

Université de Montréal

Caractérisation de l'impact de la polymyxine B sur les biofilms de *Vibrio cholerae*

Par

Julien Pauzé-Foixet

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences

en Microbiologie et Immunologie

Juin 2023

© Pauzé-Foixet, 2023

Université de Montréal

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie. Faculté de Médecine

Ce mémoire intitulé

Caractérisation de l'impact de la polymyxine B sur les biofilms de *Vibrio cholerae*

Présenté par

Julien Puzé Foixet

A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes

France Daigle

Présidente-rapporteuse

Marylise Duperthuy

Directrice de recherche

Éric Déziel

Membre du jury

Résumé

Vibrio cholerae, l'agent étiologique du choléra, est une bactérie adaptée à l'environnement aquatique et, dans le cadre infectieux, à la colonisation du petit intestin humain. L'environnement intestinal est un milieu *a priori* hostile aux bactéries externes, à cause de son environnement anaérobie et de la présence des effecteurs du système immunitaire. Capable de produire un biofilm dans ces deux niches écologiques, *V. cholerae* est capable de persister dans des conditions défavorables et de résister aux molécules antimicrobiennes, y compris les peptides antimicrobiens (PAM). J'ai d'abord étudié la résistance aux antimicrobiens de *V. cholerae* dans des conditions expérimentales représentatives de l'intestin. Ensuite, j'ai caractérisé, quantitativement et qualitativement, la résistance à la polymyxine B (PmB) des biofilms de *V. cholerae*, exposés à des concentrations sous-inhibitrices ou létales de ce PAM. Nos résultats suggèrent que la résistance aux PAM de *V. cholerae* est influencée par la disponibilité de l'oxygène dans le milieu. Je propose également que des concentrations létales de PmB peuvent stimuler un mécanisme de résistance exclusif aux biofilms matures. Les différences soulevées par nos investigations mettent en perspective l'importance d'adapter les conditions expérimentales aux caractéristiques réelles de l'environnement infectieux lors des études de résistances aux antimicrobiens.

Mots-clés : choléra, peptides antimicrobiens, mécanismes de résistance, antibiotiques, biofilms, anaérobiose, microscopie.

Abstract

Vibrio cholerae, the etiological agent of cholera, is a bacterium that is adapted to the aquatic environment and, in the infectious setting, to the colonization of the small intestine. The intestinal environment is at first glance hostile to external bacteria, due to its anaerobic conditions and the presence of the effectors of the immune system. Capable of producing a biofilm in its two ecological niches, *V. cholerae* is quite capable of persisting in unfavorable conditions and of resisting antimicrobial molecules, including antimicrobial peptides (AMPs). I first investigated the antimicrobial resistance of *V. cholerae* under experimental conditions representative of the intestine. Then, I characterized, quantitatively and qualitatively, the antimicrobial resistance of *V. cholerae* biofilms to Polymyxin B (PmB), at sub-inhibitory or lethal concentrations of this AMP. Our results suggest that resistance to PmB in *V. cholerae* is influenced by oxygen availability in the medium. I also propose that lethal concentrations of PmB may promote a resistance mechanism exclusive to mature biofilms. The differences raised by our investigations put into perspective the importance of adapting laboratory conditions to the actual features of the infectious environment when investigating antimicrobial resistance.

Keywords : cholera, antimicrobial peptides, resistance mechanisms, antibiotics, biofilms, anaerobiosis, microscopy.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des tableaux	x
Liste des figures	xi
Liste des sigles et abréviations	xiii
Remerciements	xvi
Introduction.....	1
Chapitre 1 – Épidémiologie & Histoire	2
3.3 — L’histoire du choléra	2
1.2 — Les pandémies de choléra	3
1.3 — Le choléra aujourd’hui	4
Chapitre 2 — L’épidémiologie du choléra.....	6
2.1 — Le choléra et les populations à risque	6
2.2 — La transmission	7
2.3 — Les symptômes du choléra	7
2.4 — Le traitement du choléra	8
2.5 — Vaccins contre le choléra	9
Chapitre 3 — <i>V. cholerae</i> et son environnement naturel.....	10
3.1 — Les <i>Vibrionaceae</i>	10
3.2 — <i>Vibrio cholerae</i>	10
3.3 — Biofilms environnementaux.....	11
3.4 — Viable mais non cultivable	12

Chapitre 4 — <i>V. cholerae</i> dans le cadre infectieux	13
4.1 — Traverser la barrière d'acidité	13
4.2 — Colonisation de la muqueuse intestinale	14
4.3 — La toxine cholérique	15
4.4 — Adaptation à l'anaérobiose	16
4.5 — Excrétion de bactéries	18
Chapitre 5 — Les biofilms.....	19
5.1 — Généralités.....	19
5.2 — Le développement d'un biofilm.....	20
5.3 — La matrice du biofilm	22
5.3.1 Les exopolysaccharides	23
5.3.2 Les protéines	23
5.3.3 L'ADN extracellulaire (ADNe)	24
5.3.4 Les autres composant de la matrice du biofilm	24
5.4 — « <i>le Quorum Sensing</i> »	25
5.5 — La niche écologique du biofilm	27
5.6 — Les mécanismes de résistance des biofilms	28
5.6.1 Barrière protectrice	28
5.6.2 Molécules de résistance.....	28
5.6.3 Variabilité génétique	28
5.6.4 Persistance	29
5.7 - Les biofilms de <i>V. cholerae</i>	29
5.7.1 Contrôle de l'expression des gènes.....	29
5.7.2 Les variants rugueux.....	30

5.7.3 L'adhésion initiale du biofilm	31
5.7.4 Les gènes de structure du biofilm	31
5.7.5 La résistance des biofilms	33
5.7.6 Colonisation de l'interface eau-air	33
Chapitre 6 — Résistance aux antimicrobiens.....	35
6.1 — L'émergence de la résistance	35
6.2 – Les antibiotiques	36
6.2.1 Inhibiteurs de la biosynthèse des protéines	36
Inhibiteurs de la sous-unité 30S des ribosomes	36
Les aminoglycosides	36
Les tétracyclines	37
Inhibiteurs de la sous-unité 50S des ribosomes	37
Le chloramphénicol	37
Les macrolides	38
6.2.2 Inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques	38
Inhibition de la synthèse de l'ADN	38
Les quinolones.....	38
6.2.3 Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne.....	39
Les β -lactames.....	39
6.2.4 Autres antibiotiques.....	39
6.3 — Les mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	40
6.3.1 Réduction de la perméabilité.....	41
6.3.2 Réduction de la concentration intracellulaire.....	41
6.3.3 Modification de la cible	42

6.3.4 Protection de la cible.....	42
6.3.5 Contournement de la cible.....	42
6.3.6 Inactivation de l'antibiotique.....	43
6.4 — Les peptides antimicrobiens (PAM).....	45
6.4.1 Modes d'action des PAM.....	46
6.5 — La polymyxine B (PmB).....	48
6.5.1 – Mécanisme d'action.....	48
6.5.2 – Mécanismes d'action secondaires.....	50
6.6 — Les mécanismes de résistance aux PAM.....	50
6.6.1 Dégradation des PAM.....	50
6.6.2 Modifications des membranes.....	50
6.6.3 Structures de protection.....	51
6.6.4 Réduction de la concentration intracellulaire.....	51
6.6.5 Séquestration des PAM.....	52
6.7 — La résistance de <i>V. cholerae</i>	52
6.7.1 Mécanismes de résistance.....	52
6.7.2 Résistance à la PmB.....	54
6.7.3 Adaptations aux quantités sous-inhibitrices de PmB.....	54
Chapitre 7 — Problématique et objectifs expérimentaux.....	56
Chapitre 8 — Matériel et méthodes.....	58
8.1 Souches et conditions de croissance.....	58
8.2 Test de résistance en antibiogramme.....	59
8.3 Concentration minimale inhibitrice (CMI).....	60
8.4 Test de formation et résistance des biofilms.....	60

8.5 Récupération des bactéries des biofilms traités à la PmB	61
8.6 Microscopie en microflux.....	61
8.7 Croissance sur filtre 0,22 μm	62
8.8 Extraction d'ARN, ADNc et PCR quantitatif (qPCR)	62
Chapitre 9 — Résultats.....	65
9.1 — Concentration minimale inhibitrice selon la température et la salinité du milieu	65
9.2 — Concentration minimale inhibitrice selon la disponibilité en oxygène	67
9.3 — Production de biofilm chez <i>V. cholerae</i> selon la disponibilité en oxygène	70
9.4 — Production de biofilms en présence de PmB.....	74
9.5 — Résistance des biofilms en présence de PmB.....	75
9.6 — Tests de résistance des bactéries isolées des biofilms traités avec 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PmB	77
9.7 — Production de biofilms en présence de PmB : plaque de 24 puits.....	80
9.8 — Résistance des biofilms à la PmB : plaque de 24 puits.....	82
9.9 — Microscopie sur les biofilms statiques.....	83
9.10 — Formation du biofilm en microflux.....	84
9.11 — Résistance du biofilm en microflux.....	85
9.12 — Analyse d'expression des gènes du biofilm par PCR quantitatif (RT-qPCR).....	87
9.13 — Résistance du biofilm en microflux.....	91
9.14 — Microscopie à fluorescence sur les biofilms en microflux.....	92
9.15 — Résistance aux hautes concentrations de PmB sur gélose LB-agar	93
Chapitre 10 — Discussion.....	95
10.1 — Les variations de température et de salinité du milieu de croissance influencent la résistance aux antibiotiques.	95

10.2 — La résistance aux antibiotiques en anaérobiose est influencée par le métabolisme bactérien.	97
10.3 — Les différentes concentrations de PmB influencent <i>V. cholerae</i> différemment selon la disponibilité de l’oxygène.	98
10.4 — Les caractéristiques du biofilm diffèrent selon la disponibilité de l’oxygène dans le milieu.	100
10.5 — En anaérobiose, la production de biofilm est davantage inhibée par les concentrations sous-inhibitrices de PmB.	101
10.6 — Les biofilms de <i>V. cholerae</i> sont résistants à la PmB en dose sous-inhibitrice et en dose d’excès.	102
10.7 — La résistance aux fortes concentrations de PmB n’est pas due à une variation génétique.	103
10.8 — Le traitement des biofilms aux fortes concentrations de PmB stimule l’apparition d’un phénotype unique.	104
10.9 — Les quantités sous-inhibitrices de PmB influencent le développement d’un biofilm présentant des défauts d’adhérence.	105
10.10 — L’action des fortes concentrations de PmB sur les biofilms est un processus très rapide.	106
10.11 — Les phénotypes de résistance accrus ne résultent pas d’une surexpression des gènes de structures du biofilm.	107
10.12 — Les bactéries survivent dans les biofilms traités aux fortes concentrations en PmB.	108
10.13 — Une concentration très élevée de PmB mène au relâchement d’ADN qui englobe le biofilm.	109
10.14 — Sur milieu solide, <i>V. cholerae</i> est capable de développer une nouvelle structure en réponse aux très fortes concentrations de PmB.	110

10.15 — Conclusion.....	111
Références bibliographiques.....	112

Liste des tableaux

Tableau 1	<i>Liste des souches utilisées lors de l'étude.....</i>	59
Tableau 2	<i>Cycle d'amplification pour le qPCR.....</i>	63
Tableau 3	<i>Amorces utilisées pour déterminer l'expression des gènes du biofilm.....</i>	63
Tableau 4	Concentration inhibitrice médiane et concentration minimale inhibitrice chez <i>V. cholerae</i> A1552.	67
Tableau 5	Concentration inhibitrice médiane et concentration minimale inhibitrice de <i>V. cholerae</i> A1552 et A1552R en aérobiose et en anaérobiose.	68

Liste des figures

Figure 1	<i>Identification de Vibrio cholerae par Filippo Pacini en 1854.</i>	3
Figure 2	<i>Transmissions responsables des épidémies constituant la 7^e pandémie de choléra.</i> ..	4
Figure 3	<i>État actuel des épidémies de choléra dans le monde au début de 2023.</i>	5
Figure 4	<i>Modèle représentant les différentes étapes permettant la colonisation de l'intestin par V. cholerae.</i>	15
Figure 5	<i>La chaîne de transport des électrons de V. cholerae est différente selon l'accepteur final d'électrons.</i>	17
Figure 6	<i>Modèle classique du développement d'un biofilm</i>	22
Figure 7	<i>Le rôle du quorum sensing (QS) dans le développement du biofilm.</i>	26
Figure 8	<i>Morphologie coloniale de V. cholerae lisse et de son variant rugueux après 24 h sur un milieu LB-Agar.</i>	31
Figure 9	<i>Morphologie coloniale du variant rugueux V. cholerae A1552 et de mutants comportant des délétion des gènes de structure du biofilm.</i>	33
Figure 10	<i>Cibles de l'action des antibiotiques</i>	40
Figure 11	<i>Les mécanismes moléculaires de résistance aux antibiotiques.</i>	44
Figure 12	<i>Les cinq classes de structure 3D des PAM.</i>	46
Figure 13	<i>Les mécanismes d'action des PAM sur la membrane externe.</i>	47
Figure 14	<i>Modèle d'interaction de la Polymyxine B avec la membrane externe</i>	49
Figure 15	<i>Les mécanismes des résistances aux antibiotiques chez V. cholerae.</i>	53
Figure 16	<i>Antibiogramme de V. cholerae selon la température de croissance et la salinité du milieu de culture.</i>	66
Figure 17	<i>Croissance de V. cholerae A1552 et A1552R selon différentes concentrations de PmB en conditions (A) aérobie et (B) anaérobie.</i>	69
Figure 18	<i>Production de biofilm chez V. cholerae A1552 et des mutants de A1552R selon la disponibilité en oxygène dans le milieu de croissance.</i>	71
Figure 19	<i>Production de biofilm chez V. cholerae A1552 et des mutants de A1552R selon la disponibilité en oxygène, après un changement de milieu.</i>	73

Figure 20	<i>Production de biofilm chez V. cholerae A1552 et des mutants de A1552R selon différentes concentrations de PmB.</i>	74
Figure 21	<i>Biomasse de biofilm mature chez V. cholerae A1552 et des mutants de A1552R après 24 h de traitement avec différentes concentrations de PmB selon la disponibilité en oxygène.</i>	76
Figure 22	<i>Tests de concentration minimale inhibitrice, de formation et de résistance des biofilms sur les bactéries isolés des biofilms traités à 1600 µg/ml de PmB.</i>	78
Figure 23	<i>Production de biofilm chez V. cholerae A1552 et des mutants de A1552R selon différentes concentrations de PmB.</i>	80
Figure 24	<i>Biomasse de biofilm mature chez des mutants de V. cholerae A1552R après 24 h de traitement avec différentes concentrations de PmB.</i>	82
Figure 25	<i>Microscopie sur des biofilms préformé de A1552R traités à la PmB selon une coloration au cristal violet et au Hoechst 33342.</i>	84
Figure 26	<i>Formation de biofilms de V. cholerae A1552 pKEN2 dans un système de microflux avec et sans 6 µg/ml de PmB.</i>	85
Figure 27	<i>Impact de la PmB sur des biofilms matures dans un système de microflux.</i>	86
Figure 28	<i>Expression des gènes de structures du biofilm après 1 h d'exposition à la PmB.</i>	88
Figure 29	<i>Expression des gènes de structures du biofilm après 6 h d'exposition à la PmB.</i>	89
Figure 30	<i>Expression des gènes de structures du biofilm après 15 minutes d'exposition à 1600 µg/ml de PmB.</i>	90
Figure 31	<i>Test de survie des bactéries au sein d'un biofilm traité à 1600 µg/ml de Polymyxine B pendant 2 heures.</i>	91
Figure 32	<i>Fluorescence de l'ADN dans les biofilms traités à la PmB selon deux colorants.</i>	93
Figure 33	<i>Impact de différentes concentrations de PmB sur des colonies matures.</i>	94

Liste des sigles et abréviations

AC : adénylate cyclase

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNe : ADN extracellulaire

ADP : Adénosine diphosphate

AEA : Accepteur alternatif d'électrons

AMR : Résistance aux antimicrobiens

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomale

ARNt : ARN de transport

ATP : Adénosine triphosphate

Azy : Azithromycine

cAMP : Adénosine cyclique monophosphate

c-di-GMP : Di-guanosine monophosphate cyclique

Cipro : Ciprofloxacine

Cm : Chloramphénicol

CT : Toxine cholérique

DMSO : dimethyl sulfoxide

Doxy : Doxycycline

EPS : substances polymériques extracellulaires

Éry : Érythromycine

ICE : éléments de conjugaison intégrants

IS : séquence d'insertion

Kan : Kanamycine

LB : Lysogeny Broth

LPS : lipopolysaccharide

MHA : Mueller-Hinton Agar

MSHA : pili de type IV hémagglutinine mannose-dépendant

MRSA : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

OMP : protéine de la membrane externe

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAM : Peptides antimicrobiens

PAMC : peptide antimicrobien cationique

PBP : protéines liant la pénicilline

PBP2a : protéines liant la pénicilline additionnelle

PCR : Réaction en chaîne par polymérase

PI : iodure de propidium

PmB : Polymyxine B

qPCR : PCR Quantitatif

QS : « quorum sensing »

Spec : Spectinomycine

Strep : Streptomycine

Tétra : Tétracycline

TMAO : triméthylamine N-oxide

T2SS : système de sécrétion de type 2

T6SS : système de sécrétion de type 6

V. cholerae : *Vibrio cholerae*

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

VPI : îlot de pathogénicité de *Vibrio*

VPS : vibrio-polysaccharide

À ma mère, qui n'aura jamais cessé de m'encourager.

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de recherche Marylise Duperthuy, une femme intelligente, inventive et chaleureuse qui se distingue par ses qualités humaines. Merci d'avoir choisi de me faire confiance pour faire ma maîtrise dans ton laboratoire.

Je veux également remercier ma collègue Annabelle, la chercheuse la plus dévouée et foncière que je connais. J'espère qu'on va continuer à s'envoyer des photos de chats pour toujours.

Merci à tous mes collègues avec qui j'ai partagé de beaux moments au laboratoire.

Je veux remercier également les membres de laboratoire Daigle pour avoir partagé des conversations de corridor avec moi et l'entraide continue dans nos projets.

Merci aux membres de mon jury de correction, la Dre France Daigle et le Dr Éric Déziel.

Je veux aussi remercier ma famille pour avoir cru en moi dans mon parcours académique et m'avoir offert le soutien dont j'avais besoin. Merci d'avoir cru en mes capacités.

Merci à ma ~~soeur~~, Dave, je te souhaite une carrière épanouissante de travailleuse sociale.

Merci à mon chat Gustav pour les séances de zoothérapies infinies.

Finalement, je veux remercier mon amoureux Alexandre, merci d'avoir été présent dans les moments difficiles et de rendre la vie plus belle et plus agréable à chaque jour qu'on passe ensemble.

Introduction

Le vibron cholérique, ou *Vibrio cholerae* de son nom latin, est une bactérie à Gram négatif incurvée et mobile de la famille des *Vibrionaceae*. Cette bactérie aquatique se trouve naturellement dans une multitude d'environnements marins où elle peut exprimer un mode de vie planctonique ou être intégrée dans un biofilm. Les sérotypes O1 et O139 de *V. cholerae* sont également réputés pour causer une grave toxi-infection chez l'homme, connue cliniquement sous le nom du choléra, lors de l'ingestion de denrées contaminées (Clemens et al., 2017). Cette infection très virulente est caractérisée par de sévères diarrhées aqueuses qui mènent à une grave déshydratation générale qui peut entraîner la mort quelques heures après le début des symptômes (Azman et al., 2013). Bien que cette maladie soit célèbre depuis l'antiquité, il faudra attendre plusieurs milliers d'années avant la découverte en 1854 par Filippo Pacini de son agent étiologique (Lippi & Gotuzzo, 2014). On recense 7 pandémies depuis le 19^e siècle qui ont affectées majoritairement l'Afrique du Nord, mais également l'Europe, le Moyen-Orient et l'Asie (Cvjetanovic & Barua, 1972). Aujourd'hui, plus de 150 ans après la découverte de *V. cholerae*, une simple recherche dans l'actualité des derniers mois montre que le choléra fait encore des ravages chez les populations vulnérables, par exemple récemment au Malawi en Afrique de l'Ouest (Nakkazi, 2023). Dans un contexte grandissant de problèmes de santé publique liés à la résistance aux antibiotiques des bactéries, je m'intéresse à la résistance de *V. cholerae* aux agents antimicrobiens, en fonction de son environnement et de son mode de vie en biofilm, étant donné que les souches en circulation sont de plus en plus résistantes aux antibiothérapies (Das et al., 2020).

Chapitre 1 – Épidémiologie & Histoire

3.3 — L’histoire du choléra

Les premières mentions du choléra dans l’histoire nous viennent de l’antiquité, où la maladie était déjà décrite par Hippocrate comme un « flot de biles » (Howard-Jones, 1974). Au courant du 15^e au 18^e siècle, plusieurs épidémies de maladies diarrhéiques en Europe furent attribuées au choléra et causèrent des milliers de morts (Howard-Jones, 1974; MacPherson, 1872). Il n’était pas possible de déterminer si ces cas de choléra étaient vraiment liés à la bactérie *V. cholerae*, puisqu’à l’époque ces symptômes pouvaient être facilement confondus par d’autres maladies qui causent des diarrhées (Barua, 1992). Il faudra attendre le 19^e siècle et les avancés de la médecine moderne pour faire un lien entre la maladie et son agent étiologique, le vibrion cholérique.

C’est en 1854 que le docteur John Snow fit le lien entre les eaux contaminées de Londres et l’épidémie de choléra dont souffrait le district de Soho. En utilisant une carte pour recenser les malades, il détermina que les malades étaient concentrés autour d’une source d’eau commune, la pompe de Broad Street. Il fit retirer le manche de la pompe, ce qui aura pour conséquence le déclin du choléra à Londres (Lippi et al., 2016). Plus tard, John Snow arriva à faire un lien entre le nombre important de malades qui s’abreuvait en aval de la rivière Tamise, par opposition à ceux qui s’abreuvait en amont qui tombait moins malade du choléra (Tulchinsky, 2018). Les découvertes du docteur John Snow permettront de mettre en valeur le caractère aquatique de la maladie et contribueront à rejeter la théorie des miasmes, qui stipulait que le « mauvais air » était responsable de la dissémination des maladies (Halliday, 2001).

C’est également en 1854, en Italie, que le vibrion cholérique fut identifié pour la première fois par Filippo Pacini, qui décrit de petits bacilles en forme de virgule (Lippi et al., 2016) (Fig. 1). Il suggéra aussi de traiter les patients atteints de choléra avec une intraveineuse d’eau salée, un traitement qui encore aujourd’hui est le traitement de choix pour traiter le choléra, ce qui permet de sauver des vies. Malheureusement, ses découvertes ne furent pas acceptées par la communauté scientifique qui préférait alors la théorie des miasmes. Il faudra attendre 1883, pour que Robert

Koch soit en mesure d'isoler la bactérie en culture pure pour que le lien entre le vibron cholérique et la maladie du choléra soit acceptée par la communauté scientifique (Lippi & Gotuzzo, 2014).



Figure 1

Identification de Vibrio cholerae par Filippo Pacini en 1854.

Il s'agit de la première identification de la bactérie *V. cholerae* à l'université de Florence en 1854 par le biologiste *Filippo Pacini*. Soit 29 ans avant la revendication de la découverte du vibron cholérique par Robert Koch en 1883 (Lippi & Gotuzzo, 2014). Reproduction sous la permission de Elsevier Ltd pour utilisation dans un mémoire (Numéro de licence : 5560860707345).

1.2 — Les pandémies de choléra

On recense 6 pandémies de choléra depuis le début du 19^e siècle et les années 1920s. Ces pandémies ont majoritairement touché le Moyen-Orient et l'Afrique, mais elles se sont répandues un peu partout en touchant l'Europe, l'Asie, l'Australie et même les Amériques au milieu du 19^e siècle (Clemens et al., 2017). Ces pandémies ont des origines variées, mais elles ont toujours un lien avec les déplacements des populations, comme les guerres et catastrophes naturelles. Le pèlerinage à La Mecque est responsable d'au moins trois de ces pandémies lorsque les pèlerins ont rapporté la maladie (Barua, 1992). On estime qu'ensemble, ces 6 pandémies ont causé la mort de 6 à 13 millions de personnes (Høiby, 2021; Lekshmi et al., 2018). Aujourd'hui, nous sommes dans la 7^e pandémie de choléra depuis les années 1960 à cause de l'émergence des vibriens séro groupe O1 El Tor (Cvjetanovic & Barua, 1972). *V. cholerae* O1 El Tor fût isolé pour la première fois en 1905 chez des pèlerins en provenance de l'île de Célèbes en Indonésie, où la bactérie sera endémique jusque dans les années 1960. Après plusieurs épidémies restreintes à

Célèbes, l'infection s'est répandue dans les pays voisins, ce qui marque le début de la 7^e pandémie de choléra, la première des biotypes El Tor (Barua, 1992; Mukhopadhyay et al., 2014). Les biotypes El Tor ont la particularité d'être très persistants dans l'environnement en plus d'un taux d'infections asymptomatiques plus élevé, ce qui complique les efforts pour combattre la pandémie en cours (Cvjetanovic & Barua, 1972; Lekshmi et al., 2018). La figure 2 illustre bien l'étendue des événements d'infections de la 7^e pandémie de choléra des années 1960 à la fin des années 2000 (Mutreja et al., 2011). Certains auteurs parlent également d'une 8^e pandémie en parallèle qui aurait commencé en 1992 avec le sérotype O139 (Høiby, 2021).

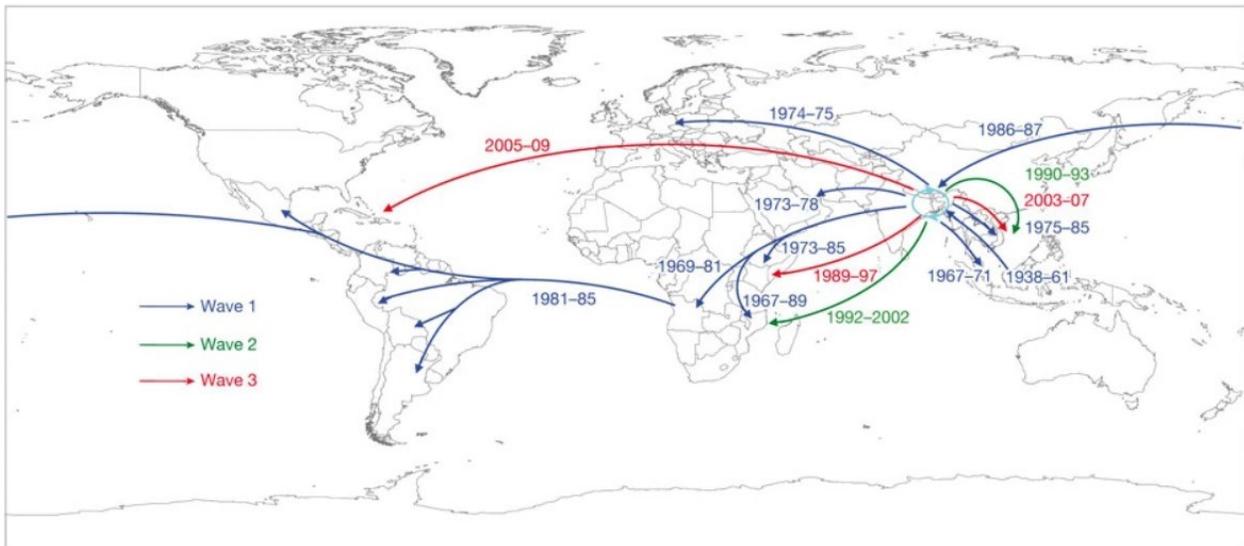


Figure 2

Transmissions responsables des épidémies constituant la 7^e pandémie de choléra.

Le choléra s'est répandu depuis le Moyen-Orient au cours de plusieurs événements de transmissions qui définissent les 7 pandémies de choléra (Mutreja et al., 2011). Reproduction sous la permission de *Springer Nature Limited* pour utilisation dans un mémoire (Numéro de licence : 5560871246786).

1.3 — Le choléra aujourd'hui

De nos jours, les épidémies de choléra sont surtout en lien avec les catastrophes naturelles et humanitaires, comme les guerres. Un des exemples majeurs d'épidémie dans la dernière décennie fut causée par le tremblement de terre en Haïti de 2010. L'introduction malheureuse de *V. cholerae* O1 El Tor par des bénévoles humanitaires asymptomatiques en provenance du

Népal provoqua une épidémie majeure qui causera plus de 820 000 cas de choléra et 9 792 morts selon des chiffres de 2019 (Orata et al., 2014; Rubin et al., 2022). En 2022, alors qu'aucun cas n'était répertorié depuis plus de 3 ans, une nouvelle éclosion a eu lieu en novembre et l'épidémie se poursuit en 2023 avec plus de 20 000 cas suspects de choléra (Ocasio, 2023).

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la 7^e pandémie de choléra est en résurgence depuis 2021, où plus de 23 pays d'Afrique et du Moyen-Orient ont signalé des épidémies. L'OMS considère que le risque que l'infection se propage aux pays voisins est très élevé, considérant la précarité des systèmes de santé des pays concernés en plus des changements climatiques et des crises humanitaires auxquels font face certains pays comme le Yémen. En 2023, le nombre d'infections est estimé à 2,9 millions de cas par an par qui se traduirait par 95 000 morts par années (World Health Organization, 2023) (Fig. 3).



The designations employed and the presentation of the material in this publication do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of WHO concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted and dashed lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement.

Data Source: World Health Organization
Map Production: WHO Health Emergencies Programme
Map Date: 3 February 2023



Figure 3

État actuel des épidémies de choléra dans le monde au début de 2023.

Le choléra reste un problème de santé persistant en 2023 avec une explosion des cas en début d'année au Moyen-Orient et en Afrique subsaharienne (World Health Organization, 2023). Reproduction sous la permission de l'OMS pour utilisation dans un mémoire (Numéro de licence : 393341).

Chapitre 2 — L'épidémiologie du choléra

2.1 — Le choléra et les populations à risque

Le choléra est une toxi-infection qui se développe à la suite d'ingestion d'eau ou de denrées alimentaires contaminées par la bactérie *V. cholerae*. Il s'agit donc d'une infection qui utilise la voie fécale orale pour se disséminer, puisque les personnes contaminées excrètent une grande quantité de bactéries. La dose infectieuse des souches El Tor est relativement élevée, soit 10^8 bactéries (Clemens et al., 2017). Les patients qui survivent à l'infection développent une immunité naturelle au choléra, ce qui leur apporte une protection d'approximativement 90 % contre les réinfections (Harris, 2018). Les enfants de moins de 5 ans représentent donc le groupe le plus à risque de subir une infection grave à cause de leur absence d'immunité naturelle (Clemens et al., 2017). Cependant, lorsque le pathogène est introduit dans une nouvelle population qui n'a pas développé d'immunité naturelle, tous les membres de la population sont également à risque d'être infectés (Nelson et al., 2009). Bien que l'immunité naturelle soit très efficace contre les réinfections, celle-ci est limitée au sérotype responsable de l'infection initiale, car il n'y a pas de preuve que l'immunité naturelle protège contre les infections aux autres sérotypes (Ali et al., 2011).

Les populations à risque se trouvent dans les différentes zones endémiques du globe, principalement l'est de l'Afrique, le Moyen-Orient et l'Asie. La difficulté de l'accès à l'eau potable des populations est le principal facteur de risque de provoquer une épidémie au choléra (Richterman et al., 2018). Les bactéries étant aquatiques, elles perdurent dans les réserves d'eaux contaminées et dans les étendues d'eau stagnante. La quantité de vibrions dans l'eau peut être particulièrement élevée lorsqu'elle est contaminée par des déjections provenant des porteurs de la bactérie (Sack et al., 2004). Les sinistrés et les migrants qui se retrouvent souvent dans des camps où l'accès à l'eau potable et l'hygiène de base sont difficiles représentent un groupe à risque accru de développer une infection à *V. cholerae*. De plus, les taux élevés de malnutrition et l'absence de soin font exploser le taux de mortalité au choléra dans les campements de réfugiés (Shannon et al., 2019).

2.2 — La transmission

La transmission du choléra est directement liée à la présence des bactéries dans les environnements aquatiques. Étant donné la nature hautement transmissible de la maladie, une infection depuis une source environnementale de choléra peut facilement conduire à une épidémie. Les diarrhées des patients souffrant de choléra contiennent un nombre élevé de bactéries, soit entre 10^{10} et 10^{12} vibrions par litre qui peuvent être relâchés dans l'environnement immédiat (Nelson et al., 2009). On assiste donc à une augmentation exponentielle des vibrions relâchés dans l'environnement dès que les épisodes diarrhéiques commencent (Mandal et al., 2011).

La nourriture manipulée dans des conditions non hygiéniques et contaminée par des matières fécales peut également être un vecteur de transmission de *V. cholerae*. La nourriture contaminée est un facteur de risque important dans les pays en développement où l'hygiène alimentaire est déficiente (Rabhani & Greenough III, 1999). Cependant, des épisodes de contamination par les aliments peuvent également avoir lieu dans les pays industrialisés et déclencher des épidémies, notamment par des fruits de mer contaminés. La contamination des denrées dans les pays industrialisés est à risque de se reproduire à la lumière des changements climatiques qui peuvent étendre la niche écologique de *V. cholerae* (Kim et al., 2018). L'ingestion de nourriture contaminée peut également augmenter le risque d'infection, car certains types de nourriture peuvent augmenter le pH de l'estomac, ce qui peut augmenter la survie des bactéries en les protégeant contre l'acidité gastrique (Hornick et al., 1971).

2.3 — Les symptômes du choléra

Le symptôme principal qui définit le choléra est la présence d'abondantes diarrhées aqueuses qui ont une texture et couleur « d'eau de riz », souvent accompagnée de vomissements. La perte de fluides peut atteindre 1 litre par heure chez un adulte, ce qui mène rapidement à une déshydratation générale (Nelson et al., 2009). La déshydratation apporte de nouveaux symptômes plus graves, tels un pouls et une pression artérielle faible, une perte de turgescence cutanée et la léthargie (Sack et al., 2004). Le symptôme le plus dangereux est un choc hypovolémique, ce qui mène à une absence de circulation sanguine, un coma et éventuellement

la mort en absence d'une thérapie de réhydratation d'urgence. Une déshydratation aussi rapide peut engendrer la mort en quelques heures, ce qui rend le choléra particulièrement mortel en absence de traitement approprié (Clemens et al., 2017).

Ce n'est pas toutes les formes de choléra qui sont sévères, on estime qu'environ 2 à 5 % des personnes qui tombent malades vont développer une forme grave (Valcin et al., 2013). La sévérité des symptômes peut varier selon plusieurs facteurs tels que l'acidité de l'estomac, le groupe sanguin et la présence d'une immunité naturelle (Deen et al., 2020; Van Loon et al., 1990). Par exemple, des études ont démontré que les individus du groupe sanguin O sont plus susceptibles de développer une infection sévère à cause d'une sensibilité accrue à la toxine cholérique (Kuhlmann et al., 2016). Suivant l'infection, la maladie se développe suivant une période d'incubation qui peut durer de 18 heures à 5 jours (Sack et al., 2004). Chez les formes graves de la maladie, la mortalité peut être supérieure à 50 % des cas, mais avec des soins appropriés, le taux de mortalité peut descendre en dessous de 1 % (Clemens et al., 2017).

2.4 — Le traitement du choléra

La réhydratation est le traitement par excellence pour les patients atteints de choléra. Le but est de remplacer le liquide qui a été perdu par les diarrhées afin de rétablir la circulation sanguine. La réhydratation peut être orale pour les cas moins graves, mais doit être intraveineuse pour les symptômes de déshydratation sévère (Sack et al., 2004). Une thérapie aux antibiotiques peut être également utilisée dans les cas les plus graves de la maladie. La prise d'antibiotiques permet de réduire la gravité des symptômes et met fin aux épisodes diarrhéiques plus rapidement. En plus de diminuer les symptômes, la thérapie aux antibiotiques permet de réduire le nombre de bactéries présent dans les selles des patients, ce qui aide à limiter la contagion de la maladie (Mandal et al., 2011). La doxycycline est l'antibiotique traditionnellement utilisé en une seule dose de 300 mg. De nos jours, la résistance à la doxycycline réduit l'efficacité du traitement dans certaines régions, alors le choléra est majoritairement traité avec des antibiotiques de la famille des macrolides, soit l'azithromycine ou l'érythromycine. Dans le cas de résistance aux macrolides, la ciprofloxacine est utilisée comme antibiotique de dernier recours (Clemens et al., 2017).

2.5 — Vaccins contre le choléra

Il existe 3 vaccins oraux contre le choléra qui sont approuvés par l’OMS : Dukoral®, Shanchol™, et Euvichol-Plus®. Chacun de ces vaccins se prend en deux doses, ce qui permet de mieux contrôler les éclosions dans les régions endémiques. Cependant, la durée de protection qu’offrent ces vaccins est très limitée, soit 2 à 3 ans (World Health Organization, 2022). L’efficacité des vaccins est très variable selon les populations et les études publiées, on note une efficacité qui varie de 50 à 80 % en moyenne pour les trois vaccins sur une durée de 2 ans (Song et al., 2021). Les vaccins sont principalement utilisés dans les régions endémiques lors d’éclosions de cas de choléra afin de limiter la propagation de la maladie. Ils sont aussi disponibles aux voyageurs qui se dirigent vers les zones à haut risque. Malgré la disponibilité des vaccins, la meilleure prévention contre le choléra reste l’accès à des sources d’eau potable et à des normes sanitaires élevées entourant les denrées alimentaires (World Health Organization, 2022).

Chapitre 3 — *V. cholerae* et son environnement naturel

3.1 — Les *Vibrionaceae*

Vibrio cholerae appartient aux *Vibrionaceae*, il s'agit d'une famille de bactéries aquatiques indigènes des eaux chaudes océaniques en régions tropicales, des estuaires et des eaux côtières. Les vibrions sont souvent en association avec des animaux invertébrés marins, particulièrement les crustacés et les mollusques comme les huîtres (Kingsley, 2014). On retrouve plusieurs pathogènes parmi les *Vibrionaceae* qui peuvent poser des problèmes dans le secteur des pêcheries, notamment *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, et *V. vulnificus* qui peuvent causer des gastroentérites plus ou moins graves selon l'espèce (Wright & Montazeri, 2021). On trouve également des bactéries symbiotiques des animaux marins, comme l'exemple de *V. fischeri* et sa relation avec *Euprymna scolopes*, une seiche hawaïenne. La seiche offre une niche écologique pour la bactérie, qui en retour produit une bioluminescence, ce qui donne un avantage de survie à la seiche face aux prédateurs. Il s'agit d'un des exemples les plus étudiés d'interaction symbiotique entre un animal et une bactérie (Dunn, 2012). Il existe plusieurs autres interactions interspèces impliquant des membres des *Vibrionaceae*, notamment avec les animaux producteurs de chitine. Par exemple, *V. parahaemolyticus* est capable de se développer sur l'exosquelette de chitine de certains crustacés et zooplanctons, ce qui lui offre une niche écologique avantageuse en plus d'affecter sa distribution saisonnière dans les environnements marins (Kaneko & Colwell, 1975). À cause de cette association avec la chitine, les vibrions posent constamment des problèmes de salubrité alimentaire avec les animaux marins comestibles comme l'huître, qui de plus est souvent consommée crue. On estime qu'environ 8000 cas par années de gastroentérites sont causés par *V. parahaemolyticus* aux États-Unis, à cause de la consommation de fruits de mer contaminés (Wright & Montazeri, 2021).

3.2 — *Vibrio cholerae*

Comme les autres membres des *Vibrionaceae*, *V. cholerae* est une bactérie hétérotrophe avec un mode de vie aquatique et se retrouve principalement dans les estuaires. Cette bactérie comprend un arsenal varié de gènes répartis sur deux chromosomes circulaires (I et II) selon une

organisation complexe (Trucksis et al., 1998). La présence de vibrions dans l'eau suit une variabilité saisonnière avec une plus forte population durant les mois les plus chauds de l'été, car sa température optimale de croissance se situe entre 20°C et 37°C (Barua, 1992). *V. cholerae* est une bactérie également très halotolérante, elle peut survivre à une salinité de 25 %, mais la meilleure concentration de sel pour sa croissance se trouve à 1,8 % de NaCl (Singleton et al., 1982). Dans l'environnement marin des zones endémiques, on trouve d'importantes populations de vibron en association avec des animaux marins comme les huîtres ou les crabes, mais principalement avec les microalgues et le zooplancton (Barua, 1992). Cette association lui offre une persistance dans les eaux avoisinantes aux zones habitées par l'homme, ce qui rend l'éradication de la maladie quasi impossible dans les zones endémiques puisque même sans cas actif de choléra dans la population, l'agent pathogène reste présent dans l'environnement immédiat (Sack et al., 2004). Les changements climatiques ayant un impact sur la prolifération des phytoplanctons et zooplanctons, les zones endémiques de *V. cholerae* risquent de s'élargir et atteindre de nouveaux pays en suivant la dispersion des espèces de planctons selon le réchauffement des eaux (Colwell, 1996; Trinanes & Martinez-Urtaza, 2021). Dans l'environnement aquatique, *V. cholerae* peut s'adapter à son environnement immédiat en alternant entre un mode de vie sédentaire attaché à une surface, donc sous forme de biofilm, ou en étant mobile sous la forme d'une bactérie planctonique (Cottingham et al., 2003).

3.3 — Biofilms environnementaux

Le mode de vie en biofilm, c'est-à-dire une communauté bactérienne souvent attachée à une surface et enveloppée dans une matrice d'exopolysaccharides, d'ADN et de protéines (voir chapitre 5), procure plusieurs avantages aux bactéries, comme une augmentation de la résistance aux stress environnementaux et une meilleure persistance. *V. cholerae* peut adhérer à la surface de chitine de l'exosquelette des différentes espèces de zooplancton et d'animaux marins pour y former un biofilm. Cette association lui donne l'accès à un micro-environnement riche en nutriments, car à l'aide de ses chitinases, elle peut se nourrir directement sur les polymères de chitine pour y extraire du carbone (Cottingham et al., 2003). De plus, les déchets métaboliques des animaux planctoniques peuvent également être une source de nutriments pour les bactéries du biofilm (Islam et al., 1994). Il est également avantageux de former un biofilm sur le plancton

pour profiter de la mobilité de l'animal ce qui permet l'accès à de nouveaux environnements riches en nutriments en plus d'augmenter la dispersion des bactéries (Lutz et al., 2013).

3.4 — Viable mais non cultivable

En réponse à des conditions environnementales non favorables, *V. cholerae* peut transitionner dans un stade viable, mais non cultivable (VBNC). Dans ce mode de vie, les bactéries ne peuvent pas être cultivées aussi simplement sur des géloses en laboratoire même si elles maintiennent encore des fonctions physiologiques (Nilsson et al., 1991). On note également des changements dans la morphologie, telle que la perte du flagelle, une diminution de la taille et une forme arrondie. Au niveau physiologique, les VBNC ont un métabolisme ralenti et ne divisent plus. Sous cette forme, les bactéries peuvent perdurer longtemps permettant la survie des bactéries sur de longues périodes dans des conditions de croissance défavorables (Cottingham et al., 2003). Les VBNC sont surtout présentes dans l'environnement aquatique et au sein des biofilms environnementaux où elles font office de réservoir entre les épidémies (Alam et al., 2007). Cependant, *V. cholerae* demeure un problème de santé même sous cette forme, car malgré une activité métabolique réduite, elle demeure capable d'infecter les humains (Colwell, 1996).

Ces différentes adaptations permettent à *V. cholerae* d'augmenter sa survie et sa persistance dans l'environnement aquatique. Notamment en résistant davantage aux prédateurs protistes, aux bactériophages, aux variations de température et à l'absence de nutriments (Lutz et al., 2013).

Chapitre 4 — *V. cholerae* dans le cadre infectieux

La pathogénèse de *V. cholerae* est un processus complexe en fonction de plusieurs adaptations physiologiques et de changements des patrons d'expression des gènes afin de répondre à l'environnement immédiat qui est très différent de sa niche écologique naturelle. Les différences de cette nouvelle niche, soit l'intestin humain, se trouvent au niveau de la température, l'osmolarité, l'absence d'oxygène et de la présence des effecteurs du système immunitaire, incluant des peptides antimicrobiens (PAM). L'infection comporte deux étapes très critiques, soit la colonisation de l'intestin et la production de la toxine cholérique (Clemens et al., 2017).

4.1 — Traverser la barrière d'acidité

L'infection à *V. cholerae* commence avec l'ingestion d'une quantité suffisamment élevée de bactéries à partir de denrées ou d'eau contaminées. La première barrière naturelle à l'infection est l'importante acidité de l'estomac. Les bactéries planctoniques sont les plus susceptibles à l'acide gastrique et une forte majorité ne survivra pas au passage dans l'estomac (Hsiao & Zhu, 2020). Une première stratégie pour survivre à l'acidité gastrique est la transition du stade des bactéries planctoniques au stade VBNC. En effet, les VBNC survivent mieux à l'acidité que les bactéries planctoniques et peuvent révéler en bactéries infectieuses une fois l'intestin atteint (Singh & Barnard, 2016). Cependant, la meilleure stratégie pour traverser la barrière acide de l'estomac est de faire partie d'un agrégat de biofilm. Des études ont démontré que les bactéries faisant partie d'un biofilm de *V. cholerae* survivent jusqu'à 1000 fois mieux à l'acidité de l'estomac que les cellules libres (Zhu & Mekalanos, 2003). De plus, les bactéries qui se sont développées dans un biofilm présentent un phénotype hyperinfectieux, caractérisé par une expression importante des gènes de virulence, ce qui diminue la dose infectieuse nécessaire pour aller coloniser la muqueuse intestinale (Gallego-Hernandez et al., 2020; Tamayo et al., 2010). Arrivées dans le petit intestin, les bactéries du biofilm doivent être relâchées pour aller pénétrer la muqueuse intestinale. Des facteurs de l'hôte comme la bile envoient des messages de dispersion au biofilm en agissant comme signal pour activer la virulence et le relâchement des bactéries du biofilm (Hay & Zhu, 2015).

4.2 — Colonisation de la muqueuse intestinale

V. cholerae possède des gènes de résistance à la bile et aux agents antimicrobiens qui permettent aux bactéries relâchées dans le petit intestin de survivre en dehors du biofilm. La porine OmpU notamment, procure une résistance aux sels biliaires, aux PAM du système immunitaire, comme les défensines, et à la polymyxine B (PmB) (Almagro-Moreno et al., 2015; Mathur & Waldor, 2004). La mobilité est essentielle à la dissémination des bactéries dans l'intestin afin d'aller rejoindre la muqueuse intestinale. *V. cholerae* est une bactérie très mobile grâce à son flagelle monotriche. L'absence de motilité est corrélée avec une diminution de la virulence des bactéries (Guentzel & Berry, 1975). Les bactéries doivent pénétrer la muqueuse pour aller rejoindre l'épithélium intestinal. C'est principalement à l'aide d'enzymes, les mucinases, qui sont capables de dégrader la mucine, une des protéines les plus importantes de la muqueuse intestinale, que les vibrions se fraient un chemin jusqu'à l'épithélium (Silva et al., 2003). Les vibrions ont besoin principalement de deux facteurs de virulence essentiels pour coloniser l'intestin : la toxine cholérique (CT) et le pilus corégulé avec la toxine (TCP) (Hsiao & Zhu, 2020). Ces deux effecteurs, provenant d'un phage, sont codés par des opérons, qui sont eux-mêmes sous le contrôle du régulateur ToxT et d'une complexe cascade de gènes qui ont, entre autres, pour rôle de coordonner l'expression de la virulence chez *V. cholerae* (Hsiao & Zhu, 2020). Les bactéries adhèrent à l'épithélium à l'aide d'un éventail d'adhésines et grâce à l'activité de TCP qui facilite les interactions entre les bactéries, ce qui permet de coloniser le tractus intestinal (Almagro-Moreno et al., 2015). À la surface de l'épithélium, les vibrions se divisent et forment de microcolonies maintenues ensemble par des pili TCP. Ces microcolonies formées à la surface de la muqueuse intestinale ont une mobilité réduite, mais sont très virulentes et pourraient potentiellement résister mieux à l'acide gastrique de l'hôte (Almagro-Moreno et al., 2015). On trouve aussi des microcolonies au sein des biofilms matures et des agrégats de biofilm (voir chapitre 5). La figure 4 tirée de la revue de littérature de Almagro-Moreno et al. propose un schéma simplifié des différentes étapes de la colonisation de l'intestin par *V. cholerae*.

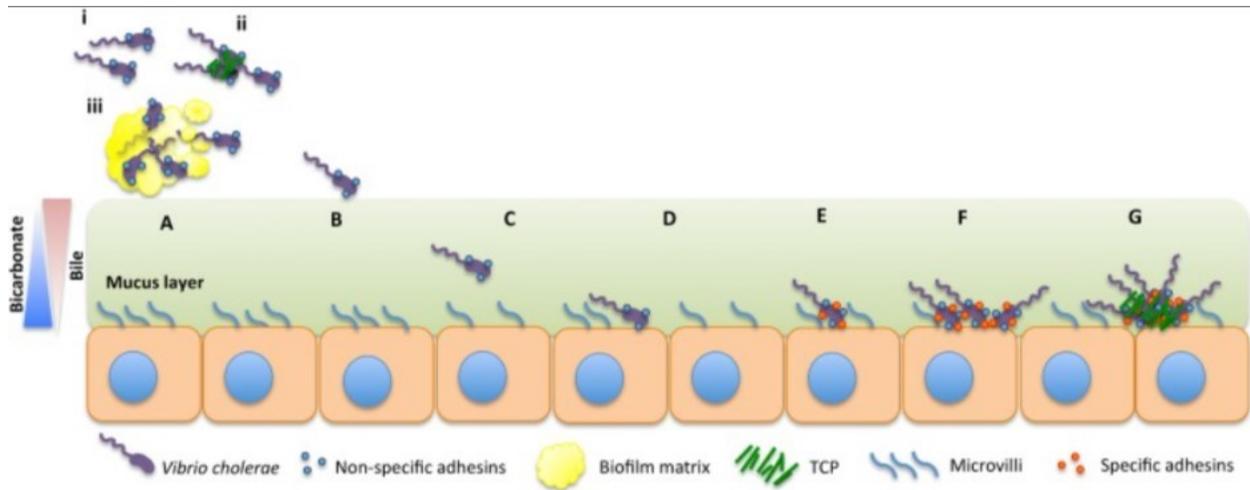


Figure 4

Modèle représentant les différentes étapes permettant la colonisation de l'intestin par V. cholerae.

(A) *V. cholerae* est ingéré soit sous forme de (i) cellules planctoniques, (ii) de microcolonies ou (iii) d'agrégats de biofilm. (B) Les bactéries qui se retrouvent dans l'intestin arrivent d'abord en contact avec la muqueuse intestinale. (C) Les bactéries devront ensuite traverser la couche visqueuse de la muqueuse pour y atteindre l'épithélium intestinal. (D) À la suite du contact avec l'épithélium intestinal, une adhésion réversible a lieu, à l'aide des adhésines GbpA ou Mam7. (E) Des adhésines plus spécialisées sont ensuite produites pour permettre à *V. cholerae* d'adhérer, (F) les cellules se multiplient et, à partir d'une certaine concentration de bactéries, TCP est produit, (G) ce qui mène à la formation de microcolonies et à la sécrétion de CT (Almagro-Moreno et al., 2015). [Traduction libre] Reproduction sous la permission de Creative Commons (CC BY 4.0).

4.3 — La toxine cholérique

Une fois installé sur l'épithélium intestinal, *V. cholerae* peut sécréter sa toxine CT à l'aide d'un système de sécrétion de type 2 (T2SS). CT est une toxine de type AB, dont la partie A possède l'activité enzymatique et la partie B permet l'internalisation de la toxine dans les cellules de l'hôte. La toxine sécrétée à la surface des cellules épithéliales pourra lier sa sous-unité B au récepteur ganglioside GM1 afin d'être internalisée (Zielke et al., 2014). Dans le cytosol de la cellule hôte, la sous-unité A interagit avec une protéine G régulatrice grâce à son activité d'ADP-ribosylation. Cette interaction mène à l'activation constitutive de cette protéine G, dont le rôle est la régulation

de l'activité de l'adénylate cyclase (AC). En conséquence, il y a une augmentation rapide de l'adénosine cyclique monophosphate (cAMP) intracellulaire, ce qui mène à la sécrétion d'une importante quantité de liquide dans le lumen intestinal (Vanden Broeck et al., 2007). À l'échelle de plusieurs cellules infectées, cette sécrétion de liquide se traduit par les importantes diarrhées typiques du choléra.

Il est intéressant de noter que les gènes de la toxine cholérique, les gènes *ctx*, proviennent d'un phage lysogénique, le phage CTXΦ, qui est intégré dans le chromosome I de *V. cholerae*. Ce bactériophage lysogénique porte aussi les gènes de facteur de colonisation qui codent pour le pilus corégulé avec la toxine, les gènes *tcp*. L'ensemble des gènes du phage représente un îlot de pathogénicité de *Vibrio* (VPI) et n'est pas présent dans les souches non pathogènes de *V. cholerae* (Waldor & Mekalanos, 1996).

4.4 — Adaptation à l'anaérobiose

Compte tenu de la faible teneur en oxygène dans l'intestin humain, *V. cholerae* est capable de pratiquer la respiration anaérobie en plus de la fermentation. Tout comme la respiration aérobie, la respiration anaérobie nécessite une chaîne de transport des électrons fonctionnelle, adaptée à l'anaérobiose, afin de créer le gradient de protons nécessaire pour activer l'ATP synthase et produire l'ATP (Fig. 5) (Bueno, Pinedo, et al., 2020). Afin de remplacer l'oxygène dans la chaîne de transport des électrons, *V. cholerae* doit être capable d'utiliser d'autres molécules en tant qu'accepteur final d'électron. Le triméthylamine N-oxide (TMAO), le fumarate, le nitrate et le diméthyl sulfoxyde (DMSO) sont des exemples de molécules que *V. cholerae* est capable d'utiliser comme accepteur final d'électron (Lee et al., 2012). Le TMAO est un déchet métabolique du microbiote humain que l'on trouve dans le système digestif de plusieurs animaux, dont les humains. Il est formé à la suite de l'oxydation de choline et lécithine apportée par le régime alimentaire et est considéré comme un composé néfaste pour la santé humaine (Velasquez et al., 2016). Lorsque *V. cholerae* utilise le TMAO pour la respiration anaérobie, la production de CT est augmentée significativement et les bactéries s'en trouvent plus virulentes. Ces découvertes suggèrent que le TMAO en plus de son rôle énergétique, joue un rôle de signalisation pour induire le cycle infectieux de *V. cholerae* (Lee et al., 2012). Le gène *arcA* code pour la principale protéine

régulatrice des adaptations à l'anaérobiose chez *V. cholerae*. Parmi les fonctions affectées par ce régulateur en anaérobiose, on trouve la virulence, la formation de biofilm et la motilité (Li et al., 2022).

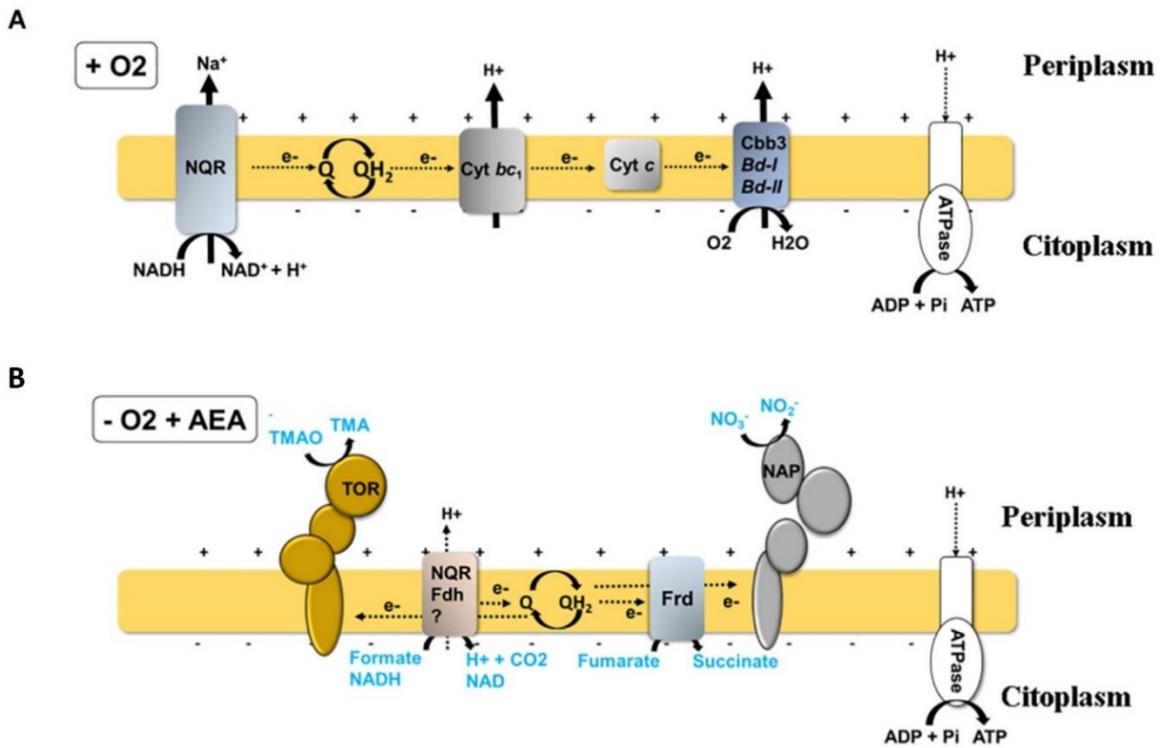


Figure 5

La chaîne de transport des électrons de V. cholerae est différente selon l'accepteur final d'électrons.

Ce schéma simplifié présente les chaînes de transport des électrons utilisées pour la respiration aérobie et anaérobie selon le métabolisme de *V. cholerae*. (A) La croissance aérobie, où *V. cholerae* génère de l'ATP par phosphorylation oxydative, en respirant l'oxygène à l'aide d'une chaîne de transport d'électrons initiée par une NADH:quinone oxydoréductase transloquant le sodium (Na^+). (B) La croissance anaérobie en présence d'un accepteur alternatif d'électrons (AEA), où *V. cholerae* est capable d'obtenir de l'énergie par la respiration de l'AEA (Bueno, Pinedo, et al., 2020). [Traduction Libre] Reproduction sous la permission de Creative Commons (CC BY 4.0).

4.5 — Excrétion de bactéries

Une fois le cycle infectieux complété, les bactéries qui sont excrétées à la suite des diarrhées causées par le choléra ont un phénotype hyperinfectieux. Cette caractéristique se maintient pendant quelques heures dans l'environnement, ce qui participe à la nature explosive des éclosions de choléra (Hartley et al., 2006). Les bactéries excrétées peuvent se trouver sous la forme de bactéries planctoniques, microcolonies ou agrégats de biofilms. Ces bactéries expriment des niveaux très élevés des gènes requis pour la virulence, comme des gènes de mobilité et les gènes du pilus TCP, ce qui diminue effectivement la dose infectieuse pour infecter d'autres êtres humains (Merrell et al., 2002). Ces caractéristiques rendent le choléra particulièrement redoutable dans les populations où l'hygiène est déficiente, car un seul cas de choléra peut mener rapidement à une épidémie incontrôlable (Sack et al., 2004).

Chapitre 5 — Les biofilms

5.1 — Généralités

On a longtemps pensé que les bactéries se trouvaient majoritairement sous forme d'organismes libres dans l'environnement, mais on sait aujourd'hui que la plupart des bactéries environnementales vivent dans une communauté microbienne maintenue par des substances polymériques extracellulaires (EPS), un biofilm. Les bactéries à l'intérieur du biofilm coopèrent entre elles, ce qui permet au biofilm d'être plus tolérant aux stress environnementaux que les bactéries libres (Chew & Yang, 2016).

Un biofilm est une communauté bactérienne, souvent ancrée sur une surface, où les bactéries sont adhérentes, les unes aux autres, à l'aide d'une matrice composée d'EPS, c'est-à-dire principalement des exopolysaccharides, mais aussi des protéines et de l'ADN extracellulaires (ADNe). Les biofilms ne sont pas toujours ancrés sur une surface, on trouve également des structures indépendantes comme les microcolonies (section 5.2) et des biofilms qui colonisent l'interface eau-liquide (section 5.7.6). Le mode de vie en biofilm est drastiquement différent de celui planctonique, puisqu'il nécessite plusieurs changements physiologiques et l'expression de différents gènes pour adopter le phénotype du biofilm (O'Toole et al., 2000). Les biofilms peuvent se développer sur une multitude de surfaces abiotiques et biotiques, incluant la surface de l'eau, où ils peuvent former des radeaux sous forme de pellicule (Yamamoto et al., 2011). À titre d'exemple, on peut trouver des biofilms sur les équipements médicaux comme les cathéters, dans les canalisations des systèmes d'eau courante et même associés avec des tissus vivants comme à l'intérieur des poumons de patients de fibrose kystique (Donlan, 2002). Ils posent également des problèmes dans l'industrie agroalimentaire, à cause de leur tolérance accrue, ils sont difficiles à éliminer des équipements sanitaires et peuvent être sources de toxi-infections alimentaires. Les biofilms ont un rôle important dans les maladies infectieuses causées par des bactéries, étant donné que 60 à 80 % de ce type d'infections impliquent des biofilms, ce qui cause des problèmes de santé publique majeurs (Rather et al., 2021). Les biofilms ne sont pas toujours néfastes, par exemple on trouve des biofilms dans notre système intestinal qui comporte des bactéries du microbiote qui participent activement à notre immunité. On trouve aussi des biofilms dans la

nature où ils ont des rôles de bioremédiation grâce aux qualités détoxifiantes de certaines espèces de bactéries (Chew & Yang, 2016).

Les biofilms ne sont pas toujours composés de la même espèce. On trouve des biofilms multi-espèces dans la nature dans lesquels plusieurs espèces de bactéries communiquent ensemble via le QS et participent à la production du biofilm. Dans l'environnement, les biofilms seraient la plupart du temps multi-espèces. Cette diversité complique l'usage des méthodes traditionnelles pour se débarrasser des espèces néfastes, comme les traitements aux antibiotiques, car les communautés multi-espèces possèdent des caractéristiques physiologiques uniques (Yang et al., 2011). Cependant, dans le cadre de cette étude, je m'intéresse principalement aux biofilms d'une seule espèce, puisqu'il s'agit des biofilms les mieux décrits.

5.2 — Le développement d'un biofilm

La première étape du développement d'un biofilm ancré est l'attachement réversible d'une bactérie planctonique à une surface. Les bactéries peuvent atteindre une surface par des méthodes passives, comme le mouvement brownien, la gravité, les forces hydrauliques et l'ensemble des caractéristiques physiques d'un milieu. Cependant, les bactéries mobiles profitent d'un avantage pour la colonisation des surfaces. Des structures de mobilité comme des flagelles ou des pili permettent d'aller contre les forces hydrauliques et d'être un meilleur compétiteur pour la niche écologique (Kostakioti et al., 2013). Chez certaines espèces, le chimiotactisme peut également guider les bactéries pour trouver un site d'attachement préférentiel, en fonction de la disponibilité des nutriments (Kostakioti et al., 2013). La seconde étape est l'attachement irréversible de la bactérie sur la surface à l'aide de facteurs d'adhésion comme les pili, les adhésines et la production d'EPS. Ensuite, il y a une première étape de maturation où il y a l'apparition d'une mince couche de biofilm et de petits groupes de bactéries ou microcolonies. La maturation continue en phase II avec la formation de gros agrégats de biofilm qui contiennent beaucoup de bactéries et une importante production de matrice extracellulaire (Chew & Yang, 2016). Le biofilm mature obtient une structure en trois dimensions avec des systèmes de canaux entre les microcolonies qui permettent le transport des nutriments et l'éjection des déchets métaboliques. Une fois la maturation du biofilm avancée, des cellules vont se détacher et

pourront à leur tour recommencer le cycle de formation du biofilm, il s'agit de l'étape de la dissémination. Les bactéries détachées peuvent présenter un phénotype de bactérie planctonique ou se présenter sous la forme d'agrégats de biofilm (Kostakioti et al., 2013).

Les biofilms sont donc des structures dynamiques où chaque étape nécessite une régulation précise en réponse avec l'environnement des bactéries. Il ne s'agit pas d'une simple structure de survie, mais bien d'un mode de vie qui promeut la reproduction des cellules, l'échange de matériel génétique et la virulence dans certains cas (Donlan, 2002). Le détachement du biofilm est un phénomène qui peut être passif ou actif. Il est actif lorsque les bactéries utilisent leurs procédés métaboliques, comme la dégradation enzymatique de la matrice pour relâcher des bactéries planctoniques. Il est passif quand la dispersion est le résultat de forces externes comme l'abrasion, la force des fluides environnants ou l'action d'un prédateur (Kaplan, 2010). La figure 6 propose un résumé des principales étapes du cycle de vie d'un biofilm basé sur *Pseudomonas aeruginosa*. Il faut comprendre que ce modèle est simplifié et qu'il ne prend pas en compte toute la diversité dans les mécanismes de formation de biofilm que l'on trouve chez les différentes espèces de bactéries, mais également en fonction des conditions environnementales. Ce modèle est notamment limité aux biofilms de surface, mais nous savons aujourd'hui que les biofilms se présentent sous plusieurs formes, tels que les agrégats qui se forment en l'absence de surface d'adhérence (Sauer et al., 2022).

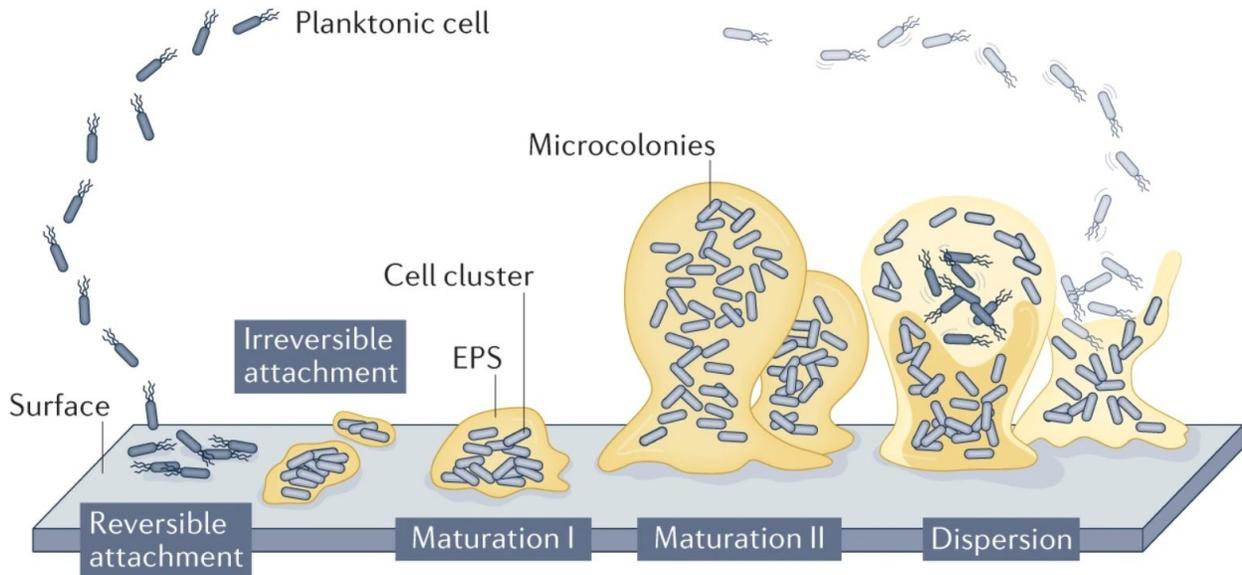


Figure 6

Modèle classique du développement d'un biofilm

Ce modèle prévoit le déroulement d'un cycle de formation de biofilms en cinq étapes spécifiques. Le mécanisme débute au contact d'une surface par une cellule planctonique individuelle. On peut distinguer différentes étapes dans le développement du biofilm, comme l'attachement réversible, l'attachement irréversible, les deux étapes de maturation et la dispersion. Au cours de l'attachement réversible, les bactéries adhèrent au substrat par un pôle ou un flagelle, suivi d'un attachement longitudinal. La transition vers un attachement irréversible survient en même temps qu'une diminution des taux d'inversion des flagelles et de l'expression de leurs gènes associés, ainsi que de la synthèse des éléments composant la matrice du biofilm. À ce stade, les cellules adhérentes sont plus résistantes aux antibiotiques. La maturation du biofilm est caractérisée par la présence d'amas de bactéries de plusieurs cellules d'épaisseur, intégrés dans la matrice (stade de maturation I), et qui deviennent ultérieurement des microcolonies (stade de maturation II). La dispersion est associée avec la dégradation des éléments de la matrice en plus d'une réduction de leur synthèse. Les cellules libérées sont motiles et moins résistantes aux antibiotiques que les bactéries du biofilm (Sauer et al., 2022). [Traduction libre] Reproduction sous la permission de *Springer Nature Limited* pour utilisation dans un mémoire (Numéro de licence : 5560891424071).

5.3 — La matrice du biofilm

La matrice d'un biofilm est composée de 50-90 % des EPS sécrétés par les bactéries du biofilm. Les propriétés physiques et chimiques des EPS sont très variables et diverses entre les différentes

espèces de bactéries (Donlan, 2002). La sécrétion des EPS est un phénomène dynamique et régulé par les bactéries du biofilm. Le type de composants et la quantité de polymères sécrétés sont directement liés avec la réponse aux stress environnementaux, l'âge du biofilm et la nature des nutriments disponibles. Certains auteurs vont même jusqu'à qualifier chaque biofilm comme unique à un micro-environnement à cause de tous les paramètres qui influencent sa composition (Sutherland, 2001). La section suivante décrit les composants généraux qui constituent les biofilms des bactéries, les caractéristiques spécifiques à *V. cholerae* sont détaillées par la suite (voir chapitre 5.7).

5.3.1 Les exopolysaccharides

La matrice des biofilms est composée principalement d'exopolysaccharides, donc des sucres qui ont diverses propriétés (Chew & Yang, 2016). On trouve une variété de polysaccharides différents dans le biofilm d'une même espèce de bactérie et la diversité augmente davantage selon les différentes espèces. Généralement, on trouve une grande quantité de polysaccharides hydrophiles, ce qui permet la rétention d'eau au sein du biofilm pour garantir l'hydratation des cellules bactériennes qui l'habitent. On trouve également des polysaccharides hydrophobes qui ont un rôle de structure dans le biofilm et permettent l'interaction avec différents types de molécules comme des ions, mais également des macromolécules comme des lipides et des protéines (Donlan, 2002). Cependant, la majorité des exopolysaccharides sont polyanioniques permettant ainsi une meilleure adsorption des nutriments environnementaux (Chew & Yang, 2016).

5.3.2 Les protéines

Les protéines que l'on trouve dans la matrice du biofilm ont principalement des rôles structuraux, comme la stabilisation de la matrice d'EPS. Les lectines sont des protéines capables de lier les carbohydrates et sont essentielles dans la formation des biofilms. Les lectines ont également le rôle de lier les bactéries aux exopolysaccharides pour maintenir la structure de la matrice du biofilm (Flemming & Wingender, 2010). Une famille de protéines commune des biofilms est les protéines associées aux biofilms (Bap). Les protéines Bap sont des adhésines qui permettent l'adhésion du biofilm sur la surface, mais également des bactéries les unes aux autres (Chew &

Yang, 2016). Bien que les protéines Bap aient originalement été décrites chez *Staphylococcus aureus*, elles sont présentes chez une multitude de bactéries à Gram positif et à Gram négatif dont *V. cholerae*. Chez les bactéries pathogènes, les protéines Bap permettent aux biofilms une meilleure persistance dans l'environnement infectieux, ce qui en fait des facteurs de virulence (Latasa et al., 2006). On trouve également toute sorte d'enzymes extracellulaires qui remplissent différents rôles comme la dégradation des EPS permettant le détachement des bactéries du biofilm. On trouve aussi des enzymes qui dégradent les matières organiques, ce qui assure une disponibilité des nutriments pour les bactéries du biofilm (Flemming & Wingender, 2010). Il y a aussi des protéines non structurales qui dirigent les interactions de compétition aux seins des biofilms multi-espèces. Parmi les mécanismes de compétition connus, on trouve l'altération du développement du biofilm, l'inhibition de la communication entre les cellules et la production de molécules antimicrobiennes (Rendueles & Ghigo, 2015).

5.3.3 L'ADN extracellulaire (ADNe)

On trouve une quantité importante d'ADNe dans la matrice d'un biofilm, qui est excrété par les bactéries du biofilm ou qui provient de la lyse des bactéries mortes. L'ADN étant une substance anionique, sa présence permet également une meilleure tolérance aux antibiotiques cationiques comme les aminoglycosides qui se retrouvent coincés dans la matrice avant d'atteindre les bactéries (Chew & Yang, 2016). La quantité d'ADNe présente dans la matrice des biofilms varie beaucoup selon les espèces bactériennes et est particulièrement élevée dans les biofilms des eaux usées (Flemming & Wingender, 2010; Frølund et al., 1996). Il s'agit d'un composant important de la matrice chez plusieurs espèces, puisque les bactéries traitées à la DNase sont incapables de maintenir l'intégrité du biofilm (Tetz et al., 2009). L'ADNe occupe un rôle important dans l'agrégation des bactéries à l'intérieur du biofilm et il s'agit d'un des composants majeur qui permet une connexion intercellulaire entre les bactéries résidentes du biofilm (Flemming & Wingender, 2010).

5.3.4 Les autres composants de la matrice du biofilm

Au-delà des trois composants majeurs que l'on vient de discuter, les exopolysaccharides, les protéines et l'ADNe, on trouve d'autres composants dans la matrice d'un biofilm selon les

différentes espèces de bactéries. Les lipides sont trouvés chez plusieurs espèces où ils jouent un rôle d'adhérence. On trouve également des surfactants qui ont des propriétés antimicrobiennes et antifongiques. Les caractéristiques hydrophobes des lipides et surfactants sont essentielles à certaines espèces de bactéries pour coloniser l'interface eau-air et pour faciliter l'accès à l'oxygène et ainsi augmenter les échanges gazeux (Flemming & Wingender, 2010).

L'eau est également une composante essentielle des biofilms. Il est estimé que les biofilms sont composés jusqu'à 97 % d'eau (Zhang et al., 1998). Les EPS peuvent être qualifiés d'hygroscopiques à cause de leur importante capacité à retenir l'eau. L'eau permet une résistance à la dessiccation dont bénéficient les bactéries du biofilm, mais également les espèces environnantes qui peuvent profiter de l'eau retenue dans la matrice du biofilm (Flemming & Wingender, 2010).

5.4 — « *le Quorum Sensing* »

Les bactéries, dont celles organisées en biofilm, sont capables de communiquer entre elles grâce à un mécanisme de signalisation intercellulaire, nommé le « *quorum sensing* » (QS). Le principe du QS repose sur le principe de détection de quorum, c'est-à-dire que les bactéries peuvent mesurer la concentration de molécules de signalisation dans leur environnement, les auto-inducteurs, comme un indicateur de la densité de leur population. Une bactérie seule qui produit des auto-inducteurs n'en détectera jamais assez dans l'environnement pour activer elle-même les gènes du QS. Cependant, lorsqu'une population de bactéries suffisamment dense produit assez d'auto-inducteurs, la concentration dans l'environnement atteint le seuil nécessaire pour activer les gènes ciblés par le QS. Les bactéries changent donc leur profil d'expression génique pour adopter un comportement de population multicellulaire avec une synchronisation entre les bactéries. Les bactéries utilisent donc le QS pour adopter des comportements de population comme la bioluminescence, la virulence et la formation de biofilms entre autres exemples (Mukherjee & Bassler, 2019). La figure 7 illustre simplement le QS dans le cas de la formation de biofilm (Muras et al., 2022).

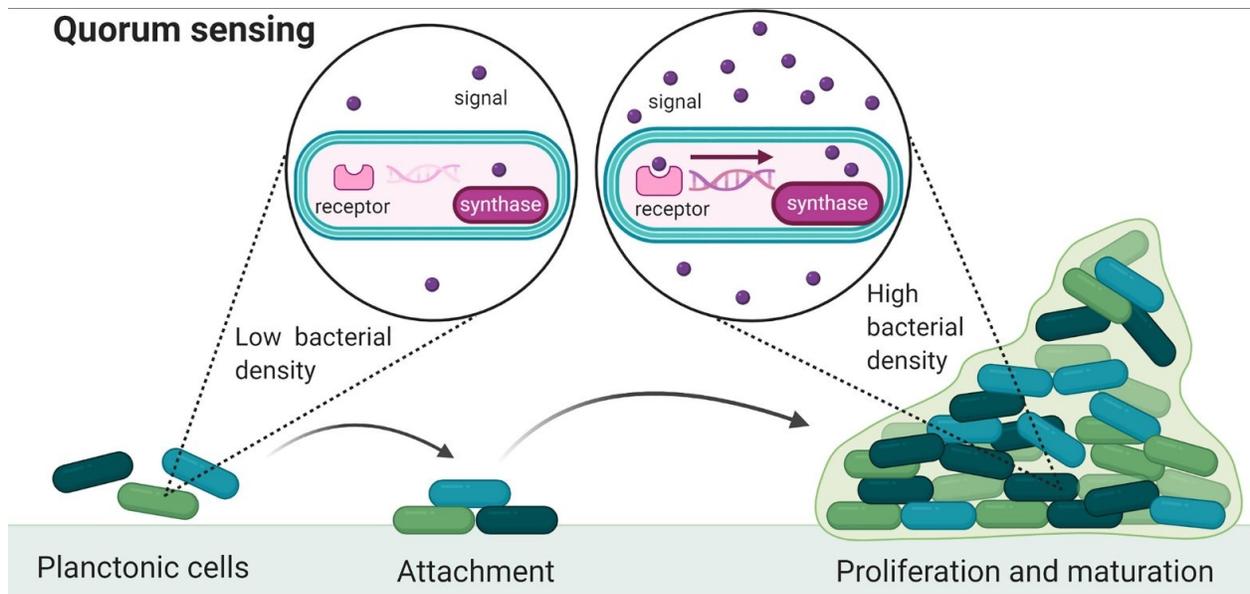


Figure 7

Le rôle du « quorum sensing » (QS) dans le développement du biofilm.

Les signaux du QS (petits cercles violets) sont générés par une synthase et sont relâchés dans le milieu extracellulaire, où ils seront détectés par un récepteur spécifique. Cette interaction active l'expression des gènes régulés par le QS. La concentration des signaux QS est fonction du nombre de bactéries présentes (Muras et al., 2022). [Traduction libre] Reproduction sous la permission de *Wiley Periodicals LLC* pour utilisation dans un mémoire (Numéro de licence : 5560900333131).

Dans le cadre de la formation et la maturation d'un biofilm, le QS joue plusieurs rôles, principalement dans la régulation du recrutement de nouvelles bactéries dans le biofilm et à l'inverse, dans le relâchement de bactéries planctoniques depuis le biofilm. Selon une étude sur *P. aeruginosa*, des bactéries doublement mutantes incapables de produire et capter les auto-inducteurs étaient capables de produire des biofilms, mais ceux-ci étaient beaucoup plus minces, sans architecture caractéristique et beaucoup moins fermement ancrés sur une surface. Ces résultats démontraient clairement l'importance du QS pour les biofilms (Donlan, 2002). Chez d'autres bactéries, dont *V. cholerae*, le QS permet aussi de réguler la motilité, la production de surfactants et la production d'EPS dans le cadre d'un biofilm. Chez *V. cholerae* lors de la formation de biofilm, le QS peut utiliser plusieurs molécules auto-inductrices qui sont reconnues par plusieurs systèmes de détection de quorum au sein de la même bactérie, permettant de contrôler simultanément la synthèse des EPS par plusieurs systèmes (Chew & Yang, 2016). Il existe même

des auto-inducteurs généraux qui affectent plusieurs espèces de bactéries, qualifiant le QS comme un moyen de communication intraespèces dans certains cas (Muras et al., 2022).

5.5 — La niche écologique du biofilm

Les biofilms supportent la vie des communautés de bactéries en offrant une niche très spécialisée pour répondre à leurs besoins. On trouve de la diversité entre les bactéries d'un même biofilm, en réponse aux micro-environnements qu'on y trouve. La distribution des nutriments est inégale dans les différentes couches d'un biofilm à cause de la diffusion réduite à travers la matrice. Les bactéries en surface ont souvent un métabolisme beaucoup plus actif que les bactéries enfouies dans les couches profondes. La disponibilité d'oxygène et en nutriments n'étant pas la même, on trouve de la respiration aérobie à la surface ainsi que des adaptations à l'anaérobiose en profondeur (Chew & Yang, 2016). Ces différents micro-environnements induisent également de la variation génétique entre les membres d'une population en sélection préférentiellement certains variants selon les conditions (Chew & Yang, 2016). La niche du biofilm est également un environnement propice pour les transferts génétiques horizontaux, telles la conjugaison et la transformation naturelle. Les éléments génétiques extrachromosomiques comme les plasmides peuvent donc se partager plus facilement que parmi les bactéries planctoniques. Le QS peut également stimuler la compétence naturelle de certaines espèces de bactéries, ce qui augmente les fréquences d'évènements de transformations jusqu'à 600 fois plus que les cellules libres (Donlan, 2002).

5.6 — Les mécanismes de résistance des biofilms

L'une des caractéristiques les plus importantes des biofilms est leur tolérance accrue aux stress environnementaux et aux agents antimicrobiens.

5.6.1 Barrière protectrice

La nature même de la matrice du biofilm et de ses composants offre une protection aux bactéries du biofilm en agissant comme une barrière. Les molécules antimicrobiennes diffusent mal au travers de la matrice d'EPS étant donné de sa densité et la profondeur, ce qui rend difficile l'accès aux microcolonies du biofilm. Cette protection est plus ou moins efficace en fonction du type de matrice, mais aussi en fonction des types d'agents antimicrobiens (Mah, 2012). De plus, les composants de la matrice peuvent se lier aux différentes molécules à l'aide de différentes interactions. Par exemple, l'ADNe des biofilms peut lier les antibiotiques cationiques pour empêcher leur diffusion (Chew & Yang, 2016).

5.6.2 Molécules de résistance

La structure du biofilm permet l'établissement de micro-environnements où la concentration de molécules de résistance sécrétées rend difficile l'action des antimicrobiens. Par exemple, l'accumulation d'enzymes catalases, produites en réponse aux stress oxydatifs, à l'intérieur du biofilm protège les bactéries du biofilm contre les espèces réactives d'oxygènes (Chew & Yang, 2016).

5.6.3 Variabilité génétique

Comme mentionné précédemment, on trouve de la variabilité génétique au sein des biofilms. Cette variabilité agit également comme un mécanisme de résistance aux antimicrobiens, car elle permet de sélectionner facilement les variants plus résistants aux antibiotiques quand ils sont déjà présents au sein du biofilm (Mah, 2012). Les bactéries plus résistantes peuvent également protéger les autres en produisant des molécules de résistance qui restent accumulées dans la matrice, comme des β -lactamases (voir chapitre 6.3) qui protègent l'ensemble de la communauté contre les pénicillines par exemple (Fux et al., 2005). Les biofilms comportent également des bactéries profondément ancrées dans la matrice qui ont enclenché des mécanismes de réponse aux stress à cause de la diffusion réduite des nutriments et l'accumulation des déchets

métaboliques. Ces bactéries ont donc eu le temps de développer davantage de variabilité génétique qui peut parfois mener au développement de mécanisme de résistance aux antimicrobiens (Chew & Yang, 2016).

5.6.4 Persistance

Les biofilms présentent aussi un environnement propice au développement de cellules persistantes ou dormantes, comme les VBNC de *V. cholerae* par exemple. Ces bactéries sont souvent très peu métaboliquement actives et vu que la plupart des antibiotiques ciblent des processus métaboliques vitaux des bactéries, ils sont moins efficaces contre ces cellules persistantes. Ces bactéries sont donc naturellement plus tolérantes aux antibiotiques et participent à la persistance des biofilms dans le cadre d'un traitement antimicrobien (Fux et al., 2005; Mah, 2012).

5.7 - Les biofilms de *V. cholerae*

V. cholerae se trouve sous forme de biofilms dans l'environnement aquatique, en relation avec les animaux marins producteurs de chitine, et dans le cadre de l'infection, sous la forme d'agrégats de biofilms. Les biofilms de *V. cholerae* sont plus infectieux que les cellules planctoniques et plus résistants à l'acide gastrique, ce qui fait de la production de biofilm un facteur de virulence très important dans la dissémination du choléra (Teschler et al., 2015).

5.7.1 Contrôle de l'expression des gènes

Les bactéries de *V. cholerae* qui vivent en biofilm possèdent un patron d'expression génique différent des vibrions planctoniques. Une des plus grandes différences est la répression des gènes de motilité lors de la conversion vers le mode de vie en biofilm, en plus de l'induction des gènes responsables de la biosynthèse des EPS (Moorthy & Watnick, 2005; Silva & Benitez, 2016). Les bactéries utilisent le QS pour contrôler le développement du biofilm. Le QS est plus efficace dans la matrice du biofilm que dans l'environnement des bactéries planctoniques, car la matrice du biofilm permet de concentrer les molécules d'auto-inducteur, ce qui mène à une activation plus rapide du QS (Silva & Benitez, 2016). C'est la protéine HapR qui joue le rôle de régulateur principal du QS chez *V. cholerae*. L'expression du gène *hapR* est directement liée à plusieurs processus clés des biofilms, comme la production de la matrice d'EPS, le détachement des bactéries

planctonique et la colonisation intestinale (Liu et al., 2007). La transition de l'état planctonique vers le mode de vie en biofilms est dictée par la concentration intracellulaire de di-guanosine monophosphate cyclique (c-di-GMP). Une forte concentration de ce second messager augmente l'expression des gènes responsables de la synthèse des vibriopolysaccharides (VPS) ainsi que des régulateurs *vpsR* et *vpsT* qui dictent l'expression des autres gènes impliqués dans la formation du biofilm (Yildiz & Visick, 2009).

5.7.2 Les variants rugueux

Dans les environnements naturels et infectieux, on trouve des variants de *V. cholerae* qui produisent significativement plus de biofilms. *V. cholerae* peut adopter cette variation rugueuse lorsque les conditions environnementales sont peu favorables, comme une déficience en énergie et en nutriments (Mizunoe et al., 1999). Comme on peut voir sur la figure 8 (Rashid et al., 2003), ces variants sont qualifiés de rugueux, à cause du phénotype que les colonies adoptent sur un milieu avec agar (White, 1938). Le mécanisme derrière le changement de variation est encore aujourd'hui mal compris, plusieurs hypothèses de mutations sur certains gènes, dont des *vps* et des gènes régulateurs, sont présentes dans la littérature. Cependant, la plupart des démarches entreprises suggèrent un lien avec le second messager c-di-GMP qui est présents dans la cascade de signalisation du régulateur HapR (Beyhan & Yildiz, 2007; Rashid et al., 2003). Ce phénotype fait de ces variants le modèle idéal pour l'étude des biofilms de *V. cholerae* en laboratoire. Les variants rugueux sont présents dans environ 6 % des échantillons environnementaux, cependant ce pourcentage grimpe à 32 % dans les échantillons de *V. cholerae* cliniques, ce qui suggère que cette variation procure un avantage compétitif lors de l'infection (Ali et al., 2002). Ces variants qui forment plus de biofilms jouissent d'une meilleure résistance aux stress osmotiques et oxydatifs. Ils contribuent aussi à la persistance des bactéries dans l'environnement et à la dissémination dans les populations humaines (Mizunoe et al., 1999).

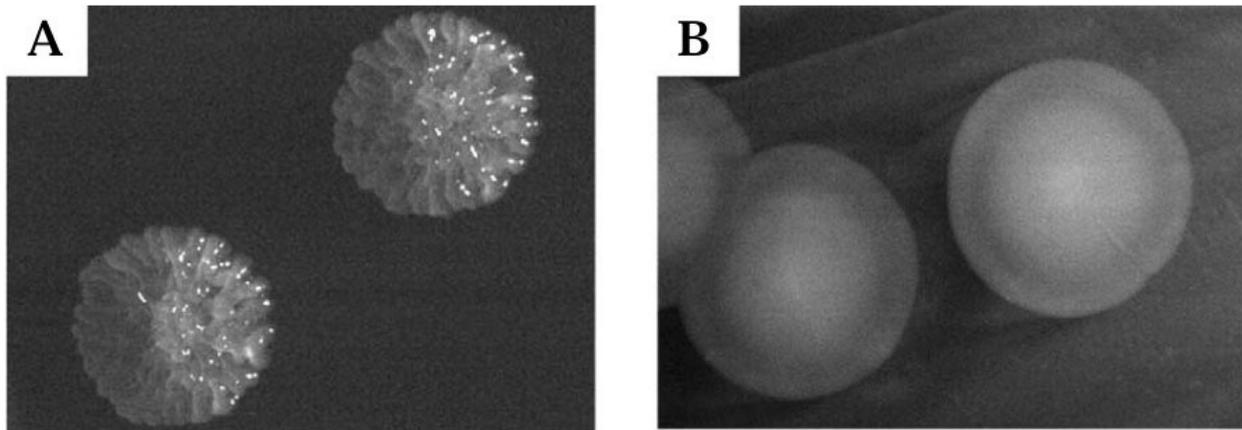


Figure 8

Morphologie coloniale de V. cholerae lisse et de son variant rugueux après 24 h sur un milieu LB-Agar.

(A) variant rugueux; (B) colonie lisse. Les variants rugueux sont traditionnellement utilisés pour les études de biofilms chez *V. cholerae* à cause de leurs phénotypes accentués, ce qui facilite les observations et la prise de résultats (Rashid et al., 2003). Reproduction sous la permission de *Oxford University Press* pour utilisation dans un mémoire (Numéro de licence : 5560901235456).

5.7.3 L'adhésion initiale du biofilm

La transition du stade mobile à l'adhésion des vibrions au substrat est médiée à l'aide des pili de type IV hémagglutinine mannose-dépendante (MSHA) et du flagelle (Utada et al., 2014). La perturbation du mouvement du flagelle lorsqu'il percute une surface déstabilise la mobilité de la bactérie, ce qui crée un contact étroit entre la cellule et la surface. Cette interaction permet aux MSHA de rencontrer la surface où ils peuvent servir de frein à la motilité, permettant l'initiation de l'adhésion de la bactérie au substrat (Teschler et al., 2022). L'interruption du mouvement du flagelle accroît la synthèse de c-di-GMP dans la cellule, qui en retour stimule l'extension des MSHA, ce qui procure un meilleur ancrage au substrat et inhibe davantage le mouvement du flagelle (Teschler et al., 2022).

5.7.4 Les gènes de structure du biofilm

Chez *V. cholerae*, ce sont les gènes des VPS qui sont responsables de la partie exopolysaccharidique des EPS. Ces gènes *vps* sont divisés en deux opérons : *vps-I* et *vps-II* (Yildiz

& Schoolnik, 1999). Parmi les *vps*, la délétion de *vpsF*, *vpsJ* ou *vpsM* réduit le plus drastiquement la formation du biofilm en plus d'inhiber la formation de pellicule et de phénotype rugueux. Ces gènes *vps* seraient donc les plus importants dans la formation des biofilms de *V. cholerae* (Fong et al., 2010; Teschler et al., 2015). Les protéines principales de structure du biofilm sont contenues dans l'opéron *rbm*, les protéines RbmA-F, qui se situe exactement entre les deux opérons *vps* sur le chromosome I de *V. cholerae*. Une autre protéine de structure, Bap1, participe également à la matrice du biofilm, mais son gène se trouve plus loin en aval du chromosome I (Silva & Benitez, 2016). RbmA, RbmC et Bap1 sont les protéines de structure les plus importantes dans le biofilm de *V. cholerae*. La protéine RbmA promeut l'adhésion des bactéries productrices de VPS entre elles. RbmA peut également être clivée par la protéase PrtV, ce qui lui ajoute la fonction de recrutement de nouvelles bactéries planctoniques pour participer au développement du biofilm (Smith et al., 2015). La protéine RbmC remplit un rôle de stabilisation de la structure du biofilm et interagit avec son homologue, la protéine Bap1, pour former une matrice de protéines qui enveloppe les microcolonies de bactéries du biofilm (Berk et al., 2012). La protéine issue du gène *bap1* possède également un rôle d'adhésine qui permet l'adhésion du biofilm à son substrat (Absalon et al., 2011). Les protéines Bap1 et RbmC sont considérées comme homologues et similaires à 47 % dans leur séquence de peptides, elles ne peuvent se compléter que partiellement, car la perte d'un des gènes affecte la structure et la résistance du biofilm. Le biofilm produit par un mutant double $\Delta rbmC \Delta bap1$ est incapable d'adhérer à une surface (Fong & Yildiz, 2015). Les protéines de structure du biofilm sont sécrétées par les bactéries à l'aide du T2SS, le même type de système de sécrétion responsable de sécréter la CT lors de l'infection intestinale (Johnson et al., 2014). La protéine RbmB, ne possède pas un rôle de structure, mais au contraire, une activité enzymatique qui lui permet de dégradée les VPS, cela permet de relâcher des bactéries motiles afin d'aller coloniser d'autres surfaces et former un nouveau un biofilm (Fong & Yildiz, 2007). La délétion d'une ou plusieurs protéines de structure affecte la capacité de résistance et l'architecture du biofilm de *V. cholerae*, comme le démontre la figure 9 (Fong & Yildiz, 2015). De plus, plusieurs protéines de la famille des protéines de la membrane externe (OMP) sont retrouvées en grandes quantités dans la matrice des biofilms de *V. cholerae* où elles

auraient des rôles architecturaux. Cependant, leur fonction mécanistique précise dans le cadre de la formation des biofilms est aujourd’hui encore inconnue (Fong & Yildiz, 2015).

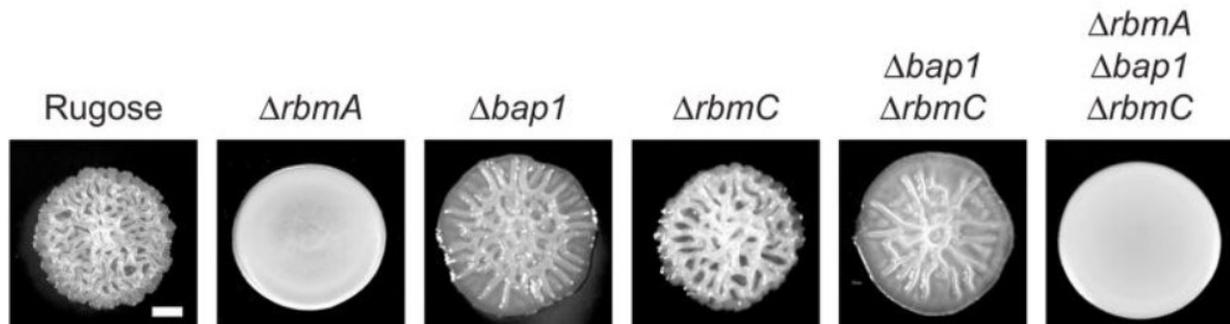


Figure 9

Morphologie coloniale du variant rugueux V. cholerae A1552 et de mutants comportant des délétions des gènes de structure du biofilm.

Les variants rugueux et leurs mutants avec délétion des gènes de structure du biofilm ont permis d’étudier le rôle des différentes protéines associées aux biofilms dans l’architecture du biofilm (Fong & Yildiz, 2015). Reproduction sous la permission de l’American Society for Microbiology pour utilisation dans un mémoire (Numéro de licence : 1361641-1).

5.7.5 La résistance des biofilms

Comme chez les autres bactéries, les biofilms de *V. cholerae* sont plus résistants aux stress environnementaux que les bactéries planctoniques, en plus des mécanismes de résistance communs aux biofilms (chapitre 5.6). Le QS dans le biofilm, à l’aide du régulateur HapR, stimule l’expression du facteur sigma RpoS qui est responsable de la réponse aux stress (Wang et al., 2011). Ces bactéries expriment donc des gènes et un phénotype de tolérance aux stress environnementaux (Teschler et al., 2015). La protéine Bap1 joue également un rôle de résistance, notamment contre les peptides antimicrobiens. Bap1 se retrouve associé aux vésicules de membranes sécrétées (voir section 6.6.5) où il peut se lier à une OMP, OmpT, pour former un complexe capable de séquestrer les PAM, protégeant ainsi les bactéries (Duperthuy et al., 2013).

5.7.6 Colonisation de l’interface eau-air

V. cholerae peut également coloniser l’interface eau-air d’un milieu en formant une pellicule de biofilm flottante, un phénotype particulièrement favorisé chez les variants rugueux. La

production de ce type de biofilm permet d'augmenter la surface d'échanges gazeux disponible pour aller chercher davantage d'oxygène (Yamamoto et al., 2011). Ces pellicules de biofilm utilisent les mêmes protéines de structure que les biofilms classiques, mais elles occupent des rôles différents. La protéine Bap1 participe à l'hydrophobicité de la pellicule, assurant ainsi sa flottaison, en plus de renforcer son élasticité en maintenant sa structure intègre. La protéine RbmA joue un rôle dans les étapes précoces du développement de la pellicule (Hollenbeck et al., 2014).

Chapitre 6 — Résistance aux antimicrobiens

Les antibiotiques sont des molécules antibactériennes qui sont utilisées dans la médecine clinique depuis le début du 20^e siècle. Leur découverte a permis le traitement de plusieurs maladies qui causaient des ravages dans l'ère préantibiotique, comme la tuberculose et la syphilis (Aminov, 2010). À la suite de leur découverte, l'utilisation des antibiotiques s'est répandue dans plusieurs sphères, dépassant l'usage classique comme traitement d'une infection. L'usage des antibiotiques en prophylaxie est devenu courant dans la médecine clinique, notamment dans le cadre de chirurgie, ce qui a permis de réduire drastiquement les infections post-chirurgicales (Hutchings et al., 2019). Dans l'industrie agroalimentaire, les antibiotiques sont utilisés en prophylaxie pour réduire les risques d'infections des animaux, en plus d'agir comme facteur de croissance (McEwen & Fedorka-Cray, 2002). L'utilisation des antibiotiques a apporté tellement de bénéfices économiques, médicaux et sociaux, qu'ils furent surutilisés pendant des décennies, et même encore aujourd'hui (Landers et al., 2012).

6.1 — L'émergence de la résistance

Suivant la découverte des antibiotiques, une partie importante de la communauté médicale a tenu pour acquis l'efficacité des traitements antimicrobiens, ce qui a mené à un développement presque inexistant de nouvelles molécules durant la deuxième moitié du 20^e siècle (Silver, 2011). L'importante capacité évolutive des bactéries combinée avec la surutilisation des antibiotiques a permis l'apparition rapide de mécanismes de résistance aux antibiotiques. La résistance aux antimicrobiens (AMR) est apparue très rapidement et aujourd'hui nous faisons face à des bactéries super-résistantes qui résistent même aux antibiotiques de dernier recours. L'organisme mondial de la santé a classé le problème comme risque majeur pour l'humanité depuis 2014 (Urban-Chmiel et al., 2022). La résurgence des infections bactériennes n'est pas limitée aux pays en développement, le problème est bien implanté dans notre système de santé. Par exemple, en 2011, le *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA) a tué plus d'Américains que le virus d'immunodéficience humaine (VIH), la maladie de Parkinson, l'emphysème et les homicides combinés (Llor & Bjerrum, 2014). Les mécanismes de résistance sont présents autant chez les bactéries pathogènes que chez les bactéries commensales et se retrouvent très souvent sur des

éléments génétiques mobiles. Cela permet aux gènes de résistance de perdurer dans l'environnement et de se transmettre à d'autres espèces à l'aide de différents mécanismes de transfert horizontal de gènes, comme la conjugaison, la transformation et la transduction (Bag et al., 2019). L'omniprésence des gènes de résistance est particulièrement dangereuse chez les bactéries possédant des mécanismes de transformation naturelle comme *V. cholerae*, créant ainsi des réservoirs de gènes de résistance (Das et al., 2020).

6.2 – Les antibiotiques

Les antibiotiques peuvent se classer selon leur mécanisme d'action. L'action d'un antibiotique peut soit tuer les bactéries, l'effet bactéricide, ou inhiber la croissance, l'effet bactériostatique. Cependant, ces effets peuvent être directement influencés par la dose utilisée durant le traitement. Dans presque tous les cas, un antibiotique bactéricide aura un effet bactériostatique à faible dose et inversement, un antibiotique bactériostatique peut avoir un effet bactéricide à forte dose (Pankey & Sabath, 2004). Dans les points suivants, quelques classes d'antibiotiques que le laboratoire Duperthuy utilise dans les recherches sur *V. cholerae* sont présentés.

6.2.1 Inhibiteurs de la biosynthèse des protéines

L'inhibition de la synthèse des protéines est l'un des mécanismes d'action les plus répandus parmi les antibiotiques d'origine naturelle. Ces antibiotiques ciblent la machinerie des ribosomes à divers niveaux. Étant donné l'abondance et l'importance des ribosomes dans les cellules bactériennes, ceux-ci sont des cibles de choix, car leur inhibition peut retarder la synthèse de toutes les protéines, dont ceux qui permettent la résistance aux antibiotiques (McCoy et al., 2011). On peut diviser davantage ces antibiotiques selon la région visée, soit la sous-unité 30S et la sous-unité 50S des ribosomes.

Inhibiteurs de la sous-unité 30S des ribosomes

Les aminoglycosides

Les aminoglycosides sont une grande famille d'antibiotiques qui agissent en inhibant la synthèse des protéines grâce à une forte affinité pour le site A des ribosomes. Ce site se trouve sur l'ARN ribosomal (ARNr) 16S qui appartient à la sous-unité 30S des ribosomes. Cette interaction mène à des erreurs de lecture des codons de l'ARN messager (ARNm) par le ribosome, ce qui affecte

l'intégrité des protéines produites qui peuvent être tronquées ou aberrantes (Krause et al., 2016). L'accumulation de protéines aberrantes dans la membrane cytoplasmique peut affecter l'intégrité de celle-ci, menant à davantage d'importation de molécules antibiotiques dans la cellule. La combinaison des effets des aminoglycosides en fait une classe d'antibiotiques majoritairement bactéricide (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Les aminoglycosides ont un spectre d'action assez large contre les bactéries aérobies, cependant ils sont inefficaces contre les bactéries anaérobies puisqu'ils utilisent la force du gradient produit par la chaîne de transport des électrons pour entrer dans le cytoplasme de la cellule bactérienne (Krause et al., 2016). Parmi les antibiotiques de cette famille, on retrouve la kanamycine (Kan), la spectinomycine (Spec), la streptomycine (Strep) et plusieurs autres.

Les tétracyclines

La famille des tétracyclines, parfois appelée simplement les cyclines, comporte des antibiotiques à large spectre souvent utilisés pour traiter les infections transmises sexuellement, comme les chlamydias, mais également contre certaines maladies causées par des protozoaires, comme le paludisme (Gaillard et al., 2015). Ces antibiotiques se lient au site d'attachement des aminoacyl-ARNt, le site A dans la sous-unité 30S des ribosomes. Cette interaction bloque l'arrivée des ARN de transfert (ARNt), cependant cet attachement est réversible, d'où l'effet bactériostatique des tétracyclines (Chopra & Roberts, 2001). Les antibiotiques de cette famille comprennent, entre autres, la Tétracycline (Tétra) et la doxycycline (Doxy).

Inhibiteurs de la sous-unité 50S des ribosomes

Le chloramphénicol

Le chloramphénicol (Cm) est le seul antibiotique d'origine naturel de la famille des amphénicols, cependant il est produit synthétiquement pour son usage clinique. Le chloramphénicol fut autrefois un antibiotique à très large spectre utilisé principalement pour le traitement de la fièvre typhoïde (Dasopang et al., 2019). Aujourd'hui, l'augmentation de la résistance due à sa vente libre dans plusieurs pays en développement et au grand nombre d'effets secondaires attribués à son utilisation fait du chloramphénicol un antibiotique rarement utilisé en traitement clinique (Balbi, 2004). Cet antibiotique entre en compétition avec les ARNm pour l'attachement à la sous-

unité 50S des ribosomes. Cette action entraîne donc l'inhibition de l'activité peptidyl-transférase du ribosome et l'arrêt de la synthèse des protéines. Cet attachement est réversible, ce qui fait chloramphénicol un antibiotique bactériostatique (Weisberger et al., 1969).

Les macrolides

La famille des macrolides comprend des antibiotiques principalement efficaces contre un large spectre de bactéries à Gram positif, cependant ils sont aussi efficaces contre certaines bactéries à Gram négatif, dont *V. cholerae*. Les macrolides interrompent la synthèse des protéines en bloquant la sortie des peptides naissant sur la sous-unité 50S des ribosomes (Vázquez-Laslop & Mankin, 2018). Cette action mène à l'interruption des protéines en synthèse qui sont relâchées du ribosome incomplet, menant à la production de protéines sévèrement tronquées. Le site d'attachement est sur l'ARN 23S, mais l'attachement est réversible, ce qui fait des macrolides une classe d'antibiotiques bactériostatiques (Dinos, 2017). Parmi les antibiotiques de la classe des macrolides, on trouve l'azithromycine (Azi) et l'érythromycine (Éry).

6.2.2 Inhibiteurs de la biosynthèse des acides nucléiques

Le métabolisme des acides nucléiques (ADN et ARN) forme une autre cible de choix pour les molécules antimicrobiennes. Ces antibiotiques peuvent inhiber le processus de synthèse directement, modifier les conformations des acides déjà présents ou causer des lésions dans l'ADN ou l'ARN (Cambau & Guillard, 2012). Les cibles de ces antibiotiques comprennent entre autres les polymérases d'ADN et d'ARN et les topoisomérases. Parmi les principales familles d'antibiotiques ciblant les acides nucléiques, on trouve les sulfamides, les quinolones et les rifamycines (Hartmann et al., 1968).

Inhibition de la synthèse de l'ADN

Les quinolones

Les quinolones et leurs dérivés de deuxième génération, les Fluoroquinolones, sont une famille d'antibiotiques synthétiques à très large spectre parmi les plus prescrits dans le monde. Ces antibiotiques se lient sur l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, ce qui modifie leur activité sur l'ADN en les transformant en enzymes toxiques (Aldred et al., 2014). Les topoisomérases liées aux quinolones ont une action bactéricide, car elles induisent de nombreuses cassures double-brin

dans l'ADN, ce qui mène à la mort des bactéries. La ciprofloxacine (Cipro) est l'antibiotique le plus couramment utilisé parmi les fluoroquinolones (Correia et al., 2017).

6.2.3 Inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne

La paroi de peptidoglycane des bactéries est l'une des meilleures cibles pour les antibiotiques. Il s'agit d'un polymère complètement absent chez les eucaryotes, donc la toxicité liée aux inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane est très faible. Le peptidoglycane est une structure très importante pour les bactéries, car il assure l'intégrité de leurs parois, leur forme ainsi qu'une structure solide pour supporter le métabolisme bactérien (Lambert et al., 2002). Le peptidoglycane est composé de glycanes linéaires reliés ensemble par de courts peptides, sa synthèse est un processus complexe mettant en jeu plusieurs réactions de transglycosylation et transpeptidation (Vollmer et al., 2008). Les antibiotiques qui ciblent la paroi des bactéries inhibent la formation de celle-ci en s'attaquant aux enzymes participant à la synthèse du peptidoglycane, comme les transpeptidases et aux précurseurs de celui-ci (Vollmer et al., 2008). On trouve principalement la famille des β -lactames et les glycopeptides (Nikolaidis et al., 2014).

Les β -lactames

Les β -lactames sont les antibiotiques les plus prescrits dans le monde en plus de contenir la pénicilline, le premier antibiotique découvert de l'histoire moderne par Alexander Fleming dans les années 1920s (Fleming, 1929). Les β -lactames agissent en liant les protéines de liaison de la pénicilline (PBP), ce sont des enzymes qui jouent un rôle dans la synthèse de la paroi de peptidoglycane, tel que de catalyser les réactions de transpeptidation et de transglycosylation (Sauvage et al., 2008). L'inhibition de ces enzymes a un effet bactéricide, cependant après des décennies de surutilisation, beaucoup de bactéries ont développé de nombreux mécanismes de résistance aux β -lactames. Parmi les β -lactames, on trouve plusieurs sous-classes comme les pénicillines, comprenant la carbénicilline (Carb), les céphalosporines, les carbapénèmes.

6.2.4 Autres antibiotiques

Il existe plusieurs autres familles d'antibiotiques qui ne sont pas introduites, car elles sont peu pertinentes contre les bactéries à Gram négatifs ou plus spécifiquement contre *V. cholerae*. Parmi ces familles on trouve des inhibiteurs de métabolisme des acides foliques, soit les Sulfonamides

et Triméthoprimes. Il y a aussi les PAM, dont la polymyxine B (PmB) qui sera introduite en détails plus loin (chapitre 6.5). La figure 10 présente un résumé des mécanismes d'action des antibiotiques (Kapoor et al., 2017).

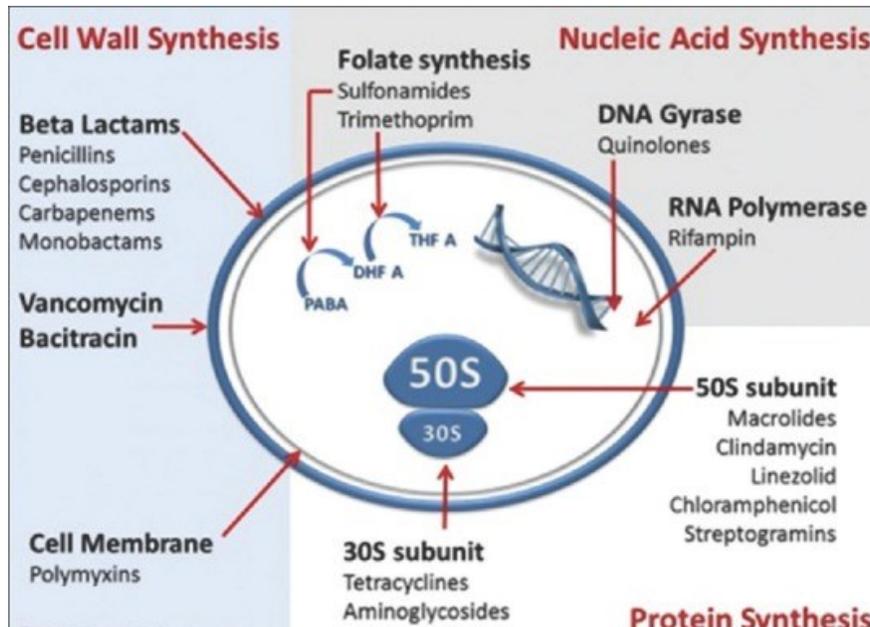


Figure 10

Cibles de l'action des antibiotiques

Les antibiotiques cibles différents composants du métabolisme bactérien, soit la synthèse de la paroi de peptidoglycane, des acides nucléiques, des protéines et l'intégrité de la membrane externe (Kapoor et al., 2017). Reproduction sous la permission de *Creative Commons* (CC BY-NC-SA 3.0).

6.3 — Les mécanismes de résistance aux antibiotiques

La résistance aux antimicrobiens est apparue en réponse à la surutilisation des antibiotiques dans les différentes sphères de notre société, comme mentionné précédemment. Les mécanismes de résistance peuvent être généraux à plusieurs types d'antibiotiques ou très spécifiques pour contrer une molécule. Étant donné que la résistance est favorisée par la sélection naturelle, les mécanismes de résistance existent sous des formes variées et leur émergence est inévitable chaque fois qu'une nouvelle molécule est introduite dans le marché (Kapoor et al., 2017; Richardson, 2017). Dans la prochaine section, les principaux mécanismes de résistance que l'on trouve chez les bactéries sont introduits.

6.3.1 Réduction de la perméabilité

Une méthode répandue pour résister à un antibiotique est de l'empêcher d'accéder à sa cible d'action en empêchant intégralement son entrée dans la cellule. Par exemple, c'est de cette manière que les bactéries anaérobies fermentatives résistent aux aminoglycoside, car en faisant la fermentation, le gradient de la chaîne de transport des électrons n'est pas disponible pour générer l'énergie qui permet l'entrée de l'antibiotique (Krause et al., 2016). Une modification de la membrane peut impacter l'entrée d'une multitude de molécules à l'intérieur de la bactérie. Si une modification des phospholipides membranaires ou des lipopolysaccharides (LPS) diminuent les charges négatives de la membrane, cela peut réduire l'affinité envers des antibiotiques de charges positives (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016). Une modification de l'abondance des porines dans la membrane externe, ou une modification de la porine elle-même peut réduire l'entrée des molécules antibiotiques (Darby et al., 2023). Tout changement qui affecte la perméabilité des membranes bactériennes est susceptible de créer une résistance aux antibiotiques. C'est pourquoi on voit ces mécanismes principalement chez les bactéries à Gram négatif, car elles possèdent la membrane externe en plus de la membrane cytoplasmique que les antibiotiques doivent traverser pour atteindre les cibles intracellulaires (Darby et al., 2023).

6.3.2 Réduction de la concentration intracellulaire

La diminution de la concentration intracellulaire des molécules antimicrobiennes est un mécanisme souvent médié par l'acquisition de nouvelles protéines d'efflux qui proviennent d'éléments génétiques mobiles comme les plasmides (Das et al., 2020). Ces protéines transmembranaires font l'export actif de molécules antibiotiques hors de la cellule afin de maintenir une concentration intracellulaire sous-effective de l'antibiotique. Ces protéines d'efflux sont variées et peuvent être spécifiques à un type d'antibiotique ou peuvent être des transporteurs généraux, capables d'exporter un large éventail de molécules (Kapoor et al., 2017). De plus, ces protéines d'efflux sont également susceptibles aux mutations induites par la sélection naturelle, ce qui permet d'augmenter l'affinité pour le substrat, lors d'une pression sélective (Garneau-Tsodikova & Labby, 2016).

6.3.3 Modification de la cible

Un changement de structure de la cible d'un antibiotique provenant d'une mutation spontanée est une altération puissante pour la résistance aux antimicrobiens, car ces mutations ont le potentiel de créer une résistance à de multiples organismes. Une mutation peut réduire l'affinité du site de liaison de l'antibiotique et rendre la bactérie complètement immunisée à une dose normalement létale (Darby et al., 2023). Ces mutations peuvent arriver facilement, car elles peuvent être de l'ordre d'un seul nucléotide. Puisqu'il s'agit de mutations du chromosome, elles sont transmissibles lors de la réplication des bactéries et peuvent être facilement sélectionnées avec la pression sélective d'un traitement antimicrobien (Darby et al., 2023). Les mutations qui offrent une résistance sont souvent sur les cibles majeures des antibiotiques comme les sous-unités des ribosomes, les PBP, les topoisomérases et les précurseurs du peptidoglycane (Kapoor et al., 2017).

6.3.4 Protection de la cible

La protection de la cible est un mécanisme qui fait appel à une protéine protectrice qui vient affecter l'affinité entre l'antibiotique et sa cible. La protéine protectrice peut être une protéine qui fait concurrence pour la même cible que la molécule antibiotique, mais sans l'activité d'inhibition. Ces protéines ont une plus forte affinité pour le site cible, protégeant ainsi la bactérie contre l'activité antimicrobienne (Guardabassi & Courvalin, 2005). Il existe aussi des protéines protectrices qui agissent ailleurs que sur le site cible de l'antibiotique, induisant ainsi un changement allostérique chez la protéine cible. Ce changement allostérique chez la cible peut mener au détachement de la molécule antibiotique ou au fonctionnement normal de la cible malgré la présence de l'inhibiteur (Darby et al., 2023). Les mécanismes de protection de la cible sont très efficaces contre les concentrations faibles à moyennes d'antimicrobiens. Étant donné qu'ils font appel aux principes d'affinité, ils sont sensibles aux fortes concentrations d'antibiotiques qui augmentent l'affinité de ceux-ci pour la cible (Darby et al., 2023).

6.3.5 Contournement de la cible

Le contournement de la cible est le mécanisme inverse de la protection de la cible. Les bactéries qui utilisent cette forme de résistance produisent des protéines-leurres, qui ont une affinité plus

forte pour l'antibiotique que la cible de celui-ci. Le but étant de séquestrer les molécules antimicrobiennes pour qu'elles n'atteignent pas leur cible (Guardabassi & Courvalin, 2005). Il existe d'autres mécanismes de contournement pour augmenter la résistance, comme la surproduction de l'enzyme cible évitant ainsi sa saturation par les antibiotiques. Cette résistance peut aussi être acquise lorsqu'il existe des protéines avec une activité redondante de la cible. La protéine redondante n'ayant pas d'affinité pour l'antibiotique, elle peut remplir le rôle de la cible (Darby et al., 2023). L'exemple classique de contournement de la cible se trouve chez MRSA qui produit une protéine similaire aux PBP, les protéines de liaison à la pénicilline additionnelle (PBP2a). Ces protéines sont capables de remplir les mêmes fonctions que les PBP classiques, mais elles possèdent une affinité réduite à la pénicilline, ce qui permet de résister à de plus fortes concentrations de l'antibiotiques (Stapleton & Taylor, 2002).

6.3.6 Inactivation de l'antibiotique

L'inactivation ou la modification de l'antibiotique est une forme de résistance active très répandue qui repose sur le principe de détruire ou d'inactiver les molécules antimicrobiennes. L'exemple le plus connu est les β -lactamases, une classe de protéines de résistance, qui hydrolysent les antibiotiques de la famille des β -lactames (Bush & Bradford, 2016). Ces protéines de résistance sont tellement répandues, qu'il est aujourd'hui commun de prendre des inhibiteurs de β -lactamases en même temps qu'un traitement antibiotique comme la pénicilline pour augmenter l'efficacité du traitement (Bush & Bradford, 2016). En plus de la digestion enzymatique des antimicrobiens, il existe aussi des protéines inactivatrices qui vont simplement ajouter un groupement supplémentaire sur une molécule d'antibiotique, ce qui réduit son affinité pour la cible. Il s'agit d'un mode de résistance très répandu contre les aminoglycosides, où les protéines de résistance ajoutent des groupements phosphates ou acétyle sur l'antibiotique (Krause et al., 2016). On trouve des protéines neutralisantes qui catalysent l'inactivation chimique des antimicrobiens, comme l'oxydation des tétracyclines par la protéine TetX (Darby et al., 2023). Il existe des dizaines d'exemples d'enzymes qui font appel à une multitude de réactions chimiques pour inactiver les antibiotiques, on en trouve contre quasiment toutes les familles d'antimicrobiens (De Pascale & Wright, 2010; Longley & Johnston, 2005). La figure 11 propose une synthèse des mécanismes de résistances aux antibiotiques.

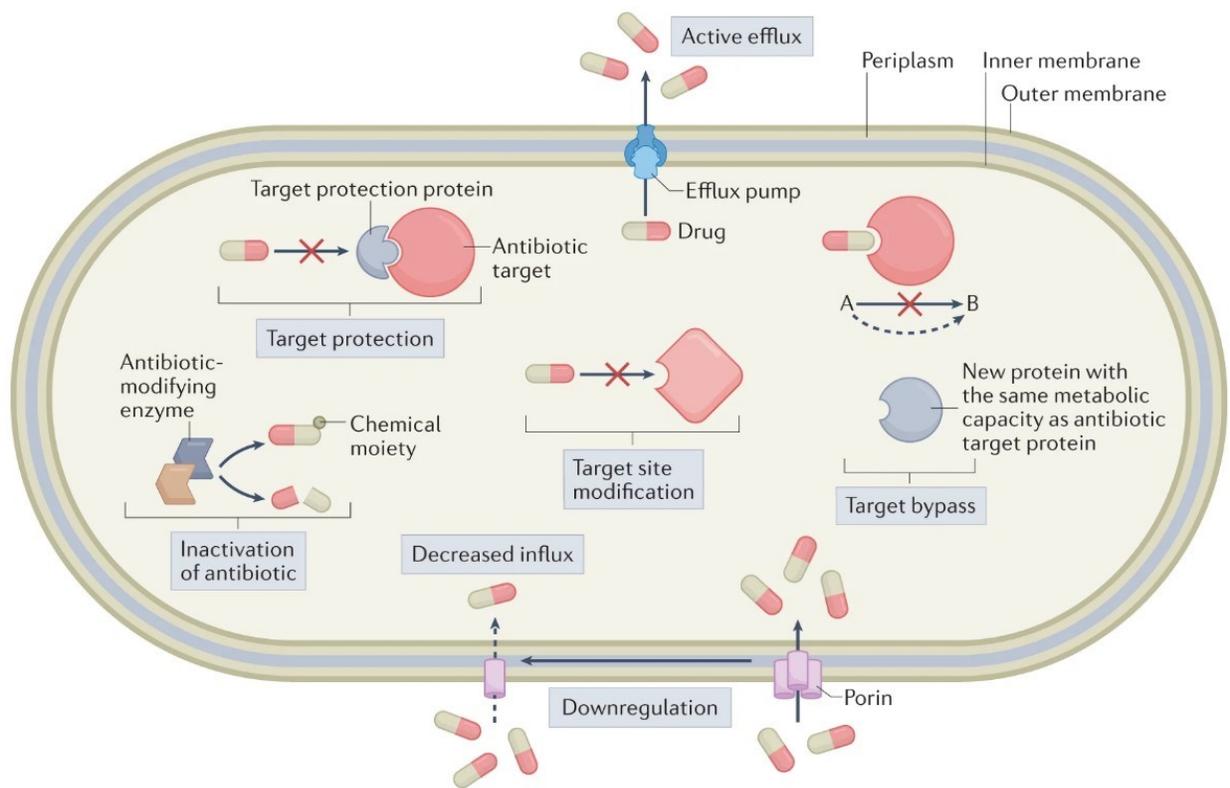


Figure 11

Les mécanismes moléculaires de résistance aux antibiotiques.

L'inactivation des antibiotiques est effectuée par des enzymes qui dégradent ou modifient les molécules d'antibiotiques. La dégradation enzymatique nécessite l'hydrolyse du groupement fonctionnel de l'antibiotique. Les enzymes qui modifient les antibiotiques y transfèrent divers groupements chimiques qui préviennent la liaison de l'antibiotique sur sa cible. La modification du site cible permet de diminuer l'affinité à l'antibiotique. Dans le cas d'un contournement de cible, la fonctionnalité de la cible de l'antibiotique est assurée par une nouvelle protéine qui n'est pas entravée par l'antibiotique. La diminution de l'influx est médiée par des modifications de la structure de la membrane qui augmente la perméabilité de celle-ci. La protection de la cible implique l'association physique d'une protéine de protection de la cible avec la cible de l'antibiotique. (Darby et al., 2023). [Traduction Libre] Reproduction sous la permission de *Springer Nature Limited* pour utilisation dans un mémoire (Numéro de licence : 5562601458516).

6.4 — Les peptides antimicrobiens (PAM)

Les PAM furent traditionnellement classés comme une famille d'antibiotiques qui cible la membrane des bactéries avec la PmB comme molécule type de la catégorie. Cependant, les PAM sont de plus en plus classifiées comme un type de molécules à part entière et non comme une famille d'antibiotiques. Ce sont des peptides qui proviennent originellement du système immunitaire inné d'une très grande variété d'espèces d'animaux et plantes. Ils peuvent également provenir de certaines espèces de bactéries qui les utilisent pour être de meilleurs compétiteurs dans leur niche écologique (Mahlapuu et al., 2016). Les PAM sont très vastes et diversifiés, plus de 17 360 séquences de peptides antimicrobiens étaient répertoriées en 2016, et comptent au moins 3 240 peptides dans la base de données APD3 en 2020 (Bechinger & Gorr, 2017; Huan et al., 2020). Depuis les années 2000, la recherche sur les PAM s'est intensifiée à cause de leur potentiel comme remplacement des thérapies antibiotiques classiques (Mahlapuu et al., 2016). En plus d'une activité antibactérienne, les PAM ont des activités antifongique, antivirale, anti-protozoaire et anticancer (Seyfi et al., 2020). Les mécanismes d'action sont diversifiés, mais sont majoritairement composés d'actions antimicrobiennes dirigées contre la membrane plasmique et d'actions immunomodulatrices (Kumar et al., 2018). L'activité antibactérienne des PAM ne serait pas le résultat d'un seul mécanisme, mais de l'accumulation de plusieurs effets sur différentes cibles du métabolisme bactérien et de son intégrité membranaire (Mahlapuu et al., 2016). Les PAM peuvent être classifiés de plusieurs façons, selon leur origine, leur activité, leur structure et la diversité des acides aminés (Huan et al., 2020). La figure 12 présente la classification des PAM selon leur structure trois-dimensionnelle datant de 2021.

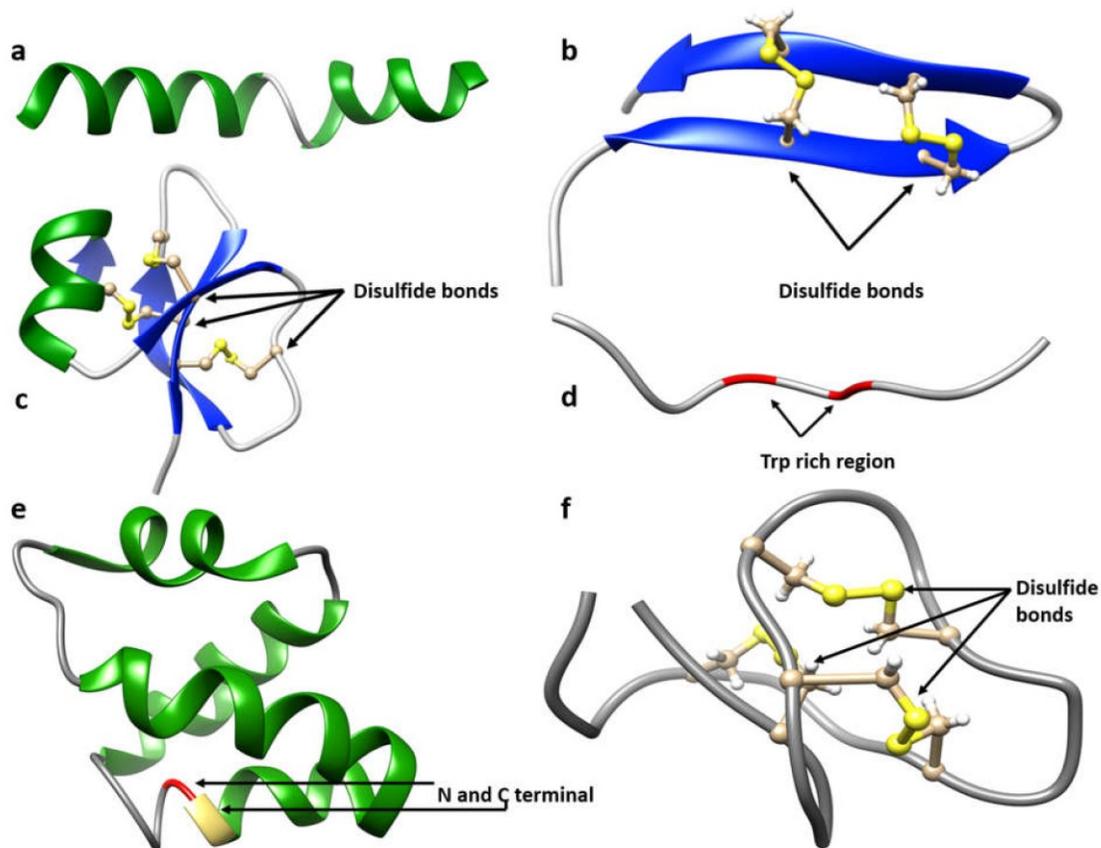


Figure 12

Les cinq classes de structure 3D des PAM.

(a) La structure en hélice- α , représentée par la méllitine. (b) La structure en feuillet- β , représentée par la protégrine-1. (c) La structure $\alpha\beta$, représentée par la β -défensine 2. (d) La structure non- $\alpha\beta$, représenté par l'indolicidine. (e) La structure cyclique sans liaison disulfure ou thioéthers, représentée par la carnocycline-A. (f) La structure cyclique avec liaison disulfure ou thioéthers, représentée par la kalata B1 (Bin Hafeez et al., 2021). Reproduction sous la permission de *Creative Commons* (CC BY 4.0).

6.4.1 Modes d'action des PAM

L'activité antimicrobienne des PAM la plus décrite est leur interaction avec la membrane plasmique des bactéries. Les PAM qui ont majoritairement une charge positive sont nommés les PAM cationique (PAMC), donc une affinité pour les membranes qui sont principalement chargées négativement. Chez les bactéries à Gram négatif, la charge négative de la membrane externe est élevée à cause des LPS, ce qui en fait des cibles particulièrement accessibles pour les PAM (Mahlpuu et al., 2016).

Les PAM perturbent les membranes des bactéries en y formant des pores, ce qui les perméabilisent et facilite l'entrée à d'avantage de peptides dans l'espace périplasmique ou le cytoplasme. La membrane désormais poreuse et dépolarisée n'est plus capable de retenir les composants du cytoplasme comme les ions et métabolites, ce qui mène à la lyse de la bactérie (Yeaman & Yount, 2003). Trois modèles de formation de pores (fig. 13) sont décrits pour expliquer l'activité des PAM sur les membranes. Dans le modèle du tapis, les PAM accumulés à la surface d'une membrane agissent comme un détergent en séparant les lipides. Le modèle du tonneau se caractérise par l'insertion des PAM dans la membrane qui vont interagir entre eux pour former un tunnel. Finalement, dans le modèle du pore toroïdal, les PAM s'insère dans la membrane et change ensuite leur conformation pour former des trous en forme d'anneau (Huan et al., 2020).

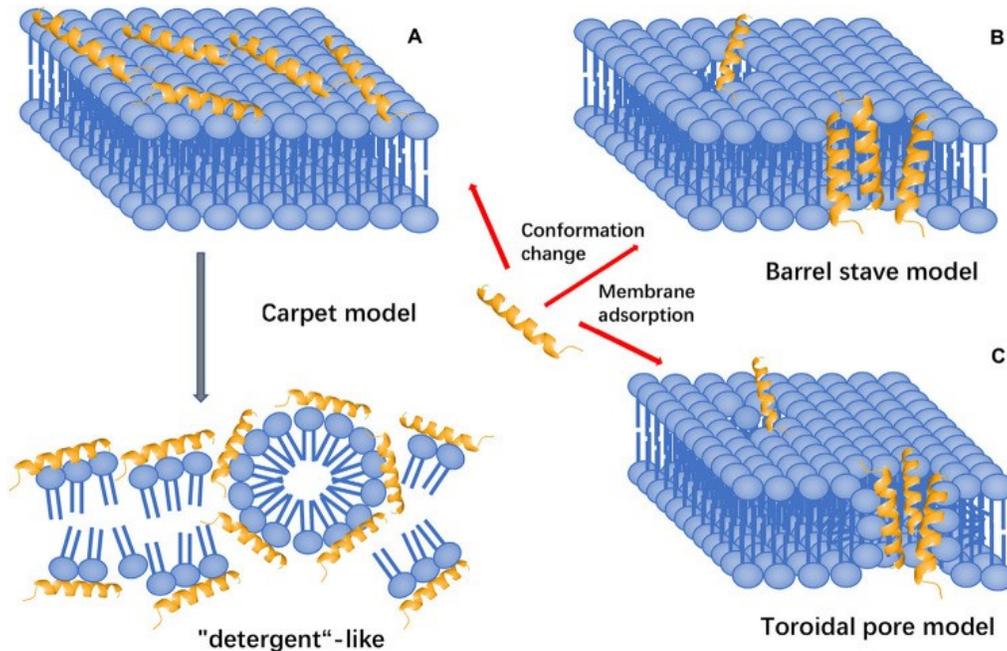


Figure 13

Les mécanismes d'action des PAM sur la membrane externe.

(A) Modèle du tapis. (B) Modèle du tonneau. (C) Modèle du pore toroïdal (Huan et al., 2020). [Traduction libre] Reproduction sous la permission de *Creative Commons* (CC BY 4.0).

Suivant la formation de pores dans la membrane des bactéries, les PAM peuvent pénétrer le cytoplasme pour interagir avec une variété de cibles intracellulaire. Ces interactions peuvent être le résultats d'une synergie entre deux PAM, l'un ciblant la membrane et l'autre agissant à

l'intérieur du cytoplasme (Yan & Hancock, 2001). Parmi les cibles possibles pour les PAM, on trouve la synthèse de l'ADN et ARNm, la synthèse et la maturation des protéines, les enzymes du métabolisme et la biosynthèse de la paroi bactérienne (Mahlapuu et al., 2016).

Étant initialement des peptides du système immunitaire, il n'est pas étonnant que les PAM possèdent des activités immunomodulatrices. Certains peptides sont capables d'agir comme modulateur de l'inflammation, d'autres peuvent neutraliser certaines toxines (Mahlapuu et al., 2016). Certains effets en lien avec le système immunitaire adaptatif ont été répertoriés, comme la régulation de la différenciation des cellules immunitaires, la chimiotaxie avec les leucocytes et autres (Mahlapuu et al., 2016).

6.5 — La polymyxine B (PmB)

La PmB, appartenant à la famille des polymyxines, fut le premier peptide antimicrobien commercialisé dans les années 1950. Il est isolé de la bactérie *Bacillus polymyxa* et possède une activité très similaire aux PAMC du système immunitaire inné, comme la cathélicidine humaine LL-37, en induisant la formation de pores dans les membranes des bactéries (Mohapatra et al., 2021). Les polymyxines ont une structure de décapeptide cyclique portant cinq résidus aminés chargés positivement et possédant une queue terminale d'acides gras (Brown & Dawson, 2015). La PmB, est majoritairement un mélange entre deux polypeptides, la polymyxin B1 et la polymyxine B2. La différence entre les différentes polymyxines se trouve au niveau de la queue terminale d'acides gras (Ayoub Moubareck, 2020). Les polymyxines sont particulièrement efficaces contre les bactéries à Gram négatif à cause de leur activité antimicrobienne qui cible les membranes. Malheureusement, cette activité est aussi une cause de toxicité, car la PmB peut également agir sur les membranes cytoplasmiques des cellules eucaryotes (Yu et al., 2015). Les polymyxines comprennent aussi une autre molécule commercialisée, soit la colistine, ou polymyxine E.

6.5.1 – Mécanisme d'action

Le mécanisme primaire de la PmB est la perméabilisation de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. La PmB possède une forte affinité pour les LPS qui se trouvent à la surface des bactéries. Cette interaction déplace les ions de calcium et magnésium de la membrane externe,

ce qui perturbe suffisamment l'intégrité membranaire pour permettre l'entrée de la PmB dans l'espace périplasmique (Ayoub Moubareck, 2020; Li & Velkov, 2019). La PmB peut ensuite se lier avec le lipide A des LPS, qui sont chargés négativement. Cette interaction permet l'insertion de la queue d'acides gras de la PmB dans la membrane externe. L'insertion de la PmB dans la membrane a pour conséquence de provoquer l'expansion et la déstabilisation de celle-ci (Ayoub Moubareck, 2020). La membrane externe ayant perdu son intégrité, le contenu périplasmique et les composants qui s'y trouvent sont perdus, ce qui laisse la membrane plasmique vulnérable. La PmB qui est guidée vers la membrane plasmique par les précurseurs du LPS, peut maintenant agir sur les phospholipides et y former des pores (section 6.4.1). La cumulation de ces effets mène à la lyse de la bactérie (Mohapatra et al., 2021; Yu et al., 2015). La figure 14 propose un schéma du mode d'action de la PmB sur la membrane externe.

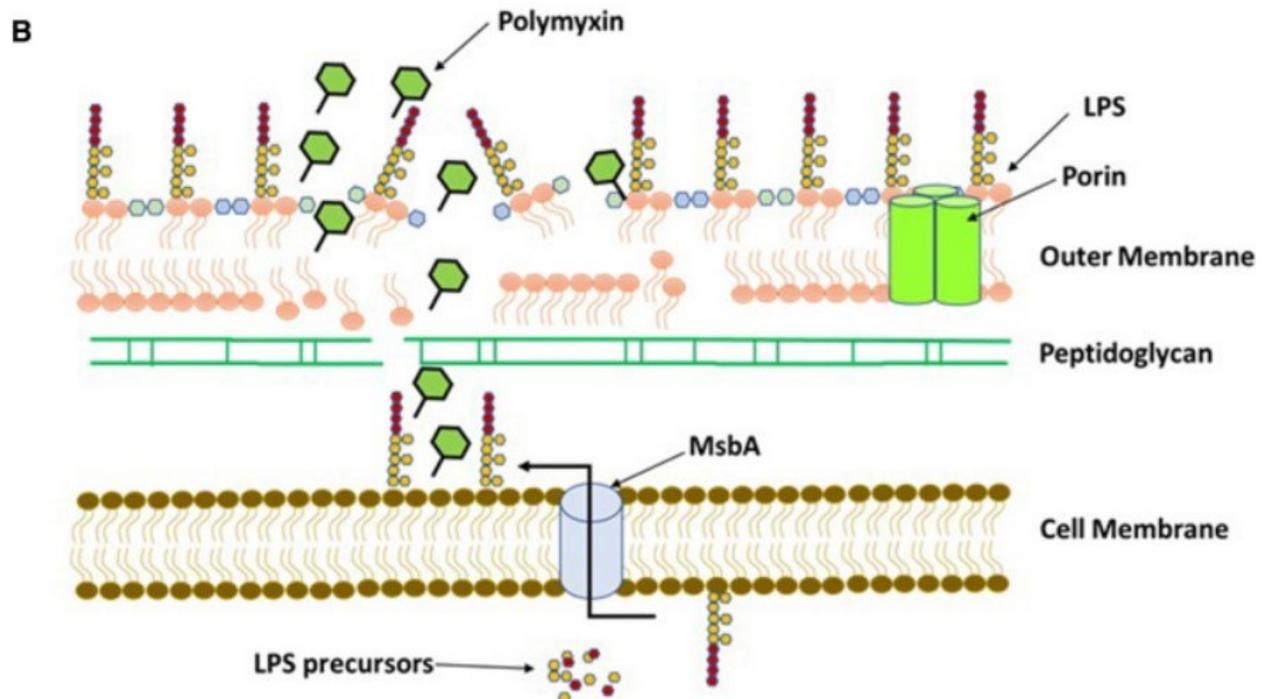


Figure 14

Modèle d'interaction de la Polymyxine B avec la membrane externe

Les molécules de PmB (hexagone vert) rejoignent, à l'aide d'interactions électrostatiques, le LPS de la membrane externe. Cela déplace les ions magnésium (Mg^{2+}) et calcium (Ca^{2+}), entraînant ainsi l'insertion de la molécule de polymyxine dans la membrane et sa déstabilisation. La PmB

peut ensuite agir sur l'assemblage des molécules de LPS naissantes sur la membrane cellulaire ainsi qu'avec leur transport jusqu'à la membrane externe (Mohapatra et al., 2021). [Traduction Libre] Reproduction sous la permission de *Indian Academy of Sciences* pour utilisation dans un mémoire (Numéro de licence : 5562611467102).

6.5.2 – Mécanismes d'action secondaires

En plus de son effet sur les membranes, d'autres mécanismes d'action pour les polymyxines ont été décrits. Parmi ces mécanismes, on peut nommer l'inhibition de la respiration, la génération d'espèces réactive de l'oxygène et une interaction avec les ribosomes (Mohapatra et al., 2021). Cependant, ces mécanismes ne sont pas encore définis en profondeur et on ne se sait pas si ces effets sont dus à une interaction avec PmB directement ou des conséquences de la perte de l'intégrité membranaire (Mohapatra et al., 2021).

6.6 — Les mécanismes de résistance aux PAM

Les peptides antimicrobiens ne sont pas immunisés à l'émergence de la résistance aux antimicrobiens. Plusieurs mécanismes de résistances se sont développés en coévolution, entre autres chez les bactéries du microbiote qui sont en contact constant avec les PAM du système immunitaire de l'hôte et provenant des autres bactéries (Cole & Nizet, 2016). La plupart des mécanismes de résistance aux PAM sont très similaires aux mécanismes de résistance aux antibiotiques. Voici quelques mécanismes présents chez les bactéries à Gram négatif.

6.6.1 Dégradation des PAM

Les PAM étant des peptides, ils sont nécessairement vulnérables aux enzymes protéolytiques. La sécrétion de protéases est donc un mécanisme de résistance qui est très similaire aux mécanismes d'inactivation des antibiotiques (Bechinger & Gorr, 2017).

6.6.2 Modifications des membranes

Les PAMC étant attirés par la polarité de la membrane externe des bactéries à Gram négatif des changements de polarité permettent de mieux résister. Certaines bactéries peuvent réarranger le LPS afin de diminuer la charge négative de la membrane. Ces modifications peuvent être des changements de phosphorylation, la substitution de certains sucres et la sécrétion de lipides

(Bechinger & Gorr, 2017). Par exemple, le système à deux composantes PhoP-PhoQ de *Salmonella enterica* est un mécanisme de résistance complexe à la PmB qui fonctionne en changeant la composition du LPS. Ce système protège les phosphates chargés négativement du lipide A en ajoutant un groupement chargé positivement afin de réduire les interactions avec l'agent microbien et donc augmenter la résistance (Yu et al., 2015). On trouve aussi des modifications de la membrane cytoplasmique chez des bactéries à Gram positif, ce qui augmente leur résistance aux PAMC. La modification des acides téichoïques par D-alanylation modifie la charge de la membrane cytoplasmique ce qui permet d'augmenter la résistance chez plusieurs bactéries (Saar-Dover et al., 2012).

6.6.3 Structures de protection

La production de matrice extracellulaire est un mécanisme puissant qui permet de former une couche protectrice efficace contre les PAM cationique et anionique en plus de potentiellement les séquestrer pour réduire leur concentration dans le milieu (Koprivnjak & Peschel, 2011). Ce mécanisme est très similaire à la production de biofilm, qui est d'ailleurs très résistant aux PAM pour les mêmes raisons. Cependant, il existe des peptides qui agissent spécifiquement sur les mécanismes de production de biofilms afin de contourner cette résistance. Ils doivent cependant agir rapidement sur les cellules libres, car ils sont beaucoup moins efficaces lorsque le biofilm est déjà formé (Bechinger & Gorr, 2017; Daep et al., 2010). La production d'une capsule de polysaccharide par plusieurs espèces de bactéries à Gram positif et à Gram négatif permet d'augmenter la résistance aux PAM. Certaines espèces peuvent produire une capsule polaire pouvant séquestrer les molécules antimicrobiennes, permettant ainsi de les éloigner de la membrane plasmique (Nawrocki et al., 2014).

6.6.4 Réduction de la concentration intracellulaire

Les protéines d'efflux de spécificité générale qui sont efficaces contre plusieurs classes d'antibiotiques peuvent aussi augmenter la résistance contre les PAM. Ce mécanisme est surtout efficace contre les PAM qui interagissent avec des cibles intracellulaires (Bechinger & Gorr, 2017).

6.6.5 Séquestration des PAM

Les vésicules membranaires sont des fragments de membranes relarguées lors de la croissance normale des bactéries, peuvent séquestrer les PAM et ainsi protéger la bactérie. Celles-ci sont retrouvées majoritairement chez les bactéries à Gram négatif et servent de leurre aussi bien aux PAM qu'aux bactériophages (Manning & Kuehn, 2011).

6.7 — La résistance de *V. cholerae*

Vibrio cholerae possède une forte plasticité grâce à ses mécanismes de transformation naturelle, notamment en relation avec la chitine qui stimule son acquisition d'ADN extracellulaire (Meibom et al., 2005). Cette capacité accrue à acquérir des éléments génétiques mobiles, tels des plasmides, éléments transposables, des éléments de conjugaison intégrants (ICE) et des séquences d'insertion (IS) a permis à plusieurs souches de *V. cholerae* d'accumuler un arsenal impressionnant de gènes de résistance aux antibiotiques (Das et al., 2020). Les traitements classiques à la streptomycine, au chloramphénicol et aux tétracyclines ne sont plus efficaces depuis la fin de 20^e siècle à cause de l'émergence des souches multirésistantes. Cette résistance a mené à l'utilisation d'antibiotiques plus récents pour traiter les cas graves de choléra, comme les macrolides et les fluoroquinolones. Aujourd'hui, l'efficacité de ces traitements est en péril avec l'apparition de souches résistantes aux macrolides et même à la ciprofloxacine (Clemens et al., 2017; Das et al., 2020; Verma et al., 2019).

6.7.1 Mécanismes de résistance

Parmi les mécanismes de résistance communs chez *V. cholerae*, on trouve plusieurs changements dans la structure des cibles des antibiotiques dus à des mutations spontanées qui ont été favorablement sélectionnées au gré des épidémies. Par exemple, la résistance aux quinolones chez *V. cholerae* est associée avec des mutations des gènes de topoisomérases II et IV, *gyrA* et *parC* (Das et al., 2020). Des analyses ont permis d'identifier au moins 6 classes de protéines efflux, ce qui permet de résister à plusieurs antibiotiques comme la tétracycline, le chloramphénicol et plusieurs aminoglycosides (Das et al., 2020). On trouve également un arsenal d'enzymes inactivatrices d'antibiotiques qui agissent en ajoutant des groupements chimiques grâce à des activités de ADP-ribosylation, phosphorylation, acétylation, etc (Verma et al., 2019). On trouve

également des mécanismes d'hydrolyse des agents antimicrobiens grâce à des enzymes tel des β -lactamases (Das et al., 2020). La figure 15 propose un résumé des mécanismes connus chez *V. cholerae*.

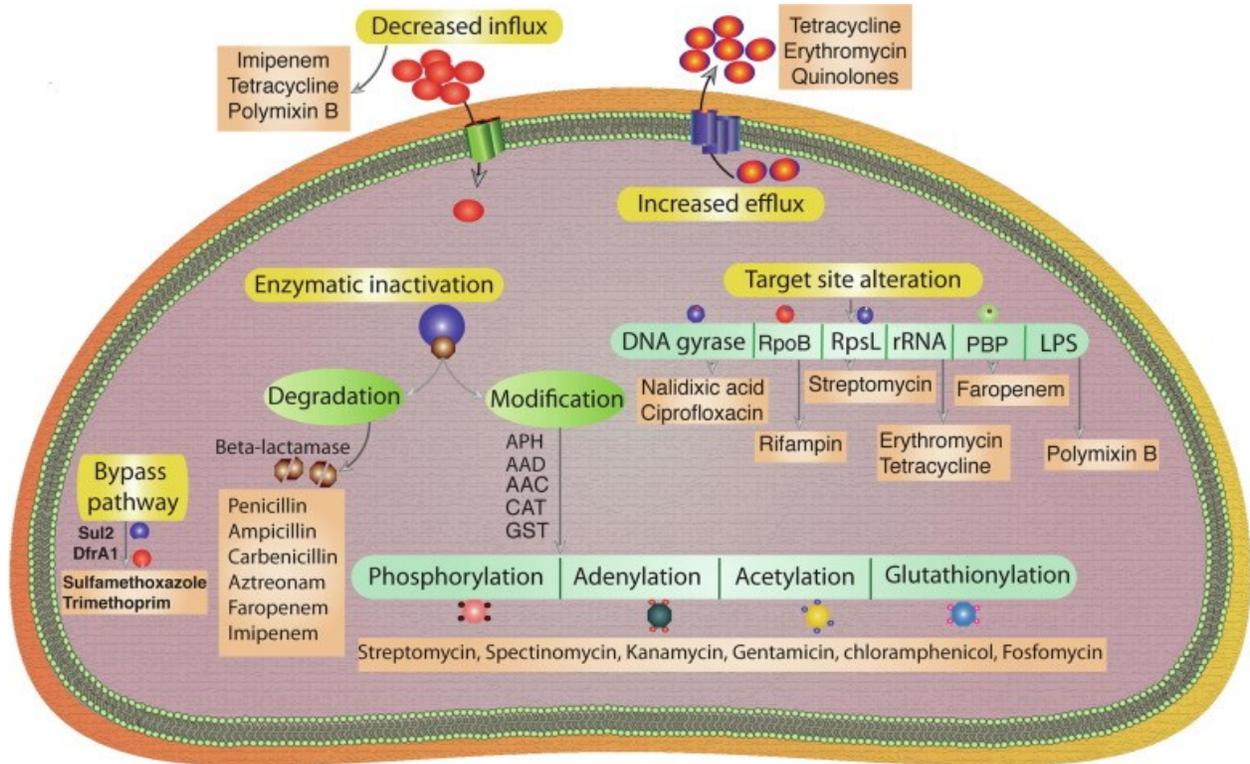


Figure 15

Les mécanismes des résistances aux antibiotiques chez V. cholerae.

Les bactéries sont capables de développer des résistances aux antimicrobiens par des mécanismes simples : en modifiant la séquence cible (transmission verticale) ou en acquérant des gènes codants pour la résistance à partir d'autres espèces bactériennes (transfert de gènes horizontal). Les caractéristiques de résistance obtenues peuvent assurer la résistance en modifiant la perméabilité de la membrane, la dégradation enzymatique ou la modification des agents antimicrobiens, ou en modifiant les cibles des antibiotiques. Ils peuvent aussi créer une voie métabolique alternative ou pomper activement les molécules antimicrobiennes hors de la cellule (Das et al., 2020). [Traduction Libre] Reproduction sous la permission de *Creative Commons* (CC BY 4.0).

6.7.2 Résistance à la PmB

Les souches El Tor de *V. cholerae* sont particulièrement résistantes à la PmB, contrairement aux souches classiques qui y sont sensibles. Cette résistance à la PmB, et à d'autres PAMC, est le résultat d'une modification des LPS, soit une glycosylation du lipide A. Ces changements sont médiés par les produits des gènes de l'opéron *almEFG* et ont comme conséquence une diminution de la charge négative de la membrane externe, donc une augmentation de la résistance (Henderson et al., 2014). Ce mécanisme de résistance est absent des souches classiques et aurait probablement contribué à l'émergence des El Tor comme agents du choléra lors de la 7^e pandémie (Henderson et al., 2017).

Un autre mécanisme de résistance efficace contre la PmB et d'autres PAMC est la séquestration des molécules antimicrobiennes par des vésicules de membrane. Les vésicules étant constituées de portions de la membrane externe ou cytoplasmique et de ses protéines associées, elles peuvent attraper et séquestrer les PAMC hors de la cellule bactérienne ce qui a un effet de dilution de l'antimicrobien sur la cellule (Band & Weiss, 2015). Il fut même démontré que des mutants avec un phénotype d'hypervésiculation étaient jusqu'à six fois plus résistants à la PmB (McBroom & Kuehn, 2007). Le rôle des vésicules de membranes dans la résistance au PAM est un sujet central du laboratoire Duperthuy. Mes collègues ont démontré que la protéine Bap1 (voir section 5.7.4) augmente son association avec les vésicules en présence de PmB, ce qui offre à la bactérie une résistance croisée à LL-37 (Duperthuy et al., 2013). Ils ont aussi démontré que des phénotypes d'hypervésiculations chez des variants de *V. cholerae* confèrent une résistance accrue à la PmB (Giacomucci et al., 2022).

6.7.3 Adaptations aux quantités sous-inhibitrices de PmB

La relation de *V. cholerae* avec les PAM est complexe et dynamique. En fonction de la concentration de PAM dans son milieu, on peut assister à une multitude de comportements différents qui varie de l'augmentation de la virulence à l'inhibition de la croissance et la mort. Une analyse en protéomique effectuée par le laboratoire Duperthuy a révélé 18 protéines extracellulaires présentes dans le sécrétome uniquement en présence de PmB (Mathieu-Denoncourt & Duperthuy, 2022).

Parmi les phénotypes décrits chez *V. cholerae* en présence de PmB en quantité sous-inhibitrice, on trouve la production de vésicules plus large avec une composition différente de protéines associés aux membranes. Parmi ces protéines, on trouve le complexe Bap1-OmpT qui est capable de lier les molécules de PAMC comme LL-37, augmentant ainsi la résistance aux PAM (Duperthuy et al., 2013). La présence de faibles quantités de PmB dans le milieu de croissance à un effet inhibiteur sur la formation des biofilms. Cette inhibition est le résultat de la perte du flagelle à la suite de l'exposition à la PmB. Sans le flagelle comme facteur de mobilité et d'adhésion, la formation de biofilm s'en trouve compromise (Giacomucci et al., 2019). De plus, la présence de PmB stimule l'activité du système de sécrétion de type 6 (T6SS) ce qui a pour effet d'augmenter le « fitness » de *V. cholerae* dans un contexte de compétition interspèces et de résistance aux prédateurs protozoaires (Mathieu-Denoncourt & Duperthuy, 2022).

D'autres effets des quantités sous-inhibitrices de PmB ont été répertoriés chez d'autres espèces. Par exemple, chez *P. aeruginosa*, où la PmB peut ralentir significativement la division cellulaire lorsque présente en quantité sous-inhibitrice (Mortensen et al., 2009). Chez *Acinetobacter baumannii*, les concentrations sous-inhibitrices de PmB stimulent la transition de bactéries planctoniques à bactéries formatrices de biofilm, avec une augmentation de la synthèse des protéines Bap et éventuellement une production accrue de biofilm (Sato et al., 2018).

Chapitre 7 — Problématique et objectifs expérimentaux

L'utilisation excessive des antibiotiques dans notre société moderne a mené au développement de nombreux mécanismes de résistances chez les bactéries, ce qui menace notre capacité à traiter les infections bactériennes. La résistance aux agents antimicrobiens des bactéries est un phénomène complexe qui peut se manifester différemment selon les facteurs environnementaux (Corona & Martinez, 2013). La formation de biofilms par les bactéries leur permet d'augmenter significativement leur résistance aux agents antimicrobiens dans des conditions de croissance hostile (Lewis, 2001). Des différences de sensibilité aux agents antimicrobiens en conditions anaérobiques ou hypoxiques ont été décrites, cependant les mécanismes moléculaires impliqués sont encore inconnus (Casey et al., 1985; DeMars et al., 2016). Chez *V. cholerae*, la formation d'agrégats de biofilm et de microcolonies a été rapportée lors de la croissance anaérobie (Xi et al., 2020). Ces structures sont associées avec des phénotypes de tolérances accrues qui peuvent influencer positivement la résistance aux molécules antimicrobiennes (Sauer et al., 2022). Lors de l'infection du système gastro-intestinal humain, les bactéries sont soumises à divers stress absents de leur environnement naturel, comme l'acidité extrême de l'estomac et les peptides de défense du système immunitaire (Robinson et al., 2015). *V. cholerae* possède un arsenal d'adaptations qui lui permet de survivre autant dans l'environnement infectieux que dans son environnement marin naturel (Clemens et al., 2017).

L'objectif global de cette maîtrise était de caractériser la résistance aux agents antimicrobiens dans des milieux mimant certaines des caractéristiques de l'environnement infectieux chez *V. cholerae*. Je pose comme 1^{re} hypothèse que les conditions environnementales déterminent la résistance aux antibiotiques. En 2^e hypothèse, j'avance que l'effet anti-biofilm des PAM est plus performant en anaérobiose sur les biofilms de *V. cholerae*. Pour la 3^e hypothèse, je suggère que les fortes concentrations en PmB enclenchent un mécanisme de résistance lié à l'ADN chez les biofilms de *V. cholerae*.

Pour répondre à ces hypothèses, j'ai tout d'abord étudié les différences de résistance aux familles d'antibiotiques selon des conditions de croissance reflétant l'environnement naturel aquatique et l'environnement infectieux. Ensuite, j'ai investigué les caractéristiques des biofilms en

aérobiose et en anaérobiose, ainsi que leur relation avec diverses concentrations de peptides antimicrobiens. Finalement, j'ai caractérisé un phénotype présent chez les biofilms de *V. cholerae* lorsqu'ils sont traités avec de fortes concentrations de PmB.

Pour atteindre ces objectifs, j'ai utilisé une méthodologie variée comprenant plusieurs types de tests de résistances aux antimicrobiens, des tests de formation et de résistance des biofilms, ainsi que de la caractérisation des biofilms par microscopie en flux et en fluorescence.

Chapitre 8 — Matériel et méthodes

8.1 Souches et conditions de croissance

V. cholerae O1 El Tor Inaba A1552 est une souche clinique isolée chez un voyageur du Pérou dans les années 1990s lors d'une épidémie de choléra en Amérique du Sud (Allué-Guardia et al., 2018). La souche A1552R est un variant phénotypique rugueux qui produit plus de biofilms, permettant une meilleure acquisition de données liée aux biofilms (Beyhan & Yildiz, 2007). Plusieurs mutants du variant rugueux sont utilisés soit : A1552R $\Delta rbmA$, A1552R $\Delta rbmC$, A1552R $\Delta bap1$ et un triple mutant A1552R $\Delta rbmAC\Delta bap1$. Une souche avec un plasmide permettant l'expression d'une protéine fluorescente verte (GFP) maintenu par une cassette de résistance à la Kan, soit A1552 (pKEN2), est utilisée pour les essais dans le bioflux. L'ensemble des souches utilisées sont listées dans le tableau 1.

Les bactéries sont cultivées dans un milieu « Lysogeny Broth » (LB), avec 1% de peptone, 0,5% d'extrait de levure et 0,5 % de NaCl. Des géloses Mueller-Hinton Agar (MHA) sont utilisées pour les tests d'antibiogramme (Difco™ ref. 225250). Un milieu LB additionné de 50 mM TMAO (LB-TMAO) est utilisé pour la culture en anaérobiose afin de promouvoir la respiration anaérobie (Lee et al., 2012). Les expériences en anaérobiose sont réalisées dans une chambre anaérobie Bactron 600 (Sheldon Manufacturing) équipée d'un incubateur. Les milieux destinés à l'anaérobiose sont placés 48 h à l'avance en chambre anaérobie pour assurer le retrait de tout l'oxygène résiduel. Toutes les expériences sont réalisées à une température de 37°C, excepté les tests d'antibiogrammes dont la température de 18°C est spécifiée.

Tableau 1

Liste des souches utilisées lors de l'étude.

Souches et plasmides	Caractéristiques générales	Référence
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor Inaba		
A1552	Souche sauvage pathogène responsable de la 7 ^e pandémie de choléra.	(Allué-Guardia et al., 2018)
A1552 (pKEN2)	Souche sauvage avec un plasmide permettant l'expression d'une protéine fluorescente verte (GFP).	(Cormack et al., 1996)
A1552R	Variant rugueux de la souche sauvage produisant une quantité accrue de biofilm.	(Yildiz et al., 2001)
A1552R Δbap1	Souche rugueuse avec délétion du gène codant pour la protéine Bap1 (protéine de structure jouant un rôle dans l'ancrage des biofilms).	(Hollenbeck et al., 2014)
A1552R ΔrbmA	Souche rugueuse avec délétion du gène codant pour la protéine RbmA (protéine responsable de l'adhésion entre les bactéries du biofilm).	(Hollenbeck et al., 2014)
A1552R ΔrbmC	Souche rugueuse avec délétion du gène codant pour la protéine RbmC (protéine de structure et stabilisatrice du biofilm).	(Hollenbeck et al., 2014)
A1552R ΔrbmAC Δbap1	Souche rugueuse avec délétion des trois gènes de structures du biofilm.	(Hollenbeck et al., 2014)

8.2 Test de résistance en antibiogramme

Les tests de susceptibilité aux antibiotiques par diffusion sur gélose sont réalisés avec des disques d'antibiotiques selon la méthode de Kirby-Bauer (Hudzicki, 2009). On ensemence des géloses MHA, ou MHA + 2 % NaCl, avec 100 μ l d'une culture en phase stationnaire de *V. cholerae* A1552 et l'on forme un tapis bactérien en étalant la culture. Les disques imbibés d'antibiotiques sont ensuite ajoutés au centre de la gélose avant une incubation de 24 h à 37°C ou 48 h à 18°C selon les conditions à l'étude. La concentration d'antibiotique des disques varie de 5 à 30 μ g/ml selon les disponibilités chez le fournisseur (Fisher Scientific). Après l'incubation, les zones d'inhibition

sur les géloses sont mesurées à la règle pour comparer la sensibilité de la souche aux antibiotiques testés selon les différentes conditions de croissance. Chaque test est réalisé en triplicatas biologiques et techniques.

8.3 Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Les bactéries sont cultivées dans un milieu LB à 37°C sous agitation à 250 RPM jusqu'à une DO_{600nm} de 0,3. La culture est diluée [1:3000] dans du LB ou LB-TMAO et ensuite répartie dans des plaques de 96 puits à raison de 90 μ l par puits. Un volume de 10 μ l d'antibiotiques suspendus dans du PBS est ajouté aux puits pour obtenir la concentration finale à l'étude. Les plaques sont incubées à 37°C avec agitation en présence d'oxygène ou sans agitation en condition anaérobie durant 18 h, étant donné que le maximum de croissance est atteint à ce délais. La lecture de l'absorbance des plaques se fait à 600 nm dans un lecteur de plaque SpectraMax® ID3 (Molecular Devices). La concentration minimale inhibitrice (CMI) est déterminée comme la plus petite concentration qui inhibe la croissance des bactéries à moins de 10 % de leur croissance maximale. La concentration inhibitrice médiane (CI_{50}) est la plus petite concentration qui inhibe la croissance des bactéries à moins de 50 % de leur croissance maximale. Tous les tests sont reproduits en triplicata biologiques et techniques.

8.4 Test de formation et résistance des biofilms

Les bactéries sont cultivées dans un milieu LB à 37°C sous agitation à 250 RPM au cours de la nuit, puis diluées [1:100] dans du LB frais. La dilution est répartie dans une plaque de 96 puits, à raison de 100 μ l par puits ou dans une plaque 24 puits, à raison de 1 ml. La plaque est incubée à 37°C sans agitation pour 18 h. Au lendemain, les puits sont drainés et rincés doucement avec de l'eau distillée. La pellicule de biofilm de surface est retirée avec une petite spatule en métal lorsque celle-ci est présente dans les plaques 24 puits seulement. Les biofilms sont colorés au cristal violet 0,1 % pendant 10 minutes. Les puits sont rincés 3 fois avec de l'eau distillée et sont ensuite laissés à sécher pour 24 h. Au lendemain, les biofilms sont dissous dans l'acide acétique 30 %, au même volume qu'originellement, pendant 10 minutes. La lecture de l'absorbance des plaques se fait à 595 nm dans un lecteur de plaque SpectraMax® ID3. Une valeur standardisée pour chaque concentration de PmB est retirée pour effectuer le blanc, cette valeur est obtenue à la suite de

l'incubation de plusieurs réplicats de plaque de LB avec différentes concentrations de PmB qui ont suivi les mêmes étapes de coloration que les biofilms. Pour les tests de formation du biofilm en présence de PmB, celle-ci est ajoutée dans les plaques en même temps que les bactéries. Pour les tests de résistances des biofilms, la PmB est ajoutée sur un biofilm de 24 h et ceux-ci sont incubés 24 h de plus avant de procéder à la coloration. Tous les tests sont reproduits minimalement en triplicata.

8.5 Récupération des bactéries des biofilms traités à la PmB

Afin de récupérer des bactéries dans les biofilms traités à 1600 µg/ml de PmB, les mêmes tests de résistance avec A1552R, que ceux décrits au paragraphe précédent ont été réalisés dans des plaques de 24 puits, jusqu'au lendemain de l'incubation avec PmB de 24 h. On retire le milieu avec PmB et les puits sont rincés 2 fois, avec du LB frais. Après les trois lavages au LB, on ajoute 1 mL de LB frais et l'on gratte le fond du puits à l'aide de l'embout de pipette pour suspendre le biofilm dans le LB. On réalise ensuite six dilutions binaires avec le biofilm en solution afin de diluer la PmB résiduelle pour éviter de tuer les bactéries survivantes dans les amas de biofilms. Les 3 dernières dilutions sont ensuite ensemencées sur des géloses LBA afin d'obtenir des colonies isolées et sont incubées pendant une nuit à 37°C. On récupère ensuite quelques colonies qui seront mises en culture dans le but de faire des réserves au congélateur -80°C pour les futures expérimentations. Les nouvelles souches sont nommées A1552R V1-6.

8.6 Microscopie en microflux

La croissance de biofilm de *V. cholerae* se fait à l'aide d'un système de microfluidique, le Bioflux200 (Fluxion), avec une souche de A1552 exprimant la GFP à l'aide du plasmide pKEN2. Les bactéries sont cultivées dans un milieu LB à 37°C sous agitation à 250 RPM. Le système de microfluidique est mis en place selon les instructions de fabricant. Le système est inoculé avec 20 µl de culture bactérienne à DO₆₀₀ de 0,5, suivi d'une incubation de 30 minutes pour permettre l'adhérence. Après nettoyage des cellules planctoniques, le système est lancé avec un flux de 0,20 dyne. Le flux de LB est laissé en continu sous une plaque chauffante à 37°C pour le temps d'acquisition des données. Les tests de formation de biofilm commencent dès le lancement du flux avec ajout de PmB suivant l'adhérence initiale. Les tests de résistance des biofilms

commencent après un 12 h de flux initial pour permettre le développement d'un biofilm mature. Les puits de la plaque du microflux sont ensuite lavés et le milieu est changé pour ajouter la PmB en flux. Pour les tests de survie, les puits sont lavés après le flux avec PmB et remplacé avec du LB frais. Ensuite, on fait un cycle de nettoyage de 5 minutes à 1 dyne, suivi de 1 h de flux régulier et finalement un dernier lavage des puits pour retirer toute PmB résiduelle. Les photos sont prises avec un microscope Revolve4 (Echo), en mode inversé, à grossissement 100x (Olympus Objective 10X Fluorite ELWD NA 3.0-4.2MM) avec fond clair. La fluorescence est obtenue grâce l'ajout de colorants Hoechst 33342 (NucBlue™) et iodure de propidium (PI) dans le flux passant sur des biofilms matures, durant 30 minutes. Les photos en fluorescence utilisent un filtre DAPI pour le Hoechst 33342, Texas Red pour le PI et FITC pour la GFP.

8.7 Croissance sur filtre 0,22 µm.

Les filtres de nitrocellulose stériles sont déposés sur des géloses LB agar et on ajoute 10 µl de culture de *V. cholerae* avant d'incuber pour une nuit à 37°C. Après l'incubation, les filtres sont prélevés puis déposés sur des géloses LB agar avec des concentrations de 0, 6, 200 et 1600 µg/ml de PmB dans la gélose. Au bout de 72 h d'incubation, on observe les phénotypes des colonies.

8.8 Extraction d'ARN, ADNc et PCR quantitatif (qPCR)

Les biofilms de *V. cholerae* A1552R sont cultivés en plaque de 24 puits comme décrits précédemment (section 8.4). Le milieu de culture est retiré et remplacé par un milieu LB frais avec PmB lorsque nécessaire et incubé pour 15 minutes, 1 heure ou 6 heures. Le milieu et la pellicule de surface sont ensuite retirés. Chaque biofilm est dissous dans 333 µl de TRIzol™ et placé à 4°C pour une nuit. Le lendemain, trois puits de chaque condition sont combinés pour obtenir un total de 999 µl de biofilm dissous par condition. L'extraction d'ARN est effectuée selon le protocole du fournisseur (Invitrogen™). Les ARN sont traités à la DNase avec TURBO DNA-free Kit (Invitrogen™) en suivant le protocole du fabricant. La qualité des ARN est évaluée par électrophorèse sur un gel d'agarose 2 % et par quantification au Nanodrop OneC (Thermo Scientific) afin d'évaluer la pureté des échantillons. Les ADNc sont synthétisés avec « High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit » (AppliedBiosystems) en suivant le protocole du fabricant et dilués à une concentration de 20 ng/µl dans de l'eau Milli-Q®. La qualité des ADNc est évaluée par PCR en testant avec des

amorces qui couvrent des régions intergéniques afin de confirmer l'absence d'ADN génomique résiduelle. Le PCR quantitatif (qPCR) est réalisé dans un thermocycleur QantStudio™ 3 real-time PCR system (ThermoFisher) avec une trousse « PerfeCTa SYBR® Green FastMix Low ROX » (Quantabio) pour l'amplification des acides nucléiques. Le cycle d'amplification est présenté au tableau 2. Les résultats sont analysés dans le logiciel « QuantStudio 3 and 5 real-time PCR system software » (ThermoFisher) en utilisant *recA* comme gène de ménage et des ADNc de biofilms non traités comme témoin. Les résultats sont obtenus à partir d'au moins 4 réplicats biologiques et 3 réplicats techniques pour chacun. Les amorces utilisées sont décrites dans le tableau 3.

Tableau 2

Cycle d'amplification pour le qPCR

Étape		Température	Temps
Dénaturation initiale		95°C	30 sec.
Dénaturation	40x	95°C	05 sec.
Hybridation		58°C	15 sec.
Élongation		70°C	12 sec.
Courbe de fusion		95°C	15 sec.
		60°C	60 sec.
		95°C	15 sec.

Tableau 3

Amorces utilisées pour déterminer l'expression des gènes du biofilm

Région génique	Amorce	Séquence	Référence
<i>recA</i>	F	ATTGAAGGCGAAATGGGCGATAG	(Giacomucci et al., 2019)
	R	TACACATACAGTTGGATTGCTTGAG	
<i>rbmA</i>	F	CAGTTGGCAAGTAACGGTGG	Cette étude.
	R	CGCTTTGGCTGGGAAGTAGA	
<i>rbmC</i>	F	TTGCTGTCGGTCTTTTGTCTG	Cette étude.
	R	GGCGGCTGATAATACACCCT	
<i>bap1</i>	F	TGACTCAAAGCACCGCATTC	Cette étude.
	R	CCATCGCCATTATCGTCGTT	
<i>vpsU (VPS-I)</i>	F	CTGGCACGCTAAAGACAGGA	Cette étude.
	R	ACTTGCTGGACTGGGTTGAC	

<i>vpsL</i> (VPS-II)	F	GCGAGTGATGGATAATGGCA	Cette étude.
	R	CGACGAATGAACGCACCAAA	

Chapitre 9 — Résultats

9.1 — Concentration minimale inhibitrice selon la température et la salinité du milieu

Les premières investigations du projet avaient pour but de déterminer si *V. cholerae* A1552 présentait des différences notables de résistance aux agents antimicrobiens selon les conditions de croissance. Des tests d'antibiogramme furent réalisés sur milieu MHA selon une salinité physiologique de 0,5 % ou selon une salinité représentative de l'environnement naturel, soit 2 %. Les géloses ont été incubées à la température physiologique de 37°C et à une température plus proche de l'environnement naturel soit 18°C. La combinaison 37°C et 0,5% NaCl est donc représentative de l'environnement infectieux, alors que la combinaison 18°C et 2% NaCl représente l'environnement naturel. Les incubations ont durées 24 h à 37°C et 48 h à 18°C. Les concentrations d'antibiotiques sont déterminés par les disques disponibles chez le fournisseur. La figure 16 présente les moyennes des diamètres des zones d'inhibition obtenues.

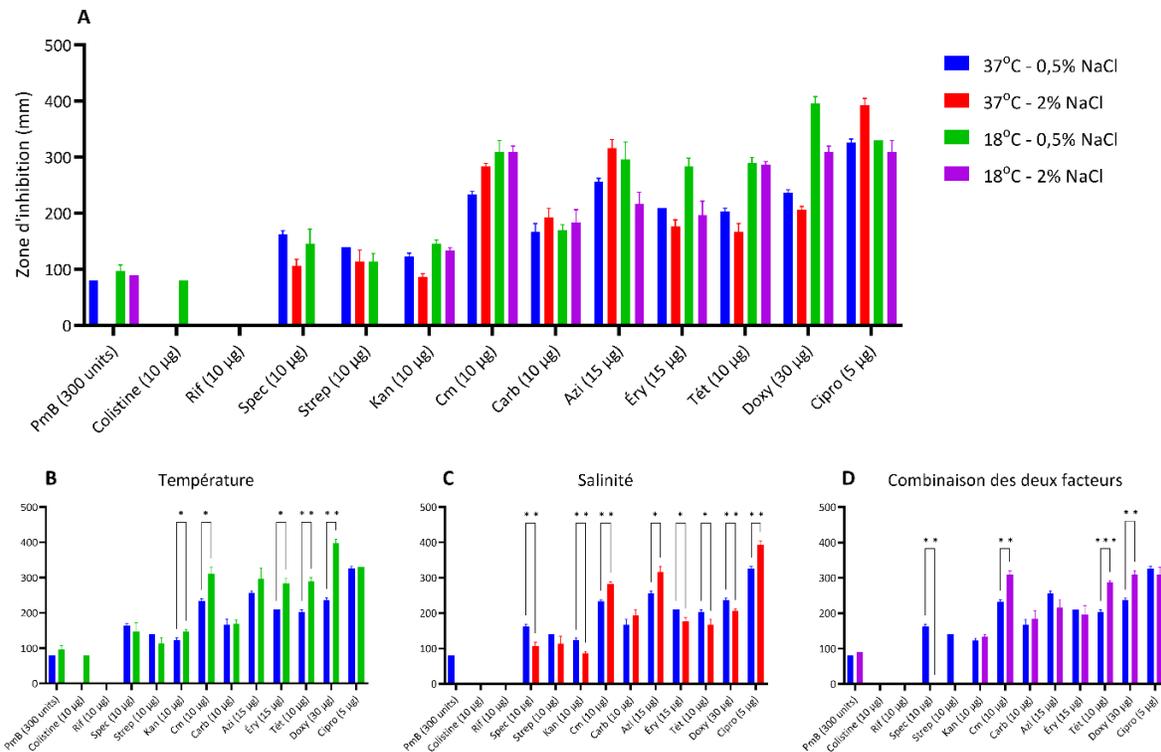


Figure 16

Antibiogramme de V. cholerae selon la température de croissance et la salinité du milieu de culture.

Les zones d'inhibitions de la croissance de *V. cholerae* A1552 sont mesurés à la suite d'une incubation de 24 heures à 37°C et 48 heures à 18°C sur des géloses MH ou MH 2% NaCl en présence de disques imbibés de différents antibiotiques dans des concentrations de 300 unités, 5 µg, 10 µg, 15 µg ou 30 µg. L'inhibition est comparée selon différentes conditions de croissance, (A) toutes les conditions, (B) température, (C) salinité et (D) température et salinité combinés. Les résultats sont représentatifs des moyennes de triplicata techniques et biologiques. Les tests de « T » de *Student* mesurent la différence entre les facteurs et la condition contrôle de 37°C, 0,5 % NaCl. Légende : * = P < 0,05. ** = P < 0,01. *** = P < 0,001. PmB, polymyxine B; colistine; Rif, rifamycine; Spec, spectinomycine; Strep, streptomycine; Kan, kanamycine; Cm, chloramphénicol; Carb, carbénicilline; Azi, azithromycine; Éry, érythromycine; Tét, tétracycline; Doxy, doxycycline; Cipro, ciprofloxacine.

Les résultats mettent en valeur la sensibilité de *V. cholerae* à un grand éventail d'agents antimicrobiens ainsi que plusieurs différences selon les conditions de croissance. La différence de température affecte majoritairement les antibiotiques de la famille des tétracyclines qui sont plus efficaces à faible température. On note aussi une efficacité accrue pour la Kan, le Cm et Éry à la température de 18°C (Fig. 16 B). La forte salinité augmente la sensibilité au Cm, Azi et Cipro. Inversement, dans ces conditions *V. cholerae* est plus résistante à la Spec, Kan, Éry et aux tétracyclines (Fig. 16 C). Lorsqu'on compare la température faible 18°C combiné à la forte salinité 2% NaCl aux conditions de bases de 37°C et 0,5% NaCl, on augmente beaucoup la sensibilité au Cm ainsi qu'aux tétracyclines (Fig. 16 D). La Spec et la Strep sont inefficaces avec la combinaison des 2 facteurs. On peut également noter une forte résistance aux PAM, soit la PmB et la colistine. Il y a absence d'inhibition par la PmB pour la condition 37°C à 2 % de NaCl. La colistine permet une inhibition seulement à 18°C à faible salinité (Fig, 16 A). Ensemble, ces résultats suggèrent que les caractéristiques environnementales influencent la sensibilité aux antibiotiques à plusieurs niveaux. La Rif est écartée pour la suite des expérimentations.

9.2 — Concentration minimale inhibitrice selon la disponibilité en oxygène

Ensuite, le but était de déterminer si la résistance de *V. cholerae* aux agents antimicrobiens était affectée par un autre facteur de l'environnement, la disponibilité en oxygène. Des tests de résistance aux antibiotiques furent effectués dans les deux conditions ; les tests aérobies ont été effectués dans du LB sous agitation durant 18 h, alors que les tests en anaérobiose ont été réalisés dans du LB sans agitation sous une hotte anaérobie. Les différents antibiotiques furent testés à partir de 100 µg/ml jusqu'à trouver la CMI. Après l'incubation, la densité optique (DO_{600nm}) fût mesurée dans un lecteur de plaque ID3 et les résultats d'inhibition de la croissance sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4

Concentration inhibitrice médiane et concentration minimale inhibitrice chez *V. cholerae* A1552.

Antibiotiques (µg/ml)	Aérobie		Anaérobiose	
	CI ₅₀	CMI	CI ₅₀	CMI
Polymyxine B	50,00	>100	>100	>100
Colistine	50,00	>100	>100	>100
Spectinomycine	12,50	50,00	50,00	100,00
Streptomycine	12,50	25,00	25,00	50,00
Kanamycine	12,50	25,00	12,50	50,00
Chloramphénicol	0,40	0,80	0,20	0,80
Carbénicilline	1,50	3,00	0,80	1,50
Azithromycine	0,20	0,40	1,50	3,00
Érythromycine	1,50	3,00	1,50	6,25
Tétracycline	0,20	0,40	<0,20	<0,20
Doxycycline	0,20	0,40	<0,20	<0,20
Ciprofloxacine	<0,20	<0,20	<0,20	<0,20

Légende : CI₅₀, concentration inhibitrice médiane; CMI, concentration minimale inhibitrice.

Les résultats démontrent plusieurs différences importantes de résistance selon la présence ou l'absence d'oxygène dans le milieu. Les antibiotiques de la famille des aminoglycosides (Spec, Strep et Kan) et des macrolides sont moins efficaces en anaérobiose jusqu'à 6 fois la concentration pour atteindre la CMI dans le cas de Azi (Tableau 4). Inversement, les bactéries

sont plus sensibles aux tétracyclines (Tétra et Doxy) et la Carb en condition d'anaérobiose, car ils présentent une sensibilité à une dose environ 2 fois plus faible (Tableau 4). La CMI n'est pas atteinte pour les PAM, cependant la CI₅₀ est augmentée jusqu'à plus de 2 fois la concentration d'antimicrobiens pour les tests sur les polymyxines (Tableau 4). Ces résultats démontrent qu'on peut trouver plusieurs différences d'efficacité des antibiotiques selon la croissance aérobie et le métabolisme fermentatif.

Afin de voir si les différences de résistance se poursuivent lorsque le métabolisme des bactéries utilise la respiration anaérobie plutôt que la fermentation, un milieu de culture enrichie de TMAO (50 mM), qui sert d'accepteur final d'électrons pour le métabolisme respiratoire, est utilisé. Les tests aérobies furent effectués dans du LB sous agitation durant 18 h, alors que les tests anaérobies ont été faits dans du LB-TMAO, sans agitation sous une hotte anaérobie. Les différents antibiotiques étaient testés à partir de 200 µg/ml jusqu'à trouver la CMI. Après l'incubation, la densité optique (DO_{600nm}) fût mesurée dans un lecteur de plaque ID3 pour déterminer la concentration inhibitrice. Les tests étaient effectués sur A1552 et A1552R et les résultats des mesures sont présentés dans le tableau 5.

Tableau 5

Concentration inhibitrice médiane et concentration minimale inhibitrice de *V. cholerae* A1552 et A1552R en aérobiose et en anaérobiose.

Antibiotiques (µg/ml)	Aérobie		Anaérobiose	
	CI ₅₀	CMI	CI ₅₀	CMI
Polymyxine B	50,00	200,00	150,00	200,00
Streptomycine	12,50	25,00	25,00	50,00
Kanamycine	12,50	25,00	25,00	50,00
Chloramphénicol	0,40	0,80	0,40	0,80
Carbénicilline	1,50	3,00	1,50	3,00
Azithromycine	0,20	0,40	0,20	0,40
Érythromycine	1,50	3,00	1,50	3,00
Tétracycline	0,20	0,40	0,20	0,40
Doxycycline	0,10	0,20	0,10	0,20
Ciprofloxacine	0,00	0,01	0,00	0,01

Légende : CI₅₀, concentration inhibitrice médiane; CMI, concentration minimale inhibitrice. Étant donné que les résultats des deux souches étaient parfaitement identiques, une seule valeur est présentée.

Les résultats montrent qu'il n'y a aucune différence entre la souche A1552 et le variant A1552R. Les bactéries montrent seulement une résistance accrue aux antibiotiques de la famille des aminoglycosides (Strep et Kan) en anaérobiose, avec des CMI et des CI_{50} 2 fois supérieures en anaérobiose (Tableau 5). Aucune différence n'est observée pour Cm, Carb, Azi, Éry, Tétra Doxy et Cipro, aussi bien pour la CMI que pour le CI_{50} . Concernant la PmB, la CMI reste la même, mais on note une grande augmentation de la concentration nécessaire pour réduire la croissance de 50 %, qui est trois fois plus élevées en anaérobiose (Tableau 5), indiquant une résistance accrue en anaérobiose. Ces résultats démontrent que la croissance en anaérobiose n'affecte pas beaucoup la résistance aux antibiotiques lorsque le métabolisme utilise la respiration anaérobie à l'exception des aminoglycosides et de la PmB.

Afin de mieux décrire les différences observées pour la PmB, il a fallu tester une plus grande gamme de concentrations avec un intervalle plus strict, soit des différences de 25 $\mu\text{g/ml}$. Les tests en aérobiose étaient effectués dans du LB sous agitation durant 18 h, alors que les tests anaérobies étaient faits dans du LB-TMAO sans agitation sous une hotte anaérobie. Les résultats des moyennes sont présentés dans la figure 17.

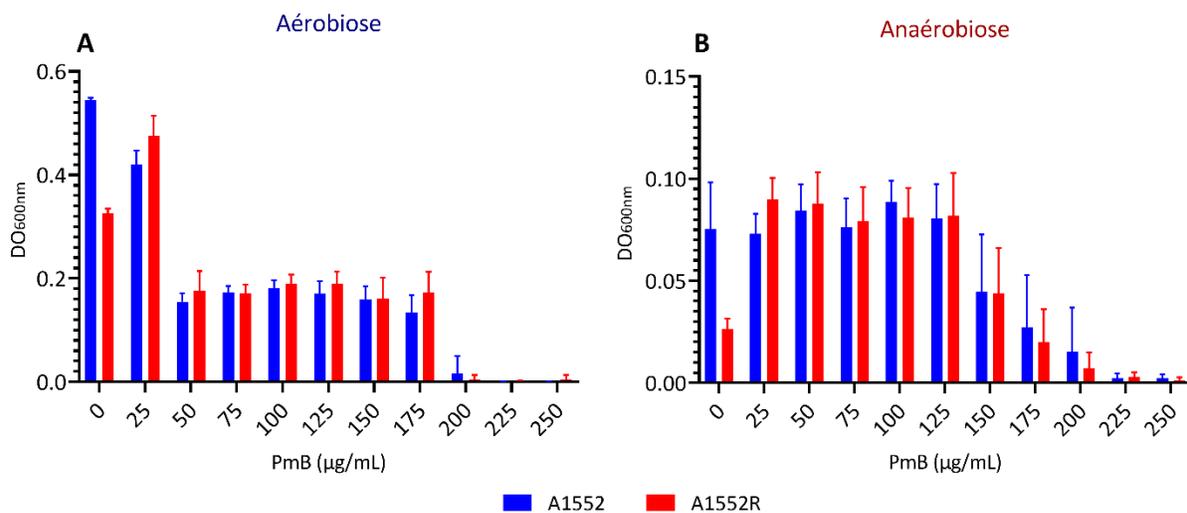


Figure 17

Croissance de V. cholerae A1552 et A1552R selon différentes concentrations de PmB en conditions (A) aérobie et (B) anaérobie.

Les bactéries ont été cultivées en présence ou absence de PmB dans un milieu LB en aérobiose et LB-TMAO en anaérobiose dans des plaques 96 puits pendant 18 heures à 37°C. Les données finales mesurées en DO_{600nm} de triplicata techniques et biologiques, sont représentées par la moyenne ± la déviation standard.

Comme précédemment, la disponibilité de l'oxygène dans le milieu n'affecte pas la CMI pour la PmB, mais la CI₅₀ augmente de 50 à 150 µg/ml (Fig. 17 A). La croissance en anaérobiose est nettement plus faible que la croissance en aérobiose, malgré la présence d'un accepteur d'électron alternatif. On peut aussi noter que la croissance du variant A1552R semble stimulé par les faibles concentrations de PmB comparativement au contrôle sans PmB (Fig. 17 B).

9.3 — Production de biofilm chez *V. cholerae* selon la disponibilité en oxygène

Les investigations sur l'impact de l'environnement anaérobie furent continuées en étudiant la production de biofilm. Pour évaluer la production de biofilm, les souches de A1552R et A1552, ainsi que les mutants dans A1552R des protéines connues pour leur rôle dans la formation de la matrice du biofilm chez *V. cholerae* ont été utilisés. La croissance des biofilms était réalisée dans un environnement avec ou sans oxygène durant 24 heures. Les biofilms ont été ensuite lavés et colorés au cristal violet avant d'être dissous dans l'acide acétique. Les résultats des lectures à DO_{595nm} sont présentés à figure 18.

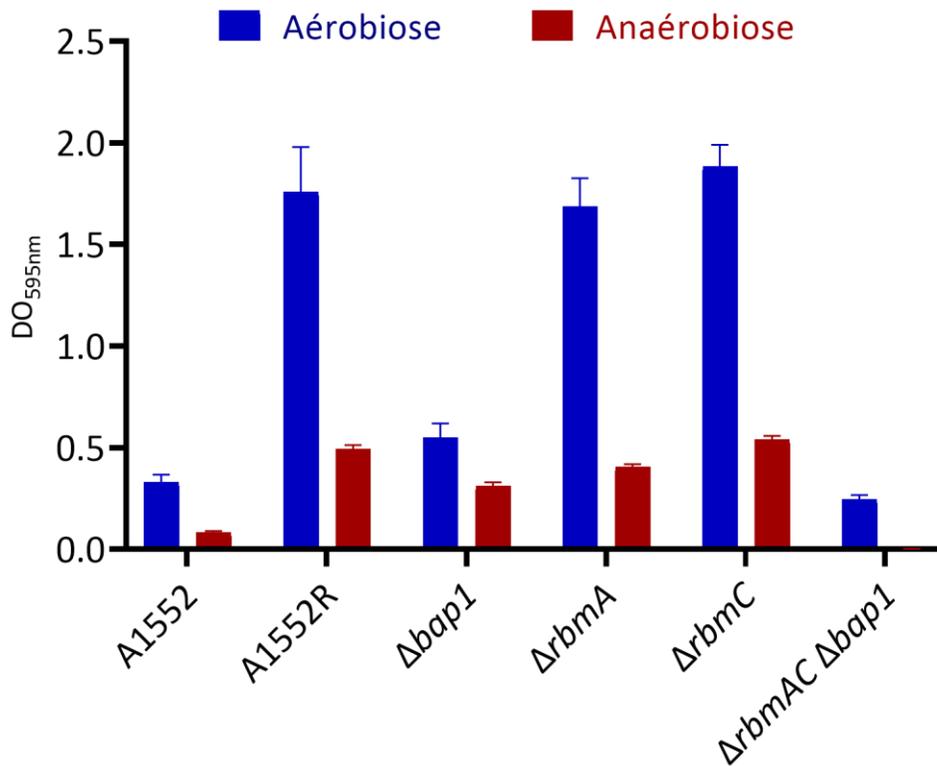


Figure 18

Production de biofilm chez V. cholerae A1552 et des mutants de A1552R selon la disponibilité en oxygène dans le milieu de croissance.

Les biofilms sont cultivés dans des plaques 96 puits à 37°C pendant 24 h dans un milieu LB en aérobiose et LB-TMAO en anaérobiose. Les données finales en DO_{595nm} de triplicata techniques et biologiques sont mesurées à la suite d'une coloration au cristal violet et sont représentées par la moyenne ± un intervalle de confiance à 95%.

Les résultats mettent en valeur la diminution de la production de biofilm lors de la croissance anaérobiose chez toutes les souches. Le mutant du gène *bap1* semble très peu capable de développer un biofilm dans l'environnement aérobie comparativement au variant A1552R et aux autres mutants simples. Cependant, en anaérobiose, la différence de production de biofilm du mutant *bap1* n'est pas aussi marquée par rapport aux autres mutants simples et la souche sauvage (Fig. 18). Ce qui suggère un rôle important du produit du gène *bap1* pour la production de biofilm en environnement aérobie. On note aussi la très faible production de biofilm du triple mutant de

la souche rugueuse qui produit moins de biofilms que la souche lisse et aucun biofilm en anaérobiose (Fig. 18).

Afin de continuer davantage la caractérisation, le milieu des biofilms fût changé après 24 h pour ajouter un nouveau milieu frais de LB ou LB-TMAO selon la disponibilité en oxygène. Les mesures ont été réalisées 24 h plus tard, donc sur des biofilms de 48 h. Les résultats des moyennes sont présentés dans la figure 19.

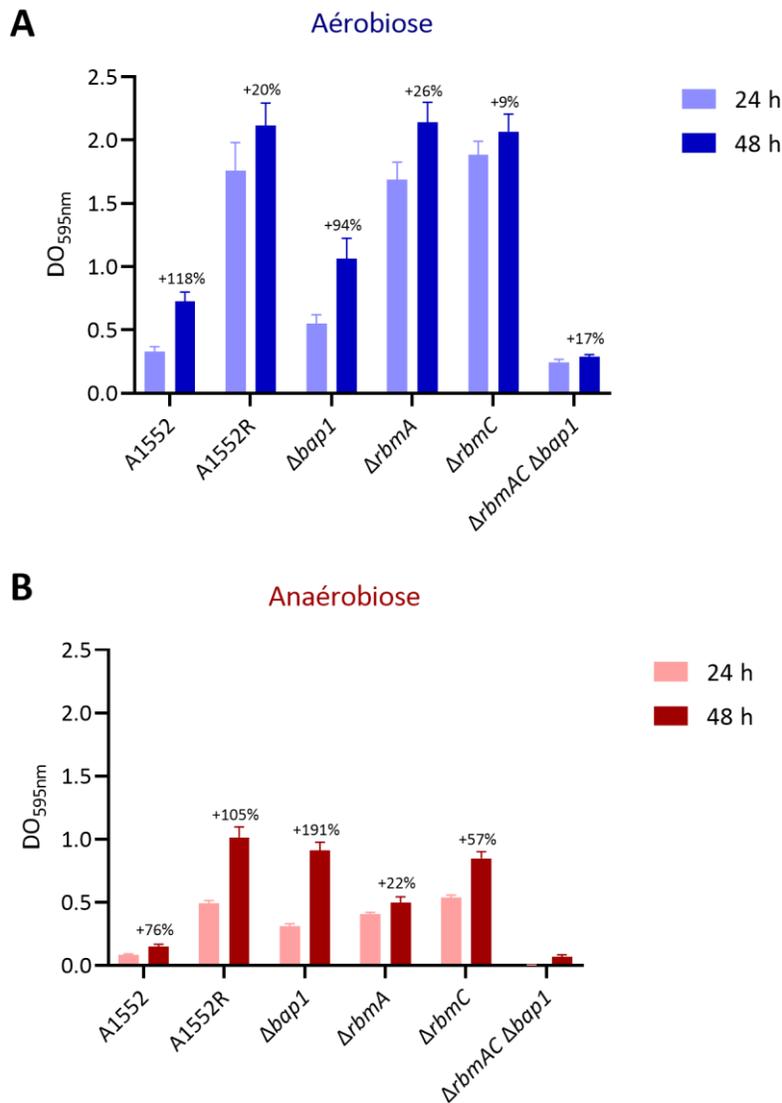


Figure 19

Production de biofilm chez V. cholerae A1552 et des mutants de A1552R selon la disponibilité en oxygène, après un changement de milieu.

Les biofilms sont d'abord cultivés dans des plaques 96 puits à 37°C pendant 24 h dans un milieu LB en aérobiose et LB-TMAO en anaérobiose, puis le milieu est remplacé et l'incubation est poursuivie pour 24 h supplémentaire. Les données finales en DO_{595nm} de triplicata techniques et biologiques sont mesurées à la suite d'une coloration au cristal violet et sont représentées par la moyenne \pm un intervalle de confiance à 95%.

On peut observer que la biomasse des biofilms a augmenté pour toutes les souches par rapport à l'incubation précédente, mais pas tous à la même ampleur. En aérobiose, la biomasse de la souche sauvage A1552 et du mutant A1552R $\Delta bap1$ ont pratiquement doublé, comparativement aux autres qui ont augmenté d'environ 20 % de leur masse initiale (Fig. 19 A). En anaérobiose, les résultats sont plus variables entre les différentes souches. Les souches sauvages ont une augmentation assez forte, soit 76 % pour la souche lisse et 105 % pour la rugueuse. Le mutant *bap1* démontre la plus forte croissance en anaérobiose, soit 191 %, alors que le mutant *rbmA* démontre la plus faible à 22 % (Fig. 19 B). Le triple mutant des gènes de structure du biofilm a produit une très faible quantité de biofilms après 48 h en anaérobiose. Ces résultats mettent en valeur l'impact des différentes mutations des gènes du biofilm sur le développement d'un biofilm préexistant lors de l'abondance de nutriments dans le milieu.

9.4 — Production de biofilms en présence de PmB

Étant donné l'importance des biofilms dans la résistance aux agents antimicrobiens, des investigations sur la production de biofilm en présence de PmB furent réalisées. Les tests de production de biofilm étaient réalisés dans du LB, ou LB-TMAO en anaérobiose, à 37°C sans agitation pendant 18 h dans des plaques de 96 puits en présence ou en absence de PmB. Des contrôles de PmB seule colorée au cristal violet ont été réalisés afin de retirer le bruit de fond dû à la coloration de la PmB adhérente aux puits. Les résultats sont présentés dans la figure 20.

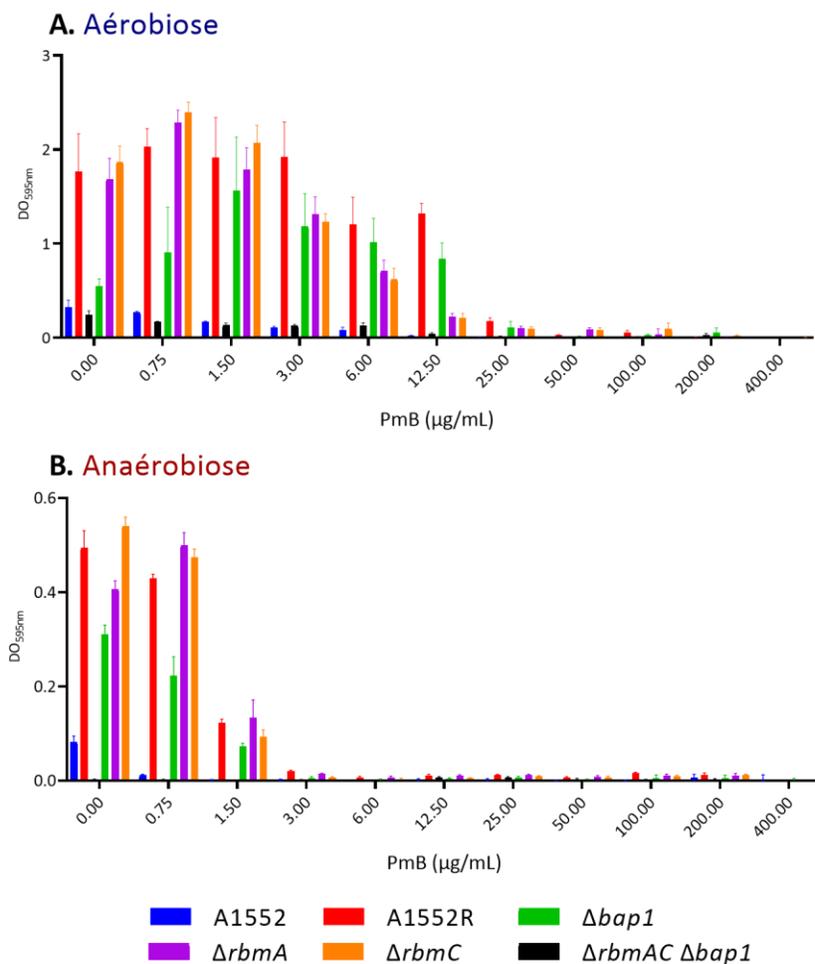


Figure 20

Production de biofilm chez V. cholerae A1552 et des mutants de A1552R selon différentes concentrations de PmB.

Les biofilms sont cultivés avec et sans PmB dans des plaques 96 puits à 37°C pendant 18 h dans un milieu (A) LB en aérobiose et (B) LB-TMAO en anaérobiose. Les données finales en DO_{595nm} de triplicata techniques et biologiques sont mesurées à la suite d'une coloration au cristal violet et sont représentées par la moyenne \pm un intervalle de confiance à 95%.

En aérobiose, on peut remarquer que la production de biofilm est stimulée par les faibles concentrations de PmB chez les mutants de la souche rugueuse, en particulier le mutant $\Delta bab1$ (Fig. 20 A). La production de biofilm en présence d'oxygène est sévèrement réduite chez la majorité des souches à partir de 12,5 $\mu\text{g/ml}$ de PmB (Fig. 20 A). La dose de 25 $\mu\text{g/ml}$ peut être considérée comme la concentration minimale inhibitrice de la production de biofilm chez l'ensemble de nos souches en aérobiose. En absence d'oxygène, la production de biofilm est sévèrement réduite à partir de 1,6 $\mu\text{g/ml}$ de PmB chez la majorité des souches rugueuses, alors que la production de biofilm est nulle à partir de 3 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 20 B). La souche lisse A1552 ne produit plus de biofilm en anaérobiose à partir de 0,8 $\mu\text{g/ml}$, alors que le triple mutant de A1552R n'en produit simplement pas. Ces résultats démontrent que la formation de biofilm est inhibée bien avant d'atteindre la CMI et que de faibles quantités de PmB peuvent stimuler la production de biofilm chez la souche rugueuse.

9.5 — Résistance des biofilms en présence de PmB

La résistance de biofilms matures à la PmB fût ensuite caractérisée. Les biofilms étaient produits comme décrits précédemment (section 9.4) dans des plaques de 96 puits. Après 18 h de croissance, le milieu est changé par du LB ou LB-TMAO frais avec la PmB. Après une incubation de 24 h, les biofilms ont été lavés et la biomasse a été quantifiée par coloration au cristal violet. Étant donné la nature très tolérante des biofilms, les quantités de PmB ont été augmentées significativement, jusqu'à 1600 $\mu\text{g/ml}$. Les résultats des lectures à DO_{595} sont présentés à figure 21.

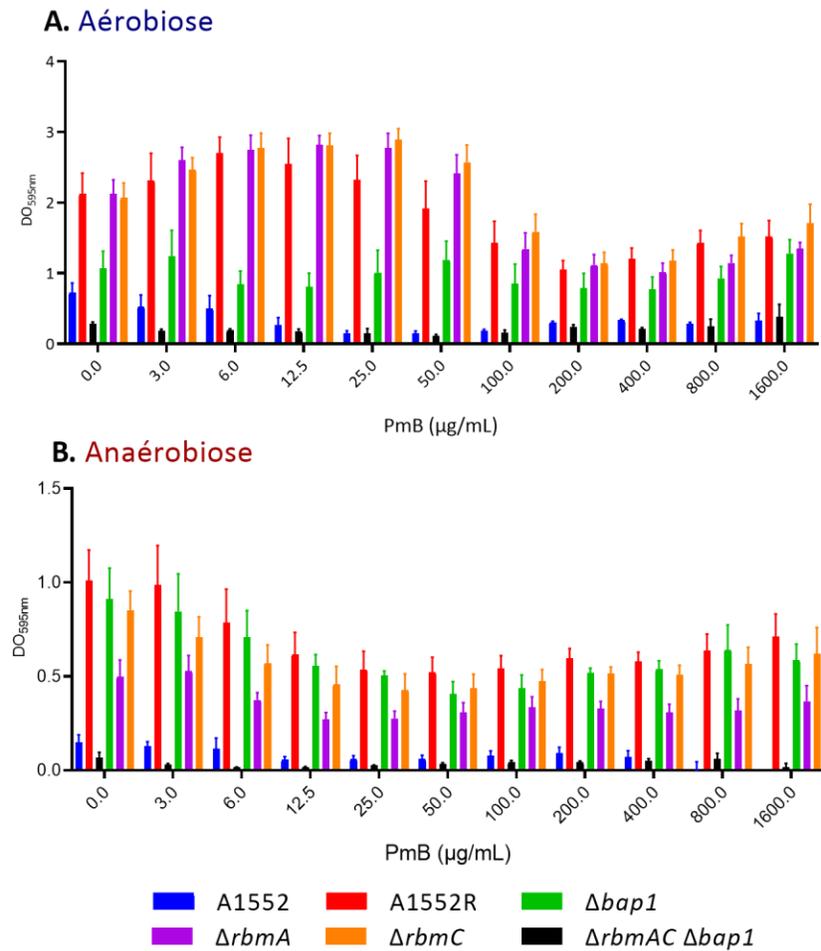


Figure 21

Biomasse de biofilm mature chez V. cholerae A1552 et des mutants de A1552R après 24 h de traitement avec différentes concentrations de PmB selon la disponibilité en oxygène.

Les biofilms sont cultivés sans PmB dans des plaques 96 puits à 37°C pendant 18 h dans un milieu (A) LB en aérobiose et (B) LB-TMAO en anaérobiose. Les milieux sont ensuite remplacés par des milieux additionnés de PmB pour 24 h d'incubation supplémentaire. Les données finales en DO_{595nm} de triplicata techniques et biologiques sont mesurées à la suite d'une coloration au cristal violet et sont représentées par la moyenne \pm un intervalle de confiance à 95%.

Les résultats en aérobiose montrent une augmentation de la biomasse des biofilms par rapport au contrôle sans PmB chez le variant A1552R et ses mutants des gènes *rbm*, dans les concentrations inférieures à 50 $\mu\text{g/ml}$. La biomasse des biofilms diminuée par rapport au contrôle

jusqu'à 200 µg/ml chez ces mêmes souches (Fig. 21 A). Les résultats du mutant *bap1* sont variables d'une concentration à l'autre, mais il ne présente jamais une très forte augmentation ou diminution de biomasse (Fig. 21 A). La souche sauvage et le triple mutant démontrent une réduction de biomasse jusqu'à une concentration de 100 µg/ml de PmB. La biomasse de biofilm de toutes les souches est en augmentation dans les concentrations supérieures à 400 µg/ml comparativement aux concentrations de 100-200 µg/ml (Fig. 21 A, B).

En anaérobiose, les résultats sont plus uniformes, la biomasse des biofilms est en diminution chez toutes les souches jusqu'à un creux entre 25 et 100 µg/ml dépendamment des souches (Fig. 21 B). Encore une fois, on note une biomasse plus importante dans les hautes concentrations de PmB, par rapport aux concentrations intermédiaires, excepté pour la souche sauvage A1552 et le triple mutant de la souche rugueuse (Fig. 21 B). Ces résultats mettent encore une fois en valeur l'augmentation de production de biofilm chez la souche A1552R dans les concentrations sous-inhibitrices de PmB. Les résultats suggèrent que les biofilms de *V. cholerae* sont plus résistants aux concentrations très élevées de PmB comparativement à la CMI.

9.6 — Tests de résistance des bactéries isolées des biofilms traités avec 1600 µg/ml de PmB

Afin de déterminer si les bactéries présentes au sein des biofilms traités aux fortes concentrations de PmB étaient plus résistantes à celle-ci. Les bactéries des biofilms traités à 1600 µg/ml de PmB (PmB1600) ont été isolées et leurs phénotypes de résistance furent évalués. Les tests effectués sont les mêmes que dans les figures 17, 20 et 21, c'est-à-dire un test de CMI, un test de formation des biofilms et un test de résistance des biofilms préformés à la PmB. Les tests ont été réalisés en anaérobiose et les résultats compilés sont présentés dans la figure 22.

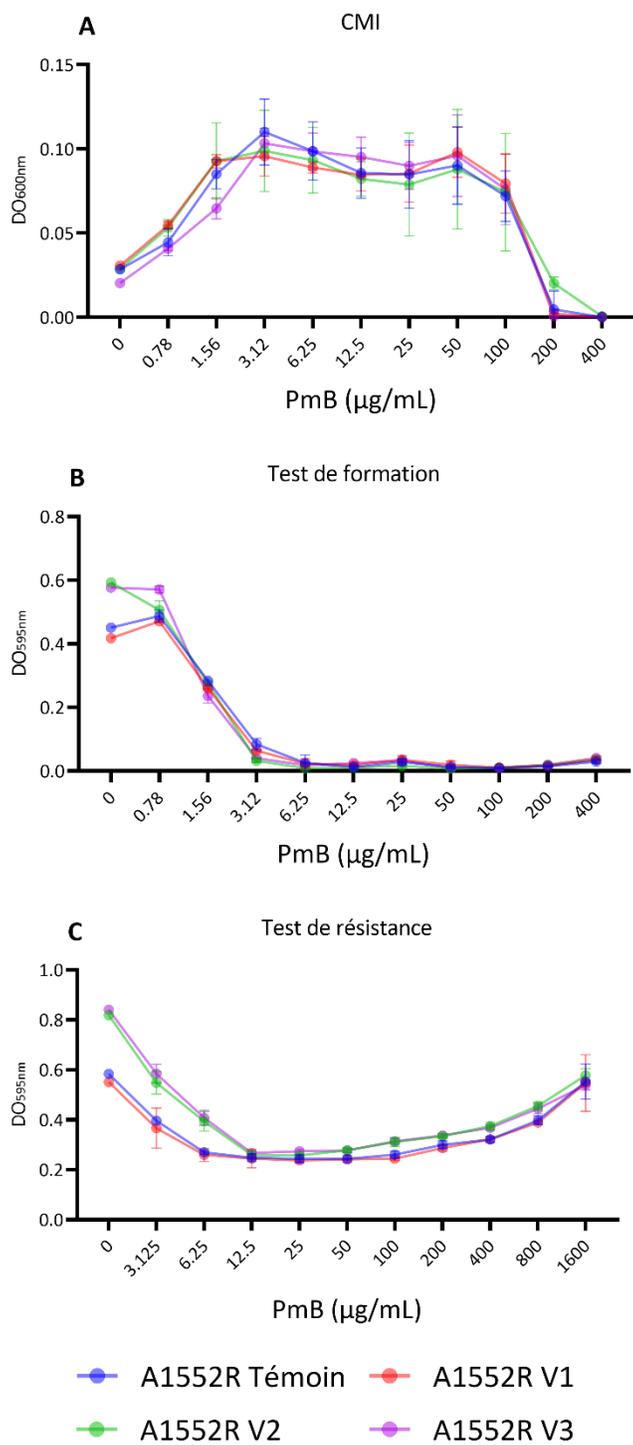


Figure 22

Tests de concentration minimale inhibitrice, de formation et de résistance des biofilms sur les bactéries isolés des biofilms traités à 1600 µg/ml de PmB.

(A) Les bactéries ont été cultivées en anaérobiose dans un milieu LB-TMAO, avec ou sans PmB, dans des plaques 96 puits pendant 18 heures à 37°C. (A) Les données finales mesurées en DO_{600nm} de triplicata technique sont représentées par la moyenne \pm la déviation standard. (B, C) Les biofilms sont cultivés en anaérobiose dans un milieu LB-TMAO, dans des plaques 96 puits à 37°C. (B) Pour les tests de formation, la PmB est ajouté au début d'une incubation de 18 h. (C) Pour les tests de résistance, les milieux avec PmB sont ajoutés à la suite de 18 h d'incubation dans des milieux sans agents antimicrobiens, puis incubé pour 24 heures supplémentaires. (B, C) Les données finales en DO_{595nm} en tripliqua techniques sont mesurées à la suite d'une coloration au cristal violet et sont représentées par la moyenne \pm la déviation standard.

Les résultats démontrent qu'il n'y a pas vraiment de différences importantes qui pourrait expliquer la forte tolérance des biofilms aux quantités importantes de PmB, entre les résultats des bactéries isolés et les bactéries témoins de A1552R, pour aucun des 3 tests effectués. La seule différence qu'on peut noter, concerne les biofilms des souches témoins et V1 qui se sont moins développés, par opposition aux souches V2 et V3, dans les faibles quantités de PmB (Fig. 22 C). Ces essais ont été rapidement interrompus, étant donné qu'ils étaient peu prometteurs et les autres « variants » isolés n'ont pas été évalués. Les résultats des CMI remettent en valeurs que la croissance du variant rugueux est stimulée par la présence de faibles concentrations de PmB (Fig. 22 A).

9.7 — Production de biofilms en présence de PmB : plaque de 24 puits

Afin de caractériser la production et la résistance des biofilms à de fortes concentrations de PmB, il fallait vérifier si les phénotypes des plaques de 96 puits pouvaient se répliquer dans un plus gros volume, afin d'éventuellement passer en microcopie et de faire du qPCR. Le protocole fut adapté à des plaques de 24 puits et les résultats des tests de production sont présentés à la figure 23. L'augmentation de la surface disponible pour le développement du biofilm avait permis de procéder aux étapes de lavages et coloration en risquant au minimum le détachement des biofilms au fond des puits et de retirer le biofilm de surface plus facilement. L'anaérobiose fût mise de côté à partir de ce point, car les phénotypes sont beaucoup plus faciles à observer avec la culture aérobie dans le LB.

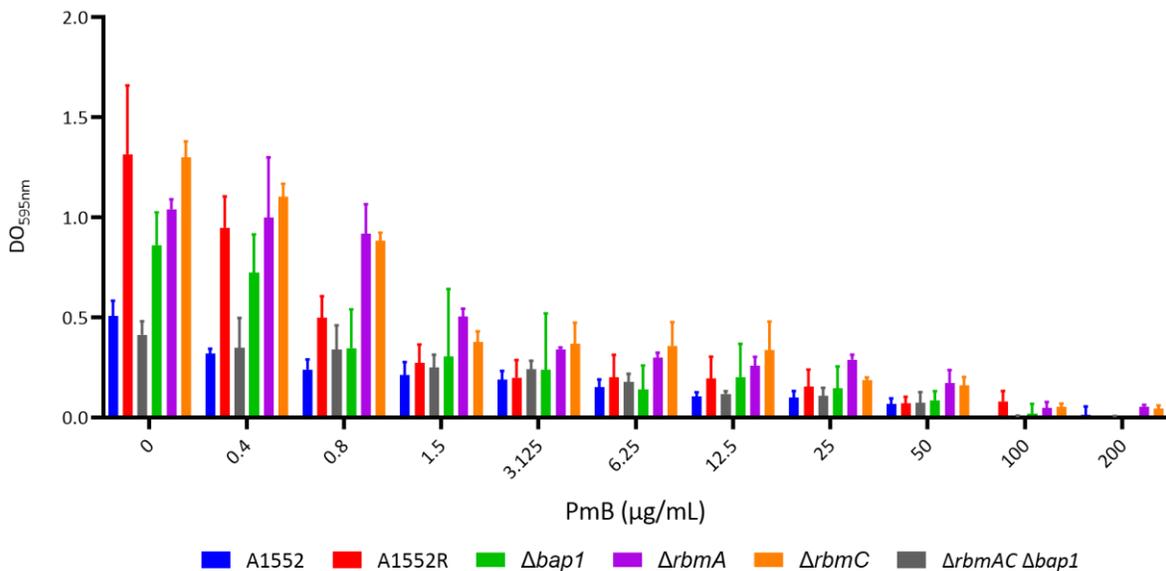


Figure 23

Production de biofilm chez V. cholerae A1552 et des mutants de A1552R selon différentes concentrations de PmB.

Les biofilms sont cultivés avec et sans PmB, dans des plaques 24 puits à 37°C, pendant 18 h dans un milieu LB. Les données finales en DO_{595nm} de triplicata techniques et biologiques sont mesurées à la suite d'une coloration au cristal violet et sont représentées par la moyenne \pm la déviation standard.

Les résultats obtenus montrent que, comme attendu, en absence de PmB, la souche A1552R produit une biomasse de biofilm significativement plus importante que la souche A1552 et le triple mutant *rbmA-rbmC-bap1* est fortement altéré dans sa capacité à former un biofilm avec une production comparable à A1552 (Fig. 23). D'autre part, on peut observer que les mutants *bap1* et *rbmA* montrent aussi une réduction de la formation de biofilm alors que le mutant *rbmC* ne présente pas de différence par rapport à la souche A1552R sauvage (Fig. 23). La production de biofilm est sévèrement réduite à partir d'une concentration de 0,8 µg/ml de PmB chez la plupart des souches. Cependant, les mutants des gènes *rbmA* et *rbmC* vont nécessiter 1,5 µg/ml de PmB pour montrer une inhibition comparable de la production de biofilm. Il n'y a pratiquement plus aucune production de biofilm après une concentration de 50 µg/ml de PmB (Fig. 23). La stimulation de la production biofilm chez les mutants des gènes *rbm* à faible concentration de PmB semble avoir disparu dans ces conditions. L'ensemble de ces résultats indiquent que la présence de PmB dans le milieu altère la formation de biofilm à des concentrations bien inférieures à la CMI.

9.8 — Résistance des biofilms à la PmB : plaque de 24 puits

Comme pour les tests de formation de biofilm, les manipulations avec le protocole optimisé en plaque de 24 puits ont été répétées pour les tests de résistance aux antimicrobiens. Les tests de résistance des biofilms furent réalisés comme précédemment (fig. 23). Les résultats des tests de résistance en plaque 24 puits sont présentés à la figure 24.

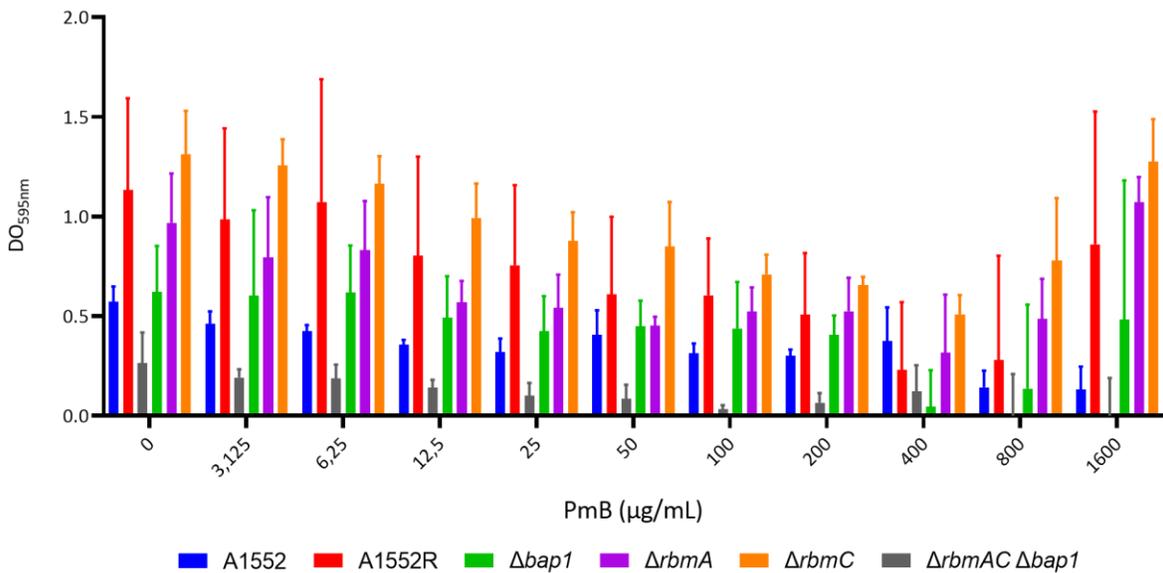


Figure 24

Biomasse de biofilm mature chez des mutants de V. cholerae A1552R après 24 h de traitement avec différentes concentrations de PmB.

Les biofilms sont cultivés sans PmB, dans des plaques 24 puits à 37°C, pendant 18 h dans un milieu LB. Le milieu est ensuite remplacé par un milieu additionné de PmB pour 24 h d'incubation supplémentaire. Les données finales en DO_{595nm} de triplicata techniques et biologiques sont mesurées à la suite d'une coloration au cristal violet et sont représentées par la moyenne ± la déviation standard.

La majorité des souches se comportent d'une manière similaire avec une diminution progressive de la quantité de biofilms jusqu'à toucher une valeur minimum entre 200 et 400 µg/ml (Fig. 24). Chez A1552R et les mutants simples, on note une augmentation significative de la biomasse à partir de 800 µg/ml de PmB et revenant à des niveaux proches du contrôle, indiquant une forte

résistance du biofilm à des concentrations très élevées de PmB. Alors que la souche sauvage et le triple mutant montrent une biomasse relativement stable dans les concentrations supérieures à 200 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 24). Ces résultats sont beaucoup moins puissants que ceux en plaque 96 puits, comme le démontre les barres d'erreurs importantes. Cependant, il est possible d'observer la même tendance dans les fortes concentrations de PmB, c'est-à-dire l'augmentation de la biomasse, ce qui confirme qu'il est possible d'utiliser de plus gros volumes pour faire nos observations caractéristiques sur les biofilms traités à 1600 $\mu\text{g/ml}$.

9.9 — Microscopie sur les biofilms statiques

Afin d'aller chercher des données qualitatives sur les biofilms traités à la PmB, des observations microscopiques des biofilms ont été réalisées avec la souche A1552R en champ clair avec et sans coloration au cristal violet et en fluorescence après coloration de l'ADN au Hoechst 33342. Les concentrations de PmB qui semblaient les plus intéressantes, soit 6 $\mu\text{g/ml}$ (PmB6), 200 $\mu\text{g/ml}$ (PmB200) et 1600 $\mu\text{g/ml}$ (PmB1600), ainsi que le contrôle sans PmB, ont été testées. Les photos de microscopies sont présentées à la figure 25.

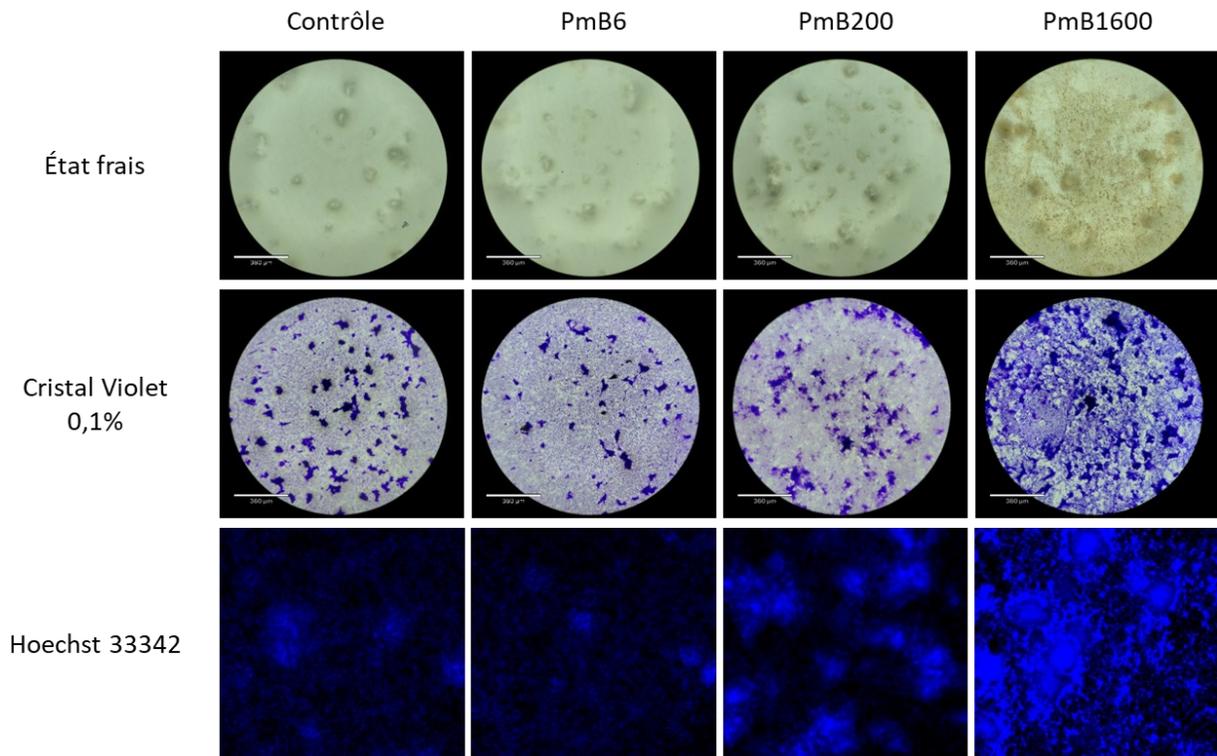


Figure 25

Microscopie sur des biofilms préformé de A1552R traités à la PmB selon une coloration au cristal violet et au Hoechst 33342.

Les biofilms sont cultivés sans PmB, dans des plaques 24 puits à 37°C, pendant 18 h dans un milieu LB en aérobie. Le milieu est ensuite remplacé par un milieu additionné de PmB pour 24 h d'incubation supplémentaire. Les observations sont effectuées sur (panneau du haut) des bactéries non colorées, (panneau du centre) à la suite d'une coloration au cristal violet ou (panneau du bas) au Hoechst 33342 sur un microscope à fluorescence avec un grossissement 100x. Les photos proviennent d'un même répliquat, mais sont représentatives de triplicata.

On peut observer des structures de biofilms dans toutes les concentrations, ce qui confirme que même à haute concentration la PmB n'est pas capable de détruire le biofilm (Fig. 25). Dans le biofilm traité avec PmB1600, on peut voir plusieurs particules de biomasse entre les amas de biofilms. On peut observer une augmentation de cristal violet proportionnelle à l'augmentation de PmB sur les biofilms. Particulièrement à PmB1600 où énormément de colorant est retenu. La coloration Hoechst 33342 émane de la fluorescence lorsqu'elle se lie à l'ADN. On note peu de différence entre le contrôle et PmB6. On détecte plus d'ADN à partir de PmB200, mais beaucoup plus à PmB1600 (Fig. 25). Ces résultats suggèrent que la quantité d'ADN augmente avec le traitement à la PmB.

9.10 — Formation du biofilm en microflux

Dans l'objectif de caractériser les biofilms de *V. cholerae* en présence de PmB, un système de microflux pour observer le développement du biofilm fût utilisé. Le système permet de visualiser le développement du biofilm dans un capillaire avec un flux constant de milieu. La souche A1552 portant le plasmide pKen2 a été utilisé pour ces observations, car elle produit la protéine GFP, ce qui permettait de mieux visualiser les bactéries. Après une adhésion initiale de 30 minutes des bactéries, le biofilm se forme dans le capillaire sous flux de LB contenant ou non de la PmB à 6 µg/ml et permettant un apport continu de nutriments à 37°C. Les images présentées à la figure 26 ont été prises à des intervalles réguliers afin de caractériser le développement du biofilm.

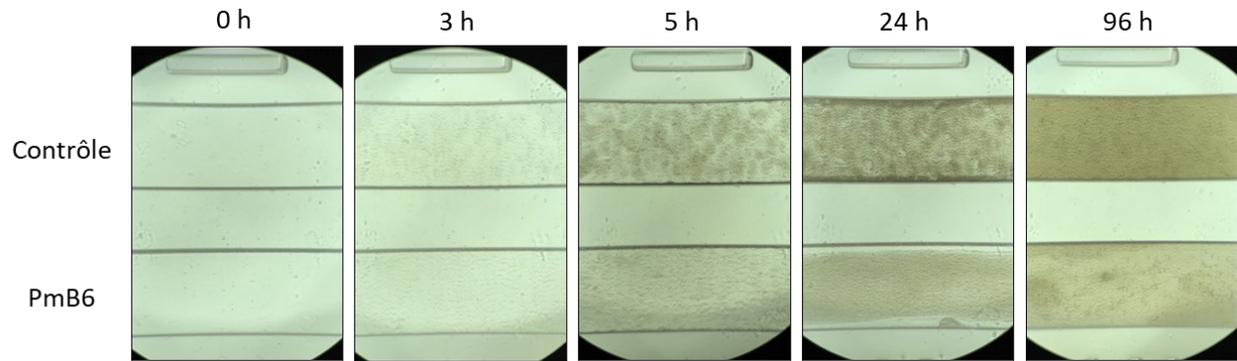


Figure 26

*Formation de biofilms de *V. cholerae* A1552 pKEN2 dans un système de microflux avec et sans 6 $\mu\text{g/ml}$ de PmB.*

Pour observer l'impact de la PmB sur le développement des biofilms en flux, la PmB est ajoutée dans le milieu LB à la suite de l'adhésion initiales des bactéries, dans le système qui est maintenu à 37°C avec un flux de 0,20 dynes. Les photos sont prises à grossissement 40x, une fois par heure pour les 6 premières heures, suivi d'un point à 24 heures et d'un dernier à 96 heures. Les photos proviennent d'un même réplicat, mais sont représentatives de triplicata.

Dans la condition de contrôle sans PmB, on observe la formation d'un biofilm dès 3 h post-adhésion et qui va se développer pour former des structures denses après 5 h. Au bout de 4 jours, plus aucun flux n'était visible, signe que le capillaire était bouché par le biofilm (Fig. 26). En présence de faibles concentrations en PmB (PmB6), on note un développement significativement ralenti du biofilm. En plus de produire moins de biofilms, celui-ci apparaît moins solidement adhérent à la paroi du capillaire, comme on peut voir au point 24 h et moins structuré avec l'absence de structures denses (Fig. 26). Au bout de 4 jours de flux, le capillaire contenant la PmB présentait toujours le mouvement du milieu qui s'écoulait. Ces résultats suggèrent que la PmB à faible concentration dans un système dynamique sous flux de milieu induit une diminution de l'adhésion du biofilm à son support et une perte de la structuration de celui-ci.

9.11 — Résistance du biofilm en microflux

L'impact de la PmB sur des biofilms déjà formés dans le système de microfluidique a été évalué. Le système de flux a été lancé comme décrit précédemment, mais sans PmB, jusqu'à obtenir un biofilm bien formé, mais qui permet toujours la circulation du flux. Au bout de 12 h, le milieu fût

changé pour y ajouter différentes concentrations de PmB (6, 200 et 1600 $\mu\text{g/ml}$). Le milieu avec PmB a été laissé en flux à 37°C pendant 24 heures avec des photos à intervalles réguliers. Les photos qui ont été prises dans le système de microflux sont présentés à la figure 27.

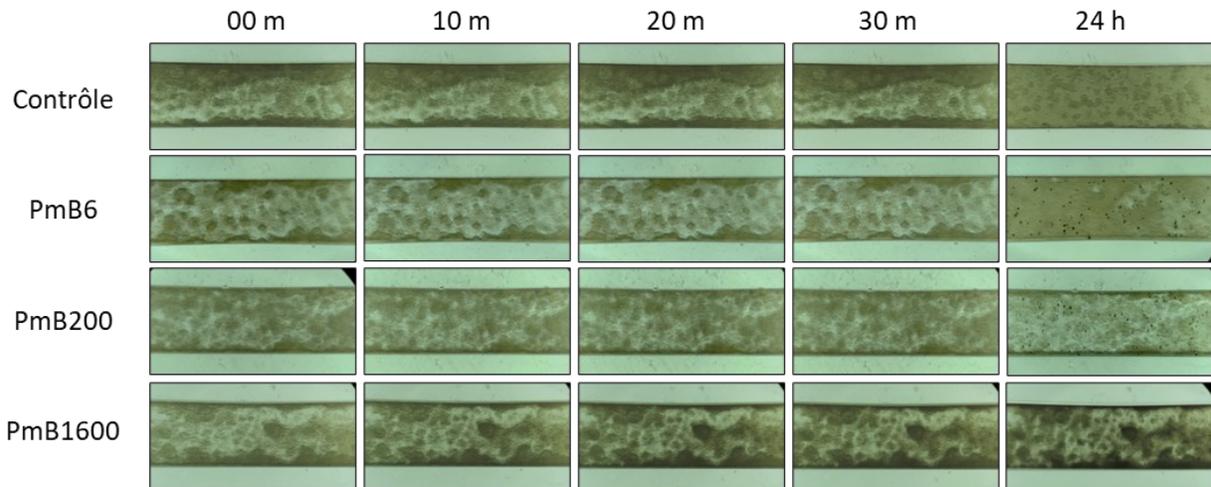


Figure 27

Impact de la PmB sur des biofilms matures dans un système de microflux.

Pour observer la dégradation des biofilms en flux, la PmB est ajoutée sur des biofilms matures de 12 heures, dans le système qui est maintenu à 37°C avec un flux de 0,20 dynes. Les photos sont prises à grossissement 40x, aux 10 minutes pour les 30 premières minutes, suivi d'un point à 24 heures. Les photos proviennent d'un même réplicat, mais sont représentatives de triplicata.

On note très peu de différence dans les 30 premières minutes pour le contrôle et les concentrations PmB6 et 200. Cependant, PmB1600 montre une différence notable dès les 10 premières minutes de contact avec le milieu additionné de PmB (Fig. 27). À 30 minutes, le biofilm est significativement plus dense et contracté qu'avant le traitement. Au bout de 24 heures, PmB1600 est très dense, mais pas beaucoup plus que le 20 ou 30 minutes, ce qui porte à croire que le changement a lieu très rapidement, soit majoritairement dans les 20 premières minutes de traitement. Également à PmB1600, le biofilm ne se développe pas sur les régions qui n'était pas initialement recouvertes de biofilm dans le capillaire, puisqu'aucune nouvelle structure n'y est observée, le changement étant restreint aux structures déjà formées qui se densifient (Fig. 27). Le contrôle finit par recouvrir tout le capillaire en 24 h, alors que PmB6, bien que plus développé qu'initialement, n'a pas recouvert l'ensemble du capillaire. Le biofilm traité à

la PmB200 est le seul qui présente moins de biomasse après 24 heures d'exposition à la PmB, il semblerait qu'une partie du biofilm a été désagrégé par la PmB. Ainsi, les résultats suggèrent qu'un traitement à la PmB sur un biofilm déjà formé à des effets contradictoires en fonction de la concentration. À PmB200, une concentration inhibitrice pour la forme planctonique, le biofilm est réduit alors qu'à des concentrations plus élevées (PmB1600), le biofilm semble plus dense selon un phénomène qui a lieu dès les 20 premières minutes de traitement et qui se maintient dans le temps.

9.12 — Analyse d'expression des gènes du biofilm par PCR quantitatif (RT-qPCR)

Une analyse d'expression par qPCR fût réalisée dans le but d'examiner les différents phénotypes observés en microscopie et par essais au cristal violet, afin de déterminer si les phénotypes étaient des conséquences d'une différence d'expression des gènes codant pour les composants du biofilm chez *V. cholerae*. Les biofilms de A1552R ont été préparés en plaques de 24 puits. Après une nuit d'incubation, le milieu a été retiré et remplacé par du LB frais avec différentes concentrations de PmB, soit 6, 200 et 1600 µg/ml. Les biofilms ont été remis à incuber pour 15 min, 1 h ou 6 h. Les ARNs ont été extraits et l'expression des gènes déterminée par qPCR. Les résultats d'analyse sont compilés dans les figures 28, 29 et 30 suivantes. Le gène *vpsU* est utilisé comme marqueur du locus I des gènes *vps*, alors que *vpsL* indique le locus II.

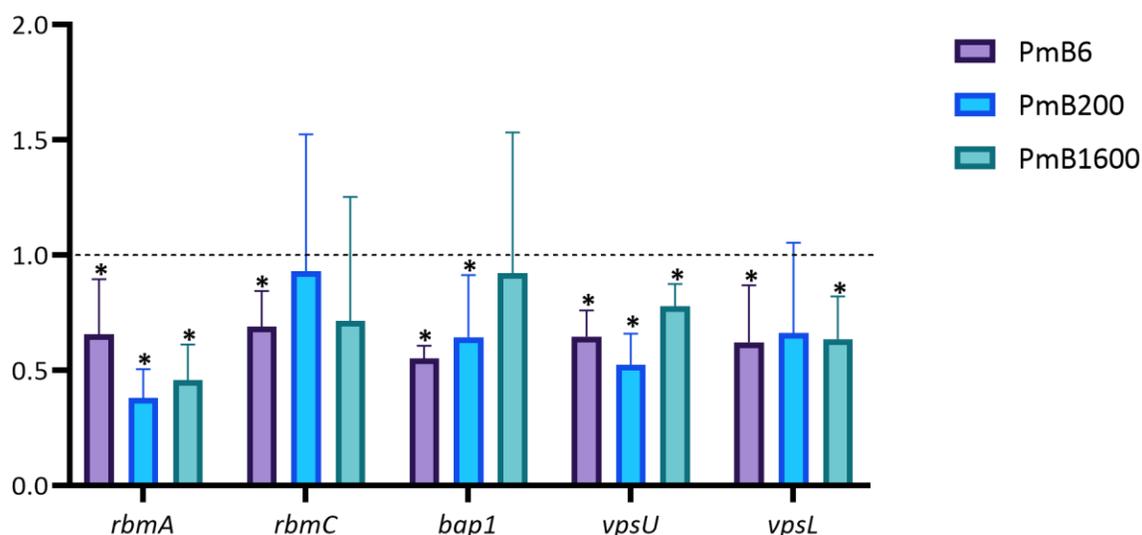


Figure 28

Expression des gènes de structures du biofilm après 1 h d'exposition à la PmB.

Les biofilms sont cultivés sans PmB, dans des plaques 24 puits à 37°C, pendant 18 h dans un milieu LB en aérobie. Le milieu est ensuite remplacé par un milieu additionné de PmB pour 1 h d'incubation supplémentaire. L'ARN est ensuite extraite et rétrotranscrit. L'expression des gènes *rbmA*, *rbmC*, *bap1*, *vpsU* et *vpsL* est mesurée par qPCR pour les biofilms traités à la PmB, en comparaison à des biofilms non-traités, normalisé sur le gène de ménage *recA*, où 1.0 représente l'expression du contrôle. Les données finales proviennent de quatre réplicats techniques conduits sur 3 réplicats biologiques et sont représentées par la moyenne \pm la déviation standard. Légende : * = $P < 0,05$.

Après 1 h d'exposition à la PmB, presque tous les gènes sont sous-exprimés par rapport au contrôle. Les exceptions sont *rbmC* et *vpsL* à PmB200, ainsi que *rbmC* et *bap1* à PmB1600 (Fig. 28). On peut déduire quelques différences d'expression entre les différentes concentrations de PmB. Le gène *bap1* est initialement réprimé dans les quantités sous-inhibitrices de PmB, mais l'expression remonte avec l'augmentation de PmB. Le locus VPS I est le seul qui est plus exprimé à PmB1600 qu'aux autres concentrations de PmB.

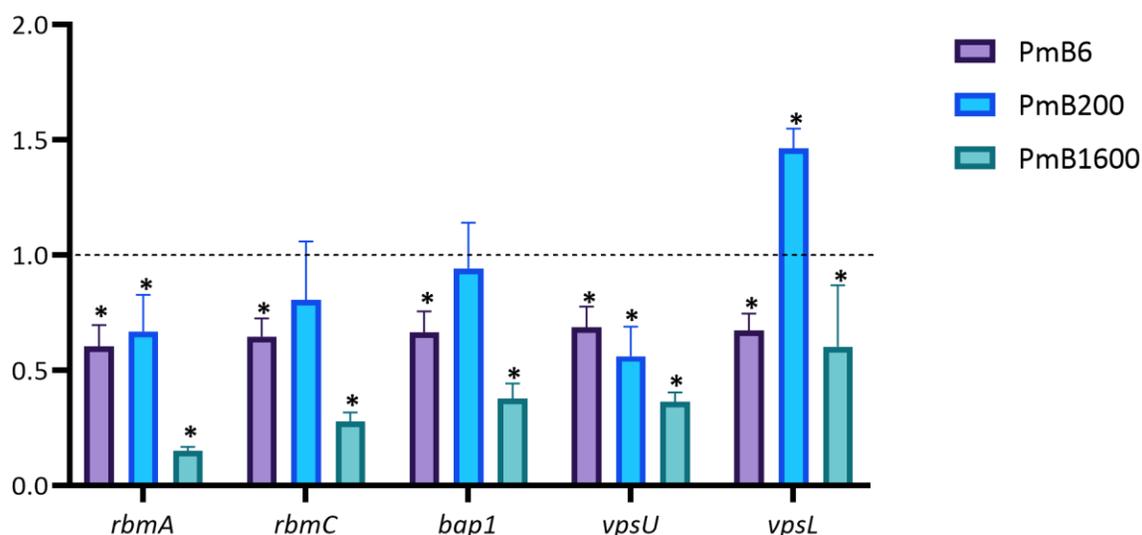


Figure 29

Expression des gènes de structures du biofilm après 6 h d'exposition à la PmB.

Les biofilms sont cultivés sans PmB, dans des plaques 24 puits à 37°C, pendant 18 h dans un milieu LB en aérobie. Le milieu est ensuite remplacé par un milieu additionné de PmB pour 6 h d'incubation supplémentaire. L'ARN est ensuite extraite et rétrotranscrit. L'expression des gènes *rbmA*, *rbmC*, *bap1*, *vpsU* et *vpsL* est mesurée par qPCR pour les biofilms traités à la PmB, en comparaison à des biofilms non-traités, normalisé sur le gène de ménage *recA*, où 1.0 représente l'expression du contrôle. Les données finales proviennent de quatre réplicats techniques conduit sur 3 réplicats biologiques et sont représentées par la moyenne \pm la déviation standard. Légende : * = $P < 0,05$.

Après 6 heures d'expositions à la PmB, le seul gène surexprimé est *vpsL* à PmB200. Presque tous les autres sont sous-exprimés, à l'exception de *rbmC* et *bap1* à PmB200 (Fig. 29). Cependant, on peut noter que les gènes *bap1* et *vpsU* sont sévèrement réprimés après 6 h à PmB1600. Les gènes *bap1* et *rbmC* sont plus exprimés à PmB200 que PmB6.

Après que les résultats en microflux aient démontrés que l'adaptation des biofilms exposé à la concentration de 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de PmB se produisait dans les 20 premières minutes du traitement, l'expression des gènes après 15 minutes de traitement à la PmB à 1600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a été examinée.

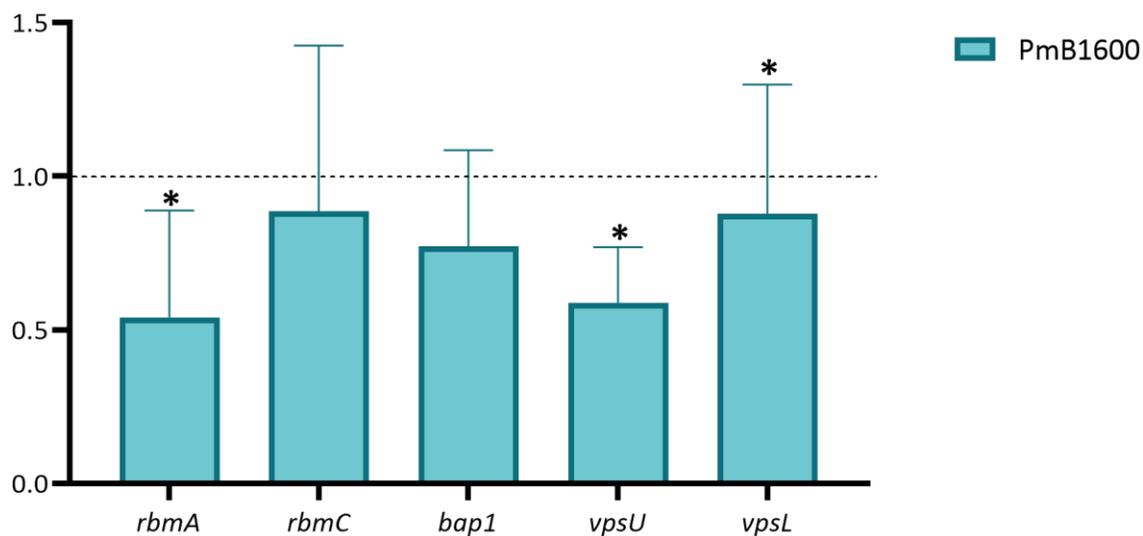


Figure 30

Expression des gènes de structures du biofilm après 15 minutes d'exposition à 1600 µg/ml de PmB.

Les biofilms sont cultivés sans PmB, dans des plaques 24 puits à 37°C, pendant 18 h dans un milieu LB en aérobie. Le milieu est ensuite remplacé par un milieu additionné de PmB à 1600 µg/ml pour 15 minutes d'incubation supplémentaire. L'ARN est ensuite extraite et rétrotranscrit. L'expression des gènes *rbmA*, *rbmC*, *bap1*, *vpsU* et *vpsL* est mesuré par qPCR pour les biofilms traités à la PmB, en comparaison à des biofilms non-traités, normalisé sur le gène de ménage *recA*, où 1.0 représente l'expression du contrôle. Les données finales proviennent de quatre réplicats techniques conduit sur 3 réplicats biologiques et sont représentées par la moyenne ± la déviation standard. Légende : * = $P < 0,05$.

On note une sous-expression des gènes *rbmA*, *vpsU* et potentiellement *vpsL*. On ne note pas de changement pour *bap1* et *rbmC*. L'ensemble des résultats de RT-qPCR démontrent que les phénotypes du biofilm traité aux fortes concentrations de PmB ne sont pas le résultat d'une surexpression des gènes du biofilm.

9.13 — Résistance du biofilm en microflux

La survie des bactéries au sein du biofilm traité à PmB à 1600 $\mu\text{g/ml}$ a été évalué. Étant donné qu'il s'agit d'une concentration 8 fois supérieure à la CMI planctonique de *V. cholerae* (voir tableau 5) et qu'il n'était pas possible d'observer de nouvelle structure après 24 h d'incubation avec la PmB, il fallait examiner s'il était possible de relancer le développement du biofilm en enlevant la PmB. Pour ce faire, les mêmes étapes que précédemment (voir figure 26) ont été réalisées en développant un biofilm mature de 12 h en flux, puis en changeant le milieu pour ajouter 1600 $\mu\text{g/ml}$ de PmB. Sachant que la PmB agit rapidement sur la structure du biofilm (voir figure 27), celle-ci fût laissée 2 h en contact avec le biofilm, puis le capillaire a été rincé avec du LB en augmentant la puissance du flux pour endommager le biofilm et bien rincer toute la PmB qui aurait pu adhérer en surface. Ensuite, du LB a été laissé en flux pour 24 h à 37°C, afin de permettre au biofilm de récupérer. La figure 31 présente les résultats-clé de cette analyse.

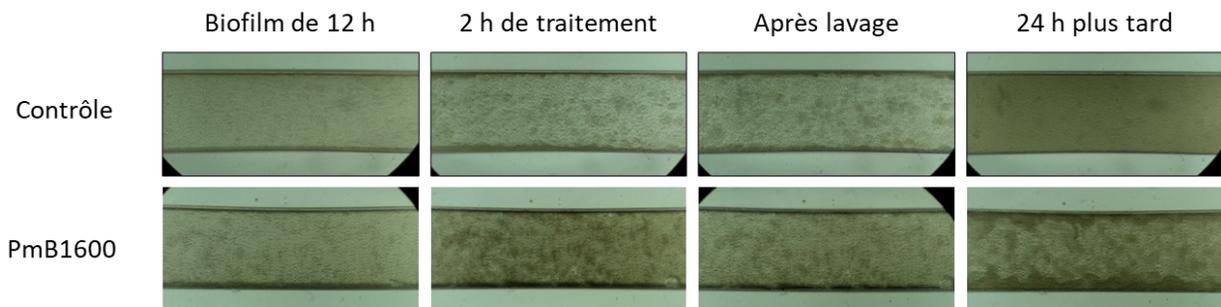


Figure 31

Test de survie des bactéries au sein d'un biofilm traité à 1600 $\mu\text{g/ml}$ de Polymyxine B pendant 2 heures.

Pour observer la récupération des biofilms en flux, la PmB à 1600 $\mu\text{g/ml}$ est ajoutée sur des biofilms matures de 12 heures, dans le système qui est maintenu à 37°C avec un flux de 0,20 dynes pendant 2 h. Ensuite, le système est rincé par un flux de LB de 1 dyne durant 5 minutes, suivi d'un flux de LB de 0,20 dynes pendant 24 heures. Les photos sont prises à grossissement 40x, avant le traitement à la PmB, 2h après traitement, après le lavage de la PmB un point à 24 heures. Les photos proviennent d'un même répliquat, mais sont représentatives de triplicata.

On peut tout de suite noter que 24 heures après le traitement PmB1600, le biofilm s'est bien relancé et a recommencé à croître (Fig. 31). Il est cependant différent du contrôle, sa structure

est beaucoup plus localisée et densifiée, présentant une structure en forme de gros agrégats. On peut aussi voir que le contrôle résiste mieux au flux de nettoyage que le biofilm traité à la PmB (Fig. 31). Ce résultat suggère que les bactéries à l'intérieur du biofilm ne sont pas toutes tuées par le traitement à la PmB puisque le biofilm s'est développé après le lavage et 24 h sans PmB.

9.14 — Microscopie à fluorescence sur les biofilms en microflux

En plus de faire les observations en champ clair, les biofilms d'intérêt ont été colorés avec deux types de colorants pour l'ADN, soit le Hoechst 33342 qui est un colorant de l'ADN total et l'iodure de propidium qui est un colorant de l'ADNe seulement, afin d'évaluer la quantité d'ADN dans le biofilm. Les biofilms matures de 12 heures en flux furent obtenus comme décrit dans les analyses précédente (voir figure 27), mais des colorants fluorescents sont ajoutés en même temps que le traitement à la PmB. Au bout de 30 minutes d'incubation, les biofilms ont été observés sous avec un microscope à fluorescence. L'exposition et la luminosité ont été réglés sur les capillaires avec PmB1600 et les paramètres furent conservés pour regarder les contrôles. Les photos de microscopie à fluorescence sont présentées à la figure 32.

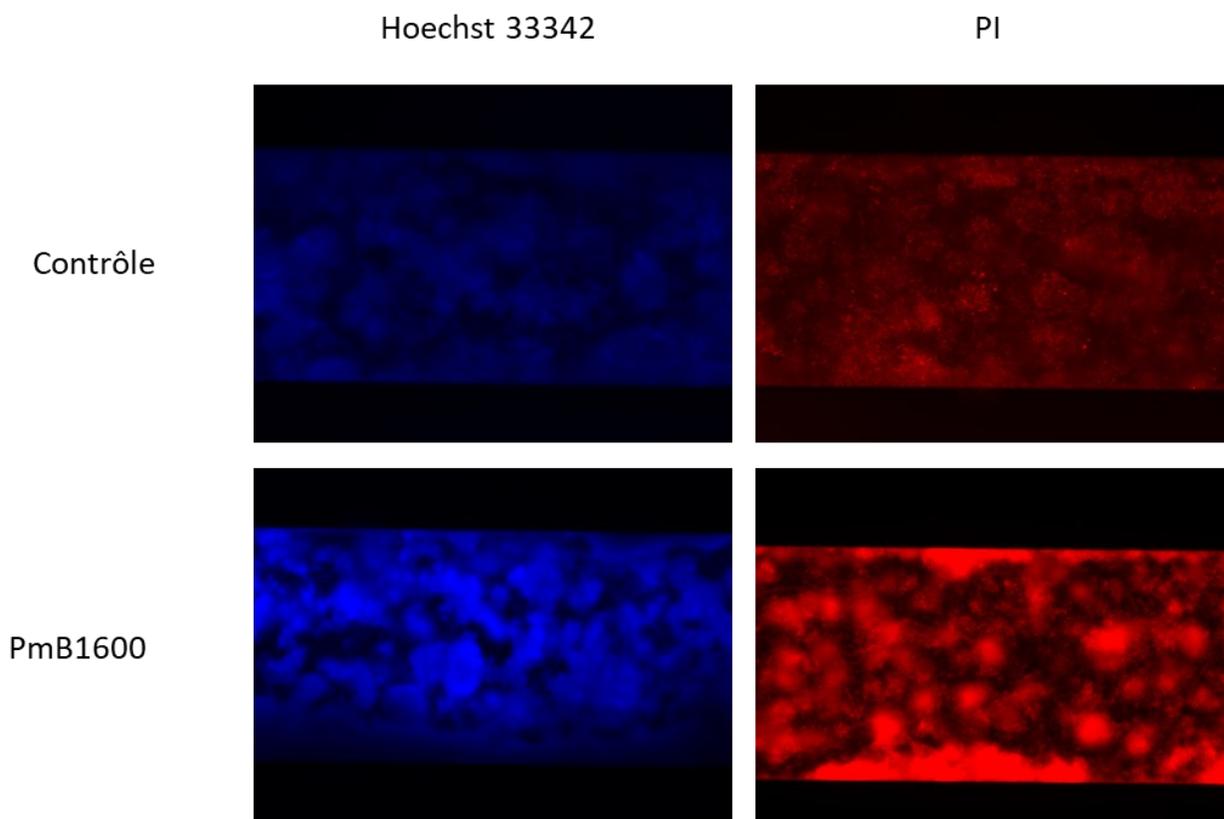


Figure 32

Fluorescence de l'ADN dans les biofilms traités à la PmB selon deux colorants.

Pour observer l'ADN dans les biofilms en flux, la PmB à 1600 µg/ml est ajoutée sur des biofilms matures de 12 heures, dans le système qui est maintenu à 37°C avec un flux de 0,20 dynes pendant 30 minutes. Une coloration fluorescente est réalisée en flux pendant 30 minutes avec Hoechst 33342 (en bleu) et l'iodure de propidium (en rouge) dans des capillaires différents. Les photos sont prises à grossissement 100x et les paramètres du microscope sont mis au point sur les biofilms traités à la PmB et sont conservés pour observer le contrôle. Les photos proviennent d'un même répliquas, mais sont représentatives de triplicata.

On peut remarquer que la fluorescence est beaucoup plus importante dans les puits avec le traitement à la PmB que dans les puits contrôles (Fig. 32). Cela suggère qu'une forte concentration de PmB libère une grande quantité d'ADN dans le biofilm.

9.15 — Résistance aux hautes concentrations de PmB sur gélose LB-agar

Les expériences en microflux ont été transposées sur gélose afin de voir l'impact du changement de milieu sur des colonies déjà formées. Des filtres 0,22 µm de nitrocellulose ont été déposés sur des géloses LB Agar et le dessus du filtre a étéensemencé avec 10 µl de culture de *V. cholerae* A1552 et A1552R. Après une nuit d'incubation, le filtre avec la colonie fût prélevé et a été déposé sur une nouvelle gélose de LB Agar avec PmB. Les nouvelles géloses ont été mises à l'incubation pour 3 jours à 37°C et les résultats sont présentés à la figure 33.

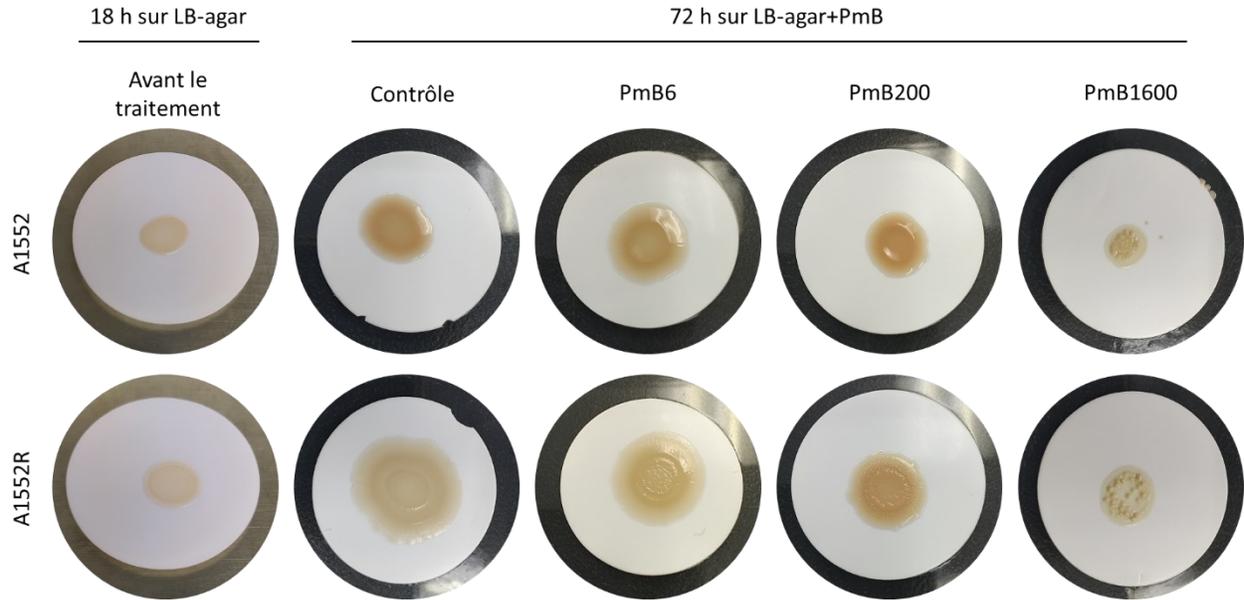


Figure 33

Impact de différentes concentrations de PmB sur des colonies matures.

Des filtres de nitrocellulose de 0,22 μm sont déposés sur des géloses LB agar et ensemencés avec une gouttelette de 10 μl de culture de *V. cholerae* A1552 (panneau du haut) ou A1552R (panneau du bas) puis incubés à 37°C pour 24 h. Ensuite les filtres sont prélevés et déposés sur de nouvelles géloses LB agar avec 6, 200 ou 1600 $\mu\text{g/ml}$ de PmB, puis incubés pour 72 h. Les photos proviennent d'un même répliquat, mais sont représentatives de triplicata.

Au bout des premières 18 h d'incubation, on remarque que des colonies se sont développées sur la membrane des filtres (Fig. 33). Après 72 h en présence de PmB, les contrôles ont continué de croître. La gélose traitée avec 6 $\mu\text{g/ml}$ de PmB semble présentée davantage de rugosité chez les 2 souches. PmB200 montre également de la croissance et une rugosité accrue, mais moins de croissance que PmB6. PmB1600 montre un phénotype différent, les colonies n'ont pas élargi, mais on peut voir l'apparition de structures en trois dimensions (Fig. 33).

Chapitre 10 — Discussion

L'objectif principal de ce projet de maîtrise était de caractériser la résistance aux agents antimicrobiens de *V. cholerae* selon les conditions de croissance environnementale. Pour atteindre cet objectif, j'ai quantifié les différences de résistance aux antibiotiques selon le milieu et les conditions de croissance, et étudié la formation et la résistance des biofilms envers les peptides antimicrobiens. Ensuite, j'ai mené plusieurs essais en microscopie et en biologie moléculaire pour caractériser les phénotypes de résistance extrêmes des biofilms de *V. cholerae*. Notre hypothèse globale est que les peptides antimicrobiens peuvent affecter différemment les biofilms de *V. cholerae* selon leur concentration et les conditions environnementales.

10.1 — Les variations de température et de salinité du milieu de croissance influencent la résistance aux antibiotiques.

Les investigations ont commencé par l'étude des conditions environnementales sur la résistance aux antibiotiques chez *V. cholerae*. J'ai donc testé un éventail d'antibiotiques à l'aide de test de diffusion sur géloses selon deux températures et deux concentrations de NaCl. Ces conditions font échos aux deux niches écologiques qu'occupe la bactérie, soit l'environnement aquatique naturel avec une température faible (18°C) et une salinité élevée (2% NaCl). L'environnement infectieux quant à lui est représenté par une salinité et une température physiologique standard (0,5 % NaCl et 37°C). Les résultats de ces expérimentations sont présentés à la figure 14 des résultats.

La diminution de la température influence négativement la résistance de *V. cholerae*, étant donné qu'elle est plus sensible à plusieurs antibiotiques (Tétra, Doxy, Kan, Cm et Éry) et qu'elle n'est pas plus résistante à aucun des antibiotiques testés (Fig. 14B). Tous ces antibiotiques fonctionnent comme inhibiteurs de la synthèse des protéines. Bien que *V. cholerae* soit une bactérie capable de survivre et de se reproduire dans les environnements marins naturels, son taux de croissance et de survie descend significativement en dessous de 20°C, où ses fonctions vitales sont plus orientées sur la survie que vers la croissance (Singleton et al., 1982). Elle possède d'ailleurs un système de réponse au froid contrôlé par les gènes *csp* (cold shock proteins). Les processus

physiologiques influencés par la protéine CspV incluent, entre autres, la formation de biofilm et la virulence (Townsend et al., 2016). De plus, il y a présence du ralentissement inévitable du métabolisme bactérien à cause de l'effet des températures réduites sur l'assemblage des ribosomes (Chen & Shakhnovich, 2010). Il est donc peu étonnant que les antibiotiques agissant sur la synthèse des protéines induisent une zone d'inhibition plus large lors d'une réduction de la température de croissance. La présence d'antibiotiques peut également affecter la capacité d'une bactérie de croître à certaines températures. Une étude sur *E. coli* a d'ailleurs déterminé que le stress dû à la présence des antibiotiques peut restreindre l'étendue des températures permissives pour la croissance (Cruz-Loya et al., 2021).

La salinité supérieure influence la résistance dans les deux directions. On note une augmentation de la résistance face à cinq antibiotiques (Spec, Kan, Éry, Tétracycline et Doxy), alors qu'inversement on augmente la sensibilité envers d'autres antibiotiques (Cm, Azi et Cipro) selon la figure 14 C. En tant que bactérie marine, *V. cholerae* a une relation particulière avec la salinité de son milieu. Souvent plus qu'autrement, l'ajout de NaCl dans le milieu de culture stimule la croissance et la survie du vibron cholérique (Miller et al., 1984; Singleton et al., 1982). Une étude sur l'expression des gènes de synthèse du peptidoglycane chez *V. cholerae* a démontré que ceux-ci étaient surexprimés lorsque la salinité du milieu augmente ce qui confère à la bactérie une meilleure imperméabilité (Fu et al., 2014). Il est raisonnable de supposer que cette baisse de la perméabilité puisse diminuer la diffusion de certains antibiotiques à l'intérieur de la bactérie, ce qui augmenterait sa résistance. Il fut également décrit chez d'autres bactéries qu'une augmentation de l'osmolarité stimule les phénotypes de résistance à certains antimicrobiens (Darby et al., 2023). Cette résistance est la conséquence de l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des pompes transmembranaires qui peuvent transporter les antibiotiques hors de la cellule en tentant de maintenir l'osmolarité (Cohen, 2014). Cependant, il est difficile d'émettre plus d'hypothèses pour expliquer les différences de résistance dont on est témoin sans davantage d'investigations.

Les PAM testés (PmB et colistine) furent difficiles à caractériser par la technique de diffusion sur gélose. Les zones d'inhibitions étaient trop petites ou absentes, ce qui représente une base trop incertaine pour tirer des conclusions.

Autant au niveau de la salinité que de la température, il est possible de confortablement conclure que ces variations dans le milieu de croissance influencent la résistance aux antibiotiques chez *V. cholerae*. Les résultats ne permettent cependant pas d'expliquer par quels mécanismes ces différents phénotypes se présentent, sans procéder à des expérimentations supplémentaires.

10.2 — La résistance aux antibiotiques en anaérobiose est influencée par le métabolisme bactérien.

Pour donner suite aux résultats de la figure 14, j'ai voulu tester un autre paramètre qui influence la croissance de *V. cholerae*. Dans l'environnement infectieux, l'intestin, il y a très peu d'oxygène, ce qui favorise la croissance anaérobie des bactéries. Je me suis interrogé sur l'influence de la croissance en anaérobiose dans le cadre de la résistance aux antimicrobiens.

Les résultats du tableau 4 montrent énormément de différence de résistance entre l'environnement aérobie et anaérobie lors de la croissance dans un milieu LB. On note une augmentation très importante de la résistance par rapport à plusieurs antibiotiques, dont tous les aminoglycosides, les PAM et les macrolides testés. Alors que les antibiotiques de la famille des tétracyclines et la Carb sont plus efficaces. De tels résultats semblent très prometteurs pour étudier davantage la résistance aux antibiotiques dans l'environnement anaérobie, cependant ces manipulations comportent un défaut très important. Le milieu LB ne comporte aucun accepteur alternatif pour soutenir la croissance anaérobie, ce qui ne laisse que la fermentation pour produire l'ATP nécessaire au métabolisme bactérien. La fermentation reste très limitée dans un milieu LB vu sa très faible teneur en sucre fermentescible. Le rendement énergétique de la fermentation est très réduit comparé à celui découlant de la respiration oxydative en aérobie, ce qui aboutit en une faible croissance (Jurtshuk, 1996). De plus, la croissance par fermentation est connue pour diminuer l'efficacité de plusieurs antibiotiques, dont les aminoglycosides, à cause de la chaîne de transport des électrons qui crée un gradient de protons dont la force permet l'entrée de ces antibiotiques à l'intérieur de la cellule (Rasmussen et al., 1997). *V. cholerae* utilise principalement la respiration anaérobie pour soutenir son métabolisme lors de la colonisation de l'intestin, avec un peu de fermentation comme mécanisme secondaire, dans une régulation très complexe (Bueno, Sit, et al., 2020). Un métabolisme purement fermentatif ne représente donc

pas la réalité de l'environnement infectieux et cela entraîne trop de différences de résistance qui ne sont pas représentatives du métabolisme réel.

Afin de remédier à ce défaut, j'ai commencé à utiliser un milieu LB enrichi de TMAO pour la croissance anaérobie (voir chapitre 4.4). Le TMAO est ajouté à une concentration de 50 mM pour remplacer l'oxygène en tant qu'accepteur final d'électron, ce qui assure un métabolisme de respiration anaérobie, mais ajoute une variable supplémentaire (Lee et al., 2012). Le tableau 5 présente donc les résultats des CMI avec respiration aérobie et anaérobie. Les résultats montrent que presque toutes les différences de résistance disparaissent par rapport au tableau 4. Les bactéries montrent toujours une résistance accrue en anaérobiose à streptomycine et la kanamycine. Ces deux antibiotiques de la famille des aminoglycosides sont moins efficaces contre les bactéries anaérobies à cause de la nécessité d'une chaîne de transport des électrons intacte pour s'importer dans la cellule comme discutée précédemment (Rasmussen et al., 1997). La chaîne de transport des électrons adaptés à l'anaérobiose de *V. cholerae* comporte plusieurs protéines analogues qui diffèrent de la chaîne classique des environnements aérobies, ce qui peut expliquer que le phénotype n'est pas complètement rétabli (Bueno, Sit, et al., 2020). La seule autre différence de résistance dans le tableau 5 est au niveau de la PmB, dont la CI_{50} triple en anaérobiose. Étant donné que plusieurs études précédentes du laboratoire Duperthuy ont mis en valeur plusieurs mécanismes de survie en relation avec la polymyxine B (Giacomucci et al., 2019; Mathieu-Denoncourt & Duperthuy, 2022), j'ai voulu caractériser davantage ces différences.

10.3 — Les différentes concentrations de PmB influencent *V. cholerae* différemment selon la disponibilité de l'oxygène.

Les résultats présentés dans la figure 15 montrent la croissance de *V. cholerae* selon toutes les concentrations de PmB que j'ai testées. En premier lieu, on peut souligner que la croissance en anaérobiose est très inférieure, soit environ une DO_{600nm} de 0,1, alors que la croissance en présence d'oxygène est d'une DO_{600nm} d'environ 0,5 (Fig. 17). Cette différence n'est pas très étonnante considérant que la respiration oxydative est la méthode la plus efficace de générer de l'ATP (Jurtshuk, 1996). De plus, la viabilité de *V. cholerae* est réduite après 4 h de croissance en utilisant le TMAO, à cause de l'accumulation de déchets métaboliques toxiques dans le milieu, les

bactéries atteignent donc prématurément la phase stationnaire en comparaison avec la croissance aérobie (Oh et al., 2014).

La différence principale se trouve au niveau de la CI_{50} qui se situe à 50 $\mu\text{g/ml}$ de PmB en aérobie, mais à 150 $\mu\text{g/ml}$ en anaérobie (Fig. 17). Lors de la croissance anaérobie, la présence de PmB ne perturbe pas la croissance dans les concentrations inférieures à 150 $\mu\text{g/ml}$ comparativement au témoin sans PmB. Il est difficile de comprendre pourquoi cette différence de résistance est aussi prononcée en anaérobie. Bien que la résistance à la PmB soit très documentée chez *V. cholerae*, aucune de ces études ne prend en considération l'environnement hypoxique. Les mécanismes classiques de résistance à la PmB chez *V. cholerae* sont l'altération des LPS et la production de vésicules (voir section 6.7.2). Une étude récente a démontré une modification des LPS en anaérobie chez *V. cholerae* lorsque celle-ci croît dans un milieu enrichi de TMAO et de bile (Netter et al., 2023). Dans un milieu différent, il est possible d'envisager que des modifications du LPS peuvent avoir lieu en anaérobie et influencer la sensibilité à la PmB. Cependant, les connaissances actuelles ne permettent pas d'émettre une hypothèse précise sur le mécanisme responsable de l'augmentation de la résistance à la PmB en anaérobie.

Chez la souche rugueuse A1552R, dont la CMI est identique à la souche lisse, les concentrations sous-inhibitrices de PmB semblent stimuler la croissance de la souche en anaérobie jusqu'à 175 $\mu\text{g/ml}$ et en aérobie jusqu'à 50 $\mu\text{g/ml}$, si on les compare aux témoins. Cette souche produit plus de biofilms que la souche sauvage classique et la production d'une quantité supérieure de biofilms pourrait augmenter l'opacité du milieu de culture, ce qui causerait une $DO_{600\text{nm}}$ plus élevée. Des concentrations sous-inhibitrices d'antibiotiques peuvent stimuler la production de biofilm chez d'autres bactéries (Penesyan et al., 2020). Cependant, j'ai n'ai pas d'hypothèse pour justifier une différence aussi importante entre la culture aérobie et anaérobie.

Bien que je ne connaisse pas les mécanismes responsables des phénotypes qu'on observe dans la figure 17, je peux affirmer que la PmB influence *V. cholerae* différemment selon la disponibilité de l'oxygène.

10.4 — Les caractéristiques du biofilm diffèrent selon la disponibilité de l’oxygène dans le milieu.

Dans le but de continuer les investigations sur l’impact de l’anaérobiose sur la croissance de *V. cholerae*, j’ai commencé à étudier la production de biofilms. J’avais accès à des mutants des gènes du biofilm de la souche rugueuse A1552R, dont j’ai profité pour caractériser l’impact de l’anaérobiose sur les biofilms.

Les résultats de la figure 18 démontrent clairement la faible production de biofilm dans l’environnement anaérobie. Ces résultats concordent avec les résultats précédents (Fig. 17) qui ont démontré que la croissance en anaérobiose est réduite en comparaison avec la croissance aérobie. D’autres auteurs ont également tiré les mêmes conclusions, c’est-à-dire que l’environnement hypoxique limite la formation de biofilms chez *V. cholerae*, lorsque comparé à un environnement avec présence d’oxygène (Caigoy et al., 2022). Cette diminution de la production de biofilm n’est pas très surprenante, bien qu’il y ait une production de biofilm dans le cycle infectieux, les biofilms en adhésion sur une surface sont principalement dominants dans l’environnement aquatique (voir chapitre 3.3), car ils permettent aux bactéries de vivre en association avec le zooplancton (Hood & Winter, 1997). Les biofilms sont particulièrement utiles durant les premières phases de l’infection, lors de l’ingestion, ce qui permet de résister à l’acidité gastrique et d’augmenter la virulence (Tamayo et al., 2010). D’autres facteurs jouent également un rôle dans le développement des biofilms en anaérobiose, la présence de bile est connue pour stimuler la production de biofilm dans l’intestin (Hung et al., 2006).

La production réduite de biofilm du mutant $\Delta bap1$, comparativement aux autres mutants, en aérobie seulement est également un trait intéressant de la figure 18. Ces données suggèrent que la protéine Bap1, qui possède un rôle d’adhérence et de structure (voir section 5.7.2), n’est pas aussi importante pour le développement de biofilm en anaérobiose qu’en aérobie. La figure 19 démontre que la production de biofilm du mutant *bap1* en aérobie augmente de 94 % après un changement de milieu et 24 heures d’incubation supplémentaire, comparativement à 20 % pour la souche rugueuse. Ces résultats confirment qu’une fois que l’adhésion établit, le rôle de Bap1 est beaucoup moins important dans le développement d’un biofilm mature, alors que le

rôle de Bap1 en tant qu'adhésine dans les étapes précoces du développement d'un biofilm est connu (Kaus et al., 2019). Les rares études sur les biofilms de *V. cholerae* en anaérobiose actuellement disponible n'ont pas révélé cette différence. Il serait donc intéressant d'identifier les adhésines responsables de l'adhésion initiale du biofilm en anaérobiose puisque Bap1 semble jouer un rôle minime dans ces conditions.

10.5 — En anaérobiose, la production de biofilm est davantage inhibée par les concentrations sous-inhibitrices de PmB.

En continuité avec les résultats précédents, j'ai poursuivi les investigations sur l'impact de la PmB, cette fois-ci sur les biofilms en aérobiose et anaérobiose. Les résultats de la figure 20 AB démontrent qu'à partir de 25 µg/ml de PmB la production de biofilm est inhibée chez toutes les souches en aérobiose. Il s'agit d'une valeur 8 fois inférieure à la CMI des bactéries planctoniques (200 µg/ml à la figure 17A), donc une dose sous-inhibitrice. L'inhibition de la formation du biofilm est également mise en valeur à la figure 23, où j'ai répété les mêmes tests, mais dans des volumes plus importants. En anaérobiose, la production de biofilm est inhibée à partir 3 µg/ml, ce qui est 75 fois inférieur à la CMI d'anaérobiose (225 µg/ml à la figure 17B). La croissance en anaérobiose est donc plus résistante à la PmB qu'en présence d'oxygène, mais la production de biofilm est inhibée plus rapidement qu'en aérobiose. Le phénotype étant identique chez les différents mutants présentés à la figure 20, on peut confirmer que cette différence dans l'inhibition n'est pas due aux gènes de structure du biofilm.

L'inhibition de la formation du biofilm en présence de PmB est déjà décrite par un article du laboratoire Duperthuy. Dans cette étude, les auteurs ont décrit que l'inhibition est le résultat de la perte du flagelle associé à la bactérie dans les concentrations sous-inhibitrices de PmB, ce qui résulte d'une diminution de la motilité et de la capacité à produire un biofilm (Giacomucci et al., 2019). Cependant, cette étude ne prenait pas en compte le développement de biofilm dans un environnement anaérobie. Un article publié récemment décrit une fonction du régulateur principal de l'adaptation à l'anaérobiose (ArcA) qui régule négativement la mobilité lié au flagelle en anaérobiose (Li et al., 2022). On peut supposer que la diminution de la motilité en anaérobiose

combinée avec l'effet d'une dose sous-inhibitrice de PmB sur les flagelles accentue le phénotype d'inhibition de la formation du biofilm dans l'environnement anaérobie.

10.6 — Les biofilms de *V. cholerae* sont résistants à la PmB en dose sous-inhibitrice et en dose d'excès.

Après avoir testé l'impact de la PmB sur la formation des biofilms à partir de bactéries en solution, je me suis interrogé sur l'impact de celle-ci sur des biofilms déjà matures de 24 heures.

Les résultats de la figure 21 AB démontrent qu'il y a plus de biomasse chez les biofilms traités à moins de 25 µg/ml de PmB que dans le contrôle sans PmB de chez la souche rugueuse et les mutants *ΔrbmA* et *ΔrbmC*. Ces résultats font échos au phénotype discuté précédemment qui montre une augmentation de la biomasse dans les concentrations sous-inhibitrices chez la souche A1552R (Fig. 17). La figure 20B démontre également un phénotype similaire pour la production de biofilm chez les mutants *ΔrbmA* et *ΔrbmC*. Bien que je ne connaisse pas la cause, la répétition de ce phénomène dans plusieurs expériences confirme que les doses sous-inhibitrices de PmB stimulent la croissance du variant rugueux, sauf si celui-ci porte une délétion de *bap1*. Cependant, le phénotype n'est pas présent en anaérobiose pour les biofilms déjà formés (Fig. 21 B) contrairement aux tests de CMI de la figure 17 B.

Un résultat intéressant de la figure 21 se trouve dans les fortes concentrations de PmB (> 400 µg/ml) qui démontrent une biomasse plus importante qu'aux concentrations inférieures. En aérobiose, on observe un creux de la quantité de biofilms vers 200 µg/ml, suivi d'une augmentation de la biomasse suivant la concentration croissante de PmB. Ce phénotype est présent chez presque toutes les souches, à l'exception de la souche lisse et du triple mutant des gènes de structure du biofilm (Fig. 21 A). En anaérobiose, on observe la quantité la plus faible de biomasse à une concentration plus faible de PmB, environ 50 µg/ml (Fig. 21 B), ce qui indique encore une fois la sensibilité accrue en anaérobiose, comme décrite précédemment. Toujours en anaérobiose, chez A1552R et les mutants *ΔrbmC* et *Δbap1*, la quantité de biomasse augmente dans les concentrations supérieures de PmB. Les tests réalisés dans de plus gros volumes à la figure 24 ont montré la même tendance. Ce phénotype va à l'encontre de l'hypothèse initiale, car

j'avais prédit que plus la concentration en PmB augmenterait, plus le biofilm serait dégradé et donc que la biomasse serait réduite. Les résultats de la figure 21 démontrent le contraire, ce qui m'a poussés à poursuivre les investigations sur ce phénotype.

10.7 — La résistance aux fortes concentrations de PmB n'est pas due à une variation génétique.

La première piste que j'ai explorée pour tenter d'expliquer le phénotype de la figure 21 fut que cette résistance soit due à la sélection de variants hyper-résistants à la PmB, à la suite de la pression sélective du traitement. J'ai donc récupéré les bactéries vivantes à l'intérieur des biofilms traités à 1600 µg/ml de PmB. Parmi les six isolats récupérés, j'ai testé trois variants potentiels pour les soumettre à plusieurs tests de résistance; la CMI, le test de production de biofilm en présence de PmB et j'ai testé la résistance des biofilms mature à la PmB, comme dans les manipulations précédentes. Les résultats de la figure 22 sont cependant très clairs, il n'y a pas de différence entre les bactéries extraites des biofilms et notre témoin, au niveau de la résistance à la PmB. La seule variation que l'on peut voir est lorsqu'on compare les tandems témoin-V1 avec V2-V3, où les résultats donnent l'impression que V2-V3 sont plus résistants à la PmB dans les faibles concentrations (Fig. 22). Cependant, ces variants étaient incubés ensemble dans la même plaque, alors ces différences sont très certainement dû à une asymétrie dans la qualité des manipulations, plutôt qu'à une différence biologique. Étant donné que les résultats étaient si peu prometteurs, je n'ai pas poursuivi cette piste davantage.

J'avais testé cette démarche qui avait déjà fait ses preuves dans le cadre d'une autre publication du laboratoire. L'isolation de variants avec un phénotype d'hypervésiculation, isolé à la suite d'une pression sélective induite par une concentration sous-inhibitrice de PmB, avait permis de mettre en lumière un nouveau mécanisme de motilité (Giacomucci et al., 2022). *V. cholerae* étant une bactérie possédant une forte plasticité génique et la capacité de produire des variants facilement (Escudero & Mazel, 2017), j'ai cru pouvoir isoler des mutations expliquant la forte résistance à la PmB des biofilms. Cependant, dans le cas de mon projet, cette démarche n'a pas été concluante.

10.8 — Le traitement des biofilms aux fortes concentrations de PmB stimule l'apparition d'un phénotype unique.

Suivant l'échec de l'isolement de variation génétique, j'ai poursuivi les investigations à l'aide de la microscopie en champ clair et à fluorescence pour essayer de découvrir la source du phénotype de résistance. Afin de reproduire les phénotypes observés lors des essais en plaque de 96 puits, j'ai testé les mêmes protocoles en plaque de 24 puits qui sont ensuite portés en microscopie. Les résultats de ces essais peuvent être visualisés dans les figures 23 et 24. Ces résultats ne montrent pas de différence drastique avec les résultats des figures 21 et 21, mais ils résument moins de réplicats et possèdent de fortes barres d'erreur, ils sont par conséquent moins puissants.

Les résultats de la figure 25 offrent une perspective des biofilms de A1552R au fond des plaques de 24 puits dans lequel on peut visualiser l'effet de la PmB qui a été ajouté sur les biofilms matures et incubés pendant 24 h. On peut observer des structures matures de biofilm au champ clair dans toutes les concentrations suggérant que les biofilms préexistants résistent à toutes les concentrations de PmB testés. L'extrême résistance des biofilms aux antibiotiques est un fait bien connu, cependant plusieurs auteurs voient les PAM comme de puissants agents anti-biofilm potentiels à cause de leur action sur les membranes bactériennes (Yasir et al., 2018). Les PAM sont intéressants, car ils peuvent agir sur les bactéries persistantes en plus des bactéries métaboliquement actives, contrairement aux antibiotiques classiques (Batoni et al., 2016). Cependant, il faut que les PAM puissent atteindre les bactéries ciblées pour obtenir un effet bactéricide, ce qui n'est pas nécessairement possible selon la complexité du biofilm. L'action des PAM sur la matrice extracellulaire est mal comprise et certains composés des EPS pourraient avoir un effet inhibiteur sur les PAM, ce qui limite leur action sur les biofilms déjà formés (Batoni et al., 2016). Cependant, l'action des PAM comme agent anti-biofilm est très efficace dans les étapes initiales de la formation des biofilms comme les travaux d'autres auteurs et de notre laboratoire l'ont démontré (Batoni et al., 2011; Giacomucci et al., 2019).

Les puits témoins et ceux traités avec la PmB6 ne présentent pas beaucoup de différence entre eux, ce qui correspond avec les résultats concomitants de la figure 24. Les résultats de cristal violet des biofilms traités avec la PmB200 montrent moins de coloration que dans les autres puits.

Bien qu'on puisse voir de grosses structures de biofilms, l'espace intermédiaire est plus estompé et semble dégradé si on le compare avec le témoin sans PmB (Fig. 25). Ces résultats semblent suggérer une dégradation des biofilms moins développés comparativement aux amas plus épais. On peut supposer que ces régions sont moins avancées dans les stades de maturation du biofilm et donc plus sensibles à l'activité anti-biofilm de la PmB. Il ne faut pas oublier que les biofilms sont des structures dynamiques qui comportent beaucoup de variations à leur surface en fonction du développement. Par exemple, le site d'attachement initial, de la première bactérie qui s'est adhérent à une surface, supporte un biofilm beaucoup plus mature que celui d'une bactérie relâchée ultérieurement qui vient de commencer le processus (Sauer et al., 2022).

Le biofilm traité à la PmB1600 de la figure 25 présente un résultat particulier, car on distingue énormément de cristal violet retenu par la matrice du biofilm. Le champ clair aussi présente des caractéristiques absentes des autres puits, où l'on voit plusieurs petits amas entre les grosses structures du biofilm. Pour le moment, on peut supposer qu'il s'agit d'amas de biofilms puisqu'ils retiennent le colorant violet et ne présente pas un phénotype lavé contrairement à la PmB200. La coloration au Hoechst 33342 (NucBlue™) est très réactive dans le puit PmB1600, ce qui suggère une quantité très importante d'ADNe dans le biofilm ou d'ADN intracellulaire comparé aux autres concentrations. On suppose que cet ADN est le résultat de la lyse d'un nombre important de bactéries à la suite du traitement à la PmB1600. La PmB ayant une action de perméabilisation des membranes bactériennes, une aussi forte concentration peut mener au relâchement du contenu cytoplasmique des bactéries traitées (Yeaman & Yount, 2003).

10.9 — Les quantités sous-inhibitrices de PmB influencent le développement d'un biofilm présentant des défauts d'adhérence.

J'avais continué la caractérisation des biofilms en délaissant les tests statiques au profit de tests dans un système de microfluidique. Étant donné la nature du système, j'ai utilisé la souche lisse de *V. cholerae* A1552 (pKEN2), produisant une protéine GFP, afin de mieux surveiller le système et parce que la souche rugueuse bouche les capillaires du système au bout de quelques heures.

La figure 26 présente les résultats de formation du biofilm selon la présence ou non d'une concentration sous-inhibitrice de PmB. En l'absence de PmB dans le système, le biofilm se développe rapidement et finit par couvrir l'ensemble du capillaire et arrive à le boucher en moins de 3 jours. Le biofilm produit en présence d'une concentration de 6 µg/ml de PmB, se développe moins rapidement à comparer au témoin (Fig. 26). Selon les observations en cours de manipulation, le biofilm PmB6 est très faiblement ancré aux parois du capillaire et se détache spontanément lors de la manipulation du système après 24 heures d'incubation. Au bout de 96 heures de flux, on ne distingue que très peu de structure dense dans le biofilm PmB6 et le milieu de culture circule encore dans le système de capillaire, signe que celui-ci n'arrive pas à couvrir l'ensemble du système. Les résultats précédents (Fig. 20) montrent une forte réduction de la formation de biofilm en présence de concentrations sous-inhibitrices de PmB, alors que les résultats de la figure 26 ajoutent une nouvelle dimension en démontrant le faible ancrage de ces biofilms sur le substrat. Ces résultats vont dans le même sens que ceux relevés dans l'article précédent du laboratoire Duperthuy qui attribue la diminution de la formation du biofilm à la perte du flagelle, un élément important de l'adhésion chez *V. cholerae*, comme décrit précédemment (Giacomucci et al., 2019). On peut en conclure que les concentrations sous-inhibitrices de PmB induisent une diminution de l'adhérence du biofilm à son substrat et qui entraîne une perte de structuration de celui-ci.

10.10 — L'action des fortes concentrations de PmB sur les biofilms est un processus très rapide.

J'ai répété les tests de résistance des biofilms matures qui ont montré les phénotypes de résistance accrue aux fortes concentrations en PmB (Fig. 21, 24 et 25) dans le système de microfluidique. La figure 27 présente un résumé des résultats clés obtenus en cours de manipulation. Pour le biofilm traité à la PmB6, on note une légère différence au bout de 24 heures de traitement, car le capillaire n'est pas complètement recouvert de biofilm comparativement au témoin. Ces résultats vont dans le même sens que ceux de la figure 26, car le biofilm développé à la suite du traitement ne s'est pas aussi bien développé uniformément que celui sans antimicrobien.

Le biofilm traité à la PmB200 a montré une dégradation avec une perte importante de biofilm au bout de 24 heures. Seules les structures plus denses ont perduré malgré la présence de PmB, ce qui rappelle des résultats de la figure 25. Comme précédemment, on peut supposer que les amas de biofilms immatures n'ont pas résisté au traitement, ce qui laisse des structures matures seulement et donc un biofilm beaucoup moins dense qui ne couvre pas tout le capillaire.

Pour ce qui est du biofilm traité à la PmB1600, on remarque une augmentation de l'opacité et une contraction du biofilm très rapide, en moins de 30 minutes. Au bout de 24 heures, le biofilm n'est pas très différent, ce qui suggère qu'il n'a pas été dégradé, mais qu'il ne s'est pas développé davantage non plus. Ce phénotype semble être le même qu'observé à la figure 25, ce qui permet de supposer que l'augmentation de l'opacité du biofilm pourrait être due à l'accumulation d'ADN générée par la lyse d'un nombre important de bactéries en surface. Étant donné que l'apparition du phénotype du biofilm se fait en moins de 30 minutes, cela confirme comme à la figure 22 qu'on n'ait pas en présence de variants hyper-résistants, puis que ceux-ci n'auraient pas le temps d'être dominant dans la structure du biofilm. On peut donc se poser la question à savoir si ce phénotype est le résultat d'une régulation d'expression des gènes de structure du biofilm en réponse au traitement. Les bactéries peuvent répondre très rapidement aux stress environnementaux, une protéine pouvant être produite en moins de 1 minute lors d'une réponse rapide au stress (Zhu & Dai, 2020). De plus *V. cholerae* est une bactérie qui se reproduit rapidement avec un temps de génération qui varie de 16 à 20 minutes, ce qui lui laisse le temps de s'adapter rapidement (Bueno, Pinedo, et al., 2020).

10.11 — Les phénotypes de résistance accrus ne résultent pas d'une surexpression des gènes de structures du biofilm.

Dans le but de découvrir si le phénotype de résistance des biofilms aux fortes concentrations en PmB est dû à un changement d'expression des protéines de structures et des VPS du biofilm, j'ai testé la transcription des gènes de structures à différents moments après le traitement à la PmB. La quantification de l'expression des gènes des protéines de structure des biofilms par qPCR (Fig. 28, 29 et 30) montrent globalement diminution de l'expression des gènes de structures du biofilm lors de la présence de PmB indépendamment du temps d'exposition et de la concentration. Ces

résultats étaient attendus, car la formation du biofilm est moins importante en présence de PmB comme on peut voir dans plusieurs résultats précédemment discuté (Fig. 20, 21, 23 et 24). Cette information est tout de même pertinente, car cela indique que la densification du biofilm traité à la PmB1600 (Fig. 27 et 31) n'est pas le résultat d'une surproduction des VPS et des protéines de matrice du biofilm. Le seul gène surexprimé parmi les trois figures de qPCR, est *vpsL* à PmB200 après 6 h d'exposition à la PmB (Fig. 29). Cependant, cette surexpression n'est pas très importante avec moins de 1,5 fois l'expression normal, alors qu'il est sous-exprimé ou neutre dans tous les autres résultats. Bien que statistiquement significatif, il est donc peu probable que ce résultat le soit d'un point de vue biologique, surtout qu'une surexpression d'un seul des locus *vps*, sans support additionnel des protéines de structures ou de l'autre locus *vps*, ne mènerait qu'à l'accumulation de polysaccharides immatures désorganisés sans intégrité structurelle (Fong et al., 2010). Pour ce qui est de la figure 30 qui témoigne du changement rapide des biofilms traité à la PmB1600, on note soit une sous-expression des gènes ou aucun changement significatif. Ces résultats informent donc qu'il est très improbable que le phénotype observé à la figure 27 soit le résultat d'une réponse rapide au stress par les gènes de structures du biofilm.

10.12 — Les bactéries survivent dans les biofilms traités aux fortes concentrations en PmB.

Bien que le phénotype se soit reproduit dans plusieurs tests, j'ai voulu savoir si les bactéries pouvaient survivre au sein du biofilm après le traitement à la PmB1600. La figure 31 démontre que le biofilm traité à la PmB s'était développé davantage une fois la PmB retirée. Ce résultat suggère la survie de bactéries à l'intérieur du biofilm, malgré la forte quantité de PmB. En revanche, 24 heures suivant le lavage, le biofilm traité n'est pas aussi bien développé uniformément que le contrôle. Il est sûrement impossible de retirer entièrement la PmB malgré les lavages puisque des résidus doivent rester dans le biofilm. Cela laisse sûrement une concentration sous-inhibitrice dans le système après le lavage de la PmB1600, ce qui expliquerait le biofilm n'est pas aussi développé que le témoin, comme à la figure 27. Je me doutais déjà que les bactéries pouvaient survivre au traitement étant donné que j'avais déjà récupéré des bactéries en cherchant de potentiels variants dans les biofilms statiques à la figure 22. Ces résultats

permettent donc de confirmer que les bactéries au sein du biofilm survivent aux concentrations très élevées de PmB.

10.13 — Une concentration très élevée de PmB mène au relâchement d'ADN qui englobe le biofilm.

Les résultats obtenus en microscopie par fluorescence de la figure 25, avaient démontré que les biofilms traités à une concentration de 1600 µg/ml de PmB présentaient une abondance d'ADNe comparativement aux témoins non traités. J'ai donc répété la manipulation dans le système de microfluidique avec deux colorants d'ADN pour vérifier si j'obtenais le même résultat. La figure 32 démontre qu'avec deux colorants différents ciblant l'ADN, soit le PI qui ne pénètre pas dans les cellules vivantes, et le Hoechst 33342 qui peut entrer dans les cellules vivantes, donc colorer tout l'ADN des biofilms. Les biofilms traités à la PmB1600 fluorescent beaucoup plus que le témoin sans traitement, et ce avec les deux colorants. Ces résultats permettent de déduire que beaucoup d'ADN se trouve dans les biofilms traités à la PmB1600. La coloration au PI n'étant pas plus faible que la coloration au Hoechst 33342, on peut déduire qu'une majorité de l'ADN fluorescent est extracellulaire. Étant donné la vitesse de l'apparition de phénomène, la seule source possible pour cet ADN serait la lyse des bactéries libres et en surface de la matrice du biofilm.

Je propose que cet ADN serait responsable des phénotypes observés dans les figures précédentes et participerait à la protection des bactéries du biofilm contre les fortes concentrations de PmB. Le biofilm étant intact 24 heures après un traitement à la PmB1600, contrairement au traitement à la PmB200, je pense que cette protection nécessite une forte concentration de PAM afin de libérer suffisamment d'ADN pour enrober le biofilm afin de le protéger. Les résultats des figures 21, 24, 25, 27 et 31 vont dans ce sens en présentant toujours un phénotype de biomasse plus importante à PmB1600 que PmB200. Les caractéristiques protectrices de l'ADN ne sont pas un concept nouveau. Il est connu que l'ADN est une molécule adhésive participant à la structure des biofilms en reliant les polymères, protéines et autres composants de la matrice pour stabiliser la structure (Das et al., 2013). La polarité de l'ADN est également décrite comme pouvant séquestrer certains antibiotiques comme les aminoglycosides et les PAMC, dont la PmB, un rôle décrit dans

les biofilms de *P. aeruginosa* (Chiang et al., 2013). L'ADN extracellulaire est également utilisé par les neutrophiles comme mécanisme de séquestration des bactéries (NETs) dans le cadre d'une infection (Brinkmann et al., 2004). Je propose donc que l'ADN libéré à la suite de la lyse des bactéries, par les fortes concentrations de PmB, puisse séquestrer cette dernière, voire renforcer la structure du biofilm, et protéger les bactéries en agissant comme bouclier.

10.14 — Sur milieu solide, *V. cholerae* est capable de développer une nouvelle structure en réponse aux très fortes concentrations de PmB.

J'ai testé l'effet d'une très forte concentration de PmB sur des colonies bactériennes afin d'évaluer si les bactéries pouvaient résister comme à l'intérieur d'un biofilm mature. Les résultats de la figure 33 démontrent que les colonies bactériennes ont continué de se développer en largeur dans toutes les concentrations testées sauf la PmB1600. Avec la PmB à 1600 µg/ml, on note l'apparition de structures en trois dimensions ressemblant à des pustules au-dessus des colonies. Le développement de ces structures témoigne de la survie des bactéries malgré le traitement à la PmB, ce qui suggère que les bactéries sont encore métaboliquement actives au sein de la colonie.

Les colonies sont une forme de biofilm avec une organisation complexe où les bactéries s'engagent dans des comportements collectifs (Cho et al., 2007). Les bactéries peuvent se réorganiser en microcolonies au sein d'un biofilm en réponse aux stress environnementaux, cette stratégie permet de profiter du quorum sensing pour développer davantage le biofilm en plus d'offrir une protection contre les stress (Cho et al., 2007). Il est possible de supposer qu'à la suite du stress induit par la PmB1600, les bactéries les plus éloignées de l'antimicrobien se réorganisent en structures de biofilm physiquement isolé du reste de la colonie où elles peuvent persister à l'aide de mécanisme de résistance aux stress comme le QS. Il est également possible que nous sommes en présence de mutants, cependant le phénotype est présent dans tous les réplicats, ce qui suggère qu'il s'agirait d'un phénotype facile à acquérir.

10.15 — Conclusion

Cette étude sur la caractérisation de la résistance aux agents antimicrobiens selon les conditions de croissance chez *V. cholerae* a permis de révéler plusieurs particularités qui ouvrent la porte à de nouveaux projets. Des variations dans l'intensité de la résistance à un large éventail d'antibiotique selon différents paramètres de l'environnement soit ; la température, la salinité et la présence d'oxygène, ont été identifiées. Ces résultats ont révélé les différents phénotypes qu'induit la PmB lorsqu'utilisée sur des cellules planctoniques et des biofilms : soit la différence de résistance en anaérobiose et la diminution de l'adhérence des biofilms en présence de quantité sous-inhibitrice de PmB. Un phénotype intrigant, la tolérance des biofilms aux fortes concentrations en PmB, suggère l'existence d'un mécanisme de résistance mal connu qui pourrait jouer un rôle dans la persistance des bactéries. Bien que je ne pense pas que les biofilms de *V. cholerae* puissent être soumis à de si fortes concentrations de PAM dans le système intestinal, il est possible que le phénotype se reproduise à la suite d'une combinaison de facteurs ou au contact d'autres substances comme l'acidité gastrique. L'ensemble des résultats de mon mémoire sont résumé dans un article intitulé « *Elevated concentrations of polymyxin B elicit a biofilm-specific resistance mechanism in Vibrio cholerae* » qui est disponible en annexe.

L'ensemble des résultats laisse avec plusieurs questions qui pourront nourrir les prochains projets du laboratoire Duperthuy. Le rôle de *bap1* en anaérobiose reste mystérieux et mérite qu'on s'y attarde afin d'être mieux en mesure de comprendre l'adhésion de *V. cholerae* durant l'infection de l'intestin. La stimulation de la croissance du variant rugueux A1552R en présence de PmB dans l'environnement anaérobie reste un mystère complet pour lequel je n'ai toujours pas d'hypothèses. Le projet pourrait également continuer en poussant davantage la caractérisation de la résistance à la PmB1600 à l'aide de plus puissant microscope et de techniques de pointes. Bien que la résistance aux agents antimicrobiens soit connue depuis longtemps, les bactéries restent mystérieuses encore aujourd'hui et nous reconnaissons que nous avons énormément de chemin à faire pour mieux les connaître. Cependant, j'espère qu'il y aura toujours de la place dans notre science pour de plus petits projets de passion qui ose laisser encore quelques questions en suspens...

Références bibliographiques

- 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. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002210>
- Alam, M., Sultana, M., Nair, G. B., Siddique, A. K., Hasan, N. A., Sack, R. B., Sack, D. A., Ahmed, K. U., Sadique, A., Watanabe, H., Grim, C. J., Huq, A., & Colwell, R. R. (2007). Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(45), 17801-17806. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.0705599104>
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565-1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Ali, A., Rashid, M. H., & Karaolis, D. K. (2002). High-frequency rugose exopolysaccharide production by *Vibrio cholerae*. *Appl Environ Microbiol*, 68(11), 5773-5778. <https://doi.org/10.1128/aem.68.11.5773-5778.2002>
- Ali, M., Emch, M., Park, J. K., Yunus, M., & Clemens, J. (2011). Natural cholera infection-derived immunity in an endemic setting. *J Infect Dis*, 204(6), 912-918. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir416>
- Allué-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). <https://doi.org/10.1128/genomeA.00098-18>
- Almagro-Moreno, S., Pruss, K., & Taylor, R. K. (2015). Intestinal Colonization Dynamics of *Vibrio cholerae*. *PLoS Pathog*, 11(5), e1004787. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004787>
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*, 1, 134. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>
- Ayoub Moubareck, C. (2020). Polymyxins and Bacterial Membranes: A Review of Antibacterial Activity and Mechanisms of Resistance. *Membranes*, 10(8), 181. <https://www.mdpi.com/2077-0375/10/8/181>
- Azman, A. S., Rudolph, K. E., Cummings, D. A., & Lessler, J. (2013). The incubation period of cholera: a systematic review. *J Infect*, 66(5), 432-438. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2012.11.013>
- Bag, S., Ghosh, T. S., Banerjee, S., Mehta, O., Verma, J., Dayal, M., Desigamani, A., Kumar, P., Saha, B., Kedia, S., Ahuja, V., Ramamurthy, T., & Das, B. (2019). Molecular Insights into Antimicrobial Resistance Traits of Commensal Human Gut Microbiota. *Microbial Ecology*, 77(2), 546-557. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1228-7>
- Balbi, H. J. (2004). Chloramphenicol: a review. *Pediatr Rev*, 25(8), 284-288. <https://doi.org/10.1542/pir.25-8-284>
- Band, V. I., & Weiss, D. S. (2015). Mechanisms of Antimicrobial Peptide Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Antibiotics (Basel)*, 4(1), 18-41. <https://doi.org/10.3390/antibiotics4010018>
- Barua, D. (1992). History of Cholera. In D. Barua & W. B. Greenough (Eds.), *Cholera* (pp. 1-36). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9688-9_1
- Batoni, G., Maisetta, G., & Esin, S. (2016). Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* -

- Batoni, G., Maisetta, G., Lisa Brancatisano, F., Esin, S., & Campa, M. (2011). Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Current medicinal chemistry*, 18(2), 256-279.
- Bechinger, B., & Gorr, S. U. (2017). Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J Dent Res*, 96(3), 254-260. <https://doi.org/10.1177/0022034516679973>
- 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. <https://doi.org/10.1126/science.1222981>
- Beyhan, S., & Yildiz, F. H. (2007). Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signalling pathway. *Molecular Microbiology*, 63(4), 995-1007. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05568.x>
- Bin Hafeez, A., Jiang, X., Bergen, P. J., & Zhu, Y. (2021). Antimicrobial Peptides: An Update on Classifications and Databases. *Int J Mol Sci*, 22(21). <https://doi.org/10.3390/ijms22211691>
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., & Zychlinsky, A. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535.
- Brown, P., & Dawson, M. J. (2015). Chapter Three - A Perspective on the Next Generation of Antibacterial Agents Derived by Manipulation of Natural Products. In G. Lawton & D. R. Witty (Eds.), *Progress in Medicinal Chemistry* (Vol. 54, pp. 135-184). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/bs.pmch.2014.10.001>
- Bueno, E., Pinedo, V., & Cava, F. (2020). Adaptation of *Vibrio cholerae* to Hypoxic Environments [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00739>
- Bueno, E., Sit, B., Waldor, M. K., & Cava, F. (2020). Genetic Dissection of the Fermentative and Respiratory Contributions Supporting *Vibrio cholerae* Hypoxic Growth. *Journal of bacteriology*, 202(24), 10.1128/jb.00243-00220. <https://doi.org/doi:10.1128/jb.00243-20>
- Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(8). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025247>
- Caigoy, J. C., Shimamoto, T., Mukhopadhyay, A. K., Shinoda, S., & Shimamoto, T. (2022). Sequence Polymorphisms in *Vibrio cholerae* HapR Affect Biofilm Formation under Aerobic and Anaerobic Conditions. *Applied and environmental microbiology*, 88(17), e01044-01022. <https://doi.org/doi:10.1128/aem.01044-22>
- Cambau, E., & Guillard, T. (2012). Antimicrobials that affect the synthesis and conformation of nucleic acids. *Rev Sci Tech*, 31(1), 77-87, 65-76. <https://doi.org/10.20506/rst.31.1.2102>
- Casey, S., Shafer, W., & Spitznagel, J. (1985). Anaerobiosis increases resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to O₂-independent antimicrobial proteins from human polymorphonuclear granulocytes. *Infection and Immunity*, 47, 401-407. <https://doi.org/10.1128/IAI.47.2.401-407.1985>
- Chen, P., & Shakhnovich, E. I. (2010). Thermal adaptation of viruses and bacteria. *Biophysical journal*, 98(7), 1109-1118.

- Chew, S. C., & Yang, L. (2016). Biofilms. In B. Caballero, P. M. Finglas, & F. Toldrá (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 407-415). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00069-6>
- Chiang, W.-C., Nilsson, M., Jensen, P. Ø., Høiby, N., Nielsen, T. E., Givskov, M., & Tolker-Nielsen, T. (2013). Extracellular DNA Shields against Aminoglycosides in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(5), 2352-2361. <https://doi.org/doi:10.1128/aac.00001-13>
- Cho, H., Jönsson, H., Campbell, K., Melke, P., Williams, J. W., Jedynek, B., Stevens, A. M., Groisman, A., & Levchenko, A. (2007). Self-Organization in High-Density Bacterial Colonies: Efficient Crowd Control. *PLOS Biology*, 5(11), e302. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050302>
- 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. <https://doi.org/10.1128/mnbr.65.2.232-260.2001>
- Clemens, J. D., Nair, G. B., Ahmed, T., Qadri, F., & Holmgren, J. (2017). Cholera. *Lancet*, 390(10101), 1539-1549. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(17\)30559-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(17)30559-7)
- Cohen, B. E. (2014). Functional linkage between genes that regulate osmotic stress responses and multidrug resistance transporters: challenges and opportunities for antibiotic discovery. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(2), 640-646. <https://doi.org/10.1128/aac.02095-13>
- Cole, J., & Nizet, V. (2016). *Bacterial evasion of host antimicrobial peptide defenses. Microbiol Spectr* 4. doi: 10.1128/microbiolspec.
- Colwell, R. R. (1996). Global Climate and Infectious Disease: The Cholera Paradigm*. *Science*, 274(5295), 2025-2031. <https://doi.org/doi:10.1126/science.274.5295.2025>
- Cormack, B. P., Valdivia, R. H., & Falkow, S. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 173(1 Spec No), 33-38. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00685-0](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00685-0)
- Corona, F., & Martinez, J. L. (2013). Phenotypic resistance to antibiotics. *Antibiotics*, 2(2), 237-255.
- Correia, S., Poeta, P., Hébraud, M., Capelo, J. L., & Igrejas, G. (2017). Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol*, 66(5), 551-559. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000475>
- Cottingham, K. L., Chiavelli, D. A., & Taylor, R. K. (2003). Environmental Microbe and Human Pathogen: The Ecology and Microbiology of *Vibrio cholerae*. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 1(2), 80-86. <https://doi.org/10.2307/3868034>
- Cruz-Loya, M., Tekin, E., Kang, T. M., Cardona, N., Lozano-Huntelman, N., Rodriguez-Verdugo, A., Savage, V. M., & Yeh, P. J. (2021). Antibiotics Shift the Temperature Response Curve of *Escherichia coli* Growth. *mSystems*, 6(4), 10.1128/msystems.00228-00221. <https://doi.org/doi:10.1128/msystems.00228-21>
- Cvjetanovic, B., & Barua, D. (1972). The seventh pandemic of cholera. *Nature*, 239(5368), 137-138. <https://doi.org/10.1038/239137a0>
- Daep, C. A., Novak, E. A., Lamont, R. J., & Demuth, D. R. (2010). Selective substitution of amino acids limits proteolytic cleavage and improves the bioactivity of an anti-biofilm peptide that targets the periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*. *Peptides*, 31(12), 2173-2178.

- Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 280-295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
- 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, A83-A92. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.031>
- Das, T., Sehar, S., & Manefield, M. (2013). The roles of extracellular DNA in the structural integrity of extracellular polymeric substance and bacterial biofilm development. *Environmental Microbiology Reports*, 5(6), 778-786. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1758-2229.12085>
- Dasopang, E. S., Hasanah, F., Bakri, T. K., & Isma, M. (2019). Comparative Effectiveness Study of Chloramphenicol and Ceftriaxone in the Treatment of Typhoid Fever in Children Admitted to Putri Hijau Kesdam I/Bb Hospital Medan. *Open Access Maced J Med Sci*, 7(22), 3847-3851. <https://doi.org/10.3889/oamjms.2019.517>
- De Pascale, G., & Wright, G. D. (2010). Antibiotic Resistance by Enzyme Inactivation: From Mechanisms to Solutions. *ChemBioChem*, 11(10), 1325-1334. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cbic.201000067>
- Deen, J., Mengel, M. A., & Clemens, J. D. (2020). Epidemiology of cholera. *Vaccine*, 38 Suppl 1, A31-a40. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.07.078>
- DeMars, Z., Biswas, S., Amachawadi, R. G., Renter, D. G., & Volkova, V. V. (2016). Antimicrobial Susceptibility of Enteric Gram Negative Facultative Anaerobe Bacilli in Aerobic versus Anaerobic Conditions. *PLoS One*, 11(5), e0155599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155599>
- Dinos, G. P. (2017). The macrolide antibiotic renaissance. *Br J Pharmacol*, 174(18), 2967-2983. <https://doi.org/10.1111/bph.13936>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 8(9), 881-890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Dunn, A. K. (2012). Chapter Two - *Vibrio fischeri* Metabolism: Symbiosis and Beyond. In R. K. Poole (Ed.), *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 61, pp. 37-68). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394423-8.00002-0>
- Duperthuy, M., Sjöström, 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 Pathogens*, 9(10), e1003620.
- Escudero, J. A., & Mazel, D. (2017). Genomic plasticity of *Vibrio cholerae*. *Int Microbiol*, 20, 138-148.
- Fleming, A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *British journal of experimental pathology*, 10(3), 226.
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol*, 8(9), 623-633. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>
- Fong, J. C., 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*, 156(Pt 9), 2757.

- Fong, J. C., & Yildiz, F. H. (2007). The *rbmBCDEF* gene cluster modulates development of rugose colony morphology and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology*, 189(6), 2319-2330.
- Fong, J. N. C., & Yildiz, F. H. (2015). Biofilm Matrix Proteins. *Microbiol Spectr*, 3(2). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0004-2014>
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., & Nielsen, P. H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research*, 30(8), 1749-1758. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354\(95\)00323-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354(95)00323-1)
- Fu, X., Liang, W., Du, P., Yan, M., & Kan, B. (2014). Transcript changes in *Vibrio cholerae* in response to salt stress. *Gut Pathogens*, 6(1), 47. <https://doi.org/10.1186/s13099-014-0047-8>
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology*, 13(1), 34-40.
- Gaillard, T., Madamet, M., & Pradines, B. (2015). Tetracyclines in malaria. *Malar J*, 14, 445. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0980-0>
- Gallego-Hernandez, A. L., DePas, W. H., Park, J. H., Teschler, J. K., Hartmann, R., Jeckel, H., Drescher, K., Beyhan, S., Newman, D. K., & Yildiz, F. H. (2020). Upregulation of virulence genes promotes *Vibrio cholerae* biofilm hyperinfectivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(20), 11010-11017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1916571117>
- Garneau-Tsodikova, S., & Labby, K. J. (2016). Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *Medchemcomm*, 7(1), 11-27. <https://doi.org/10.1039/c5md00344j>
- Giacomucci, S., Cros, C. D.-N., 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.
- Giacomucci, S., Mathieu-Denoncourt, A., Vincent, A. T., Jannadi, H., & Duperthuy, M. (2022). Experimental evolution of *Vibrio cholerae* identifies hypervesiculation as a way to increase motility in the presence of polymyxin B [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.932165>
- Guardabassi, L., & Courvalin, P. (2005). Modes of Antimicrobial Action and Mechanisms of Bacterial Resistance. In *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin* (pp. 1-18). <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/9781555817534.ch1>
- Guentzel, M., & Berry, L. (1975). Motility as a virulence factor for *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity*, 11(5), 890-897.
- Halliday, S. (2001). Death and miasma in Victorian London: an obstinate belief. *Bmj*, 323(7327), 1469-1471. <https://doi.org/10.1136/bmj.323.7327.1469>
- Harris, J. B. (2018). Cholera: Immunity and Prospects in Vaccine Development. *J Infect Dis*, 218(suppl_3), S141-s146. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy414>
- Hartley, D. M., Morris, J. G., Jr., & Smith, D. L. (2006). Hyperinfectivity: a critical element in the ability of *V. cholerae* to cause epidemics? *PLoS Med*, 3(1), e7. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030007>
- Hartmann, G., Behr, W., Beissner, K.-A., Honikel, K., & Sippel, A. (1968). Antibiotics as Inhibitors of Nucleic Acid and Protein Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 7(9), 693-701. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/anie.196806931>

- Hay, A. J., & Zhu, J. (2015). Host intestinal signal-promoted biofilm dispersal induces *Vibrio cholerae* colonization. *Infect Immun*, 83(1), 317-323. <https://doi.org/10.1128/iai.02617-14>
- Henderson, J. C., Fage, C. D., Cannon, J. R., Brodbelt, J. S., Keatinge-Clay, A. T., & Trent, M. S. (2014). Antimicrobial peptide resistance of *Vibrio cholerae* results from an LPS modification pathway related to nonribosomal peptide synthetases. *ACS Chem Biol*, 9(10), 2382-2392. <https://doi.org/10.1021/cb500438x>
- Henderson, J. C., Herrera, C. M., & Trent, M. S. (2017). *AlmG*, responsible for polymyxin resistance in pandemic *Vibrio cholerae*, is a glycytransferase distantly related to lipid A late acyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, 292(51), 21205-21215.
- Høiby, N. (2021). Pandemics: past, present, future: That is like choosing between cholera and plague. *Apmis*, 129(7), 352-371. <https://doi.org/10.1111/apm.13098>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.10.015>
- Hood, M., & Winter, P. (1997). Attachment of *Vibrio cholerae* under various environmental conditions and to selected substrates. *FEMS Microbiology Ecology*, 22(3), 215-223.
- Hornick, R. B., Music, S. I., Wenzel, R., Cash, R., Libonati, J. P., Snyder, M. J., & Woodward, T. E. (1971). The Broad Street pump revisited: response of volunteers to ingested cholera vibrios. *Bull N Y Acad Med*, 47(10), 1181-1191.
- Howard-Jones, N. (1974). Cholera nomenclature and nosology: a historical note. *Bulletin of the World Health Organization*, 51(3), 317.
- Hsiao, A., & Zhu, J. (2020). Pathogenicity and virulence regulation of *Vibrio cholerae* at the interface of host-gut microbiome interactions. *Virulence*, 11(1), 1582-1599. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1845039>
- Huan, Y., Kong, Q., Mou, H., & Yi, H. (2020). Antimicrobial Peptides: Classification, Design, Application and Research Progress in Multiple Fields. *Front Microbiol*, 11, 582779. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Hudzicki, J. (2009). Kirby-Bauer disk diffusion susceptibility test protocol. *American society for microbiology*, 15, 55-63.
- Hung, D. T., Zhu, J., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2006). Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 59(1), 193-201.
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, 51, 72-80. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>
- Islam, M. S., Drasar, B. S., & Sack, R. B. (1994). The aquatic flora and fauna as reservoirs of *Vibrio cholerae*: a review. *J Diarrhoeal Dis Res*, 12(2), 87-96.
- 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*. *Journal of bacteriology*, 196(24), 4245-4252.
- Jurtshuk, P. (1996). Bacterial metabolism. *Medical microbiology*, 4.
- Kaneko, T., & Colwell, R. R. (1975). Adsorption of *Vibrio parahaemolyticus* onto chitin and copepods. *Appl Microbiol*, 29(2), 269-274. <https://doi.org/10.1128/am.29.2.269-274.1975>

- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm Dispersal: Mechanisms, Clinical Implications, and Potential Therapeutic Uses. *Journal of Dental Research*, 89(3), 205-218. <https://doi.org/10.1177/0022034509359403>
- Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 33(3), 300-305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15
- 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. *Journal of Biological Chemistry*, 294(40), 14499-14511.
- Kim, J. H., Lee, J., Hong, S., Lee, S., Na, H. Y., Jeong, Y. I., Choi, E. J., Kim, J., Kawk, H. S., & Cho, E. (2018). Cholera Outbreak due to Raw Seafood Consumption in South Korea, 2016. *Am J Trop Med Hyg*, 99(1), 168-170. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0646>
- Kingsley, D. H. (2014). SHELLFISH (MOLLUSCS AND CRUSTACEA) | Shellfish Contamination and Spoilage. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 389-396). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00306-2>
- Koprivnjak, T., & Peschel, A. (2011). Bacterial resistance mechanisms against host defense peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(13), 2243-2254. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0716-4>
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3(4), a010306. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306>
- Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a027029>
- Kuhlmann, F. M., Santhanam, S., Kumar, P., Luo, Q., Ciorba, M. A., & Fleckenstein, J. M. (2016). Blood Group O-Dependent Cellular Responses to Cholera Toxin: Parallel Clinical and Epidemiological Links to Severe Cholera. *Am J Trop Med Hyg*, 95(2), 440-443. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0161>
- Kumar, P., Kizhakkedathu, J. N., & Straus, S. K. (2018). Antimicrobial peptides: diversity, mechanism of action and strategies to improve the activity and biocompatibility in vivo. *Biomolecules*, 8(1), 4.
- Lambert, P. A., Allison, D. G., & Gilbert, P. (2002). 27 - Antibiotics that Act on the Cell Wall and Membrane. In M. Sussman (Ed.), *Molecular Medical Microbiology* (pp. 591-598). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012677530-3/50246-4>
- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., & Larson, E. L. (2012). A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Rep*, 127(1), 4-22. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>
- Latasa, C., Solano, C., Penadés, J. R., & Lasa, I. (2006). Biofilm-associated proteins. *Comptes rendus biologies*, 329(11), 849-857.
- Lee, K. M., Park, Y., Bari, W., Yoon, M. Y., Go, J., Kim, S. C., Lee, H. I., & Yoon, S. S. (2012). Activation of cholera toxin production by anaerobic respiration of trimethylamine N-oxide in *Vibrio cholerae*. *J Biol Chem*, 287(47), 39742-39752. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.394932>

- Lekshmi, N., Joseph, I., Ramamurthy, T., & Thomas, S. (2018). Changing facades of *Vibrio cholerae*: An enigma in the epidemiology of cholera. *Indian J Med Res*, 147(2), 133-141. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_280_17
- Lewis, K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 999-1007.
- Li, Y., Yan, J., Guo, X., Wang, X., Liu, F., & Cao, B. (2022). The global regulators *ArcA* and *CytR* collaboratively modulate *Vibrio cholerae* motility. *BMC Microbiology*, 22(1), 22. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02435-y>
- Li, Z., & Velkov, T. (2019). Polymyxins: mode of action. *Polymyxin Antibiotics: From Laboratory Bench to Bedside*, 37-54.
- Lippi, D., & Gotuzzo, E. (2014). The greatest steps towards the discovery of *Vibrio cholerae*. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(3), 191-195. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1469-0691.12390>
- Lippi, D., Gotuzzo, E., & Caini, S. (2016). Cholera. *Microbiology Spectrum*, 4(4), 4.4.06. <https://doi.org/doi:10.1128/microbiolspec.PoH-0012-2015>
- Liu, Z., Stirling, F. R., & Zhu, J. (2007). Temporal quorum-sensing induction regulates *Vibrio cholerae* biofilm architecture. *Infection and Immunity*, 75(1), 122-126.
- Llor, C., & Bjerrum, L. (2014). Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem. *Ther Adv Drug Saf*, 5(6), 229-241. <https://doi.org/10.1177/2042098614554919>
- Longley, D., & Johnston, P. (2005). Molecular mechanisms of drug resistance. *The Journal of Pathology*, 205(2), 275-292. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/path.1706>
- Lutz, C., Erken, M., Noorian, P., Sun, S., & McDougald, D. (2013). Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae* [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00375>
- MacPherson, J. (1872). *Annals of Cholera: from the earliest periods to the year 1817*. Ranken.
- Mah, T.-F. (2012). Biofilm-specific antibiotic resistance. *Future Microbiology*, 7(9), 1061-1072. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.76>
- Mahlapuu, M., Håkansson, J., Ringstad, L., & Björn, C. (2016). Antimicrobial Peptides: An Emerging Category of Therapeutic Agents. *Front Cell Infect Microbiol*, 6, 194. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00194>
- Mandal, S., Mandal, M. D., & Pal, N. K. (2011). Cholera: a great global concern. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4(7), 573-580.
- Manning, A. J., & Kuehn, M. J. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC Microbiol*, 11, 258. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>
- Mathieu-Denoncourt, A., & Duperthuy, M. (2022). Secretome analysis reveals a role of subinhibitory concentrations of polymyxin B in the survival of *Vibrio cholerae* mediated by the type VI secretion system. *Environmental Microbiology*, 24(3), 1133-1149.
- Mathur, J., & Waldor, M. K. (2004). The *Vibrio cholerae* *ToxR*-regulated porin *OmpU* confers resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun*, 72(6), 3577-3583. <https://doi.org/10.1128/iai.72.6.3577-3583.2004>
- McBroom, A. J., & Kuehn, M. J. (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Mol Microbiol*, 63(2), 545-558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x>

- McCoy, L. S., Xie, Y., & Tor, Y. (2011). Antibiotics that target protein synthesis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2(2), 209-232. <https://doi.org/10.1002/wrna.60>
- McEwen, S. A., & Fedorka-Cray, P. J. (2002). Antimicrobial use and resistance in animals. *Clin Infect Dis*, 34 Suppl 3, S93-s106. <https://doi.org/10.1086/340246>
- Meibom, K. L., Blokesch, M., Dolganov, N. A., Wu, C. Y., & Schoolnik, G. K. (2005). Chitin induces natural competence in *Vibrio cholerae*. *Science*, 310(5755), 1824-1827. <https://doi.org/10.1126/science.1120096>
- Merrell, D. S., Butler, S. M., Qadri, F., Dolganov, N. A., Alam, A., Cohen, M. B., Calderwood, S. B., Schoolnik, G. K., & Camilli, A. (2002). Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. *Nature*, 417(6889), 642-645.
- Miller, C. J., Drasar, B. S., & Feachem, R. G. (1984). Response of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 to physico-chemical stresses in aquatic environments. *Epidemiology & Infection*, 93(3), 475-495.
- Mingeot-Leclercq, M. P., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: activity and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(4), 727-737. <https://doi.org/10.1128/aac.43.4.727>
- Mizunoe, Y., Wai, S. N., Takade, A., & Yoshida, S. I. (1999). Isolation and characterization of rugose form of *Vibrio cholerae* O139 strain MO10. *Infect Immun*, 67(2), 958-963. <https://doi.org/10.1128/iai.67.2.958-963.1999>
- Mohapatra, S. S., Dwibedy, S. K., & Padhy, I. (2021). Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *J Biosci*, 46(3). <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00209-8>
- Moorthy, S., & Watnick, P. I. (2005). Identification of novel stage-specific genetic requirements through whole genome transcription profiling of *Vibrio cholerae* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 57(6), 1623-1635.
- Mortensen, N. P., Fowlkes, J. D., Sullivan, C. J., Allison, D. P., Larsen, N. B., Molin, S., & Doktycz, M. J. (2009). Effects of colistin on surface ultrastructure and nanomechanics of *Pseudomonas aeruginosa* cells. *Langmuir*, 25(6), 3728-3733.
- Mukherjee, S., & Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 371-382. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0186-5>
- Mukhopadhyay, A. K., Takeda, Y., & Balakrish Nair, G. (2014). Cholera outbreaks in the El Tor biotype era and the impact of the new El Tor variants. *Cholera Outbreaks*, 17-47.
- Muras, A., Mallo, N., Otero-Casal, P., Pose-Rodríguez, J. M., & Otero, A. (2022). Quorum sensing systems as a new target to prevent biofilm-related oral diseases. *Oral Diseases*, 28(2), 307-313. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/odi.13689>
- Mutreja, A., Kim, D. W., Thomson, N. R., Connor, T. R., Lee, J. H., Kariuki, S., Croucher, N. J., Choi, S. Y., Harris, S. R., Lebens, M., Niyogi, S. K., Kim, E. J., Ramamurthy, T., Chun, J., Wood, J. L. N., Clemens, J. D., Czerkinsky, C., Nair, G. B., Holmgren, J., . . . Dougan, G. (2011). Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*, 477(7365), 462-465. <https://doi.org/10.1038/nature10392>
- Nakkazi, E. (2023). Cholera outbreak in Africa. *The Lancet Infectious Diseases*, 23(4), 411. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(23\)00149-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00149-4)

- Nawrocki, K. L., Crispell, E. K., & McBride, S. M. (2014). Antimicrobial Peptide Resistance Mechanisms of Gram-Positive Bacteria. *Antibiotics (Basel)*, 3(4), 461-492. <https://doi.org/10.3390/antibiotics3040461>
- Nelson, E. J., Harris, J. B., Morris, J. G., Jr., Calderwood, S. B., & Camilli, A. (2009). Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic. *Nat Rev Microbiol*, 7(10), 693-702. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2204>
- Netter, Z., Dunham, D. T., & Seed, K. (2023). Adaptation to bile and anaerobicity limits *Vibrio cholerae* phage adsorption. *bioRxiv*, 2023.2004. 2022.537938.
- Nikolaidis, I., Favini-Stabile, S., & Dessen, A. (2014). Resistance to antibiotics targeted to the bacterial cell wall. *Protein science*, 23(3), 243-259.
- Nilsson, L., Oliver, J. D., & Kjelleberg, S. (1991). Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J Bacteriol*, 173(16), 5054-5059. <https://doi.org/10.1128/jb.173.16.5054-5059.1991>
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol*, 54, 49-79. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.49>
- Ocasio, D. V. (2023). Cholera Outbreak—Haiti, September 2022–January 2023. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, 72.
- Orata, F. D., Keim, P. S., & Boucher, Y. (2014). The 2010 Cholera Outbreak in Haiti: How Science Solved a Controversy. *PLOS Pathogens*, 10(4), e1003967. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003967>
- Pankey, G. A., & Sabath, L. D. (2004). Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, 38(6), 864-870. <https://doi.org/10.1086/381972>
- Penesyan, A., Paulsen, I. T., Gillings, M. R., Kjelleberg, S., & Manefield, M. J. (2020). Secondary Effects of Antibiotics on Microbial Biofilms. *Front Microbiol*, 11, 2109. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02109>
- Rabbani, G., & Greenough III, W. (1999). Food as a vehicle of transmission of cholera. *Journal of diarrhoeal diseases research*, 1-9.
- Rashid, M. H., Rajanna, C., Ali, A., & Karaolis, D. K. (2003). Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol Lett*, 227(1), 113-119. [https://doi.org/10.1016/s0378-1097\(03\)00657-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1097(03)00657-8)
- Rasmussen, B., Bush, K., & Tally, F. (1997). Antimicrobial resistance in anaerobes. *Clinical Infectious Diseases*, 24(Supplement_1), S110-S120.
- Rather, M. A., Gupta, K., Bardhan, P., Borah, M., Sarkar, A., Eldiehy, K. S. H., Bhuyan, S., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: A matter of grave concern for human health and food industry. *Journal of Basic Microbiology*, 61(5), 380-395. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jobm.202000678>
- Rendueles, O., & Ghigo, J.-M. (2015). Mechanisms of Competition in Biofilm Communities. *Microbiology Spectrum*, 3(3), 10.1128/microbiolspec.mb-0009-2014. <https://doi.org/doi:10.1128/microbiolspec.mb-0009-2014>
- Richardson, L. A. (2017). Understanding and overcoming antibiotic resistance. *PLOS Biology*, 15(8), e2003775. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003775>

- Richterman, A., Sainvilien, D. R., Eberly, L., & Ivers, L. C. (2018). Individual and household risk factors for symptomatic cholera infection: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of infectious diseases*, 218(suppl_3), S154-S164.
- Robinson, K., Deng, Z., Hou, Y., & Zhang, G. (2015). Regulation of the intestinal barrier function by host defense peptides. *Frontiers in veterinary science*, 2, 57.
- Rubin, D. H., Zingl, F. G., Leitner, D. R., Ternier, R., Compere, V., Marseille, S., Slater, D., Harris, J. B., Chowdhury, F., & Qadri, F. (2022). Reemergence of cholera in Haiti. *New England Journal of Medicine*, 387(25), 2387-2389.
- Saar-Dover, R., Bitler, A., Nezer, R., Shmuel-Galia, L., Firon, A., Shimoni, E., Trieu-Cuot, P., & Shai, Y. (2012). D-alanylation of lipoteichoic acids confers resistance to cationic peptides in group B streptococcus by increasing the cell wall density. *PLoS Pathog*, 8(9), e1002891. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002891>
- Sack, D. A., Sack, R. B., Nair, G. B., & Siddique, A. K. (2004). Cholera. *Lancet*, 363(9404), 223-233. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)15328-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)15328-7)
- 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.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A., & Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 234-258. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x>
- Seyfi, R., Kahaki, F. A., Ebrahimi, T., Montazersaheb, S., Eyvazi, S., Babaeipour, V., & Tarhriz, V. (2020). Antimicrobial peptides (AMPs): roles, functions and mechanism of action. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, 1451-1463.
- Shannon, K., Hast, M., Azman, A. S., Legros, D., McKay, H., & Lessler, J. (2019). Cholera prevention and control in refugee settings: Successes and continued challenges. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(6), e0007347. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007347>
- Silva, A. J., & Benitez, J. A. (2016). *Vibrio cholerae* Biofilms and Cholera Pathogenesis. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(2), e0004330. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004330>
- Silva, A. J., Pham, K., & Benitez, J. A. (2003). Haemagglutinin/protease expression and mucin gel penetration in El Tor biotype *Vibrio cholerae*. *Microbiology*, 149(7), 1883-1891.
- Silver, L. L. (2011). Challenges of antibacterial discovery. *Clin Microbiol Rev*, 24(1), 71-109. <https://doi.org/10.1128/cmr.00030-10>
- Singh, A., & Barnard, T. G. (2016). Surviving the acid barrier: responses of pathogenic *Vibrio cholerae* to simulated gastric fluid. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100(2), 815-824. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7067-2>
- Singleton, F., Attwell, R., Jangi, S., & Colwell, R. (1982). Effects of temperature and salinity on *Vibrio cholerae* growth. *Applied and environmental microbiology*, 44(5), 1047-1058.
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1512424112>

- Song, K. R., Lim, J. K., Park, S. E., Saluja, T., Cho, S.-I., Wartel, T. A., & Lynch, J. (2021). Oral Cholera Vaccine Efficacy and Effectiveness. *Vaccines*, 9(12), 1482. <https://www.mdpi.com/2076-393X/9/12/1482>
- Stapleton, P. D., & Taylor, P. W. (2002). Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulation. *Science progress*, 85(1), 57-72.
- Sutherland, I. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology (Reading)*, 147(Pt 1), 3-9. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-1-3>
- Tamayo, R., Patimalla, B., & Camilli, A. (2010). Growth in a biofilm induces a hyperinfectious phenotype in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*, 78(8), 3560-3569. <https://doi.org/10.1128/iai.00048-10>
- Teschler, J. K., Nadell, C. D., Drescher, K., & Yildiz, F. H. (2022). Mechanisms Underlying *Vibrio cholerae* Biofilm Formation and Dispersion. *Annu Rev Microbiol*, 76, 503-532. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-111021-053553>
- Teschler, J. K., Zamorano-Sánchez, 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. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3433>
- Tetz, G. V., Artemenko, N. K., & Tetz, V. V. (2009). Effect of DNase and Antibiotics on Biofilm Characteristics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(3), 1204-1209. <https://doi.org/doi:10.1128/AAC.00471-08>
- Townsley, L., Sison Mangus, M. P., Mehic, S., & Yildiz, F. H. (2016). Response of *Vibrio cholerae* to Low-Temperature Shifts: CspV Regulation of Type VI Secretion, Biofilm Formation, and Association with Zooplankton. *Appl Environ Microbiol*, 82(14), 4441-4452. <https://doi.org/10.1128/aem.00807-16>
- 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.
- Trucksis, M., Michalski, J., Deng, Y. K., & Kaper, J. B. (1998). The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(24), 14464-14469. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.24.14464>
- Tulchinsky, T. (2018). John Snow, Cholera, the Broad Street Pump; Waterborne Diseases Then and Now. In (pp. 77-99). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804571-8.00017-2>
- Urban-Chmiel, R., Marek, A., Stępień-Pyśniak, D., Wiczorek, K., Dec, M., Nowaczek, A., & Osek, J. (2022). Antibiotic Resistance in Bacteria-A Review. *Antibiotics (Basel)*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081079>
- 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. <https://doi.org/10.1038/ncomms5913>
- Valcin, C. L., Severe, K., Riche, C. T., Anglade, B. S., Moise, C. G., Woodworth, M., Charles, M., Li, Z., Joseph, P., Pape, J. W., & Wright, P. F. (2013). Predictors of disease severity in patients admitted to a cholera treatment center in urban Haiti. *Am J Trop Med Hyg*, 89(4), 625-632. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0170>
- Van Loon, F., Clemens, J., Shahrier, M., Sack, D., Stefhensen, C., Khan, M., Rabbani, G., Rao, M., & Banik, A. (1990). Low gastric acid as a rise factor for cholera transmission: application of a

- new non-invasive gastric acid field test. *Journal of Clinical Epidemiology*, 43(12), 1361-1367.
- Vanden Broeck, D., Horvath, C., & De Wolf, M. J. S. (2007). *Vibrio cholerae*: Cholera toxin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(10), 1771-1775. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.07.005>
- Vázquez-Laslop, N., & Mankin, A. S. (2018). How Macrolide Antibiotics Work. *Trends in Biochemical Sciences*, 43(9), 668-684. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.tibs.2018.06.011>
- Velasquez, M. T., Ramezani, A., Manal, A., & Raj, D. S. (2016). Trimethylamine N-Oxide: The Good, the Bad and the Unknown. *Toxins (Basel)*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/toxins8110326>
- Verma, J., Bag, S., Saha, B., Kumar, P., Ghosh, T. S., Dayal, M., Senapati, T., Mehra, S., Dey, P., Desigamani, A., Kumar, D., Rana, P., Kumar, B., Maiti, T. K., Sharma, N. C., Bhadra, R. K., Mutreja, A., Nair, G. B., Ramamurthy, T., & Das, B. (2019). Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(13), 6226-6231. <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.1900141116>
- Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149-167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Waldor, M. K., & Mekalanos, J. J. (1996). Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*, 272(5270), 1910-1914.
- Wang, H., Wu, J. H., Ayala, J. C., Benitez, J. A., & Silva, A. J. (2011). Interplay among cyclic diguanylate, *HapR*, and the general stress response regulator (*RpoS*) in the regulation of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease. *J Bacteriol*, 193(23), 6529-6538. <https://doi.org/10.1128/jb.05166-11>
- Weisberger, A. S., Wessler, S., & Avioli, L. V. (1969). Mechanisms of Action of Chloramphenicol. *JAMA*, 209(1), 97-103. <https://doi.org/10.1001/jama.1969.03160140053011>
- White, P. B. (1938). The rugose variant of vibrios. *Journal of Pathology and Bacteriology*, 46(1).
- World Health Organization. (2022). *Cholera*.
- World Health Organization. (2023). *Disease Outbreak News; Cholera – Global situation*.
- Wright, A. C., & Montazeri, N. (2021). Chapter 7 - Vibrios. In J. G. Morris & D. J. Vugia (Eds.), *Foodborne Infections and Intoxications (Fifth Edition)* (pp. 105-124). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819519-2.00030-X>
- Xi, D., Yang, S., Liu, Q., Li, Y., Li, Y., Yan, J., Wang, X., Ning, K., & Cao, B. (2020). The response regulator *ArcA* enhances biofilm formation in the *vpsT* manner under the anaerobic condition in *Vibrio cholerae*. *Microbial Pathogenesis*, 144, 104197. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104197>
- Yamamoto, K., Arai, H., Ishii, M., & Igarashi, Y. (2011). Trade-off between oxygen and iron acquisition in bacterial cells at the air–liquid interface. *FEMS Microbiology Ecology*, 77(1), 83-94. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01087.x>
- Yan, H., & Hancock, R. E. W. (2001). Synergistic Interactions between Mammalian Antimicrobial Defense Peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(5), 1558-1560. <https://doi.org/doi:10.1128/aac.45.5.1558-1560.2001>
- Yang, L., Liu, Y., Wu, H., Høiby, N., Molin, S., & Song, Z. j. (2011). Current understanding of multi-species biofilms. *International journal of oral science*, 3(2), 74-81.

- Yasir, M., Willcox, M. D. P., & Dutta, D. (2018). Action of Antimicrobial Peptides against Bacterial Biofilms. *Materials (Basel)*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/ma11122468>
- Yeaman, M. R., & Yount, N. Y. (2003). Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacological reviews*, 55(1), 27-55.
- 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. <https://doi.org/10.1128/jb.183.5.1716-1726.2001>
- 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4028>
- Yildiz, F. H., & Visick, K. L. (2009). *Vibrio* biofilms: so much the same yet so different. *Trends Microbiol*, 17(3), 109-118. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.12.004>
- Yu, Z., Qin, W., Lin, J., Fang, S., & Qiu, J. (2015). Antibacterial mechanisms of polymyxin and bacterial resistance. *Biomed Res Int*, 2015, 679109. <https://doi.org/10.1155/2015/679109>
- Zhang, X., Bishop, P. L., & Kupferle, M. J. (1998). Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science and Technology*, 37(4), 345-348. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00127-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00127-9)
- Zhu, J., & Mekalanos, J. J. (2003). Quorum sensing-dependent biofilms enhance colonization in *Vibrio cholerae*. *Dev Cell*, 5(4), 647-656. [https://doi.org/10.1016/s1534-5807\(03\)00295-8](https://doi.org/10.1016/s1534-5807(03)00295-8)
- Zhu, M., & Dai, X. (2020). Bacterial stress defense: the crucial role of ribosome speed. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77, 853-858.
- 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 σE . *Infect Immun*, 82(7), 2788-2801. <https://doi.org/10.1128/iai.01292-13>