinkner, J. S., Han, Z., Greene, S. E., Ford, B. A., Crowley, J. R., Henderson, J. P., Janetka, J. W., & Hultgren, S. J. (2011). Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Sci Transl Med*, *3*(109), 109ra115. DOI:10.1126/scitranslmed.3003021
- D'Mello-Guyett, L., Gallandat, K., Van den Bergh, R., Taylor, D., Bulit, G., Legros, D., Maes, P., Checchi, F., & Cumming, O. (2020). Prevention and control of cholera with household and community water, sanitation and hygiene (WASH) interventions: A scoping review of current international guidelines. *PLoS One*, *15*(1), e0226549. DOI:10.1371/journal.pone.0226549
- Das, B., Verma, J., Kumar, P., Ghosh, A., & Ramamurthy, T. (2020). Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine*, *38 Suppl 1*, A83-A92. DOI:10.1016/j.vaccine.2019.06.031
- Daugelavicius, R., Bakiene, E., & Bamford, D. H. (2000). Stages of polymyxin B interaction with the *Escherichia coli* cell envelope. *Antimicrob Agents Chemother*, *44*(11), 2969-2978. DOI:10.1128/aac.44.11.2969-2978.2000
- Davies, D. (2003). Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*, *2*(2), 114-122. DOI:10.1038/nrd1008
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, *74*(3), 417-433. DOI:10.1128/MMBR.00016-10
- de la Fuente-Nunez, C., Mertens, J., Smit, J., & Hancock, R. E. (2012). The bacterial surface layer provides protection against antimicrobial peptides. *Appl Environ Microbiol*, *78*(15), 5452-5456. DOI:10.1128/AEM.01493-12
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clin Microbiol Rev*, *33*(3). DOI:10.1128/CMR.00181-19
- Deen, J., Mengel, M. A., & Clemens, J. D. (2020). Epidemiology of cholera. *Vaccine*, *38 Suppl 1*, A31-A40. DOI:10.1016/j.vaccine.2019.07.078
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*, *1794*(5), 808-816. DOI:10.1016/j.bbapap.2008.11.005
- Delepelaire, P. (2004). Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta*, *1694*(1-3), 149-161. DOI:10.1016/j.bbamcr.2004.05.001

- Depluvere, S., Devos, S., & Devreese, B. (2016). The Role of Bacterial Secretion Systems in the Virulence of Gram-Negative Airway Pathogens Associated with Cystic Fibrosis. *Front Microbiol*, 7, 1336. DOI:10.3389/fmicb.2016.01336
- Destoumieux-Garzon, D., Duperthuy, M., Vanhove, A. S., Schmitt, P., & Wai, S. N. (2014). Resistance to Antimicrobial Peptides in *Vibrios*. *Antibiotics (Basel)*, 3(4), 540-563. DOI:10.3390/antibiotics3040540
- Di Domenico, E. G., Rimoldi, S. G., Cavallo, I., D'Agosto, G., Trento, E., Cagnoni, G., Palazzin, A., Pagani, C., Romeri, F., De Vecchi, E., Schiavini, M., Secchi, D., Antona, C., Rizzardini, G., Dichirico, R. B., Toma, L., Kovacs, D., Cardinali, G., Gallo, M. T., Gismondo, M. R., & Ensolì, F. (2019). Microbial biofilm correlates with an increased antibiotic tolerance and poor therapeutic outcome in infective endocarditis. *BMC Microbiol*, 19(1), 228. DOI:10.1186/s12866-019-1596-2
- Dieltjens, L., Appermans, K., Lissens, M., Lories, B., Kim, W., Van der Eycken, E. V., Foster, K. R., & Steenackers, H. P. (2020). Inhibiting bacterial cooperation is an evolutionarily robust anti-biofilm strategy. *Nat Commun*, 11(1), 107. DOI:10.1038/s41467-019-13660-x
- Dingsdag, S. A., & Hunter, N. (2018). Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother*, 73(2), 265-279. DOI:10.1093/jac/dkx351
- Dorr, T., Delgado, F., Umans, B. D., Gerding, M. A., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2016). A Transposon Screen Identifies Genetic Determinants of *Vibrio cholerae* Resistance to High-Molecular-Weight Antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(8), 4757-4763. DOI:10.1128/AAC.00576-16
- Dowhan, W. (1997). Molecular basis for membrane phospholipid diversity: why are there so many lipids? *Annu Rev Biochem*, 66, 199-232. DOI:10.1146/annurev.biochem.66.1.199
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J. V., & Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat Rev Microbiol*, 16(9), 523-539. DOI:10.1038/s41579-018-0048-6
- Duperthuy, M. (2020). Antimicrobial Peptides: Virulence and Resistance Modulation in Gram-Negative Bacteria. *Microorganisms*, 8(2). DOI:10.3390/microorganisms8020280
- Duperthuy, M., Sjostrom, A. E., Sabharwal, D., Damghani, F., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2013). Role of the *Vibrio cholerae* matrix protein Bap1 in cross-resistance to antimicrobial peptides. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003620. DOI:10.1371/journal.ppat.1003620
- ECDC and EMA. (2009). *Time to react : a call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents*.
- Egan, A. J., Biboy, J., van't Veer, I., Breukink, E., & Vollmer, W. (2015). Activities and regulation of peptidoglycan synthases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370(1679). DOI:10.1098/rstb.2015.0031
- Eldweik, L., McClelland, C., Stein, J. D., Blachley, T. S., & Lee, M. S. (2019). Association between cycline antibiotic and development of pseudotumor cerebri syndrome. *J Am Acad Dermatol*, 81(2), 456-462. DOI:10.1016/j.jaad.2019.03.041

- Epand, R. M., & Epand, R. F. (2009). Lipid domains in bacterial membranes and the action of antimicrobial agents. *Biochim Biophys Acta*, 1788(1), 289-294. DOI:10.1016/j.bbamem.2008.08.023
- Epand, R. M., Walker, C., Epand, R. F., & Magarvey, N. A. (2016). Molecular mechanisms of membrane targeting antibiotics. *Biochim Biophys Acta*, 1858(5), 980-987. DOI:10.1016/j.bbamem.2015.10.018
- Erler, S., Lewkowsky, O., Poehlein, A., & Forsgren, E. (2018). The Curious Case of *Achromobacter eurydice*, a Gram-Variable Pleomorphic Bacterium Associated with European Foulbrood Disease in Honeybees. *Microb Ecol*, 75(1), 1-6. DOI:10.1007/s00248-017-1007-x
- Eugenia, R., Romo, C., Coria, R., Ortiz, M., & Aquino, A. (2012). Mechanisms of O-Antigen Structural Variation of Bacterial Lipopolysaccharide (LPS). In *The Complex World of Polysaccharides*. ISBN: 978-953-51-0819-1. <http://dx.doi.org/10.5772/48147>.
- Eyler, R. F., & Shvets, K. (2019). Clinical Pharmacology of Antibiotics. *Clin J Am Soc Nephrol*, 14(7), 1080-1090. DOI:10.2215/CJN.08140718
- Fagan, R. P., & Fairweather, N. F. (2014). Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat Rev Microbiol*, 12(3), 211-222. DOI:10.1038/nrmicro3213
- Fernandez, L., & Hancock, R. E. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, 25(4), 661-681. DOI:10.1128/CMR.00043-12
- Finn, R. D., Tate, J., Mistry, J., Coghill, P. C., Sammut, S. J., Hotz, H. R., Ceric, G., Forslund, K., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L., & Bateman, A. (2008). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 36(Database issue), D281-288. DOI:10.1093/nar/gkm960
- Fleming, D., & Rumbaugh, K. (2018). The Consequences of Biofilm Dispersal on the Host. *Sci Rep*, 8(1), 10738. DOI:10.1038/s41598-018-29121-2
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8(9), 623-633. DOI:10.1038/nrmicro2415
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*, 14(9), 563-575. DOI:10.1038/nrmicro.2016.94
- Flemming, H. C., & Wuertz, S. (2019). Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 17(4), 247-260. DOI:10.1038/s41579-019-0158-9
- Floyd, K. A., Lee, C. K., Xian, W., Nametalla, M., Valentine, A., Crair, B., Zhu, S., Hughes, H. Q., Chlebek, J. L., Wu, D. C., Hwan Park, J., Farhat, A. M., Lomba, C. J., Ellison, C. K., Brun, Y. V., Campos-Gomez, J., Dalia, A. B., Liu, J., Biais, N., Wong, G. C. L., & Yildiz, F. H. (2020). c-di-GMP modulates type IV MSHA pilus retraction and surface attachment in *Vibrio cholerae*. *Nat Commun*, 11(1), 1549. DOI:10.1038/s41467-020-15331-8
- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol*, 2, 167. DOI:10.3389/fmicb.2011.00167

- Fronzes, R., Remaut, H., & Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J*, 27(17), 2271-2280. DOI:10.1038/emboj.2008.155
- Fu, L., Wan, M., Zhang, S., Gao, L., & Fang, W. (2020). Polymyxin B Loosens Lipopolysaccharide Bilayer but Stiffens Phospholipid Bilayer. *Biophys J*, 118(1), 138-150. DOI:10.1016/j.bpj.2019.11.008
- Fuerst, J. A., & Perry, J. W. (1988). Demonstration of lipopolysaccharide on sheathed flagella of *Vibrio cholerae* O:1 by protein A-gold immunoelectron microscopy. *J Bacteriol*, 170(4), 1488-1494. DOI:10.1128/jb.170.4.1488-1494.1988
- Garcia-Bermudez, J., & Birsoy, K. (2021). A mitochondrial gatekeeper that helps cells escape death by ferroptosis. *Nature*. DOI:10.1038/d41586-021-01203-8
- Geisinger, E., & Isberg, R. R. (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog*, 11(2), e1004691. DOI:10.1371/journal.ppat.1004691
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M. A., & Gomez-Zavaglia, A. (2015). Role of S-layer proteins in bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, 31(12), 1877-1887. DOI:10.1007/s11274-015-1952-9
- Gidden, J., Denson, J., Liyanage, R., Ivey, D. M., & Lay, J. O. (2009). Lipid Compositions in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* During Growth as Determined by MALDI-TOF and TOF/TOF Mass Spectrometry. *Int J Mass Spectrom*, 283(1-3), 178-184. DOI:10.1016/j.ijms.2009.03.005
- Glauert, A. M., & Thornley, M. J. (1969). The topography of the bacterial cell wall. *Annu Rev Microbiol*, 23, 159-198. DOI:10.1146/annurev.mi.23.100169.001111
- Global Task Force on Cholera Control, W. H. O. (2017). *Ending Cholera – A Global Roadmap to 2030*. Retrieved from <https://www.who.int/cholera/publications/global-roadmap.pdf?ua=1>. Accessed November 20, 2020.
- Global Tuberculosis Programme. (2020). Global tuberculosis report 2020. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>. Accessed in November 20, 2020
- Goldman, R., Kohlbrenner, W., Lartey, P., & Pernet, A. (1987). Antibacterial agents specifically inhibiting lipopolysaccharide synthesis. *Nature*, 329(6135), 162-164. DOI:10.1038/329162a0
- Goldman, R. C., White, D., Orskov, F., Orskov, I., Rick, P. D., Lewis, M. S., Bhattacharjee, A. K., & Leive, L. (1982). A surface polysaccharide of *Escherichia coli* O111 contains O-antigen and inhibits agglutination of cells by O-antiserum. *J Bacteriol*, 151(3), 1210-1221. DOI:10.1128/JB.151.3.1210-1221.1982
- Golub, S. R., & Overton, T. W. (2021). Pellicle formation by *Escherichia coli* K-12: Role of adhesins and motility. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 131(4), 381-389. DOI:<https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2020.12.002>
- Goodwin, A., Kersulyte, D., Sisson, G., Veldhuyzen van Zanten, S. J., Berg, D. E., & Hoffman, P. S. (1998). Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene

- (rdxA) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol*, 28(2), 383-393. DOI:10.1046/j.1365-2958.1998.00806.x
- Götz, F., Bannerman, T., & Schleifer, K.-H. (2006). The Genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In *The Prokaryotes* (pp. 5-75). ISBN: 978-0-387-25494-4  
978-0-387-30744-2. [http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30744-3\\_1](http://dx.doi.org/10.1007/0-387-30744-3_1).
- Grassi, L., Maisetta, G., Esin, S., & Batoni, G. (2017). Combination Strategies to Enhance the Efficacy of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Front Microbiol*, 8, 2409. DOI:10.3389/fmicb.2017.02409
- Green, E. R., & Meccas, J. (2016). Bacterial Secretion Systems: An Overview. *Microbiol Spectr*, 4(1). DOI:10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015
- Guerrero-Mandujano, A., Hernandez-Cortez, C., Ibarra, J. A., & Castro-Escarpulli, G. (2017). The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic*, 18(7), 425-432. DOI:10.1111/tra.12488
- Gupta, P., Mankere, B., Chekkoora Keloth, S., Tuteja, U., Pandey, P., & Chelvam, K. T. (2018). Increased antibiotic resistance exhibited by the biofilm of *Vibrio cholerae* O139. *J Antimicrob Chemother*, 73(7), 1841-1847. DOI:10.1093/jac/dky127
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol*, 198(1), 1-15. DOI:10.1007/s00203-015-1148-6
- Gupta, R. S. (1998). What are archaeobacteria: life's third domain or monoderm prokaryotes related to gram-positive bacteria? A new proposal for the classification of prokaryotic organisms. *Mol Microbiol*, 29(3), 695-707. DOI:10.1046/j.1365-2958.1998.00978.x
- Gupta, R. S. (2005). Evolutionary relationships among photosynthetic bacteria. In *Discoveries in Photosynthesis* (pp. 1087-1097). ISBN: 1-4020-3323-0. [http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-3324-9\\_96](http://dx.doi.org/10.1007/1-4020-3324-9_96).
- Gupta, R. S. (2011). Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100(2), 171-182. DOI:10.1007/s10482-011-9616-8
- Hakenbeck, R., Brückner, R., & Henrich, B. (2010). *Cell Wall Targeted Antibiotics*.
- Hall, C. W., & Mah, T. F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 41(3), 276-301. DOI:10.1093/femsre/fux010
- Hammer, B. K., & Bassler, B. L. (2009). Distinct sensory pathways in *Vibrio cholerae* El Tor and classical biotypes modulate cyclic dimeric GMP levels to control biofilm formation. *J Bacteriol*, 191(1), 169-177. DOI:10.1128/JB.01307-08
- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Muller, E., & Rohde, M. (2005). Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*, 73(8), 4653-4667. DOI:10.1128/IAI.73.8.4653-4667.2005

- Harris, J. B., LaRocque, R. C., Qadri, F., Ryan, E. T., & Calderwood, S. B. (2012). Cholera. *The Lancet*, 379(9835), 2466-2476. DOI:10.1016/s0140-6736(12)60436-x
- Häse, C. C. (2001). Analysis of the role of flagellar activity in virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Microbiology*, 147(Pt 4), 831-837. DOI:10.1099/00221287-147-4-831
- Hedge, P. J., & Spratt, B. G. (1985). Resistance to beta-lactam antibiotics by re-modelling the active site of an *E. coli* penicillin-binding protein. *Nature*, 318(6045), 478-480. DOI:10.1038/318478a0
- Helander, I. M., Kilpelainen, I., & Vaara, M. (1997). Phosphate groups in lipopolysaccharides of *Salmonella* Typhimurium *rfaP* mutants. *FEBS Lett*, 409(3), 457-460. DOI:10.1016/s0014-5793(97)00572-3
- Herb, M., & Schramm, M. (2021). Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants (Basel)*, 10(2). DOI:10.3390/antiox10020313
- Hernandez-Rocamora, V. M., Otten, C. F., Radkov, A., Simorre, J. P., Breukink, E., VanNieuwenhze, M., & Vollmer, W. (2018). Coupling of polymerase and carrier lipid phosphatase prevents product inhibition in peptidoglycan synthesis. *Cell Surf*, 2, 1-13. DOI:10.1016/j.tcs.2018.04.002
- Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martinez, J. L. (2020). Antibiotic Resistance: Moving From Individual Health Norms to Social Norms in One Health and Global Health. *Front Microbiol*, 11, 1914. DOI:10.3389/fmicb.2020.01914
- Herrera, C. M., Crofts, A. A., Henderson, J. C., Pingali, S. C., Davies, B. W., & Trent, M. S. (2014). The *Vibrio cholerae* VprA-VprB two-component system controls virulence through endotoxin modification. *mBio*, 5(6). DOI:10.1128/mBio.02283-14
- Herrera, C. M., Henderson, J. C., Crofts, A. A., & Trent, M. S. (2017). Novel coordination of lipopolysaccharide modifications in *Vibrio cholerae* promotes CAMP resistance. *Mol Microbiol*, 106(4), 582-596. DOI:10.1111/mmi.13835
- Hersch, S. J., Watanabe, N., Stietz, M. S., Manera, K., Kamal, F., Burkinshaw, B., Lam, L., Pun, A., Li, M., Savchenko, A., & Dong, T. G. (2020). Envelope stress responses defend against type six secretion system attacks independently of immunity proteins. *Nat Microbiol*, 5(5), 706-714. DOI:10.1038/s41564-020-0672-6
- Hoiby, N. (2002). Understanding bacterial biofilms in patients with cystic fibrosis: current and innovative approaches to potential therapies. *J Cyst Fibros*, 1(4), 249-254. DOI:10.1016/s1569-1993(02)00104-2
- Hollenbeck, E. C., Fong, J. C., Lim, J. Y., Yildiz, F. H., Fuller, G. G., & Cegelski, L. (2014). Molecular determinants of mechanical properties of *V. cholerae* biofilms at the air-liquid interface. *Biophys J*, 107(10), 2245-2252. DOI:10.1016/j.bpj.2014.10.015
- Holtje, J. V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62(1), 181-203. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529891>
- Hornborg, A. (2021). Beyond the Image of COVID-19 as Nature's Revenge: Understanding Globalized Capitalism through an Epidemiology of Money. *Sustainability*, 13(9). DOI:ARTN 5009

10.3390/su13095009

- Hospenthal, M. K., Costa, T. R. D., & Waksman, G. (2017). A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, *15*(6), 365-379. DOI:10.1038/nrmicro.2017.40
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*, *11*, 582779. DOI:10.3389/fmicb.2020.582779
- Huang, K. C., Mukhopadhyay, R., Wen, B., Gitai, Z., & Wingreen, N. S. (2008). Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *105*(49), 19282-19287. DOI:10.1073/pnas.0805309105
- Hung, D. T., Zhu, J., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2006). Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, *59*(1), 193-201. DOI:10.1111/j.1365-2958.2005.04846.x
- Imlay, J. A. (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu Rev Microbiol*, *57*, 395-418. DOI:10.1146/annurev.micro.57.030502.090938
- Impey, R. E., Hawkins, D. A., Sutton, J. M., & Soares da Costa, T. P. (2020). Overcoming Intrinsic and Acquired Resistance Mechanisms Associated with the Cell Wall of Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)*, *9*(9). DOI:10.3390/antibiotics9090623
- Irazoki, O., Hernandez, S. B., & Cava, F. (2019). Peptidoglycan Muropeptides: Release, Perception, and Functions as Signaling Molecules. *Front Microbiol*, *10*, 500. DOI:10.3389/fmicb.2019.00500
- Ismail, H., Smith, A. M., Sooka, A., Keddy, K. H., Group for Enteric, R., & Meningeal Disease Surveillance in South, A. (2011). Genetic characterization of multidrug-resistant, extended-spectrum- beta-lactamase-producing *Vibrio cholerae* O1 outbreak strains, Mpumalanga, South Africa, 2008. *J Clin Microbiol*, *49*(8), 2976-2979. DOI:10.1128/JCM.00293-11
- Izadpanah, A., & Gallo, R. L. (2005). Antimicrobial peptides. *J Am Acad Dermatol*, *52*(3 Pt 1), 381-390; quiz 391-382. DOI:10.1016/j.jaad.2004.08.026
- Jain, M., Kumar, P., & Goel, A. K. (2016). Emergence of Tetracycline Resistant *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor Serotype Ogawa with Classical ctxB Gene from a Cholera Outbreak in Odisha, Eastern India. *J Pathog*, *2016*, 1695410. DOI:10.1155/2016/1695410
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., Hussain, T., Ali, M., Rafiq, M., & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *J Chin Med Assoc*, *81*(1), 7-11. DOI:10.1016/j.jcma.2017.07.012
- Jee, S. C., Kim, M., Sung, J. S., & Kadam, A. A. (2020). Efficient Biofilms Eradication by Enzymatic-Cocktail of Pancreatic Protease Type-I and Bacterial alpha-Amylase. *Polymers (Basel)*, *12*(12). DOI:10.3390/polym12123032
- Jemielita, M., Wingreen, N. S., & Bassler, B. L. (2018). Quorum sensing controls *Vibrio cholerae* multicellular aggregate formation. *Elife*, *7*. DOI:10.7554/eLife.42057
- Jiang, X., Tan, W. B., Shrivastava, R., Seow, D. C. S., Chen, S. L., Guan, X. L., & Chng, S. S. (2020). Mutations in enterobacterial common antigen biosynthesis restore outer membrane



- barrier function in *Escherichia coli* tol-pal mutants. *Mol Microbiol*, 114(6), 991-1005. DOI:10.1111/mmi.14590
- Jiang, Y., Geng, M., & Bai, L. (2020). Targeting Biofilms Therapy: Current Research Strategies and Development Hurdles. *Microorganisms*, 8(8). DOI:10.3390/microorganisms8081222
- Jonson, A. B., Normark, S., & Rhen, M. (2005). Fimbriae, pili, flagella and bacterial virulence. *Contrib Microbiol*, 12, 67-89. DOI:10.1159/000081690
- Jorgenson, M. A., & Young, K. D. (2016). Interrupting Biosynthesis of O Antigen or the Lipopolysaccharide Core Produces Morphological Defects in *Escherichia coli* by Sequestering Undecaprenyl Phosphate. *J Bacteriol*, 198(22), 3070-3079. DOI:10.1128/JB.00550-16
- Juan, C., Torrens, G., Barcelo, I. M., & Oliver, A. (2018). Interplay between Peptidoglycan Biology and Virulence in Gram-Negative Pathogens. *Microbiol Mol Biol Rev*, 82(4). DOI:10.1128/MMBR.00033-18
- Jung, S. Y., Matin, A., Kim, K. S., & Khan, N. A. (2007). The capsule plays an important role in *Escherichia coli* K1 interactions with *Acanthamoeba*. *Int J Parasitol*, 37(3-4), 417-423. DOI:10.1016/j.ijpara.2006.10.012
- Kahlmeter, G. (2014). Defining antibiotic resistance-towards international harmonization. *Ups J Med Sci*, 119(2), 78-86. DOI:10.3109/03009734.2014.901446
- Kalynych, S., Morona, R., & Cygler, M. (2014). Progress in understanding the assembly process of bacterial O-antigen. *FEMS Microbiol Rev*, 38(5), 1048-1065. DOI:10.1111/1574-6976.12070
- Kanampalliwar, A., & Singh, D. V. (2020). Extracellular DNA builds and interacts with vibrio polysaccharide in the biofilm matrix formed by *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol Rep*, 12(5), 594-606. DOI:10.1111/1758-2229.12870
- Kaper, J. B., Morris, J. G., & Levine, M. M. (1995). Cholera. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(1), 48-86. DOI:10.1128/cmr.8.1.48
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 123-140. DOI:10.1038/nrmicro818
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends Microbiol*, 28(8), 668-681. DOI:10.1016/j.tim.2020.03.016
- Kenner, J. R., Coster, T. S., Taylor, D. N., Trofa, A. F., Barrera-Oro, M., Hyman, T., Adams, J. M., Beattie, D. T., Killeen, K. P., Spriggs, D. R., & et al. (1995). Peru-15, an improved live attenuated oral vaccine candidate for *Vibrio cholerae* O1. *J Infect Dis*, 172(4), 1126-1129. DOI:10.1093/infdis/172.4.1126
- Khatoon, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F., & Alarcon, E. I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, 4(12), e01067. DOI:10.1016/j.heliyon.2018.e01067
- Khursigara, C. M., Koval, S. F., Moyles, D. M., & Harris, R. J. (2018). Inroads through the bacterial cell envelope: seeing is believing. *Can J Microbiol*, 64(9), 601-617. DOI:10.1139/cjm-2018-0091

- Killeen, K. P., Beattie, D. T., Spriggs, D. R., Waldor, M. K., Mekalanos, J. J., Coster, T. S., Kenner, J. R., Trofa, A., Sadoff, J. C., & Taylor, D. N. (1995). Safety, immunogenicity, and efficacy of live attenuated *Vibrio cholerae* 0139 vaccine prototype. *The Lancet*, *345*(8955), 949-952. DOI:10.1016/s0140-6736(95)90698-3
- Kim, K. J., Elliott, S. J., Di Cello, F., Stins, M. F., & Kim, K. S. (2003). The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol*, *5*(4), 245-252. DOI:10.1046/j.1462-5822.2003.t01-1-00271.x
- Klein, A., Toth, B., Jankovics, H., Muskotal, A., & Vonderviszt, F. (2012). A polymerizable GFP variant. *Protein Eng Des Sel*, *25*(4), 153-157. DOI:10.1093/protein/gzs003
- Klein, E. Y., Van Boeckel, T. P., Martinez, E. M., Pant, S., Gandra, S., Levin, S. A., Goossens, H., & Laxminarayan, R. (2018). Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(15), E3463-E3470. DOI:10.1073/pnas.1717295115
- Klose, K. E., & Mekalanos, J. J. (1998). Differential regulation of multiple flagellins in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, *180*(2), 303-316. DOI:10.1128/JB.180.2.303-316.1998
- Koch, A. L. (2000). The exoskeleton of bacterial cells (the sacculus): still a highly attractive target for antibacterial agents that will last for a long time. *Crit Rev Microbiol*, *26*(1), 1-35. DOI:10.1080/10408410091154165
- Konovalova, A., Kahne, D. E., & Silhavy, T. J. (2017). Outer Membrane Biogenesis. *Annu Rev Microbiol*, *71*, 539-556. DOI:10.1146/annurev-micro-090816-093754
- Korotkov, K. V., & Sandkvist, M. (2019). Architecture, Function, and Substrates of the Type II Secretion System. *EcoSal Plus*, *8*(2). DOI:10.1128/ecosalplus.ESP-0034-2018
- Kostrzynska, M., Dooley, J. S., Shimojo, T., Sakata, T., & Trust, T. J. (1992). Antigenic diversity of the S-layer proteins from pathogenic strains of *Aeromonas hydrophila* and *Aeromonas veronii* biotype *sobria*. *J Bacteriol*, *174*(1), 40-47. DOI:10.1128/jb.174.1.40-47.1992
- Kouidmi, I. (2018). *Caractérisation du rôle du facteur ElyC dans la biogénèse de l'enveloppe chez l'organisme modèle* (PhD Par Article). Université de Montréal,
- Kouidmi, I., Alvarez, L., Collet, J. F., Cava, F., & Paradis-Bleau, C. (2018). The Chaperone Activities of DsbG and Spy Restore Peptidoglycan Biosynthesis in the *elyC* Mutant by Preventing Envelope Protein Aggregation. *J Bacteriol*, *200*(19). DOI:10.1128/JB.00245-18
- Kovacs-Simon, A., Titball, R. W., & Mitchell, S. L. (2011). Lipoproteins of bacterial pathogens. *Infect Immun*, *79*(2), 548-561. DOI:10.1128/IAI.00682-10
- Kraemer, S. A., Ramachandran, A., & Perron, G. G. (2019). Antibiotic Pollution in the Environment: From Microbial Ecology to Public Policy. *Microorganisms*, *7*(6). DOI:10.3390/microorganisms7060180
- Kuhn, H. M., Meier-Dieter, U., & Mayer, H. (1988). ECA, the enterobacterial common antigen. *FEMS Microbiol Rev*, *4*(3), 195-222. DOI:10.1111/j.1574-6968.1988.tb02743.x
- Kwon, D. H., El-Zaatari, F. A., Kato, M., Osato, M. S., Reddy, R., Yamaoka, Y., & Graham, D. Y. (2000). Analysis of *rdxA* and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (*FrxA*) and ferredoxin-like protein (*FdxB*) in metronidazole resistance of

- Helicobacter pylori. *Antimicrob Agents Chemother*, 44(8), 2133-2142. DOI:10.1128/AAC.44.8.2133-2142.2000
- Kwon, D. H., Kato, M., El-Zaatari, F. A., Osato, M. S., & Graham, D. Y. (2000). Frame-shift mutations in NAD(P)H flavin oxidoreductase encoding gene (frxA) from metronidazole resistant Helicobacter pylori ATCC43504 and its involvement in metronidazole resistance. *FEMS Microbiol Lett*, 188(2), 197-202. DOI:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09193.x
- Lahiri, D., Nag, M., Banerjee, R., Mukherjee, D., Garai, S., Sarkar, T., Dey, A., Sheikh, H. I., Pathak, S. K., Edinur, H. A., Pati, S., & Ray, R. R. (2021). Amylases: Biofilm Inducer or Biofilm Inhibitor? *Front Cell Infect Microbiol*, 11, 660048. DOI:10.3389/fcimb.2021.660048
- Lawrence, J. A., Huang, Z., Rathinavelu, S., Hu, J. F., Garo, E., Ellis, M., Norman, V. L., Buckle, R., Williams, R. B., Starks, C. M., & Eldridge, G. R. (2020). Optimized plant compound with potent anti-biofilm activity across gram-negative species. *Bioorg Med Chem*, 28(5), 115229. DOI:10.1016/j.bmc.2019.115229
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A. K., Wertheim, H. F., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G. L., Gould, I. M., Goossens, H., Greko, C., So, A. D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A. Q., Qamar, F. N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z. A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G. D., Brown, E. D., & Cars, O. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*, 13(12), 1057-1098. DOI:10.1016/S1473-3099(13)70318-9
- Lee, J. C., Oh, J. Y., Cho, J. W., Park, J. C., Kim, J. M., Seol, S. Y., & Cho, D. T. (2001). The prevalence of trimethoprim-resistance-conferring dihydrofolate reductase genes in urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *J Antimicrob Chemother*, 47(5), 599-604. DOI:10.1093/jac/47.5.599
- Lembre, P., Lorentz, C., & Di, P. (2012). Exopolysaccharides of the Biofilm Matrix: A Complex Biophysical World. In *The Complex World of Polysaccharides*. ISBN: 978-953-51-0819-1. <http://dx.doi.org/10.5772/51213>.
- Leo, J. C., Grin, I., & Linke, D. (2012). Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1592), 1088-1101. DOI:10.1098/rstb.2011.0208
- Lesinski, G. B., & Westerink, M. A. (2001). Vaccines against polysaccharide antigens. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 1(3), 325-334. DOI:10.2174/1568005014605964
- Letunic, I., & Bork, P. (2021). Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res*. DOI:10.1093/nar/gkab301
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(4), 999-1007. DOI:10.1128/AAC.45.4.999-1007.2001
- Li, X. Z., & Nikaido, H. (2004). Efflux-mediated drug resistance in bacteria. *Drugs*, 64(2), 159-204. DOI:10.2165/00003495-200464020-00004
- Li, X. Z., Plesiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 28(2), 337-418. DOI:10.1128/CMR.00117-14

- Lidholt, K., & Fjelstad, M. (1997). Biosynthesis of the *Escherichia coli* K4 capsule polysaccharide. A parallel system for studies of glycosyltransferases in chondroitin formation. *J Biol Chem*, *272*(5), 2682-2687. DOI:10.1074/jbc.272.5.2682
- Lima, L. M., Silva, B., Barbosa, G., & Barreiro, E. J. (2020). beta-lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective. *Eur J Med Chem*, *208*, 112829. DOI:10.1016/j.ejmech.2020.112829
- Lin, H. V., Massam-Wu, T., Lin, C. P., Wang, Y. A., Shen, Y. C., Lu, W. J., Hsu, P. H., Chen, Y. H., Borges-Walmsley, M. I., & Walmsley, A. R. (2017). The *Vibrio cholerae* var regulon encodes a metallo-beta-lactamase and an antibiotic efflux pump, which are regulated by VarR, a LysR-type transcription factor. *PLoS One*, *12*(9), e0184255. DOI:10.1371/journal.pone.0184255
- Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. V., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P. R., Knirel, Y. A., Wang, L., & Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiol Rev*, *44*(6), 655-683. DOI:10.1093/femsre/fuz028
- Liu, D., & Reeves, P. R. (1994). *Escherichia coli* K12 regains its O antigen. *Microbiology (Reading)*, *140* ( Pt 1), 49-57. DOI:10.1099/13500872-140-1-49
- Liu, Z., Wang, Y., Liu, S., Sheng, Y., Rueggeberg, K. G., Wang, H., Li, J., Gu, F. X., Zhong, Z., Kan, B., & Zhu, J. (2015). *Vibrio cholerae* represses polysaccharide synthesis to promote motility in mucosa. *Infect Immun*, *83*(3), 1114-1121. DOI:10.1128/IAI.02841-14
- Lories, B., Roberfroid, S., Dieltjens, L., De Coster, D., Foster, K. R., & Steenackers, H. P. (2020). Biofilm Bacteria Use Stress Responses to Detect and Respond to Competitors. *Curr Biol*, *30*(7), 1231-1244 e1234. DOI:10.1016/j.cub.2020.01.065
- Loutet, S. A., Di Lorenzo, F., Clarke, C., Molinaro, A., & Valvano, M. A. (2011). Transcriptional responses of *Burkholderia cenocepacia* to polymyxin B in isogenic strains with diverse polymyxin B resistance phenotypes. *BMC Genomics*, *12*, 472. DOI:10.1186/1471-2164-12-472
- Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., AlMazroa, M. A., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., Bell, M. L., Benjamin, E. J., Bennett, D., Bhalla, K., Bikbov, B., Abdulhak, A. B., Birbeck, G., Blyth, F., Bolliger, I., Boufous, S., Bucello, C., Burch, M., Burney, P., Carapetis, J., Chen, H., Chou, D., Chugh, S. S., Coffeng, L. E., Colan, S. D., Colquhoun, S., Colson, K. E., Condon, J., Connor, M. D., Cooper, L. T., Corriere, M., Cortinovis, M., de Vaccaro, K. C., Couser, W., Cowie, B. C., Criqui, M. H., Cross, M., Dabhadkar, K. C., Dahodwala, N., De Leo, D., Degenhardt, L., Delossantos, A., Denenberg, J., Des Jarlais, D. C., Dharmaratne, S. D., Dorsey, E. R., Driscoll, T., Duber, H., Ebel, B., Erwin, P. J., Espindola, P., Ezzati, M., Feigin, V., Flaxman, A. D., Forouzanfar, M. H., Fowkes, F. G. R., Franklin, R., Fransen, M., Freeman, M. K., Gabriel, S. E., Gakidou, E., Gaspari, F., Gillum, R. F., Gonzalez-Medina, D., Halasa, Y. A., Haring, D., Harrison, J. E., Havmoeller, R., Hay, R. J., Hoen, B., Hotez, P. J., Hoy, D., Jacobsen, K. H., James, S. L., Jasrasaria, R., Jayaraman, S., Johns, N., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Keren, A., Khoo, J.-P., Knowlton, L. M., Kobusingye, O., Koranteng, A., Krishnamurthi, R., Lipnick,

M., Lipshultz, S. E., Ohno, S. L., Mabweijano, J., MacIntyre, M. F., Mallinger, L., March, L., Marks, G. B., Marks, R., Matsumori, A., Matzopoulos, R., Mayosi, B. M., McAnulty, J. H., McDermott, M. M., McGrath, J., Memish, Z. A., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Michaud, C., Miller, M., Miller, T. R., Mock, C., Mocumbi, A. O., Mokdad, A. A., Moran, A., Mulholland, K., Nair, M. N., Naldi, L., Narayan, K. M. V., Nasser, K., Norman, P., O'Donnell, M., Omer, S. B., Ortblad, K., Osborne, R., Ozgediz, D., Pahari, B., Pandian, J. D., Rivero, A. P., Padilla, R. P., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Phillips, D., Pierce, K., Pope, C. A., Porrini, E., Pourmalek, F., Raju, M., Ranganathan, D., Rehm, J. T., Rein, D. B., Remuzzi, G., Rivara, F. P., Roberts, T., De León, F. R., Rosenfeld, L. C., Rushton, L., Sacco, R. L., Salomon, J. A., Sampson, U., Sanman, E., Schwebel, D. C., Segui-Gomez, M., Shepard, D. S., Singh, D., Singleton, J., Sliwa, K., Smith, E., Steer, A., Taylor, J. A., Thomas, B., Tleyjeh, I. M., Towbin, J. A., Truelsen, T., Undurraga, E. A., Venketasubramanian, N., Vijayakumar, L., Vos, T., Wagner, G. R., Wang, M., Wang, W., Watt, K., Weinstock, M. A., Weintraub, R., Wilkinson, J. D., Woolf, A. D., Wulf, S., Yeh, P.-H., Yip, P., Zabetian, A., Zheng, Z.-J., Lopez, A. D., & Murray, C. J. L. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380(9859), 2095-2128. DOI:10.1016/s0140-6736(12)61728-0

Lozano, R., Naghavi, M., Foreman, K., Lim, S., Shibuya, K., Aboyans, V., Abraham, J., Adair, T., Aggarwal, R., Ahn, S. Y., Alvarado, M., Anderson, H. R., Anderson, L. M., Andrews, K. G., Atkinson, C., Baddour, L. M., Barker-Collo, S., Bartels, D. H., Bell, M. L., Benjamin, E. J., Bennett, D., Bhalla, K., Bikbov, B., Bin Abdulhak, A., Birbeck, G., Blyth, F., Bolliger, I., Boufous, S., Bucello, C., Burch, M., Burney, P., Carapetis, J., Chen, H., Chou, D., Chugh, S. S., Coffeng, L. E., Colan, S. D., Colquhoun, S., Colson, K. E., Condon, J., Connor, M. D., Cooper, L. T., Corriere, M., Cortinovis, M., de Vaccaro, K. C., Couser, W., Cowie, B. C., Criqui, M. H., Cross, M., Dabhadkar, K. C., Dahodwala, N., De Leo, D., Degenhardt, L., Delossantos, A., Denenberg, J., Des Jarlais, D. C., Dharmaratne, S. D., Dorsey, E. R., Driscoll, T., Duber, H., Ebel, B., Erwin, P. J., Espindola, P., Ezzati, M., Feigin, V., Flaxman, A. D., Forouzanfar, M. H., Fowkes, F. G., Franklin, R., Fransen, M., Freeman, M. K., Gabriel, S. E., Gakidou, E., Gaspari, F., Gillum, R. F., Gonzalez-Medina, D., Halasa, Y. A., Haring, D., Harrison, J. E., Havmoeller, R., Hay, R. J., Hoen, B., Hotez, P. J., Hoy, D., Jacobsen, K. H., James, S. L., Jasrasaria, R., Jayaraman, S., Johns, N., Karthikeyan, G., Kassebaum, N., Keren, A., Khoo, J. P., Knowlton, L. M., Kobusingye, O., Koranteng, A., Krishnamurthi, R., Lipnick, M., Lipshultz, S. E., Ohno, S. L., Mabweijano, J., MacIntyre, M. F., Mallinger, L., March, L., Marks, G. B., Marks, R., Matsumori, A., Matzopoulos, R., Mayosi, B. M., McAnulty, J. H., McDermott, M. M., McGrath, J., Mensah, G. A., Merriman, T. R., Michaud, C., Miller, M., Miller, T. R., Mock, C., Mocumbi, A. O., Mokdad, A. A., Moran, A., Mulholland, K., Nair, M. N., Naldi, L., Narayan, K. M., Nasser, K., Norman, P., O'Donnell, M., Omer, S. B., Ortblad, K., Osborne, R., Ozgediz, D., Pahari, B., Pandian, J. D., Rivero, A. P., Padilla, R. P., Perez-Ruiz, F., Perico, N., Phillips, D., Pierce, K., Pope, C. A., 3rd, Porrini, E., Pourmalek, F., Raju, M., Ranganathan, D., Rehm, J. T., Rein, D. B., Remuzzi, G., Rivara, F. P., Roberts, T., De Leon, F. R., Rosenfeld, L. C., Rushton, L., Sacco, R. L., Salomon, J. A., Sampson, U., Sanman,

- E., Schwebel, D. C., Segui-Gomez, M., Shepard, D. S., Singh, D., Singleton, J., Sliwa, K., Smith, E., Steer, A., Taylor, J. A., Thomas, B., Tleyjeh, I. M., Towbin, J. A., Truelsen, T., Undurraga, E. A., Venketasubramanian, N., Vijayakumar, L., Vos, T., Wagner, G. R., Wang, M., Wang, W., Watt, K., Weinstock, M. A., Weintraub, R., Wilkinson, J. D., Woolf, A. D., Wulf, S., Yeh, P. H., Yip, P., Zabetian, A., Zheng, Z. J., Lopez, A. D., Murray, C. J., AlMazroa, M. A., & Memish, Z. A. (2012). Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, *380*(9859), 2095-2128. DOI:10.1016/S0140-6736(12)61728-0
- Lu, S., Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Geer, R. C., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Hurwitz, D. I., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2020). CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Res*, *48*(D1), D265-D268. DOI:10.1093/nar/gkz991
- Lu, Y. H., Guan, Z., Zhao, J., & Raetz, C. R. (2011). Three phosphatidylglycerol-phosphate phosphatases in the inner membrane of *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, *286*(7), 5506-5518. DOI:10.1074/jbc.M110.199265
- Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S., & McDougald, D. (2013). Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol*, *4*, 375. DOI:10.3389/fmicb.2013.00375
- MacLachlan, P. R., Keenleyside, W. J., Dodgson, C., & Whitfield, C. (1993). Formation of the K30 (group I) capsule in *Escherichia coli* O9:K30 does not require attachment to lipopolysaccharide lipid A-core. *J Bacteriol*, *175*(23), 7515-7522. DOI:10.1128/jb.175.23.7515-7522.1993
- Magana, M., Pushpanathan, M., Santos, A. L., Leanse, L., Fernandez, M., Ioannidis, A., Giulianotti, M. A., Apidianakis, Y., Bradfute, S., Ferguson, A. L., Cherkasov, A., Seleem, M. N., Pinilla, C., de la Fuente-Nunez, C., Lazaridis, T., Dai, T., Houghten, R. A., Hancock, R. E. W., & Tegos, G. P. (2020). The value of antimicrobial peptides in the age of resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, *20*(9), e216-e230. DOI:10.1016/s1473-3099(20)30327-3
- Magiorakos, A. P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., & Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*, *18*(3), 268-281. DOI:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x
- Magnuson, K., Jackowski, S., Rock, C. O., & Cronan, J. E., Jr. (1993). Regulation of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, *57*(3), 522-542. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8246839>
- Mah, T. F., & O'Toole, G. A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol*, *9*(1), 34-39. DOI:10.1016/s0966-842x(00)01913-2
- Mahlapuu, M., Hakansson, J., Ringstad, L., & Bjorn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol*, *6*, 194. DOI:10.3389/fcimb.2016.00194

- Manat, G., Roure, S., Auger, R., Bouhss, A., Barreteau, H., Mengin-Lecreulx, D., & Touze, T. (2014). Deciphering the metabolism of undecaprenyl-phosphate: the bacterial cell-wall unit carrier at the membrane frontier. *Microb Drug Resist*, *20*(3), 199-214. DOI:10.1089/mdr.2014.0035
- Mansilla, M. C., Cybulski, L. E., Albanesi, D., & de Mendoza, D. (2004). Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J Bacteriol*, *186*(20), 6681-6688. DOI:10.1128/JB.186.20.6681-6688.2004
- Mares, J., Kumaran, S., Gobbo, M., & Zerbe, O. (2009). Interactions of lipopolysaccharide and polymyxin studied by NMR spectroscopy. *J Biol Chem*, *284*(17), 11498-11506. DOI:10.1074/jbc.M806587200
- Markova, J. A., Anganova, E. V., Turskaya, A. L., Bybin, V. A., & Savirov, E. D. (2018). Regulation of *Escherichia coli* Biofilm Formation (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *54*(1), 1-11. DOI:10.1134/s0003683818010040
- Marshall, R. L., Lloyd, G. S., Lawler, A. J., Element, S. J., Kaur, J., Ciusa, M. L., Ricci, V., Tschumi, A., Kuhne, H., Alderwick, L. J., & Piddock, L. J. V. (2020). New Multidrug Efflux Inhibitors for Gram-Negative Bacteria. *mBio*, *11*(4). DOI:10.1128/mBio.01340-20
- Massad, G., & Oliver, J. D. (1987). New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*(9), 2262-2264. DOI:10.1128/aem.53.9.2262-2264.1987
- Mathieu-Denoncourt, A., Giacomucci, S., & Duperthuy, M. (2021). The Secretome of *Vibrio cholerae*. In Lixing Huang, Jie Li Fang (Ed.), *Vibrios [Working Title]*: IntechOpen. ISBN: 978-1-83969-227-7. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.96803>.
- Matson, J. S., Yoo, H. J., Hakansson, K., & Dirita, V. J. (2010). Polymyxin B resistance in El Tor *Vibrio cholerae* requires lipid acylation catalyzed by MsbB. *J Bacteriol*, *192*(8), 2044-2052. DOI:10.1128/JB.00023-10
- Mauldin, P. D., Salgado, C. D., Hansen, I. S., Durup, D. T., & Bosso, J. A. (2010). Attributable hospital cost and length of stay associated with health care-associated infections caused by antibiotic-resistant gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, *54*(1), 109-115. DOI:10.1128/AAC.01041-09
- May, K. L., & Grabowicz, M. (2018). The bacterial outer membrane is an evolving antibiotic barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(36), 8852-8854. DOI:10.1073/pnas.1812779115
- McCarren, J., & Brahamsha, B. (2009). Swimming motility mutants of marine *Synechococcus* affected in production and localization of the S-layer protein SwmA. *J Bacteriol*, *191*(3), 1111-1114. DOI:10.1128/JB.01401-08
- Messner, P., Steiner, K., Zarschler, K., & Schaffer, C. (2008). S-layer nanoglycobiology of bacteria. *Carbohydr Res*, *343*(12), 1934-1951. DOI:10.1016/j.carres.2007.12.025
- Mewborn, L., Benitez, J. A., & Silva, A. J. (2017). Flagellar motility, extracellular proteases and *Vibrio cholerae* detachment from abiotic and biotic surfaces. *Microb Pathog*, *113*, 17-24. DOI:10.1016/j.micpath.2017.10.016
- Miller, S. I., & Salama, N. R. (2018). The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. *PLoS Biol*, *16*(1), e2004935. DOI:10.1371/journal.pbio.2004935

- Minamino, T., Morimoto, Y. V., Kawamoto, A., Terashima, H., & Imada, K. (2018). *Salmonella* Flagellum. In *Salmonella - A Re-emerging Pathogen*. ISBN: 978-1-78923-444-2  
978-1-78923-445-9. <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.73277>.
- Miriagou, V., Tzelepi, E., Daikos, G. L., Tassios, P. T., & Tzouvelekis, L. S. (2005). Panresistance in VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, 55(5), 810-811. DOI:10.1093/jac/dki080
- Misra, C. S., Basu, B., & Apte, S. K. (2015). Surface (S)-layer proteins of *Deinococcus radiodurans* and their utility as vehicles for surface localization of functional proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1848(12), 3181-3187. DOI:10.1016/j.bbamem.2015.09.021
- Mitchell, A. M., Srikumar, T., & Silhavy, T. J. (2018). Cyclic Enterobacterial Common Antigen Maintains the Outer Membrane Permeability Barrier of *Escherichia coli* in a Manner Controlled by YhdP. *mBio*, 9(4). DOI:10.1128/mBio.01321-18
- Mitchell, A. M., Wang, W., & Silhavy, T. J. (2017). Novel RpoS-Dependent Mechanisms Strengthen the Envelope Permeability Barrier during Stationary Phase. *J Bacteriol*, 199(2). DOI:10.1128/JB.00708-16
- Mohorcic, M., Jerman, I., Zorko, M., Butinar, L., Orel, B., Jerala, R., & Friedrich, J. (2010). Surface with antimicrobial activity obtained through silane coating with covalently bound polymyxin B. *J Mater Sci Mater Med*, 21(10), 2775-2782. DOI:10.1007/s10856-010-4136-z
- Morabito, S. (2014). *Pathogenic Escherichia coli : Molecular and Cellular Microbiology*. Poole, UNITED KINGDOM: Caister Academic Press.
- Morris, J. G. (2011). Infections due to non-O1/O139 *Vibrio cholerae*. *UpToDate*.
- Moxon E.R., K. J. S. (1990). The Role of Bacterial Polysaccharide Capsules as Virulence Factors. In J. B. Jann K. (Ed.), *Bacterial Capsules. Current Topics in Microbiology and Immunology*. (Vol. 150): Springer, Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-642-74694-9. [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-74694-9\\_4](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-74694-9_4).
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., & Huang, T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Front Microbiol*, 11, 928. DOI:10.3389/fmicb.2020.00928
- Mulani, M. S., Kamble, E. E., Kumkar, S. N., Tawre, M. S., & Pardesi, K. R. (2019). Emerging Strategies to Combat ESKAPE Pathogens in the Era of Antimicrobial Resistance: A Review. *Front Microbiol*, 10, 539. DOI:10.3389/fmicb.2019.00539
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2). DOI:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- My, L., Rekoske, B., Lemke, J. J., Viala, J. P., Gourse, R. L., & Bouveret, E. (2013). Transcription of the *Escherichia coli* fatty acid synthesis operon *fabH* is directly activated by FadR and inhibited by ppGpp. *J Bacteriol*, 195(16), 3784-3795. DOI:10.1128/JB.00384-13
- Nadell, C. D., Drescher, K., & Foster, K. R. (2016). Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 14(9), 589-600. DOI:10.1038/nrmicro.2016.84



- Narendrakumar, L., Chandrika, S. K., & Thomas, S. (2020). Adaptive laboratory evolution of *Vibrio cholerae* to doxycycline associated with spontaneous mutation. *Int J Antimicrob Agents*, *56*(3), 106097. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2020.106097
- Natale, P., Bruser, T., & Driessen, A. J. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta*, *1778*(9), 1735-1756. DOI:10.1016/j.bbamem.2007.07.015
- Nesper, J., Schild, S., Lauriano, C. M., Kraiss, A., Klose, K. E., & Reidl, J. (2002). Role of *Vibrio cholerae* O139 surface polysaccharides in intestinal colonization. *Infect Immun*, *70*(11), 5990-5996. DOI:10.1128/iai.70.11.5990-5996.2002
- Nguyen-Disteche, M., Ghuysen, J. M., Pollock, J. J., Reynolds, P., Perkins, H. R., Coyette, J., & Salton, M. R. (1974). Enzymes involved in wall peptide crosslinking in *Escherichia coli* K12, strain 44. *Eur J Biochem*, *41*(3), 447-455. DOI:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03286.x
- Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S., & Dessen, A. (2014). Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein Sci*, *23*(3), 243-259. DOI:10.1002/pro.2414
- Nina Mian, Alex Bateman. (2015). Species distribution of DUF218 protein domain (PF02698). Retrieved from <http://pfam.xfam.org/family/PF02698#tabview=tab7>
- Nørager, S., Jensen, K. F., Björnberg, O., & Larsen, S. (2002). *E. coli* Dihydroorotate Dehydrogenase Reveals Structural and Functional Distinctions between Different Classes of Dihydroorotate Dehydrogenases. *Structure*, *10*(9), 1211-1223. DOI:10.1016/s0969-2126(02)00831-6
- Nwodo, U. U., Green, E., & Okoh, A. I. (2012). Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. *Int J Mol Sci*, *13*(11), 14002-14015. DOI:10.3390/ijms131114002
- Ogg, J. E., Ogg, B. J., Shrestha, M. B., & Poudayl, L. (1979). Antigenic changes in *Vibrio cholerae* biotype eltor serotype Ogawa after bacteriophage infection. *Infection and Immunity*, *24*(3), 974-978. DOI:10.1128/IAI.24.3.974-978.1979
- Oh, Y. T., Park, Y., Yoon, M. Y., Bari, W., Go, J., Min, K. B., Raskin, D. M., Lee, K. M., & Yoon, S. S. (2014). Cholera toxin production during anaerobic trimethylamine N-oxide respiration is mediated by stringent response in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem*, *289*(19), 13232-13242. DOI:10.1074/jbc.M113.540088
- ONeill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations *Review on Antimicrobial Resistance*.
- Organization Mondiale de la Santé. (2017). L’OMS publie une liste de bactéries contre lesquelles il est urgent d’avoir de nouveaux antibiotiques [Press release]. Retrieved from <https://www.who.int/fr/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Accessed november 20, 2020.
- Pages, J. M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, *6*(12), 893-903. DOI:10.1038/nrmicro1994
- Pages, J. M., Masi, M., & Barbe, J. (2005). Inhibitors of efflux pumps in Gram-negative bacteria. *Trends Mol Med*, *11*(8), 382-389. DOI:10.1016/j.molmed.2005.06.006

- Paiva, C. N., & Bozza, M. T. (2014). Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? *Antioxid Redox Signal*, *20*(6), 1000-1037. DOI:10.1089/ars.2013.5447
- Paluch, E., Rewak-Soroczynska, J., Jedrusik, I., Mazurkiewicz, E., & Jermakow, K. (2020). Prevention of biofilm formation by quorum quenching. *Appl Microbiol Biotechnol*, *104*(5), 1871-1881. DOI:10.1007/s00253-020-10349-w
- Paracini, N., Clifton, L. A., Skoda, M. W. A., & Lakey, J. H. (2018). Liquid crystalline bacterial outer membranes are critical for antibiotic susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(32), E7587-E7594. DOI:10.1073/pnas.1803975115
- Paradis-Bleau, C., Kritikos, G., Orlova, K., Typas, A., & Bernhardt, T. G. (2014). A genome-wide screen for bacterial envelope biogenesis mutants identifies a novel factor involved in cell wall precursor metabolism. *PLoS Genet*, *10*(1), e1004056. DOI:10.1371/journal.pgen.1004056
- Paradis-Bleau, C., Markovski, M., Uehara, T., Lupoli, T. J., Walker, S., Kahne, D. E., & Bernhardt, T. G. (2010). Lipoprotein cofactors located in the outer membrane activate bacterial cell wall polymerases. *Cell*, *143*(7), 1110-1120. DOI:10.1016/j.cell.2010.11.037
- Peleg, A., Shifrin, Y., Ilan, O., Nadler-Yona, C., Nov, S., Koby, S., Baruch, K., Altuvia, S., Elgrably-Weiss, M., Abe, C. M., Knutton, S., Saper, M. A., & Rosenshine, I. (2005). Identification of an *Escherichia coli* operon required for formation of the O-antigen capsule. *J Bacteriol*, *187*(15), 5259-5266. DOI:10.1128/JB.187.15.5259-5266.2005
- Phanphak, S., Georgiades, P., Li, R., King, J., Roberts, I. S., & Waigh, T. A. (2019). Super-Resolution Fluorescence Microscopy Study of the Production of K1 Capsules by *Escherichia coli*: Evidence for the Differential Distribution of the Capsule at the Poles and the Equator of the Cell. *Langmuir*, *35*(16), 5635-5646. DOI:10.1021/acs.langmuir.8b04122
- Pollock, J. J., Nguyen-Disteche, M., Ghuysen, J. M., Coyette, J., Linder, R., Salton, M. R., Kim, K. S., Perkins, H. R., & Reynolds, P. (1974). Fractionation of the DD-carboxypeptidase-transpeptidase activities solubilized from membranes of *Escherichia coli* K12, strain 44. *Eur J Biochem*, *41*(3), 439-446. DOI:10.1111/j.1432-1033.1974.tb03285.x
- Pradhan, S., Baidya, A. K., Ghosh, A., Paul, K., & Chowdhury, R. (2010). The El Tor biotype of *Vibrio cholerae* exhibits a growth advantage in the stationary phase in mixed cultures with the classical biotype. *J Bacteriol*, *192*(4), 955-963. DOI:10.1128/JB.01180-09
- Preston, A., Mandrell, R. E., Gibson, B. W., & Apicella, M. A. (1996). The lipooligosaccharides of pathogenic gram-negative bacteria. *Crit Rev Microbiol*, *22*(3), 139-180. DOI:10.3109/10408419609106458
- Que, Y.-A., & Moreillon, P. (2015). Staphylococcus aureus (Including Staphylococcal Toxic Shock Syndrome). In J. E. Bennett, R. Dolin, & M. J. Blaser (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (pp. 2237-2271.e2235). Philadelphia: Content Repository Only! ISBN: 9781455748013. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-1-4557-4801-3.00196-x>.
- Raetz, C. R., Reynolds, C. M., Trent, M. S., & Bishop, R. E. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem*, *76*, 295-329. DOI:10.1146/annurev.biochem.76.010307.145803

- Rai, A. K., & Mitchell, A. M. (2020). Enterobacterial Common Antigen: Synthesis and Function of an Enigmatic Molecule. *mBio*, 11(4). DOI:10.1128/mBio.01914-20
- Rai, M., Pandit, R., Gaikwad, S., & Kovics, G. (2016). Antimicrobial peptides as natural bio-preservative to enhance the shelf-life of food. *J Food Sci Technol*, 53(9), 3381-3394. DOI:10.1007/s13197-016-2318-5
- Rajagopal, M., & Walker, S. (2017). Envelope Structures of Gram-Positive Bacteria. *Curr Top Microbiol Immunol*, 404, 1-44. DOI:10.1007/82\_2015\_5021
- Ramos-Morales, F., Prieto, A. I., Beuzon, C. R., Holden, D. W., & Casadesus, J. (2003). Role for *Salmonella enterica* enterobacterial common antigen in bile resistance and virulence. *J Bacteriol*, 185(17), 5328-5332. DOI:10.1128/jb.185.17.5328-5332.2003
- Rao, V., Ghei, R., & Chambers, Y. (2016). Biofilms Research—Implications to Biosafety and Public Health. *Applied Biosafety*, 10(2), 83-90. DOI:10.1177/153567600501000205
- Reid, A. N., & Szymanski, C. M. (2010). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides. In *Microbial Glycobiology* (pp. 351-373). ISBN: 9780123745460. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-374546-0.00020-1>.
- Renner, L. D., & Weibel, D. B. (2011). Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bull*, 36(5), 347-355. DOI:10.1557/mrs.2011.65
- Restaino, O. F., D'Ambrosio, S., Cassese, E., Ferraiuolo, S. B., Alfano, A., Ventriglia, R., Marrazzo, A., Schiraldi, C., & Cimini, D. (2019). Molecular weight determination of heparosan- and chondroitin-like capsular polysaccharides: figuring out differences between wild -type and engineered *Escherichia coli* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 103(16), 6771-6782. DOI:10.1007/s00253-019-09969-8
- Rida, S., Caillet, J., & Alix, J. H. (1996). Amplification of a novel gene, *sanA*, abolishes a vancomycin-sensitive defect in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 178(1), 94-102. DOI:10.1128/jb.178.1.94-102.1996
- Roberts, I. S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 50, 285-315. DOI:10.1146/annurev.micro.50.1.285
- Rodo, X., San-Jose, A., Kirchgatter, K., & Lopez, L. (2021). Changing climate and the COVID-19 pandemic: more than just heads or tails. *Nat Med*, 27(4), 576-579. DOI:10.1038/s41591-021-01303-y
- Rodrigues-Oliveira, T., Belmok, A., Vasconcellos, D., Schuster, B., & Kyaw, C. M. (2017). Archaeal S-Layers: Overview and Current State of the Art. *Front Microbiol*, 8, 2597. DOI:10.3389/fmicb.2017.02597
- Rodriguez, M. L., Jann, B., & Jann, K. (1988). Structure and serological characteristics of the capsular K4 antigen of *Escherichia coli* O5:K4:H4, a fructose-containing polysaccharide with a chondroitin backbone. *Eur J Biochem*, 177(1), 117-124. DOI:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14351.x
- Rohde, M. (2019). The Gram-Positive Bacterial Cell Wall. *Microbiol Spectr*, 7(3). DOI:10.1128/microbiolspec.GPP3-0044-2018
- Rompikuntal, P. K., Vdovikova, S., Duperthuy, M., Johnson, T. L., Ahlund, M., Lundmark, R., Oscarsson, J., Sandkvist, M., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2015). Outer Membrane Vesicle-

- Mediated Export of Processed PrtV Protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS One*, 10(7), e0134098. DOI:10.1371/journal.pone.0134098
- Rossolini, G. M., Arena, F., & Giani, T. (2017). Mechanisms of Antibacterial Resistance. In *Infectious Diseases* (pp. 1181-1196.e1181). ISBN: 9780702062858. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-7020-6285-8.00138-6>.
- Rubin, E. J., Lin, W., Mekalanos, J. J., & Waldor, M. K. (1998). Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage. *Mol Microbiol*, 28(6), 1247-1254. DOI:10.1046/j.1365-2958.1998.00889.x
- Sabnis, A., Ledger, E. V. K., Pader, V., & Edwards, A. M. (2018). Antibiotic interceptors: Creating safe spaces for bacteria. *PLoS Pathog*, 14(4), e1006924. DOI:10.1371/journal.ppat.1006924
- Sabra, W., Zeng, A. P., Lunsdorf, H., & Deckwer, W. D. (2000). Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl Environ Microbiol*, 66(9), 4037-4044. DOI:10.1128/aem.66.9.4037-4044.2000
- Sachdeva, S., Palur, R. V., Sudhakar, K. U., & Rathinavelan, T. (2017). *E. coli* Group 1 Capsular Polysaccharide Exportation Nanomachinery as a Plausible Antivirulence Target in the Perspective of Emerging Antimicrobial Resistance. *Front Microbiol*, 8, 70. DOI:10.3389/fmicb.2017.00070
- Sack, D. A., Sack, R. B., Nair, G. B., & Siddique, A. K. (2004). Cholera. *The Lancet*, 363(9404), 223-233. DOI:10.1016/s0140-6736(03)15328-7
- Sailer, F. C., Meberg, B. M., & Young, K. D. (2003). beta-Lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 226(2), 245-249. DOI:10.1016/S0378-1097(03)00616-5
- Salton, M. R. J., & Kim, K. S. (1996). Structure. In th & S. Baron (Eds.), *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston
- Copyright © 1996, The University of Texas Medical Branch at Galveston. ISBN: 0963117211. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413343>.
- Samanta, P., Saha, R. N., Chowdhury, G., Naha, A., Sarkar, S., Dutta, S., Nandy, R. K., Okamoto, K., & Mukhopadhyay, A. K. (2018). Dissemination of newly emerged polymyxin B sensitive *Vibrio cholerae* O1 containing Haitian-like genetic traits in different parts of India. *J Med Microbiol*, 67(9), 1326-1333. DOI:10.1099/jmm.0.000783
- Sambanthamoorthy, K., Luo, C., Pattabiraman, N., Feng, X., Koestler, B., Waters, C. M., & Palys, T. J. (2014). Identification of small molecules inhibiting diguanylate cyclases to control bacterial biofilm development. *Biofouling*, 30(1), 17-28. DOI:10.1080/08927014.2013.832224
- Sanders, P., & Laurentie, M. (2012). Definitions of Antimicrobial Resistance in Veterinary Medicine: Epidemiological or Prognostic [Press release]
- Sandoval, N. R., Kim, J. Y., Glebes, T. Y., Reeder, P. J., Aucoin, H. R., Warner, J. R., & Gill, R. T. (2012). Strategy for directing combinatorial genome engineering in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(26), 10540-10545. DOI:10.1073/pnas.1206299109

- Santajit, S., & Indrawattana, N. (2016). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Biomed Res Int*, 2016, 2475067. DOI:10.1155/2016/2475067
- Sara, M., & Sleytr, U. B. (2000). S-Layer proteins. *J Bacteriol*, 182(4), 859-868. DOI:10.1128/jb.182.4.859-868.2000
- Sarkar, S., Ulett, G. C., Totsika, M., Phan, M. D., & Schembri, M. A. (2014). Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS One*, 9(4), e94786. DOI:10.1371/journal.pone.0094786
- Schaffer, C., & Messner, P. (2017). Emerging facets of prokaryotic glycosylation. *FEMS Microbiol Rev*, 41(1), 49-91. DOI:10.1093/femsre/fuw036
- Schembri, M. A., Dalsgaard, D., & Klemm, P. (2004). Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J Bacteriol*, 186(5), 1249-1257. DOI:10.1128/jb.186.5.1249-1257.2004
- Schmid, J., Sieber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol*, 6, 496. DOI:10.3389/fmicb.2015.00496
- Scholl, D., Adhya, S., & Merrill, C. (2005). *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Appl Environ Microbiol*, 71(8), 4872-4874. DOI:10.1128/AEM.71.8.4872-4874.2005
- Schroder, I., Johnson, E., & de Vries, S. (2003). Microbial ferric iron reductases. *FEMS Microbiol Rev*, 27(2-3), 427-447. DOI:10.1016/S0168-6445(03)00043-3
- Schubert, K., Sieger, B., Meyer, F., Giacomelli, G., Bohm, K., Rieblinger, A., Lindenthal, L., Sachs, N., Wanner, G., & Bramkamp, M. (2017). The Antituberculosis Drug Ethambutol Selectively Blocks Apical Growth in CMN Group Bacteria. *mBio*, 8(1). DOI:10.1128/mBio.02213-16
- Schwechheimer, C., Hebert, K., Tripathi, S., Singh, P. K., Floyd, K. A., Brown, E. R., Porcella, M. E., Osorio, J., Kiblen, J. T. M., Pagliai, F. A., Drescher, K., Rubin, S. M., & Yildiz, F. H. (2020). A tyrosine phosphoregulatory system controls exopolysaccharide biosynthesis and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog*, 16(8), e1008745. DOI:10.1371/journal.ppat.1008745
- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nat Rev Microbiol*, 13(10), 605-619. DOI:10.1038/nrmicro3525
- Schwechheimer, C., Rodriguez, D. L., & Kuehn, M. J. (2015). NlpI-mediated modulation of outer membrane vesicle production through peptidoglycan dynamics in *Escherichia coli*. *Microbiologyopen*, 4(3), 375-389. DOI:10.1002/mbo3.244
- Scott, A. J., Oyler, B. L., Goodlett, D. R., & Ernst, R. K. (2017). Lipid A structural modifications in extreme conditions and identification of unique modifying enzymes to define the Toll-like receptor 4 structure-activity relationship. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1862(11), 1439-1450. DOI:10.1016/j.bbalip.2017.01.004
- Seltmann, G., & Holst, O. (2002). Periplasmic Space and Rigid Layer. In *The Bacterial Cell Wall* (pp. 103-132). ISBN: 978-3-642-07648-0, 978-3-662-04878-8. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-04878-8\\_3](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-662-04878-8_3).
- Sengupta, C., Mukherjee, O., & Chowdhury, R. (2016). Adherence to Intestinal Cells Promotes Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis*, 214(10), 1571-1578. DOI:10.1093/infdis/jiw435

- Settem, R. P., Honma, K., Nakajima, T., Phansopa, C., Roy, S., Stafford, G. P., & Sharma, A. (2013). A bacterial glycan core linked to surface (S)-layer proteins modulates host immunity through Th17 suppression. *Mucosal Immunol*, *6*(2), 415-426. DOI:10.1038/mi.2012.85
- Sgro, G. G., Oka, G. U., Souza, D. P., Cenens, W., Bayer-Santos, E., Matsuyama, B. Y., Bueno, N. F., Dos Santos, T. R., Alvarez-Martinez, C. E., Salinas, R. K., & Farah, C. S. (2019). Bacteria-Killing Type IV Secretion Systems. *Front Microbiol*, *10*, 1078. DOI:10.3389/fmicb.2019.01078
- Shin, J. M., Gwak, J. W., Kamarajan, P., Fenno, J. C., Rickard, A. H., & Kapila, Y. L. (2016). Biomedical applications of nisin. *J Appl Microbiol*, *120*(6), 1449-1465. DOI:10.1111/jam.13033
- Sicard, J. F., Le Bihan, G., Vogeleeer, P., Jacques, M., & Harel, J. (2017). Interactions of Intestinal Bacteria with Components of the Intestinal Mucus. *Front Cell Infect Microbiol*, *7*, 387. DOI:10.3389/fcimb.2017.00387
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, *2*(5), a000414. DOI:10.1101/cshperspect.a000414
- Silipo, A., & Molinaro, A. (2010). The diversity of the core oligosaccharide in lipopolysaccharides. *Subcell Biochem*, *53*, 69-99. DOI:10.1007/978-90-481-9078-2\_4
- Silva, A. J., & Benitez, J. A. (2016). *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis*, *10*(2), e0004330. DOI:10.1371/journal.pntd.0004330
- Silva, F., Lourenco, O., Queiroz, J. A., & Domingues, F. C. (2011). Bacteriostatic versus bactericidal activity of ciprofloxacin in *Escherichia coli* assessed by flow cytometry using a novel far-red dye. *J Antibiot (Tokyo)*, *64*(4), 321-325. DOI:10.1038/ja.2011.5
- Sivieri, K., Bassan, J., Peixoto, G., & Monti, R. (2017). Gut microbiota and antimicrobial peptides. *Current Opinion in Food Science*, *13*, 56-62. DOI:10.1016/j.cofs.2017.02.010
- Slauch, J. M. (2011). How does the oxidative burst of macrophages kill bacteria? Still an open question. *Mol Microbiol*, *80*(3), 580-583. DOI:10.1111/j.1365-2958.2011.07612.x
- Sleytr, U. (1999). Bacterial S-layers. *Trends in Microbiology*, *7*(6), 253-260. DOI:10.1016/s0966-842x(99)01513-9
- Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E. M., & Pum, D. (2014). S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol Rev*, *38*(5), 823-864. DOI:10.1111/1574-6976.12063
- Sleytr, U. B., Thornley, M. J., & Glauert, A. M. (1974). Location of the Fracture Faces Within the Cell Envelope of Acinetobacter Species Strain MJT/F5/5. *Journal of Bacteriology*, *118*(2), 693-707. Retrieved from <https://jb.asm.org/content/jb/118/2/693.full.pdf>
- Smith, K. R., Woodward, A., Campbell-Lendrum, D., Chadee, D. D., Honda, Y., Liu, Q., Olwoch, J. M., Revich, B., & Sauerborn, R. (2014). Human Health: Impacts, Adaptation, and Co-Benefits. In C. B. Field, V. R. Barros, D. J. Dokken, K. J. Mach, M. D. Mastrandrea, T. E. Bilir, M. Chatterjee, K. L. Ebi, Y. O. Estrada, R. C. Genova, B. Girma, E. S. Kissel, A. N. Levy, S. MacCracken, P. R. Mastrandrea, & W. L.L. (Eds.), *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (pp. 709-754).

- Smith, M. A., & Edwards, D. I. (1997). Oxygen scavenging, NADH oxidase and metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother*, *39*(3), 347-353. DOI:10.1093/jac/39.3.347
- Solis-Velazquez, O. A., Gutierrez-Lomeli, M., Guerreo-Medina, P. J., Rosas-Garcia, M. L., Iniguez-Moreno, M., & Avila-Novoa, M. G. (2020). Nosocomial pathogen biofilms on biomaterials: Different growth medium conditions and components of biofilms produced in vitro. *J Microbiol Immunol Infect*. DOI:10.1016/j.jmii.2020.07.002
- Sonnhammer, E. L., Eddy, S. R., & Durbin, R. (1997). Pfam: a comprehensive database of protein domain families based on seed alignments. *Proteins*, *28*(3), 405-420. DOI:10.1002/(sici)1097-0134(199707)28:3<405::aid-prot10>3.0.co;2-l
- Souza Ribeiro Costa, J., Medeiros, M., Yamashiro-Kanashiro, E. H., Rocha, M. C., Cotrim, P. C., Stephano, M. A., Lancellotti, M., Tavares, G. D., & Oliveira-Nascimento, L. (2019). Biodegradable nanocarriers coated with polymyxin B: Evaluation of leishmanicidal and antibacterial potential. *PLoS Negl Trop Dis*, *13*(5), e0007388. DOI:10.1371/journal.pntd.0007388
- Stenutz, R., Weintraub, A., & Widmalm, G. (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiol Rev*, *30*(3), 382-403. DOI:10.1111/j.1574-6976.2006.00016.x
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., & Reeves, P. R. (1996). Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol*, *178*(16), 4885-4893. DOI:10.1128/jb.178.16.4885-4893.1996
- Stewart, M., & Murray, R. G. (1982). Structure of the regular surface layer of *Aquaspirillum serpens* MW5. *J Bacteriol*, *150*(1), 348-357. DOI:10.1128/jb.150.1.348-357.1982
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol*, *292*(2), 107-113. DOI:10.1078/1438-4221-00196
- Stirm, S., & Freund-Molbert, E. (1971). *Escherichia coli* capsule bacteriophages. II. Morphology. *J Virol*, *8*(3), 330-342. DOI:10.1128/JVI.8.3.330-342.1971
- Stock, J. B., Rauch, B., & Roseman, S. (1977). Periplasmic space in *Salmonella Typhimurium* and *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, *252*(21), 7850-7861. DOI:10.1016/s0021-9258(17)41044-1
- Strahl, H., & Errington, J. (2017). Bacterial Membranes: Structure, Domains, and Function. *Annu Rev Microbiol*, *71*, 519-538. DOI:10.1146/annurev-micro-102215-095630
- Stromberg, Z. R., Van Goor, A., Redweik, G. A. J., Wymore Brand, M. J., Wannemuehler, M. J., & Mellata, M. (2018). Pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* colonization and host inflammatory response in a defined microbiota mouse model. *Dis Model Mech*, *11*(11). DOI:10.1242/dmm.035063
- Sultana, M., Nusrin, S., Hasan, N. A., Sadique, A., Ahmed, K. U., Islam, A., Hossain, A., Longini, I., Nizam, A., Huq, A., Siddique, A. K., Sack, D. A., Sack, R. B., Colwell, R. R., & Alam, M. (2018). Biofilms Comprise a Component of the Annual Cycle of *Vibrio cholerae* in the Bay of Bengal Estuary. *mBio*, *9*(2). DOI:10.1128/mBio.00483-18

- Sumpradit, N., Wongkongkathep, S., Poonpolsup, S., Janejai, N., Paveenkittiporn, W., Boonyarit, P., Jaroenpoj, S., Kiatying-Angsulee, N., Kalpravidh, W., Sommanustweechai, A., & Tangcharoensathien, V. (2017). New chapter in tackling antimicrobial resistance in Thailand. *BMJ*, *358*, j3415. DOI:10.1136/bmj.j2423
- Syed, K. A., Beyhan, S., Correa, N., Queen, J., Liu, J., Peng, F., Satchell, K. J., Yildiz, F., & Klose, K. E. (2009). The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. *J Bacteriol*, *191*(21), 6555-6570. DOI:10.1128/JB.00949-09
- Tamaki, S., Nakajima, S., & Matsushashi, M. (1977). Thermosensitive mutation in *Escherichia coli* simultaneously causing defects in penicillin-binding protein-1Bs and in enzyme activity for peptidoglycan synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *74*(12), 5472-5476. DOI:10.1073/pnas.74.12.5472
- Tamayo, R., Patimalla, B., & Camilli, A. (2010). Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, *78*(8), 3560-3569. DOI:10.1128/IAI.00048-10
- Tanner, W. D., Atkinson, R. M., Goel, R. K., Toleman, M. A., Benson, L. S., Porucznik, C. A., & VanDerslice, J. A. (2017). Horizontal transfer of the blaNDM-1 gene to *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in biofilms. *FEMS Microbiol Lett*, *364*(8). DOI:10.1093/femsle/fnx048
- Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, *8*(3), 207-217. DOI:10.1038/nrmicro2298
- Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front Microbiol*, *8*, 1566. DOI:10.3389/fmicb.2017.01566
- Teschler, J. K., Zamorano-Sanchez, D., Utada, A. S., Warner, C. J., Wong, G. C., Lington, R. G., & Yildiz, F. H. (2015). Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat Rev Microbiol*, *13*(5), 255-268. DOI:10.1038/nrmicro3433
- Tian, X., Auger, R., Manat, G., Kerff, F., Mengin-Lecreulx, D., & Touze, T. (2020). Insight into the dual function of lipid phosphate phosphatase PgpB involved in two essential cell-envelope metabolic pathways in *Escherichia coli*. *Sci Rep*, *10*(1), 13209. DOI:10.1038/s41598-020-70047-5
- Tipton, K. A., Chin, C. Y., Farokhyfar, M., Weiss, D. S., & Rather, P. N. (2018). Role of Capsule in Resistance to Disinfectants, Host Antimicrobials, and Desiccation in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, *62*(12). DOI:10.1128/AAC.01188-18
- Tirumalai, M. R., Karouia, F., Tran, Q., Stepanov, V. G., Bruce, R. J., Ott, C. M., Pierson, D. L., & Fox, G. E. (2019). Evaluation of Acquired Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Exposed to Long-Term Low-Shear Modeled Microgravity and Background Antibiotic Exposure. *mBio*, *10*(1). DOI:10.1128/mBio.02637-18
- Tolker-Nielsen, T. (2015). Biofilm Development. *Microbiol Spectr*, *3*(2), MB-0001-2014. DOI:10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014
- Tomek, M. B., Neumann, L., Nimeth, I., Koerdt, A., Andesner, P., Messner, P., Mach, L., Potempa, J. S., & Schaffer, C. (2014). The S-layer proteins of *Tannerella forsythia* are secreted via a



- type IX secretion system that is decoupled from protein O-glycosylation. *Mol Oral Microbiol*, 29(6), 307-320. DOI:10.1111/omi.12062
- Toska, J., Ho, B. T., & Mekalanos, J. J. (2018). Exopolysaccharide protects *Vibrio cholerae* from exogenous attacks by the type 6 secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(31), 7997-8002. DOI:10.1073/pnas.1808469115
- Trimble, M. J., Mlynarcik, P., Kolar, M., & Hancock, R. E. (2016). Polymyxin: Alternative Mechanisms of Action and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(10). DOI:10.1101/cshperspect.a025288
- Trinanes, J., & Martinez-Urtaza, J. (2021). Future scenarios of risk of *Vibrio* infections in a warming planet: a global mapping study. *The Lancet Planetary Health*, 5(7), e426-e435. DOI:10.1016/s2542-5196(21)00169-8
- Troy, F. A., & McCloskey, M. A. (1979). Role of a membranous sialyltransferase complex in the synthesis of surface polymers containing polysialic acid in *Escherichia coli*. Temperature-induced alteration in the assembly process. *J Biol Chem*, 254(15), 7377-7387. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/379003>
- Typas, A., Banzhaf, M., Gross, C. A., & Vollmer, W. (2011). From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol*, 10(2), 123-136. DOI:10.1038/nrmicro2677
- Unissa, A. N., Subbian, S., Hanna, L. E., & Selvakumar, N. (2016). Overview on mechanisms of isoniazid action and resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Genet Evol*, 45, 474-492. DOI:10.1016/j.meegid.2016.09.004
- Ursula Meier-Dieter, R. S., Kathleen Barr, Hubert Mayer, and Paul D. Rick. (1990). Biosynthesis of Enterobacterial Common Antigen in *Escherichia coli*. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Vol. 265, No. 23(Issue of August 15), 13490-13497.
- Utada, A. S., Bennett, R. R., Fong, J. C. N., Gibiansky, M. L., Yildiz, F. H., Golestanian, R., & Wong, G. C. L. (2014). *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment. *Nat Commun*, 5, 4913. DOI:10.1038/ncomms5913
- Vaara, M. (1992). Agents that increase the permeability of the outer membrane. *Microbiological Reviews*, 56(3), 395-411. Retrieved from <https://mibr.asm.org/content/mibr/56/3/395.full.pdf>
- van Heijenoort, Y., & van Heijenoort, J. (1980). Biosynthesis of the peptidoglycan of *Escherichia coli* K-12: properties of the in vitro polymerization by transglycosylation. *FEBS Lett*, 110(2), 241-244. DOI:10.1016/0014-5793(80)80082-2
- Van Wielink, J. E., & Duine, J. A. (1990). How big is the periplasmic space? *Trends in Biochemical Sciences*, 15(4), 136-137. DOI:10.1016/0968-0004(90)90208-s
- Vann, W. F., Schmidt, M. A., Jann, B., & Jann, K. (1981). The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of urinary-tract-infective *Escherichia coli* O10:K5:H4. A polymer similar to desulfo-heparin. *Eur J Biochem*, 116(2), 359-364. DOI:10.1111/j.1432-1033.1981.tb05343.x

- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T*, 40(4), 277-283. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25859123>
- Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Front Chem*, 7, 824. DOI:10.3389/fchem.2019.00824
- Vergalli, J., Bodrenko, I. V., Masi, M., Moynie, L., Acosta-Gutierrez, S., Naismith, J. H., Davin-Regli, A., Ceccarelli, M., van den Berg, B., Winterhalter, M., & Pages, J. M. (2020). Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 18(3), 164-176. DOI:10.1038/s41579-019-0294-2
- Vezzulli, L., Grande, C., Reid, P. C., Helaouet, P., Edwards, M., Hofle, M. G., Brettar, I., Colwell, R. R., & Pruzzo, C. (2016). Climate influence on *Vibrio* and associated human diseases during the past half-century in the coastal North Atlantic. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(34), E5062-5071. DOI:10.1073/pnas.1609157113
- Vilcheze, C., & Kremer, L. (2017). Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative *Mycobacterium tuberculosis*: The Koch Paradox. *Microbiol Spectr*, 5(2). DOI:10.1128/microbiolspec.TB2-0003-2015
- Vincent, A. T., Nyongesa, S., Morneau, I., Reed, M. B., Tocheva, E. I., & Veyrier, F. J. (2018). The Mycobacterial Cell Envelope: A Relict From the Past or the Result of Recent Evolution? *Front Microbiol*, 9, 2341. DOI:10.3389/fmicb.2018.02341
- Vollmer, W., Blanot, D., & de Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), 149-167. DOI:10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., & Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2), 259-286. DOI:10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x
- Waites, K. B., & Talkington, D. F. (2004). *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. *Clin Microbiol Rev*, 17(4), 697-728, table of contents. DOI:10.1128/CMR.17.4.697-728.2004
- Waldor, M. K., Colwell, R., & Mekalanos, J. J. (1994). The *Vibrio cholerae* O139 serogroup antigen includes an O-antigen capsule and lipopolysaccharide virulence determinants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(24), 11388-11392. DOI:10.1073/pnas.91.24.11388
- Wang, H., Xing, X., Wang, J., Pang, B., Liu, M., Larios-Valencia, J., Liu, T., Liu, G., Xie, S., Hao, G., Liu, Z., Kan, B., & Zhu, J. (2018). Hypermutation-induced in vivo oxidative stress resistance enhances *Vibrio cholerae* host adaptation. *PLoS Pathog*, 14(10), e1007413. DOI:10.1371/journal.ppat.1007413
- Wang, L., Rothemund, D., Curd, H., & Reeves, P. R. (2003). Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *J Bacteriol*, 185(9), 2936-2943. DOI:10.1128/jb.185.9.2936-2943.2003
- Wang, M., & Tang, T. (2019). Surface treatment strategies to combat implant-related infection from the beginning. *J Orthop Translat*, 17, 42-54. DOI:10.1016/j.jot.2018.09.001
- Wang, S., Liu, X., Xu, X., Yang, D., Wang, D., Han, X., Shi, Y., Tian, M., Ding, C., Peng, D., & Yu, S. (2016). *Escherichia coli* Type III Secretion System 2 ATPase EivC Is Involved in the Motility and Virulence of Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Front Microbiol*, 7, 1387. DOI:10.3389/fmicb.2016.01387

- Watters, C., Fleming, D., Bishop, D., & Rumbaugh, K. P. (2016). Host Responses to Biofilm. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 142, 193-239. DOI:10.1016/bs.pmbts.2016.05.007
- Weisgerber, C., & Troy, F. A. (1990). Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. The endogenous acceptor of polysialic acid is a membrane protein of 20 kDa. *J Biol Chem*, 265(3), 1578-1587. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404016>
- Wen, Z., & Zhang, J.-R. (2015). Bacterial Capsules. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 33-53). ISBN: 9780123971692. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-397169-2.00003-2>.
- Werneburg, M., Zerbe, K., Juhas, M., Bigler, L., Stalder, U., Kaech, A., Ziegler, U., Obrecht, D., Eberl, L., & Robinson, J. A. (2012). Inhibition of lipopolysaccharide transport to the outer membrane in *Pseudomonas aeruginosa* by peptidomimetic antibiotics. *Chembiochem*, 13(12), 1767-1775. DOI:10.1002/cbic.201200276
- Wernick, N. L., Chinnapen, D. J., Cho, J. A., & Lencer, W. I. (2010). Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum. *Toxins (Basel)*, 2(3), 310-325. DOI:10.3390/toxins2030310
- Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 75(75), 39-68. DOI:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142545
- Whitfield, C., Vimr, E. R., Costerton, J. W., & Troy, F. A. (1984). Protein synthesis is required for in vivo activation of polysialic acid capsule synthesis in K1. *Journal of Bacteriology*, 159(1), 321. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/159/1/321.abstract>
- Whitfield, G. B., Marmont, L. S., & Howell, P. L. (2015). Enzymatic modifications of exopolysaccharides enhance bacterial persistence. *Front Microbiol*, 6, 471. DOI:10.3389/fmicb.2015.00471
- Wickramasinghe, N. N., Hlaing, M. M., Ravensdale, J. T., Coorey, R., Chandry, P. S., & Dykes, G. A. (2020). Characterization of the biofilm matrix composition of psychrotrophic, meat spoilage pseudomonads. *Sci Rep*, 10(1), 16457. DOI:10.1038/s41598-020-73612-0
- Willis, L. M., Stupak, J., Richards, M. R., Lowary, T. L., Li, J., & Whitfield, C. (2013). Conserved glycolipid termini in capsular polysaccharides synthesized by ATP-binding cassette transporter-dependent pathways in Gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(19), 7868-7873. DOI:10.1073/pnas.1222317110
- Willis, L. M., & Whitfield, C. (2013). Capsule and lipopolysaccharide. In *Escherichia coli* (pp. 533-556). ISBN: 9780123970480. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-397048-0.00017-6>.
- Winther, B., Gross, B. C., Hendley, J. O., & Early, S. V. (2009). Location of bacterial biofilm in the mucus overlying the adenoid by light microscopy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 135(12), 1239-1245. DOI:10.1001/archoto.2009.186
- World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance : global report on surveillance*. Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization. (2016, 21 september 2016). At UN, global leaders commit to act on antimicrobial resistance. *World Health Organization Regional Office for the Western Pacific*. Retrieved from <https://www.who.int/news/item/21-09-2016-at-un-global-leaders-commit-to-act-on-antimicrobial-resistance>. Accessed november 20, 2020.

- World Health Organization. (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. Retrieved from [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1). Accessed november 20, 2020.
- Xavier, J. B., & Foster, K. R. (2007). Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(3), 876-881. DOI:10.1073/pnas.0607651104
- Yadav, A. K., Espaillet, A., & Cava, F. (2018). Bacterial Strategies to Preserve Cell Wall Integrity Against Environmental Threats. *Front Microbiol*, *9*, 2064. DOI:10.3389/fmicb.2018.02064
- Yamaichi, Y., Bruckner, R., Ringgaard, S., Moll, A., Cameron, D. E., Briegel, A., Jensen, G. J., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2012). A multidomain hub anchors the chromosome segregation and chemotactic machinery to the bacterial pole. *Genes Dev*, *26*(20), 2348-2360. DOI:10.1101/gad.199869.112
- Yan, Y., Waite-Cusic, J. G., Kuppusamy, P., & Yousef, A. E. (2013). Intracellular free iron and its potential role in ultrahigh-pressure-induced inactivation of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, *79*(2), 722-724. DOI:10.1128/AEM.02202-12
- Yang, S., Xi, D., Jing, F., Kong, D., Wu, J., Feng, L., Cao, B., & Wang, L. (2018). Genetic diversity of K-antigen gene clusters of *Escherichia coli* and their molecular typing using a suspension array. *Can J Microbiol*, *64*(4), 231-241. DOI:10.1139/cjm-2017-0620
- Yasir, M., Willcox, M. D. P., & Dutta, D. (2018). Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Materials (Basel)*, *11*(12). DOI:10.3390/ma11122468
- Yoon, S. S., & Mekalanos, J. J. (2006). 2,3-butanediol synthesis and the emergence of the *Vibrio cholerae* El Tor biotype. *Infect Immun*, *74*(12), 6547-6556. DOI:10.1128/IAI.00695-06
- Zariri, A., & van der Ley, P. (2015). Biosynthetically engineered lipopolysaccharide as vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines*, *14*(6), 861-876. DOI:10.1586/14760584.2015.1026808
- Zerbib, D. (2016). Bacterial Cell Envelopes: Composition, Architecture, and Origin. In *Handbook of Electroporation* (pp. 1-20). ISBN: 978-3-319-26779-1. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1\\_28-1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1_28-1).
- Zgurskaya, H. I., Lopez, C. A., & Gnanakaran, S. (2015). Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. *ACS Infect Dis*, *1*(11), 512-522. DOI:10.1021/acsinfecdis.5b00097
- Zhang, G., Baidin, V., Pahil, K. S., Moison, E., Tomasek, D., Ramadoss, N. S., Chatterjee, A. K., McNamara, C. W., Young, T. S., Schultz, P. G., Meredith, T. C., & Kahne, D. (2018). Cell-based screen for discovering lipopolysaccharide biogenesis inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(26), 6834-6839. DOI:10.1073/pnas.1804670115
- Zhu, J., & Mekalanos, J. J. (2003). Quorum Sensing-Dependent Biofilms Enhance Colonization in *Vibrio cholerae*. *Developmental Cell*, *5*(4), 647-656. DOI:10.1016/s1534-5807(03)00295-8
- Zhu, S., Kojima, S., & Homma, M. (2013). Structure, gene regulation and environmental response of flagella in *Vibrio*. *Front Microbiol*, *4*, 410. DOI:10.3389/fmicb.2013.00410

## Chapitre 7 – Annexes

### Préface au Chapitre 7.1

- **Introduction**

Le chapitre de livre « The secretome of *Vibrio cholerae* » rapporte l'ensemble des connaissances connues à ce jour sur le sécrétome de l'agent étiologique du choléra et du lien des molécules qu'il sécrète avec la virulence, la colonisation et la résistance (Mathieu-Denoncourt et al., 2021).

- **Information sur le chapitre de livre**

Auteurs : Annabelle Mathieu-Denoncourt, Sean Giacomucci et Marylise Duperthuy. Département de Microbiologie, Infectiologie et Immunologie, Université de Montréal, Montréal, Canada.

Contact : [marylise.duperthuy@umontreal.ca](mailto:marylise.duperthuy@umontreal.ca).

Date de publication : 19 mars 2021

Titre du livre : *Vibrios [working title]*

Titre du chapitre : The Secretome of *Vibrio cholerae*.

Maison d'édition IntechOpen.

ISBN: 978-1-83969-227-7.

DOI : [10.5772/intechopen.96803](https://doi.org/10.5772/intechopen.96803)

Lien : <https://www.intechopen.com/online-first/the-secretome-of-vibrio-cholerae>

- **Contribution des auteurs**

Annabelle Mathieu-Denoncourt a participé à la majorité de l'écriture ~80%, Marylise Duperthuy à 12% et moi ~8%, principalement à la section **7.1.4 Biofilms and flagella**.

## 7.1 Chapitre de livre : The secretome of *Vibrio cholerae*

Annabelle Mathieu-Denoncourt, Sean Giacomucci and Marylise Duperthuy, Université de Montréal, Faculty of Medicine, Department of Microbiology, Infectiology and Immunology, Montreal, Canada, [marylise.duperthuy@umontreal.ca](mailto:marylise.duperthuy@umontreal.ca)

### Abstract

*Vibrio cholerae* is a facultative human pathogen responsible for the cholera disease which infects millions of people worldwide each year. *V. cholerae* is a natural inhabitant of aquatic environments and the infection usually occurs after ingestion of contaminated water or food. The virulence factors of *V. cholerae* have been extensively studied in the last decades and include the cholera toxin and the coregulated pilus. Most of the virulence factors of *V. cholerae* belong to the secretome, which corresponds to all the molecules secreted in the extracellular environment such as proteins, exopolysaccharides, extracellular DNA or membrane vesicles. In this chapter, we review the current knowledge of the secretome of *V. cholerae* and its role in virulence, colonization and resistance. In the first section, we focus on the proteins secreted through conventional secretion systems. The second and third sections emphasize on the membrane vesicles and on the secretome associated with biofilms.

**Keywords:** *Vibrio cholerae*, secretome, secretion system, membrane vesicles, biofilm.

### 7.1.1 Introduction

*Vibrio cholerae* is a Gram-negative bacterium responsible for the cholera disease, which infects millions of people per year worldwide. In the environment, *V. cholerae* is a common inhabitant of aquatic ecosystems. Over more than 200 serotypes of *V. cholerae* have been described, but only two are responsible of the pandemics, *i.e.* O1 and O139 serotypes. The O1 serotype is divided in two biotypes, classical and El Tor. The *V. cholerae* O1 El Tor is responsible for the ongoing 7<sup>th</sup> pandemic (Zuckerman, Rombo, & Fisch, 2007). The infection usually begins with the ingestion of contaminated water or food. Once inside the human host, *V. cholerae* colonizes the small

intestine where biofilm-like structures have been observed (C. Sengupta et al., 2016). The colonization and virulence inside the host are highly correlated with the secretion of a panel of proteins, including the cholera toxin (CT). The toxin is responsible for the malfunction of the calcium channel of the host epithelial cells, leading to the cholera characteristic massive loss of water and the diarrhea (Vanden Broeck, Horvath, & De Wolf, 2007). This review aims to focus on the secretome of *V. cholerae* and the secretion systems used by this bacterium to colonize the human host, compete with other bacteria, and survive in the environment.

### **7.1.2 Secretion systems**

*V. cholerae* possesses as many as five multicomponent secretion systems, allowing secretion or translocation of a broad range of molecules into the extracellular milieu or directly into the neighbouring cells. These molecules are essential for niche competition in the environment and for persistence in the host.

#### **7.1.2.1 Type II secretion system for virulence and environmental fitness**

The type II secretion system (T2SS) shares many structural characteristics with the type IV pilus (T4P) and is conserved among Gram-negative bacteria for delivery of colonization and virulence factors in the extracellular milieu (Korotkov, Sandkvist, & Hol, 2012; Sikora, 2013). In *V. cholerae*, it is used in the aquatic environment and in the human host to secrete exoproteins from the periplasm to the extracellular milieu or to anchor the bacteria to the host cells (Sikora, 2013; Sikora, Zielke, Lawrence, Andrews, & Sandkvist, 2011). The loss of T2SS altered growth, biofilm formation, antimicrobial resistance, and cell envelope integrity, suggesting that the T2SS has an essential role in this bacterium, which makes it a suitable target for therapeutic development (Johnson et al., 2014; Sandkvist et al., 1997; Sikora, Lybarger, & Sandkvist, 2007). The T2SS genes are referred to as extracellular protein secretion (*eps*) (Sandkvist et al., 1997). Hydrolyzation of

ATP is required to provide energy for secretion (Korotkov et al., 2012). The T2SS is anchored in both bacterial membranes and is distributed all over the bacterial surface (Johnson, Abendroth, Hol, & Sandkvist, 2006; Lybarger, Johnson, Gray, Sikora, & Sandkvist, 2009).

The growth defect of mutants lacking essential components or regulators of the T2SS shows that it is a vital component for *V. cholerae*, mostly since all the proteins secreted by the T2SS seem to act together to facilitate *V. cholerae* colonization and survival in ecological niches or in the human host. Majority of experiments occur in controlled laboratory conditions which do not represent the complexity of the intestinal nor the marine niches. These conditions might influence the type of proteins that are secreted by the bacteria, as seen in the Sikora & *al.* study where the CT has not been detected in the supernatant while it is a known T2SS secreted protein (Sikora et al., 2011).

#### 7.1.2.1.1 Structure and secretion through the T2SS

The structural components (Korotkov et al., 2012) and secreted proteins (Sikora, 2013) of the T2SS have recently been the object for reviews. Briefly, the T2SS assembles in 4 complexes; i) the secretin, a pore located in the outer membrane, ii) the inner membrane anchoring platform, iii) the intracytoplasmic ATPase complex and iv) the pseudopilus. Even though the exact sequence of biogenesis is still unknown, a general pathway of assembly has been suggested.

The targeted proteins with signal peptides are firstly translocated to the periplasm by Sec or Tat, where they are assembled to acquire a secretion competent conformation (Hofstra & Witholt, 1984; Voulhoux et al., 2001). Then, it has been proposed that they bind to the pseudopilin trimeric tip and to the inner membrane platform. This interaction activates the ATPase hydrolysis activity, thus the pseudopilus elongation by addition of pseudopilin subunits and leads to the thrust of the secreted protein through the secretin channel as a piston (Korotkov et al., 2012). It has been proposed that the signals for T2SS transportation are dependent on the protein conformation on



the N-terminal signal peptides, but they have not been clearly identified yet (Connell, Metzger, Lynch, & Folster, 1998).

#### 7.1.2.1.2 Genes and regulation

The T2SS apparatus is composed of a dozen types of proteins, which are encoded on the *eps* operon (*epsC* to *epsN*), plus *epsAB* and the *vcpD* (*pilD*) genes in *V. cholerae* (Lybarger et al., 2009; Sandkvist et al., 1997). Few studies have concentrated on the regulation of the T2SS in *V. cholerae*. Under laboratory conditions, the T2SS is constitutively expressed in *V. cholerae* following the growth rate of the bacteria with a higher expression at 25°C than at 37°C (Zielke et al., 2014). In addition, studies on the T2SS regulation suggest that several major regulatory pathways, including the quorum sensing, the C-D-GMP, the  $\sigma$ E envelope stress response, might be involved (Sloup et al., 2017; Zielke et al., 2014). Finally, as more than 20 extracellular proteins with important activities throughout the infection are secreted through the T2SS (Sikora et al., 2011), this system must be tightly controlled over time to allow their synchronized secretion. Therefore, the expression of the cargo proteins is regulated by a panoply of regulators.

#### 7.1.2.1.3 Secreted proteins

In *V. cholerae*, the T2SS ensures the transportation of more than 20 proteins with extracellular activities such as enzymes, toxins, virulence and colonization effectors (Sikora et al., 2011). The T2SS is essential for survival in the aquatic environment and to infect the human gut. An essential process to colonize both environments is the ability to adhere to abiotic and biotic surfaces such as copepods and zooplankton exoskeletons and epithelial cells, respectively (Benktander et al., 2013; Stauder et al., 2012; Wong et al., 2012). The surface-exposed GlcNAc binding protein (GbpA - VCA0811) is secreted by the T2SS and is an adhesion factor used by *V. cholerae* to bind chitinous surfaces, intestinal epithelial cells and mucin (Bhowmick et al., 2008; Kirn, Jude, & Taylor, 2005; Stauder et al., 2012; Wong et al., 2012). Chitin is the second most abundant polymer in nature

and consists on N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) monomers linked in  $\beta$ -1,4 and the main component of copepods and zooplankton exoskeleton (Keyhani & Roseman, 1999). Attachment to marine crustacea and zooplankton is an advantage for nutrients acquisition, survival and dispersion in aquatic environment. GlcNAc-containing glycoconjugates are often beared by some glycoproteins at the surface of the intestinal epithelial cells and might insure adhesion to the epithelial cells (Benktander et al., 2013; Finne et al., 1989; Zampini et al., 2005). GbpA possesses 4 domains, the 1 and 4 being the most important for chitin binding, while only the 1 is needed for mucin binding (Wong et al., 2012). As a secreted protein, GbpA must be able to interact with *V. cholerae* to allow its adhesion to the substrate. This function is assumed by the domains 3 and 4 of GbpA, that bind to the bacterial surface (Wong et al., 2012). GbpA is regulated by the quorum sensing and produced at low cell density (Jude, Martinez, Skorupski, & Taylor, 2009). At high cell density, HA/P and PrtV digest GbpA to allow cell detachment and propagation (Finkelstein, Boesman-Finkelstein, & Holt, 1983; Jude et al., 2009). Also, higher temperatures increase the production of GbpA, promoting cell adhesion (Stauder, Vezzulli, Pezzati, Repetto, & Pruzzo, 2010). GbpA induces mucin secretion by intestinal epithelium, and mucin increases expression of GbpA (Bhowmick et al., 2008). Studies also determined that GbpA can induce necrosis of intestinal cells by increasing their membrane permeability (Mandal & Chatterjee, 2016). Recently, a chitin cleavage activity under copper saturation has been described for GbpA and would therefore make it a lytic polysaccharide monooxygenase, a metalloenzyme copper-dependant capable of polysaccharide cleavage by oxidation (Loose, Forsberg, Fraaije, Eijsink, & Vaaje-Kolstad, 2014). Taken together, these findings suggest that GbpA is not only an early adhesion factor but might also have a more important role in pathogenesis.

In the aquatic environment, after binding to zooplankton, copepods and insect egg masses, *V. cholerae* can use chitin as source of carbon and nitrogen (Connell et al., 1998; Garay, Arnau, & Amaro, 1985). To do so, *V. cholerae* secretes at least 2 chitinases: ChiA-1 and ChiA-2. The chitinase-1 (ChiA-1 - VC1952) and 2 (ChiA-2 - VC0027) are secreted by the T2SS and synergistically hydrolyzes the  $\beta$ 1,4 bond between the GlcNAc monomers in the extracellular milieu (Connell et

al., 1998; Meibom et al., 2004; Sikora et al., 2011). The expression and activity of *V. cholerae* chitinases are influenced by environmental factors such as pH, salinity or temperature (Bhowmick, Ghosal, & Chatterjee, 2007). In the extracellular milieu, ChiA-1 expression is induced by chitin via the sensor kinase of the orphan two-component system ChiS (Meibom et al., 2004). In the intestine, the expression of the chitinases is constitutive and a role for ChiA-2 in mucin degradation and in virulence has been reported (M. Mondal, Nag, Koley, Saha, & Chatterjee, 2014). Besides ChiA-1 and ChiA-2, other proteins might have a role in chitin utilization including the VCA0140 gene that encodes for the spindolin-related protein, the VC0769 gene product and the chitin oligosaccharide deacetylase (COD - VC1280) (X. Li, Wang, Wang, & Roseman, 2007; Meibom et al., 2004; Sikora et al., 2011). All of them are secreted by the T2SS (Sikora et al., 2011). Regarding COD, Xibing Li *and coll.* demonstrated that it removes the GlcNAc from chitin oligosaccharides (X. Li et al., 2007).

Besides chitin, collagen can also be used as carbon source by *V. cholerae*. Collagen is one of the most abundant components of host tissues and aquatic animals, and can therefore be found in aquatic environments in association with marine life and sedimentation of decomposing animals (Y. Z. Zhang, Ran, Li, & Chen, 2015). Its degradation provides a nitrogen source, giving a growth advantage to collagenases producing bacteria (Y. Z. Zhang et al., 2015). The collagenase (VchC - VC1650) is a metalloprotease that degrades type I collagen, providing another carbon source for *V. cholerae* (Park et al., 2015). VchC has been recognized as a T2SS dependant extracellular protein (Park et al., 2015). In other *Vibrio* species, collagenases are recognized as virulence factors as it facilitates their dispersion by degradation of the cellular basal lamina, but this role has not been attributed to VchC yet (Park et al., 2015).

After the ingestion, *V. cholerae* navigates through the digestive tract, where it survives many physical and chemical barriers such as gastric acid, peristaltic movement, bile, mucin and microbiota. In the small intestine, it crosses mucin using its flagellum and the mucinase complex, that includes the vibriolysin, a zinc dependant metalloprotease hemagglutinin/protease (HA/P - VCA0865) secreted *via* the T2SS as a free protease or in a cell associated form (Benitez & Silva,

2016; Finkelstein et al., 1983). The structure, regulation, secretion mechanism and functions of HA/P have been reviewed recently (Benitez & Silva, 2016). Briefly, HA/P is expressed when cell density is high or when there is nutrient limitation through the HapR and RpoS regulators (Vance, Zhu, & Mekalanos, 2003; J. Zhu et al., 2002). It is translated as an inactive protein and chaperones ensure its inactive state inside the cytoplasm, then the secretion occurs in 2 steps; i) HA/P is translocated *via* Sec into the periplasm, ii) the T2SS exports the protease in the extracellular space where an autocatalytic event activates HA/P (Benitez & Silva, 2016). HA/P has multiple targets to facilitate spreading of *Vibrio* and increases its virulence (Benitez & Silva, 2016). *V. cholerae* gains access to the intestinal epithelial cells by degradation of the mucus layer, lactoferrin and fibronectin by HA/P in order to release toxic effectors into the epithelial cells (Finkelstein et al., 1983). In addition, HA/P can cleave toxins such as CT and lactoferrin to activate or increase their activity (Booth, Boesman-Finkelstein, & Finkelstein, 1984; Finkelstein et al., 1983; Silva, Leitch, Camilli, & Benitez, 2006) and disrupts tight junctions between intestinal epithelial cells by occludin cleavage (Wu, Nybom, & Magnusson, 2000). HA/P participates in *V. cholerae*'s release into the stool by degradation of mucin to detach bacteria from epithelial cells (Finkelstein, Boesman-Finkelstein, Chang, & Hase, 1992).

A second important component of the mucinase complex is the neuramidase (VCNA - VC1784). The sialidase, or neuraminidase, is encoded on the pathogenicity island of every toxigenic *V. cholerae* strains and is secreted by the T2SS (Moustafa et al., 2004). VCNA removes the sialic acid that hides the ganglioside GM1, which is the receptor of the CT, on the surface of epithelial cells (Galen et al., 1992). It binds to sialic acid to modify it by its N-terminal lectin domain (Crennell, Garman, Laver, Vimr, & Taylor, 1994). Multiple enzymes (VesA, HA/P, and VCNA) appear to work synergistically and with redundancy, ensuring access to the receptor and the activation of the toxin immediately after its secretion (Sikora et al., 2011).

The CT (VC1456-57) is an AB<sub>5</sub> toxin secreted by the T2SS in the intestinal lumen, which represents the main virulence factor of *V. cholerae* found in O1 and O139 strains (Finkelstein, Mukerjee, & Rudra, 1963; Vanden Broeck et al., 2007). The subunits are individually translocated by Sec into

the periplasm, and the assembled toxin is translocated to the extracellular milieu by the T2SS(Sandkvist et al., 1997). The toxin is secreted in an inactive form and must be cleaved by human or bacterial protease to be activated(Booth et al., 1984). CT is composed of five B subunits linked in a ring shape that bind to the ganglioside membrane receptor GM1 on the apical surface of intestinal epithelial cells(Vanden Broeck et al., 2007). CT is internalised and transits to the endoplasmic reticulum. The A subunit is heterodimeric with the A2 as the linker between B and A1 subunits, and A1 as a mono-ADP-rybosyltransferase(Vanden Broeck et al., 2007). A1 is released in the endoplasmic reticulum by disulfide isomerase and translocated to the cytosol where it activates the adenylate cyclase G protein by addition of an ADP. Thereby, the activated adenylate cyclase increases the intracellular levels of cyclic AMP, which in turn, activates the protein kinase A (PKA). Finally, PKA activates the chloride anion (Cl<sup>-</sup>) excretion by phosphorylation of the chloride channel, that leads to major water secretion by osmose(Vanden Broeck et al., 2007). *ctxA* and *ctxB* genes are organized as an operon on the integrated CTX $\phi$  lysogenic phage(Waldor & Mekalanos, 1996). The secretin complex of the T2SS is required by CTX $\phi$  to exit the bacteria, which makes the T2SS essential for virulence and horizontal transfer of CT(Davis et al., 2000). CT is expressed when the cell density is low, inversely to HA/P, which is why it has been suggested that HA/P could cleave the remaining non-activated CT when the cell density rises (Chaudhuri, 2014).

Prior to GM1 binding, the CT must be processed by extracellular proteases to be activated. These proteases are therefore important for virulence and colonization. Besides their capacity to activate the toxin, they have a role in finding a substrate (modification of integrin) and nutrients, and in deactivating host defense mechanisms. Among the T2SS secreted proteins, 3 serine proteases with 30% homology between them have been identified, the *Vibrio* extracellular serine proteases (VesA - VCA0803; VesB - VC1200; VesC - VC1649) (Sikora et al., 2011). All three proteins have a N-terminal protease domain(Gadwal, Korotkov, Delarosa, Hol, & Sandkvist, 2014; Sikora et al., 2011). VesB has a similar structure and specificity to trypsin(Gadwal et al., 2014). Mutation of *vesABC* allowed to identify that VesB is the main responsible of the proteolytic activity, while

VesA and VesC are responsible of 20% of the total proteolytic activity(Sikora et al., 2011). VesABC do not require bivalent ions for their enzymatic activity (Sikora et al., 2011). Under laboratory growth conditions, VesA, and in a lesser extend VesB and HA/P, activate the CT in the extracellular milieu (Booth et al., 1984; Sikora et al., 2011). VesC induces a hemorrhagic response in rabbit ileal loop model, which might also reflect a role in virulence(Syngkon et al., 2010). VesB and VesC are expressed at low cell density while VesA is expressed at high cell density(Sikora, 2013).

Other virulence factors secreted by the T2SS have been identified in *V. cholerae*. The extracellular metalloprotease (PrtV) is a Zn-dependant metalloprotease(Ogierman et al., 1997; Vaitkevicius et al., 2008). Its activity depends on several autocatalytic events occurring inside and outside the cell for activation(Edwin et al., 2014). PrtV uses two mechanisms of secretion, in association with membrane vesicles (MV) and *via* the T2SS(Rompikuntal et al., 2015; Sikora et al., 2011). PrtV cleaves host proteins such as extracellular matrix and substrate proteins, inducing a change in host cell conformation leading to cell death(Vaitkevicius et al., 2008). In addition, PrtV is necessary for killing of *Caenorhabditis elegans* and protection against predators(Vaitkevicius et al., 2006). To do so, PrtV has many substrates such as, but not limited to, fibronectin, fibrinogen and plasminogen(Vaitkevicius et al., 2008). PrtV is composed of two domains usually known to allow protein-protein or protein-carbohydrates interactions(Edwin et al., 2014; Edwin et al., 2015). Thus, PrtV is important for the colonization of ecological niches and in pathogenesis.

The cytolytic toxin cytolysin/hemolysin A (VCC or HlyA - VCA0219), is secreted by the T2SS (Sikora et al., 2011). All *V. cholerae* strains produce VCC, an iron-dependant secondary toxin activated by cleavage (Stoebner & Payne, 1988). VCC leads to cell death by vacuolization of the target cell, after production of anions channels in the membrane (Debellis et al., 2009). Since VCC leads to chloride efflux in intestinal cells, and subsequently to sodium and water by osmosis, it has been suggested that VCC is the major factor responsible of diarrhea in non-producing CT strains.

Leucine aminopeptidase (Lap - VCA0812) and aminopeptidase (LapX - VCA0813) are other secreted proteases using T2SS(Sikora et al., 2011). Lap is a zinc dependant metallo-exopeptidase

that cleaves leucin in N-terminal position, while the role of LapX remains unknown (Toma & Honma, 1996). Both Lap and LapX have no role in virulence in a *C. elegans* model (Vaitkevicius et al., 2006). While the TagA-related protein (Tarp - VCA0148), the unidentified VCA0583 and VCA0738 proteins, as well as the putative lipoprotein VC2298, have been recognized as T2SS secreted proteins, their role in *V. cholerae* is still unknown (Sikora et al., 2011).

Finally, several proteins involved in biofilm formation and dissemination are also secreted by the T2SS in *V. cholerae*. Biofilm protects bacteria from antibiotics, immune system and poor environmental conditions, thus allows their survival in diversified range of ecological niches. Many components are secreted into the extracellular milieu to form the matrix. Among them, Biofilm associated protein 1 (Bap1 - VC1888) and rugosity and biofilm structure modulator A (RbmA - VC0928) and C (RbmC - VC0930) are the matrix proteins and are secreted by the T2SS (Johnson et al., 2014). In addition, the DNase Xds, an exonuclease would also be secreted by the T2SS (Seper et al., 2013). Xds is expressed at the late stage of infection, can contribute to survival against neutrophils NET traps, to acquisition of new DNA and dispersion of the biofilm (Blokesch & Schoolnik, 2008; Seper et al., 2013). More details about the roles of the matrix proteins and nucleases in biofilm formation are presented in the Biofilms and Flagella section.

#### 7.1.2.2 Type VI secretion system for competition and DNA acquisition

The type VI secretion system (T6SS) is a versatile syringe-like apparatus with homology to the phage T4 and produced by more than 25% Gram-negative bacteria that, upon contact with a target cell, punctures its cell wall, allowing translocation of toxic effectors directly into the neighboring cells (Coulthurst, 2019; Joshi et al., 2017). The cellular targets of these effectors are multiple; peptidoglycan, actin, cellular membrane, nucleic acids and immune system components, for instance (Cherrak, Flaugnatti, Durand, Journet, & Cascales, 2019). As the target cells release their DNA into the extracellular milieu upon lysis, another function of the T6SS is to

capture the extracellular DNA (eDNA) in order to acquire new features such as antibiotic resistance factors and new effectors or immunity proteins (Borgeaud, Metzger, Scignari, & Blokesch, 2015). Bacteria use this device as a competition effector to take over the environmental niche and a single bacterium can possess as much as 6 different types of T6SS (Coulthurst, 2019). In *V. cholerae*, the T6SS is as efficient at killing bacterial competitors as it is at delivering toxic effectors to eukaryotic host cells, making it an important colonization and virulence factor (Pukatzki et al., 2006).

#### 7.1.2.2.1 Structure and secretion through the T6SS

The T6SS is anchored in the cell membrane and contains 4 distinct domains; i) the membrane complex, ii) the baseplate, iii) the contractile sheath and iv) the syringe. The current knowledge on the structure of the T6SS have been reviewed elsewhere (Joshi et al., 2017).

Valine glycine rich proteins G 1, 2 and 3 (VgrG1-3) and a single proline-alanine-alanine-arginine repeated motif protein (PAAR) form the tip of the syringe (Shneider et al., 2013). There are multiple PAAR proteins in *V. cholerae*'s genome but only one binds and folds in order to form a sharpened tip and it has been shown to be essential for an efficient secretion by the T6SS (Shneider et al., 2013). The PAAR proteins also have toxic effector functions. The syringe is a tube composed of multiple hexameric rings of hemolysin-coregulated protein (Hcp) (Brunet, Henin, Celia, & Cascales, 2014). Almost simultaneously, the syringe is wrapped by the helical contractile sheath made of VipA and VipB (Kube et al., 2014) which polymerizes in an extended conformation. This high-energy conformation provides enough energy, upon contraction signal, to propel the Hcp syringe, the VgrG-PAAR tip and the associated effectors into the extracellular milieu or directly into a near target cell by contraction and rotation of VipB (Kube et al., 2014). VipA would function as a chaperone for the VipB subunits (Kube et al., 2014). The contracted arrangement of VipB would expose the ClpV binding sites on VipB, which are hidden in the extended conformation. ClpV is the ATPase responsible for recycling the sheath components that



can be reused for further effectors translocation(Bonemann, Pietrosiuk, Diemand, Zentgraf, & Mogk, 2009; Pietrosiuk et al., 2011). Adaptor proteins are required to load the effectors on the tip of the syringe; however, they are not secreted by the T6SS(Unterweger, Kostiuik, & Pukatzki, 2017).

#### 7.1.2.2.2 *Genes and regulation*

In *V. cholerae*, the core genes are organized in a main cluster operon that includes *vipAB*, *hsiF*, *vasA* to *vasM* and *clpV*, on the small chromosome (Pukatzki et al., 2006). It contains most of the structural components of the T6SS, except for Hcp, in addition to the regulator VasH and recycling protease ClpV. At least 2 auxiliary clusters (Hcp -1 and -2), harbouring Hcp, VgrGs, adaptor and effector/immunity proteins, are distributed in the genome(Crisan et al., 2019). Some strains, including pandemic strains, have an additional auxiliary cluster (Aux -3) coding for a second PAAR protein and extra effector/immunity module set(Crisan et al., 2019). Recently, two other auxiliary clusters, Aux -4, coding for the predicted Tse4, and Aux -5, coding for Hcp, a VgrG protein, an adaptor protein and effector/immunity module set, have been identified(Crisan et al., 2019; Labbate et al., 2016). While the genes from the main cluster are highly conserved, the auxiliary clusters, even from the pandemic strains harbouring the same effectors/immunity module sets, only share about 30 % homology between them(Unterweger et al., 2014).

The complexity of the apparatus and its organization require a fine regulation to insure its efficiency and recycling. The transcriptional regulation of the T6SS in *V. cholerae* is strain dependant(Dong & Mekalanos, 2012; Ishikawa et al., 2012), complex and not entirely understood yet. As the environmental strains constitutively express the T6SS to control the surrounding bacterial populations and survive predators of the ecological niche, the pathogenic strains tightly regulate their T6SS(Drebes Dorr & Blokesch, 2020; Ishikawa et al., 2012). Quorum sensing, the chitin and bacterial competence pathways, osmolarity and other environmental conditions are

involved in the regulation of the T6SS (for a more detailed review of the T6SS see:(Joshi et al., 2017)).

#### *7.1.2.2.3 Secreted proteins*

As mentioned before, the T6SS apparatus carries toxic effectors directly into the target bacterial or eukaryotic cells. A single contraction event allows the translocation of many of these effectors at the same time into the target cell(Shneider et al., 2013). The cellular targets for these effectors are multiple; they go from peptidoglycan to cellular membrane, actin and nucleic acids(Joshi et al., 2017). To protect themselves against the toxic effectors they produce, bacterial cells express immunity proteins, which brings the notion of strains compatibility (for more information see:(Yang, Long, & Shen, 2018)). The secreted effectors and structure components can be reused by recipient cells to form a new T6SS (Vettiger & Basler, 2016).

Hcp is one of the proteins transported by the T6SS into the target cell, in addition to be part of its structure by forming the inner tube and serving as a chaperone to the effector molecules(Silverman et al., 2013). Hcp is encoded by two different yet functional genes (VC1415; VCA0017) producing the same protein(Pukatzki et al., 2006; Williams, Varcoe, Attridge, & Manning, 1996). Both genes must be knocked out to suppress the T6SS activity(Pukatzki et al., 2006). Hcp is co-expressed with HlyA, and its secretion was observed before the discovery of the T6SS(Williams et al., 1996).

Similarly to Hcp, the VgrG proteins (VC1416; VCA0018; VCA0123) are part of the T6SS structure and are secreted into the target cell upon contraction of the T6SS (Pukatzki, Ma, Revel, Sturtevant, & Mekalanos, 2007; Pukatzki et al., 2006). VgrG-1 has an actin cross-linking activity in eukaryotic cells, thus preventing cytoskeleton reorganization and phagocytosis(Ma & Mekalanos, 2010). VgrG-2 is homologous to VgrG-1, but without a functional C-terminal effector domain(Pukatzki et al., 2007). Both appear to be essential for secretion of other T6SS components as a mutational inactivation of one of these gene makes the mutant unable to secrete any T6SS-dependant

effectors(Pukatzki et al., 2007). Since its toxicity is exclusive to eukaryotic cells, no immunity coupled protein is required against VgrG-1. The VgrG-3 protein is known to be active against other bacteria by hydrolyzing peptidoglycan with its lysozyme-like domain, after a translocation to the periplasm(Brooks, Unterweger, Bachmann, Kostiuk, & Pukatzki, 2013; Pukatzki et al., 2007). It might also have a muramidase activity, which could be useful in its aquatic niche to gain access to chitin or in infection to cross mucin(Dong, Ho, Yoder-Himes, & Mekalanos, 2013). TsiV3 (VCA0124) acts as the antitoxin for VgrG-3 by binding to it and prevents the degradation of the cell wall in the predator bacteria(Brooks et al., 2013). Thus, VgrG-3 might be important for infection by killing gut microbiota and by hydrolysing mucin.

The PAAR proteins (VCA0284; VCA0105), along with VgrGs, form the tip of the syringe of T6SS, bind the effectors and are therefore essential for T6SS effectors' secretion. There are two proteins with a PAAR domain in *V. cholerae*'s genome with enzymatic activities that could be toxic for eukaryotic or prokaryotic cells, thus acting as effectors(Shneider et al., 2013). PAAR proteins are secreted by the T6SS by capping the tip of the syringe, the PAAR domain allowing the bond with the VgrG trimeric tip. As Hcp, VgrG and PAAR proteins can bind and load effectors, the multiple effector translocation VgrGs (MERV) model has been proposed, suggesting that the T6SS spike (Hcp-VgrG-PAAR) can deliver different cargo effectors at the same time into the targeted cell (Shneider et al., 2013).

The cargo effector VasX (VCA0020) acts as a colicin and targets the inner bacterial membrane or eukaryotic membrane in which it is believed to form pores, increase permeability and lead to its disruption(Miyata, Kitaoka, Brooks, McAuley, & Pukatzki, 2011). It is encoded downstream of Hcp-2 and VgrG-2 and is regulated by VasH(Miyata et al., 2011). Its immunity coupled protein is TsiV2 (VCA0021) (Dong et al., 2013). The VasW (VCA0019) protein encoded right upstream VasX is an adaptor protein that plays a role in secretion of VasX and an accessory role to VasX bactericidal activity(Miyata, Unterweger, Rudko, & Pukatzki, 2013).

The type six effector Lipase (TseL - VC1418) is another cargo effector and its secretion depends on the presence of VgrG-3. It carries a phospholipase domain that is believed to cause damage to cell membranes in both eukaryotic and prokaryotic cells (Dong et al., 2013; Kamal et al., 2020). Its immunity coupled protein is TsiV1 (VC1419).

The type six effector Hydrolase (TseH - VCA0285) is encoded next to the PAAR protein and its secretion is dependant of the T6SS(Altindis, Dong, Catalano, & Mekalanos, 2015). It has been shown that TseH is able to degrade peptidoglycan, a main component of the bacterial cell wall, by hydrolysis and would therefore make it an important effector as for interbacterial competition. Its immunity coupled protein is the type six immunity hydrolase (TsiH - VCA0286), which prevents cell wall degradation.

Recently, another lipase, the Type VI lipase effector *Vibrio* (TleV1) has been discovered in environmental *V. cholerae*'s genome(Crisan et al., 2019). TleV1 has a toxic activity in bacteria, mainly in periplasm, by targeting phospholipids and destabilizing the cellular membrane. Two immunity coupled proteins are associated with TleV1, TliV1a and TliV1b (type VI lipase immunity *Vibrio* 1a and 1b), but only TliV1a has an effective neutralizing effect against TleV1.

It is most likely that, as genome analysis of more *V. cholerae* strains will occur, new effector/immunity modules will be identified as they can be transferred between strains by genetic transfer or acquisition of eDNA upon target cell lysis(Borgeaud et al., 2015; Crisan et al., 2019; Kostiuk, Unterweger, Provenzano, & Pukatzki, 2017; Labbate et al., 2016). All the pandemic strains encode the same effector/immunity module sets (TseL/TsiV1, VasX/TsiV2 and VgrG3/TsiV3, called AAA), as a result of intraspecific competition(Kostiuk et al., 2017). Some strains harbour immunity genes without the coupled effector that they acquired from gene transfer, named orphan immunity proteins, allowing their survival from multiple toxic effectors(Drebes Dorr & Blokesch, 2020). The modules found within strains may differ from each other, however, their diversity and their omnipresence testify of their value for virulence and competition of the niche.

### 7.1.2.3 Type I secretion system, a tool for auxiliary toxins secretion

The type I secretion system (T1SS) is used by Gram-negative bacteria to secrete, in a one-step process using ATP, proteins directly into the extracellular milieu.

#### 7.1.2.3.1 Structure and secretion through the T1SS

The most studied T1SS is the hemolysin A associated T1SS (HlyA-T1SS) from *E. coli* and its general structure has been reviewed elsewhere (Kanonenberg, Spitz, Erenburg, Beer, & Schmitt, 2018). Briefly, the T1SS are composed of 3 proteins encoded on the same operon, next to their associated secreted protein and activator; i) an outer membrane protein (TolC), ii) an ATP-binding cassette (ABC) transporter in the inner membrane (HlyB), and iii) a linker protein (HlyD) anchored in the inner membrane, linking the two other components.

The secreted proteins carry a C-terminal secretion signal sensed by the inner membrane proteins upon binding (Gray, Mackman, Nicaud, & Holland, 1986). The porin TolC is then recruited to the complex, and the proteins pass through the HlyB and HlyD channel. The binding of TolC to the inner membrane complex allows its opening and the secretion of the protein to the extracellular milieu, whereafter TolC leaves the complex (Kanonenberg et al., 2018). As the inner membrane proteins bind to specific substrates, the TolC can be used by multiple T1SS within a cell (T. R. Costa et al., 2015). The secreted proteins have a functional domain in N-terminal and are secreted shortly after their translation in their unfolded state. In *V. cholerae*, the T1SS structure is atypical and is composed of 4 components: the periplasmic linker RtxD, the outer membrane protein TolC, and 2 ATPases RtxB and RtxE, which most probably form heterodimers in the inner membrane instead of the conventional homodimer ATPase (Boardman & Satchell, 2004).

#### 7.1.2.3.2 *Genes and regulation*

The *rtx* gene cluster is encoded near the CTX $\phi$  phage, but their regulation is not linked (Boardman, Meehan, & Fullner Satchell, 2007). RtxA is secreted by its own unorthodox T1SS that requires two ABC transporters for the secretion (Boardman & Satchell, 2004). The *rtx* locus is composed of 2 operons, the first one is left oriented and contains a conserved hypothetical gene VC1449, the activator (*rtxC*) and the toxin (*rtxA*). The second, right oriented, contains the ABC transporter (*rtxB*) and the fusion protein (*rtxD*) genes, plus the extra ABC transporter *rtxE*. The *tolC* is encoded further. The RtxA toxin secretion is optimal during the exponential phase of growth but is inhibited in stationary phase (Boardman et al., 2007).

#### 7.1.2.3.3 *Secreted proteins*

The repeat in toxin (RTX) proteins are a class of proteins exclusively secreted by the T1SS (Linhartova et al., 2010). They include the HlyA of *E. coli* (but not of *V. cholerae* – see T2SS) and RtxA and FrhA of *V. cholerae*. Briefly, these proteins contain glycine and aspartate-rich sequence in C-terminal, before their T1SS secretion signal, and a functional domain originally associated with toxin activities. They require activation by the acetyl transferase activator encoded within the operon. The RTX region offers many Ca<sup>2+</sup> binding sites. Once bound to the sites, the Ca<sup>2+</sup> generates a sudden conformation change and formation of the secondary structure of the RTX protein. As the Ca<sup>2+</sup> concentrations are low inside the cells, the RTX proteins keep their unfolded state until they reach the extracellular milieu, where the Ca<sup>2+</sup> concentrations are higher.

One T1SS has been described in *V. cholerae*. It is associated to the RTX toxin (RtxA), a large toxin found in many *V. cholerae* strains, including O1 El tor, O139 and non-O1/O139 strains, but not in the O1 classical strains that contain a deletion into the gene cluster (Boardman et al., 2007; Lin et al., 1999). The omnipresence of RtxA toxin among currently circulating strains lets us think that it is an important virulence factor that could be responsible for the non-O1/O139 strains' emergence (Lin et al., 1999). RtxA leads to the depolarization of actin, by cross-linking the actin

monomers into dimers, trimers or multimers, which causes rapid rounding of host cells(Cordero, Kudryashov, Reisler, & Satchell, 2006; Cordero, Sozhamannan, & Satchell, 2007; Fullner & Mekalanos, 2000; Sheahan, Cordero, & Satchell, 2004).

Three other T1SS could be found in *V. cholerae*'s genome. The first one is associated to two putative RTX toxins with hemolytic activity (RtxL1 and RtxL2) that have been discovered in the genome of many *V. cholerae* strains(R. Chatterjee, Nag, & Chaudhuri, 2008). They induce cell rounding and cytotoxicity and, unlike RtxA, also have a hemolytic activity. The locus has been identified but the secretion pathway has not, although all RTX proteins are secreted through a T1SS, the RtxL associated T1SS is yet to be described. Another of the putative T1SS of *V. cholerae* is associated to another RTX-like toxin, the Flagellum-regulated hemagglutinin A (FrhA - VC1620) (Syed et al., 2009). The decreased hemagglutination in non-motile *V. cholerae* mutant has led to the discovery of FrhA. FrhA contains a RTX-like domain and a T1SS signal and has a role in hemagglutination, adhesion to human host cells and chitin, thus in colonization and biofilm formation(Syed, 2010). Its regulation is comprised in the four-step hierarchy regulation of motility, which includes the regulation of several virulence factors. FrhA is encoded in a gene cluster harbouring components with homology to TolC (FrhC - VC1621) and HlyB (VC1628). However, no HlyD homolog has been found in the surrounding genes and the homology of VC1618 to HlyB is poor, as the ATP binding site, essential to the translocation process through the T1SS, is missing (Syed et al., 2009). This secretion system is yet to be described. The retention module-containing protein (CraA - VCA0849) also contains a glycine rich module used as T1SS secretion signal, but its secretion system remains to be described (Kitts et al., 2019). CraA is an adhesin that has a role in early stage of biofilm formation by binding chitin. It has some homology to RtxA. In other Gram-negative bacteria, it serves as an adhesin on the bacterial surface.

#### 7.1.2.4 Type III secretion system for colonization and injection of effectors into eukaryotic host cells

The Type III secretion system (T3SS) is a multicomponent device translocating various effectors directly into the neighbouring eukaryotic host cells and is found in many *Vibrio* species, including *V. cholerae* (K. A. Miller, Tomberlin, & Dziejman, 2019). Many non O1/O139 strains, which can lead to severe diarrhea even though they do not produce the CT and toxin coregulated pilus (TCP), possess a T3SS (Chaand et al., 2015; Dziejman et al., 2005). Unlike the pandemic strains, the diarrhea induced by non O1/O139 strains shows damages to the intestinal epithelium (Shin et al., 2011). The T3SS would in fact be essential for intestinal colonization and invasive diarrhea in those strains. The T3SS is composed of a basal structure that shares similarities with the flagella, and a needle, connecting the bacterial cytoplasm to the eukaryotic cell using a pore at its end (Portaliou, Tsois, Loos, Zorzini, & Economou, 2016). While the structure of the T3SS is conserved among Gram-negative bacteria, the effectors encoded differ from one another, subsequently to the intended host. In *V. cholerae*, the translocated effectors are multiple, and their accumulation disrupts host cellular processes with a key role in the early stages of infection, such as cytoskeletal rearrangement and cytotoxicity, resulting in intestinal epithelial damages and colonization of the gut (Alam, Miller, Chaand, Butler, & Dziejman, 2011; K. A. Miller et al., 2019).

##### 7.1.2.4.1 Structure and secretion through the T3SS

The T3SS is a multicomponent apparatus spanning both bacterial membranes. While the effectors' secretion through T3SS is Sec independent, the translocation of the membrane components of the injectosome requires it (Portaliou et al., 2016). The T3SS uses ATP for the active translocation of the effectors through both bacterial membranes directly into host cell cytoplasm. The T3SS consists of an injectosome with structural and genetic homology to the flagellum and a molecular syringe, the structure has been reviewed elsewhere (Portaliou et al.,



2016). In brief, the syringe connects the membrane complex to the host cell cytoplasm. It is composed of i) a basal needle, ii) a tip and, at its end, iii) a translocation pore. The membrane complex is composed of an assembly of concentric rings creating a channel through both bacterial membranes. It includes an outer membrane ring connected, in the periplasm, to the inner membrane ring, in addition to a cytoplasmic portion, made of a cytoplasmic ring and an ATPase complex. The exact T3SS assembly in *V. cholerae* has not been studied yet, and some components remain to be identified(K. A. Miller et al., 2019).

#### 7.1.2.4.2 Genes and regulation

While some *Vibrio* species (*V. parahaemolyticus*) possess two T3SS (T3SS1 and T3SS2), only one, with similarities to the T3SS2 of *V. parahaemolyticus*, has been found in *V. cholerae*'s genome(Dziejman et al., 2005). The T3SS genes are located on a genomic island of approximately 49kb, which includes an integrase, structural components, effectors and regulators (*vttR<sub>A</sub>*, *vttR<sub>B</sub>*)(Alam et al., 2011). The T3SS genomic island is acquired by horizontal transfer(Morita et al., 2013). The core region contains most of the structural components and some effectors, while the upstream and downstream regions, more affected by the gene transfer, harbor a variety of effectors(K. A. Miller et al., 2019). The *Vibrio* type three regulators VttR<sub>A</sub> and VttR<sub>B</sub> share similarities with ToxR, an important virulence regulator in *V. cholerae*(Alam, Tam, Hamilton, & Dziejman, 2010). The regulators VttR<sub>A</sub> and ToxR control the expression of VttR<sub>B</sub>, which, afterwards, controls the expression of the T3SS structural genes in presence of bile(K. A. Miller, Sofia, Weaver, Seward, & Dziejman, 2016). The deletion of either of these regulator leads to a decreased T3SS-dependant cytotoxicity. VttR<sub>A</sub> and VttR<sub>B</sub> might also regulate genes outside the T3SS island(Chaand et al., 2015).

### 2.4.3 Secreted proteins

The presence of T3SS in non O1/O139 strains leads to intestinal epithelium damages, such as alteration of the brush border and disruption, as seen in the infant rabbit model of infection (Shin et al., 2011). It is the result of the translocation of many effectors into the eukaryotic host cytoplasm by the T3SS. In *V. cholerae*, there are 7 effectors encoded within the T3SS core genomic island and at least 5 others have been identified in the up and downstream regions (K. A. Miller et al., 2019). The first effector to be identify is *Vibrio* outer protein F (VopF - NT01VC2350) (Tam, Serruto, Dziejman, Brieher, & Mekalanos, 2007; Tam et al., 2010). VopF possesses 2 actin binding domains, the formin homology-1 like and WASP homology 2 domains, that intervene in actin polymerization of the host intestinal epithelial cells. It has been shown to be essential for virulence in infant mouse model of infection (Tam et al., 2010). VopF has a homolog in other non O1/O139 strains, VopN, that shares 55% similarity (Tam et al., 2010). Just like VopF, VopN disturbs actin polymerization by nucleation, but unlike VopF, locates in the stress fibers by binding filamin. Both would also have an anti-apoptotic effect.

A total of 11 proteins that use the T3SS for their secretion have been identified by using a FRET technique to visualize the translocation of proteins in HeLa cells, including an effector specific to *V. cholerae*, VopX (A33\_1663) (Alam et al., 2011). VopX has been found to be essential for colonization in infant mouse model of infection and to induce an important growth defect in *S. cerevisiae* by destabilization of the cell wall through Cell Wall Integrity MAP kinase pathway activation (Alam et al., 2011; Seward, Manzella, Alam, Butler, & Dziejman, 2015).

Another of the secreted effectors is VopE (A33\_1662) (Suzuki, Danilchanka, & Mekalanos, 2014). VopE is translocated to the mitochondria after its secretion by the T3SS, where it acts as a GTPase-activating protein. Its presence in the mitochondria intervenes with the normal process of Rho GTPases Miro1 and 2, thus with the immune response using mitochondrial signalisation pathways (Kay, Sangal, Black, & Soundararajan, 2019; Suzuki et al., 2014). Along with VopF, VopE would lead to the loosening of the tight junctions, a primordial structure of the intestinal epithelium (Tam et al., 2010). VopM (A33\_1684) is another effector secreted by the T3SS that leads to actin stress fibers formation and brush border effacement (Chaand et al., 2015).

Other effectors have been identified, but their function remains unclear, such as VopZ (A33\_1704), VopW (A33\_1690), VopA (A33\_1680), VopG (A33\_1697), VopI (A33\_1687), VopY (A33\_1700), VopH (A33\_1678) and VopK (A33\_1699) (Alam et al., 2011; Chaand et al., 2015). VopW is known as a hydrophilic translocator that would both have structural and effector roles (Alam et al., 2011). Despite the lack of information, a study on multiple effectors brought some light on their potential role in infection (Chaand et al., 2015). It stated that VopA, VopM, VopW and VopH seemed to be required for intestinal colonization in infant mouse model of infection, as mutants of these effectors were not recovered from infected animals. VopA could also have a role in adhesion to the intestinal cells in the early stages of infection. Along with VopH, VopI and VopW, VopA could be part of the structural apparatus as it is essential for other effectors secretion.

#### 7.1.2.5 Type IV secretion system, a crucial virulence factor

Three T4Ps can be found at the surface of *V. cholerae*, TCP, the chitin regulated pilus (ChiRP) and the mannose sensitive hemagglutinin pilus (MSHA). T4P have structural similarities with the T2SS, and their structure has been reviewed elsewhere (Hospenthal et al., 2017). An inner membrane complex, docking an ATPase cytoplasmic complex, recruits a secretion pore in the outer membrane. The pilin subunits are then assembled and secreted to form a strong but malleable filament. They have a role in many biological processes leading to virulence such as, in *V. cholerae*, acquisition of mobile genetic elements (MGE), micro-colonies formation in the intestinal lumen, adhesion to abiotic surfaces or chitin and biofilm formation (Hospenthal et al., 2017). The bacterial aggregation by pilus-pilus interaction with TCP, in form of micro-colonies, allows concentration of the toxin at the site of colonization and protection of the immune system (as would a biofilm) (Lim et al., 2010). Most T4P have cytoplasmic ATPases that allow their elongation and

retraction, which can lead to eDNA capture and motility. The main secreted components of the T4P are the pilin subunits.

#### 7.1.2.5.1 *The toxin coregulated pilus*

The pandemic virulence potential of *V. cholerae* resides in its MGE, harbouring both the CT and TCP apparel on the integrated CTX $\phi$  phage and *Vibrio* Pathogenic Island 1 (VPI-1), respectively (Kumar, Das, & Kumar, 2020). TCP is essential for effective colonization of the intestinal epithelium in pandemic O1/O139 strains (Tacket et al., 1998). The VPI-1 harbours the receptor for the CTX $\phi$  phage, the major pilin of TCP (TcpA), allowing its entry into *V. cholerae*. It also regulates the CT production with ToxT, which also regulates TCP expression (Kumar et al., 2020; Waldor & Mekalanos, 1996). It is believed that acquisition of both these MGE is enough to convert environmental strains into pathogenic strains (Kumar et al., 2020). Considering this information, it is clear that the gene acquisition by horizontal transfer is important for the toxigenic potential of *V. cholerae*. Obviously, TcpA, being the major component of the filament, is responsible for the pilus:pilus interaction that leads to the formation of the micro-colonies (Lim et al., 2010). TCP also has a minor pilin, TcpB, which is also secreted and initiates pilus polymerization and retraction, despite the lack of a retraction ATPase in TCP (Gutierrez-Rodarte, Kolappan, Burrell, & Craig, 2019). TcpB would also bind to CTX $\phi$  minor coat protein and then leads to its internalization into *V. cholerae* by initializing the retraction of the T4P (Gutierrez-Rodarte et al., 2019).

#### 7.1.2.5.2 *The mannose sensitive hemagglutinin pilus*

MSHA is produced by O1 El Tor and O139 strains, but not by the O1 classical strains, and is important for adhesion to chitinous surface and biofilm formation, although it does not seem to play a role in virulence nor colonization in humans (Meibom et al., 2004; Stauder et al., 2010; Tacket et al., 1998; Watnick, Fullner, & Kolter, 1999). Its filament is composed of the single major

pilin MshA(Floyd et al., 2020). The dynamic of retraction/polymerization of the MSHA is controlled by C-D-GMP(Floyd et al., 2020).

#### 7.1.2.5.3 *The chitin regulated pilus*

The third T4P identified in *V. cholerae* is ChiRP(Meibom et al., 2004). Because, in its marine life, *V. cholerae* can use chitin as a carbon source, the capacity to colonize shellfish is then primordial to acquire this element. The expression of Pila, the major pilin of ChiRP, is induced when the bacteria are grown in presence of chitin (Meibom et al., 2004). The absence of Pila, thus of ChiRP, decreases, but does not suppress, the ability of *V. cholerae* to colonize crab shell, even though it has no effect in infant mouse model nor on adhesion to human cells(Fullner & Mekalanos, 1999). It suggests that ChiRP has a role in adhesion to chitin in collaboration with other chitin binding structures and proteins (MSHA, GbpA). The colocalization of ChiRP at the pole of *V. cholerae* along with the T2SS, secreting chitinases required for chitin acquisition, would increase the effectiveness of chitin uptake by limiting the secretion to an adhesion site(Meibom et al., 2004). In other *Vibrio*, ChiRP could also have a role in biofilm formation by mediating bacterium:bacterium interactions, a phenomenon that has also been observed in *V. cholerae* and that could further increase chitin uptake(Adams, Stutzmann, Stoudmann, & Blokesch, 2019; Shime-Hattori et al., 2006). It is important to note that the chitin utilization pathway is linked with natural competence pathway and that ChiRP is implied in eDNA uptake(Adams et al., 2019). eDNA uptake is used by bacteria to gain new functions, such as virulence and resistance factors, and to increase their fitness and survival in environment.

#### 7.1.2.6 Other secreted molecules

The cholix toxin (ChxA) is a eukaryotic elongation factor-2 specific ADP-ribosyl transferase that induces cell death (Ogura, Yahiro, & Moss, 2020). ChxA is produced by many *V. cholerae* strains (Jorgensen et al., 2008; Taverner et al., 2020).

Accessory cholera enterotoxin (Ace - VC1459) and zonula occludens toxin (Zot - VC1458) are accessory toxins that are both encoded near the CT genes on the CTX $\phi$  phage (Fasano et al., 1991; Trucksis, Galen, Michalski, Fasano, & Kaper, 1993). Zot leads to the disruption of the tight junctions between intestinal epithelial cells, an important structure in the intestinal permeability (Perez-Reytor et al., 2020; Uzzau, Cappuccinelli, & Fasano, 1999). It is translocated and anchored in the outer membrane and has two functional domains. The N-terminal domain is important for CTX $\phi$  phage's morphogenesis and the C-terminal domain is cleaved by proteases. Once released into the intestinal lumen, the C-terminal domain acts as a toxin (Goldblum et al., 2011; Uzzau et al., 1999). Thus, Zot does not employ a conventional secretion system for its release into the extracellular milieu. Regarding Ace, it leads to fluid secretion in rabbit ileal loop model by unbalancing calcium secretion and the secretion mechanism has not been determined yet (Perez-Reytor et al., 2020).

### **7.1.3 Membrane vesicles, the type 0 secretion system**

Most bacteria, including Gram-negative and Gram-positive bacteria, release MV, also known as the type 0 secretion system (Guerrero-Mandujano et al., 2017). Different types of MV can be produced including the outer membrane vesicles (OMV), the outer-inner membrane vesicles (OIMV), the cytoplasmic membrane vesicles (CMV) and the tube-shaped membranous structures (TSMS). The different types of MV differ in their composition and their biogenesis mechanisms, which will not be presented here since they have already been reviewed elsewhere (Toyofuku, Nomura, & Eberl, 2019). *V. cholerae* can secrete OMV and OIMV, which contain lipopolysaccharides, phospholipids, proteins (Altindis, Fu, & Mekalanos, 2014), DNA and RNA (Langlete, Krabberod, & Winther-Larsen, 2019; Sjostrom, Sandblad, Uhlin, & Wai, 2015). An hypervesiculation has been reported in *V. cholerae* at the early stages of intestine colonization by

silencing the phospholipid transporter VacJ/Yrb involved in the maintenance of the outer membrane lipid asymmetry. This hypervesiculation is characterized by a drastic modification of the membrane composition and a better colonization of the host intestine (Zingl et al., 2020).

*In vitro*, the protein cargo of MV is highly dependent on the bacterial growth conditions (Orench-Rivera & Kuehn, 2016). The protein cargo of the MV secreted by *V. cholerae* El Tor O1 has been determined under virulence activating conditions. A total of 90 proteins associated to MV have been identified, 50 % being outer membrane or periplasmic proteins (Altindis et al., 2014). Among these proteins, some are secreted in association with the vesicles, such as the membrane and periplasmic proteins, while others are secreted independently and associated with the vesicles in the extracellular compartment, such as Bap1 (Duperthuy et al., 2013). The proteins associated with the vesicles can have a role in resistance (antimicrobials, plasma and bacteriophages), in biofilm formation or in virulence.

#### 7.1.3.1 Membrane vesicles and resistance

A role for the MV in antimicrobial peptides (AMP) resistance has been reported in several Gram-negative bacteria including *V. cholerae*. Our previous studies demonstrated that PrtV-associated MV can protect *V. cholerae* from the lysis by LL-37, a cathelicidin secreted by the epithelial cells in response to *V. cholerae* infection (Rompikuntal et al., 2015). In addition, the matrix protein Bap1 can bind to OmpT, a porin located in the outer membrane, on the surface of the MV of *V. cholerae* in presence of polymyxin B and confer cross-resistance to LL-37 (Duperthuy et al., 2013). Interestingly, the hypervesiculation observed during the early stages of infection leads to a decrease of OmpT in the outer membrane correlated with an increase in OmpT abundance in the MV (Zingl et al., 2020). The authors suggest that the hypervesiculation is a process used by *V. cholerae* to quickly modify the outer membrane protein content in order to increase the intestinal colonization fitness. Therefore, the hypervesiculation *in vivo* may contribute to the Bap1 mediated AMP resistance in the intestine where analogues of polymyxin B are secreted by

the microbiota. In *V. cholerae*, the expression of *ompT* is negatively correlated with the expression of *ompU* through the ToxR switch (Champion, Neely, Brennan, & DiRita, 1997; V. L. Miller & Mekalanos, 1988). During the hypervesiculation process, *ompU* expression increases, leading to an accumulation of OmpU in the membrane (Duperthuy et al., 2013). A role of OmpU in AMP and bile resistance has been reported in *V. cholerae* (Mathur & Waldor, 2004). Therefore, the hypervesiculation in *V. cholerae* might represent a double advantage in terms of AMP resistance through vesicles associated OmpT-Bap1 and membrane bounded OmpU.

Besides AMP, MV are also involved in serum resistance in *V. cholerae*. Septicemia caused by *V. cholerae* has been reported, especially in patients suffering liver disorders, which can lead to a 50% mortality rates (Blake, Weaver, & Hollis, 1980). In an elegant study, Aung *et al.* demonstrated that IgG present in the serum of healthy people can recognize OmpU of *V. cholerae*, which leads to the recruitment of the complement through C1q binding and to the clearance of *V. cholerae* (Aung et al., 2016). However, the presence of OmpU in the MV can sequester the anti-OmpU IgG before they reach the bacterial cells, leading to an increased resistance of the bacteria to serum (Aung et al., 2016).

A role of the MV in resistance to bacteriophages has also been demonstrated in *V. cholerae* (Reyes-Robles et al., 2018). The authors proposed that, similarly to Bap1 and AMP and to OmpU and IgG, the presence of MV is used as bacterial decoy to lure the phages before they can reach the bacterial cell. In this case, it is the presence of phage receptors on the surface of the MV that is responsible for the sequestration of the phages (Reyes-Robles et al., 2018).

#### 7.1.3.2 Membrane vesicles and biofilm

A significant part of antimicrobial resistance is associated with the biofilm lifestyle of bacteria. The bacteria growing in a biofilm are up to 1000 times more resistant to antimicrobials and



disinfectants than their planktonic counterparts (Mah, 2012). It has been demonstrated that MV are involved in the formation of biofilms in several Gram-negative bacteria (J. N. C. Fong & Yildiz, 2015). In *V. cholerae*, the association of Bap1, PrtV and eDNA with the MV might have a role in biofilm formation by strengthening the structure and by recruiting planktonic bacteria. More information on the role of MV in biofilm is provided in the Biofilms and Flagella section.

#### 7.1.3.3 Membrane vesicles and virulence

The MV can also carry virulence factors including the CT, the major virulence factor of *V. cholerae* (D. Chatterjee & Chaudhuri, 2011). After secretion, The B subunits interact with the GM1 receptor at the surface of the epithelial cells and the toxin is endocytosed. The A subunit dissociates from the rest of the toxin in the endoplasmic reticulum and spontaneously unfold. The unfolded form of the A subunit is responsible for the toxic activity of the CT. The vesicle-associated toxin is biologically active although only A subunits are encapsulated (Rasti & Brown, 2019). It has been demonstrated that the MV can enter inside the host cells using different mechanisms involving clathrin coated pits, formation of caveolae, use of lipid rafts and direct fusion with host cell membrane (O'Donoghue & Krachler, 2016). Therefore, it is likely that the lack of B subunits is not an issue for the delivery of active A subunits of the CT while encapsulated inside the MV.

Besides the CT, other biologically active virulence factors can also be transported to the host cells through MV. It is the case for HA/P and VesC (A. Mondal et al., 2016), PrtV metalloprotease (Rompikuntal et al., 2015) and the VCC (Elluri et al., 2014). Therefore, the MV of *V. cholerae* can carry a concentrated arsenal of virulence factors that can be efficiently delivered to the host cells and have a role in *V. cholerae* pathogenesis.

#### 7.1.4 Biofilms and flagella

Most of the bacteria, including pathogens, form biofilm to survive and persist in different environments. Biofilms are organized bacterial communities attached to a surface and producing a matrix. *V. cholerae* form biofilms at different stages of its life cycle. An increasing number of evidences suggest that *V. cholerae* forms biofilm during the gut infection and biofilm-like aggregates display a hyper-infective phenotype (Silva & Benitez, 2016). To persist in the environment, *V. cholerae* forms biofilm on different biotic and abiotic substrates such as floating aggregates, ship hulls, microalgae and copepods (Lutz et al., 2013). The transition between planktonic motile and non-motile biofilm states is highly regulated (Conner et al., 2016; Silva & Benitez, 2016). The composition and abundance of the secreted factors involved in biofilm formation, maturation and dispersion largely depend on environmental conditions and on surface composition. In this section, we will review the current knowledge about the biofilm secretome in *V. cholerae* at different stages of the biofilm formation and the interplay between biofilm and motility.

##### 7.1.4.1 From motility to initial adhesion

Planktonic *V. cholerae* are motile cells and their motility is ensured by a single polar flagellum. The flagellum is composed of three major structural components: i) the basal body, ii) the hook and iii) the filament (for detailed structure: (Echazarreta & Klose, 2019)). Structurally, the flagellum is closely related to the T3SS and therefore has been referred as fT3SS (flagellum Type-3 Secretion System) (Galan & Collmer, 1999). The main proteins secreted through the fT3SS are the flagellins. In *V. cholerae*, five different flagellins (FlaA-E) encoded on two chromosomally distinct loci (*flaAC* and *flaEDB*) have been described. From these 5 flagellins, only FlaA is essential for the motility (Klose & Mekalanos, 1998). Recently, an elegant study from Dongre *and coll.* demonstrated that the cytotoxin MakA is also secreted through the fT3SS (Dongre et al., 2018).

This toxin is involved in colonization and virulence in zebrafish and *C. elegans* infection models and represents the first characterization of a toxin secreted through the fT3SS in *V. cholerae* (Dongre et al., 2018).

*V. cholerae* motility and chemotaxis are important for the virulence in the human gut (Butler & Camilli, 2004). They are necessary for the bacteria to travel from the lumen to the epithelial cells, where the virulence factors are secreted after attachment of the bacteria. Motility also plays a key role in biofilm formation on surfaces as an essential element of the initial adhesion of the bacteria. On abiotic surfaces, *V. cholerae*'s adhesion involves MSHA to "scan the surface" (Utada et al., 2014). The flagellum is responsible for the bacterial rotation on the surface of the support, which allows MSHA to reach a spot of high affinity. This adhesion is signaled through the flagellum rotor and results in an inhibition of motility pathways and the secretion of the *Vibrio* polysaccharides (VPS) (Lauriano, Ghosh, Correa, & Klose, 2004). Two other T4P are implicated in bacterial adhesion; ChiRP and TCP (see T4SS section). Initial adhesion to biotic surface is promoted by GbpA, which is secreted through the T2SS and induces mucin secretion (Bhowmick et al., 2008).

Additionally, FrhA (hemagglutinin) and CraA (adhesin) secreted through the T1SS are involved in adhesion and biofilm formation (see T1SS section). The expression of both *frhA* and *craA* is controlled by a C-D-GMP-dependent regulatory system (Kitts et al., 2019). In addition, *frhA* is regulated by the flagella regulation pathways, reinforcing the role of flagella in the initial stages of biofilm formation (Syed et al., 2009).

#### 7.1.4.2 Biofilm maturation

Once attached, *Vibrio* starts secreting VPS, which represent more than 50% of matrix composition. VPS polymers are secreted throughout the biofilm production and are mostly

composed of  $[\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-L-GalpNAcAGly3OAc-(1}\rightarrow 4)\text{-}\beta\text{-D-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-d-Glcp-(1}\rightarrow 4)\text{-}\alpha\text{-D-Galp-(1}\rightarrow ]$  subunits. A variant representing around 20% of VPS consists on the same pattern except for the  $\alpha\text{-D-Glcp}$  moiety that is replaced by  $\alpha\text{-D-GlcpNAc}$  (F. Yildiz, Fong, Sadovskaya, Grard, & Vinogradov, 2014). The VPS biogenesis and export systems are encoded on two clusters: *VpsI* and *VpsII*, encoding *VpsA-K* and *VpsL-Q*, respectively (J. C. N. Fong, Syed, Klose, & Yildiz, 2010; F. H. Yildiz & Schoolnik, 1999). Among the 18 *vps* genes, 15 of them induced highly impaired biofilm formation in *V. cholerae* when suppressed (J. C. N. Fong et al., 2010). Recently, a model has been proposed for the production and secretion of VPS. In this model, the VPS are synthesized by formation and polymerization of individual subunits. The polymers are then transferred across the outer membrane through *VpsM/N* (Schwechheimer et al., 2020). This system is tightly controlled by the tyrosine phosphoregulatory system *VpsO/VpsU*, which controls the level of phosphorylation of the C-terminal tyrosine-cluster of *VpsO*. High level of phosphorylation results in *VpsO* oligomer dissociation and VPS production reduction, whereas low level of *VpsO* phosphorylation results in high oligomerization and increased VPS production (Schwechheimer et al., 2020).

Shortly after VPS secretion has been initiated, the sequential secretion of the 3 major biofilm matrix proteins through the T2SS occurs. The first matrix protein to be secreted is *RbmA*, followed by *Bap1* and *RbmC* (Teschler et al., 2015). More specifically, *RbmC* has a role in maintaining and stabilizing the biofilm (J. C. Fong & Yildiz, 2007). A study using mutants lacking *RbmC* and its homolog *Bap1* showed a change of colonial morphology and the loss of biofilm formation capacity (J. C. Fong & Yildiz, 2007; Kaus et al., 2019). On the other hand, *RbmA* controls the structure of the biofilm (J. C. Fong, Karplus, Schoolnik, & Yildiz, 2006; Johnson et al., 2014).

Growth of the biofilm is ensured by two different processes: i) the bacteria inside the matrix are dividing inside an envelope formed by the VPS, *RbmC* and *Bap1* (Teschler et al., 2015) and ii) new bacteria are recruited inside the biofilm. This recruitment requires the cleavage of the N-terminal domain of *RbmA* by *PrtV*. Once cleaved, *RbmA* can bind bacterial cells that are not producing VPS (planktonic) and recruits them into the biofilm (D. R. Smith et al., 2015). Since MV have been

observed in the biofilm matrix and PrtV can be associated to the surface of the MV, it is possible that MV play an important role in biofilm maturation in *V. cholerae* (Duperthuy, Uhlin, & Wai, 2015). In addition, the association of Bap1 to the MV in specific conditions is likely to lead to the adhesion of the MV to the surface and to the exopolysaccharides (Duperthuy et al., 2015). Three other proteins with no role in biofilm formation and adhesion have been identified in biofilm preparation, *i.e.* the hemolysin HylA, HA/P and ChiA-2 (Absalon, Van Dellen, & Watnick, 2011).

Besides VPS, proteins and MV, a significant amount of eDNA is entrapped in the biofilm matrix. The roles of eDNA in bacterial physiology have been reviewed elsewhere and include nutrient source, horizontal gene transfer and adherence (Vorkapic, Pressler, & Schild, 2016). Recently, a role in the tridimensional matrix structure of the biofilm in *V. cholerae* has been reported (Kanampalliwar & Singh, 2020). The eDNA inside the biofilm most probably results from cell autolysis and MV secretion (Seper et al., 2011).

#### 7.1.4.3 Biofilm dispersion and detachment

Biofilm dispersal is a complex process by which bacteria actively succeed to evade biofilm matrix (Kaplan, 2010). Conversely to adhesion and biofilm maturation, little is known about the dispersion process of *V. cholerae* biofilms. It requires specific environmental signals, which trigger the quorum sensing and the general stress response pathways (Singh et al., 2017), matrix degradation and motility resumption (Bridges, Fei, & Bassler, 2020). The matrix degradation requires RbmB, an extracellular polysaccharide lyase that digests the VPS, and LapG, a periplasmic protease that cleaves the adhesins FrhA and CraA located at the outer membrane (Bridges et al., 2020). Under substrate specific conditions, the extracellular protease HA/P also participates in biofilm dispersion by degrading the mucin (Mewborn et al., 2017). Finally, secreted nucleases such as Dns and Xds have a role in biofilm dispersion by cleaving the eDNA present in the matrix (Seper et al., 2011). The motility resumption requires the ability to switch the flagella rotation

from counterclockwise to clockwise direction mediated by CheY3 independently of chemotaxis (Bridges et al., 2020).

### 7.1.5 Conclusion

Over the last decades, numerous studies have focused on the secreted molecules and secretion systems used by *V. cholerae* to deliver extracellular effectors. Various roles have been assigned to the secreted molecules especially regarding the host colonization and virulence, and the environmental survival and persistence, denoting their importance in *V. cholerae*'s pathogenesis and life cycle. Additionally, the redundancy of some functions carried by multiple secreted effectors testifies of their importance. With gene acquisition, MGE, strain sequencing and the emergence of more efficient technologies, it is most likely that additional secreted effectors and secretion systems will be identified and characterized.

The recent characterization of the MakA toxin secretion through the FT3SS (Dongre et al., 2018) and the numerous studies on the T6SS since its discovery 15 years ago (Pukatzki et al., 2006) clearly demonstrate that there is still work to do on the secretome and secretion systems in *V. cholerae*. The secretion mechanism of some extracellular proteins - with characterized functions - remains to be determined. It is the case of ChxA, Ace, RbmB and the DNase Dns.

The regulation of the secretion systems and their cargo molecules is a complex process. It involves numerous regulators that can be activated or repressed depending on the detection of specific intracellular and extracellular signals. So far, most of the studies aiming to decipher the regulation pathways have been performed under laboratory conditions. The featuring of conditions that characterize the intestinal environment before and during diarrhea, including the peristaltic movement, anaerobia, the presence of the microbiota, water efflux and high osmolarity, is likely to modify *V. cholerae* secretion in terms of regulation and nature, abundance and activity of the secreted molecules. Therefore, it would be highly beneficial to study the secretion mechanisms, the secreted molecules and their regulation in models that are closer to the physiological conditions encountered in the host, such as *ex vivo* devices. Understanding the regulation and

the mechanisms of colonization, virulence and resistance in these physiological conditions is crucial for the development of treatments and vaccines against *V. cholerae*.

### 7.1.6 Acknowledgments

This work was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC [http://www.nserc-crsng.gc.ca/index\\_eng.asp](http://www.nserc-crsng.gc.ca/index_eng.asp)) Discovery grant number RGPIN-2017-05322. AMD received financial support from the Fonds de recherche du Québec en Santé, doctoral training scholarship #290352.

### 7.1.7 References

- Absalon, C., Van Dellen, K., & Watnick, P. I. (2011). A communal bacterial adhesin anchors biofilm and bystander cells to surfaces. *PLoS Pathog*, 7(8), e1002210. DOI:10.1371/journal.ppat.1002210
- Adams, D. W., Stutzmann, S., Stoudmann, C., & Blokesch, M. (2019). DNA-uptake pili of *Vibrio cholerae* are required for chitin colonization and capable of kin recognition via sequence-specific self-interaction. *Nat Microbiol*, 4(9), 1545-1557. DOI:10.1038/s41564-019-0479-5
- Alam, A., Miller, K. A., Chaand, M., Butler, J. S., & Dziejman, M. (2011). Identification of *Vibrio cholerae* type III secretion system effector proteins. *Infect Immun*, 79(4), 1728-1740. DOI:10.1128/IAI.01194-10
- Alam, A., Tam, V., Hamilton, E., & Dziejman, M. (2010). vttRA and vttRB Encode ToxR family proteins that mediate bile-induced expression of type three secretion system genes in a non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strain. *Infect Immun*, 78(6), 2554-2570. DOI:10.1128/IAI.01073-09
- Altindis, E., Dong, T., Catalano, C., & Mekalanos, J. (2015). Secretome analysis of *Vibrio cholerae* type VI secretion system reveals a new effector-immunity pair. *mBio*, 6(2), e00075. DOI:10.1128/mBio.00075-15
- Altindis, E., Fu, Y., & Mekalanos, J. J. (2014). Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(15), E1548-1556. DOI:10.1073/pnas.1403683111
- Aung, K. M., Sjostrom, A. E., von Pawel-Rammingen, U., Riesbeck, K., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2016). Naturally Occurring IgG Antibodies Provide Innate Protection against *Vibrio cholerae* Bacteremia by Recognition of the Outer Membrane Protein U. *J Innate Immun*, 8(3), 269-283. DOI:10.1159/000443646
- Benitez, J. A., & Silva, A. J. (2016). *Vibrio cholerae* hemagglutinin(HA)/protease: An extracellular metalloprotease with multiple pathogenic activities. *Toxicon*, 115, 55-62. DOI:10.1016/j.toxicon.2016.03.003

- Benktander, J., Angstrom, J., Karlsson, H., Teymournejad, O., Linden, S., Lebens, M., & Teneberg, S. (2013). The repertoire of glycosphingolipids recognized by *Vibrio cholerae*. *PLoS One*, *8*(1), e53999. DOI:10.1371/journal.pone.0053999
- Bhowmick, R., Ghosal, A., & Chatterjee, N. S. (2007). Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae*. *J Appl Microbiol*, *103*(1), 97-108. DOI:10.1111/j.1365-2672.2006.03253.x
- Bhowmick, R., Ghosal, A., Das, B., Koley, H., Saha, D. R., Ganguly, S., . . . Chatterjee, N. S. (2008). Intestinal adherence of *Vibrio cholerae* involves a coordinated interaction between colonization factor GbpA and mucin. *Infect Immun*, *76*(11), 4968-4977. DOI:10.1128/IAI.01615-07
- Blake, P. A., Weaver, R. E., & Hollis, D. G. (1980). Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annu Rev Microbiol*, *34*, 341-367. DOI:10.1146/annurev.mi.34.100180.002013
- Blokesch, M., & Schoolnik, G. K. (2008). The extracellular nuclease Dns and its role in natural transformation of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, *190*(21), 7232-7240. DOI:10.1128/JB.00959-08
- Boardman, B. K., Meehan, B. M., & Fullner Satchell, K. J. (2007). Growth phase regulation of *Vibrio cholerae* RTX toxin export. *J Bacteriol*, *189*(5), 1827-1835. DOI:10.1128/JB.01766-06
- Boardman, B. K., & Satchell, K. J. (2004). *Vibrio cholerae* strains with mutations in an atypical type I secretion system accumulate RTX toxin intracellularly. *J Bacteriol*, *186*(23), 8137-8143. DOI:10.1128/JB.186.23.8137-8143.2004
- Bonemann, G., Pietrosiuk, A., Diemand, A., Zentgraf, H., & Mogk, A. (2009). Remodelling of VipA/VipB tubules by ClpV-mediated threading is crucial for type VI protein secretion. *EMBO J*, *28*(4), 315-325. DOI:10.1038/emboj.2008.269
- Booth, B. A., Boesman-Finkelstein, M., & Finkelstein, R. A. (1984). *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease nicks cholera enterotoxin. *Infect Immun*, *45*(3), 558-560. DOI:10.1128/IAI.45.3.558-560.1984
- Borgeaud, S., Metzger, L. C., Scignari, T., & Blokesch, M. (2015). The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer. *Science*, *347*(6217), 63-67. DOI:10.1126/science.1260064
- Bridges, A. A., Fei, C., & Bassler, B. L. (2020). Identification of signaling pathways, matrix-digestion enzymes, and motility components controlling *Vibrio cholerae* biofilm dispersal. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *117*(51), 32639-32647. DOI:10.1073/pnas.2021166117
- Brooks, T. M., Unterweger, D., Bachmann, V., Kostiuik, B., & Pukatzki, S. (2013). Lytic activity of the *Vibrio cholerae* type VI secretion toxin VgrG-3 is inhibited by the antitoxin TsaB. *J Biol Chem*, *288*(11), 7618-7625. DOI:10.1074/jbc.M112.436725
- Brunet, Y. R., Henin, J., Celia, H., & Cascales, E. (2014). Type VI secretion and bacteriophage tail tubes share a common assembly pathway. *EMBO Rep*, *15*(3), 315-321. DOI:10.1002/embr.201337936
- Butler, S. M., & Camilli, A. (2004). Both chemotaxis and net motility greatly influence the infectivity of *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(14), 5018-5023. DOI:10.1073/pnas.0308052101



- Chaand, M., Miller, K. A., Sofia, M. K., Schlesener, C., Weaver, J. W., Sood, V., & Dziejman, M. (2015). Type 3 Secretion System Island Encoded Proteins Required for Colonization by Non-O1/non-O139 Serogroup *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, *83*(7), 2862-2869. DOI:10.1128/IAI.03020-14
- Champion, G. A., Neely, M. N., Brennan, M. A., & DiRita, V. J. (1997). A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of toxT mutant strains. *Mol Microbiol*, *23*(2), 323-331. DOI:10.1046/j.1365-2958.1997.2191585.x
- Chatterjee, D., & Chaudhuri, K. (2011). Association of cholera toxin with *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles which are internalized by human intestinal epithelial cells. *FEBS Lett*, *585*(9), 1357-1362. DOI:10.1016/j.febslet.2011.04.017
- Chatterjee, R., Nag, S., & Chaudhuri, K. (2008). Identification of a new RTX-like gene cluster in *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett*, *284*(2), 165-171. DOI:10.1111/j.1574-6968.2008.01199.x
- Chaudhuri, K. (2014). Structure, Genetics, and Mode of Disease of Cholera Toxin. In B.-M. M. Gopalakrishnakone P., Llewellyn L., Singh B. (Ed.), *Biological Toxins and Bioterrorism* (Vol. 1, pp. 3-27). Dordrecht: Springer. ISBN: 978-94-007-5869-8. [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-007-5869-8\\_7](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/978-94-007-5869-8_7).
- Cherrak, Y., Flaugnatti, N., Durand, E., Journet, L., & Cascales, E. (2019). Structure and Activity of the Type VI Secretion System. *Microbiol Spectr*, *7*(4). DOI:10.1128/microbiolspec.PSIB-0031-2019
- Connell, T. D., Metzger, D. J., Lynch, J., & Folster, J. P. (1998). Endochitinase is transported to the extracellular milieu by the eps-encoded general secretory pathway of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, *180*(21), 5591-5600. DOI:10.1128/JB.180.21.5591-5600.1998
- Conner, J. G., Teschler, J. K., Jones, C. J., & Yildiz, F. H. (2016). Staying Alive: *Vibrio cholerae*'s Cycle of Environmental Survival, Transmission, and Dissemination. *Microbiol Spectr*, *4*(2). DOI:10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015
- Cordero, C. L., Kudryashov, D. S., Reisler, E., & Satchell, K. J. (2006). The Actin cross-linking domain of the *Vibrio cholerae* RTX toxin directly catalyzes the covalent cross-linking of actin. *J Biol Chem*, *281*(43), 32366-32374. DOI:10.1074/jbc.M605275200
- Cordero, C. L., Sozhamannan, S., & Satchell, K. J. (2007). RTX toxin actin cross-linking activity in clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae*. *J Clin Microbiol*, *45*(7), 2289-2292. DOI:10.1128/JCM.00349-07
- Costa, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*, *13*(6), 343-359. DOI:10.1038/nrmicro3456
- Coulthurst, S. (2019). The Type VI secretion system: a versatile bacterial weapon. *Microbiology (Reading)*, *165*(5), 503-515. DOI:10.1099/mic.0.000789
- Crennell, S., Garman, E., Laver, G., Vimr, E., & Taylor, G. (1994). Crystal structure of *Vibrio cholerae* neuraminidase reveals dual lectin-like domains in addition to the catalytic domain. *Structure*, *2*(6), 535-544. DOI:10.1016/s0969-2126(00)00053-8

- Crisan, C. V., Chande, A. T., Williams, K., Raghuram, V., Rishishwar, L., Steinbach, G., . . . Hammer, B. K. (2019). Analysis of *Vibrio cholerae* genomes identifies new type VI secretion system gene clusters. *Genome Biol*, *20*(1), 163. DOI:10.1186/s13059-019-1765-5
- Davis, B. M., Lawson, E. H., Sandkvist, M., Ali, A., Sozhamannan, S., & Waldor, M. K. (2000). Convergence of the secretory pathways for cholera toxin and the filamentous phage, CTXphi. *Science*, *288*(5464), 333-335. DOI:10.1126/science.288.5464.333
- Debellis, L., Diana, A., Arcidiacono, D., Fiorotto, R., Portincasa, P., Altomare, D. F., . . . de Bernard, M. (2009). The *Vibrio cholerae* cytolysin promotes chloride secretion from intact human intestinal mucosa. *PLoS One*, *4*(3), e5074. DOI:10.1371/journal.pone.0005074
- Dong, T. G., Ho, B. T., Yoder-Himes, D. R., & Mekalanos, J. J. (2013). Identification of T6SS-dependent effector and immunity proteins by Tn-seq in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(7), 2623-2628. DOI:10.1073/pnas.1222783110
- Dong, T. G., & Mekalanos, J. J. (2012). Characterization of the RpoN regulon reveals differential regulation of T6SS and new flagellar operons in *Vibrio cholerae* O37 strain V52. *Nucleic Acids Res*, *40*(16), 7766-7775. DOI:10.1093/nar/gks567
- Dongre, M., Singh, B., Aung, K. M., Larsson, P., Miftakhova, R., Persson, K., . . . Wai, S. N. (2018). Flagella-mediated secretion of a novel *Vibrio cholerae* cytotoxin affecting both vertebrate and invertebrate hosts. *Commun Biol*, *1*, 59. DOI:10.1038/s42003-018-0065-z
- Drebes Dorr, N. C., & Blokesch, M. (2020). Interbacterial competition and anti-predatory behaviour of environmental *Vibrio cholerae* strains. *Environ Microbiol*, *22*(10), 4485-4504. DOI:10.1111/1462-2920.15224
- Duperthuy, M., Sjoström, A. E., Sabharwal, D., Damghani, F., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2013). Role of the *Vibrio cholerae* matrix protein Bap1 in cross-resistance to antimicrobial peptides. *PLoS Pathog*, *9*(10), e1003620. DOI:10.1371/journal.ppat.1003620
- Duperthuy, M., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2015). Biofilm recruitment of *Vibrio cholerae* by matrix proteolysis. *Trends Microbiol*, *23*(11), 667-668. DOI:10.1016/j.tim.2015.09.004
- Dziejman, M., Serruto, D., Tam, V. C., Sturtevant, D., Diraphat, P., Faruque, S. M., . . . Mekalanos, J. J. (2005). Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(9), 3465-3470. DOI:10.1073/pnas.0409918102
- Echazarreta, M. A., & Klose, K. E. (2019). *Vibrio* Flagellar Synthesis. *Front Cell Infect Microbiol*, *9*, 131. DOI:10.3389/fcimb.2019.00131
- Edwin, A., Grundstrom, C., Wai, S. N., Ohman, A., Stier, G., & Sauer-Eriksson, A. E. (2014). Domain isolation, expression, purification and proteolytic activity of the metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. *Protein Expr Purif*, *96*, 39-47. DOI:10.1016/j.pep.2014.01.012
- Edwin, A., Persson, C., Mayzel, M., Wai, S. N., Ohman, A., Karlsson, B. G., & Sauer-Eriksson, A. E. (2015). Structure of the N-terminal domain of the metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. *Protein Sci*, *24*(12), 2076-2080. DOI:10.1002/pro.2815
- Elluri, S., Enow, C., Vdovikova, S., Rompikuntal, P. K., Dongre, M., Carlsson, S., . . . Wai, S. N. (2014). Outer membrane vesicles mediate transport of biologically active *Vibrio cholerae* cytolysin

- (VCC) from *V. cholerae* strains. *PLoS One*, 9(9), e106731. DOI:10.1371/journal.pone.0106731
- Fasano, A., Baudry, B., Pumplun, D. W., Wasserman, S. S., Tall, B. D., Ketley, J. M., & Kaper, J. B. (1991). *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(12), 5242-5246. DOI:10.1073/pnas.88.12.5242
- Finkelstein, R. A., Boesman-Finkelstein, M., Chang, Y., & Hase, C. C. (1992). *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect Immun*, 60(2), 472-478. DOI:10.1128/IAI.60.2.472-478.1992
- Finkelstein, R. A., Boesman-Finkelstein, M., & Holt, P. (1983). *Vibrio cholerae* hemagglutinin/lectin/protease hydrolyzes fibronectin and ovomucin: F.M. Burnet revisited. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80(4), 1092-1095. DOI:10.1073/pnas.80.4.1092
- Finkelstein, R. A., Mukerjee, S., & Rudra, B. C. (1963). Demonstration and Quantitation of Antigen in Cholera Stool Filtrates. *J Infect Dis*, 113, 99-104. DOI:10.1093/infdis/113.2.99
- Finne, J., Breimer, M. E., Hansson, G. C., Karlsson, K. A., Leffler, H., Vliegthart, J. F., & van Halbeek, H. (1989). Novel polyfucosylated N-linked glycopeptides with blood group A, H, X, and Y determinants from human small intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*, 264(10), 5720-5735. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2466830>
- Floyd, K. A., Lee, C. K., Xian, W., Nametalla, M., Valentine, A., Crair, B., . . . Yildiz, F. H. (2020). c-di-GMP modulates type IV MSHA pilus retraction and surface attachment in *Vibrio cholerae*. *Nat Commun*, 11(1), 1549. DOI:10.1038/s41467-020-15331-8
- Fong, J. C., Karplus, K., Schoolnik, G. K., & Yildiz, F. H. (2006). Identification and characterization of RbmA, a novel protein required for the development of rugose colony morphology and biofilm structure in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 188(3), 1049-1059. DOI:10.1128/JB.188.3.1049-1059.2006
- Fong, J. C., & Yildiz, F. H. (2007). The rbmBCDEF gene cluster modulates development of rugose colony morphology and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 189(6), 2319-2330. DOI:10.1128/JB.01569-06
- Fong, J. C. N., Syed, K. A., Klose, K. E., & Yildiz, F. H. (2010). Role of *Vibrio* polysaccharide (vps) genes in VPS production, biofilm formation and *Vibrio cholerae* pathogenesis. *Microbiology (Reading)*, 156(Pt 9), 2757-2769. DOI:10.1099/mic.0.040196-0
- Fong, J. N. C., & Yildiz, F. H. (2015). Biofilm Matrix Proteins. *Microbiol Spectr*, 3(2). DOI:10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014
- Fullner, K. J., & Mekalanos, J. J. (1999). Genetic characterization of a new type IV-A pilus gene cluster found in both classical and El Tor biotypes of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 67(3), 1393-1404. DOI:10.1128/IAI.67.3.1393-1404.1999
- Fullner, K. J., & Mekalanos, J. J. (2000). In vivo covalent cross-linking of cellular actin by the *Vibrio cholerae* RTX toxin. *EMBO J*, 19(20), 5315-5323. DOI:10.1093/emboj/19.20.5315
- Gadwal, S., Korotkov, K. V., Delarosa, J. R., Hol, W. G., & Sandkvist, M. (2014). Functional and structural characterization of *Vibrio cholerae* extracellular serine protease B, VesB. *J Biol Chem*, 289(12), 8288-8298. DOI:10.1074/jbc.M113.525261

- Galan, J. E., & Collmer, A. (1999). Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science*, *284*(5418), 1322-1328. DOI:10.1126/science.284.5418.1322
- Galen, J. E., Ketley, J. M., Fasano, A., Richardson, S. H., Wasserman, S. S., & Kaper, J. B. (1992). Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin. *Infect Immun*, *60*(2), 406-415. DOI:10.1128/IAI.60.2.406-415.1992
- Garay, E., Arnau, A., & Amaro, C. (1985). Incidence of *Vibrio cholerae* and related vibrios in a coastal lagoon and seawater influenced by lake discharges along an annual cycle. *Appl Environ Microbiol*, *50*(2), 426-430. DOI:10.1128/AEM.50.2.426-430.1985
- Goldblum, S. E., Rai, U., Tripathi, A., Thakar, M., De Leo, L., Di Toro, N., . . . Fasano, A. (2011). The active Zot domain (aa 288-293) increases ZO-1 and myosin 1C serine/threonine phosphorylation, alters interaction between ZO-1 and its binding partners, and induces tight junction disassembly through proteinase activated receptor 2 activation. *FASEB J*, *25*(1), 144-158. DOI:10.1096/fj.10-158972
- Gray, L., Mackman, N., Nicaud, J. M., & Holland, I. B. (1986). The carboxy-terminal region of haemolysin 2001 is required for secretion of the toxin from *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet*, *205*(1), 127-133. DOI:10.1007/BF02428042
- Guerrero-Mandujano, A., Hernandez-Cortez, C., Ibarra, J. A., & Castro-Escarpulli, G. (2017). The outer membrane vesicles: Secretion system type zero. *Traffic*, *18*(7), 425-432. DOI:10.1111/tra.12488
- Gutierrez-Rodarte, M., Kolappan, S., Burrell, B. A., & Craig, L. (2019). The *Vibrio cholerae* minor pilin TcpB mediates uptake of the cholera toxin phage CTXphi. *J Biol Chem*, *294*(43), 15698-15710. DOI:10.1074/jbc.RA119.009980
- Hofstra, H., & Witholt, B. (1984). Kinetics of synthesis, processing, and membrane transport of heat-labile enterotoxin, a periplasmic protein in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, *259*(24), 15182-15187. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6392294>
- Hospenthal, M. K., Costa, T. R. D., & Waksman, G. (2017). A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, *15*(6), 365-379. DOI:10.1038/nrmicro.2017.40
- Ishikawa, T., Sabharwal, D., Broms, J., Milton, D. L., Sjostedt, A., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2012). Pathoadaptive conditional regulation of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae* O1 strains. *Infect Immun*, *80*(2), 575-584. DOI:10.1128/IAI.05510-11
- Johnson, T. L., Abendroth, J., Hol, W. G., & Sandkvist, M. (2006). Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett*, *255*(2), 175-186. DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00102.x
- Johnson, T. L., Fong, J. C., Rule, C., Rogers, A., Yildiz, F. H., & Sandkvist, M. (2014). The Type II secretion system delivers matrix proteins for biofilm formation by *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, *196*(24), 4245-4252. DOI:10.1128/JB.01944-14
- Jorgensen, R., Purdy, A. E., Fieldhouse, R. J., Kimber, M. S., Bartlett, D. H., & Merrill, A. R. (2008). Cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem*, *283*(16), 10671-10678. DOI:10.1074/jbc.M710008200

- Joshi, A., Kostiuk, B., Rogers, A., Teschler, J., Pukatzki, S., & Yildiz, F. H. (2017). Rules of Engagement: The Type VI Secretion System in *Vibrio cholerae*. *Trends Microbiol*, *25*(4), 267-279. DOI:10.1016/j.tim.2016.12.003
- Jude, B. A., Martinez, R. M., Skorupski, K., & Taylor, R. K. (2009). Levels of the secreted *Vibrio cholerae* attachment factor GbpA are modulated by quorum-sensing-induced proteolysis. *J Bacteriol*, *191*(22), 6911-6917. DOI:10.1128/JB.00747-09
- Kamal, F., Liang, X., Manera, K., Pei, T. T., Kim, H., Lam, L. G., . . . Dong, T. G. (2020). Differential Cellular Response to Translocated Toxic Effectors and Physical Penetration by the Type VI Secretion System. *Cell Rep*, *31*(11), 107766. DOI:10.1016/j.celrep.2020.107766
- Kanampalliwar, A., & Singh, D. V. (2020). Extracellular DNA builds and interacts with vibrio polysaccharide in the biofilm matrix formed by *Vibrio cholerae*. *Environ Microbiol Rep*, *12*(5), 594-606. DOI:10.1111/1758-2229.12870
- Kanonenberg, K., Spitz, O., Erenburg, I. N., Beer, T., & Schmitt, L. (2018). Type I secretion system-it takes three and a substrate. *FEMS Microbiol Lett*, *365*(11). DOI:10.1093/femsle/fny094
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*, *89*(3), 205-218. DOI:10.1177/0022034509359403
- Kaus, K., Biester, A., Chupp, E., Lu, J., Visudharomn, C., & Olson, R. (2019). The 1.9 Å crystal structure of the extracellular matrix protein Bap1 from *Vibrio cholerae* provides insights into bacterial biofilm adhesion. *J Biol Chem*, *294*(40), 14499-14511. DOI:10.1074/jbc.RA119.008335
- Kay, L. J., Sangal, V., Black, G. W., & Soundararajan, M. (2019). Proteomics and bioinformatics analyses identify novel cellular roles outside mitochondrial function for human miro GTPases. *Mol Cell Biochem*, *451*(1-2), 21-35. DOI:10.1007/s11010-018-3389-6
- Keyhani, N. O., & Roseman, S. (1999). Physiological aspects of chitin catabolism in marine bacteria. *Biochim Biophys Acta*, *1473*(1), 108-122. DOI:10.1016/s0304-4165(99)00172-5
- Kirn, T. J., Jude, B. A., & Taylor, R. K. (2005). A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection. *Nature*, *438*(7069), 863-866. DOI:10.1038/nature04249
- Kitts, G., Giglio, K. M., Zamorano-Sanchez, D., Park, J. H., Townsley, L., Cooley, R. B., . . . Sondermann, H. (2019). A Conserved Regulatory Circuit Controls Large Adhesins in *Vibrio cholerae*. *mBio*, *10*(6). DOI:10.1128/mBio.02822-19
- Klose, K. E., & Mekalanos, J. J. (1998). Differential regulation of multiple flagellins in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, *180*(2), 303-316. DOI:10.1128/JB.180.2.303-316.1998
- Korotkov, K. V., Sandkvist, M., & Hol, W. G. (2012). The type II secretion system: biogenesis, molecular architecture and mechanism. *Nat Rev Microbiol*, *10*(5), 336-351. DOI:10.1038/nrmicro2762
- Kostiuk, B., Unterweger, D., Provenzano, D., & Pukatzki, S. (2017). T6SS intraspecific competition orchestrates *Vibrio cholerae* genotypic diversity. *Int Microbiol*, *20*(3), 130-137. DOI:10.2436/20.1501.01.294

- Kube, S., Kapitein, N., Zimniak, T., Herzog, F., Mogk, A., & Wendler, P. (2014). Structure of the VipA/B type VI secretion complex suggests a contraction-state-specific recycling mechanism. *Cell Rep*, *8*(1), 20-30. DOI:10.1016/j.celrep.2014.05.034
- Kumar, A., Das, B., & Kumar, N. (2020). *Vibrio Pathogenicity Island-1: The Master Determinant of Cholera Pathogenesis*. *Front Cell Infect Microbiol*, *10*, 561296. DOI:10.3389/fcimb.2020.561296
- Labbate, M., Orata, F. D., Petty, N. K., Jayatilleke, N. D., King, W. L., Kirchberger, P. C., . . . Charles, I. G. (2016). A genomic island in *Vibrio cholerae* with VPI-1 site-specific recombination characteristics contains CRISPR-Cas and type VI secretion modules. *Sci Rep*, *6*, 36891. DOI:10.1038/srep36891
- Langlete, P., Krabberod, A. K., & Winther-Larsen, H. C. (2019). Vesicles From *Vibrio cholerae* Contain AT-Rich DNA and Shorter mRNAs That Do Not Correlate With Their Protein Products. *Front Microbiol*, *10*, 2708. DOI:10.3389/fmicb.2019.02708
- Lauriano, C. M., Ghosh, C., Correa, N. E., & Klose, K. E. (2004). The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, *186*(15), 4864-4874. DOI:10.1128/JB.186.15.4864-4874.2004
- Li, X., Wang, L. X., Wang, X., & Roseman, S. (2007). The chitin catabolic cascade in the marine bacterium *Vibrio cholerae*: characterization of a unique chitin oligosaccharide deacetylase. *Glycobiology*, *17*(12), 1377-1387. DOI:10.1093/glycob/cwm096
- Lim, M. S., Ng, D., Zong, Z., Arvai, A. S., Taylor, R. K., Tainer, J. A., & Craig, L. (2010). *Vibrio cholerae* El Tor TcpA crystal structure and mechanism for pilus-mediated microcolony formation. *Mol Microbiol*, *77*(3), 755-770. DOI:10.1111/j.1365-2958.2010.07244.x
- Lin, W., Fullner, K. J., Clayton, R., Sexton, J. A., Rogers, M. B., Calia, K. E., . . . Mekalanos, J. J. (1999). Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(3), 1071-1076. DOI:10.1073/pnas.96.3.1071
- Linhartova, I., Bumba, L., Masin, J., Basler, M., Osicka, R., Kamanova, J., . . . Sebo, P. (2010). RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev*, *34*(6), 1076-1112. DOI:10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x
- Loose, J. S., Forsberg, Z., Fraaije, M. W., Eijsink, V. G., & Vaaje-Kolstad, G. (2014). A rapid quantitative activity assay shows that the *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA is an active lytic polysaccharide monoxygenase. *FEBS Lett*, *588*(18), 3435-3440. DOI:10.1016/j.febslet.2014.07.036
- Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S., & McDougald, D. (2013). Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol*, *4*, 375. DOI:10.3389/fmicb.2013.00375
- Lybarger, S. R., Johnson, T. L., Gray, M. D., Sikora, A. E., & Sandkvist, M. (2009). Docking and assembly of the type II secretion complex of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, *191*(9), 3149-3161. DOI:10.1128/JB.01701-08
- Ma, A. T., & Mekalanos, J. J. (2010). In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(9), 4365-4370. DOI:10.1073/pnas.0915156107

- Mah, T. F. (2012). Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiol*, 7(9), 1061-1072. DOI:10.2217/fmb.12.76
- Mandal, S., & Chatterjee, N. S. (2016). *Vibrio cholerae* GbpA elicits necrotic cell death in intestinal cells. *J Med Microbiol*, 65(8), 837-847. DOI:10.1099/jmm.0.000298
- Mathur, J., & Waldor, M. K. (2004). The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*, 72(6), 3577-3583. DOI:10.1128/IAI.72.6.3577-3583.2004
- Meibom, K. L., Li, X. B., Nielsen, A. T., Wu, C. Y., Roseman, S., & Schoolnik, G. K. (2004). The *Vibrio cholerae* chitin utilization program. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(8), 2524-2529. DOI:10.1073/pnas.0308707101
- Mewborn, L., Benitez, J. A., & Silva, A. J. (2017). Flagellar motility, extracellular proteases and *Vibrio cholerae* detachment from abiotic and biotic surfaces. *Microb Pathog*, 113, 17-24. DOI:10.1016/j.micpath.2017.10.016
- Miller, K. A., Sofia, M. K., Weaver, J. W. A., Seward, C. H., & Dziejman, M. (2016). Regulation by ToxR-Like Proteins Converges on vttRB Expression To Control Type 3 Secretion System-Dependent Caco2-BBE Cytotoxicity in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, 198(11), 1675-1682. DOI:10.1128/JB.00130-16
- Miller, K. A., Tomberlin, K. F., & Dziejman, M. (2019). *Vibrio variations* on a type three theme. *Curr Opin Microbiol*, 47, 66-73. DOI:10.1016/j.mib.2018.12.001
- Miller, V. L., & Mekalanos, J. J. (1988). A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires toxR. *J Bacteriol*, 170(6), 2575-2583. DOI:10.1128/jb.170.6.2575-2583.1988
- Miyata, S. T., Kitaoka, M., Brooks, T. M., McAuley, S. B., & Pukatzki, S. (2011). *Vibrio cholerae* requires the type VI secretion system virulence factor VasX to kill *Dictyostelium discoideum*. *Infect Immun*, 79(7), 2941-2949. DOI:10.1128/IAI.01266-10
- Miyata, S. T., Unterweger, D., Rudko, S. P., & Pukatzki, S. (2013). Dual expression profile of type VI secretion system immunity genes protects pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog*, 9(12), e1003752. DOI:10.1371/journal.ppat.1003752
- Mondal, A., Tapader, R., Chatterjee, N. S., Ghosh, A., Sinha, R., Koley, H., . . . Pal, A. (2016). Cytotoxic and Inflammatory Responses Induced by Outer Membrane Vesicle-Associated Biologically Active Proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 84(5), 1478-1490. DOI:10.1128/IAI.01365-15
- Mondal, M., Nag, D., Koley, H., Saha, D. R., & Chatterjee, N. S. (2014). The *Vibrio cholerae* extracellular chitinase ChiA2 is important for survival and pathogenesis in the host intestine. *PLoS One*, 9(9), e103119. DOI:10.1371/journal.pone.0103119
- Morita, M., Yamamoto, S., Hiyoshi, H., Kodama, T., Okura, M., Arakawa, E., . . . Watanabe, H. (2013). Horizontal gene transfer of a genetic island encoding a type III secretion system distributed in *Vibrio cholerae*. *Microbiol Immunol*, 57(5), 334-339. DOI:10.1111/1348-0421.12039

- Moustafa, I., Connaris, H., Taylor, M., Zaitsev, V., Wilson, J. C., Kiefel, M. J., . . . Taylor, G. (2004). Sialic acid recognition by *Vibrio cholerae* neuraminidase. *J Biol Chem*, 279(39), 40819-40826. DOI:10.1074/jbc.M404965200
- O'Donoghue, E. J., & Krachler, A. M. (2016). Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cell Microbiol*, 18(11), 1508-1517. DOI:10.1111/cmi.12655
- Ogierman, M. A., Fallarino, A., Riess, T., Williams, S. G., Attridge, S. R., & Manning, P. A. (1997). Characterization of the *Vibrio cholerae* El Tor lipase operon lipAB and a protease gene downstream of the hly region. *J Bacteriol*, 179(22), 7072-7080. DOI:10.1128/jb.179.22.7072-7080.1997
- Ogura, K., Yahiro, K., & Moss, J. (2020). Cell Death Signaling Pathway Induced by Cholix Toxin, a Cytotoxin and eEF2 ADP-Ribosyltransferase Produced by *Vibrio cholerae*. *Toxins (Basel)*, 13(1). DOI:10.3390/toxins13010012
- Orench-Rivera, N., & Kuehn, M. J. (2016). Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cell Microbiol*, 18(11), 1525-1536. DOI:10.1111/cmi.12676
- Park, B. R., Zielke, R. A., Wierzbicki, I. H., Mitchell, K. C., Withey, J. H., & Sikora, A. E. (2015). A metalloprotease secreted by the type II secretion system links *Vibrio cholerae* with collagen. *J Bacteriol*, 197(6), 1051-1064. DOI:10.1128/JB.02329-14
- Perez-Reytor, D., Pavon, A., Lopez-Joven, C., Ramirez-Araya, S., Pena-Varas, C., Plaza, N., . . . Garcia, K. (2020). Analysis of the Zonula occludens Toxin Found in the Genome of the Chilean Non-toxigenic *Vibrio parahaemolyticus* Strain PMC53.7. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 482. DOI:10.3389/fcimb.2020.00482
- Pietrosiuk, A., Lenherr, E. D., Falk, S., Bonemann, G., Kopp, J., Zentgraf, H., . . . Mogk, A. (2011). Molecular basis for the unique role of the AAA+ chaperone ClpV in type VI protein secretion. *J Biol Chem*, 286(34), 30010-30021. DOI:10.1074/jbc.M111.253377
- Portaliou, A. G., Tsolis, K. C., Loos, M. S., Zorzini, V., & Economou, A. (2016). Type III Secretion: Building and Operating a Remarkable Nanomachine. *Trends Biochem Sci*, 41(2), 175-189. DOI:10.1016/j.tibs.2015.09.005
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Revel, A. T., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2007). Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(39), 15508-15513. DOI:10.1073/pnas.0706532104
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., . . . Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostelium host model system. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(5), 1528-1533. DOI:10.1073/pnas.0510322103
- Rasti, E. S., & Brown, A. C. (2019). Cholera Toxin Encapsulated within Several *Vibrio cholerae* O1 Serotype Inaba Outer Membrane Vesicles Lacks a Functional B-Subunit. *Toxins (Basel)*, 11(4). DOI:10.3390/toxins11040207
- Reyes-Robles, T., Dillard, R. S., Cairns, L. S., Silva-Valenzuela, C. A., Housman, M., Ali, A., . . . Camilli, A. (2018). *Vibrio cholerae* Outer Membrane Vesicles Inhibit Bacteriophage Infection. *J Bacteriol*, 200(15). DOI:10.1128/JB.00792-17



- Rompikuntal, P. K., Vdovikova, S., Duperthuy, M., Johnson, T. L., Ahlund, M., Lundmark, R., . . . Wai, S. N. (2015). Outer Membrane Vesicle-Mediated Export of Processed PrtV Protease from *Vibrio cholerae*. *PLoS One*, *10*(7), e0134098. DOI:10.1371/journal.pone.0134098
- Sandkvist, M., Michel, L. O., Hough, L. P., Morales, V. M., Bagdasarian, M., Koomey, M., . . . Bagdasarian, M. (1997). General secretion pathway (eps) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, *179*(22), 6994-7003. DOI:10.1128/jb.179.22.6994-7003.1997
- Schwechheimer, C., Hebert, K., Tripathi, S., Singh, P. K., Floyd, K. A., Brown, E. R., . . . Yildiz, F. H. (2020). A tyrosine phosphoregulatory system controls exopolysaccharide biosynthesis and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog*, *16*(8), e1008745. DOI:10.1371/journal.ppat.1008745
- Sengupta, C., Mukherjee, O., & Chowdhury, R. (2016). Adherence to Intestinal Cells Promotes Biofilm Formation in *Vibrio cholerae*. *J Infect Dis*, *214*(10), 1571-1578. DOI:10.1093/infdis/jiw435
- Seper, A., Fengler, V. H., Roier, S., Wolinski, H., Kohlwein, S. D., Bishop, A. L., . . . Schild, S. (2011). Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol*, *82*(4), 1015-1037. DOI:10.1111/j.1365-2958.2011.07867.x
- Seper, A., Hosseinzadeh, A., Gorkiewicz, G., Lichtenegger, S., Roier, S., Leitner, D. R., . . . Schild, S. (2013). *Vibrio cholerae* evades neutrophil extracellular traps by the activity of two extracellular nucleases. *PLoS Pathog*, *9*(9), e1003614. DOI:10.1371/journal.ppat.1003614
- Seward, C. H., Manzella, A., Alam, A., Butler, J. S., & Dziejman, M. (2015). Using *S. cerevisiae* as a Model System to Investigate *V. cholerae* VopX-Host Cell Protein Interactions and Phenotypes. *Toxins (Basel)*, *7*(10), 4099-4110. DOI:10.3390/toxins7104099
- Sheahan, K. L., Cordero, C. L., & Satchell, K. J. (2004). Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(26), 9798-9803. DOI:10.1073/pnas.0401104101
- Shime-Hattori, A., Iida, T., Arita, M., Park, K. S., Kodama, T., & Honda, T. (2006). Two type IV pili of *Vibrio parahaemolyticus* play different roles in biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett*, *264*(1), 89-97. DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00438.x
- Shin, O. S., Tam, V. C., Suzuki, M., Ritchie, J. M., Bronson, R. T., Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (2011). Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*. *mBio*, *2*(3), e00106-00111. DOI:10.1128/mBio.00106-11
- Shneider, M. M., Buth, S. A., Ho, B. T., Basler, M., Mekalanos, J. J., & Leiman, P. G. (2013). PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature*, *500*(7462), 350-353. DOI:10.1038/nature12453
- Sikora, A. E. (2013). Proteins secreted via the type II secretion system: smart strategies of *Vibrio cholerae* to maintain fitness in different ecological niches. *PLoS Pathog*, *9*(2), e1003126. DOI:10.1371/journal.ppat.1003126

- Sikora, A. E., Lybarger, S. R., & Sandkvist, M. (2007). Compromised outer membrane integrity in *Vibrio cholerae* Type II secretion mutants. *J Bacteriol*, *189*(23), 8484-8495. DOI:10.1128/JB.00583-07
- Sikora, A. E., Zielke, R. A., Lawrence, D. A., Andrews, P. C., & Sandkvist, M. (2011). Proteomic analysis of the *Vibrio cholerae* type II secretome reveals new proteins, including three related serine proteases. *J Biol Chem*, *286*(19), 16555-16566. DOI:10.1074/jbc.M110.211078
- Silva, A. J., & Benitez, J. A. (2016). *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis*, *10*(2), e0004330. DOI:10.1371/journal.pntd.0004330
- Silva, A. J., Leitch, G. J., Camilli, A., & Benitez, J. A. (2006). Contribution of hemagglutinin/protease and motility to the pathogenesis of El Tor biotype cholera. *Infect Immun*, *74*(4), 2072-2079. DOI:10.1128/IAI.74.4.2072-2079.2006
- Silverman, J. M., Agnello, D. M., Zheng, H., Andrews, B. T., Li, M., Catalano, C. E., Gonen, T., Mougous, J. D. (2013). Haemolysin coregulated protein is an exported receptor and chaperone of type VI secretion substrates. *Mol Cell*, *51*(5), 584-593. DOI:10.1016/j.molcel.2013.07.025
- Singh, P. K., Bartalomej, S., Hartmann, R., Jeckel, H., Vidakovic, L., Nadell, C. D., & Drescher, K. (2017). *Vibrio cholerae* Combines Individual and Collective Sensing to Trigger Biofilm Dispersal. *Curr Biol*, *27*(21), 3359-3366 e3357. DOI:10.1016/j.cub.2017.09.041
- Sjostrom, A. E., Sandblad, L., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2015). Membrane vesicle-mediated release of bacterial RNA. *Sci Rep*, *5*, 15329. DOI:10.1038/srep15329
- Sloup, R. E., Konal, A. E., Severin, G. B., Korir, M. L., Bagdasarian, M. M., Bagdasarian, M., & Waters, C. M. (2017). Cyclic Di-GMP and VpsR Induce the Expression of Type II Secretion in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*, *199*(19). DOI:10.1128/JB.00106-17
- Smith, D. R., Maestre-Reyna, M., Lee, G., Gerard, H., Wang, A. H., & Watnick, P. I. (2015). In situ proteolysis of the *Vibrio cholerae* matrix protein RbmA promotes biofilm recruitment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(33), 10491-10496. DOI:10.1073/pnas.1512424112
- Stauder, M., Huq, A., Pezzati, E., Grim, C. J., Ramoino, P., Pane, L., Colwell, R. R., Pruzzo, C., & Vezzulli, L. (2012). Role of GbpA protein, an important virulence-related colonization factor, for *Vibrio cholerae*'s survival in the aquatic environment. *Environ Microbiol Rep*, *4*(4), 439-445. DOI:10.1111/j.1758-2229.2012.00356.x
- Stauder, M., Vezzulli, L., Pezzati, E., Repetto, B., & Pruzzo, C. (2010). Temperature affects *Vibrio cholerae* O1 El Tor persistence in the aquatic environment via an enhanced expression of GbpA and MSHA adhesins. *Environ Microbiol Rep*, *2*(1), 140-144. DOI:10.1111/j.1758-2229.2009.00121.x
- Stoebner, J. A., & Payne, S. M. (1988). Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, *56*(11), 2891-2895. DOI:10.1128/IAI.56.11.2891-2895.1988
- Suzuki, M., Danilchanka, O., & Mekalanos, J. J. (2014). *Vibrio cholerae* T3SS effector VopE modulates mitochondrial dynamics and innate immune signaling by targeting Miro GTPases. *Cell Host Microbe*, *16*(5), 581-591. DOI:10.1016/j.chom.2014.09.015

- Syed, K. A. (2010). *Regulation of hemagglutinin by flagellar hierarchy in Vibrio cholerae*. (Ph.D.). University of Texas, Ann Arbor. Retrieved from <https://search.proquest.com/dissertations-theses/regulation-hemagglutinin-flagellar-hierarchy-i/docview/305240843/se-2?accountid=12543> (3402995)
- Syed, K. A., Beyhan, S., Correa, N., Queen, J., Liu, J., Peng, F., . . . Klose, K. E. (2009). The *Vibrio cholerae* flagellar regulatory hierarchy controls expression of virulence factors. *J Bacteriol*, *191*(21), 6555-6570. DOI:10.1128/JB.00949-09
- Syngkon, A., Elluri, S., Koley, H., Rompikuntal, P. K., Saha, D. R., Chakrabarti, M. K., . . . Pal, A. (2010). Studies on a novel serine protease of a DeltahapADeltaprtV *Vibrio cholerae* O1 strain and its role in hemorrhagic response in the rabbit ileal loop model. *PLoS One*, *5*(9). DOI:10.1371/journal.pone.0013122
- Tacket, C. O., Taylor, R. K., Losonsky, G., Lim, Y., Nataro, J. P., Kaper, J. B., & Levine, M. M. (1998). Investigation of the roles of toxin-coregulated pili and mannose-sensitive hemagglutinin pili in the pathogenesis of *Vibrio cholerae* O139 infection. *Infect Immun*, *66*(2), 692-695. DOI:10.1128/IAI.66.2.692-695.1998
- Tam, V. C., Serruto, D., Dziejman, M., Briehner, W., & Mekalanos, J. J. (2007). A type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a formin/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization. *Cell Host Microbe*, *1*(2), 95-107. DOI:10.1016/j.chom.2007.03.005
- Tam, V. C., Suzuki, M., Coughlin, M., Saslowsky, D., Biswas, K., Lencer, W. I., . . . Mekalanos, J. J. (2010). Functional analysis of VopF activity required for colonization in *Vibrio cholerae*. *mBio*, *1*(5). DOI:10.1128/mBio.00289-10
- Taverner, A., MacKay, J., Laurent, F., Hunter, T., Liu, K., Mangat, K., . . . Mrsny, R. J. (2020). Cholix protein domain I functions as a carrier element for efficient apical to basal epithelial transcytosis. *Tissue Barriers*, *8*(1), 1710429. DOI:10.1080/21688370.2019.1710429
- Teschler, J. K., Zamorano-Sanchez, D., Utada, A. S., Warner, C. J., Wong, G. C., Lington, R. G., & Yildiz, F. H. (2015). Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat Rev Microbiol*, *13*(5), 255-268. DOI:10.1038/nrmicro3433
- Toma, C., & Honma, Y. (1996). Cloning and genetic analysis of the *Vibrio cholerae* aminopeptidase gene. *Infect Immun*, *64*(11), 4495-4500. DOI:10.1128/IAI.64.11.4495-4500.1996
- Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nat Rev Microbiol*, *17*(1), 13-24. DOI:10.1038/s41579-018-0112-2
- Trucksis, M., Galen, J. E., Michalski, J., Fasano, A., & Kaper, J. B. (1993). Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(11), 5267-5271. DOI:10.1073/pnas.90.11.5267
- Unterweger, D., Kostiuk, B., & Pukatzki, S. (2017). Adaptor Proteins of Type VI Secretion System Effectors. *Trends Microbiol*, *25*(1), 8-10. DOI:10.1016/j.tim.2016.10.003
- Unterweger, D., Miyata, S. T., Bachmann, V., Brooks, T. M., Mullins, T., Kostiuk, B., . . . Pukatzki, S. (2014). The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition. *Nat Commun*, *5*, 3549. DOI:10.1038/ncomms4549

- Utada, A. S., Bennett, R. R., Fong, J. C. N., Gibiansky, M. L., Yildiz, F. H., Golestanian, R., & Wong, G. C. L. (2014). *Vibrio cholerae* use pili and flagella synergistically to effect motility switching and conditional surface attachment. *Nat Commun*, 5, 4913. DOI:10.1038/ncomms5913
- Uzzau, S., Cappuccinelli, P., & Fasano, A. (1999). Expression of *Vibrio cholerae* zonula occludens toxin and analysis of its subcellular localization. *Microb Pathog*, 27(6), 377-385. DOI:10.1006/mpat.1999.0312
- Vaitkevicius, K., Lindmark, B., Ou, G., Song, T., Toma, C., Iwanaga, M., . . . Wai, S. N. (2006). A *Vibrio cholerae* protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator grazing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(24), 9280-9285. DOI:10.1073/pnas.0601754103
- Vaitkevicius, K., Rompikuntal, P. K., Lindmark, B., Vaitkevicius, R., Song, T., & Wai, S. N. (2008). The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. *FEBS J*, 275(12), 3167-3177. DOI:10.1111/j.1742-4658.2008.06470.x
- Vance, R. E., Zhu, J., & Mekalanos, J. J. (2003). A constitutively active variant of the quorum-sensing regulator LuxO affects protease production and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 71(5), 2571-2576. DOI:10.1128/iai.71.5.2571-2576.2003
- Vanden Broeck, D., Horvath, C., & De Wolf, M. J. (2007). *Vibrio cholerae*: cholera toxin. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(10), 1771-1775. DOI:10.1016/j.biocel.2007.07.005
- Vettiger, A., & Basler, M. (2016). Type VI Secretion System Substrates Are Transferred and Reused among Sister Cells. *Cell*, 167(1), 99-110 e112. DOI:10.1016/j.cell.2016.08.023
- Vorkapic, D., Pressler, K., & Schild, S. (2016). Multifaceted roles of extracellular DNA in bacterial physiology. *Curr Genet*, 62(1), 71-79. DOI:10.1007/s00294-015-0514-x
- Voulhoux, R., Ball, G., Ize, B., Vasil, M. L., Lazdunski, A., Wu, L. F., & Filloux, A. (2001). Involvement of the twin-arginine translocation system in protein secretion via the type II pathway. *EMBO J*, 20(23), 6735-6741. DOI:10.1093/emboj/20.23.6735
- Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, 272(5270), 1910-1914. DOI:10.1126/science.272.5270.1910
- Watnick, P. I., Fullner, K. J., & Kolter, R. (1999). A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J Bacteriol*, 181(11), 3606-3609. DOI:10.1128/JB.181.11.3606-3609.1999
- Williams, S. G., Varcoe, L. T., Attridge, S. R., & Manning, P. A. (1996). *Vibrio cholerae* Hcp, a secreted protein coregulated with HlyA. *Infect Immun*, 64(1), 283-289. DOI:10.1128/IAI.64.1.283-289.1996
- Wong, E., Vaaje-Kolstad, G., Ghosh, A., Hurtado-Guerrero, R., Konarev, P. V., Ibrahim, A. F., . . . van Aalten, D. M. (2012). The *Vibrio cholerae* colonization factor GbpA possesses a modular structure that governs binding to different host surfaces. *PLoS Pathog*, 8(1), e1002373. DOI:10.1371/journal.ppat.1002373
- Wu, Z., Nybom, P., & Magnusson, K. E. (2000). Distinct effects of *Vibrio cholerae* haemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated

- proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol*, 2(1), 11-17. DOI:10.1046/j.1462-5822.2000.00025.x
- Yang, X., Long, M., & Shen, X. (2018). Effector(-)Immunity Pairs Provide the T6SS Nanomachine its Offensive and Defensive Capabilities. *Molecules*, 23(5). DOI:10.3390/molecules23051009
- Yildiz, F., Fong, J., Sadovskaya, I., Grard, T., & Vinogradov, E. (2014). Structural characterization of the extracellular polysaccharide from *Vibrio cholerae* O1 El-Tor. *PLoS One*, 9(1), e86751. DOI:10.1371/journal.pone.0086751
- Yildiz, F. H., & Schoolnik, G. K. (1999). *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7), 4028-4033. DOI:10.1073/pnas.96.7.4028
- Zampini, M., Pruzzo, C., Bondre, V. P., Tarsi, R., Cosmo, M., Bacciaglia, A., . . . Srivastava, B. S. (2005). *Vibrio cholerae* persistence in aquatic environments and colonization of intestinal cells: involvement of a common adhesion mechanism. *FEMS Microbiol Lett*, 244(2), 267-273. DOI:10.1016/j.femsle.2005.01.052
- Zhang, Y. Z., Ran, L. Y., Li, C. Y., & Chen, X. L. (2015). Diversity, Structures, and Collagen-Degrading Mechanisms of Bacterial Collagenolytic Proteases. *Appl Environ Microbiol*, 81(18), 6098-6107. DOI:10.1128/AEM.00883-15
- Zhu, J., Miller, M. B., Vance, R. E., Dziejman, M., Bassler, B. L., & Mekalanos, J. J. (2002). Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5), 3129-3134. DOI:10.1073/pnas.052694299
- Zielke, R. A., Simmons, R. S., Park, B. R., Nonogaki, M., Emerson, S., & Sikora, A. E. (2014). The type II secretion pathway in *Vibrio cholerae* is characterized by growth phase-dependent expression of exoprotein genes and is positively regulated by sigmaE. *Infect Immun*, 82(7), 2788-2801. DOI:10.1128/IAI.01292-13
- Zingl, F. G., Kohl, P., Cakar, F., Leitner, D. R., Mitterer, F., Bonnington, K. E., . . . Schild, S. (2020). Outer Membrane Vesiculation Facilitates Surface Exchange and In Vivo Adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell Host Microbe*, 27(2), 225-237 e228. DOI:10.1016/j.chom.2019.12.002
- Zuckerman, J. N., Rombo, L., & Fisch, A. (2007). The true burden and risk of cholera: implications for prevention and control. *Lancet Infect Dis*, 7(8), 521-530. DOI:10.1016/S1473-3099(07)70138-X



## 7.2 Complément de revue de littérature

### 7.2.1 Coloration de Gram : rappels historiques

Historiquement, les termes Gram positif et Gram négatif proviennent d'une méthode de coloration, dite « de Gram », permettant de discriminer les bactéries entre elles. Cette coloration a été inventée à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle par Hans Christian Gram et rapidement optimisée par Carl Weigert pour aboutir à une méthode qui est encore très utilisée aujourd'hui et est restée presque inchangée (Cantey & Doern, 2015; Silhavy, 2016). La coloration de Gram se base sur la propriété des enveloppes à piéger ou non un colorant dans la bactérie après des étapes de colorations et décolorations. Si la bactérie reste colorée après l'étape de décoloration, elle sera considérée comme une bactérie à Gram positif. En revanche si la bactérie est décolorée, elle sera désignée comme une bactérie à Gram négatif. L'apport de Carl Weigert a été l'ajout d'une étape finale de coloration avec un colorant moins foncé que le premier, facilitant ainsi l'observation des bactéries à Gram négatif tout en permettant de les différencier des bactéries à Gram positif (Moyes, Reynolds, & Breakwell, 2009).

Avant la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, il était déjà connu que certaines bactéries fussent difficiles ou impossibles à classer comme bactérie à Gram positif ou négatif. Comme, par exemple, *Mycobacterium tuberculosis* qui s'est avérée imperméable à la coloration de Gram (Trifiro, Bourgault, Lebel, & Rene, 1990). Ceci a pu être expliqué suite à la découverte d'un nouveau type de lipides membranaires très particuliers, les acides mycoliques, qui agissent comme barrière et empêchent l'entrée de composés chimiques comme ceux utilisés pour la coloration de Gram. Par la suite, des lipides homologues ont été identifiés dans certaines espèces des genres *Corynebacterium* et *Nocardia*. Le groupe des CMN n'a été défini pour la première fois qu'en 1970 par la composition de son enveloppe (Barksdale, 1970). Cette classification du règne bactérien a, par la suite, été confirmée d'un point de vue phylogénétique. Aujourd'hui le groupe CMN peut aussi être étendu au sous-ordre des *Corynebacterineae* (Silhavy, Kahne, & Walker, 2010; Zerbib, 2016). L'enveloppe des CMN possède des caractéristiques aussi bien de bactéries à Gram positif que de bactérie à Gram négatif (Barksdale, 1970; Yassin, 2011). La composition réelle des enveloppes bactériennes n'a pu être déterminée que bien plus tard, à partir des années 1950

grâce majoritairement aux avancées techniques en microscopie électronique (Khursigara, Koval, Moyles, & Harris, 2018).

## 7.2.2 Capsules

### 7.2.2.1 Nature et compositions

La capsule est une couche épaisse et visqueuse de polymères recouvrant la surface de la bactérie (**Figure 7.1**), chez les bactéries à Gram négatif la capsule est liée à la membrane externe. Les capsules sont composées de polysaccharides, à l'exception de la bactérie à Gram positif *Bacillus anthracis* dont la capsule est composée de polymères d'acides  $\gamma$ -glutamiques (Wen & Zhang, 2015; C. Whitfield, 2006). Les polysaccharides de capsules (PSC) sont formés par une répétition d'unités oligosaccharidiques souvent acides et chargés négativement, mais peuvent avoir une charge neutre (**Figure 7.2**). Il existe une grande diversité de PSC, par les sucres composant les unités du polysaccharide et par le type de liaisons entre les sucres. Les unités formant le PSC peuvent être liées entre elles de façon linéaire ou branchée ou encore liées à des groupements non réducteurs (Reid & Szymanski, 2010; Wen & Zhang, 2015). Les sucres PSC peuvent aussi être substitués par des groupements de types O-acétyl ou O-formyl, et être liés à des acides aminés (Cress et al., 2014; C. Whitfield, 2006). La structure et la composition de certains antigènes de capsules peuvent être similaires, voire identique, à celles des polysaccharides des lipopolysaccharides (LPS) (voir 1.1.4.1.1-Lipopolysaccharides et Figure 1.9), cependant ces derniers sont généralement très courts, représentant un poids moléculaire de 10 à 20 kDa alors que le poids moléculaire des PSC est généralement compris entre 50 et 100 kDa (Restaino et al., 2019; Wen & Zhang, 2015). Ces PSC particuliers sont appelés antigènes  $K_{LPS}$  (ou antigènes O de capsule) (Peleg et al., 2005; Lisa M. Willis & Whitfield, 2013).

Il faut noter que certaines matrices polysaccharidiques extracellulaire peuvent être considérées comme des capsules. Comme, les matrices formées d'acide colanique (antigène M) produites par certaines bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* (Stevenson, Andrianopoulos, Hobbs, & Reeves, 1996) ou d'alginate produit par *Pseudomonas aeruginosa* (Franklin, Nivens, Weadge, &



Howell, 2011). Elles sont considérées comme des capsules, car elles ne sont pas dissociables de la cellule, contrairement à d'autres matrices polysaccharidiques visqueuses appelées *slime-layers*. (Franklin et al., 2011; Rao, Ghei, & Chambers, 2016; Stevenson et al., 1996; Wen & Zhang, 2015).

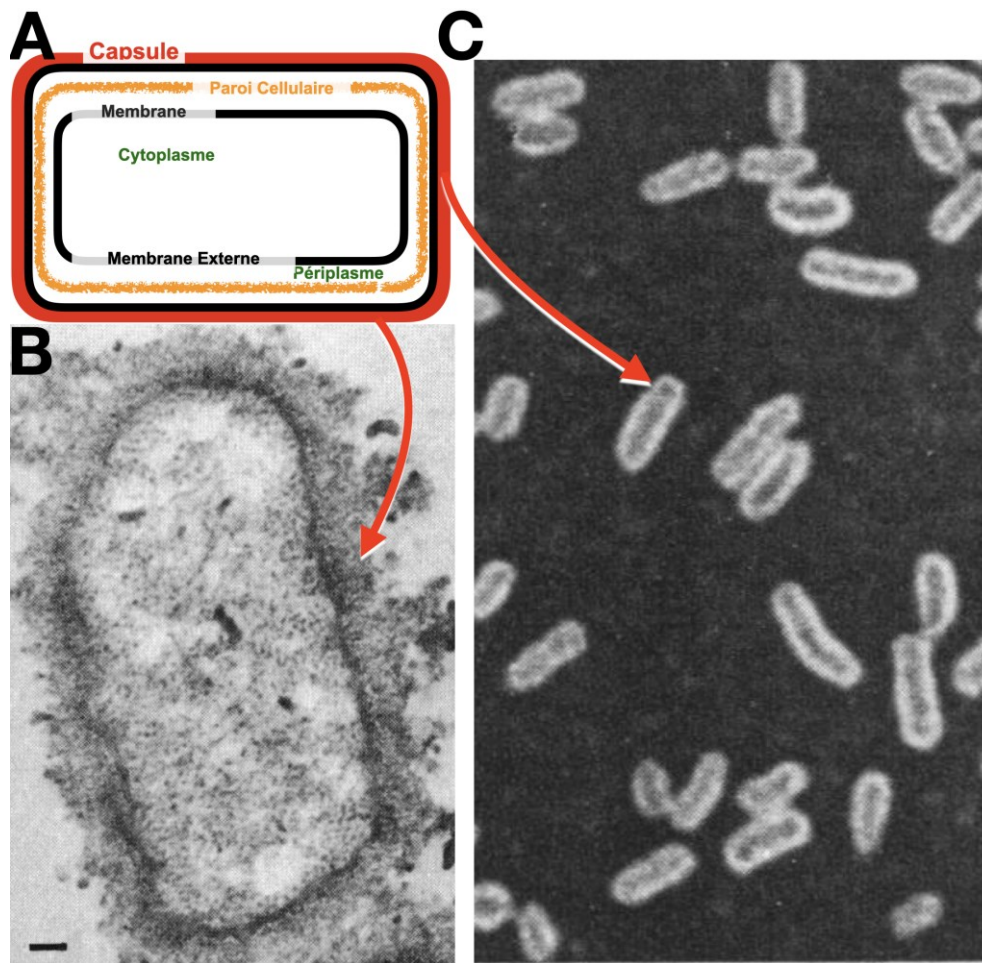


Figure 7.1. Capsule bactérienne.

Représentation schématique et images de la capsule des bactéries à Gram négatif. A) Schéma simplifié d'une enveloppe de bactérie à Gram négatif comportant une capsule. B) Image de microscopie électronique de *Escherichia coli* RS218 montrant la capsule. Échelle = 0,1  $\mu\text{m}$  C) Image de microscopie photonique de *Escherichia coli* Bil61/42 marqué à l'encre de Chine. La capsule est colorée négativement, elle apparaît sous forme de halo transparent à la surface des bactéries.

Zoom = x 1600. L'image du panneau B provient de (C. Whitfield, Vimr, Costerton, & Troy, 1984), droit de reproduction accordé selon Copyright © 1984, American Society for Microbiology. L'image du panneau C provient de (Stirm & Freund-Molbert, 1971), droits de reproduction accordés selon Copyright © 1971, American Society for Microbiology

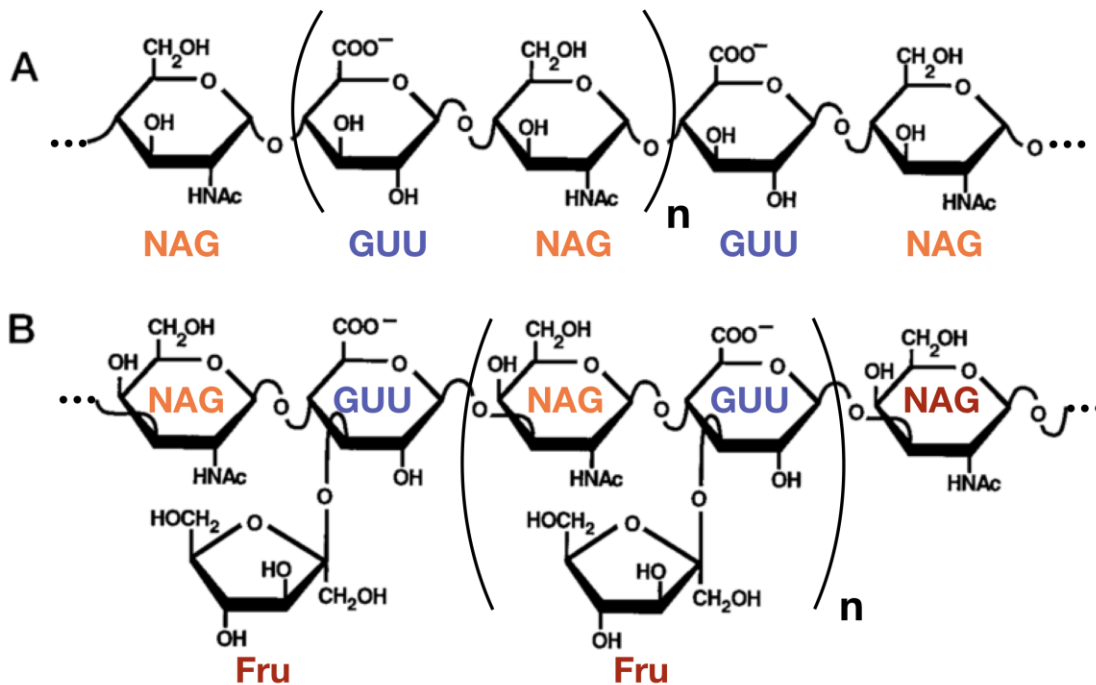


Figure 7.2. Exemples de composition de polysaccharides de capsule

Deux exemples de compositions de polysaccharides de capsule (PSC) représentées selon la projection d'Haworth. Les sous-unités des polysaccharides de capsule sont encadrées par des parenthèses et sont répétées « n » fois. A) PSC anionique de *Escherichia coli* sérotype de K5. La sous-unité du PSC est un disaccharide linéaire composé d'acide glucuronique lié en  $\beta(1\rightarrow4)$  à l'acide N-acétylglucosamine, ce dernier étant lié en  $\alpha(1\rightarrow4)$  à l'acide glucuronique de la sous-unité suivante. B) PSC anionique de *Escherichia coli* de sérotype K4. La sous-unité du PSC est un trisaccharide branché composé d'acide N-acétylglucosamine lié en  $\beta(1\rightarrow4)$  à l'acide glucuronique lui-même lié en  $\beta(3\rightarrow1)$  au fructose et en  $\beta(1\rightarrow3)$  à l'acide N-acétylglucosamine de la sous-unité suivante. Polysaccharide de capsule Ac = acétyle, NAG = acide N-acétylglucosamine, GUU = acide glucuronique, Fru = fructose. (Rodriguez, Jann, & Jann, 1988; Vann, Schmidt, Jann, & Jann, 1981). Image modifiée provenant de (Lidholt & Fjelstad, 1997), reproduction accordée selon Creative Common (CC BY 4.0), ASBMB ©1997. Currently published by Elsevier Inc; originally published by American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

### 7.2.2.2 Synthèse et régulations

Chez les bactéries à Gram négatif, il existe trois différentes voies de synthèse des PCS, une voie dépendante de la polymérase Wzy, une voie dépendante d'un transporteur de type *ATP binding cassette* (ABC) et une voie synthase dépendante (Reid & Szymanski, 2010; Sachdeva et al., 2017; L. M. Willis et al., 2013). Dans la voie de synthèse dépendant de Wzy, les sucres sont associés les uns aux autres à partir de leurs groupements réducteurs jusqu'à former un bloc oligosaccharidique. De multiples blocs sont associés les uns aux autres par la polymérase Wzy dans le périplasme jusqu'à former un PSC mature qui sera ensuite transféré à la surface de la bactérie, ce mode de synthèse est dit non processif (**Figure 7.3A**). Dans le mode de synthèse dépendant de transporteurs ABC, les sucres sont ajoutés les uns aux autres à partir de leurs groupements non réducteurs de manière processive. Une fois le PSC arrivé à maturation, il est transporté par un transporteur de type ABC et une porine à la surface de la bactérie (**Figure 7.3B**). (Phanphak et al., 2019; Wen & Zhang, 2015; C. Whitfield, 2006). Dans la voie de synthèse synthase-dépendante, le polymère est exporté en même temps qu'il est synthétisé, cependant, le mécanisme exact de cette voie reste peu connu (**Figure 1.7**) (Schmid et al., 2015). Ces mécanismes sont similaires à ceux intervenants dans la synthèse des exopolysaccharides (**Figure 1.7**), mais différents par le fait que les PSC sont finalement attachés à la surface de la bactérie (Reid & Szymanski, 2010; Sachdeva et al., 2017; Schmid et al., 2015; L. M. Willis et al., 2013).

Les  $K_{LPS}$  (ou plus rarement antigène O de capsule) sont synthétisés par la voie dépendante de Wzy et sont liés à la membrane externe par un glycophospholipide (molécule constituée d'acides gras de sucres et un (ou plusieurs) groupement phosphate), le lipide A lié au core antigène comme les molécules de LPS (R. C. Goldman et al., 1982) (section 1.1.4.1.1 Lipopolysaccharides). En revanche, la molécule servant d'encrage aux PSC non  $K_{LPS}$  de cette catégorie n'est pas encore connue (MacLachlan, Keenleyside, Dodgson, & Whitfield, 1993; Wen & Zhang, 2015). Pour les souches dont la synthèse de PSC dépend d'un transporteur ABC, les PSC sont liés à un glycéroglycophospholipide (molécule constituée d'acides gras liés de glycérol et de sucres et d'un

(ou plus) groupement phosphate lié à plusieurs sucres, le céto-déoxyoctulosonate (CDO) (Phanphak et al., 2019).

La synthèse de la capsule est régulée par de multiples facteurs, elle dépend très fortement des conditions du milieu. La production de la capsule peut être induite ou inhibée en fonction de la température, de la concentration en certains ions (Wen & Zhang, 2015). La capsule peut être un avantage ou un désavantage dans le processus d'infection. Par exemple, la production de la capsule d'une même souche peut être favorisée dans un processus de propagation des bactéries (dans le sang par exemple), mais réduite dans un processus d'adhésion, cette régulation se faisant en fonction des conditions du milieu (Hammerschmidt et al., 2005). L'activation de la synthèse de la capsule est un mécanisme de défense répandu face à différents stress. Des antibiotiques dont des peptides antimicrobiens peuvent induire la production de capsule (Campos et al., 2004; Sailer, Meberg, & Young, 2003). L'activation du système de stress membranaire Rcs induit dans certaines souches la synthèse de la capsule (Hersch et al., 2020). Chez certaines souches bactériennes, il a été rapporté une modification de l'expression de gènes impliqués dans la production de capsule *via* des phénomènes de variation de phase ou d'insertion réversible d'élément transposable (Wen & Zhang, 2015).

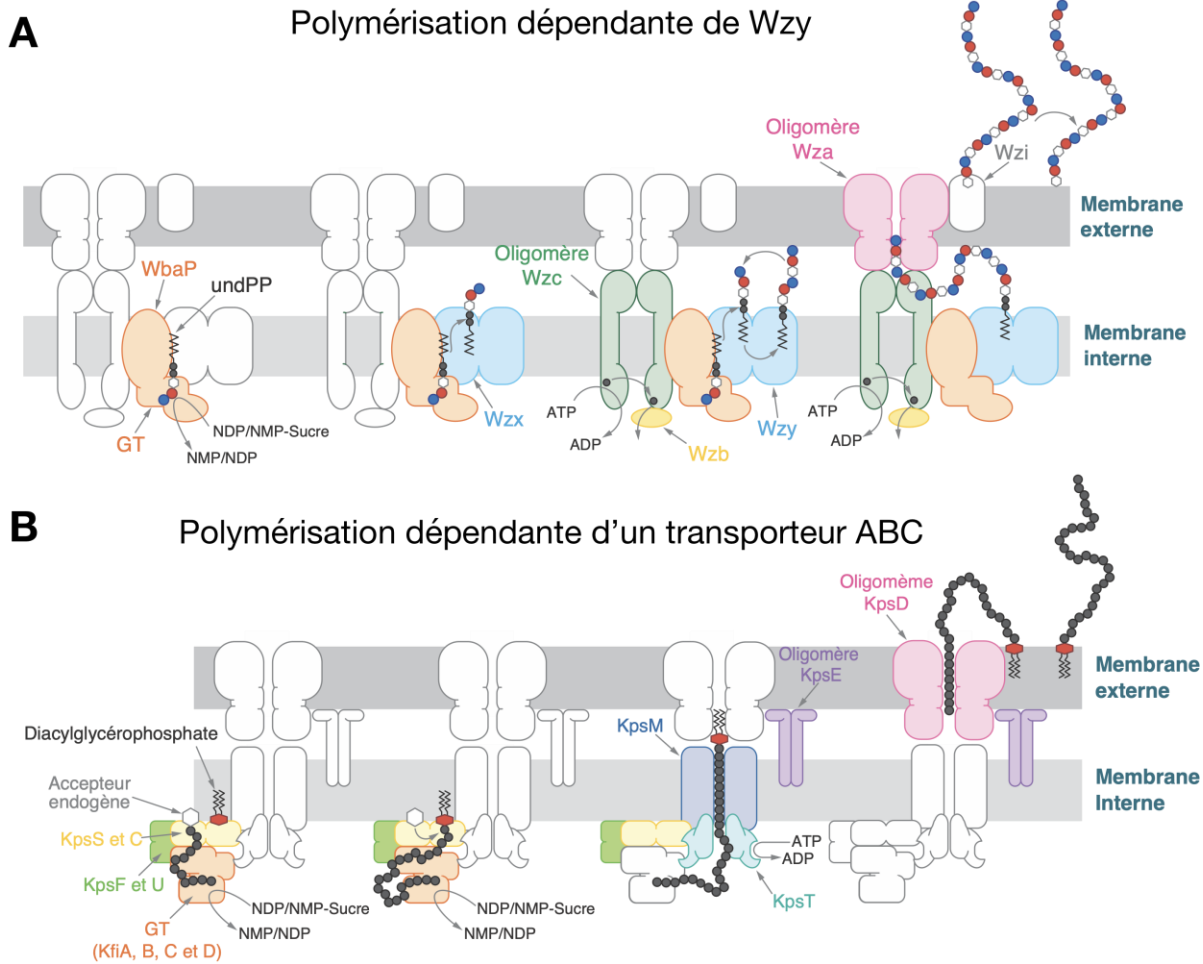


Figure 7.3. Différents modes de synthèses des polysaccharides capsulaires chez les bactéries à Gram négatif

Schéma des deux modèles de synthèse des polysaccharides de capsule (PSC) chez les bactéries à Gram négatif. La paroi bactérienne n'a pas été représentée. A) Modèle de synthèse des PSC dépendante de Wzy basé sur la synthèse des PSC du groupe capsulaire I de *Escherichia coli*. La synthèse commence par l'ajout de sucres sur le transporteur universel de sucres, l'undécaprényle pyrophosphate (undPP). Les sucres, initialement liés à des nucléotides diphosphates ou monophosphates (NDP/NMP), sont associés les uns aux autres sur leur fonction réductrice par la glycosyle transférase (GT) WbaP jusqu'à former un bloc oligosaccharidique. Ce bloc lié à l'undPP est ensuite flipé au périplasma par Wzx. Dans le périplasma les multiples blocs présents sont associés les uns aux autres par la polymérase Wzy. Une fois le PSC mature, il est transporté sur la surface de la bactérie par le système Wza-Wzb-Wzc en laissant le transporteur déphosphorylé dans la membrane interne. Le PSC est finalement ancré au feuillet externe de la membrane externe par un processus impliquant Wzi. Le PSC peut être ancré sur le core antigène du lipide A (rappel section 1.1.4.1.1 Lipopolysaccharides) ou à un accepteur final inconnu. B) Modèle de

synthèse dépendante d'un transporteur de type ABC (*ATP-binding cassette*), basé sur la synthèse de PSC du groupe capsulaire II de *Escherichia coli*. Le mécanisme ici est bien moins élucidé que le précédent. La polymérisation se fait ici totalement dans le cytoplasme, par les glycosyl transférases KfiA, B, C et D, qui lient les sucres sur une fonction non réductrice. La polymérisation est initiée sur un récepteur endogène de nature inconnue, certaines recherches indiquent qu'il pourrait s'agir de l'undPP ou d'un polypeptide. Avant d'être transporté sur la surface bactérienne, le PSC mature est transféré sur le diacylglycérolphosphate (DAGP) (ou le diacylglycérolphosphate-céto-déoxyoctulosonate (DAGP-CDO)), probablement par KpsSCFU. Le moment auquel le PSC est transféré sur le DAGP n'est pas connu. Le PSC mature lié au DAGP est transporté au périplasma par un transporteur de type ABC (KpsTM) et à la surface de la bactérie par le transporteur par KpsD et KpsE. GT = glycosyl-transférase, NMP = nucléotide monophosphate, NDP = nucléotide diphosphate, undPP = undécaprényl pyrophosphate. (Troy & McCloskey, 1979; Weisgerber & Troy, 1990; Wen & Zhang, 2015; C. Whitfield, 2006). Figures modifiées provenant de (C. Whitfield, 2006), droits de reproduction accordés, Copyright © 2006 by Annual Reviews.

### 7.2.2.3 Fonctions et Importances dans la virulence bactérienne

La capsule apporte de nombreux avantages aux bactéries qui en produisent. On peut grossièrement résumer le rôle de la capsule comme celui d'un masque ou d'un bouclier permettant à la bactérie de se cacher ou de résister à l'assaut du milieu ou de ses prédateurs. La capsule peut notamment protéger la bactérie de l'action du système immunitaire de l'hôte par plusieurs mécanismes : certaines capsules ont la propriété de camoufler des composants de la bactérie auprès du système immunitaire et permettent ainsi d'éviter la phagocytose (Cross, 1990); la grande similarité en composition de certaines capsules avec des composants de cellules épithéliales peut permettre d'échapper au système immunitaire (Cress et al., 2014); certaines capsules peuvent empêcher la phagocytose en se liant à une molécule du régulateur négatif du complément, cette liaison induit l'interruption de la cascade d'activation du complément et empêche la phagocytose (Cross, 1990) ; certaines capsules peuvent induire une résistance à la phagocytose en empêchant la fusion des lysosomes à la vacuole d'endocytose (Kim et al., 2003) ; les propriétés physico-chimiques de certains PSC les rendent très peu immunogènes (Roberts, 1996). La capsule peut permettre de résister à :

- la phagocytose de protozoaire (Jung, Matin, Kim, & Khan, 2007) ;
- à l'attaque d'autres bactéries (Hersch et al., 2020) ;

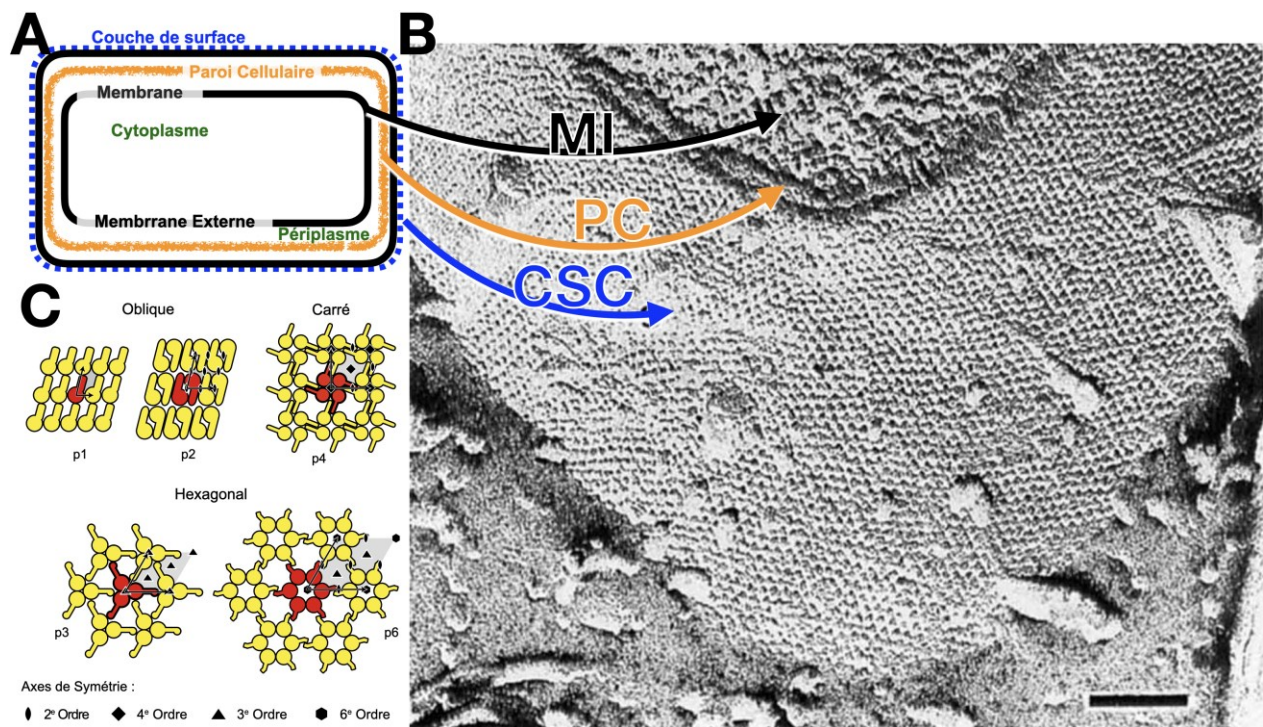
- à des bactériophages (Scholl et al., 2005) ;
- à l'oxygène chez les bactéries anaérobies obligatoires (Sabra, Zeng, Lunsdorf, & Deckwer, 2000) ;
- à la dessiccation, aux désinfectants et au lysozyme (Tipton, Chin, Farokhyfar, Weiss, & Rather, 2018) ;
- aux peptides antimicrobiens ou d'autres antibiotiques (Campos et al., 2004; Geisinger & Isberg, 2015; Sabnis, Ledger, Pader, & Edwards, 2018) ;
- et au stress oxydatif (Bylund, Burgess, Cescutti, Ernst, & Speert, 2006; Cleary & Larkin, 1979).
- Dans certains cas les capsules peuvent favoriser l'adhésion (Costerton, Irvin, & Cheng, 1981; Moxon E.R., 1990), ou au contraire limiter l'adhésion (Schembri, Dalsgaard, & Klemm, 2004).

Malgré le caractère peu immunogène d'un bon nombre de PSC, de nombreux vaccins utilisant la capsule comme agent antigénique ont été mis au point (Lesinski & Westerink, 2001). Il n'existe actuellement pas de traitement antibiotique ciblant la capsule bactérienne, cependant il est envisagé de cibler les protéines impliquées dans la biosynthèse, l'encrage ou l'expression des PSC synthétisés par la voie dépendante de Wzy (**Figure 7.3**) (Sachdeva et al., 2017).

### **7.2.3 Couche de surface cristalline**

La couche de surface cristalline (ou couche S) n'est pas présente chez toutes les espèces bactériennes, cependant elle est retrouvée dans un large éventail de bactéries à Gram négatif et positif et chez certaines espèces du groupe des CMN (U. Sleytr, 1999). Elle est pratiquement ubiquitaire dans le règne *Archaea* (Rodrigues-Oliveira, Belmok, Vasconcellos, Schuster, & Kyaw, 2017). La couche S est une couche de protéines ou de glycoprotéines recouvrant la surface de la bactérie en permanence (**Figure 7.4A**), contrairement aux capsules (par exemple) dont la production est régulée en fonction des conditions du milieu (rappel en annexe section 7.2.2 Capsules) (Fagan & Fairweather, 2014; Wen & Zhang, 2015). La couche S est composée de

monomères ou d'homopolymère (jusqu'à 6 mers) liés par des liaisons faibles formant une unité protéique. Les unités protéiques sont positionnées les unes par rapport aux autres dans un maillage régulier paracrystallin, une structure ordonnée uniquement sur deux dimensions (**Figure 7.4B**) (Messner, Steiner, Zarschler, & Schaffer, 2008). Il existe différents types de maillages, oblique, carré ou hexagonal (**Figure 7.4C**), il est souvent hexagonal chez les bactéries à Gram négatif. Chez ces bactéries, la couche S est ancrée aux lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe (voir 1.1.4.1.1 Lipopolysaccharides) par des liaisons faibles (Bayan, Houssin, Chami, & Leblon, 2003; Gerbino, Carasi, Mobili, Serradell, & Gomez-Zavaglia, 2015).





CSC = Couche de Surface Cristalline, PC = Paroi Cellulaire et MI = Membrane Interne, la barre d'échelle correspond à 100 nm. Les flèches bleue, orange et noire indiquent les différentes structures observables, respectivement, la CSC, la PC et la MI, comme illustré sur le schéma panneau A. Image provenant de (U. B. Sleytr, Thornley, & Glauert, 1974), reproduction accordé selon Copyright © 1974, American Society for Microbiology. C) Illustration des différents types de mailles observés dans les couches cristallines de surface. Les sous-unités sont en jaune, monomère et homopolymère sont en rouge, les vecteurs sont indiqués par des flèches et les axes de symétrie sont représentés par leurs symboles respectifs. Les mailles sont coloriées en gris clair. Image provenant de (U. B. Sleytr et al., 2014), reproduction accordé selon Copyright © 2014, Oxford University Press.

#### 7.2.3.1 Synthèse

La découverte de la couche de surface cristalline a été permise, comme pour les autres composants de l'enveloppe, par le développement de techniques de marquage et d'imagerie en microscopie électronique. La mise au point du marquage négatif, du marquage métallique unidirectionnel et de la cryofracture ont notamment permis d'identifier cette structure. La première image démontrant l'existence de la couche S a été effectuée sur *Ectothiorhodospira mobilis* en 1968. Depuis les mécanismes de synthèse et d'homéostasie ont partiellement été élucidés. Chez les bactéries à Gram négatif, les nouvelles unités sont incorporées uniformément sur l'ensemble de la surface bactérienne, c'est un mécanisme finement régulé dans le temps et en fonction des conditions de croissance. Les protéines de la couche S une fois traduites sont exportées du cytoplasme au périplasme *via* le système de sécrétion Sec ou de type II ou IX, puis à la surface de la bactérie *via* une porine, ou alors directement du cytoplasme à la surface à travers un système de sécrétion de type II (**Figure 7.5**). Le mécanisme exact par lequel les protéines néosynthétisées s'intègrent à la couche S existante n'est pas encore connu. Cependant, il a été démontré que les propriétés de surface (hydrophobicité et charge nette) des sous-unités ainsi que leurs affinités spécifiques avec les composants soutenant la couche S, permettaient de définir l'orientation et l'incorporation des sous-unités. Le lien entre la couche S et le LPS est très étroit, il a été démontré que chez certaines souches que la couche S dépendait de l'intégrité de l'antigène O du LPS et aussi que la couche S a une affinité spécifique à un type particulier de LPS.



bactérienne par un système de sécrétion de type II. *C. Fetus* utilise un système en une étape qui permet de transférer la PCS directement du cytoplasme au feuillet interne de la membrane externe par un système de sécrétion de type I. PCS = protéines de couche S, SS-Sec = système de sécrétion Sec, SST2 = système de sécrétion de type 2 et SST1 = système de sécrétion de type 1. Image modifiée provenant de (Fagan & Fairweather, 2014) droits de reproduction accordés selon Copyright © 2014, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited.

#### 7.2.3.2 Fonctions et rôles dans la virulence

La synthèse et le maintien de la couche S demandent une quantité énorme d'énergie pour la bactérie. Il a été estimé chez la bactérie à Gram positif *Clostridium difficile* que pour maintenir sa couche S intègre, 140 sous-unités devaient être transportées par seconde (en phase exponentielle), la couche S pouvant atteindre jusqu'à 500 000 sous-unités. Il est apparu évident que pour dépenser une telle quantité d'énergie, la bactérie doit tirer un avantage de la couche de surface cristalline et donc que cette dernière doit avoir une fonction importante (Gerbino et al., 2015; U. B. Sleytr et al., 2014). Sans identifier de fonction universelle pour la couche S, une pléthore de fonctions a été trouvée. Selon les microorganismes, il a été démontré que la couche S :

- est impliquée dans l'adhésion à l'hôte, aux composants de la matrice extracellulaire, aux biofilms ou directement à d'autres microorganismes ;
- permet la fixation d'ions ou des bactériophages (ou permettait d'empêcher la fixation de ces derniers) ; est nécessaire pour déterminer et maintenir la forme de la cellule chez les *Archaea* ;
- intervient dans la synthèse de grosses molécules en servant d'amarre ;
- protège la cellule du stress osmotique, mécanique, dû au pH ou aux radiations ; permet à la bactérie d'échapper au système immunitaire de l'hôte, de se protéger de la phagocytose et de l'action du complément ;
- induit une résistance aux peptides antimicrobiens ou enzymes lytiques.

(de la Fuente-Nunez et al., 2012; Fagan & Fairweather, 2014; Gerbino et al., 2015; Sara & Sleytr, 2000; U. B. Sleytr et al., 2014).

Diverses fonctions à la couche S ont été identifiées chez quatre bactéries à Gram négatif

- la couche S est responsable de la résistance de *Aquaspirillum serpens* et *Caulobacter crescentus* à la prédation par la bactérie *Bdellovibrio bacteriovorus*, probablement en masquant des récepteurs membranaires ;
- la couche S de *Aeromonas salmonicida* est importante dans l'import de porphyrine de l'hôte (poissons) ;
- la résistance au complément chez *Campylobacter fetus* (*C. fetus*) est due à l'incapacité d'une des molécules du complément à pouvoir se fixer à la couche S ;
- *C. fetus* est capable de faire varier sa protéine couche S lui permettant ainsi d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte (mouton ou humain) ;
- la virulence de *Tannarella forsythia* est probablement due à la couche S, qui lui permettrait de se fixer d'adhérer aux cellules épithéliales de son hôte (humain) ;
- chez plusieurs espèces du genre *Synechococcus* il se pourrait que la couche S intervienne dans la mobilité de la bactérie, notamment *via* la glycosylation des protéines.

(Fagan & Fairweather, 2014; Sara & Sleytr, 2000).

## 7.2.4 Compositions et fonctions des flagelles et des pili

### 7.2.4.1.1 Compositions et fonctions des flagelles

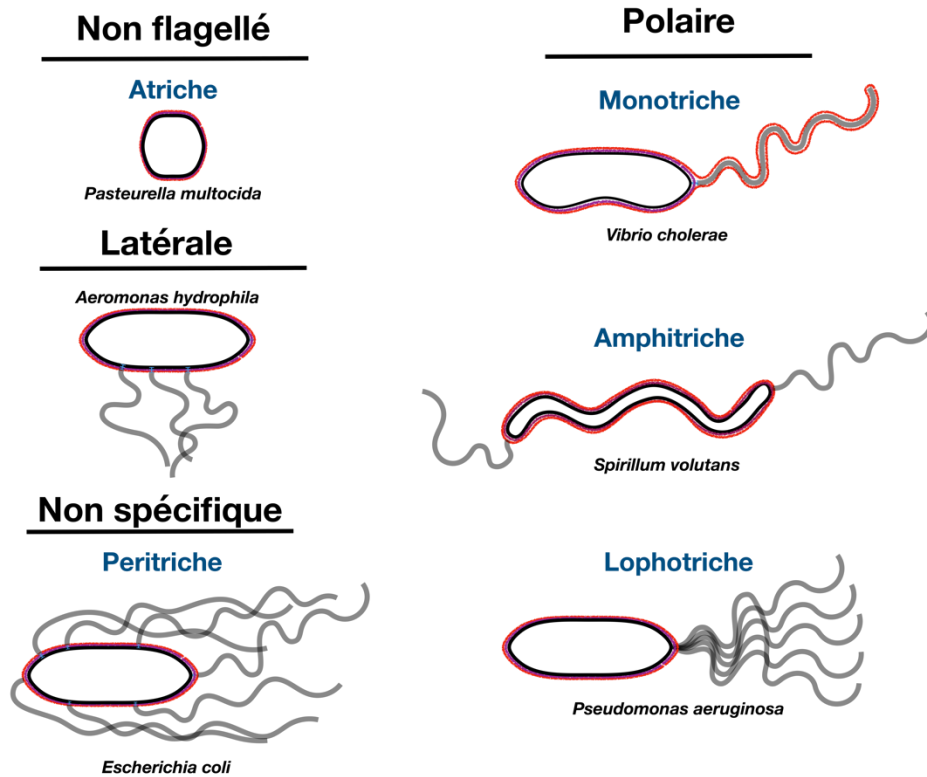


Figure 7.6. Différents types de flagellation

Représentation schématique des différents types de flagellation représentée par un exemple de bactérie à Gram négatif. Les bactéries à Gram négatif peuvent être dépourvues de flagelle (atriche), posséder des pili sur la largeur (latéral), sur un ou les deux pôles (polaire), ou de façon non spécifique (péritriche). Les bactéries possédant un seul flagelle polaire sont appelées monotriche, celles possédant un flagelle à chaque pôle amphitriches et celles possédant plusieurs flagelles à un pôle lophotriches. (Gavin et al., 2002; Lautrop & Jessen, 1964; R & E, 2012; Riley, Das, & Lauga, 2018; Starkebaum & Plorde, 1977; Swan, 1985)

Certaines bactéries ne possèdent pas de flagelle d'autres en possèdent un ou plusieurs localisés à un ou des sites spécifiques ou non (**Figure 7.6**). Les flagelles peuvent mesurer de 5 à 10  $\mu\text{m}$  de long avec un diamètre d'environ de 20 nm (Berry & Armitage, 1999; Chu, Liu, & Hoover, 2020). La

structure du flagelle est très complexe et variée selon les bactéries. Les flagelles sont généralement composés d'une trentaine de protéines différentes associées en homo- ou hétéropolymères allant jusqu'à une masse de 1 GDa (Chaban, Hughes, & Beeby, 2015). Chez certaines bactéries le flagelle peut être composé d'un élément commun au système de sécrétion de type 3 (**Figure 1.12**), certaines bactéries peuvent avoir leur flagelle enveloppé de la membrane externe comme chez *Vibrio cholerae* (**Figure 7.6**) d'autres non (plus fréquent) (Chu et al., 2020; Diepold & Armitage, 2015). Le mode de fonctionnement global du flagelle reste cependant conservé chez les bactéries. De multiples protéines forment différents éléments, un moteur rotatif appelé corps basal, la tige, le rotor et le stator ainsi qu'un système d'export, le rotor est lié à un crochet flexible qui est associé à un flagelle (voir **Figure 1.12**) (Berry & Armitage, 1999). L'énergie permettant la rotation du moteur est provient du passage d'ions  $H^+$  ou  $Na^+$  du périplasme au cytoplasme (selon les types de flagelles) à travers les stators (Nakamura & Minamino, 2019). L'énergie est transférée au rotor qui entraîne la rotation du flagelle dans un sens horaire ou antihoraire, le changement de sens de rotation permet à la bactérie de changer la direction de son déplacement (Nakamura & Minamino, 2019). Le filament du flagelle est composé majoritairement de flagellines associées entre elles en hélice. Lors de la formation du filament, les flagellines sont exportées du cytoplasme à la surface à travers le canal central (Chaban et al., 2015). La grande variabilité de flagellines est utilisé pour le stéréotypage des souches de différentes espèces bactériennes sous le nom d'antigène H (Wang, Rothmund, Curd, & Reeves, 2003).

La capacité des bactéries à pouvoir se déplacer leur permet d'atteindre leur site d'infection, qu'il soit dans un milieu liquide, sur une surface ou à travers un gel (comme le mucus), mais ne se limite pas à cela (Rossez, Wolfson, Holmes, Gally, & Holden, 2015). La direction de déplacement de la bactérie propulsée par un flagelle est médiée par le chimiotactisme, ce qui permet aux bactéries de localiser et d'accéder précisément au meilleur site d'infection (Erhardt, 2016). Le flagelle permet aux bactéries d'échapper à ses prédateurs ou de sortir des cellules de son hôte, sa structure longiligne et hydrophile permet également à la bactérie d'adhérer à certaines

surfaces (Chaban et al., 2015). Certaines bactéries peuvent exprimer différentes flagellines, le changement de flagelline exprimé peut permettre d'échapper au système immunitaire de son hôte (Wang et al., 2003). Le fait que certaines bactéries aient leur flagelle couvert de leur membrane externe, comme *Vibrio cholerae*, leur permettrait d'échapper plus facilement au système immunitaire de leur hôte ou de certains phages (Chu et al., 2020). La production du ou des flagelles n'est pas constante, mais est régulée en fonction des conditions du milieu, comme la viscosité, la disponibilité en nutriment, la température, l'oxygénation, le pH ou le contact cellulaire (Diepold & Armitage, 2015). Le flagelle peut également jouer un rôle dans l'adhésion en permettant de la bactérie et dans la formation de biofilm (Belas, 2014). L'ensemble de ces régulations et propriétés des flagelles permettent aux bactéries pourvues de flagelle de mieux s'adapter à leur environnement. La virulence de nombreuses bactéries peut être fortement réduite par la perte d'élément composant le flagelle, en limitant leurs capacités d'adhésion, d'invasion, d'association, de colonisation ou de pénétration dans le milieu (Haiko & Westerlund-Wikstrom, 2013).

#### 7.2.4.1.2 Compositions et fonctions des pili

Le terme pilus (singulier de pili) regroupe divers organites protéiques filamenteux, les pili, les *fimbriae*, les curli et certains systèmes de sécrétions (**Figure 7.7**). Ces organelles ont des structures généralement plus petites que les flagelles, entre 0,3 et 20  $\mu\text{m}$  de long pour un diamètre de 4 à 12 nm (Fronzes, Remaut, & Waksman, 2008). Comme pour le flagelle, la modulation de l'expression des divers pili varie selon la viscosité, la disponibilité en nutriment, la température, l'oxygénation ou le pH du milieu, mais aussi en fonction du cycle cellulaire des contacts (Diepold & Armitage, 2015).

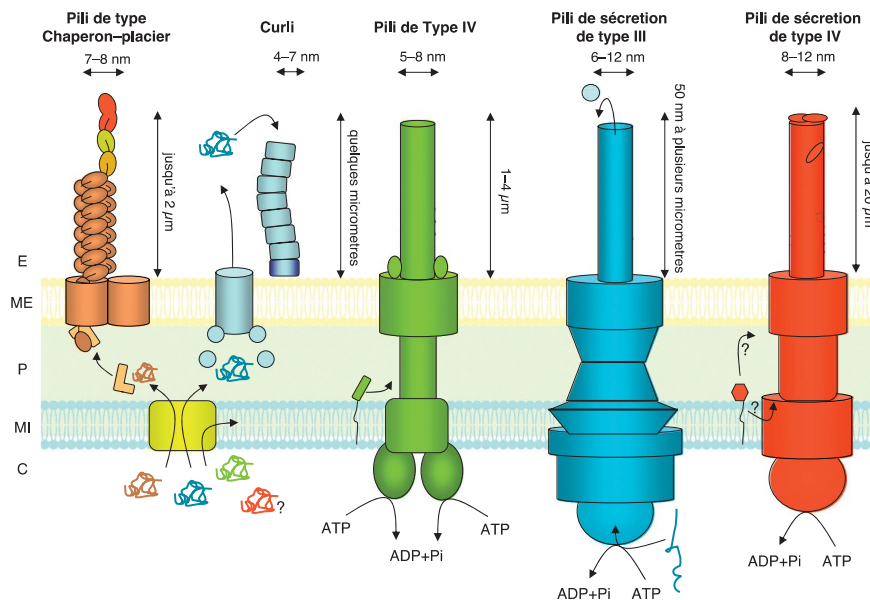


Figure 7.7. Différents types de pili

Schéma simplifié des structures et dimensions des différents types de pili. Le complexe formé par le pilus de type chaperon-placier (CP) est situé uniquement dans la membrane externe et le périplasma permettant l'assemblage du filament. Les protéines nécessaires à la construction du pilus sont transportées du cytoplasme au périplasma par le système sécrétion Sec (Chahales & Thanassi, 2015). Le filament est composé de centaines à plusieurs milliers de pilines associées linéairement (Busch & Waksman, 2012; Le Bouguenec & Servin, 2006). Comme les pili de type CP, le complexe formant les pili de types curli est situé dans la membrane externe et les éléments nécessaires à sa production sont transportés du cytoplasme au périplasma *via* le système de sécrétion Sec (Barnhart & Chapman, 2006). Les filaments des curli sont des fibres amyloïdes formées par l'association linéaire d'une centaine de sous-unités (Cherny et al., 2005). Les pili de type IV et les pili de sécrétion de type III et IV forment des complexes allant de la membrane externe à la membrane interne dont l'export de molécules dépend de l'ATP. Le filament du pilus de type IV est formé par un polymère de pilines transférés à partir du périplasma pouvant mesurer jusqu'à 4  $\mu\text{m}$  (Craig, Forest, & Maier, 2019). Le filament des pili de sécrétion de type 3 est un cylindre rigide ayant une structure hélicoïdale voisine à celle du flagelle et permet de sécréter des protéines (Fronzes et al., 2008). Le filament du pilus de sécrétion de type IV peut avoir divers aspects selon le groupe. Il forme un cylindre hélicoïdal de moins de 1  $\mu\text{m}$  à 20  $\mu\text{m}$  de long pour 8 à 12 nm de large permettant le transfert d'ADN et de protéines (Fronzes, Christie, & Waksman, 2009). E : milieu extracellulaire ; ME : membrane externe ; P : périplasma ; MI : membrane interne ; C : cytoplasme. Figure provenant de (Fronzes et al., 2008), permission accordé selon Creative Commons CC-BY-NC-ND, Copyright © 2008 European Molecular Biology Organization.



Au sein des différents types de pili, il existe des variantes classées en sous-catégories, elles ne seront pas traitées en détail, ici, seules les caractéristiques générales de chaque type de pili sont introduites **Figure 7.7**, leurs fonctions dans la pathogenèse et leurs impacts dans la virulence sont traités ci-dessous.

Le principal rôle des pili de type CP est l'adhésion aux cellules de l'hôte ou entre bactéries, la composition du filament varie grandement et l'affinité de son adhésion diffère selon la surface. L'adhésion du pilus de type CP peut également induire ou inhiber l'invasion d'un l'hôte et peut induire la formation de biofilm (Psonis & Thanassi, 2019). Certaines bactéries peuvent exprimer une multiplicité de pili, permettant aux bactéries de s'adapter à de multiples surfaces. Certaines molécules permettent d'éviter l'adhésion *in vivo* ou dans des cathéters, d'autres molécules permettent d'inhiber la synthèse de pili (pilicides) et il existe plusieurs vaccins efficaces utilisant les composants des pili (Psonis & Thanassi, 2019).

Les curli ont de multiples rôles dans la pathogenèse, ils peuvent être impliqués dans la formation de biofilms, à l'adhésion aux cellules de l'hôte et de multiples protéines de matrice extracellulaire ainsi qu'à la cellulose. Les curli semblent impliqués dans la survenue de septicémies et leurs interactions avec certaines protéines de l'hôte peuvent aussi faciliter la dissémination des bactéries exprimant des curli (Barnhart & Chapman, 2006; Kikuchi, Mizunoe, Takade, Naito, & Yoshida, 2005). L'affinité des curli varie selon les tissus, ainsi, certains curli favorisent l'adhésion à l'épithélium urinaire, d'autre à l'épithélium vaginal ou encore à l'épithélium du larynx ou de l'intestin (Barnhart & Chapman, 2006; Elpers & Hensel, 2020). La formation de curli peut être inhibée par certains peptides et induire une réduction de l'infection (Cherny et al., 2005).

Les pili des types IV (PT4) sont les pili les plus répandus dans le monde bactérien, il en existe une grande variété avec un large éventail de fonctions impliquées dans la virulence (Fronzes et al., 2008). Les PT4 peuvent permettre l'adhésion plus ou moins spécifique à différents types de surfaces. Ils permettent l'adhésion entre les bactéries, aux cellules eucaryotes ou à divers éléments de matrice extracellulaire ou encore sur des surfaces abiotiques (Giltner et al., 2006;

Pizarro-Cerda & Cossart, 2006). Certains PT4 permettent à la bactérie de se mouvoir avec un type de motilité particulier différent du flagelle (Floyd et al., 2020; Lighthart, Belzer, de Vos, & Tytgat, 2020). D'autres peuvent permettre l'acquisition d'ADN extracellulaire et sécréter des protéines ou encore participer activement à la formation de biofilm (Floyd et al., 2020; Koebnik, 2001; Teschler et al., 2015). Les PT4 peuvent servir de point d'entrée de divers bactériophages (Pizarro-Cerda & Cossart, 2006). Les PT4 ont une grande importance dans la virulence que ce soit en facilitant l'invasion, la colonisation l'agrégation, le processus transfert horizontal de gènes, la sécrétion de facteurs de virulence (Giltner, Nguyen, & Burrows, 2012; Kirn, Bose, & Taylor, 2003; Lighthart et al., 2020; Seper et al., 2011).

Les pili de sécrétion de type III (PST3), ou système de sécrétion de type 3 (SST3), sont impliqués dans l'injection de protéines à l'intérieur de bactéries ou de cellules eucaryotes voisines (Fronzes et al., 2008). De nombreuses bactéries pathogènes utilisent le PST3 pour sécréter une myriade de diverses toxines et facteur de virulences permettant de faciliter l'adhésion, l'invasion, la colonisation, la dispersion, la persistance bactérienne ou encore la cytotoxicité (Coburn, Sekirov, & Finlay, 2007). Diverses approches thérapeutiques ciblant le PST3 ont été mises au point ou sont étudiées. Plusieurs vaccins, anticorps ou petites molécules efficaces ont été découverts ou mis au point (Fasciano, Shaban, & Mecasas, 2019)

La fonction principale des pili de sécrétion de type IV (PST4), également appelées système de sécrétion de type 4 (SST4), est d'établir des contacts spécifiques avec les bactéries voisines et d'injecter du matériel génétique, ils sont nécessaires dans le phénomène de conjugaison (voir 1.2.2.2 Résistances aux antibiotiques, détails section 7.2.5.5 Acquisition de résistance) (T. R. D. Costa et al., 2016). Les pili sexuels F font partie des pili de sécrétion de type IV, le filament de pili F est également appelé antigène F (Grossman, Frost, & Silverman, 1990). Les PST4 permettent donc le transfert horizontal de gènes, mais pas uniquement, ils permettent l'injection de protéines à l'intérieur de cellules procaryotes ou eucaryotes voisines ou leurs sécrétions dans le milieu ou encore injecter de l'ADN dans des cellules eucaryotes (T. R. Costa et al., 2015; Souza et al., 2015). Ces protéines peuvent avoir des fonctions dans la transformation génétique, elles

peuvent être toxiques pour la cellule réceptrice et peuvent jouer un rôle dans la vie intracellulaire de la bactérie dans une cellule hôte (T. R. Costa et al., 2015; T. R. D. Costa et al., 2016; Yeo, Yuan, Beck, Baron, & Waksman, 2003). Les PST4 sont donc des éléments importants dans le transfert horizontal de gènes, mais également dans la virulence (Laverde et al., 2017). Certaines études suggèrent la possibilité d'utiliser un élément du T4SS pour le développement d'un vaccin contre *Pseudomonas aeruginosa* ou d'autres bactéries (Giltner et al., 2012; Laverde et al., 2017).

## 7.2.5 Mécanismes et origines des résistances aux antibiotiques

### 7.2.5.1 Absence d'affinité de l'antibiotique pour sa cible

L'absence d'affinité d'un antibiotique pour sa cible peut venir trivialement du fait que la bactérie ne possède tout simplement pas le mécanisme ou la cible sur lequel l'antibiotique agit. Par exemple, le targocil (**Figure 1.19**) est un inhibiteur de la voie de synthèse des acides téichoïques de surface, les acides téichoïques n'entrant pas dans la composition de l'enveloppe des bactéries à Gram négatif ou les CMN l'antibiotique n'a donc aucun effet sur ces dernières (Campbell et al., 2012). Dans ce cas on pourra également la définir comme une résistance intrinsèque (7.2.5.7 Résistance intrinsèque).

L'absence d'affinité d'un antibiotique pour sa cible peut être due à l'existence d'une voie alternative à celle ciblée par l'antibiotique. Par exemple, certaines souches de la bactérie à Gram positif *Enterococcus faecium* ont la capacité de pouvoir assembler les sous-unités de leur paroi via des liaisons peptidiques par deux voies différentes, leur permettant de résister à l'ampicilline. L'ampicilline est un antibiotique de la classe des  $\beta$ -lactames (**Figure 1.19**) qui inhibe la fonction des D,D-transpeptidase dont le rôle est de créer des liens peptidique entre les sous-unités de la paroi (**Figure 7.8**). En présence d'ampicilline la souche M512 de *Enterococcus faecium* peut induire l'expression de deux enzymes qui ne sont pas sensibles à l'ampicilline, la D,D-carboxypeptidase et la L,D-tranpeptidase. L'expression de ces enzymes permettant d'associer les

sous-unités de sa paroi et de maintenir son intégrité (Mainardi et al., 2005). Vous pourrez trouver plus d'information sur la paroi à la section 1.1.5.1.

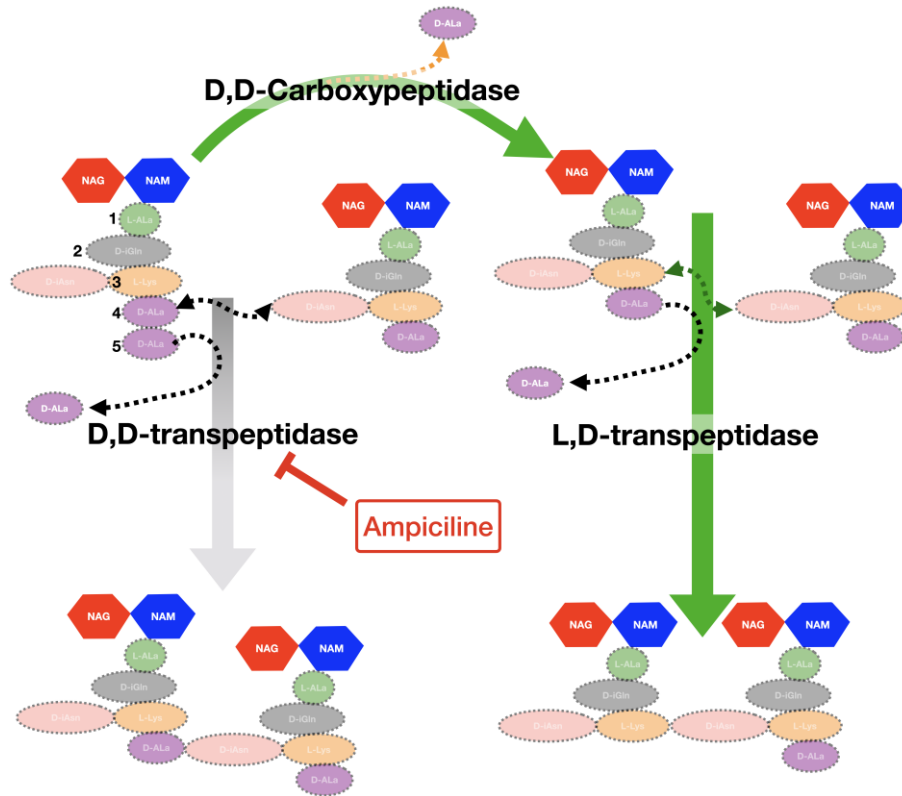


Figure 7.8. Exemple de résistance par option de voie alternative : Ampicilline et L,D-transpeptidase.

Représentation schématique de la voie de résistance à l'ampicilline chez la souche M512 de *Enterococcus faecium*. La D,D-transpeptidase (flèche grise) catalyse la réaction permettant d'associer deux sous-unités de la paroi *via* un lien peptidique du 4<sup>e</sup> acide aminé d'une sous-unité au D-isoasparagine (D-iAsn) de la sous-unité voisine (double flèche pointillée noire). L'ampicilline inhibe spécifiquement la fonction de cette enzyme. La souche M512 peut induire l'expression d'une D,D-carboxypeptidase et d'une L,D-transpeptidase (flèches vertes). La première enzyme permettant de retirer le cinquième acide aminé de la sous-unité (flèche pointillée orange) et la dernière enzyme d'associer le 3<sup>e</sup> acide aminé d'une sous-unité au D-iAsn d'une sous-unité voisine (double flèche pointillée verte). Les transpeptidase clivent le dernier nucléotide de la sous-unité (flèches pointillées noires). NAG, acide N-acétylglucosamine ; NAM, acide N-acétylmuramique ; L-Ala, L-alanine ; D-Gln, D-glutamine ; L-Lys, L-lysine ; D-Ala, D-alanine (Mainardi et al., 2005)

Finalement, l'absence d'affinité de l'antibiotique pour sa cible peut provenir du fait que la cible chez la bactérie a subi des modifications par rapport à la cible initiale. L'exemple choisi **Figure 7.9** est celui de la résistance à la polymyxine B (PmB) chez certaines souches de la bactérie à Gram négatif *Vibrio cholerae*. En présence de PmB la bactérie active une voie permettant d'ajouter des groupements glycine sur les futures molécules de lipopolysaccharides (LPS). Cette modification du LPS induit une répulsion entre l'antibiotique, la PmB, et sa cible, le LPS (Herrera et al., 2014).

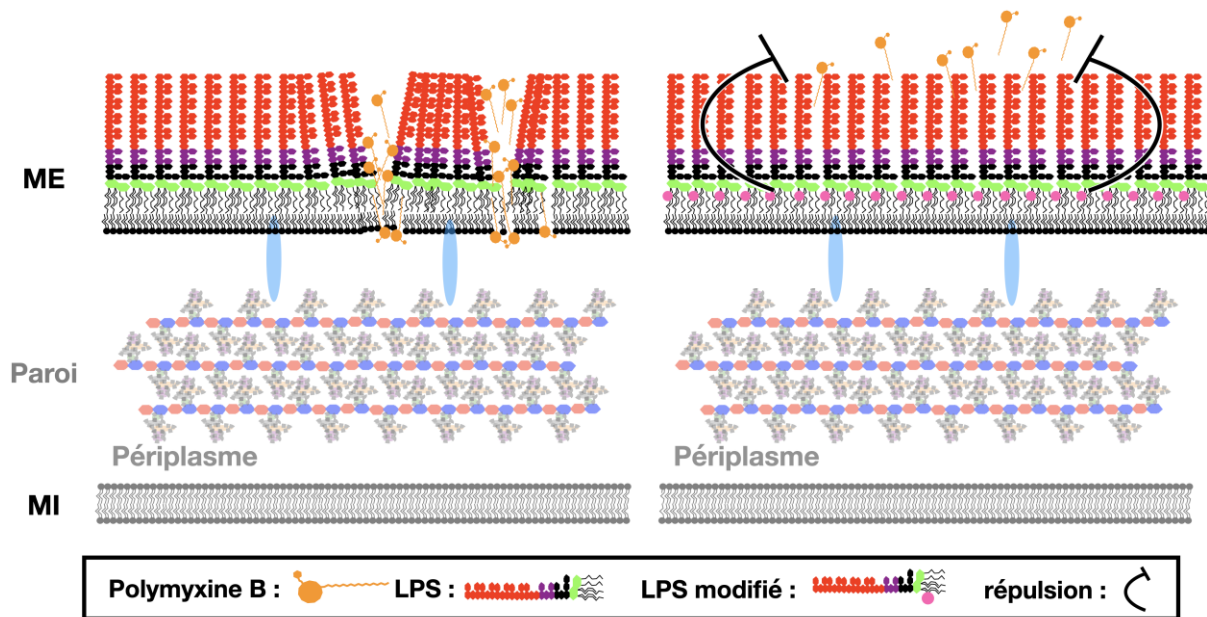


Figure 7.9. Exemple de résistance par modification de la cible : polymyxine B et lipopolysaccharides

Schéma simplifié du mécanisme de résistance à la polymyxine B par la modification de sa cible le lipopolysaccharide (LPS). La polymyxine B (PmB) est un antibiotique chargé positivement perturbant la membrane externe (ME) des bactéries à Gram négatif. La PmB *via* des interactions faible avec les charges négatives portées par LPS (à gauche). Certaines souches de *Vibrio cholerae* El Tor *via* un système à deux composant VprA-VprB peut induire la modification du LPS *via* le système AlmEFG, impliqué dans l'ajout de groupements glycine ou diglycine (à droite). La charge du LPS étant altérée, le LPS répulse la PmB. Il existe d'autres types de modifications du LPS permettant la résistance à la PmB chez d'autres bactéries à Gram négatif. (Herrera et al., 2014). Un autre mécanisme de résistance à la PmB a été indentifié plus récemment chez *V. cholerae* O1 El tor impliquant l'ajout de groupement phosphoéthanolamine par l'enzyme EptA et également régulé par VprA-VprB (Herrera, Henderson, Crofts, & Trent, 2017). L'acylation du LPS par l'enzyme

MsbB est également un mécanisme présent chez certaines souches de *V. cholerae* O1 El tor permettant d'induire une résistance à la PmB (Matson et al., 2010).

#### 7.2.5.2 Non activation ou détérioration de l'antibiotique

Certains antibiotiques sont administrés sous forme de pro-médicaments, ces molécules ont besoin d'être modifiées par la bactérie afin de devenir actives.

Le métronidazole est un antibiotique bactéricide (à forte dose) induisant des dommages à l'ADN (voir **Figure 1.19**). Cet antibiotique n'est pas actif en tant que tel, il doit subir une modification dans le cytoplasme de la bactérie afin d'être activé. La bactérie à Gram négatif *Bacteroides fragilis* peut acquérir une résistance au métronidazole *via* la perte d'un transporteur de fer, l'absence de ce transporteur induirait une réduction de fer dans la cellule qui réduirait l'activation du métronidazole (**Figure 7.11**) (Dhand & Snyderman, 2009; Dingsdag & Hunter, 2018; Veeranagouda et al., 2014).

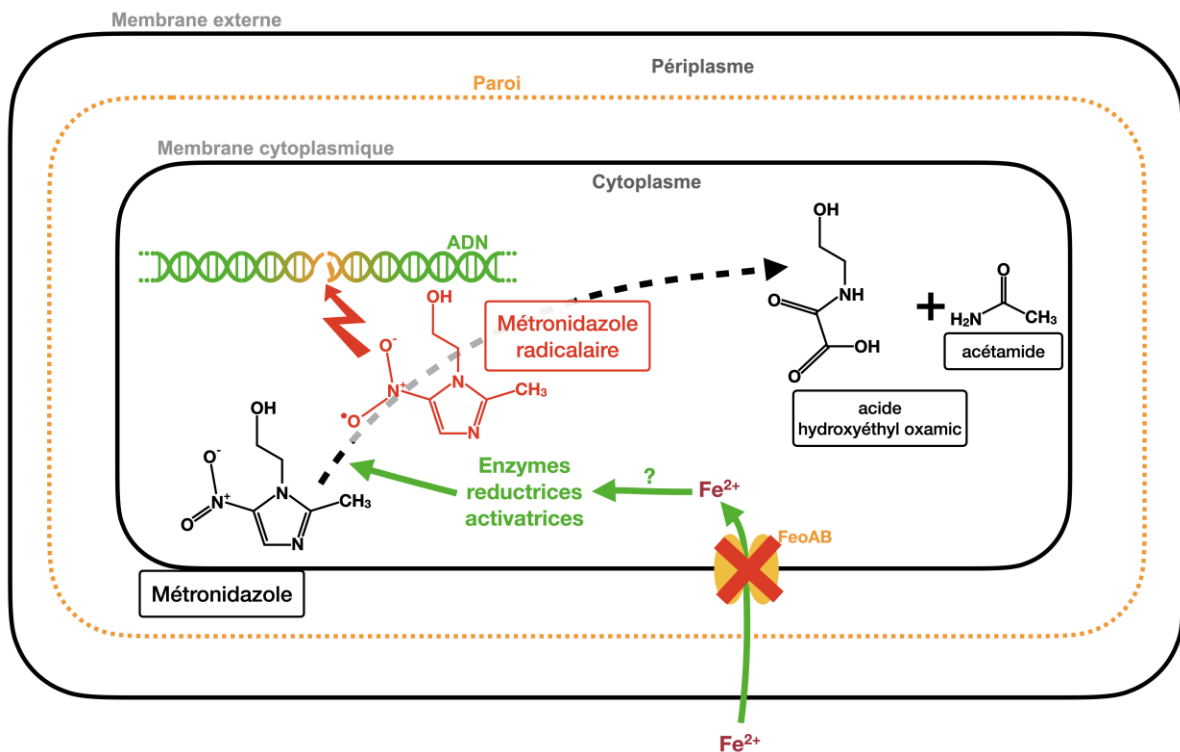


Figure 7.10. Exemple de mécanisme de résistance à un antibiotique par absence d'activation : le métronidazole

Schéma simplifié du mode d'activation du métronidazole de la résistance au métronidazole chez *Bacteroides fragilis*. Le métronidazole doit subir une modification afin d'être activé (flèche pointillée noire). Ces modifications sont effectuées par des enzymes réductrices (flèche verte) aboutissant à la formation de l'acide hydroxyéthyl oxamic et l'acétamide. Pendant ces transformations le métronidazole radicalaire est formé, il est extrêmement réactif et peut engendrer entre autres des dommages irréparables à l'ADN (éclair rouge). Chez *Bacteroides fragilis* la délétion des gènes codants pour le transporteur de fer FeoAB induirait une réduction ou une absence d'activation du métronidazole. Le mécanisme exact entraînant la diminution en fer et la réduction de l'activation n'est pas encore connue (Dhand & Snyderman, 2009; Dingsdag & Hunter, 2018; Veeranagouda et al., 2014).

La résistance à un antibiotique peut également provenir de la dégradation de l'antibiotique par la bactérie (**Figure 7.11**). L'aztréonam est un antibiotique de la famille des  $\beta$ -lactames (voir **Figure 1.19**) qui inhibe une enzyme responsable de l'homéostasie la paroi. Certaines souches de la bactérie à Gram négatif *Escherichia coli* (et bien d'autres) peuvent produire des enzymes appelées

$\beta$ -lactamase, dont la fonction est de dégrader les  $\beta$ -lactames par hydrolyse, comme par exemple l'aztréoname (Papanicolaou, Medeiros, & Jacoby, 1990).

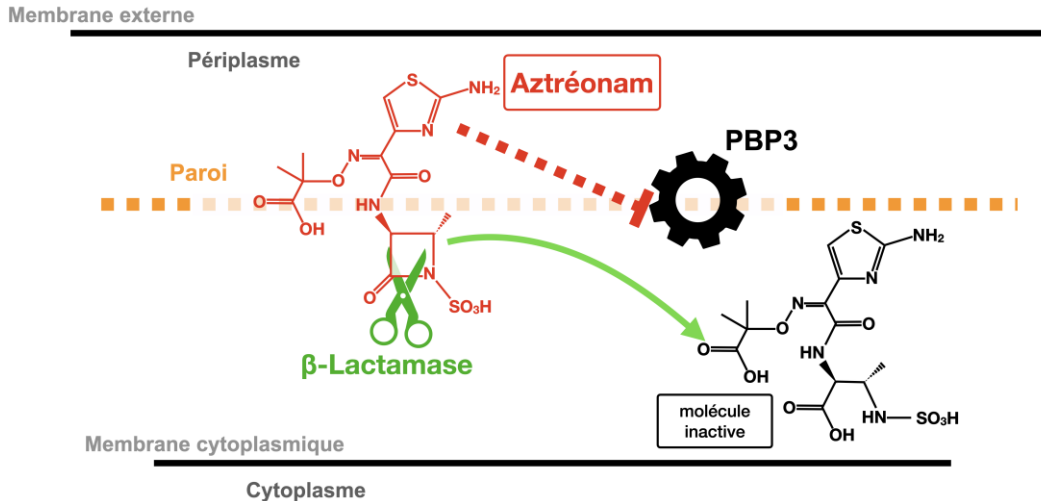


Figure 7.11. Résistance par dégradation de l'antibiotique : les  $\beta$ -Lactamases

Schéma simplifié de l'inactivation de l'aztréoname par une  $\beta$ -lactamase. L'aztréoname est un antibiotique de la famille des  $\beta$ -lactames (voir Figure 1.19). Il inhibe la *penicillin binding protein 3* (PBP3) qui est essentielle au remodelage de la paroi chez les bactéries à Gram négatif. Des souches de *Escherichia coli* portant un plasmide, TEM-6, dont un gène code pour une  $\beta$ -lactamase (représentée par une paire de ciseaux verte). Cette enzyme hydrolyse spécifiquement certains  $\beta$ -lactames comme l'aztréoname, inactivant ainsi l'antibiotique (flèche verte) (Botta & Park, 1981; Brogden & Heel, 1986; Delcour, 2009; Papanicolaou et al., 1990; Rossolini, Arena, & Giani, 2017).

### 7.2.5.3 Résistance par relargage de l'antibiotique

La résistance aux antibiotiques peut impliquer le relargage de ces molécules par les bactéries. Deux mécanismes distincts pour le relargage des antibiotiques sont décrits et impliquent la production de vésicules membranaires et l'efflux.

Les bactéries à Gram négatif peuvent expulser des portions de membranes externes contenant divers éléments de la bactérie et formant des sphères dans le milieu appelées vésicules membranaires (VM) (Zingl et al., 2020) (voir **Figure 7.12A**). Comme vu précédemment en **Figure 1.19** et **Figure 7.9** la polymyxine B (PmB) est un antibiotique déstabilisant la membrane externe



des bactéries à Gram négatif. Chez certaines bactéries à Gram négatif la PmB peut induire la production massive de VM permettant de résister à la PmB en l'expulsant de la membrane et l'interceptant dans le milieu extracellulaire (voir **Figure 7.12A**). Ce mécanisme peut même induire une résistance croisée avec d'autres antimicrobiens affectant la membrane externe (Delcour, 2009; Duperthuy et al., 2013; Manning & Kuehn, 2011). La vésiculation permet donc de limiter l'accès de l'antibiotique à la bactérie et d'en limiter la pénétration.

Le mécanisme de résistance lié à l'efflux permet quant à lui d'expulser l'antibiotique après que celui-ci a pénétré à l'intérieur de la bactérie. En effet, les bactéries peuvent induire l'expression ou surexpression des pompes à efflux, des complexes protéiques permettant d'éjecter activement des molécules du cytoplasme ou du périplasme vers le milieu extracellulaire (voir 1.1.7.1 Pompes à efflux). Les pompes à efflux peuvent refouler des antibiotiques de façon très efficace, conférant une grande résistance à la bactérie à un et souvent plusieurs antibiotiques (voir exemple chez *Yersinia pestis* (**Figure 7.12B**)). Il existe de nombreux complexes de pompes à efflux possédant des fonctionnements différents et des affinités variables selon les molécules (E. H. Kim, Nies, McEvoy, & Rensing, 2011; Lister, Raftery, Meccas, & Levy, 2012; Munita & Arias, 2016; Okusu, Ma, & Nikaido, 1996; Tikhonova, Yamada, & Zgurskaya, 2011).

#### 7.2.5.4 L'imperméabilité de la bactérie à l'antibiotique

Bien que cela puisse paraître trivial, il est important de rappeler que l'antibiotique doit pouvoir entrer en contact avec sa cible pour exercer son activité bactéricide ou bactériostatique. Divers éléments peuvent empêcher la rencontre de l'antibiotique et de sa cible pouvant conférer aux bactéries une résistance.

Certains antibiotiques ne peuvent pas atteindre leurs cibles, car ils sont incapables de passer la membrane externe des bactéries à Gram négatif ce qui en tant que tel confère à ces bactéries une résistance à de nombreuses molécules. C'est le cas, par exemple, de la vancomycine qui ne peut pas atteindre sa cible dans le périplasme de *E. coli* (**voir Figure 7.12C**) (Delcour, 2009; Pages,

James, & Winterhalter, 2008; Sutterlin, Zhang, & Silhavy, 2014; Zgurskaya, Lopez, & Gnanakaran, 2015).

Certains antibiotiques accèdent à l'intérieur des bactéries à Gram négatif par l'intermédiaire des porines, des complexes protéiques de la membrane externe permettant à de petites molécules d'entrer dans le périplasme (rappel section 1.1.4.3 Porines). Il a été démontré que des bactéries peuvent réduire ou abolir l'expression de leurs porines, ou posséder certaines versions de porines ne laissant pas ou peu passer certains antibiotiques, voir exemple **Figure 7.12D** (Delcour, 2009; Pages et al., 2008).

La plupart des bactéries peuvent former des biofilms, une collectivité de bactéries d'une ou plusieurs espèces, vivant englobées dans une matrice extracellulaire (1.1.2 Biofilm). Les bactéries peuvent sécréter les éléments de cette matrice dont les principaux composants sont généralement des polysaccharides et des protéines. La matrice du biofilm est généralement visqueuse ce qui permet de réduire la diffusion des molécules et induire une résistance aux antibiotiques jusqu'à 1000 fois plus importante que lorsqu'elles sont sous forme planctoniques (voir exemple **Figure 7.12E**) (Stewart, 2002). De plus, il a été démontré que certains antibiotiques peuvent induire la formation de biofilms comme, par exemple, la tobramycine ou le chloramphénicol chez *E. coli* ou en (Kaplan, 2011). La formation de la capsule peut également être induite par les antibiotiques (rappel section 1.1.3 Capsules et couche de surface cristalline, détails en annexe section 7.2.2 Capsules) et conférer une résistance à certains antibiotiques en empêchant leurs entrée dans la bactérie (Campos et al., 2004; Geisinger & Isberg, 2015; Sabnis, Ledger, Pader, & Edwards, 2018). Finalement, en plus de participer au relargage des antimicrobiens, les VM peuvent séquestrer ces molécules avant que celles-ci n'atteignent la bactérie (Duperthuy 2013).

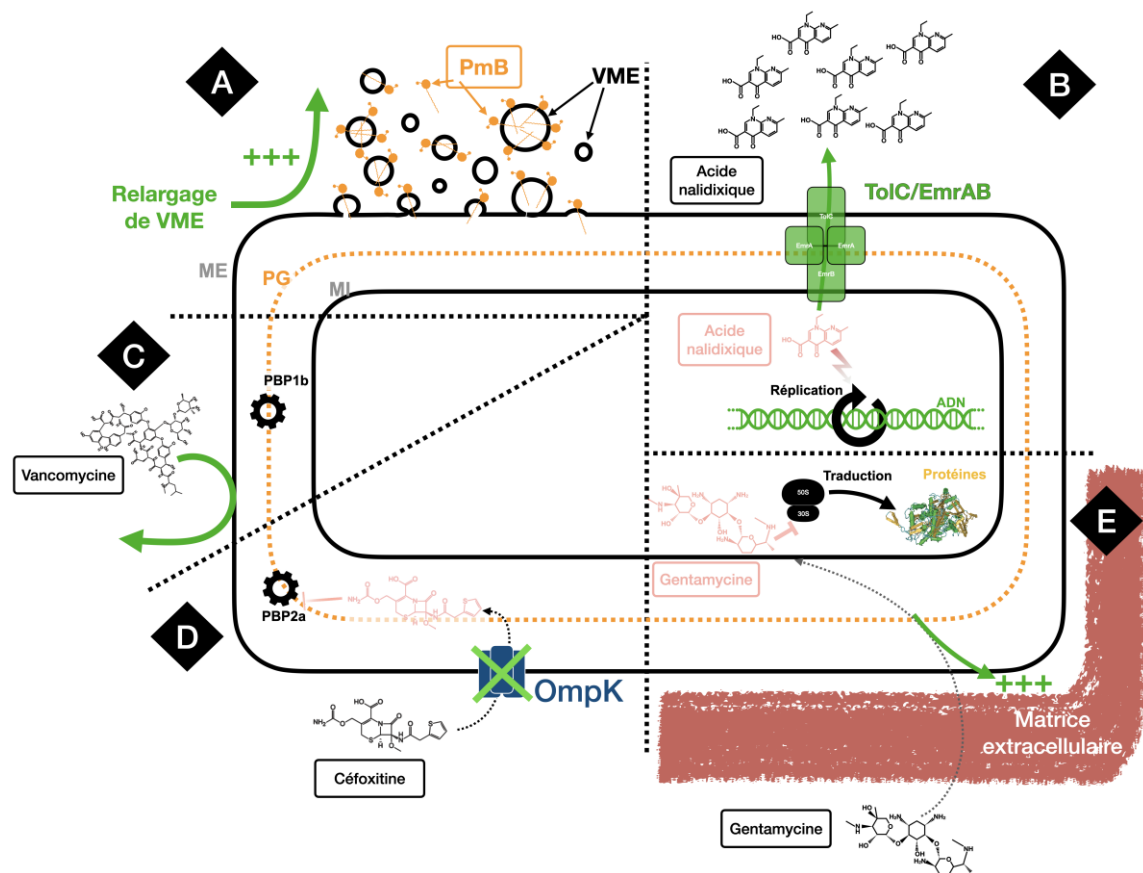


Figure 7.12. Exemples de résistances par reflux ou imperméabilité

Schéma simplifié de résistances à divers antibiotiques par relargage et par imperméabilité chez les bactéries à Gram négatif. A-B) résistance par relargage, C-D) résistance par imperméabilité. A) Relargage d'antibiotique par production de vésicules de membrane externe (VME), exemple de la polymyxine B (PmB). La présence de polymyxine B (PmB) chez *E. coli* peut induire la production de vésicules de membrane externe (VME) représentées par la flèche verte (+++). La surproduction de VME induit la résistance à la PmB par reflux et captation de la molécule dans le milieu. Chez *V. cholerae*, contrairement à *E. coli*, la quantité de PAM n'est pas modifiée. Le gain de résistance se fait par l'augmentation de la taille des VME et le recrutement de certaines protéines à la membrane se retrouvant dans les VME. (Delcour, 2009; Duperthuy et al., 2013). B) Schéma du relargage de l'acide nalidixique par pompe à efflux TolC-EmrAB chez *Yersinia pestis*. L'acide nalidixique est un antibiotique qui entrave la réplication de l'ADN (voir Figure 1.19). La pompe à efflux TolC-EmrAB chez *Yersinia pestis* induit une résistance à l'acide nalidixique, l'action de l'antibiotique est limitée par sa faible concentration dans le cytoplasme. La suppression de gènes codants pour la pompe à efflux réduit grandement cette résistance (non représenté) (Lister et al., 2012). C) Schéma montrant la résistance de *Escherichia coli* à la vancomycine. La vancomycine fait partie de la classe des  $\beta$ -lactames, inhibant l'enzyme nécessaire à l'homeostasie de la paroi

PBP1B. La membrane externe de *E. coli* est imperméable (flèche verte) à la vancomycine qui ne peut pas atteindre sa cible située dans le périplasme (représenté par un engrenage) (Sinha Roy et al., 2001; Sutterlin et al., 2014). D) Schéma simplifié de résistance aux antibiotiques par absence de porine. Il a été démontré chez certaines souches cliniques de *K. pneumoniae* que la résistance à la céfoxitine ( $\beta$ -lactame, voir Figure 1.19) était due à l'absence d'expression de la porine OmpK. Chez ces souches cliniques, l'entrée de l'antibiotique dans la bactérie était largement corrompue (Hernandez-Alles et al., 1999). E) Schéma simplifié de la résistance à la gentamicine par la formation de biofilm chez *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*). La gentamicine est un antibiotique de la classe des aminoglycosides affectant la synthèse des protéines ribosomales (voir Figure 1.19). La diffusion de la gentamicine à travers la matrice du biofilm est extrêmement faible (flèches pointillées noires). La quantité de gentamicine pénétrant dans la bactérie est donc faible et son effet sur la bactérie est très limité. (Shigeta et al., 1997; Stewart, 2002; Taylor, Yeung, & Hancock, 2014). Il a été démontré que la gentamicine peut induire la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* (représenté par +++) (Hoffman et al., 2005).

#### 7.2.5.5 Acquisition de résistance

Que ce soit par addition, délétion, transition, transversion, transposition (**Figure 7.11**) ou duplication, ces mutations spontanées peuvent aboutir à une résistance à un antibiotique (Sun, Berg, Roth, & Andersson, 2009; van Hoek et al., 2011). La modification du génome peut ainsi modifier des gènes ou moduler leur expression induisant les mécanismes de résistances évoqués aux sections précédentes (sections 7.2.5.1 à 7.2.5.4).

Qui plus est, des gènes conférant des résistances aux antibiotiques peuvent être transférés entre les bactéries par ce qui est appelé, en opposition aux transferts verticaux de cellule mère à cellule fille, le transfert horizontal de gènes (THG) (Munita & Arias, 2016). Ils peuvent provenir du phénomène de transformation avec l'acquisition d'ADN provenant du milieu extracellulaire (Hannan et al., 2010), du phénomène de conjugaison (Baharoglu, Bikard, & Mazel, 2010) ou alors par transduction *via* les bactériophages (phages) (Colavecchio, Cadieux, Lo, & Goodridge, 2017).

#### 7.2.5.6 Résistances adaptatives

La résistance adaptative peut être définie comme la capacité d'une bactérie à résister à un antibiotique en modulant l'expression de certains gènes en réponse directe ou indirecte à la

présence de cette molécule (Arzanlou, Chai, & Venter, 2017). À concentration sous-inhibitrice, les antibiotiques peuvent agir comme molécules signales induisant la modulation de l'expression de certains gènes (Sengupta, Chattopadhyay, & Grossart, 2013). Les bactéries peuvent développer une résistance aux antibiotiques, entre autres, en induisant l'activation de systèmes de réponse stress (C. K. Kim, Milheirico, de Lencastre, & Tomasz, 2017), en augmentant l'expression de pompes à efflux ou réduisant l'expression de porine (**Figure 7.12B et D**) (Fernandez & Hancock, 2012), en induisant la formation de biofilm (voir exemple **Figure 7.12E**) (Hoffman et al., 2005; Rao, Ghei, & Chambers, 2016). Certains antibiotiques peuvent même induire une résistance croisée avec d'autres antibiotiques (**Figure 7.12A**) (Delcour, 2009; Duperthuy et al., 2013).

#### 7.2.5.7 Résistance intrinsèque

Finalement, la résistance à un antibiotique peut être inhérente à la composition de la bactérie. Ce phénomène est particulièrement évident en comparant les bactéries à Gram positif et négatif. La présence d'une membrane externe rend ces dernières résistantes à de nombreux antibiotiques, car ils ne peuvent pas la traverser (Delcour, 2009; Murray, Kwon, Marcotte, & Whiteley, 2015; Zgurskaya et al., 2015). La présence de cette membrane supplémentaire réduit énormément voir abolit l'import d'antibiotique hydrophobe, la diffusion de ces molécules à travers la membrane étant extrêmement faible (Delcour, 2009). Les molécules hydrophiles peuvent passer à travers les porines à condition de ne pas être trop grosses (< 600 Da), ce qui n'est pas le cas de la vancomycine par exemple (**Figure 7.12C**) (Vergalli et al., 2020). De plus, certaines bactéries à Gram négatif présentent une expression de pompe à efflux constitutive (Zgurskaya et al., 2015).

Le fait qu'une bactérie ne possède pas la cible à un antibiotique peut également être qualifié de résistance intrinsèque (voir section 7.2.5.1 Absence d'affinité de l'antibiotique pour sa cible).

## 7.2.6 Classement des plus grandes menaces bactériennes et organes cibles

Les menaces bactériennes prioritaires définies par l'OMS sont regroupées dans trois groupes en fonction :

- de la prévalence des résistances ;
- du coût pour les systèmes de santé et les populations ;
- de la tendance des résistances sur dix ans ;
- de la transmissibilité ;
- de la possibilité de prévenir les infections ;
- de la disponibilité et de l'efficacité de traitement actuel et
- des traitements actuellement en préparation.

(World Health Organization, 2017).

En 2017 l'Organisation mondiale de la santé a publié une liste de bactéries pathogènes prioritaires pour la recherche de nouveaux antimicrobiens, avec des rangs de priorités différents : critique, haute et moyenne. Toutes les bactéries listées dans la priorité critique et les 2/3 de celles de priorité élevée sont des bactéries Gram-négatives, dénotant de l'importance d'étudier la résistance aux antimicrobiens de ce groupe de bactéries. Les menaces de plus haute priorité (priorité critique) appartiennent aux espèces *Acinetobacter baumannii* et *Pseudomonas aeruginosa* notamment à cause de l'apparition de résistances aux carbapénèmes ( $\beta$ -lactame). On y retrouve également les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* (ou entérobactéries) résistantes à la fois aux carbapénèmes et à certaines céphalosporines ( $\beta$ -lactame). Les entérobactéries incluses dans ce groupe sont *E. coli* et des espèces des genres *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* et *Morganella* (World Health Organization, 2017).

Le deuxième groupe de "haute priorité" sont les bactéries à Gram positif *Enterococcus faecium* et *Staphylococcus aureus* pour leur résistance à la vancomycine ( $\beta$ -lactame) et pour la tolérance à la vancomycine et la résistance à la méthicilline du dernier. Ce groupe inclue également les bactéries à Gram négatif *Helicobacter pylori* (résistantes à la clarithromycine, un macrolide), *Neisseria*

*gonorrhoeae* (résistantes à la fluoroquinolone une quinolone et aux céphalosporines) et les bactéries du genre *Salmonella* et *Campylobacter* pour leurs résistances aux fluoroquinolones.

Le troisième groupe de priorité moyenne comprend la bactérie à Gram positif *Streptococcus pneumoniae* (résistance à la pénicilline ( $\beta$ -lactame) et les bactéries à Gram négatif *Haemophilus influenzae* et celles appartenant au genre *Shigella*, respectivement pour leurs résistances à l'ampicilline et aux fluoroquinolones (World Health Organization, 2017). Les informations sur ces bactéries, incluant les informations sur le type d'enveloppe, la résistance et les organes les plus souvent affectés ont été reportés dans le **Tableau 7.1** et représentées **Figure 7.13**.

Tableau 7.1. Résistances aux antibiotiques, les principales menaces bactériennes

|                                    | Genre ou espèce                | Type d'enveloppe | Résistances*                    | Organe touché†  | Sources                               |
|------------------------------------|--------------------------------|------------------|---------------------------------|---|---------------------------------------|
| Groupe 1 :<br>Priorité<br>Critique | <i>Acinetobacter baumannii</i> | Diderme          | Carbapénèmes                    | Poumons, voies urinaires, peau, système sanguin           | (Harding, Hennon, & Feldman, 2018)    |
|                                    | <i>Pseudomonas aeruginosa</i>  | Diderme          | Carbapénèmes                    | Poumons, voies urinaires, peau, système sanguin, intestin | (Gellatly & Hancock, 2013)            |
|                                    | <i>Klebsiella pneumonia</i>    | Diderme          | Carbapénèmes et céphalosporines | Poumons, voies urinaire, peau, système sanguin            | (Li, Zhao, Liu, Chen, & Zhou, 2014)   |
|                                    | <i>Escherichia coli</i>        | Diderme          |                                 | Intestin, voies urinaires                                 | (Kaper, Nataro, & Mobley, 2004)       |
|                                    | <i>Enterobacter spp.</i>       | Diderme          |                                 | Cerveau, poumons peau, voies urinaires                    | (Davin-Regli, Lavigne, & Pages, 2019) |
|                                    | <i>Serratia spp.</i>           | Diderme          |                                 | Système sanguin, poumons, cœur, yeux                      | (Mahlen, 2011)                        |

|                                |                                 |           |                                 |  |   |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------|---------------------------------|--|---|
|                                | <i>Proteus spp.</i>             | Diderme   |                                 | Voies urinaires, système sanguin   | (Armbruster, Mobley, & Pearson, 2018)                     |
|                                | <i>Providencia spp.</i>         | Diderme   |                                 | Voies urinaires, système sanguin   | (Shah, Odoyo, & Ichinose, 2019)                           |
|                                | <i>Morganella spp.</i>          | Diderme   |                                 | Voies urinaires, peau, foie  | (Liu, Zhu, Hu, & Rao, 2016)                               |
| Groupe 2 :<br>Haute Priorité   | <i>Enterococcus faecium</i>     | Monoderme | Vancomycine                     | Voies urinaires, peau  | (Gao, Howden, & Stinear, 2018)                            |
|                                | <i>Staphylococcus aureus</i>    | Monoderme | Méthicilline vancomycine        | Intestin, peau, méninges, cœur, poumon, système sanguin, os, articulations | (Lowy, 1998)  |
|                                | <i>Helicobacter pylori</i>      | Diderme   | Clarithromycine                 | Estomac  | (Camilo, Sugiyama, & Touati, 2017)                        |
|                                | <i>Campylobacter spp.</i>       | Diderme   | Fluoroquinolones                | Intestin   | (Fitzgerald, 2015)  |
|                                | <i>Salmonella spp.</i>          | Diderme   | Fluoroquinolones                | Intestin, système sanguin, reins, foie, vésicule biliaire, cerveau, cœur   | (Kurtz, Goggins, & McLachlan, 2017)                       |
|                                | <i>Neisseria gonorrhoeae</i>    | Diderme   | Céphalosporine Fluoroquinolones | Organes génitaux   | (Quillin & Seifert, 2018)                                 |
| Groupe 3 :<br>Priorité moyenne | <i>Streptococcus pneumoniae</i> | Monoderme | Pénicilline                     | Poumons, oreilles, méninges, système sanguin                               | (Engholm, Kilian, Goodsell, Andersen, & Kjaergaard, 2017) |
|                                | <i>Haemophilus influenzae</i>   | Diderme   | Ampicilline                     | Méninges, sinus, poumons, oreilles, larynx                                 | (Strausbaugh, 1997)                                       |
|                                | <i>Shigella spp.</i>            | Diderme   | Fluoroquinolones                | Intestin   | (Schnupf & Sansonetti, 2019)                              |



\* : les résistances présentant le plus grand danger trouvé chez les bactéries correspondantes selon l'OMS (World Health Organization, 2014, 2017). † : Peut varier selon la souche ou selon l'espèce si le nom de l'espèce n'est pas mentionné.

Alors que *Vibrio cholerae* peut causer jusqu'à 4 millions d'infections et 143 000 décès par an (Global Task Force on Cholera Control, 2017) et *Mycobacterium tuberculosis* 10 millions d'infections et 1,4 million de décès (Global Tuberculosis Programme, 2020) et que certaines souches de ces deux bactéries puissent être ultrarésistantes ou panrésistantes (Das, 2018; Hameed et al., 2018), on peut remarquer que les agents étiologiques du choléra et de la tuberculose ne sont pas inclus dans ces listes de priorité (**Tableau 7.1**). Ceci est dû au fait que la lutte contre le choléra et la tuberculose font chacun l'objet de plans d'actions spécifiques (Global Task Force on Cholera Control, 2017; Global Tuberculosis Programme, 2020).

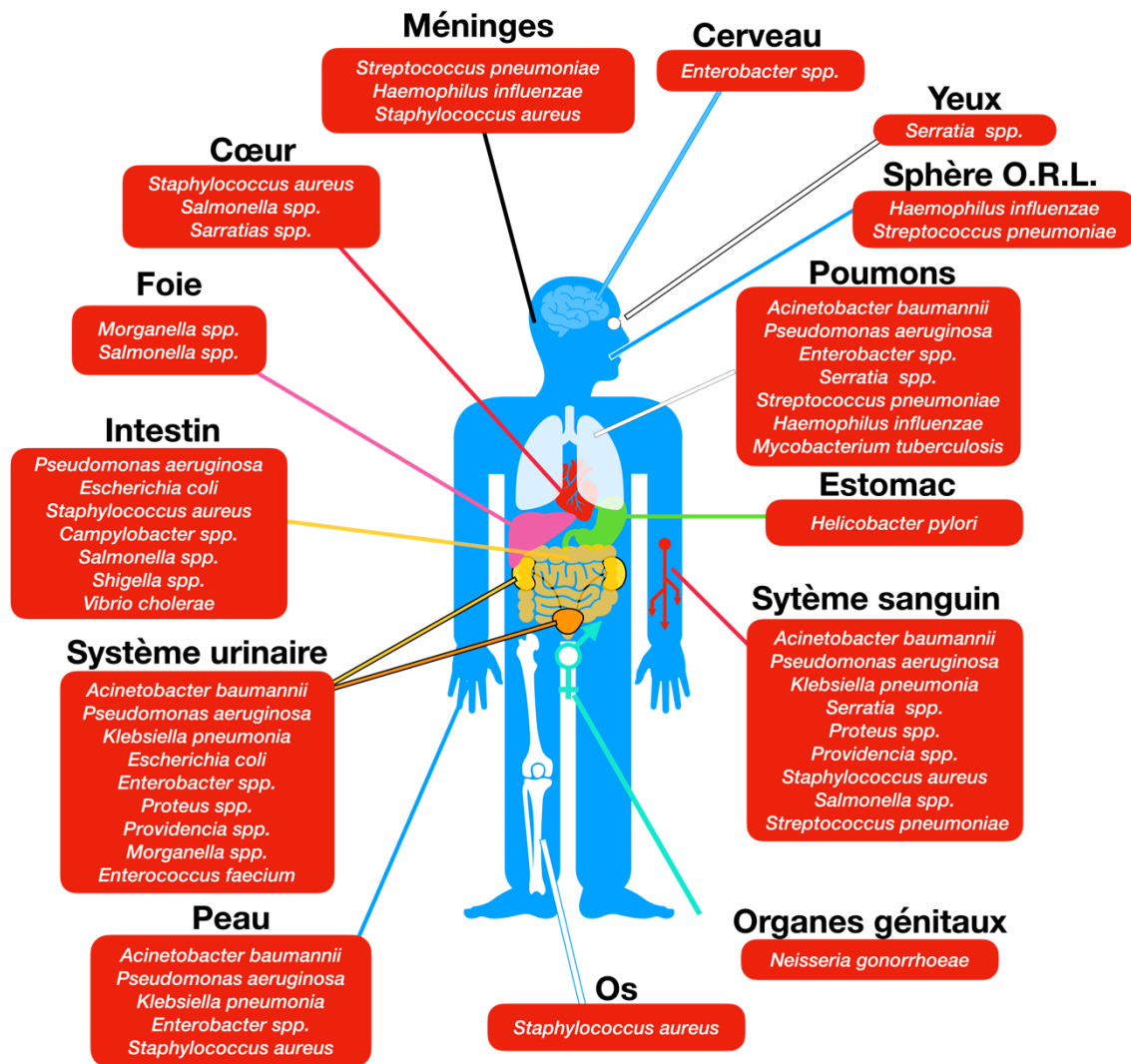


Figure 7.13. Organes touchés par les plus grandes menaces bactériennes.

Principaux organes cibles des plus grandes menaces bactériennes selon l'OMS (World Health Organization, 2017) *Vibrio cholerae* (Silva & Benitez, 2016) et *Mycobacterium tuberculosis* (Smith, 2003) ont été ajoutés. (Armbruster et al., 2018; Burkovski, 2013; Camilo et al., 2017; Davin-Regli et al., 2019; Engholm et al., 2017; Fitzgerald, 2015; Gao et al., 2018; Gellatly & Hancock, 2013; Harding et al., 2018; Kaper et al., 2004; Kurtz et al., 2017; Li et al., 2014; Liu et al., 2016; Lowy, 1998; Mahlen, 2011; Quillin & Seifert, 2018; Schnupf & Sansonetti, 2019; Shah et al., 2019; Silva & Benitez, 2016; Strausbaugh, 1997)

### 7.2.7 Mécanisme d'action de la toxine cholérique

La toxine cholérique est composée de la protéine CtxA et de cinq unités de la protéine CtxB (Lesieur et al., 2002). L'entrée de la toxine cholérique dans les cellules épithéliales humaines entraîne un bouleversement du fonctionnement de certains canaux ioniques ce qui provoque une fuite d'eau massive se traduisant en des diarrhées profuses et une déshydrations intense et rapide (**Figure 7.14**) (Wernick, Chinnapen, Cho, & Lencer, 2010 ; Field, 1974 ; Lesieur et al., 2002; Ramamurthy et al., 2020).

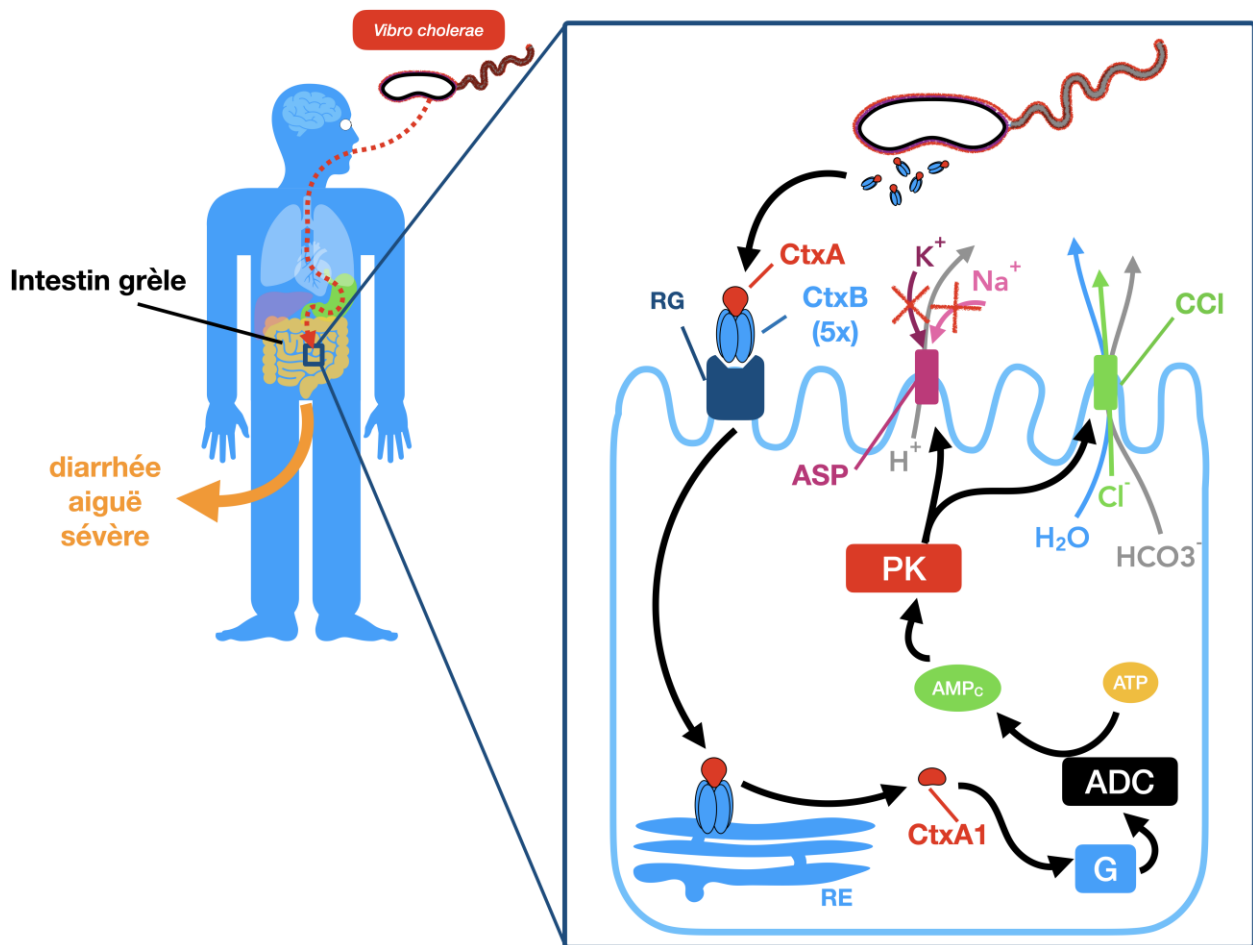


Figure 7.14. Mécanisme d'action de la toxine cholérique

Une fois ingérée, *V. cholerae* colonise l'intestin grêle où elle sécrète la toxine cholérique. La toxine cholérique est composée de la protéine CtxA et de 5 protéines B. La toxine est internalisée par la face apicale des cellules épithéliales en se liant à un récepteur gangliosidique (RG). La toxine est

ensuite rétrotransloquée au réticulum endoplasmique (RE) en passant par une vésicule d'endocytose et le golgi (non représenté). CtxA y est clivée et le domaine CtxA1 se retrouve alors dans le cytosol. CtxA1 active une protéine G (G) qui entraîne l'augmentation de transformation de l'ATP en AMP cyclique (AMP<sub>c</sub>) par l'intermédiaire d'une adénylate cyclase (ADC). L'augmentation de la quantité d'AMP<sub>c</sub> active une protéine kinase (PK) qui induit l'inhibition des canaux d'antiport sodium-proton (ASP) et active les canaux chlorures (CCl). Il s'ensuit une fuite massive d'ions Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> et d'eau, provoquant des diarrhées profuses et une déshydratation rapide. (Wernick, Chinnapen, Cho, & Lencer, 2010 ; Field, 1974 ; Lesieur et al., 2002; Ramamurthy et al., 2020)

## 7.2.8 Références au complément de revue de littérature

- Baharoglu, Z., Bikard, D., & Mazel, D. (2010). Conjugative DNA transfer induces the bacterial SOS response and promotes antibiotic resistance development through integron activation. *PLoS Genet*, 6(10), e1001165. DOI:10.1371/journal.pgen.1001165
- Bayan, N., Houssin, C., Chami, M., & Leblon, G. (2003). Mycomembrane and S-layer: two important structures of *Corynebacterium glutamicum* cell envelope with promising biotechnology applications. *J Biotechnol*, 104(1-3), 55-67. DOI:10.1016/S0168-1656(03)00163-9
- Belas, R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. *Trends Microbiol*, 22(9), 517-527. DOI:10.1016/j.tim.2014.05.002
- Berry, R. M., & Armitage, J. P. (1999). The Bacterial Flagella Motor. In R. K. Poole (Ed.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 41, pp. 291-337): Academic Press. ISBN: 0065-2911. [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2911\(08\)60169-1](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1016/S0065-2911(08)60169-1).
- Botta, G. A., & Park, J. T. (1981). Evidence for involvement of penicillin-binding protein 3 in murein synthesis during septation but not during cell elongation. *J Bacteriol*, 145(1), 333-340. DOI:10.1128/JB.145.1.333-340.1981
- Brogden, R. N., & Heel, R. C. (1986). Aztreonam. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs*, 31(2), 96-130. DOI:10.2165/00003495-198631020-00002
- Burkovski, A. (2013). Cell envelope of corynebacteria: structure and influence on pathogenicity. *ISRN Microbiol*, 2013, 935736. DOI:10.1155/2013/935736
- Busch, A., & Waksman, G. (2012). Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 367(1592), 1112-1122. DOI:10.1098/rstb.2011.0206
- Bylund, J., Burgess, L. A., Cescutti, P., Ernst, R. K., & Speert, D. P. (2006). Exopolysaccharides from *Burkholderia cenocepacia* inhibit neutrophil chemotaxis and scavenge reactive oxygen species. *J Biol Chem*, 281(5), 2526-2532. DOI:10.1074/jbc.M510692200
- Camilo, V., Sugiyama, T., & Touati, E. (2017). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter*, 22 Suppl 1. DOI:10.1111/hel.12405

- Campbell, J., Singh, A. K., Swoboda, J. G., Gilmore, M. S., Wilkinson, B. J., & Walker, S. (2012). An antibiotic that inhibits a late step in wall teichoic acid biosynthesis induces the cell wall stress stimulon in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, *56*(4), 1810-1820. DOI:10.1128/AAC.05938-11
- Campos, M. A., Vargas, M. A., Regueiro, V., Llompарт, C. M., Alberti, S., & Bengoechea, J. A. (2004). Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*, *72*(12), 7107-7114. DOI:10.1128/IAI.72.12.7107-7114.2004
- Cantey, J. B., & Doern, C. D. (2015). "A Defective and Imperfect" Method: H. Christian Gram and the History of the Gram Stain. *Pediatr Infect Dis J*, *34*(8), 848. DOI:10.1097/INF.0000000000000749
- Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M. (2015). The flagellum in bacterial pathogens: For motility and a whole lot more. *Semin Cell Dev Biol*, *46*, 91-103. DOI:10.1016/j.semcdb.2015.10.032
- Chahales, P., & Thanassi, D. G. (2015). Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. *Microbiol Spectr*, *3*(5). DOI:10.1128/microbiolspec.UTI-0018-2013
- Cherny, I., Rockah, L., Levy-Nissenbaum, O., Gophna, U., Ron, E. Z., & Gazit, E. (2005). The formation of *Escherichia coli* curli amyloid fibrils is mediated by prion-like peptide repeats. *J Mol Biol*, *352*(2), 245-252. DOI:10.1016/j.jmb.2005.07.028
- Chu, J., Liu, J., & Hoover, T. R. (2020). Phylogenetic Distribution, Ultrastructure, and Function of Bacterial Flagellar Sheaths. *Biomolecules*, *10*(3). DOI:10.3390/biom10030363
- Cleary, P. P., & Larkin, A. (1979). Hyaluronic acid capsule: strategy for oxygen resistance in group A streptococci. *J Bacteriol*, *140*(3), 1090-1097. DOI:10.1128/JB.140.3.1090-1097.1979
- Coburn, B., Sekirov, I., & Finlay, B. B. (2007). Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev*, *20*(4), 535-549. DOI:10.1128/CMR.00013-07
- Colavecchio, A., Cadieux, B., Lo, A., & Goodridge, L. D. (2017). Bacteriophages Contribute to the Spread of Antibiotic Resistance Genes among Foodborne Pathogens of the Enterobacteriaceae Family - A Review. *Front Microbiol*, *8*, 1108. DOI:10.3389/fmicb.2017.01108
- Costa, T. R. D., Ilangovan, A., Ukleja, M., Redzej, A., Santini, J. M., Smith, T. K., . . . Waksman, G. (2016). Structure of the Bacterial Sex F Pilus Reveals an Assembly of a Stoichiometric Protein-Phospholipid Complex. *Cell*, *166*(6), 1436-1444 e1410. DOI:10.1016/j.cell.2016.08.025
- Costa, T. R., Felisberto-Rodrigues, C., Meir, A., Prevost, M. S., Redzej, A., Trokter, M., & Waksman, G. (2015). Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*, *13*(6), 343-359. DOI:10.1038/nrmicro3456
- Costerton, J. W., Irvin, R. T., & Cheng, K. J. (1981). The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol*, *35*, 299-324. DOI:10.1146/annurev.mi.35.100181.001503
- Craig, L., Forest, K. T., & Maier, B. (2019). Type IV pili: dynamics, biophysics and functional consequences. *Nat Rev Microbiol*, *17*(7), 429-440. DOI:10.1038/s41579-019-0195-4

- Cress, B. F., Englaender, J. A., He, W., Kasper, D., Linhardt, R. J., & Koffas, M. A. (2014). Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. *FEMS Microbiol Rev*, 38(4), 660-697. DOI:10.1111/1574-6976.12056
- Cross, A. S. (1990). *The biologic significance of bacterial encapsulation*. In *Curr Top Microbiol Immunol* (1990/01/01 ed., Vol. 150, pp. 87-95). ISBN: 0070-217X (Print) 0070-217X (Linking). [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-74694-9\\_5](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-74694-9_5).
- Das, B. (2018). 1113. Real-Time Evolution of Extensively Drug-Resistant *Vibrio cholerae*. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(suppl\_1), S334-S334. DOI:10.1093/ofid/ofy210.946
- Davin-Regli, A., Lavigne, J. P., & Pages, J. M. (2019). Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*, 32(4). DOI:10.1128/CMR.00002-19
- de la Fuente-Nunez, C., Mertens, J., Smit, J., & Hancock, R. E. (2012). The bacterial surface layer provides protection against antimicrobial peptides. *Appl Environ Microbiol*, 78(15), 5452-5456. DOI:10.1128/AEM.01493-12
- Delcour, A. H. (2009). Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta*, 1794(5), 808-816. DOI:10.1016/j.bbapap.2008.11.005
- Dhand, A., & Snyderman, D. R. (2009). Mechanism of Resistance in Metronidazole. In *Antimicrobial Drug Resistance* (pp. 223-227). ISBN: 978-1-60327-592-7978-1-59745-180-2. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-180-2\\_19](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-180-2_19).
- Diepold, A., & Armitage, J. P. (2015). Type III secretion systems: the bacterial flagellum and the injectisome. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370(1679). DOI:10.1098/rstb.2015.0020
- Dingsdag, S. A., & Hunter, N. (2018). Metronidazole: an update on metabolism, structure-cytotoxicity and resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother*, 73(2), 265-279. DOI:10.1093/jac/dkx351
- Duperthuy, M., Sjoström, A. E., Sabharwal, D., Damghani, F., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2013). Role of the *Vibrio cholerae* matrix protein Bap1 in cross-resistance to antimicrobial peptides. *PLoS Pathog*, 9(10), e1003620. DOI:10.1371/journal.ppat.1003620
- Elpers, L., & Hensel, M. (2020). Expression and Functional Characterization of Various Chaperon-Usher Fimbriae, Curli Fimbriae, and Type 4 Pili of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Sakai. *Front Microbiol*, 11, 378. DOI:10.3389/fmicb.2020.00378
- Engholm, D. H., Kilian, M., Goodsell, D. S., Andersen, E. S., & Kjaergaard, R. S. (2017). A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *FEMS Microbiol Rev*, 41(6), 854-879. DOI:10.1093/femsre/fux037
- Erhardt, M. (2016). *Strategies to Block Bacterial Pathogenesis by Interference with Motility and Chemotaxis*.
- Fagan, R. P., & Fairweather, N. F. (2014). Biogenesis and functions of bacterial S-layers. *Nat Rev Microbiol*, 12(3), 211-222. DOI:10.1038/nrmicro3213
- Fasciano, A. C., Shaban, L., & Meccas, J. (2019). Promises and Challenges of the Type Three Secretion System Injectisome as an Antivirulence Target. *EcoSal Plus*, 8(2). DOI:10.1128/ecosalplus.ESP-0032-2018

- Fernandez, L., & Hancock, R. E. (2012). Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. *Clin Microbiol Rev*, 25(4), 661-681. DOI:10.1128/CMR.00043-12
- Field, M. (1974). Mode of action of cholera toxin: stabilization of catecholamine-sensitive adenylate cyclase in turkey erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71(8), 3299-3303. DOI:10.1073/pnas.71.8.3299
- Fitzgerald, C. (2015). *Campylobacter*. *Clin Lab Med*, 35(2), 289-298. DOI:10.1016/j.cll.2015.03.001
- Floyd, K. A., Lee, C. K., Xian, W., Nametalla, M., Valentine, A., Crair, B., . . . Yildiz, F. H. (2020). c-di-GMP modulates type IV MSHA pilus retraction and surface attachment in *Vibrio cholerae*. *Nat Commun*, 11(1), 1549. DOI:10.1038/s41467-020-15331-8
- Franklin, M. J., Nivens, D. E., Weadge, J. T., & Howell, P. L. (2011). Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Front Microbiol*, 2, 167. DOI:10.3389/fmicb.2011.00167
- Fronzes, R., Christie, P. J., & Waksman, G. (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol*, 7(10), 703-714. DOI:10.1038/nrmicro2218
- Fronzes, R., Remaut, H., & Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J*, 27(17), 2271-2280. DOI:10.1038/emboj.2008.155
- Gao, W., Howden, B. P., & Stinear, T. P. (2018). Evolution of virulence in *Enterococcus faecium*, a hospital-adapted opportunistic pathogen. *Curr Opin Microbiol*, 41, 76-82. DOI:10.1016/j.mib.2017.11.030
- Gavin, R., Rabaan, A. A., Merino, S., Tomas, J. M., Gryllos, I., & Shaw, J. G. (2002). Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol Microbiol*, 43(2), 383-397. DOI:10.1046/j.1365-2958.2002.02750.x
- Geisinger, E., & Isberg, R. R. (2015). Antibiotic modulation of capsular exopolysaccharide and virulence in *Acinetobacter baumannii*. *PLoS Pathog*, 11(2), e1004691. DOI:10.1371/journal.ppat.1004691
- Gellatly, S. L., & Hancock, R. E. (2013). *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*, 67(3), 159-173. DOI:10.1111/2049-632X.12033
- Gerbino, E., Carasi, P., Mobili, P., Serradell, M. A., & Gomez-Zavaglia, A. (2015). Role of S-layer proteins in bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, 31(12), 1877-1887. DOI:10.1007/s11274-015-1952-9
- Giltner, C. L., Nguyen, Y., & Burrows, L. L. (2012). Type IV pilin proteins: versatile molecular modules. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(4), 740-772. DOI:10.1128/MMBR.00035-12
- Giltner, C. L., van Schaik, E. J., Audette, G. F., Kao, D., Hodges, R. S., Hassett, D. J., & Irvin, R. T. (2006). The *Pseudomonas aeruginosa* type IV pilin receptor binding domain functions as an adhesin for both biotic and abiotic surfaces. *Mol Microbiol*, 59(4), 1083-1096. DOI:10.1111/j.1365-2958.2005.05002.x
- Global Task Force on Cholera Control, W. H. O. (2017). *Ending Cholera – A Global Roadmap to 2030*. Retrieved from <https://www.who.int/cholera/publications/global-roadmap.pdf?ua=1>. Accessed November 20, 2020.

- Global Tuberculosis Programme. (2020). Global tuberculosis report 2020. Retrieved from <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/336069/9789240013131-eng.pdf>. Accessed in November 20, 2020
- Goldman, R. C., White, D., Orskov, F., Orskov, I., Rick, P. D., Lewis, M. S., . . . Leive, L. (1982). A surface polysaccharide of *Escherichia coli* O111 contains O-antigen and inhibits agglutination of cells by O-antiserum. *J Bacteriol*, *151*(3), 1210-1221. DOI:10.1128/JB.151.3.1210-1221.1982
- Grossman, T. H., Frost, L. S., & Silverman, P. M. (1990). Structure and function of conjugative pili: monoclonal antibodies as probes for structural variants of F pili. *J Bacteriol*, *172*(3), 1174-1179. DOI:10.1128/jb.172.3.1174-1179.1990
- Haiko, J., & Westerlund-Wikstrom, B. (2013). The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence. *Biology (Basel)*, *2*(4), 1242-1267. DOI:10.3390/biology2041242
- Hameed, H. M. A., Islam, M. M., Chhotaray, C., Wang, C., Liu, Y., Tan, Y., . . . Zhang, T. (2018). Molecular Targets Related Drug Resistance Mechanisms in MDR-, XDR-, and TDR- Mycobacterium tuberculosis Strains. *Front Cell Infect Microbiol*, *8*, 114. DOI:10.3389/fcimb.2018.00114
- Hammerschmidt, S., Wolff, S., Hocke, A., Rosseau, S., Muller, E., & Rohde, M. (2005). Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*, *73*(8), 4653-4667. DOI:10.1128/IAI.73.8.4653-4667.2005
- Hannan, S., Ready, D., Jasni, A. S., Rogers, M., Pratten, J., & Roberts, A. P. (2010). Transfer of antibiotic resistance by transformation with eDNA within oral biofilms. *FEMS Immunol Med Microbiol*, *59*(3), 345-349. DOI:10.1111/j.1574-695X.2010.00661.x
- Harding, C. M., Hennon, S. W., & Feldman, M. F. (2018). Uncovering the mechanisms of *Acinetobacter baumannii* virulence. *Nat Rev Microbiol*, *16*(2), 91-102. DOI:10.1038/nrmicro.2017.148
- Hernandez-Alles, S., Benedi, V. J., Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Aguilar, A., Tomas, J. M., & Alberti, S. (1999). Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob Agents Chemother*, *43*(4), 937-939. DOI:10.1128/AAC.43.4.937
- Herrera, C. M., Crofts, A. A., Henderson, J. C., Pingali, S. C., Davies, B. W., & Trent, M. S. (2014). The *Vibrio cholerae* VprA-VprB two-component system controls virulence through endotoxin modification. *mBio*, *5*(6). DOI:10.1128/mBio.02283-14
- Hersch, S. J., Watanabe, N., Stietz, M. S., Manera, K., Kamal, F., Burkinshaw, B., . . . Dong, T. G. (2020). Envelope stress responses defend against type six secretion system attacks independently of immunity proteins. *Nat Microbiol*, *5*(5), 706-714. DOI:10.1038/s41564-020-0672-6
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., & Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, *436*(7054), 1171-1175. DOI:10.1038/nature03912



- Jung, S. Y., Matin, A., Kim, K. S., & Khan, N. A. (2007). The capsule plays an important role in *Escherichia coli* K1 interactions with *Acanthamoeba*. *Int J Parasitol*, 37(3-4), 417-423. DOI:10.1016/j.ijpara.2006.10.012
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2), 123-140. DOI:10.1038/nrmicro818
- Kaplan, J. B. (2011). Antibiotic-induced biofilm formation. *Int J Artif Organs*, 34(9), 737-751. DOI:10.5301/ijao.5000027
- Khursigara, C. M., Koval, S. F., Moyles, D. M., & Harris, R. J. (2018). Inroads through the bacterial cell envelope: seeing is believing. *Can J Microbiol*, 64(9), 601-617. DOI:10.1139/cjm-2018-0091
- Kikuchi, T., Mizunoe, Y., Takade, A., Naito, S., & Yoshida, S. (2005). Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiol Immunol*, 49(9), 875-884. DOI:10.1111/j.1348-0421.2005.tb03678.x
- Kim, C. K., Milheirico, C., de Lencastre, H., & Tomasz, A. (2017). Antibiotic Resistance as a Stress Response: Recovery of High-Level Oxacillin Resistance in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* "Auxiliary" (fem) Mutants by Induction of the Stringent Stress Response. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(8). DOI:10.1128/AAC.00313-17
- Kim, E. H., Nies, D. H., McEvoy, M. M., & Rensing, C. (2011). Switch or funnel: how RND-type transport systems control periplasmic metal homeostasis. *J Bacteriol*, 193(10), 2381-2387. DOI:10.1128/JB.01323-10
- Kim, K. J., Elliott, S. J., Di Cello, F., Stins, M. F., & Kim, K. S. (2003). The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol*, 5(4), 245-252. DOI:10.1046/j.1462-5822.2003.t01-1-00271.x
- Kirn, T. J., Bose, N., & Taylor, R. K. (2003). Secretion of a soluble colonization factor by the TCP type 4 pilus biogenesis pathway in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*, 49(1), 81-92. DOI:10.1046/j.1365-2958.2003.03546.x
- Koebnik, R. (2001). The role of bacterial pili in protein and DNA translocation. *Trends in Microbiology*, 9(12), 586-590. DOI:10.1016/s0966-842x(01)02255-7
- Kurtz, J. R., Goggins, J. A., & McLachlan, J. B. (2017). Salmonella infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunol Lett*, 190, 42-50. DOI:10.1016/j.imlet.2017.07.006
- Lautrop, H., & Jessen, O. (1964). On the Distinction between Polar Monotrichous and Lophotrichous Flagellation in Green Fluorescent *Pseudomonads*. *Acta Pathol Microbiol Scand*, 60, 588-598. DOI:10.1111/apm.1964.60.4.588
- Laverde, D., Probst, I., Romero-Saavedra, F., Kropec, A., Wobser, D., Keller, W., . . . Huebner, J. (2017). Targeting Type IV Secretion System Proteins to Combat Multidrug-Resistant Gram-positive Pathogens. *J Infect Dis*, 215(12), 1836-1845. DOI:10.1093/infdis/jix227

- Le Bouguenec, C., & Servin, A. L. (2006). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett*, 256(2), 185-194. DOI:10.1111/j.1574-6968.2006.00144.x
- Lesieur, C., Cliff, M. J., Carter, R., James, R. F., Clarke, A. R., & Hirst, T. R. (2002). A kinetic model of intermediate formation during assembly of cholera toxin B-subunit pentamers. *J Biol Chem*, 277(19), 16697-16704. DOI:10.1074/jbc.M110561200
- Lesinski, G. B., & Westerink, M. A. (2001). Vaccines against polysaccharide antigens. *Curr Drug Targets Infect Disord*, 1(3), 325-334. DOI:10.2174/1568005014605964
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z., & Zhou, D. (2014). Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol*, 9(9), 1071-1081. DOI:10.2217/fmb.14.48
- Lidholt, K., & Fjelstad, M. (1997). Biosynthesis of the *Escherichia coli* K4 capsule polysaccharide. A parallel system for studies of glycosyltransferases in chondroitin formation. *J Biol Chem*, 272(5), 2682-2687. DOI:10.1074/jbc.272.5.2682
- Ligthart, K., Belzer, C., de Vos, W. M., & Tytgat, H. L. P. (2020). Bridging Bacteria and the Gut: Functional Aspects of Type IV Pili. *Trends Microbiol*, 28(5), 340-348. DOI:10.1016/j.tim.2020.02.003
- Lister, I. M., Raftery, C., Meccas, J., & Levy, S. B. (2012). *Yersinia pestis* AcrAB-TolC in antibiotic resistance and virulence. *Antimicrob Agents Chemother*, 56(2), 1120-1123. DOI:10.1128/AAC.05338-11
- Liu, H., Zhu, J., Hu, Q., & Rao, X. (2016). *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *Int J Infect Dis*, 50, 10-17. DOI:10.1016/j.ijid.2016.07.006
- Lowy, F. D. (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *N Engl J Med*, 339(8), 520-532. DOI:10.1056/NEJM199808203390806
- MacLachlan, P. R., Keenleyside, W. J., Dodgson, C., & Whitfield, C. (1993). Formation of the K30 (group I) capsule in *Escherichia coli* O9:K30 does not require attachment to lipopolysaccharide lipid A-core. *J Bacteriol*, 175(23), 7515-7522. DOI:10.1128/jb.175.23.7515-7522.1993
- Mahlen, S. D. (2011). *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev*, 24(4), 755-791. DOI:10.1128/CMR.00017-11
- Mainardi, J. L., Fourgeaud, M., Hugonnet, J. E., Dubost, L., Brouard, J. P., Ouazzani, J., . . . Arthur, M. (2005). A novel peptidoglycan cross-linking enzyme for a beta-lactam-resistant transpeptidation pathway. *J Biol Chem*, 280(46), 38146-38152. DOI:10.1074/jbc.M507384200
- Manning, A. J., & Kuehn, M. J. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol*, 11, 258. DOI:10.1186/1471-2180-11-258
- Messner, P., Steiner, K., Zarschler, K., & Schaffer, C. (2008). S-layer nanoglycobiology of bacteria. *Carbohydr Res*, 343(12), 1934-1951. DOI:10.1016/j.carres.2007.12.025
- Moxon E.R., K. J. S. (1990). The Role of Bacterial Polysaccharide Capsules as Virulence Factors. In J. B. Jann K. (Ed.), *Bacterial Capsules. Current Topics in Microbiology and Immunology*. (Vol. 150): Springer, Berlin, Heidelberg. ISBN: 978-3-642-74694-9. [http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-74694-9\\_4](http://dx.doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-642-74694-9_4).

- Moyes, R. B., Reynolds, J., & Breakwell, D. P. (2009). Differential staining of bacteria: gram stain. *Curr Protoc Microbiol, Appendix 3*, Appendix 3C. DOI:10.1002/9780471729259.mca03cs15
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2). DOI:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- Murray, J. L., Kwon, T., Marcotte, E. M., & Whiteley, M. (2015). Intrinsic Antimicrobial Resistance Determinants in the Superbug *Pseudomonas aeruginosa*. *mBio*, 6(6), e01603-01615. DOI:10.1128/mBio.01603-15
- Nakamura, S., & Minamino, T. (2019). Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules*, 9(7). DOI:10.3390/biom9070279
- Okusu, H., Ma, D., & Nikaido, H. (1996). AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol*, 178(1), 306-308. DOI:10.1128/jb.178.1.306-308.1996
- Pages, J. M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 6(12), 893-903. DOI:10.1038/nrmicro1994
- Papanicolaou, G. A., Medeiros, A. A., & Jacoby, G. A. (1990). Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 34(11), 2200-2209. DOI:10.1128/aac.34.11.2200
- Paracini, N., Clifton, L. A., Skoda, M. W. A., & Lakey, J. H. (2018). Liquid crystalline bacterial outer membranes are critical for antibiotic susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(32), E7587-E7594. DOI:10.1073/pnas.1803975115
- Peleg, A., Shifrin, Y., Ilan, O., Nadler-Yona, C., Nov, S., Koby, S., . . . Rosenshine, I. (2005). Identification of an *Escherichia coli* operon required for formation of the O-antigen capsule. *J Bacteriol*, 187(15), 5259-5266. DOI:10.1128/JB.187.15.5259-5266.2005
- Phanphak, S., Georgiades, P., Li, R., King, J., Roberts, I. S., & Waigh, T. A. (2019). Super-Resolution Fluorescence Microscopy Study of the Production of K1 Capsules by *Escherichia coli*: Evidence for the Differential Distribution of the Capsule at the Poles and the Equator of the Cell. *Langmuir*, 35(16), 5635-5646. DOI:10.1021/acs.langmuir.8b04122
- Pizarro-Cerda, J., & Cossart, P. (2006). Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*, 124(4), 715-727. DOI:10.1016/j.cell.2006.02.012
- Psonis, J. J., & Thanassi, D. G. (2019). Therapeutic Approaches Targeting the Assembly and Function of Chaperone-Usher Pili. *EcoSal Plus*, 8(2). DOI:10.1128/ecosalplus.ESP-0033-2018
- Quillin, S. J., & Seifert, H. S. (2018). *Neisseria gonorrhoeae* host adaptation and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 16(4), 226-240. DOI:10.1038/nrmicro.2017.169
- R, A., & E, K. (2012). *Vibrio cholerae* Flagellar Synthesis and Virulence. In *Cholera*. ISBN: 978-953-51-0415-5. <http://dx.doi.org/10.5772/38457>.
- Ramamurthy, T., Nandy, R. K., Mukhopadhyay, A. K., Dutta, S., Mutreja, A., Okamoto, K., . . . Ghosh, A. (2020). Virulence Regulation and Innate Host Response in the Pathogenicity of *Vibrio cholerae*. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 572096. DOI:10.3389/fcimb.2020.572096

- Rao, V., Ghei, R., & Chambers, Y. (2016). Biofilms Research—Implications to Biosafety and Public Health. *Applied Biosafety*, *10*(2), 83-90. DOI:10.1177/153567600501000205
- Reid, A. N., & Szymanski, C. M. (2010). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides. In *Microbial Glycobiology* (pp. 351-373). ISBN: 9780123745460. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-374546-0.00020-1>.
- Restaino, O. F., D'Ambrosio, S., Cassese, E., Ferraiuolo, S. B., Alfano, A., Ventriglia, R., . . . Cimini, D. (2019). Molecular weight determination of heparosan- and chondroitin-like capsular polysaccharides: figuring out differences between wild -type and engineered *Escherichia coli* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, *103*(16), 6771-6782. DOI:10.1007/s00253-019-09969-8
- Riley, E. E., Das, D., & Lauga, E. (2018). Swimming of peritrichous bacteria is enabled by an elasto-hydrodynamic instability. *Sci Rep*, *8*(1), 10728. DOI:10.1038/s41598-018-28319-8
- Roberts, I. S. (1996). The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol*, *50*, 285-315. DOI:10.1146/annurev.micro.50.1.285
- Rodrigues-Oliveira, T., Belmok, A., Vasconcellos, D., Schuster, B., & Kyaw, C. M. (2017). Archaeal S-Layers: Overview and Current State of the Art. *Front Microbiol*, *8*, 2597. DOI:10.3389/fmicb.2017.02597
- Rodriguez, M. L., Jann, B., & Jann, K. (1988). Structure and serological characteristics of the capsular K4 antigen of *Escherichia coli* O5:K4:H4, a fructose-containing polysaccharide with a chondroitin backbone. *Eur J Biochem*, *177*(1), 117-124. DOI:10.1111/j.1432-1033.1988.tb14351.x
- Rossez, Y., Wolfson, E. B., Holmes, A., Gally, D. L., & Holden, N. J. (2015). Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS Pathog*, *11*(1), e1004483. DOI:10.1371/journal.ppat.1004483
- Rossolini, G. M., Arena, F., & Giani, T. (2017). Mechanisms of Antibacterial Resistance. In *Infectious Diseases* (pp. 1181-1196.e1181). ISBN: 9780702062858. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-7020-6285-8.00138-6>.
- Sabnis, A., Ledger, E. V. K., Pader, V., & Edwards, A. M. (2018). Antibiotic interceptors: Creating safe spaces for bacteria. *PLoS Pathog*, *14*(4), e1006924. DOI:10.1371/journal.ppat.1006924
- Sabra, W., Zeng, A. P., Lunsdorf, H., & Deckwer, W. D. (2000). Effect of oxygen on formation and structure of *Azotobacter vinelandii* alginate and its role in protecting nitrogenase. *Appl Environ Microbiol*, *66*(9), 4037-4044. DOI:10.1128/aem.66.9.4037-4044.2000
- Sachdeva, S., Palur, R. V., Sudhakar, K. U., & Rathinavelan, T. (2017). E. coli Group 1 Capsular Polysaccharide Exportation Nanomachinery as a Plausible Antivirulence Target in the Perspective of Emerging Antimicrobial Resistance. *Front Microbiol*, *8*, 70. DOI:10.3389/fmicb.2017.00070
- Sailer, F. C., Meberg, B. M., & Young, K. D. (2003). beta-Lactam induction of colanic acid gene expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, *226*(2), 245-249. DOI:10.1016/S0378-1097(03)00616-5

- Sara, M., & Sleytr, U. B. (2000). S-Layer proteins. *J Bacteriol*, 182(4), 859-868. DOI:10.1128/jb.182.4.859-868.2000
- Schaffer, C., & Messner, P. (2017). Emerging facets of prokaryotic glycosylation. *FEMS Microbiol Rev*, 41(1), 49-91. DOI:10.1093/femsre/fuw036
- Schembri, M. A., Dalsgaard, D., & Klemm, P. (2004). Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J Bacteriol*, 186(5), 1249-1257. DOI:10.1128/jb.186.5.1249-1257.2004
- Schmid, J., Sieber, V., & Rehm, B. (2015). Bacterial exopolysaccharides: biosynthesis pathways and engineering strategies. *Front Microbiol*, 6, 496. DOI:10.3389/fmicb.2015.00496
- Schnupf, P., & Sansonetti, P. J. (2019). Shigella Pathogenesis: New Insights through Advanced Methodologies. *Microbiol Spectr*, 7(2). DOI:10.1128/microbiolspec.BAI-0023-2019
- Scholl, D., Adhya, S., & Merrill, C. (2005). *Escherichia coli* K1's capsule is a barrier to bacteriophage T7. *Appl Environ Microbiol*, 71(8), 4872-4874. DOI:10.1128/AEM.71.8.4872-4874.2005
- Sengupta, S., Chattopadhyay, M. K., & Grossart, H. P. (2013). The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front Microbiol*, 4, 47. DOI:10.3389/fmicb.2013.00047
- Seper, A., Fengler, V. H., Roier, S., Wolinski, H., Kohlwein, S. D., Bishop, A. L., . . . Schild, S. (2011). Extracellular nucleases and extracellular DNA play important roles in *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Mol Microbiol*, 82(4), 1015-1037. DOI:10.1111/j.1365-2958.2011.07867.x
- Shah, M. M., Odoyo, E., & Ichinose, Y. (2019). Epidemiology and Pathogenesis of *Providencia alcalifaciens* Infections. *Am J Trop Med Hyg*, 101(2), 290-293. DOI:10.4269/ajtmh.18-0376
- Shigeta, M., Tanaka, G., Komatsuzawa, H., Sugai, M., Suginaka, H., & Usui, T. (1997). Permeation of antimicrobial agents through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: a simple method. *Chemotherapy*, 43(5), 340-345. DOI:10.1159/000239587
- Silhavy, T. J. (2016). Classic Spotlight: Gram-Negative Bacteria Have Two Membranes. *J Bacteriol*, 198(2), 201. DOI:10.1128/JB.00599-15
- Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(5), a000414. DOI:10.1101/cshperspect.a000414
- Silva, A. J., & Benitez, J. A. (2016). *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(2), e0004330. DOI:10.1371/journal.pntd.0004330
- Sinha Roy, R., Yang, P., Kodali, S., Xiong, Y., Kim, R. M., Griffin, P. R., . . . Chapman, K. (2001). Direct interaction of a vancomycin derivative with bacterial enzymes involved in cell wall biosynthesis. *Chem Biol*, 8(11), 1095-1106. DOI:10.1016/s1074-5521(01)00075-8
- Sleytr, U. (1999). Bacterial S-layers. *Trends in Microbiology*, 7(6), 253-260. DOI:10.1016/s0966-842x(99)01513-9
- Sleytr, U. B., Schuster, B., Egelseer, E. M., & Pum, D. (2014). S-layers: principles and applications. *FEMS Microbiol Rev*, 38(5), 823-864. DOI:10.1111/1574-6976.12063
- Sleytr, U. B., Thornley, M. J., & Glauert, A. M. (1974). Location of the Fracture Faces Within the Cell Envelope of *Acinetobacter* Species Strain MJT/F5/5. *Journal of Bacteriology*, 118(2), 693-707. Retrieved from <https://jb.asm.org/content/jb/118/2/693.full.pdf>
- Smith, I. (2003). Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*, 16(3), 463-496. DOI:10.1128/cmr.16.3.463-496.2003

- Souza, D. P., Oka, G. U., Alvarez-Martinez, C. E., Bisson-Filho, A. W., Dunger, G., Hobeika, L., . . . Farah, C. S. (2015). Bacterial killing via a type IV secretion system. *Nat Commun*, 6, 6453. DOI:10.1038/ncomms7453
- Starkebaum, G. A., & Plorde, J. J. (1977). Pasteurella pneumonia: report of a case and review of the literature. *J Clin Microbiol*, 5(3), 332-335. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/853121>
- Stevenson, G., Andrianopoulos, K., Hobbs, M., & Reeves, P. R. (1996). Organization of the *Escherichia coli* K-12 gene cluster responsible for production of the extracellular polysaccharide colanic acid. *J Bacteriol*, 178(16), 4885-4893. DOI:10.1128/jb.178.16.4885-4893.1996
- Stewart, P. S. (2002). Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Int J Med Microbiol*, 292(2), 107-113. DOI:10.1078/1438-4221-00196
- Stirm, S., & Freund-Molbert, E. (1971). *Escherichia coli* capsule bacteriophages. II. Morphology. *J Virol*, 8(3), 330-342. DOI:10.1128/JVI.8.3.330-342.1971
- Strausbaugh, L. J. (1997). Haemophilus influenzae infections in adults: a pathogen in search of respect. *Postgrad Med*, 101(2), 191-192, 195-196, 199-200. DOI:10.3810/pgm.1997.02.165
- Sun, S., Berg, O. G., Roth, J. R., & Andersson, D. I. (2009). Contribution of gene amplification to evolution of increased antibiotic resistance in Salmonella typhimurium. *Genetics*, 182(4), 1183-1195. DOI:10.1534/genetics.109.103028
- Sutterlin, H. A., Zhang, S., & Silhavy, T. J. (2014). Accumulation of phosphatidic acid increases vancomycin resistance in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 196(18), 3214-3220. DOI:10.1128/JB.01876-14
- Swan, M. A. (1985). Electron microscopic observations of structures associated with the flagella of *Spirillum volutans*. *J Bacteriol*, 161(3), 1137-1145. DOI:10.1128/JB.161.3.1137-1145.1985
- Taylor, P. K., Yeung, A. T., & Hancock, R. E. (2014). Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms: towards the development of novel anti-biofilm therapies. *J Biotechnol*, 191, 121-130. DOI:10.1016/j.jbiotec.2014.09.003
- Teschler, J. K., Zamorano-Sanchez, D., Utada, A. S., Warner, C. J., Wong, G. C., Lington, R. G., & Yildiz, F. H. (2015). Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms. *Nat Rev Microbiol*, 13(5), 255-268. DOI:10.1038/nrmicro3433
- Tikhonova, E. B., Yamada, Y., & Zgurskaya, H. I. (2011). Sequential mechanism of assembly of multidrug efflux pump AcrAB-TolC. *Chem Biol*, 18(4), 454-463. DOI:10.1016/j.chembiol.2011.02.011
- Tipton, K. A., Chin, C. Y., Farokhyfar, M., Weiss, D. S., & Rather, P. N. (2018). Role of Capsule in Resistance to Disinfectants, Host Antimicrobials, and Desiccation in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 62(12). DOI:10.1128/AAC.01188-18
- Tomek, M. B., Neumann, L., Nimeth, I., Koerdts, A., Andesner, P., Messner, P., . . . Schaffer, C. (2014). The S-layer proteins of *Tannerella forsythia* are secreted via a type IX secretion

- system that is decoupled from protein O-glycosylation. *Mol Oral Microbiol*, 29(6), 307-320. DOI:10.1111/omi.12062
- Trifiro, S., Bourgault, A. M., Lebel, F., & Rene, P. (1990). Ghost mycobacteria on Gram stain. *J Clin Microbiol*, 28(1), 146-147. DOI:10.1128/JCM.28.1.146-147.1990
- Troy, F. A., & McCloskey, M. A. (1979). Role of a membranous sialyltransferase complex in the synthesis of surface polymers containing polysialic acid in *Escherichia coli*. Temperature-induced alteration in the assembly process. *J Biol Chem*, 254(15), 7377-7387. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/379003>
- van Hoek, A. H., Mevius, D., Guerra, B., Mullany, P., Roberts, A. P., & Aarts, H. J. (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol*, 2, 203. DOI:10.3389/fmicb.2011.00203
- Vann, W. F., Schmidt, M. A., Jann, B., & Jann, K. (1981). The structure of the capsular polysaccharide (K5 antigen) of urinary-tract-infective *Escherichia coli* O10:K5:H4. A polymer similar to desulfo-heparin. *Eur J Biochem*, 116(2), 359-364. DOI:10.1111/j.1432-1033.1981.tb05343.x
- Veeranagouda, Y., Husain, F., Boente, R., Moore, J., Smith, C. J., Rocha, E. R., . . . Wexler, H. M. (2014). Deficiency of the ferrous iron transporter FeoAB is linked with metronidazole resistance in *Bacteroides fragilis*. *J Antimicrob Chemother*, 69(10), 2634-2643. DOI:10.1093/jac/dku219
- Vergalli, J., Bodrenko, I. V., Masi, M., Moynie, L., Acosta-Gutierrez, S., Naismith, J. H., . . . Pages, J. M. (2020). Porins and small-molecule translocation across the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*, 18(3), 164-176. DOI:10.1038/s41579-019-0294-2
- Wang, L., Rothemund, D., Curd, H., & Reeves, P. R. (2003). Species-wide variation in the *Escherichia coli* flagellin (H-antigen) gene. *J Bacteriol*, 185(9), 2936-2943. DOI:10.1128/jb.185.9.2936-2943.2003
- Weisgerber, C., & Troy, F. A. (1990). Biosynthesis of the polysialic acid capsule in *Escherichia coli* K1. The endogenous acceptor of polysialic acid is a membrane protein of 20 kDa. *J Biol Chem*, 265(3), 1578-1587. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2404016>
- Wen, Z., & Zhang, J.-R. (2015). Bacterial Capsules. In *Molecular Medical Microbiology* (pp. 33-53). ISBN: 9780123971692. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-397169-2.00003-2>.
- Wernick, N. L., Chinnapen, D. J., Cho, J. A., & Lencer, W. I. (2010). Cholera toxin: an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum. *Toxins (Basel)*, 2(3), 310-325. DOI:10.3390/toxins2030310
- Whitfield, C. (2006). Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*, 75(75), 39-68. DOI:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142545
- Whitfield, C., Vimr, E. R., Costerton, J. W., & Troy, F. A. (1984). Protein synthesis is required for in vivo activation of polysialic acid capsule synthesis in K1. *Journal of Bacteriology*, 159(1), 321. Retrieved from <http://jb.asm.org/content/159/1/321.abstract>
- Willis, L. M., & Whitfield, C. (2013). Capsule and lipopolysaccharide. In *Escherichia coli* (pp. 533-556). ISBN: 9780123970480. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-397048-0.00017-6>.

- Barksdale, L. (1970). *Corynebacterium diphtheriae* and its relatives. *Bacteriol Rev*, 34(4), 378-422. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4322195>
- Willis, L. M., Stupak, J., Richards, M. R., Lowary, T. L., Li, J., & Whitfield, C. (2013). Conserved glycolipid termini in capsular polysaccharides synthesized by ATP-binding cassette transporter-dependent pathways in Gram-negative pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(19), 7868-7873. DOI:10.1073/pnas.1222317110
- World Health Organization. (2014). *Antimicrobial resistance : global report on surveillance*. Switzerland: World Health Organization.
- World Health Organization. (2017). *Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics*. Retrieved from [https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short\\_Summary\\_25Feb-ET\\_NM\\_WHO.pdf?ua=1](https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1). Accessed november 20, 2020.
- Yassin, A.-A. F. (2011). Detection and Characterization of Mycolic Acids and Their Use in Taxonomy and Classification. In *Taxonomy of Prokaryotes* (pp. 207-237). ISBN: 9780123877307. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-387730-7.00010-3>.
- Yeo, H. J., Yuan, Q., Beck, M. R., Baron, C., & Waksman, G. (2003). Structural and functional characterization of the VirB5 protein from the type IV secretion system encoded by the conjugative plasmid pKM101. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(26), 15947-15952. DOI:10.1073/pnas.2535211100
- Zerbib, D. (2016). Bacterial Cell Envelopes: Composition, Architecture, and Origin. In *Handbook of Electroporation* (pp. 1-20). ISBN: 978-3-319-26779-1. [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1\\_28-1](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-26779-1_28-1).
- Arzanlou, M., Chai, W. C., & Venter, H. (2017). Intrinsic, adaptive and acquired antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Essays Biochem*, 61(1), 49-59. DOI:10.1042/EBC20160063
- Zgurskaya, H. I., Lopez, C. A., & Gnanakaran, S. (2015). Permeability Barrier of Gram-Negative Cell Envelopes and Approaches To Bypass It. *ACS Infect Dis*, 1(11), 512-522. DOI:10.1021/acsinfecdis.5b00097
- Zingl, F. G., Kohl, P., Cakar, F., Leitner, D. R., Mitterer, F., Bonnington, K. E., . . . Schild, S. (2020). Outer Membrane Vesiculation Facilitates Surface Exchange and In Vivo Adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell Host Microbe*, 27(2), 225-237 e228. DOI:10.1016/j.chom.2019.12.002
- Armbruster, C. E., Mobley, H. L. T., & Pearson, M. M. (2018). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus*, 8(1). DOI:10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017
- Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol*, 60, 131-147. DOI:10.1146/annurev.micro.60.080805.142106