

DES SOUCHES PROBIOTIQUES DE *LACTOBACILLUS* SPP. INDUISENT UNE AUGMENTATION DE LA TOLÉRANCE DE *SALMONELLA* TYPHIMURIUM À UN ANTIBIOTIQUE DE DERNIER RECOURS : L'AZITHROMYCINE.

par

Lya Blais

Mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, août 2023.

Le 24 août 2023

Le jury a accepté le mémoire de Madame Lya Blais dans sa version finale.

Membres du jury

Professeur Jean-Philippe Côté
Directeur de recherche
Département de Biologie
Université de Sherbrooke

Professeure Isabelle Laforest-Lapointe
Codirectrice de recherche
Département de Biologie
Université de Sherbrooke

Professeure Pascale B. Beaugard
Évaluatrice interne
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Professeur Sébastien Rodrigue
Président-rapporteur
Département de biologie
Université de Sherbrooke

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mon directeur de recherche Pr. Jean-Philippe Côté de m’ avoir accueillie dans son laboratoire pour débiter ce fabuleux projet. Merci de ton soutien tout au long de mon parcours, de ton écoute et de tes conseils. Je tiens également à remercier Pre. Isabelle Laforest-Lapointe pour ton attention et ta générosité tout au long de ma maîtrise. Je tiens également à remercier les membres de mon comité de conseillers, Pr. Sébastien Rodrigue et Pre. Pascale Beauregard, pour vos judicieux conseils et commentaires constructifs lors de nos différentes rencontres. Je remercie également tous les membres du laboratoire Côté pour votre soutien au travers des montagnes russes de la maîtrise. Je tiens finalement à remercier les membres de ma famille qui ont su me supporter dans les hauts et les bas de mon parcours et qui m’ ont permis de toujours voir le bon côté des choses.

Merci infiniment à tous!

SOMMAIRE

Les bactéries sont impliquées dans un grand nombre d'interactions qui peuvent se produire de façon diverse au sein de communautés complexes telles que le microbiote intestinal humain. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium est un pathogène d'origine alimentaire commun et est un bon modèle bactérien pour l'étude d'interactions inter-bactériennes pouvant se produire au sein de communautés microbiennes. Lorsqu'un traitement antibiotique est nécessaire, les infections à *S. Typhimurium* peuvent être traitées avec des antibiotiques de première ligne, soit les fluoroquinolones, ou encore avec l'antibiotique de dernier recours qu'est l'azithromycine. Dans l'étude faisant l'objet de ce mémoire, nous avons observé que lorsque *S. Typhimurium* est co-cultivée avec des souches probiotiques de *Lactobacillus* spp., un changement dans la susceptibilité du pathogène face à l'azithromycine survient. La concentration minimale inhibitrice de *S. Typhimurium* passe en effet de 2 µg/ml à 32 µg/ml. Une observation similaire a pu être faite en co-cultivant *S. Typhimurium* avec des surnageants obtenus de cultures denses des souches probiotiques de *Lactobacillus* spp. où la CMI du pathogène a augmenté à 32 ou 64 µg/ml selon la souche probiotique. Pour comprendre comment *Lactobacillus* spp. cause ce changement de susceptibilité à l'azithromycine chez *S. Typhimurium*, un criblage à haut débit a été mis en place, combinant la collection de mutants de délétions simples de *S. Typhimurium*, la SGD, avec le probiotique *L. rhamnosus*. Nos résultats ont identifié des gènes d'importance ayant un lien avec l'enveloppe bactérienne et le transport transmembranaire, ainsi qu'avec la respiration cellulaire. Aussi, l'importance d'un pH acide a été évaluée. Nous avons déterminé qu'un pH de 5.5 permettait d'observer le changement de concentration minimale inhibitrice de *S. Typhimurium* face à l'azithromycine. Suite à un second criblage à haut débit, des gènes différents de ceux identifiés lors du premier criblage ont été identifiés, suggérant un possible mécanisme de résistance face à l'azithromycine chez *S. Typhimurium* induit de façon unique par les souches probiotiques de *Lactobacillus*.

Mots clés : *Salmonella* Typhimurium, *Lactobacillus*, azithromycine, résistance aux antibiotiques, probiotiques, criblages génomiques, génomique fonctionnelle.

TABLE DES MATIÈRES

1.1 La problématique de la résistance aux antibiotiques	1
1.1.1 L'apparition des résistances	1
1.1.2 Les modes de propagation de la résistance	2
1.1.2.1 Les mutations spontanées	3
1.1.2.2 Les éléments génétiques mobiles	3
1.1.2.3 Le rôle de l'environnement dans la propagation	4
1.1.3 Les différentes classes d'antibiotiques.....	5
1.1.3.1 Cible 1 : la synthèse de la paroi cellulaire.....	5
1.1.3.2 Cible 2 : la synthèse protéique	7
1.1.3.3 Cible 3 : la réplication de l'ADN	8
1.1.3.4 Les autres classes d'antibiotiques	8
1.1.4 Le processus de développement de nouveaux traitements antibiotiques	9
1.2 Un environnement complexe : le microbiote intestinal humain	10
1.2.1 Le microbiote	10
1.2.2 La résistance face aux envahisseurs	12
1.2.3 Les probiotiques : <i>Lactobacillus</i> spp.....	14
1.3 Les interactions bactériennes.....	15
1.3.1 Les interactions en dysbiose.....	15
1.3.2 Les interactions via les systèmes de sécrétion	16
1.3.3 Les interactions entre <i>Staphylococcus aureus</i> et <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.4 Le pathogène d'intérêt : <i>Salmonella</i> Typhimurium	17
1.4.1 Mais qui est <i>Salmonella</i> ?	17
1.4.2 <i>Salmonella</i> dans le monde.....	18
1.4.3 Les infections causées par <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	19
1.4.3.1 L'azithromycine	20
1.4.4 Le criblage à haut débit	21
1.5 Objectifs du projet	22

1.5.1 Objectif I	23
1.5.2 Objectif II	23
CHAPITRE 2 Probiotic <i>Lactobacillus</i> strains decrease the susceptibility of <i>Salmonella</i>	
Typhimurium to the last resort antibiotic azithromycin.	24
2.1 Prologue	24
2.1.1 Mise en contexte	24
2.1.2 Apport des auteurs.....	25
2.1.3 Référence.....	25
2.2 Page titre	26
2.3 Abstract.....	27
2.4 Importance	27
2.5 Introduction.....	28
2.6 Materials and Methods.....	30
2.6.1 Bacterial strains and growth conditions	30
2.6.2 Products and solutions.....	32
2.6.3 Minimal inhibitory concentration assay	32
2.6.4 Coculture minimal inhibitory concentration assay	33
2.6.5 Growth curve assay	34
2.6.6 Coculture growth curve assay	34
2.6.7 Upscaled coculture assay	35
2.7 Results	36
2.7.1 Interactions between <i>S. Typhimurium</i> and gut microbiota isolates.	36
2.7.2 Antibiotic resistance specificity to the identified interaction.....	38
2.7.3 Cell-free supernatants of high-density <i>Lactobacillus</i> spp. cultures	40
2.7.4 The importance of an acidic pH	42
2.7.5 Identifying important genes for <i>S. Typhimurium</i> during the interaction	43
2.8 Discussion	46
2.9 Acknowledgments	49
2.10 References	50
2.11 Supplementary Materials.....	56

CHAPITRE 3 Discussion et Conclusion.....	60
3.1 Résumé des avancements et atteinte des objectifs	60
3.2 Perspectives	68
3.3 Importance du projet.....	70
BIBLIOGRAPHIE	72

LISTE DES TABLEAUX

Table 2.1.	Bacterial strains and their origin	31
Table 2.2.	MIC of azithromycin for <i>E. coli</i> from cocultures with <i>Lactobacillus</i> spp.	40
Table 2.3.	MIC of azithromycin for <i>S. Typhimurium</i> in the presence of cell-free supernatants from <i>Lactobacillus</i> spp. cultures	41
S. Table 2.1.	Changes observed in <i>Salmonella Typhimurium</i> 's MIC when cocultured with various strains.	56
S. Table 2.2.	MIC of azithromycin for <i>S. Typhimurium</i> in an acidic pH.	58
S. Table 2.3-9.	Complete hit genes and shared hits that were obtained from high-throughput experiments, their relative growth value and physiological GO Terms.	58

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1	Mécanismes d’actions des différentes classes d’antibiotiques.	5
Figure 1.2	La diversité du microbiome humain est unique à chaque individu et fortement influencée par l’environnement.	11
Figure 1.3	Évolution de la résistance aux antibiotiques chez les isolats de <i>Salmonella</i> non-typhoïdes.	20
Figure 2.1	The susceptibility of <i>Salmonella</i> Typhimurium to azithromycin decreases when cocultured with strains of the <i>Lactobacillus</i> genre.	37
Figure 2.2	Fold change in the MIC of <i>S. Typhimurium</i> against several antibiotics in the presence of <i>Lactobacillus</i> spp.	39
Figure 2.3	MIC of azithromycin for <i>S. Typhimurium</i> in the presence of acidic or neutralized CFS of <i>Lactobacillus</i> spp.	43
Figure 2.4	Relative growth of the SGD mutants when cocultured with <i>L.</i> <i>rhamnosus</i> or in an acidic media, in the presence of AZM.	45
Figure 2.5	Venn diagram of the hits obtained from both high-throughput experiments.	48
S. Figure 2.1	Growth curves of <i>S. Typhimurium</i> with different concentrations of AZM and in the presence of <i>Lactobacillus</i> spp.	57

LISTE DES ABRÉVIATIONS ET DES SIGLES

%	Pourcentage
°C	Degré Celsius
µl, µm	Microlitre, micromètre
β-...	Bêta-lactames, Bêta-lactamines, Bêta-lactamases
ADN	Acide désoxyribonucléique
AMP	Ampicilline
AMR	<i>Antimicrobial Resistance</i>
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
AZM	Azithromycine
BHI	<i>Brain-Heart Infusion</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFS	<i>Cell-free Supernatant</i>
CMI	Concentration minimal inhibitrice
FDA	<i>U. S. Food and Drug Administration</i>
HCl	<i>Hydrogen Chloride</i>
HMP	<i>Human Microbiome Project</i>
HQNO	2-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide
MIC	<i>Minimal Inhibitory Concentration</i>
ml	Millilitre
kDa	Kilodaltons
N	Normalité
NAG	N-acétyl-glucosamine
NAM	Acide N-acétyl-muramique

NIH	<i>National Institutes of Health</i>
NTML	<i>Nebraska Transposon Mutant Library</i>
PBPs	<i>Penicillin Binding Proteins</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Potentiel hydrogène
PQS	<i>Pseudomonas Quinolone Signal</i>
PsI	<i>Pseudomonas polysaccharide</i>
QS	<i>Quorum sensing</i>
RIF	Rifampicine
rpm	Rotations par minute
SGD	<i>Single Genre Deletion</i>
SpA	<i>Staphylococcus aureus protein A</i>
SPI1	<i>Salmonella Pathogenicity Island 1</i>
SS	<i>Salmonella-Shigella agar</i>
Tn-Seq	<i>Transposon sequencing</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

CHAPITRE 1

INTRODUCTION

1.1 La problématique de la résistance aux antibiotiques

1.1.1. L'apparition des résistances

La découverte des antibiotiques est l'une des plus importantes avancées de la médecine moderne. Elle a permis une amélioration majeure dans le traitement de nombreuses infections et a pavé le chemin pour la médecine telle qu'on la connaît aujourd'hui. C'est la découverte de la pénicilline en 1929 (Fleming, 1929), puis celle de la streptomycine en 1943 (Comroe J. H., 1978) qui ont ouvert le bal à ce qui est désormais considéré comme l'âge d'or des antibiotiques. La technique de Waksman, permettant le criblage de métabolites produits par des microorganismes du sol a permis la découverte de nombreux antibiotiques de sources naturelles (Lewis, 2012). Peu de temps après la découverte de la pénicilline et de la streptomycine, des cas de résistance à ces antibiotiques ont été observés (Abraham & Chain, 1988; Honort & Cole, 1994). Vers les années 1960, la découverte de la transférabilité des résistances aux antibiotiques a ébranlé la communauté scientifique alors que de moins en moins de nouveaux composés naturels étaient identifiés (Watanabe, 1963). C'est ce ralentissement qui a mené à la synthèse chimique de composés antibiotiques (Brown & Wright, 2016). Cette nouvelle ère a permis l'amélioration des molécules antibiotiques déjà connues et a également apporté de nouveaux traitements, notamment grâce au développement de molécules appartenant aux classes des aminoglycosides et des quinolones. À ce moment, la majeure partie des antibiotiques en utilisation courante ciblait des structures ou des fonctions cellulaires essentielles, telles que la paroi bactérienne et la synthèse d'ADN ou de protéines. L'utilisation en masse d ces antibiotiques à large spectre a favorisé l'apparition d'une vague importante de résistance vers les années 1990 (Brown & Wright, 2016). Depuis ce temps, les nouvelles technologies se succèdent pour tenter de trouver une solution à ce problème qui est rapidement devenu mondial. Les scientifiques tentent toujours de développer des antibiotiques avec des cibles précises,

faisant de ces derniers des traitements plus spécifiques qui pourraient ralentir le développement de résistances.

Le *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) publié en 2019 un rapport sur la problématique de la résistance aux antibiotiques, mentionnant qu'en 2017, près de 3 millions d'infections aux États-Unis étaient liées à la résistance aux antibiotiques, occasionnant plus de 35 000 décès (US Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Suivant ces données, une prédiction a également été faite qu'en 2050, le nombre de décès associés à la résistance aux antimicrobiens dans le monde allait augmenter à 10 millions (O'Neill, 2016). Ce nombre assez élevé a d'ailleurs été confirmé plus récemment par une équipe de collaborateurs sur la résistance aux antimicrobiens (Murray et al., 2022). Dans leur étude, des estimés encore plus précis sont décrits, démontrant que la résistance aux antibiotiques progresse toujours et que c'est une problématique mondiale qui doit être adressée avec urgence puisque de plus en plus de microorganismes développent des résistances aux antibiotiques de dernier recours, qui sont la dernière option de traitement disponible. Cependant, il est important de mentionner l'effet de divers enjeux sociaux-économiques sur la propagation de la résistance aux antibiotiques. Les antibiotiques sont produits en masse dans plusieurs pays en développement comme la Chine et l'Inde. Couplé à de dense populations, ceci résulte en une consommation abusive d'antibiotiques à laquelle contribue le manque de régulations quant à la distribution de composés antimicrobiens dans certaines régions du monde. Le tout est souvent lié au pouvoir économique des pays (Hernando-Amado et al., 2020).

1.1.2 Les modes de propagation de la résistance

Mais comment la résistance aux antibiotiques se propage-t-elle aussi rapidement? Les bactéries et autres microorganismes ont, au cours de leur évolution, développé un grand nombre de mécanismes leur permettant de survivre à différents environnements et de ce fait, leur permettant de compétitionner avec les autres microorganismes retrouvés dans cet environnement. Voici en bref quelques-uns de ces mécanismes.

1.1.2.1 Les mutations spontanées

Dans un environnement soumis à la pression d'un antibiotique quelconque, des mutants résistants audit antibiotique peuvent apparaître dans une population qui était auparavant complètement susceptible à l'antibiotique. Ces mutants résistants présentent des mutations spontanées dans des gènes affectant l'efficacité de l'antibiotique, soit en modifiant la cible du composé, en modifiant les voies métaboliques utilisées, en activant des mécanismes de pompes à efflux ou encore en empêchant l'entrée du composé (Munita & Arias, 2016). Un exemple de ce genre de résistance est celle contre la rifampicine chez *Mycobacterium tuberculosis* (Telenti et al., 1993). Dans ce cas, des substitutions prennent place dans le gène *rpoB*, soit le gène encodant pour la sous unité B de l'ARN polymérase de la souche bactérienne, qui est la cible de la rifampicine. De ce fait, la modification de la cible par la bactérie diminue l'efficacité de l'antibiotique. Généralement, la résistance par mutation n'est pas conservée (Acar & Röstel, 2001; Munita & Arias, 2016). Cependant, si un clone résistant survit dans un environnement donné et que les conditions sont favorables pour sa sélection, la mutation originellement spontanée pourrait devenir permanente et créer une lignée de clones résistants, suivant une transmission verticale de la résistance au composé antibiotique présent dans le milieu (Munita & Arias, 2016).

1.1.2.2 Les éléments génétiques mobiles

Les principaux acteurs du mode de transmission horizontale, c'est-à-dire le transfert de gènes entre deux cellules bactériennes non liées, sont les éléments génétiques mobiles. Ces derniers sont grandement impliqués dans la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques entre les bactéries d'une même espèce (intraspécifique), mais également avec celles d'autres espèces qui peuvent être retrouvées dans le même environnement (interspécifique) (Martínez, 2012). Les gènes de résistances peuvent être retrouvés sous différentes formes, notamment sous forme de plasmides ou de transposons (US Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Les plasmides sont des éléments d'ADN circulaire qui peuvent être transférés entre les cellules via

des phages (transduction) ou par conjugaison inter-bactérienne. Ils contiennent généralement un ou plusieurs gènes de résistances à différents antibiotiques. Par exemple, le plasmide pCFSA664-1 retrouvé chez *Salmonella* Indiana encode 24 gènes de résistances, notamment contre la ciprofloxacine et le céfotaxime (Hu et al., 2022).

1.1.2.3 Le rôle de l'environnement dans la propagation

L'environnement joue un rôle crucial dans la propagation de gènes de résistance aux antibiotiques. En effet, tel que mentionné plus haut, la transmission de gènes, notamment par conjugaison, requiert un contact direct entre les cellules (Martínez, 2012). De ce fait, la présence d'un antibiotique dans un environnement, tel que le tractus intestinal humain, favorise la sélection de microorganismes possédant des gènes de résistance et ainsi la propagation de ces derniers aux autres membres de la communauté (Munita & Arias, 2016; Smillie et al., 2011).

Le microbiote intestinal humain, un environnement contenant une dense communauté microbienne, est très favorable à la propagation des gènes de résistance. Une étude a d'ailleurs démontré que les bactéries retrouvées dans cet environnement avaient 25 fois plus de chances de partager des séquences d'ADN provenant d'un transfert horizontal en commun que dans les autres environnements, par exemple l'eau, le sol ou sur les aliments (Smillie et al., 2011). Ceci serait dû à la présence d'une pression de sélection, soit le traitement antibiotique, qui est beaucoup plus fréquente chez l'humain que dans la nature et qui expliquerait donc que les taux de transferts génétiques sont deux fois plus élevés dans le microbiote humain que dans d'autres environnements (Smillie et al., 2011).

1.1.3 Les différentes classes d'antibiotiques

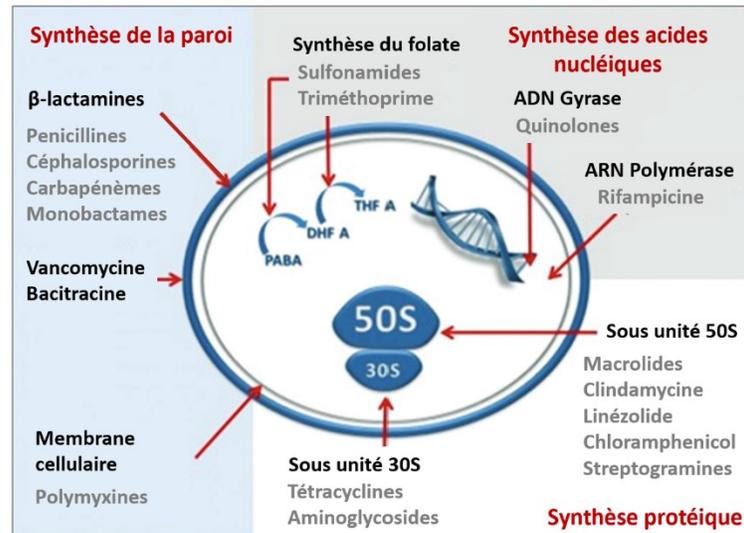


Figure 1.1 Mécanismes d'actions des différentes classes d'antibiotiques. Tiré de Kapoor et al., 2017

Au cours de l'âge d'or de la découverte des antibiotiques, les molécules antimicrobiennes se sont multipliées à grande vitesse. Ainsi, les composés à notre disposition aujourd'hui sont très variés et sont divisés en différentes classes selon leur mode d'action, leur spectre d'action ou encore par leur structure chimique. Cependant, malgré la variété de molécules, le nombre de cibles pour les antibiotiques reste limité. Les modes d'action les plus importants sont présentés dans la figure 1.1 et donc, les classes d'antibiotiques les plus importantes seront présentées ici selon leur cible.

1.1.3.1 Cible 1 : la synthèse de la paroi cellulaire

La synthèse de la paroi cellulaire est essentielle pour la survie des bactéries. Ainsi, les molécules ayant ce processus comme cible sont bactéricides et peuvent également être des produits naturels. Une première classe d'antibiotiques à cibler la synthèse de la paroi cellulaire bactérienne est celle des β -lactamines. Cette classe d'antibiotiques est d'ailleurs la première à

avoir été découverte. Les β -lactamines sont des molécules à large spectre et peuvent cibler autant des bactéries à Gram positif qu'à Gram négatif. Ces composés ont tous un point en commun : on retrouve un noyau β -lactame dans leur structure moléculaire. Les molécules de cette classe vont cibler, chez les bactéries, les enzymes de synthèse de la paroi cellulaire, ce qui permet d'inhiber la croissance bactérienne (Oates et al., 1988; Tipper & Strominger, 1965; Wise & Park, 1965). De façon plus précise, en liant les protéines de liaisons à la pénicilline, les β -lactamines permettent d'empêcher l'étape de transpeptidation (soit l'étape d'assemblage) de la paroi cellulaire. Ceci affaiblit la paroi bactérienne et cause la lyse des cellules (Spratt, 1980).

Parmi les sous-classes des β -lactamines, on retrouve les carbapénèmes, par exemple l'imipénème et le méropénem, ce dernier pouvant être utilisé en combinaison avec des inhibiteurs de β -lactamases (Cho et al., 2018). On retrouve également les céphalosporines, divisées en plusieurs générations. Les différentes générations varient dans leur efficacité contre différents pathogènes. Par exemple la ceftriaxone, une céphalosporine de 3^e génération, peut être efficace contre certains pathogènes autant de Gram positif que négatif (Harrison & Bratcher, 2008). Finalement, on trouve parmi les β -lactamines la sous-classe des pénicillines, qui sont connues depuis bientôt 100 ans (Fleming, 1929). Un exemple de cette classe est l'ampicilline, qui peut être utilisée notamment pour le traitement des méningites et des infections causées par *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp. et bien d'autres pathogènes (Peechakara et al., 2022).

Il existe plusieurs mécanismes de résistance contre les β -lactamines (Malouin & Bryan, 1986). Notamment, par la modification de la cible (les PBPs (*Penicillin Binding Proteins*) (Spratt, 1977), par des changements au niveau des porines ou des pompes à efflux à la surface de la bactérie (Werner et al., 1985) ou encore par la présence de β -lactamases chez la souche bactérienne cible (Abraham & Chain, 1988). Ces dernières sont des enzymes produites par la bactérie qui vont permettre d'hydrolyser des liens du noyau β -lactame, rendant ainsi la molécule antibiotique inactive.

Les glycopeptides sont une seconde classe d'antibiotiques ayant pour cible la synthèse de la paroi cellulaire. Un exemple d'antibiotique se retrouvant dans cette classe est la vancomycine, une étonnamment grosse molécule (Kapoor et al., 2017). Cet antibiotique, actif uniquement contre les bactéries à Gram positif, inhibe la polymérisation de la paroi cellulaire en empêchant l'acide N-acetylmuramique et le N-acétyl-glucosamine de lier la couche de peptidoglycane, menant à une lyse des cellules (Shivali et al., 2022).

1.1.3.2 Cible 2 : la synthèse protéique

La classe des aminosides contient des antibiotiques qui doivent être transportés à travers la membrane bactérienne pour se rendre jusqu'à leur cible : la sous-unité 30S du ribosome (Taber et al., 1987). En liant l'ARN ribosomal de la sous-unité du ribosome bactérien, les molécules antibiotiques vont induire une mauvaise lecture des codons et inhiber la translocation (Davies et al., 1966; Davies & Davis, 1968). De cette façon les antibiotiques de cette classe, comme la gentamycine, inhibent la synthèse de protéines chez leurs cibles. Parmi les autres antibiotiques de cette classe, on retrouve notamment la kanamycine et la streptomycine.

Une seconde classe d'antibiotiques ciblant la sous-unité 30S du ribosome bactérien est celle des tétracyclines. Ces molécules, comme la tétracycline elle-même, vont en effet aller empêcher la synthèse protéique en bloquant la liaison de l'ARNt (Tritton, 1977). La résistance aux tétracyclines peut survenir par le moyen de pompes à efflux, de protéines de protection du ribosome ou encore via l'inactivation de l'antibiotique, souvent retrouvés parmi les gènes *tet* (Chopra & Roberts, 2001). Ce groupe de gènes peut être présent chez de nombreuses espèces bactériennes et est souvent couplé à d'autres résistances. Par exemple, *tetM* est souvent relié à *ermB*, un gène permettant une résistance à d'autres classes d'antibiotiques comme les macrolides et les lincosamides (Chopra & Roberts, 2001).

Finalement, une autre classe d'antibiotiques inhibant la synthèse protéique est celle des macrolides. Cette classe est cependant différente des aminosides et des tétracyclines puisque ces

composés vont plutôt cibler la sous-unité 50S du ribosome (Foulds et al., 1990). Dans cette classe d'antibiotiques on retrouve entre-autres l'azithromycine (voir section 1.4.3.1) et l'érythromycine, des composés similaires mais qui possèdent une grande différence dans leur pharmacocinétique (Amsden, 1996; Foulds et al., 1990).

1.1.3.3 Cible 3 : la réplication de l'ADN

Les antibiotiques ciblant la réplication de l'ADN font partie de la classe des quinolones. Ces derniers vont empêcher l'ADN gyrase d'effectuer son travail de déroulement des molécules d'ADN en liant la sous-unité A de cette enzyme (Kapoor et al., 2017). Le tout bloque ainsi une voie essentielle du métabolisme bactérien. Parmi les molécules de cette classe, on retrouve l'acide nalidixique et la ciprofloxacine (Thai et al., 2022). Cette dernière molécule est très connue et est beaucoup utilisée dans le traitement des infections, par exemple pour les infections urinaires, les salmonelloses et l'anthrax.

1.1.3.4 Les autres classes d'antibiotiques

Il existe d'autres classes d'antibiotiques pour lesquelles quelques exemples seront brièvement décrits. La colistine est une molécule bactéricide liant les lipides A présents dans les lipopolysaccharides des bactéries à Gram négatif (Andrade et al., 2020). La liaison de la colistine aux lipopolysaccharides cause un changement dans la membrane externe des bactéries, résultant en une membrane instable qui entraîne la lyse des cellules. Ensuite on retrouve les sulfonamides, comme le sulfaméthoxazole, et le triméthoprime qui sont des antibiotiques utilisés en combinaison et qui vont cibler différentes étapes de la synthèse de l'acide folique (Kapoor et al., 2017). Il existe également la classe des rifamycines, où l'on retrouve des molécules telles que la rifampine. Ces antibiotiques ciblent et inactivent l'ARN polymérase bactérienne, chez des souches telles qu'*E. coli* (Wehrli, 1983). Ainsi, la transcription de l'ADN en ARN ne pourra prendre place, ce qui cause la mort des cellules.

1.1.4 Le processus de développement de nouveaux traitements antibiotiques

Dans son dernier rapport, la CDC a communiqué une liste de pathogènes résistants à considérer de façon prioritaire. Ces pathogènes, tels que les *Acinetobacter* et les *Enterobacteriaceae* résistants aux carbapénèmes, ont été déclarés des dangers imminents pour la santé mondiale (US Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Dans le but de remédier à cette problématique, de nombreuses équipes de recherche travaillent actuellement à identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ou encore de nouvelles molécules antibiotiques. Bien que plusieurs molécules semblent fonctionner lors des essais *in vitro*, rares sont celles qui réussissent à traverser le processus complet de développement et de mise en marché d'un antibiotique. De nombreux facteurs affectent ce processus dont notamment les coûts élevés, les modèles de financement inadaptés, la quantité de travail importante nécessitant beaucoup de temps et dans le cas de maladies infectieuses à bactéries résistantes, le faible nombre de patients disponibles pour participer aux études cliniques (The Pew Charitable Trusts, 2021). Le processus de développement de nouveaux antibiotiques est donc grandement critiqué depuis plusieurs années, alors que la menace de la résistance aux antibiotiques se concrétise de plus en plus. En décembre 2020, 43 nouveaux composés antibiotiques étaient en développement et seulement 13 se sont rendus jusqu'à la phase clinique III (The Pew Charitable Trusts, 2021). Depuis 2017, seulement 12 nouvelles molécules antibiotiques ont été approuvées par la FDA. Parmi ces 12, seul le vaborbactam possède un nouveau type de pharmacophore composé d'acide borique cyclique (Butler et al., 2022; Lomovskaya et al., 2017). D'un côté plus positif, la majorité de ces nouvelles molécules ciblent les pathogènes d'importance énoncés par la *World Health Organization* (WHO) en 2017 (World Health Organization, 2017).

L'histoire des antibiotiques en est une qui est complexe et qui évolue rapidement au fil du temps. Du temps glorieux où la découverte de nouvelles molécules était fréquente à aujourd'hui où la problématique de la résistance aux antibiotiques ne peut plus être ignorée, on peut réaliser à quel point les microorganismes sont capables d'adaptation. Ces nombreux mécanismes d'adaptation, notamment ceux portant sur l'acquisition de résistances, sont certes impressionnants mais

démontrent également l'urgence de la situation à laquelle l'humanité fera face au cours des prochaines années. Il est donc primordial pour l'humanité de trouver des alternatives aux présents traitements antibiotiques. Notamment, le développement de traitements spécifiques à certaines conditions d'infection grâce à la génomique fonctionnelle et la production de microorganismes modifiés ayant des cibles précises.

1.2 Un environnement complexe : le microbiote intestinal humain

Dans la nature, les bactéries forment des communautés complexes au sein desquelles plusieurs populations cohabitent avec d'autres microorganismes (ex : champignons, protistes, virus) dans des environnements biotiques (ex : la surface des plantes, les racines, la peau et le corps humain, notamment au sein de l'intestin) ainsi qu'abiotiques (ex : surface des roches, points d'eau). Ces différentes communautés sont appelées microbiotes.

1.2.1 Le microbiote

Il existe divers types de microbiote, chacun comportant une communauté de microorganismes unique et leurs propres paramètres de diversité et d'abondance. Dans la figure 1.2 il est possible d'observer les liens, présents ou non, entre les différents microbiotes. Par exemple, il peut être conclu que le microbiote oral est différent du microbiote gastro-intestinal mais similaire au microbiote nasal. Entre les individus d'une même communauté, les différents microbiotes, soit de la bouche, de la peau, de l'intestin, etc., peuvent être similaire dans leur composition. Par contre, la stabilité des divers microbiotes, par exemple le microbiote gastro-intestinal, peut être affectée par divers facteurs majeurs comme un changement d'alimentation, la prise d'antibiotiques et les maladies (Huttenhower et al., 2012).

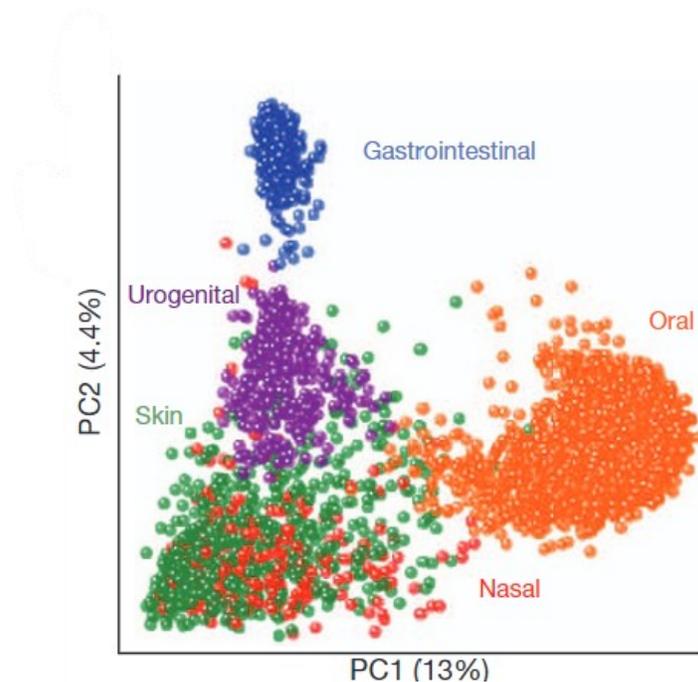


Figure 1.2 La diversité du microbiome humain est unique à chaque individu et fortement influencée par l’environnement. Ordination illustrant que la composition des communautés bactériennes entre les échantillons est spécifique à chaque type de site, soit la bouche, le tractus gastrointestinal, la peau et le tractus urogénital séparés, puis le nez liant les habitats de la peau et la bouche. Adapté de Huttenhower et al., 2012.

Le microbiote intestinal humain est caractérisé par une grande diversité de microorganismes. Cette communauté est non seulement composée de diverses espèces de bactéries mais comporte également plusieurs variétés de levures, de virus et d’autres microorganismes incluant des protistes (Sibinelli-Sousa et al., 2021). À l’intérieur même de l’environnement complexe qu’est le tractus gastrointestinal humain, les souches bactériennes peuvent varier considérablement. En effet, les conditions de croissance peuvent changer, notamment entre le petit et le gros intestin (Rinninella et al., 2019). Par exemple, l’environnement du petit intestin est beaucoup plus acide que celui du gros. On y retrouve donc une moins grande concentration de microorganismes. Cependant, malgré des conditions plus difficiles, de nombreuses souches bactériennes comme les phylums des Firmicutes et des Actinobactéries vont s’établir dans cet environnement

(Angelakis et al., 2015). Du côté du gros intestin, on retrouve des conditions plus favorables à la croissance. C'est pourquoi on peut y trouver notamment des souches des phylums des Bactéroïdes, des Firmicutes et des Protéobactéries (Gu et al., 2013).

Afin de déterminer quelles souches bactériennes étaient présentes de façon plus spécifique dans l'intestin humain, le *National Institute of Health* (NIH) a lancé le *Human Microbiome Project* (HMP) en 2007. Ce projet a pour but de recueillir l'information d'un grand nombre d'études afin de mettre partager les connaissances et d'acquérir une meilleure compréhension de la diversité et du rôle du microbiote, intestinal entre autres, au niveau génétique et physiologique de l'humain (Turnbaugh et al., 2007). En effet, le microbiote humain joue plusieurs rôles essentiels chez son hôte. Notamment, cette communauté de microorganismes permet l'accès à divers nutriments ou composés ne pouvant pas être synthétisés par l'homme par leur participation dans la digestion des aliments (Martin et al., 2007). Le microbiote permet également de développer et d'entretenir le système immunitaire humain tout en participant à prévenir la colonisation par des microorganismes pathogènes (Hooper et al., 2003). Finalement, le microbiote intestinal affecte les interactions entre le système nerveux central et le système nerveux entérique (Appleton, 2018). En effet, la composition du microbiote peut influencer plusieurs états de santé-mentale chez l'hôte, par exemple sur la dépression ou l'anxiété.

1.2.2 La résistance face aux envahisseurs

Certaines caractéristiques de l'environnement intestinal agissent comme des filtres pour prévenir la colonisation par des pathogènes. Différents facteurs comme le niveau d'oxygène, le pH et la concentration des nutriments créent une barrière qui permet de sélectionner les souches qui seront capable de croître (Rogers et al., 2021; Sibinelli-Sousa et al., 2021). Par exemple, une diète riche en lait maternel telle que celle d'un nouveau-né favorise la présence de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* pouvant utiliser les oligosaccharides retrouvés dans une telle diète à l'instar d'autres microorganismes ne permettant pas cette fonction (Sela et al., 2008). Ces différents filtres vont exercer une sélection sur le microbiote de l'hôte pendant la

croissance jusqu'à l'obtention d'un équilibre de la communauté qui se produit vers 2,5 ans (Koenig et al., 2011).

Le phénomène de résistance à la colonisation est un autre moyen que possède la communauté du microbiote pour résister aux pathogènes envahisseurs. Ce moyen de défense est caractérisé par la capacité du microbiote à prévenir la colonisation par des bactéries indésirables grâce à la compétition inter-bactérienne et aussi grâce aux filtres de l'habitat. Un exemple de la résistance à la colonisation consiste en la production d'acides gras à chaînes courtes par certains microorganismes, ce qui inhibe le pathogène *S. Typhimurium* (Rogers et al., 2021). De façon plus précise, il a été démontré que le propionate produit par des bactéries du genre *Bacteroides* modifie le pH du lumen intestinal ainsi que du cytoplasme bactérien, affectant ainsi la croissance de ce pathogène (Jacobson et al., 2018). Également, une étude mettant en place un traitement à la streptomycine a démontré que la perturbation du microbiote causée par ce traitement antibiotique diminue la présence de ces acides gras à chaînes courtes, permettant ainsi la colonisation par *S. Typhimurium* (Meynell, 1963). Un autre exemple de la résistance à la colonisation pour *S. Typhimurium* est la limitation des ressources, notamment les acides aminés. Un environnement déplété en acides aminés permet donc la sélection pour les microorganismes qui peuvent synthétiser leurs propres acides aminés. Ainsi, un pathogène dépendant de l'acquisition d'acides aminés du milieu extracellulaire aura de la difficulté à s'établir au sein de la communauté du microbiote (Rogers et al., 2021). Cependant, il est connu qu'un traitement antibiotique peut augmenter la disponibilité des acides aminés, ce qui suggère que le pathogène pourrait alors prendre le dessus sur les autres microorganismes de la communauté et s'établir à son site d'infection (Theriot et al., 2014). La capacité du microbiote à résister à la colonisation par des bactéries pathogènes peut donc être assez efficace mais est définitivement dépendante de l'homéostasie de la communauté. Un état de dysbiose, soit de déséquilibre du microbiote associé avec une diminution de la stabilité des interactions microbes-microbes dans la communauté, tend à permettre l'établissement d'infections par les pathogènes (Rogers et al., 2021).

1.2.3 Les probiotiques : *Lactobacillus* spp.

Le microbiote intestinal est connu pour avoir certains bénéfices sur la santé humaine notamment grâce à la présence de souches bactériennes probiotiques au sein de cette communauté. Un probiotique est défini comme étant un microorganisme pouvant être supplémenté à la diète humaine et ayant des effets positifs sur la santé (Wang et al., 2021). Cependant, ces bénéfices attribués aux probiotiques sont assez mitigés, puisque les effets qui peuvent être attribués aux souches bactériennes probiotiques diffèrent entre les études scientifiques. Par exemple, certaines études démontrent que la présence de probiotiques permet de réguler la flore intestinale. Lors d'une dysbiose causée par différents facteurs, comme un traitement antibiotique, les probiotiques peuvent participer au maintien de l'équilibre de la communauté et également à un retour du microbiote à l'état normal (Oh et al., 2016; Wang et al., 2021). Aussi, les probiotiques peuvent jouer un rôle important dans le maintien de la barrière épithéliale bordant l'intestin. (Tuo et al., 2018; Wang et al., 2021). Cette barrière est d'ailleurs la première ligne de défense de l'intestin contre les pathogènes, signifiant que les probiotiques peuvent participer à l'inhibition de l'établissement de divers pathogènes au sein du tractus intestinal humain. Cependant, d'autres études démontrent l'inefficacité de certaines souches probiotiques, par exemple l'incapacité de la souche *L. rhamnosus* Lcr35 à prévenir de façon significative la colonisation de l'intestin par des entérocoques résistants à la vancomycine chez l'humain (Vidal et al., 2010).

Il existe différentes souches bactériennes qui peuvent être considérées comme des probiotiques. Entre autres, on retrouve les *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp. et bien sûr les *Lactobacillus* spp. (Zhang et al., 2018). Les lactobacilles font partie du phylum des Firmicutes et sont des bactéries à Gram positif qui sont productrices d'acide lactique. Ce groupe de souches bactériennes est représenté entre autres par les souches *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri* et *L. salivarius* (Lebeer et al., 2008). Les lactobacilles sont des souches probiotiques puisqu'elles permettent le maintien de l'homéostasie du microbiote grâce à leur interaction avec d'autres microorganismes probiotiques, ce qui prévient la colonisation par des microorganismes

pathogènes (Lebeer et al., 2008). Ceci peut être causé par la compétition pour les sites d'attachement ou pour les nutriments disponibles. Un exemple de la prévention de la colonisation par des souches pathogènes par *Lactobacillus* spp. a récemment été démontrée (Djukovic et al., 2022). Chez les souris, la présence de ce genre bactérien, lorsque combiné à des souches du genre des *Clostridiales*, permet de bloquer la colonisation du microbiote par des souches d'entérobactéries multi-résistantes. Ceci est notamment dû au fait que la collaboration entre les microorganismes probiotiques diminue l'accès aux nutriments pour les pathogènes et produit différents métabolites qui affectent le pouvoir pathogènes des souches d'entérobactéries.

1.3 Les interactions bactériennes

Tel que mentionné plus haut, afin que les bactéries pathogènes puissent s'établir au site d'infection, il est souvent nécessaire qu'elles soient capables d'interagir avec les bactéries commensales déjà présentes à cet endroit. Les types d'interactions inter-bactériennes sont très variés. Un type d'interaction bien connu est la production de molécules par une première souche qui affecteront une seconde. Ceci peut être représenté par la production de composés antimicrobiens qui ont pour objectif d'éliminer les bactéries compétitrices avoisinantes (J. N. O'Sullivan et al., 2019). D'autres exemples où la production de molécules peut aller affecter une autre souche seraient le *quorum sensing* (QS) (Fugère et al., 2014) ou la sécrétion d'effecteurs via différents systèmes de sécrétion (Baümeler & Sperandio, 2016).

1.3.1 Les interactions en dysbiose

Les traitements antibiotiques sont reconnus pour causer des changements majeurs dans la composition du microbiote intestinal humain. Les traitements vont en effet perturber l'équilibre établi de cette communauté et induire une dysbiose (Baümeler & Sperandio, 2016). Cet état peut être favorable à plusieurs pathogènes en favorisant certaines interactions. Un exemple intéressant d'interaction lors d'une dysbiose est celui des pathogènes *Clostridioides difficile* et *S. Typhimurium* (Baümeler & Sperandio, 2016). Ces deux bactéries utilisent l'acide sialique

comme source de carbone préférentielle. Au sein du microbiote, c'est le métabolisme de *Bacteroides thetaiotaomicron* qui permet de rendre cette source de carbone disponible dans le lumen intestinal (Ng et al., 2013). Il a donc été démontré qu'en présence d'un traitement antibiotique, l'acide sialique devient plus disponible dans le lumen intestinal, favorisant ainsi la colonisation par les pathogènes.

1.3.2 Les interactions via les systèmes de sécrétion

Les systèmes de sécrétion participent de différentes manières aux interactions entre microorganismes. En effet, ces systèmes complexes permettent l'acheminement de diverses molécules via un contact direct entre les pathogènes et leurs cibles (Baümler & Sperandio, 2016). Par exemple, *Vibrio cholerae* possède un système de sécrétion de type 6 qui lui permet de tuer les souches lui faisant compétition en leur injectant un effecteur toxique. Lors de l'entrée de ce pathogène au sein du microbiote, certaines bactéries peuvent avoir un effet sur la régulation de ce système de sécrétion mortel (Bachmann et al., 2015). Plus précisément, *Bifidobacterium bifidum*, une souche commensale du mucus intestinal, convertit les acides retrouvés dans la bile en acide désoxycholique. Ce produit de la souche commensale est la clé pour réprimer l'expression des gènes du système de sécrétion de type 6 de *Vibrio cholerae*. Ainsi, le pouvoir pathogène de *Vibrio* se voit diminué grâce à cette interaction entre le pathogène et une souche commensale du microbiote.

1.3.3 Les interactions entre *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*

L'une des interactions inter-bactériennes les plus étudiée est celle entre *S. aureus* et *P. aeruginosa*. Ces deux pathogènes cohabitent notamment chez les patients atteints de la fibrose kystique et sont souvent retrouvés sous forme de biofilm. Dans ces conditions, *P. aeruginosa* produit un grand nombre de métabolites qui sont entre autres régulés par le QS, un système régulateur complexe (Fugère et al., 2014). Parmi ces métabolites on retrouve la pyocyanine, le 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide (HQNO) et le *Pseudomonas Quinolone*

Signal (PQS). Il a d'ailleurs été démontré que la production de ces deux dernières molécules par *P. aeruginosa* permet de stimuler la formation de biofilm chez *S. aureus*.

Un autre trait intrigant que peuvent avoir les interactions inter-bactériennes est la modification de la susceptibilité d'une des bactéries de l'interaction face à un composé anti-microbien. Chez *S. aureus*, ce phénomène causé par *P. aeruginosa* est très étudié. Une équipe a d'ailleurs démontré qu'un exoproduit de *P. aeruginosa*, soit l'endopeptidase LasA, permet d'augmenter la susceptibilité de *S. aureus* à la vancomycine de 100 à 1000 fois selon les isolats testés (Radlinski et al., 2017). D'un autre côté, l'équipe a observé que le HQNO permet à *S. aureus* de résister au traitement à la ciprofloxacine en diminuant la production d'adénosine-triphosphate (ATP) chez cette souche.

Étonnamment, *S. aureus* peut aussi modifier la sensibilité de *P. aeruginosa* à des antibiotiques, prouvant que les interactions ne sont pas seulement unidirectionnelles. Par exemple, *P. aeruginosa* devient résistant à la tobramycine en présence de *S. aureus* (Beaudoin et al., 2017). En effet, la liaison de la *Staphylococcus aureus protein A* (SpA) produit par *S. aureus* au PsI de *P. aeruginosa*, une molécule d'exopolysaccharide, induit une agrégation des cellules bactériennes qui permet à *P. aeruginosa* de résister à un traitement à la tobramycine.

1.4 Le pathogène d'intérêt : *Salmonella* Typhimurium

1.4.1 Mais qui est *Salmonella*?

Les Salmonelles sont des bactéries à Gram négatif en forme de bâtonnets de la famille des *Enterobacteriaceae*. Il existe deux espèces de Salmonelles, soit *Salmonella bongori* et *Salmonella enterica*. Cependant, ces deux espèces comprennent plus de 2500 sérotypes dont le pathogène d'intérêt de cette étude : *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium (Brenner et al., 2000). *S. Typhimurium* est une Salmonelle non-typhoïde. Elle diffère donc des Salmonelles typhoïdes, comme *S. enterica* ser. Typhi, par les symptômes qu'elle peut causer

chez son hôte et par son épidémiologie (Gal-Mor et al., 2014). Aussi, *S. Typhimurium* est l'une des plus importantes souches pathogènes dans le monde en ce qui concerne les infections de type zoonoses, soit de l'animal à l'humain (World Health Organization, 2018).

Lors de l'invasion de son hôte, *S. Typhimurium* colonise au niveau de l'intestin. Le pathogène commence par activer son îlot de pathogénicité I (SPI1) qui permet au système de sécrétion de type III d'entrer en fonction. De cette façon, *S. Typhimurium* manipule les cellules épithéliales de l'intestin afin d'être internalisé dans ces dernières (Dorsey et al., 2005). Ainsi, le pathogène réussit à traverser la première barrière de l'intestin et induit une réaction d'inflammation (Sibinelli-Sousa et al., 2021). Ce changement dans l'état de l'intestin est la clé de l'infection par *S. Typhimurium*. C'est en effet dans l'intestin inflammé que le pathogène se retrouvera dans la niche idéale pour sa croissance et pourra ainsi persister pour causer l'infection.

Une caractéristique intéressante de *S. Typhimurium* est sa ressemblance avec l'une des souches les mieux étudiées de ce monde : *Escherichia coli*. C'est probablement l'évolution de *S. Typhimurium* dans sa niche écologique favorite qui lui a permis de diverger de la souche commensale. Il est tout de même notable que *Salmonella* et *E. coli* K12 partagent près de 85% de leur génome (AbuOun et al., 2009). Ceci fait donc de *Salmonella* un genre bactérien très intéressant à utiliser comme modèle pathogène.

1.4.2 *Salmonella* dans le monde

Aux États-Unis, les Salmonelles non-typhoïdes sont responsables d'environ 1,35 million d'infections chaque année, causant environ 420 décès par année (US Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Dans le monde, ce chiffre monte plutôt à 155 000 décès par an (Majowicz et al., 2010), puisque c'est dans les pays en développement que l'incidence des Salmonelles non-typhoïdes augmente le plus rapidement. Cependant, ce sont ces pays d'Asie, d'Amérique du Sud et du Moyen-Orient pour lesquels le moins de données sont disponibles. Récemment, une étude a scruté les bases de données pour déterminer l'incidence des

Salmonelles non-typhoïdes au Moyen-Orient (Abukhattab et al., 2022). Avec le peu de données recueillies dans ces pays de 2010 à 2021, ils ont pu établir que l'incidence de ce type de pathogène est de 9% chez les humains et de 13% chez les animaux dans ces pays.

1.4.3 Les infections causées par *Salmonella* Typhimurium

Les Salmonelloses sont les infections causées par les bactéries du genre *Salmonella* et sont le plus souvent d'origine alimentaire. Par exemple, dans les pays en développement comme l'Éthiopie, les infections causées par les Salmonelles non-typhoïdes sont souvent dues à un manque d'hygiène lors de la boucherie des animaux (Belina et al., 2021). L'économie de ce pays en particulier repose en effet beaucoup plus sur l'agriculture et le bétail, ce qui fait qu'un plus grand nombre de personnes sont en contact avec les animaux et donc plus à risque de contracter un pathogène d'origine alimentaire, tel que *S. Typhimurium*.

Les Salmonelloses se caractérisent normalement par de la fièvre, de la diarrhée et des nausées. Dans la majorité des cas, les infections vont se résorber d'elles-mêmes, sans nécessiter de traitement antibiotique (World Health Organization, 2018). En revanche, un traitement devient nécessaire chez les patients plus à risque, comme les personnes âgées et les jeunes enfants. Dans ces cas, les antibiotiques de prédilection sont les fluoroquinolones, par exemple la ciprofloxacine, ou encore les céphalosporines de 3^e génération comme la ceftriaxone (Acheson & Hohmann, 2001; US Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Cependant, depuis plusieurs années, la résistance à ces antibiotiques de première ligne est en croissance. En effet, un rapport de la CDC confirme que la résistance à la ciprofloxacine était présente chez près de 10% des souches de *Salmonella* non-typhoïdes responsables d'infections aux États-Unis en 2017 (Figure 1.3) (US Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Heureusement, les macrolides restent pour l'instant disponibles comme antibiotiques de dernier recours pour le traitement des infections graves à *S. Typhimurium*.

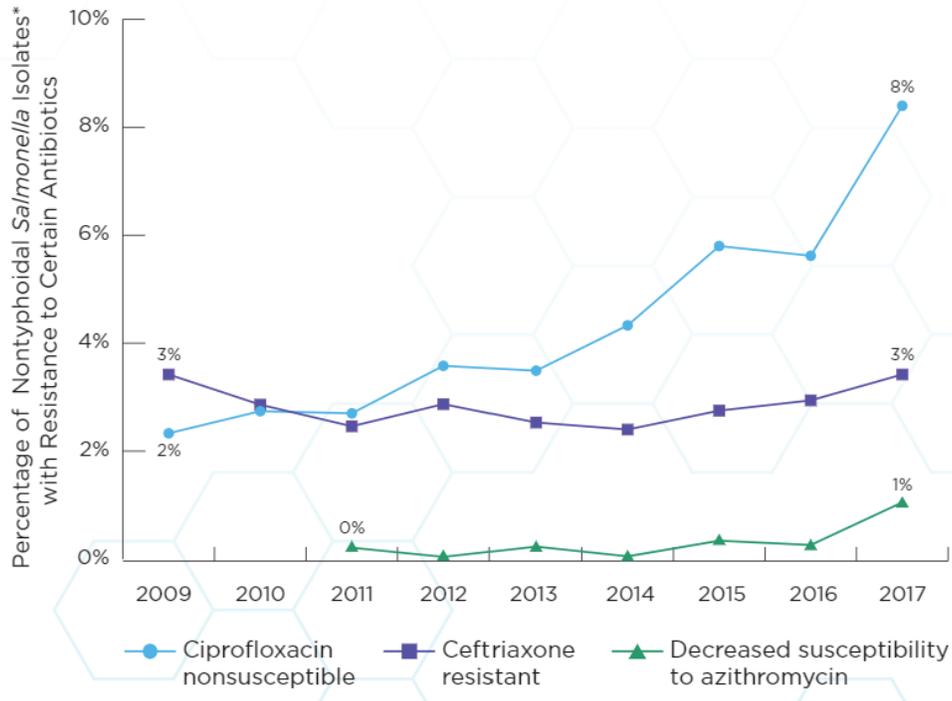


Figure 1.3 Évolution de la résistance aux antibiotiques chez les isolats de *Salmonella* nontyphoïdes. Tiré de US Centers for Disease Control and Prevention, 2019.

1.4.3.1 L'azithromycine

Tel que mentionné précédemment, l'azithromycine est un antibiotique de la classe des macrolides qui peut être utilisé en clinique comme traitement de dernier recours lors d'infections graves (Anandabaskar, 2021). L'azithromycine, une molécule à action bactériostatique, est dérivée de la structure de l'érythromycine et qui est connue pour demeurer stable en milieu acide. C'est un antibiotique qui peut être administré par voie orale et qui est rapidement absorbé au niveau du tractus gastrointestinal, en faisant un antibiotique fortement prescrit. En 2011, cet antibiotique était d'ailleurs la molécule plus prescrite aux États-Unis, suivie de près par l'amoxicilline (Hicks et al., 2015). En plus de traiter les infections à *S. Typhimurium*, l'azithromycine peut également cibler d'autres pathogènes d'origine alimentaire comme *Salmonella* Typhi, *E. coli* ainsi que d'autres *Enterobacteriaceae* (Trivedi & Shah, 2012).

Quelques mécanismes de résistance à l’azithromycine sont connus à ce jour. Le mécanisme principal de résistance est la sortie du composé antibiotique de la cellule par des pompes à efflux, notamment celles des familles *ATP-binding cassette* (ABC), *major facilitator superfamily* (MFS), multidrug and toxic compound extrusion (MATE), *resistance nodulation cell division* (RND) et *small multidrug resistance* (SMR) (Gomes et al., 2017; Li et al., 2015). Récemment, une souche de *S. Typhimurium* résistante à l’azithromycine a d’ailleurs été identifiée comme responsable de plusieurs éclosions et possède une mutation qui augmente de manière significative l’efficacité de sa pompe à efflux AcrB (Sajib et al., 2021; Hooda et al., 2019; Ababou et al., 2016). Un autre mécanisme possible de résistance est la modification de la cible de l’antibiotique, soit le ribosome bactérien, ou en la modification structurelle de l’antibiotique lui-même. Ceci peut être effectué par diverses enzymes comme des ARNr méthylases, estérases, etc. (Gomes et al., 2017). La résistance à l’azithromycine peut également se propager entre les souches pathogènes. Ceci peut être effectué via différents plasmides, notamment le plasmide conjugatif de type IncI1 codant pour une ARNr méthylase et une phosphorylase (Xie et al., 2022).

1.4.4 Le criblage à haut débit

Le criblage à haut débit est une méthode assez récente qui permet entre autres l’association de gènes à leurs fonctions. En effet, avant l’arrivée des collections de mutants de délétion, un criblage nécessitait la délétion individuelle de chaque gène, un travail long et particulièrement demandant. Cependant, plusieurs collections de mutants sont maintenant disponibles, ce qui a permis de faire avancer grandement les connaissances, notamment sur l’essentialité des gènes dans différentes conditions (Côté et al., 2016) ou encore avec les criblages de molécules à potentiel antibiotique (French et al., 2016.). L’une des collections les mieux connues de ce genre est la collection Keio (Baba et al., 2006). Cette collection de mutants de délétion d’*Escherichia coli* K-12 a été développée en 2006 et consiste en 3985 mutants pour lesquels un gène non essentiel a été délété puis remplacé par une cassette de résistance à la kanamycine. Aujourd’hui, il existe de telles collections pour d’autres microorganismes comme *Acinetobacter*

baylyi ADP1 (de Berardinis et al., 2008) et bien sûr *S. Typhimurium* ATCC14028 (Porwollik et al., 2014).

S. Typhimurium est un pathogène modèle très étudié à travers le monde à cause de sa grande incidence dans les infections d'origine alimentaire. C'est pourquoi l'équipe de Porwollik *et al.* a développé une collection de mutants de délétion simples pour les gènes non essentiels de *S. Typhimurium*, nommée la *single gene deletion collection* (SGD), qui est similaire à la collection Keio mentionnée plus haut (Porwollik et al., 2014).. Pour se faire, l'équipe a utilisé la recombinaison homologue pour déléter les gènes cibles et les remplacer par une résistance à la kanamycine. Après avoir sélectionné les transformants, les mutants produits ont été séquencés afin de confirmer la position de l'insertion de la cassette de résistance à la kanamycine et de confirmer la délétion du gène cible. Ainsi, la collection de près de 4000 mutants a été classée en 46 plaques 96 puits (Porwollik et al., 2014).

1.5 Objectifs du projet

Le projet aura pour but d'identifier l'effet possible que différents microorganismes retrouvés au site d'infection de *S. Typhimurium*, soit dans la communauté du microbiote intestinal humain, ont sur la physiologie ou le métabolisme de ce pathogène face à différents traitements. *S. Typhimurium* est choisi comme pathogène puisque ce microorganisme possède un mode d'infection favorable à la présence d'interactions inter-bactériennes. Pour identifier les interactions, les changements de susceptibilité du pathogène face à différents antibiotiques seront évalués en présence de souches partenaires possibles provenant du microbiote intestinal humain. Un changement de susceptibilité à un antibiotique peut révéler des informations sur son mécanisme d'entrée dans la cellule, sa métabolisation et son mode d'action. À plus long terme, le but du projet sera d'identifier de nouvelles cibles potentielles pour de nouveaux traitements antibiotiques contre le pathogène *S. Typhimurium*. Le développement d'une nouvelle cible thérapeutique pourrait permettre de spécialiser le traitement des infections causées par ce

pathogène et ainsi limiter l'utilisation massive des antibiotiques courants, ce qui permettrait de limiter la propagation de la résistance chez cette souche pathogène.

1.5.1 Objectif I

Le premier objectif du projet sera donc d'identifier des interactions entre la souche pathogène *S. Typhimurium* et des souches du microbiote intestinal humain. Nous pensons que puisque le site d'infection du pathogène est déjà habité par les différentes souches de la communauté du microbiote, *S. Typhimurium* n'a d'autres choix que d'interagir avec ces souches pour réussir sa colonisation. Tel que discuté plus haut, les interactions entre les microorganismes sont très communes, quoique peu étudiées. C'est pourquoi l'avancement des connaissances sur les diverses interactions pouvant se produire au sein de cette communauté est important et nous fournira des informations clés sur l'effet de la communauté sur la physiologie ou la susceptibilité du pathogène à différents antibiotiques.

1.5.2 Objectif II

Le second objectif portera de façon plus précise sur la caractérisation de l'interaction entre les souches de *Lactobacillus* spp. et le pathogène *S. Typhimurium*. Cette interaction, identifiée dans les étapes préliminaires du projet, est observée en présence d'azithromycine. Puisque cet antibiotique en est un d'intérêt pour le pathogène ciblé ici, le changement de susceptibilité à cette molécule demeure intrigant. Nous pensons donc qu'avec l'aide de la collection SGD, des gènes essentiels chez *S. Typhimurium* pourraient être identifiés dans ces conditions. Ceci permettrait donc de débiter l'objectif à long terme qui consiste à identifier des cibles pour de nouvelles molécules antibiotiques.

CHAPITRE 2
PROBIOTIC *LACTOBACILLUS* STRAINS DECREASE THE SUSCEPTIBILITY OF
***SALMONELLA* TYPHIMURIUM TO THE LAST RESORT ANTIBIOTIC**
AZITHROMYCIN.

2.1 Prologue

2.1.1 Mise en contexte

L'article ci-présent démontre l'étude de l'interaction entre le pathogène d'intérêt *Salmonella* Typhimurium et les souches probiotiques de *Lactobacillus* spp.. Suite à l'investigation des différentes interactions possibles entre le pathogène et des souches du microbiote intestinal humain, cette interaction particulière a été investiguée et caractérisée. L'interaction a d'abord été identifiée en combinant le pathogène avec les souches *Lactobacillus rhamnosus* et *Lactobacillus reuteri* en présence d'AZM. Cet antibiotique en est un de dernier recours pour le traitement des infections à *S. Typhimurium* et donc l'interaction a par la suite été caractérisée. Pour ce faire, une collection de mutants de délétions simples de *S. Typhimurium* (SGD) a été utilisée. L'utilisation de la SGD a ainsi permis d'identifier les gènes importants dans le métabolisme de *S. Typhimurium* en présence d'une souche probiotique de *Lactobacillus* et d'AZM. Ainsi, cet article démontre qu'un changement majeur au niveau du métabolisme de *S. Typhimurium* peut survenir en présence de *L. rhamnosus* ce qui diminue sa susceptibilité face à l'AZM. De plus, l'article témoigne de l'importance de l'étude des interactions possibles entre les microorganismes retrouvés dans un environnement tel que le microbiote puisque de nombreuses interactions pouvant modifier la susceptibilité des pathogènes aux antibiotiques peuvent y prendre place.

2.1.2 Apport des auteurs

Ce manuscrit a été réalisé à partir de mes travaux de maîtrise uniquement. J'ai donc réalisé toutes les expériences ci-décrites sous la supervision de Jean-Philippe Côté. Pr. Côté a également apporté son soutien pour les analyses bio-informatiques qui ont été effectuées pour l'obtention des résultats présentés dans ce manuscrit en plus de faire la révision du présent document.

2.1.3 Référence

L'article ici présent a été rédigé en prévision d'une soumission au journal *mBio* de l'*American Society for Microbiology*.

Blais, L. Côté, J.P. (2023). Probiotic *Lactobacillus* strains decrease the susceptibility of *Salmonella* Typhimurium to the last resort antibiotic azithromycin. *mBio*, In preparation.

2.2 Page titre

PROBIOTIC *LACTOBACILLUS* STRAINS DECREASE THE SUSCEPTIBILITY OF *SALMONELLA* TYPHIMURIUM TO THE LAST RESORT ANTIBIOTIC AZITHROMYCIN.

Authors: *Blais, L.¹ & Côté, J.P.¹*

Affiliations :

¹Département de biologie, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1K 2R1

***Corresponding author : jean-philippe.cote2@usherbrooke.ca**

2.3 Abstract

Bacteria are involved in many interactions during events of co-infection and among microbial populations such as the gut microbiota. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is an important foodborne pathogen and a great model to study interactions that may occur in a microbial community. When antibiotic treatments are required, *Salmonella* is typically treated with first line antibiotics like fluoroquinolones or azithromycin (AZM). In the present study, we found that when *S. Typhimurium* is co-cultured with the probiotic strains of *Lactobacillus* spp., a change in the pathogen's susceptibility to AZM occurs where its minimal inhibitory concentration (MIC) goes from 2 µg/ml to 32 µg/ml. A similar observation was made when *S. Typhimurium* was cultured in the presence of filtered spent media from *Lactobacillus* spp., where the MIC of *S. Typhimurium* for AZM increased to 64 or 32 µg/ml depending on the probiotic strains tested. To further understand how *Lactobacillus* spp. modifies the sensitivity of *S. Typhimurium* to AZM, a high-throughput assay was developed to probe the interactions between the *S. Typhimurium* collection) of single gene deletion mutants (SGD and the probiotic *L. rhamnosus*. Genes of importance for this interaction were either related to cell surface and transmembrane transport or cellular respiration, which suggests a possible mechanism of resistance for *S. Typhimurium* induced by the presence of *Lactobacillus* spp. We also investigated the role of acidic pH and found that a pH of 5.5 induces tolerance of AZM for *S. Typhimurium* similarly to *Lactobacilli* strains. However, the genes essential for this interaction were significantly different from those essential in the presence of *L. rhamnosus*.

2.4 Importance

This study revealed significant microbial interactions involving *S. Typhimurium* that can affect its susceptibility to antibiotic treatments. Our results specifically show the changes that occur in *S. Typhimurium* during and interaction with probiotic strains from *Lactobacillus* spp. in the presence of azithromycin, an antibiotic of last resource when it comes to the treatment of *S. Typhimurium* infections. Since antibiotic resistance is an ongoing problematic of our world,

this study shows that the determination of resistance for a given pathogen should consider other strains found in its environment, since they may participate in changing its susceptibility to different antibiotic compounds. Furthermore, this study participates in the general understanding of microbial interactions that may cause changes in the sensitivity of pathogens to antibiotics, which still remain mostly unknown.

2.5 Introduction

Antibiotic resistance is a major public health concern worldwide. A recent study confirmed that the impact of antimicrobial resistance (AMR) is worse than the predictions made in 2016 indicating that annual deaths associated with AMR would reach 10 million by 2050 (Murray et al., 2022; O'Neill, 2016). This increase of AMR is the consequence of many problems, notably the inadequate use of antibiotics and the slow discovery rate of new antimicrobial compounds (Chatterjee et al., 2018; The Pew Charitable Trusts, 2021). In addition, horizontal gene transfer contributes to the fast dissemination of AMR genes, particularly in environments such as the gastrointestinal tract where microorganisms are in close proximity (Smillie et al., 2011). However, the mechanisms explaining how the environment contributes to the propagation of AMR genes are not typically considered.

In environments like the human gut, bacteria are found in an heterogeneous community containing various species along with other types of microorganisms (Sibinelli-Sousa et al., 2021). The high density of microorganisms in the human gut microbiota promote proximity between cells and therefore favors interactions between microorganisms. Although the interest in interbacterial interactions in communities like the microbiota is spiking, the molecular mechanisms behind these interactions are difficult to study and remain mostly unknown. Nonetheless, the well-described interplay between *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* has shown the importance of studying the interactions between microorganisms colonizing the same ecological niche. For example, metabolites produced by *P. aeruginosa* stimulate biofilm production by *S. aureus* (Fugère et al., 2014), and modify its

susceptibility to vancomycin by reducing the rate of ATP produced by the cell (Radlinski et al., 2017). Interestingly and not surprisingly, the co-incubation of *S. aureus* and *P. aeruginosa* greatly influence the gene essentiality profiles of the bacteria (Ibberson et al., 2017). Indeed, the essentiality status of more than 250 *S. aureus* genes is changed when *P. aeruginosa* is present, and many essential genes become dispensable while some otherwise dispensable genes become essential. Unfortunately, not many interactions have been studied using such genome-wide approaches.

Salmonella enterica serovar Typhimurium is a Gram-negative, rod-shaped bacteria and is part of the non-typhoidal *Salmonella* species. It is a well-known foodborne pathogen causing around 1,35 million of infections each year in the US (US Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Worldwide, this common pathogen leads to about 155 000 deaths yearly, with a greater importance in developing countries (Majowicz et al., 2010). *S. Typhimurium* infections can lead to Salmonellosis, which is characterized by fever, nausea and diarrhea (World Health Organization, 2018). In most cases, this infection can be resolved without any antibiotic treatment although some patients at higher risks require antibiotic treatment. In these cases, the first line antibiotics are ciprofloxacin or ceftriaxone (Acheson & Hohmann, 2001; US Centers for Disease Control and Prevention, 2019). However, 10% of the non-typhoidal *Salmonella* that caused infections in the US showed a resistance to ciprofloxacin in 2017 (US Centers for Disease Control and Prevention, 2019). Therefore, macrolides like azithromycin are used as last resort antibiotics.

In recent years, our capacity to perform functional genomics analysis has taken a big step forward. This was partly enabled by the optimization of Tn-Seq approaches (Cain et al., 2020) and by the creation of ordered genome-wide deletion collections for which each non-essential gene is deleted and replaced by an antibiotic resistance cassette. One well-known example is the Keio collection of *Escherichia coli* K-12 (Baba et al., 2006). As opposed to Tn-seq approaches where all transposon mutants are contained in a single pool, the Keio collection enables the evaluation of every gene deletion individually. For example, each mutant can be observed

individually and as performed by French *et al*, morphology changes can be directly linked to the deletions (French et al., 2017). Many other ordered single-gene deletion collections have now been created in various bacterial species, including *S. Typhimurium* strain 14028 (Porwollik et al., 2014).

Here, we aimed to identify and characterize genetic interactions between *S. Typhimurium* and strains from the human gut microbiota. We used changes in the susceptibility of *S. Typhimurium* to various antibiotics as a manifestation of interactions. Interestingly, we found that probiotic strains of *Lactobacillus* spp. decreased the susceptibility of *S. Typhimurium* to azithromycin. We then characterized this tolerance to azithromycin in the presence of *Lactobacillus* spp. using the *Salmonella* single-gene deletion collection and found that genes involved in cell surface and transmembrane transport as well as cell respiration were needed for this interaction to take place.

2.6 Materials and Methods

2.6.1 Bacterial strains and growth conditions

Bacterial strains used in this project are listed in table 2.1. Most of the strains were obtained from the Human Microbiome Project (HMP) and were cultured in Brain-Heart infusion broth (BHI) or supplemented BHI broth (BHIS) prepared according to Lau *et al* (Lau et al., 2016). All strains were grown at 37 °C. The single-gene deletion collection (SGD) of *S. Typhimurium* was maintained in BHI broth supplemented in kanamycin (KAN) at a concentration of 50 mg/ml (Porwollik et al., 2014).

Table 2.1. Bacterial strains and their origin.

Strains	Niche	Obtained from
<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium ATCC 14028	Poultry tissues	ATCC ¹
<i>Bifidobacterium adolescentis</i> L2-32	GI tract	HMP ²
<i>Bifidobacterium breve</i> HPH0326	GI tract	HMP ²
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> 2-2B	GI tract	HMP ²
<i>Bacillus subtilis</i> 168	Soil	UdS ³
<i>Enterobacter aerogenes</i> UCI 15	GI tract	HMP ²
<i>Escherichia coli</i> MS 110-3	GI tract	HMP ²
<i>Enterococcus faecalis</i> HH22	GI tract	HMP ²
<i>Enterococcus faecalis</i> TX0104	GI tract	HMP ²
<i>Enterococcus faecium</i> TX0082	Blood	HMP ²
<i>Enterococcus faecium</i> TX1330	GI tract	HMP ²
<i>Klebsiella oxytoca</i> MIT 10-5249	Blood	HMP ²
<i>Klebsiella pneumoniae</i> WGLW3	GI tract	HMP ²
<i>Klebsiella pneumoniae</i> WGLW2	Airways	HMP ²
<i>Lactobacillus reuteri</i> CF48-3A	GI tract	HMP ²
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> LMS2-1	GI tract	HMP ²
<i>Pseudomonas</i> sp. 2_1_26	GI tract	HMP ²
<i>Pseudomonas</i> sp. HPB0071	GI tract	HMP ²
<i>Proteus mirabilis</i> WGLW4	Urogenital tract	HMP ²
<i>Proteus mirabilis</i> WGLW6	GI tract	HMP ²
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 130	Skin	HMP ²
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MN8	Urogenital tract	HMP ²
<i>Staphylococcus aureus</i> USA300 LAC	Unknown	UdS ³
<i>Staphylococcus epidermidis</i> BCM-HMP0060	Skin	HMP ²
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> DNF00585	Urogenital tract	HMP ²
<i>Serratia marcescens</i> Bizio ATCC 8100	Urogenital tract	ATCC ⁴

¹ ATCC. (2022). *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (ex Kauffmann and Edwards) Le Minor and Popoff serovar Typhimurium 14028 TM. www.atcc.org

² Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. In *Nature* (Vol. 449, Issue 7164, pp. 804–810). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nature06244>

³ Lab stock, Université de Sherbrooke, Jean-Philippe Côté's Laboratory, Department of Biology, Science Faculty, Sherbrooke, Qc, Ca.

⁴ ATCC. (2022). *Serratia marcescens* Bizio 14756 TM. www.atcc.org

2.6.2 Products and solutions

A panel of antibiotic compounds was selected to cover the most important antibiotic classes. Azithromycin (AZM), meropenem (MEM) and sulfamethoxazole (SMX) were obtained from Sigma Aldrich and diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO). Tetracycline (TET), novobiocin (NOV), cefuroxime (CXM), ceftriaxone (CRO) and colistin (COL) were also obtained from Sigma Aldrich but were resuspended in water. Rifampicin (RIF), erythromycin (ERY), nalidixic acid (NAL) and trimethoprim (TMP) were obtained from Bio Basic and solubilized in DMSO. Streptomycin (STR), gentamycin (GEN), ampicillin (AMP), kanamycin (KAN), ciprofloxacin (CIP) and vancomycin (VAN) were also obtained from Bio Basic but were prepared in water. Lastly, apramycin (APR) was obtained from Alfa Aesar and was diluted in water.

2.6.3 Minimal inhibitory concentration assay

Determination of the minimal inhibitory concentration (MIC) of the strains against AZM and RIF was adapted from the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2018). Briefly, each strain was grown until a dense culture was obtained, then diluted by a factor of 1000. 50 µl of diluted cultures were then put in the presence of 2-fold dilution series of the antibiotics to be tested in a 96 wells plate starting at 256 µg/ml. The MIC, corresponding to the lowest concentration to inhibit visible growth, was determined after 18h incubation at 37°C.

The MIC determination assay was also performed in acidic conditions. For this, strains were grown until a dense culture was obtained, then diluted by a factor of 1000. An appropriate

volume of BHI was then acidified to a pH of 5.5 with a solution of HCl 1N. This acidified BHI solution was used to dilute the different antibiotics to be tested in serial dilutions in 96 wells plates. As adapted from the CLSI guidelines (CLSI, 2018), diluted cultures of the target strains were then put in the presence of the antibiotics and pH 5.5 for 18 to 20 h at 37°C. The MIC of the target strains was then determined visually after the incubation.

2.6.4 Coculture minimal inhibitory concentration assay

The MIC of *S. Typhimurium* ATCC 14028 against different antibiotics was also determined in the presence of several companion strains from the HMP, notably with *L. reuteri* CF48-3A, *L. rhamnosus* LMS2-1, *E. coli* BW25113 and *E. coli* MS110-3. The method for these combination assays was also adapted from the CLSI guidelines (CLSI, 2018).

For cocultures with overnight cultures of companion strains, these were grown for 18 h at 37°C with agitation. *S. Typhimurium* was also grown until a dense culture was obtained, then diluted by a factor of 1000. The diluted culture of *Salmonella* was then used to make serial dilutions of the desired antibiotics in 96 wells plates. Then, overnight cultures of the partner strains were added to the 96 wells plates. The coculture plates were then incubated for 18 to 20 h at 37°C. After the incubation, 5 µl of each well was plated on Salmonella Shigella (SS) agar. The agar plates were incubated 18 to 20 h at 37°C, after which the MIC of *S. Typhimurium* was determined visually. A resume of this method is shown in figure 1A.

For cocultures with supernatants of companion strains, the strains were grown for 18 h at 37°C with agitation. The overnight cultures were then centrifugated at 3724 x g for 10 min. The resulting supernatant was collected and filtered with a sterile 0.22 µm syringe filter. 50 µl of the sterile supernatants were then added to the 96 wells plate containing the diluted *S. Typhimurium* and the antibiotics, as described above.

2.6.5 Growth curve assay

S. Typhimurium ATCC 14028 was grown in 5 ml of BHI for 18 h at 37°C, with shaking. *S. Typhimurium* was then diluted by a factor of 1000 in BHI. 2.5 ml of the diluted *Salmonella* culture was then combined with BHI and the appropriate AZM concentration, for a final volume of 5 ml and final antibiotic concentrations of 128, 64 or 32 µg/ml. *S. Typhimurium* was grown in the presence of AZM for a total of 24 h at 37°C, with shaking at 200 rpm. At each time points, 0, 0.5, 1, 3, 6, 10, 12 and 24 h, 50 µl of the culture was diluted in series in a 96 wells plate containing sterile PBS. The viability of *Salmonella* was then determined by plating 5 µl of the serial dilutions on SS agar. After 20 h of incubation at 37°C, the CFU/ml was determined visually from the SS plates.

2.6.6 Coculture growth curve assay

S. Typhimurium ATCC 14028 and companion *Lactobacilli* strains were grown separately in 5 ml of BHI for 18 h at 37°C, with shaking. *S. Typhimurium* was then diluted by a factor of 1000 in BHI. 2.5 ml of overnight *Lactobacillus* culture was combined with the diluted *S. Typhimurium* culture and the appropriate concentration of AZM, for a final volume of 5 ml and a 50:50 volume ratio of overnight *Lactobacillus*:diluted *Salmonella*. *S. Typhimurium* was grown in the presence of AZM and *L. reuteri* or *L. rhamnosus* for a total of 24 h, at 37°C with shaking at 200 rpm. The viability of *S. Typhimurium* was assessed by diluting the cocultures in PBS and plating 5 µl on SS agar, at each time point mentioned above (see 2.6.5).

The coculture growth curve assays were also performed with *Lactobacilli* supernatants. *Lactobacilli* supernatants were obtained from an 18 h culture, grown at 37°C with shaking. The overnight culture was centrifuged at 3724 x g for 10 min and the supernatant obtained was filtered with a sterile 0.22 µm syringe filter. 2.5 ml of *L. reuteri* or *L. rhamnosus* supernatant were combined with the diluted *S. Typhimurium* culture and the appropriate concentration of AZM, for a final volume of 5 ml and a 50:50 ratio of *Lactobacillus* supernatant:diluted

Salmonella. The culture was grown for a total of 24 h, at 37°C with shaking at 200 rpm. The viability of *S. Typhimurium* was assessed at each time point, like mentioned above (see 2.6.5).

For supernatants in exponential phase, *Lactobacilli* strains were grown until an OD₆₀₀ of 0.8-0.9 was obtained. Then, the cultures were centrifuged at 3724 x g for 10 min and the resulting supernatant was filtered with a sterile 0.22 um syringe filter. The coculture growth curve assay method continued from here, as mentioned above.

2.6.7 Upscaled coculture assay

S. Typhimurium SGD collection was grown 18 h at 37°C in 384 wells plates filled with 50 µl of BHI. The companion strain *L. rhamnosus* was grown separately in 25 ml of BHI at 37°C for 18 h. The combination was then performed in new 384 wells plates. 25 µl of overnight *L. rhamnosus* culture were put in the plates, followed by 25 µl of BHI with the appropriate concentration of AZM. Then, the SGD collection was inoculated in the 384 wells coculture plate with the Singer Rotor HDA. The combination was incubated for 18 h at 37°C. The viability of *S. Typhimurium* was then determined by pinning the 384 wells coculture plates on SS agar, which were incubated for 16 h at 37°C. Following the incubation, images of each plate were taken in transmission mode with the Phenobooth from Singer Instruments for analysis.

This high-throughput method was also performed under specific pH conditions. For this, *S. Typhimurium* SGD collection was grown 18 h at 37°C in 384 wells plates filled with 50 µl of BHI. To replace the acidic part of the coculture that was brought by the *L. rhamnosus* culture, a desired volume of BHI was acidified to the desired pH with a solution of HCl 1N. Then, in new 384 wells plates, 25 µl of BHI at the desired pH was combined with 25 µl of normal BHI with the appropriate concentration of AZM, thus reproducing the ratio that was done in the coculture assay above. Then, the SGD collection was inoculated in the 384 wells plates with the Singer Rotor HDA and the plates were incubated for 18 h at 37°C. Finally, as mentioned above, the viability of *S. Typhimurium* was determined by pinning the 384 wells coculture plates on

SS agar, which were incubated for 16 h at 37°C. Following the incubation, images of each plate were taken with Singer Instruments' Phenobooth for analysis.

Images of the bacterial growth on SS agar plates were analyzed by an in-house analysis pipeline, as described previously (French et al., 2016). Briefly, images are first analyzed through ImageJ (Schneider et al., 2012) to measure the density of each colony. Density values are then normalized with the *lowess* function in R, which produces the relative growth of each SGD mutants.

2.7 Results

2.7.1 Interactions between *S. Typhimurium* and gut microbiota isolates.

We first developed a simple method to evaluate if a strain could affect the susceptibility of *S. Typhimurium* to different antibiotics (fig. 2.1A). Our method relies on the selection of *S. Typhimurium*, following the co-incubation with another bacterial species in the presence of antibiotics, on a selective and differential media. As a proof of concept, we tested the combination of *S. Typhimurium* with *Staphylococcus aureus* strain 130, which encodes a β -lactamase (Olson et al., 2023). In the presence of ampicillin (AMP), *S. aureus* 130 allowed *S. Typhimurium* to grow even at high concentration of the antibiotic. *S. Typhimurium*'s MIC went from 8 $\mu\text{g/ml}$, when grown alone, to 128 $\mu\text{g/ml}$ in the presence of *S. aureus* 130 (fig. 2.1B). In this case, the expression and secretion of a β -lactamase by *S. aureus* 130 will inactivate AMP molecules and result in a higher MIC observed for *S. Typhimurium* when co-cultured with *S. aureus* 130.

A large number of combinations of *S. Typhimurium* and bacterial species isolated from the gut microbiota were then tested against a panel of antibiotics, covering most of the different antibiotic classes (supplementary table 1). Several interesting interactions were observed in the presence of azithromycin (AZM)

Because AZM is used to treat non-typhoid *Salmonella* infections (Anandabaskar, 2021), we were particularly interested in the high-MIC to AZM observed when *S. Typhimurium* was cocultured with probiotics strains of *Lactobacillus*. Other bacterial strains such as *Bifidobacterium adolescentis*, *B. breve*, *B. longum* subsp. *longum*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, and *Staphylococcus aureus* also changed the susceptibility of *S. Typhimurium* to AZM but were not further studied in this work. When we repeated the experiments combining the co-cultures of *S. Typhimurium* with *Lactobacillus rhamnosus* LMS2-1 or *L. reuteri* CF48-3A in the presence of AZM, *Salmonella*'s MIC for AZM went from 2 µg/ml to 32 µg/ml (fig. 2.1C) (Anandabaskar, 2021). Rifampicin (RIF) was used as a control antibiotic since the observed interaction did not occur with this antibiotic compound, therefore the MIC of *S. Typhimurium* for this antibiotic did not vary significantly (fig. 2.1D).

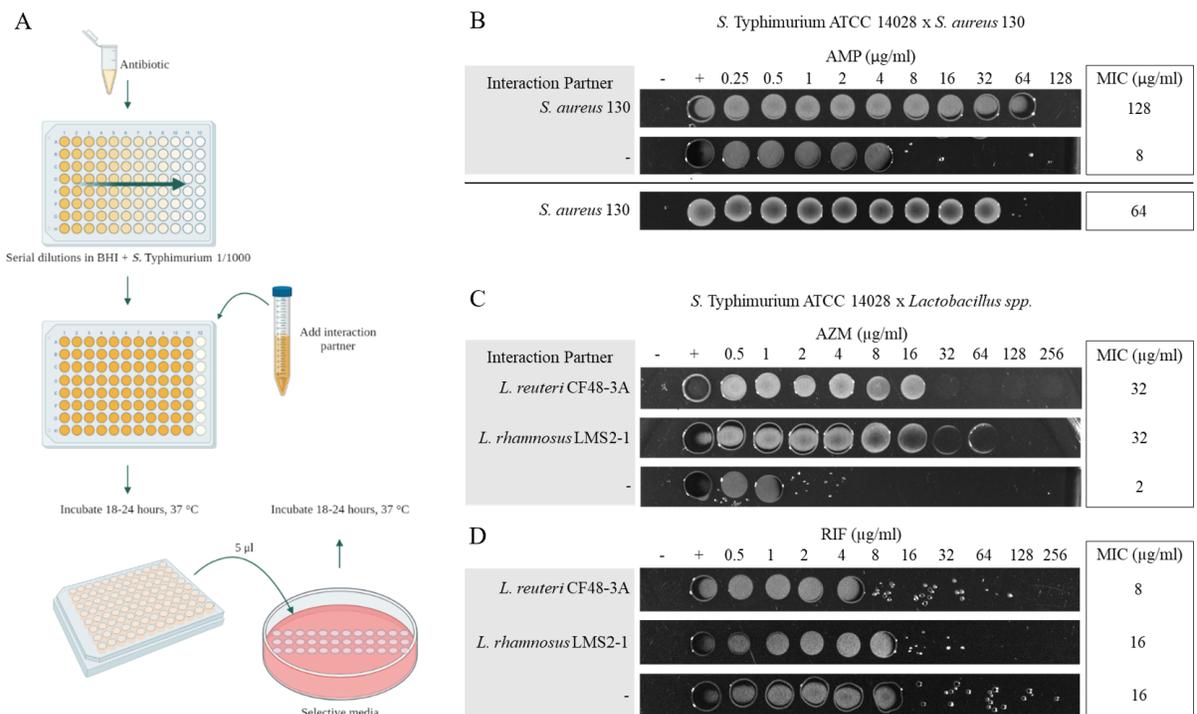


Figure 2.1. The susceptibility of *Salmonella Typhimurium* to azithromycin decreases when cocultured with strains of the *Lactobacillus* genre. (A) Summary of the method used to

determine the susceptibility of *S. Typhimurium* to different antibiotics following a co-culture. Co-cultures were performed in BHI media. After incubation, *S. Typhimurium* is selected by spotting 5 μ L of the co-cultures on SS agar. (B) Demonstration of the results that can be obtained from the method with the combination of *S. Typhimurium* and *S. aureus* 130. The combination was done in the presence of increasing concentrations of ampicillin (AMP). *S. Typhimurium*'s MIC is shown on SS agar. *S. aureus*'s MIC is shown on LB agar. (C) Changes in *S. Typhimurium*'s susceptibility to azithromycin (AZM) when cocultured with *Lactobacillus* sp. *S. Typhimurium*'s MIC is shown on SS agar either alone with the antibiotic or in combination with *Lactobacillus*. (D) The strain combination was also performed with the control antibiotic rifampicin (RIF).

2.7.2 Antibiotic resistance specificity to the identified interaction

After finding that the MIC of *S. Typhimurium* for azithromycin increased in the presence of *Lactobacillus* spp., we verified if this was specific for AZM. Combination experiments between our pathogen and the two *Lactobacilli* previously mentioned were performed with a panel of antibiotics, and the change in *Salmonella*'s MIC was assessed (fig. 2.2). Our results showed that only the MIC of *S. Typhimurium* against AZM significantly increased in the presence of the *Lactobacilli* strains, suggesting that this the tolerance phenotype could be specific to AZM. However, it is to be noted that in the presence of *L. reuteri*, *S. Typhimurium*'s MIC to colistin was reduced by 0.125 folds.

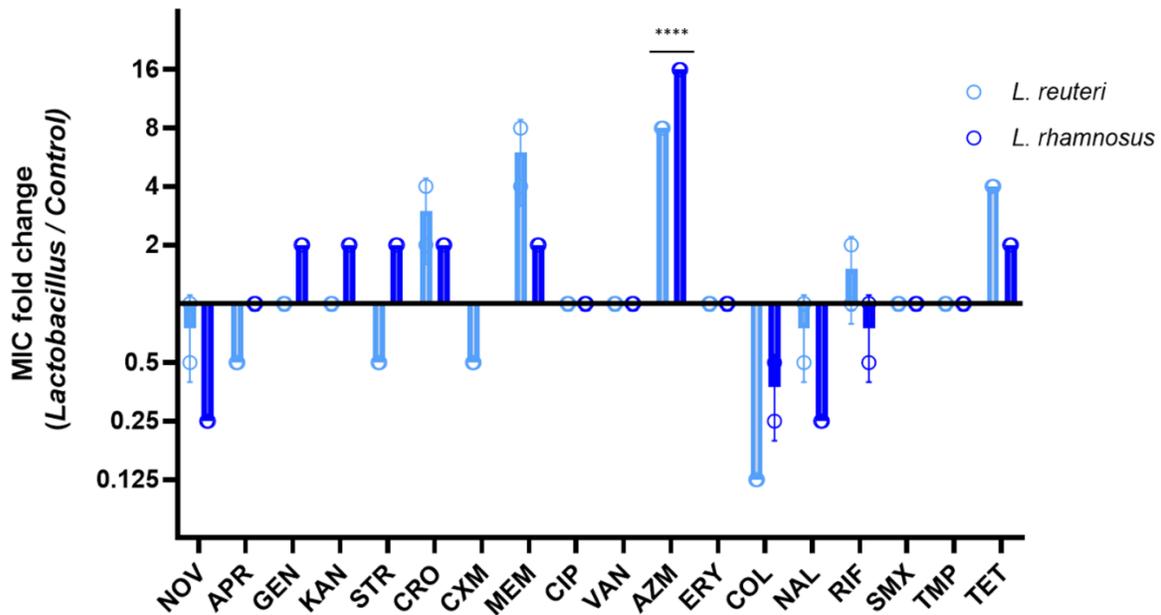


Figure 2.2. Fold change in the MIC of *S. Typhimurium* against several antibiotics in the presence of *Lactobacillus* spp. Fold change was determined by producing a ratio of the MIC of *S. Typhimurium* in the presence of *Lactobacillus* spp. and alone against a selected panel of antibiotics. MIC were performed in biological duplicates. Two-way ANOVA was performed, only for AZM was the fold change for both *Lactobacilli* significant, shown on the graph. Here, NOV is novobiocin, APR is apramycin, GEN is gentamycin, KAN is kanamycin, STR is streptomycin, CRO is ceftriaxone, CXM is cefuroxime, MEM is meropenem, CIP is ciprofloxacin, VAN is vancomycin, AZM is azithromycin, ERY is erythromycin, COL is colistin, NAL is nalidixic acid, RIF is rifampicin, SMX is sulfamethoxazole, TMP is trimethoprim and TET is tetracycline.

S. Typhimurium is often used as a model pathogen because of the way it infects its host and because of its similarities with *Escherichia coli* (AbuOun et al., 2009). Therefore, after confirming that the interaction of *S. Typhimurium* with *Lactobacilli* species specifically occurred with AZM, we wanted to confirm that it was also unique to *S. Typhimurium*. Thus, we performed the combination of *Lactobacilli* strains with *E. coli* and found that in the presence of

AZM, no significant change in *E. coli*'s MIC occurred meaning that the interaction is not taking place between *E. coli* and *Lactobacillus* spp. (table 2.2).

Table 2.2. MIC of azithromycin for *E. coli* from cocultures with *Lactobacillus* spp.

Strains in combination with <i>E. coli</i>	MIC of <i>E. coli</i> in cocultures ($\mu\text{g/ml}$)	
	AZM	RIF
<i>E. coli</i> BW25113	2	16
<i>L. reuteri</i> CF48-3A	8	8
<i>L. rhamnosus</i> LMS2-1	16	8

All MIC were performed in biological triplicates and technical duplicates.

2.7.3 Cell-free supernatants of high-density *Lactobacillus* spp. cultures

Up to this point, the interaction observed was performed with high-density cultures of *Lactobacillus* species. To determine if the key element to this interaction was secreted by the *Lactobacilli*, we produced cell-free supernatants (CFS) of the two *Lactobacilli* strains and evaluated the MIC of *S. Typhimurium* against azithromycin. As is shown in table 2.3, the CFS from both *Lactobacilli* strains did increase the MIC of *S. Typhimurium* against azithromycin from 4 $\mu\text{g/ml}$ to 64 $\mu\text{g/ml}$ for *L. rhamnosus* and to 32 $\mu\text{g/ml}$ for *L. reuteri*. The CFS of the *Lactobacilli* strains did not change MIC against rifampicin as expected.

To further investigate the specific effect of the CFS on the susceptibility of *S. Typhimurium* to AZM, the CFS of *L. rhamnosus* and *L. reuteri* were fractioned by molecular weight (table 2.3). < 10 kDa and < 3 kDa fractions gave similar MIC values to AZM for *S. Typhimurium* to whole CFS for both *Lactobacillus* spp. However, the > 3.5 kDa fraction did not affect the MIC of *S. Typhimurium* against AZM. Our results suggest that only *Lactobacilli* CFS containing molecules smaller than 3 kDa were able to produce the expected and previously observed increase in MIC. This gave a significant clue to the possible cause of this interaction between

S. Typhimurium and *Lactobacillus* spp. in the presence of AZM. The compound in action here must be a small molecule secreted by both *L. rhamnosus* and *L. reuteri*.

Table 2.3. MIC of azithromycin for *S. Typhimurium* in the presence of cell-free supernatants from *Lactobacillus* spp. cultures.

CFS in combination with <i>S. Typhimurium</i>	MIC of <i>S. Typhimurium</i> ($\mu\text{g/ml}$)	
	AZM	RIF
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	4	8
<i>L. rhamnosus</i> CFS	64	4
<i>L. rhamnosus</i> CFS 10 kDa	64	8
<i>L. rhamnosus</i> CFS > 3.5 kDa	2	8
<i>L. rhamnosus</i> CFS < 3 kDa	64 - 128	8
<i>L. rhamnosus</i> neutralized CFS	4 - 8	8
<i>L. reuteri</i> CFS	32	4
<i>L. reuteri</i> CFS 10 kDa	32	4
<i>L. reuteri</i> CFS > 3.5 kDa	2	8
<i>L. reuteri</i> CFS < 3 kDa	16 - 32	8
<i>L. reuteri</i> neutralized CFS	2 - 4	8

All MIC were performed in biological triplicates and technical duplicates.

In order to verify if the molecule of interest is secreted at a specific moment during the interaction, growth curves experiments were performed. The growth of *S. Typhimurium* was assessed in the presence of both *Lactobacilli* strains either in dense culture or CFS. Three concentrations of AZM (32, 64 and 128 $\mu\text{g/ml}$) were used to determine the new level of tolerance of *S. Typhimurium* to AZM when the interaction could take place. Both curves in the presence of dense cultures of *Lactobacilli* allowed *S. Typhimurium* to grow at a concentration of 32 $\mu\text{g/ml}$, but only the presence of *L. rhamnosus* allowed its growth at concentrations of 64 and 128 $\mu\text{g/ml}$ (supp. fig. 2.1A, B). These growth curves also show that the beginning of growth is delayed by two hours in the presence of *L. reuteri* compared to the control growth. Growth curves in the presence of *Lactobacillus* spp. CFS also both allow *S. Typhimurium* to grow with 32 $\mu\text{g/ml}$ of AZM (supp. fig. 2.1C, D). Once again, these curves show that the growth of

S. Typhimurium begins 2 hours after that of the control growth for *L. rhamnosus* and 9 hours for *L. reuteri*. For the other concentrations tested, no growth of *S. Typhimurium* was observed.

2.7.4 The importance of an acidic pH

An important characteristic of *Lactobacilli* strains is that they produce many acidic compounds, notably lactic acid (de Keersmaecker et al., 2006). Accordingly, the pH of the CFS of *L. rhamnosus* and *L. reuteri* were 5.66 and 5.34 respectively. In contrast, the pH of a *S. Typhimurium* culture was 6.84. We therefore wanted to test the effect of pH on the observed change in MIC to AZM from *S. Typhimurium*. To do this, the CFS of *Lactobacillus* spp. were neutralized and used to perform combination assays. We observed that neutralized CFS did not allow *S. Typhimurium* to tolerate high concentrations of AZM (table 2.3, fig. 2.3), with MICs equivalent to *S. Typhimurium* alone against AZM. In order to verify if the sole presence of an acidic media caused a change in *S. Typhimurium*'s MIC to AZM, a combination assay was performed with the replacement of the interaction partner by an acidic culture media, here BHI at pH 5.5 (supp. table 2.2). We observed that the acidic media changed *S. Typhimurium*'s MIC to AZM from 4 µg/ml up to 64 µg/ml. Therefore, our results suggest that the pH of the environment in which *S. Typhimurium* was combined with *Lactobacilli* strains and AZM was essential to the increase in tolerance of the pathogen to AZM.

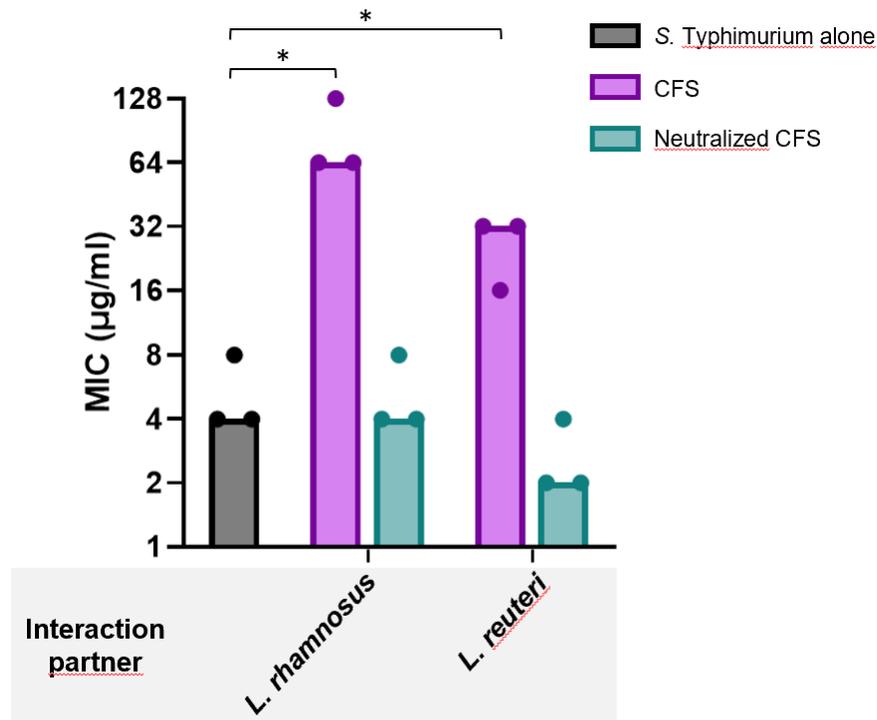


Figure 2.3. MIC of azithromycin for *S. Typhimurium* in the presence of acidic or neutralized CFS of *Lactobacillus* spp. The MIC of *S. Typhimurium* alone with azithromycin is 4 µg/ml. Initial pH of *L. rhamnosus* CFS was of 5,66 and 5,34 for *L. reuteri*. Neutralized CFS for both *Lactobacillus* had a pH of 7,00. MIC were determined in biological triplicates. Unpaired t test, p value of 0.0201 for *L. rhamnosus* and 0.0178 for *L. reuteri*.

2.7.5 Identifying important genes for *S. Typhimurium* during the interaction

To assess which genes of *S. Typhimurium* were contributing to the increased MIC against AZM in the presence of *L. rhamnosus*, we reproduced the combination experiment to a larger scale. This was done using the SGD collection created by Porwollik *et al.* (Porwollik *et al.*, 2014). Here, we combined high-density cultures of *L. rhamnosus* with the single-deletion mutants from the SGD with or without AZM at 32-fold MIC and we measured the subsequent growth of the *Salmonella* mutants on selective media (fig. 2.4A-B). Mutants showing a growth defect

specifically in the AZM condition indicated that their missing gene was essential for the observed decreased susceptibility to AZM. Therefore, 359 mutants were selected for further investigation and can be found in supplementary table 2.5 (also supp. tables 2.3, 2.5-9). Two groups of genes were particularly represented. The first included genes linked with the electron transport chain and bacterial respiration, like *cydBC*, *glpE*, *moeB*, *phsB*, *trxAB*, and *sdhAB*. The second group of genes of interest was linked to the bacterial cell surface, including transmembrane transport and cell motility, including *ompAC*, *pefCI*, *stfAD*, *traAR*, and *trbDE*.

We also performed a screen in acidified BHI to investigate the effects of acidified conditions in the presence of AZM and compare to the presence of *L. rhamnosus*. Therefore, for this experiment, we grew the SGD collection in BHI acidified to pH 5.5 using HCL with or without AZM at 128 µg/ml (fig. 2.4C-D). This time, 153 mutants were found to have a growth defect, which indicated the importance of their missing gene for the growth of *S. Typhimurium* in an acidic pH and with AZM (supp. tables 2.3-9). Interestingly, most genes that were hits with acidified conditions were different from the hits obtained in the presence of *L. rhamnosus*, with only 38 genes being shared between the two conditions (fig. 2.5). Although different genes were important for both phenotypes, similar functionality were represented in the genes that impacted the acidified media phenotype. Only two genes representing the respiration and electron transport chain were hits, *phsA* and *scsC*. However, genes linked to the cell surface, organisation or transport were much more present, including *dacA*, *yafK*, *ybhC*, *ybhR* & *stcB*. Together, our results suggest the observed increase in MIC to AZM is likely due to a modification of the cell envelope. Interestingly, our results also suggest that the mechanism by which *Salmonella* modifies its envelope when grown in the presence of *Lactobacilli* strains is different than a simple acidification of the culture media.

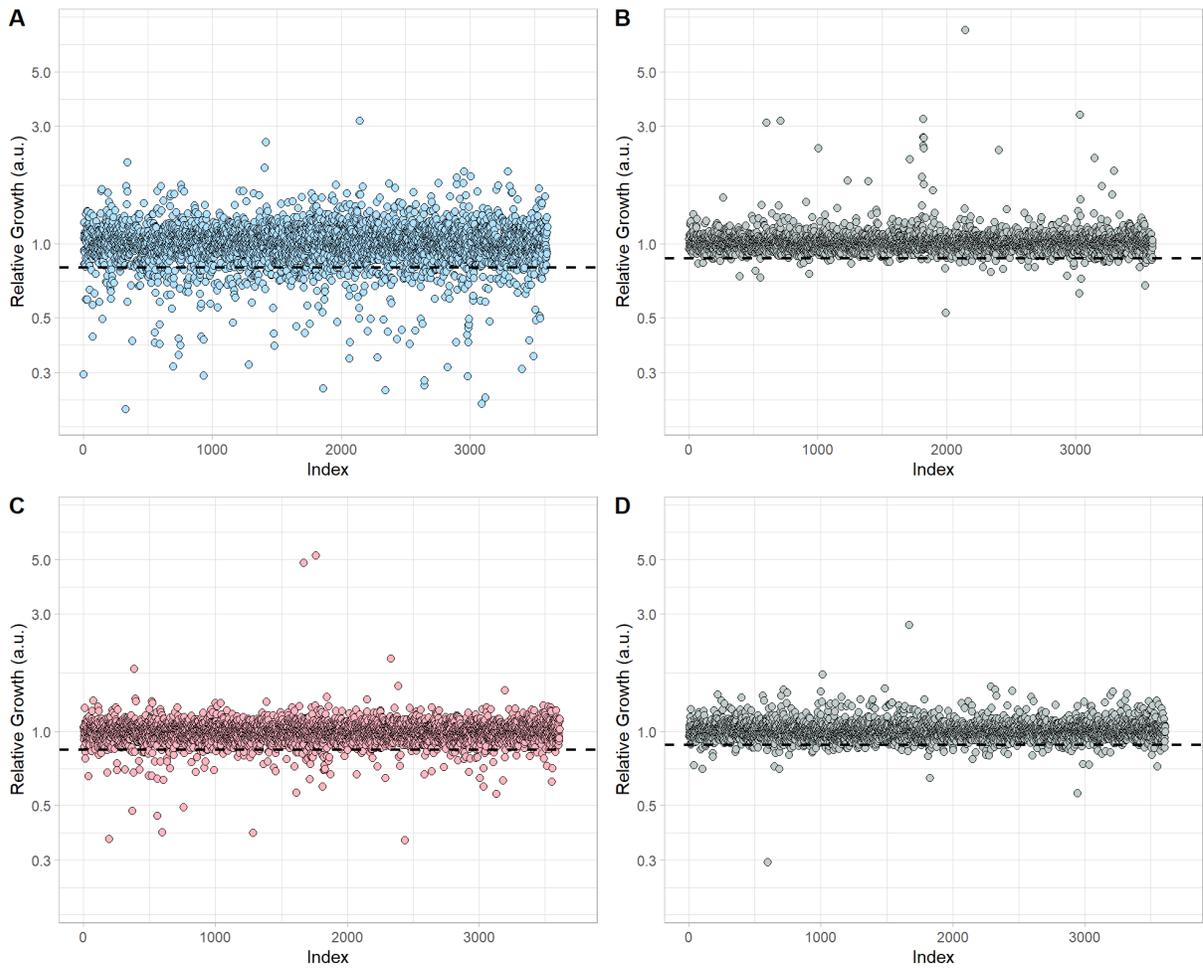


Figure 2.4. Relative growth of the SGD mutants when cocultured with *L. rhamnosus* or in an acidic media, in the presence of AZM. The y axis shows the ratio of relative growth between the reference growth of the SGD alone and the growth of the SGD in the appropriate condition. The x axis shows the index number of the different SGD mutants. Dotted lines indicate the threshold for growth defect mutants. A. Combination of the SGD with *L. rhamnosus* in the presence of AZM 128 $\mu\text{g/ml}$. B. Control growth of the SGD with *L. rhamnosus*. C. Combination of the SGD with BHI at a pH of 5.5 in the presence of AZM 128 $\mu\text{g/ml}$. D. Control growth of the SGD with BHI at a pH of 5.5.

2.8 Discussion

Interactions between microorganisms remain for the most part a mystery to the scientific community. Most of the knowledge of these interactions resides in either very specific or very large studies. The only well-described interbacterial interaction takes place between the pathogens *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The many possible effects that these two bacterial strains can have on each other demonstrate the importance of studying interbacterial interactions (Beaudoin et al., 2017; Mitchell et al., 2010; Pastar et al., 2013; Radlinski et al., 2017). Here, we sought to investigate interactions that could take place in other ecological habitats, notably in the gut microbiota which harbors a dense community of microorganisms. We hypothesized that when an intestinal pathogen tries to settle at its infection site, it must interact with the other microorganisms present in this community. But what are the impacts of these interactions on the pathogen itself? This is why we chose *S. Typhimurium*, a model pathogen, to study possible interactions that could take place between a pathogen and microorganisms found at its infection site, here the human gut microbiota. Specifically, the interaction between *S. Typhimurium* and probiotic strains from *Lactobacillus* spp. in the presence of AZM was investigated in this paper.

We identified that *S. Typhimurium* grown in the presence of *Lactobacillus* strains was less susceptible to AZM, which is a last resource antibiotic to treat infections from numerous food pathogens like *S. Typhimurium* itself (US Centers for Disease Control and Prevention, 2019). This increase in tolerance to AZM was shown in the presence of *Lactobacilli* strains; *L. rhamnosus* and *L. reuteri* and represented a 16-fold change. A similar increase in tolerance to AZM was shown in one study by Mouratidou *et al*, where the MIC of oral pathogens to AZM increased to 256 µg/ml when combined with each other (Mouratidou et al., 2011). However, the authors of this article did not study this observation in more depth (Mouratidou et al., 2011). Therefore, we looked further into the mechanism of action behind this increased tolerance of *S. Typhimurium* to AZM triggered by *Lactobacillus* strains. We found that sterile supernatants of *Lactobacillus* strains were also able to induce this phenotype, but that neutralization of the supernatants prevented the observed increased tolerance to AZM. AZM is stable in acidic

conditions (Anandabaskar, 2021), and thus the tolerance to AZM is not likely due to compound break down.

We then used a high-throughput systems biology approach to determine the mechanism of action that drives the increased tolerance of *S. Typhimurium* to AZM triggered by *Lactobacillus* spp. Our approach used the SGD collection made by Porwollik *et al.* and allowed us to identify genes that were essential for the growth of *S. Typhimurium* at high AZM concentrations in the presence of either *L. rhamnosus* or an acidic media (Porwollik *et al.*, 2014). Both screens highlighted many redundant processes that were important for the AZM tolerance, such as DNA repair, stress response and amino acids synthesis. However, two categories of genes were common in both screens and were of particular interest, cell respiration, and cell surface and transport. The first group was represented by 11 genes in the *L. rhamnosus* screen and by 2 genes in an acidified media screen. These genes may represent a change in the electron transport chain of *S. Typhimurium* that is induced by *L. rhamnosus*. For example, genes like *phsB*, *glpE*, *trxA* and *trxB* are related to thiosulfate metabolism. Thiosulfate can be obtained by the bacterial cell by reduction of tetrathionate molecules and can be used as an alternative electron acceptor (Hensel *et al.*, 1999). This alternative respiration could help the pathogen survive during an infection where other possible electron acceptors are less available. It is also noteworthy that only a few genera of Enterobacteriaceae, like *Salmonella*, *Proteus* and *Citrobacter* can use tetrathionate respiration (Barrett & Clark, 1987). Also, it was suggested that thiosulfate oxidation might be possible in an inflamed gut, which is characteristic of infections by *S. Typhimurium* (Santos *et al.*, 2009; Winter *et al.*, 2010). This would then allow the pathogen to use thiosulfate for its respiration during an infection. It is therefore possible that the use of thiosulfate as an alternative electron acceptor could have an effect on *S. Typhimurium*'s susceptibility to AZM.

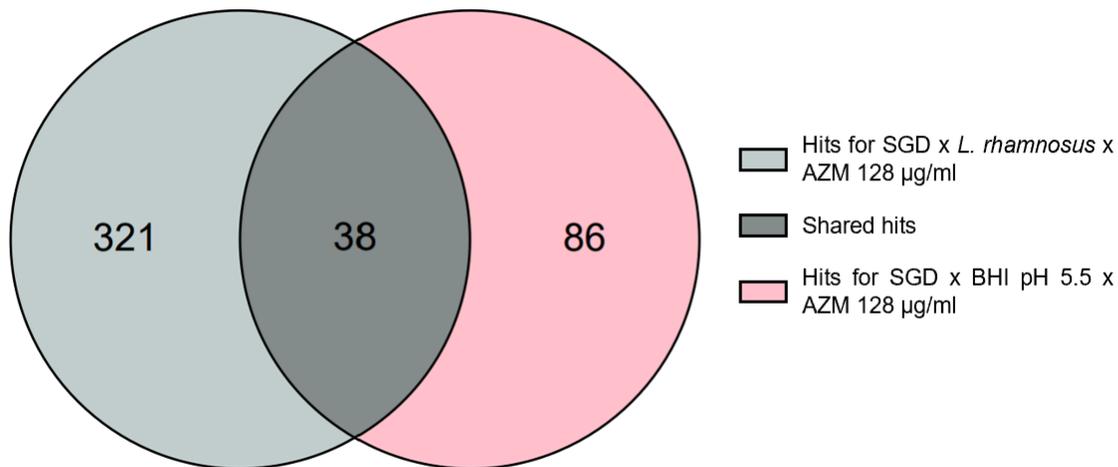


Figure 2.5. Venn diagram of the hits obtained from both high-throughput experiments. 38 genes are shared between the hits, 321 are unique to the presence of *L. rhamnosus* and AZM while 86 are unique to the presence of an acidic pH and AZM.

The second group of genes, corresponding to the cell surface and transport, was represented by 38 genes in the *L. rhamnosus* screen and by 16 genes in the acidified media screen. This suggests that the acidic pH caused either by *L. rhamnosus* or an acidified media may cause modifications to the cellular surface of the pathogen, which might affect the entry of AZM in the cell. Mechanisms of resistance to AZM normally include modification of cell permeability and expression of efflux pumps, however no genes of the latter were identified in our screen (Gomes et al., 2017; Li et al., 2015; Wilson, 2014). On the other hand, it is known that *Salmonella* can modify its membrane permeability in response to oxidative stress by modulating the opening of porins like OmpA and OmpC (van der Heijden et al., 2016), which are both genes that came out as hits in our screen of the SGD in coculture with *L. rhamnosus* and AZM. Therefore, our results suggest that acidic pH may induce modification the cell envelope of *S. Typhimurium*, notably by affecting porins like OmpA and OmpC, and thus reduce the permeability of its membrane, which could lead to a decrease passage of AZM across the cell envelope.

Further study of this particular interaction between *S. Typhimurium* and probiotic strains of *Lactobacillus* spp. will be necessary to fully understand how the *Lactobacilli* are able to induce a change in the pathogen's susceptibility to AZM. An interesting way to confirm the present hypothesis implying that the cellular envelope of *S. Typhimurium* would be modified by an acidic pH in favor to a higher tolerance to AZM, could be to observe *S. Typhimurium* cells in microscopy and assess how the presence of *Lactobacillus* species or an acidic pH could affect its cellular morphology, since it is known that pH stress can induce changes in bacterial cell morphology (Rao et al., 1984). Here we also acknowledge the limitations of this study, where this interaction can be observed *in vitro* but may not be *in vivo*. Since the human gut microbiota is a complex community of bacteria and other microorganisms, it is likely that the ratio of *S. Typhimurium* to *Lactobacillus* would be significantly reduced in this environment. Therefore, the change in *S. Typhimurium*'s susceptibility to AZM may not be observable in a human gut. However, the finding of this interaction between a well-known pathogen and probiotic strains from the human gut microbiota support the fact that bacterial interactions can take place in complex microbial communities and could possibly affect the efficacy of different antibiotic treatments.

2.9 Acknowledgments

We thank everyone at the Côté Lab in University of Sherbrooke for their support and input on the project. We also thank Isabelle Laforest-Lapointe for her wise advice on the evolution of this project.

2.10 References

AbuOun, M., Suthers, P. F., Jones, G. I., Carter, B. R., Saunders, M. P., Maranas, C. D., Woodward, M. J., & Anjum, M. F. (2009). Genome scale reconstruction of a *Salmonella* metabolic model: Comparison of similarity and differences with a commensal *Escherichia coli* strain. *Journal of Biological Chemistry*, 284(43), 29480–29488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.005868>

Acheson, D., & Hohmann, E. L. (2001). Nontyphoidal Salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 32(2), 263–269. www.cdc.gov/ncidod/dbmd/foodnet/

Anandabaskar, N. (2021). Protein synthesis inhibitors. An Introduction to basics of pharmacology and toxicology (pp. 835–868). <https://doi.org/10.1007/978-981-33-6009-9>

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>

Barker, C. A., Farha, M. A., & Brown, E. D. (2010). Chemical Genomic Approaches to Study Model Microbes. *Chemistry and Biology*, 17(6), 624–632. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.05.010>

Barrett, E. L., & Clark, M. A. (1987). Tetrathionate Reduction and Production of Hydrogen Sulfide from Thiosulfate. *Microbiological Reviews*, 51(2).

Beaudoin, T., Yau, Y. C. W., Stapleton, P. J., Gong, Y., Wang, P. W., Guttman, D. S., & Waters, V. (2017). *Staphylococcus aureus* interaction with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm enhances

tobramycin resistance. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0035-0>

Cain, A. K., Barquist, L., Goodman, A. L., Paulsen, I. T., Parkhill, J., & van Opijnen, T. (2020). A decade of advances in transposon-insertion sequencing. *Nature Reviews Genetics*, 21(9), 526–540. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0244-x>

Chatterjee, A., Modarai, M., Naylor, N. R., Boyd, S. E., Atun, R., Barlow, J., Holmes, A. H., Johnson, A., & Robotham, J. v. (2018). Quantifying drivers of antibiotic resistance in humans: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(12), e368–e378. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30296-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30296-2)

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2018). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Approved standard. Document M100.

de Keersmaecker, S. C. J., Verhoeven, T. L. A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., & Nagy, I. (2006). Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella* Typhimurium is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiology Letters*, 259(1), 89–96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00250.x>

French, S., Côté, J. P., Stokes, J. M., Truant, R., & Brown, E. D. (2017). Bacteria getting into shape: Genetic determinants of *E. coli* morphology. *MBio*, 8(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.01977-16>

French, S., Mangat, C., Bharat, A., Côté, J. P., Mori, H., & Brown, E. D. (2016). A robust platform for chemical genomics in bacterial systems. *Molecular Biology of the Cell*, 27(6), 1015–1025. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0573>

Fugère, A., Séguin, D. L., Mitchell, G., Déziel, E., Dekimpe, V., Cantin, A. M., Frost, E., & Malouin, F. (2014). Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients. *PLoS ONE*, *9*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086705>

Gomes, C., Martínez-Puchol, S., Palma, N., Horna, G., Ruiz-Roldán, L., Pons, M. J., & Ruiz, J. (2017). Macrolide resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*: Focus on azithromycin. *Critical Reviews in Microbiology*, *43*(1), 1–30. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1136261>

Hensel, M., Hinsley, A. P., Nikolaus, T., Sawers, G., & Berks, B. C. (1999). The genetic basis of tetrathionate respiration in *Salmonella* Typhimurium. *Molecular Microbiology*, *32*(2), 275–287.

Ibberson, C. B., Stacy, A., Fleming, D., Dees, J. L., Rumbaugh, K., Gilmore, M. S., & Whiteley, M. (2017). Co-infecting microorganisms dramatically alter pathogen gene essentiality during polymicrobial infection. *Nature Microbiology*, *2*. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.79>

Lau, J. T., Whelan, F. J., Herath, I., Lee, C. H., Collins, S. M., Bercik, P., & Surette, M. G. (2016). Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. *Genome Medicine*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0327-7>

Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, *28*(2), 337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., & Hoekstra, R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, *50*(6), 882–889. <https://doi.org/10.1086/650733>

Mitchell, G., Lalonde Séguin, D., Asselin, A.-E., Déziel, E., Cantin, A. M., Frost, E. H., Michaud, S., & Malouin, F. (2010). *Staphylococcus aureus* sigma B-dependent emergence of small-colony variants and biofilm production following exposure to *Pseudomonas aeruginosa* 4-hydroxy-2-heptylquinoline-N-oxide. *BMC Microbiology*, *10*(33) <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/33>

Mouratidou, A., Karbach, J., d'Hoedt, B., & Al-Nawas, B. (2011). Antibiotic Susceptibility of Cocultures in Polymicrobial Infections Such as Peri-Implantitis or Periodontitis: An In Vitro Model. *Journal of Periodontology*, *82*(9), 1360–1366. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.100657>

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, *399*(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G. J., ... Stevens, R. L. (2023). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*, *51*(D1), D678–D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>

O'Neill, J. (2016). Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations.

Pastar, I., Nusbaum, A. G., Gil, J., Patel, S. B., Chen, J., Valdes, J., Stojadinovic, O., Plano, L. R., Tomic-Canic, M., & Davis, S. C. (2013). Interactions of Methicillin Resistant

Staphylococcus aureus USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in Polymicrobial Wound Infection. *PLoS ONE*, 8(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056846>

Porwollik, S., Santiviago, C. A., Cheng, P., Long, F., Desai, P., Fredlund, J., Srikumar, S., Silva, C. A., Chu, W., Chen, X., Canals, R., Reynolds, M. M., Bogomolnaya, L., Shields, C., Cui, P., Guo, J., Zheng, Y., Endicott-Yazdani, T., Yang, H. J., ... McClelland, M. (2014). Defined single-gene and multi-gene deletion mutant collections in *Salmonella enterica* sv Typhimurium. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099820>

Radlinski, L., Rowe, S. E., Kartchner, L. B., Maile, R., Cairns, B. A., Vitko, N. P., Gode, C. J., Lachiewicz, A. M., Wolfgang, M. C., & Conlon, B. P. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts determine antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus*. *PLoS Biology*, 15(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003981>

Rao, S. S., Paolini, D., & Leppard, G. G. (1984). Effects of low-pH stress on the morphology and activity of bacteria from lakes receiving acid precipitation. *Hydrobiologica*, 114, 115–121.

Santos, R. L., Raffatellu, M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tükel, Ç., Tsolis, R. M., & Bäumlér, A. J. (2009). Life in the inflamed intestine, *Salmonella* style. *Trends in Microbiology*, 17(11), 498–506. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.08.008>

Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of Image Analysis HHS Public Access. *Nat Methods*, 9(7).

Sibinelli-Sousa, S., de Araújo-Silva, A. L., Hespanhol, J. T., & Bayer-Santos, E. (2021). Revisiting the steps of *Salmonella* gut infection with a focus on antagonistic interbacterial interactions. *The FEBS journal*, 289(14), 4192–4211. <https://doi.org/10.1111/febs.16211>

Smillie, C. S., Smith, M. B., Friedman, J., Cordero, O. X., David, L. A., & Alm, E. J. (2011). Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*, *480*(7376), 241–244. <https://doi.org/10.1038/nature10571>

The Pew Charitable Trusts. (2021). Tracking the global pipeline of antibiotics in development, March 2021. Retrieved from: <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/issue-briefs/2021/03/tracking-the-global-pipeline-of-antibiotics-in-development>

US Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>

van der Heijden, J., Reynolds, L. A., Deng, W., Mills, A., Scholz, R., Imami, K., Foster, L. J., Duong, F., & Finlay, B. B. (2016). *Salmonella* rapidly regulates membrane permeability to survive oxidative stress. *MBio*, *7*(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.01238-16>

Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>

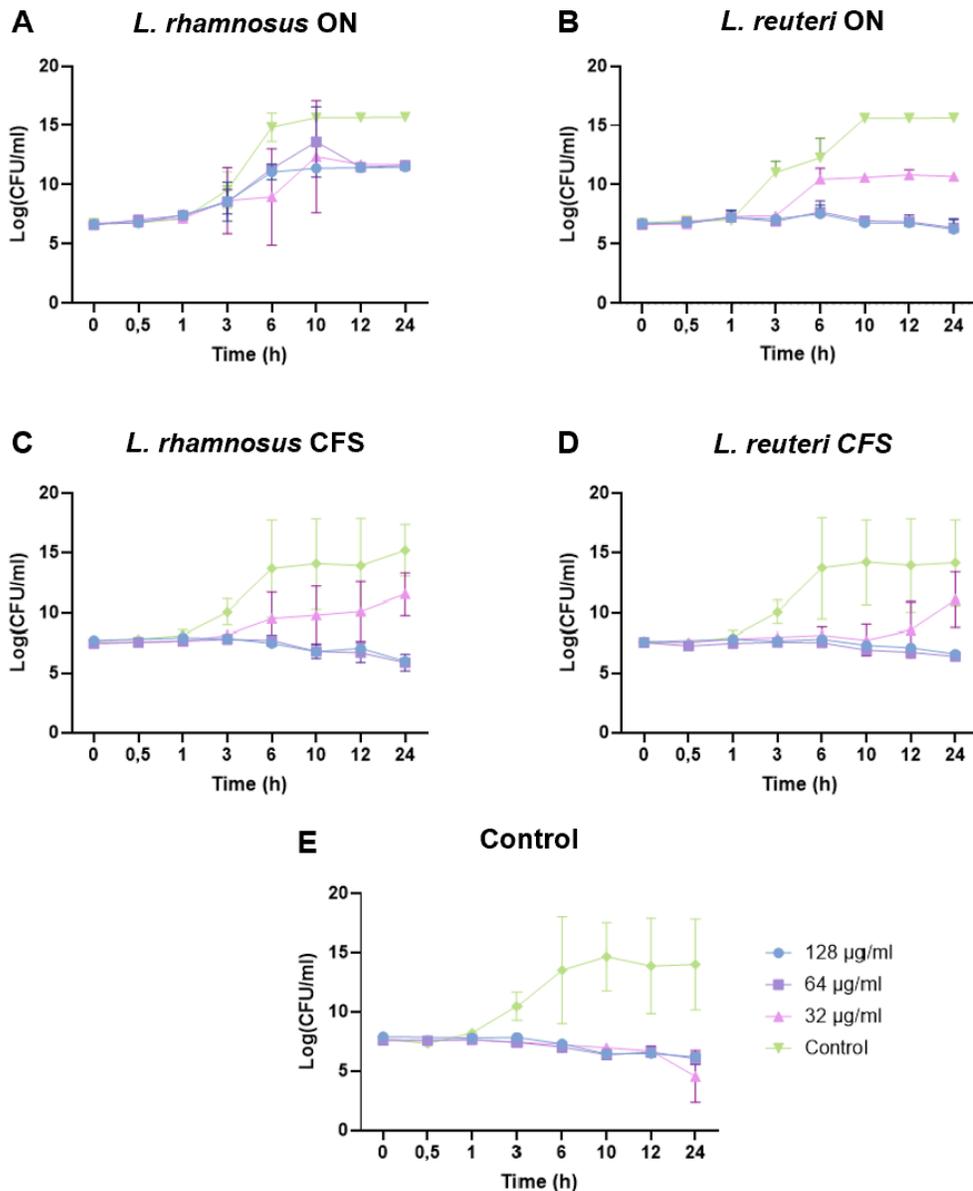
Winter, S. E., Thiennimitr, P., Winter, M. G., Butler, B. P., Huseby, D. L., Crawford, R. W., Russell, J. M., Bevins, C. L., Adams, L. G., Tsolis, R. M., Roth, J. R., & Bäumlner, A. J. (2010). Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for *Salmonella*. *Nature*, *467*(7314), 426–429. <https://doi.org/10.1038/nature09415>

World Health Organization. (2018, February 20). *Salmonella* (non-typhoidal). Retrieved from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

2.11 Supplementary Materials

Supplementary table 2.1. Changes observed in *Salmonella* Typhimurium's MIC when cocultured with various strains. The first row shows the reference MIC for *S. Typhimurium* alone against all antibiotics tested. ON is for overnight cultures, all other strains were diluted 1:1000.

Strains in combination with <i>S. Typhimurium</i>	MIC of <i>S. Typhimurium</i> in cocultures (µg/ml)												
	GEN	KAN	STR	MEM	AMP	CRO	CIP	NAL	AZM	ERY	COL	RIF	TET
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	8	16-32	32-64	≤0.25	4	≤0.25	≤0.25	4	4	>128	0.5-1	8	2
<i>B. adolescentis</i> L2-32									128		≤0.25		
<i>B. breve</i> HPH0326				0.5					64		0.5		
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> 2-2B									64		≤0.25		
<i>B. subtilis</i> 168							0.015						
<i>B. subtilis</i> 168 ON							0.015						
<i>E. aerogenes</i> UCI 15				2			≤0.015						
<i>E. coli</i> BW 25113 ON									16				
<i>E. coli</i> MS 110-3							0.015						
<i>E. coli</i> MS-110-3 ON							0.06						
<i>E. faecalis</i> HH22				1		0.12-0.25	0.06						32
<i>E. faecalis</i> HH22 ON													64
<i>E. faecalis</i> TX0104				0.03			0.125	8					32
<i>E. faecalis</i> TX0104 ON							0.125	32	64->128		4		32
<i>E. faecium</i> TX0082	64				4-16		0.06						8
<i>E. faecium</i> TX0082 ON							0.06						
<i>E. faecium</i> TX1330	32			1		0.015-0.06	0.06-0.12						
<i>K. oxytoca</i> MIT 10-5249							0.015						
<i>K. oxytoca</i> MIT 10-5249 ON							0.015						
<i>K. pneumoniae</i> WGLW1 ON									32-128			32	
<i>K. pneumoniae</i> WGLW3							0.03-0.015	4-8					32
<i>K. pneumoniae</i> WGLW3 ON							0.006						
<i>L. reuteri</i> CF48-3A							0.03		0.5-1	>64			16
<i>L. reuteri</i> CF48-3A ON									64	>128			16
<i>L. rhamnosus</i> LMS2-1						0.06	0.125	8	4				8
<i>L. rhamnosus</i> LMS2-1 ON						0.03		4	64-128	>128			8
<i>Pseudomonas</i> sp. 2_1_26								8					2
<i>Pseudomonas</i> sp. 2_1_26 ON									128				8
<i>Pseudomonas</i> sp. HPB0071							0.006						
<i>Pseudomonas</i> sp. HPB0071 ON							0.006						
<i>P. mirabilis</i> WGLW4							0.006-≤0.003						
<i>P. mirabilis</i> WGLW4 ON		>128	>128				0.015-≤0.003		>128	>128	>128		128
<i>P. mirabilis</i> WGLW6 ON		>128	>128						>128	>128	>128		32
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 130					128	0.12	0.06	8	16				
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> 130 ON							0.06						
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MN8					128	0.06		4-8					
<i>S. aureus</i> subsp. <i>aureus</i> MN8 ON									64-128			8	
<i>S. aureus</i> USA300 LAC							0.06						
<i>S. epidermidis</i> BCM-HMP0060							0.06						
<i>S. epidermidis</i> BCM-HMP0060 ON							0.06						
<i>S. haemolyticus</i> DNF00585							0.125						
<i>S. haemolyticus</i> DNF00585 ON							0.125						
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100							0.006						
<i>S. marcescens</i> ATCC 8100 ON							0.015						



Supplementary figure 2.1. Growth curves of *S. Typhimurium* with different concentrations of AZM and in the presence of *Lactobacillus* spp. Growth of *S. Typhimurium* under treatments of AZM was observed over 24 hours in the presence of either dense cultures (ON) or CFS of *Lactobacillus* strains. AZM treatments were of 128, 64, 32 or 0 $\mu\text{g/ml}$, the latest representing the control of each growth curve. The control growth curve is the growth of *S. Typhimurium* alone in the presence of AZM.

Supplementary table 2.2. MIC of azithromycin for *S. Typhimurium* in an acidic pH.

Strains tested	MIC of <i>S. Typhimurium</i> ($\mu\text{g/ml}$)	
	AZM	RIF
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	4	8
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028 in pH 5.5	32 - 64	8

MIC were performed in biological triplicates and technical duplicates.

Supplementary table 2.3-9. Complete hits genes and shared hits that were obtained from high-throughput experiments, their relative growth value and physiological GO Terms.

See Excel file. [Supplementary tables 2.3-9_LB.xlsx](#)

CHAPITRE 3

DISCUSSION ET CONCLUSION

3.1 Résumé des avancements et atteinte des objectifs

Le projet décrit dans ce mémoire visait à identifier puis caractériser des interactions entre le pathogène *S. Typhimurium* et des souches commensales pouvant être retrouvées à son site d'infection, le microbiote intestinal humain. Puisque le microbiote intestinal est un environnement contenant une densité élevée de microorganismes, la proximité entre les cellules favorise les interactions interbactériennes, comme par exemple l'échange de gènes de résistance aux composés antimicrobiens (Smillie et al., 2011). De ce fait, nous avons émis l'hypothèse que des interactions existent entre le pathogène *S. Typhimurium* et des souches du microbiote intestinal humain puisque pour s'établir et survivre au site d'infection, le pathogène doit nécessairement interagir avec les microorganismes commensaux de cette communauté complexe (Rogers et al., 2021).

Dans le but d'atteindre le premier objectif du projet qui était d'identifier des interactions entre *S. Typhimurium* et des souches du microbiote intestinal, de nombreuses combinaisons de souches ont été évaluées avec *S. Typhimurium* comme souche cible. Pour ce faire, une méthode de détermination de la CMI en coculture a été développée (figure 2.1A), permettant ainsi d'évaluer si la présence d'une souche partenaire affectait la susceptibilité du pathogène à différents traitements antibiotiques. L'hypothèse ici est qu'un changement dans la susceptibilité de *S. Typhimurium* à un antibiotique en présence d'un autre microorganisme est la conséquence d'une modification de l'état physiologique de la cellule. Une preuve de concept a d'abord été effectuée pour démontrer de la fiabilité des résultats obtenus de à cette nouvelle méthode, grâce à la combinaison de *S. aureus* 130 et *S. Typhimurium*. Lors de cette combinaison de souche, la CMI de *S. Typhimurium* contre l'AMP a augmenté à 128 µg/ml comparé à 8 µg/ml lorsque le pathogène était seul en présence de cet antibiotique (figure 2.1B). Dans ce cas, cette interaction

comporte une explication simple qui peut être retrouvée dans la littérature. La souche de *S. aureus* utilisée étant une souche SARM, elle comporte plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques comme la méticilline, la tétracycline et l'ampicilline (Olson et al., 2023). Ainsi, cette souche de *S. aureus* possède des enzymes, notamment des β -lactamases, lui permettant d'inactiver les molécules d'AMP dans le milieu (Pantosti et al., 2007). Ceci a donc permis à *S. Typhimurium* de croître à des concentrations plus élevées d'AMP, ce qui résulte en l'observation d'une diminution de sa susceptibilité à l'antibiotique grâce à cette méthode.

Suite à l'observation de nombreuses CMI en coculture (tableau supplémentaire 2.1), une certaine combinaison nous a particulièrement intéressée, soit *S. Typhimurium* en combinaison avec des souches probiotiques de *Lactobacillus* spp. issues de la communauté du microbiote intestinal humain. La présence de *Lactobacillus* spp. a causé une augmentation significative de la CMI de *S. Typhimurium* contre l'azithromycine. Initialement, la CMI du pathogène seul contre l'AZM était de 2 $\mu\text{g/ml}$. Cependant, en présence des souches de *Lactobacillus* spp. soit *L. rhamnosus* LMS2-1 ou *L. reuteri* CF48-3A, la CMI de *S. Typhimurium* face à l'AZM augmentait à 32 $\mu\text{g/ml}$, ce qui représentait une diminution de la susceptibilité du pathogène à l'AZM de 16 fois (figure 2.1C). Il est à noter que la souche de *S. Typhimurium* utilisée pour ce projet ne contient aucun gène de résistance aux antibiotiques (Alcock et al., 2020; Jarvik et al., 2010). Ceci élimine donc la possibilité que le changement de susceptibilité observé soit dû à des gènes de résistance à l'AZM. Ce phénomène de diminution de la susceptibilité de *S. Typhimurium* à l'AZM en présence de souches de *Lactobacillus* spp. n'a encore jamais été caractérisé. Une seule étude par Mouratidou *et al.* a mentionné un résultat similaire, soit un changement dans la susceptibilité de pathogènes oraux face à l'AZM en présence de d'autres souches du microbiote oral humain (Mouratidou et al., 2011). Spécifiquement, pour les 3 pathogènes étudiés, soit *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Capnocytophaga ochracea* & *Parvimonas micra*, toutes les combinaisons de souches démontraient une augmentation de la tolérance à l'AZM soit de valeurs de CMI inférieures à 2,5 $\mu\text{g/ml}$ augmentant à 256 $\mu\text{g/ml}$ suite aux combinaisons (Mouratidou et al., 2011). Cependant, l'équipe n'a pas investigué de façon plus approfondie l'occurrence de ce phénomène particulier. Ici, vu l'importance de l'AZM

comme antibiotique de dernier recours pour le traitement des infections à *S. Typhimurium* (US Centers for Disease Control and Prevention, 2019), nous n'avons pu ignorer l'observation de cette interaction particulière. De ce fait, l'interaction ici identifiée entre le pathogène et les souches probiotiques de *Lactobacillus* spp. a donc été sélectionnée pour être caractérisée au niveau génétique dans ce projet.

Dans le but de répondre au deuxième objectif du projet qui était de caractériser l'interaction entre le pathogène *S. Typhimurium* et les souches de *Lactobacillus* spp., plusieurs expériences ont été réalisées. Tout d'abord, dans le but de déterminer si l'élément clé de l'interaction était un produit de sécrétion des *Lactobacillus* spp., les surnageants stériles des souches probiotiques ont été récupérés puis combinés avec la souche pathogène d'intérêt en présence d'AZM (tableau 2.3). Plusieurs bactéries sécrètent des molécules dans le milieu extracellulaire qui vont influencer le comportement d'autres bactéries avoisinantes. Un exemple de ceci est le HQNO, une molécule liée au QS de *P. aeruginosa*, qui est donc sécrétée dans le milieu et qui induit une diminution de la susceptibilité de *S. aureus* à la ciprofloxacine (Radlinski et al., 2017). La combinaison des surnageants stériles de *L. rhamnosus* et *L. reuteri* avec *S. Typhimurium* a donc démontré qu'un métabolite sécrété par les souches de *Lactobacillus* spp était bel et bien responsable du phénotype observé. Suite à cette observation, des courbes de croissances de *S. Typhimurium* ont été effectuées en présence des souches partenaires, soit *L. reuteri* ou *L. rhamnosus*, et de différentes concentrations d'AZM (figure supplémentaire 2.1). Ceci avait pour but d'observer la mise en place de l'interaction dans le temps, et donc voir si le composé sécrété par *Lactobacillus* spp. prenait action à un moment spécifique dans la croissance de *S. Typhimurium*. Il a été observé que la reprise de croissance du pathogène en présence de l'AZM et des *Lactobacillus* semblait retardée de 2 à 4 heures de la croissance normale, ce qui suggère que la molécule permettant cette interaction agit entre les heures 2 et 6 de la croissance de *S. Typhimurium*. Pour tenter de déterminer le poids moléculaire de cette molécule clé, les surnageants stériles ont été fractionnés selon leur poids moléculaire (tableau 2.3). Ceci nous a permis de déterminer que le poids moléculaire de notre composé mystère était inférieur à 3 kDa, ce qui représente une petite molécule. Il est connu que le sécrétome des *Lactobacillus* peut avoir

un effet sur la croissance d'autres souches bactériennes. Par exemple, le surnageant stérile d'une souche spécifique de *L. rhamnosus* permet d'inhiber la croissance de *E. coli* et *S. aureus*, en augmentant notamment le taux de ROS à l'intérieur des cellules, ce qui induit la mort cellulaire (Peng et al., 2022). D'autres études ont également démontré l'activité des bactériocines, des molécules pouvant être produites par certaines souches de Lactobacilles. Entre autres, la bactériocine produite par *Lactobacillus salivarius* peut induire la mort cellulaire chez des souches d'*Enterococcus* spp. et même *Haemophilus influenzae* (Ocaña et al., 1999). On peut donc voir que différents produits de *Lactobacillus* spp. peuvent avoir des effets sur la croissance d'autres pathogènes. Cependant, suite à une recherche de littérature, les effets des Lactobacilles sur les susceptibilités d'autres souches bactériennes face à différents antibiotiques semblent être encore inconnues.

En revanche, il est connu que les souches de *Lactobacillus* sont des grands producteurs de composés acides, tels que l'acide lactique, l'acide formique, l'acide acétique et l'acide pyroglutamique (de Keersmaecker et al., 2006). Ainsi, le pH des surnageants stériles de *Lactobacillus* spp. a été mesuré et a été trouvé plus acide que le pH des cultures de *S. Typhimurium*. Pour évaluer l'importance d'un pH acide dans la mise en place de l'interaction ici étudiée, les surnageants stériles ont donc été neutralisés puis placés en combinaison avec le pathogène d'intérêt en présence d'AZM (figure 2.3, tableau 2.3). En présence des surnageants stériles neutralisés de *L. rhamnosus* ou *L. reuteri*, *S. Typhimurium* ne présentait aucun changement au niveau de sa CMI face à l'AZM lorsque comparé à la CMI du pathogène seul face à l'antibiotique. Ces résultats pourraient indiquer que l'acidité du milieu occasionnée par les souches de *Lactobacillus* est importante pour diminuer la susceptibilité de *S. Typhimurium* face à l'AZM. De façon assez intéressante, il a également été démontré que la CMI du pathogène seul face à l'AZM pouvait être modifiée de façon similaire à l'interaction en effectuant la méthode de détermination de la CMI en milieu acide (tableau supplémentaire 2.2). Ce résultat a donc été utilisé pour déterminer l'impact d'un pH acide sur l'importance des gènes non essentiels de *S. Typhimurium*. Il est d'ailleurs à noter que l'azithromycine est un antibiotique

stable aux pH acides ci-présents (Anandabaskar, 2021). L'effet d'augmentation de la tolérance du pathogène à l'AZM en pH acide n'est donc pas causée par une dégradation de l'antibiotique.

Il est bien connu que les Lactobacilles peuvent être utilisés comme souches probiotiques pour favoriser le traitement de certaines infections (Zhang et al., 2018). Cependant, ce rôle de probiotique est souvent ambigu dans la littérature. En effet certaines études prônent l'utilisation des probiotiques comme *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* ou *L. plantarum* chez les animaux et même les humains pour prévenir la colonisation par plusieurs pathogènes comme *E. coli* O157:H7 (Lema et al., 2001), *Salmonella* spp. (Gebru et al., 2010) et *Campylobacter jejuni* (Fooks & Gibson, 2003). Il aussi a été démontré que certaines souches peuvent favoriser la restauration du microbiote intestinal humain suite à un traitement antibiotique (Oh et al., 2016). Cependant, dans le traitement des maladies de l'intestin comme le syndrome du côlon irritable ou la maladie de Crohn, les traitements aux probiotiques ne donnent pas des résultats constants. Une étude par O'Sullivan & O'Morain a par exemple démontré que sur la cohorte de patients atteints du syndrome du côlon irritable, un traitement à *Lactobacillus casei* GG n'avait pas d'effet d'amélioration notable sur les symptômes de la maladie (O'Sullivan & O'Morain, 2000). D'un autre côté, une étude sur des patients atteints de la maladie de Crohn a démontré qu'un traitement avec un cocktail de souches probiotiques comme *Bifidobacterium longum* permettait une amélioration des symptômes chez les patients notamment en diminuant l'inflammation (Steed et al., 2010).

Avec toutes les informations recueillies sur l'interaction entre les souches probiotiques de *Lactobacillus* spp. et le pathogène *S. Typhimurium* à ce stade du projet, nous avons tenté de caractériser au niveau génique cette interaction. Pour ce faire, nous avons utilisé la collection de mutants de délétions simples de *S. Typhimurium*, la SGD, qui comprend une délétion de tous les gènes non-essentiels (Porwollik et al., 2014). Notre laboratoire étant équipé d'un robot répliqueur permettant de travailler à haut débit, il est donc facile de manipuler les ~3500 souches de la collection pour déterminer les gènes essentiels pour le phénotype observé. Le premier criblage à haut débit de la collection SGD a été effectué en présence de *L. rhamnosus* et d'une

concentration d'AZM à 128 µg/ml (figure 2.4A). Cette concentration d'AZM peut être tolérée uniquement par le pathogène lorsque *L. rhamnosus* est présent. Ceci veut donc dire que, pour les mutants de la SGD présentant un défaut de croissance, le gène délété est maintenant devenu essentiel à la survie de *S. Typhimurium* dans cette condition. Un criblage contrôle a également été effectué en combinant la SGD avec le probiotique sans la présence d'AZM afin d'évaluer l'effet de *L. rhamnosus* seul sur la SGD (figure 2.4B). De ce fait, un total de 359 gènes ont été tirés de cet essai à haute densité comme étant importants uniquement en présence de *L. rhamnosus* et d'AZM.

Un second criblage à haut débit a été effectué pour évaluer le rôle d'un pH acide lors de l'interaction ci-présente. Puisqu'il avait été démontré qu'un milieu acide seul pouvait causer une augmentation de la CMI de *S. Typhimurium* face à l'AZM, le criblage consistait à combiner la SGD avec 128 µg/ml d'AZM et un milieu de culture à pH 5.5 (figure 2.4C). Le pH du milieu a ainsi pu mimer celui occasionné par les souches de *Lactobacillus* spp.. Encore une fois, un criblage contrôle a été effectué pour cette concentration en évaluant l'effet d'un pH acide sans AZM sur la croissance des mutants de la collection SGD (figure 2.4D). Ainsi, un total de 153 gènes ont été déterminés comme étant importants pour *S. Typhimurium* en présence d'un pH acide et d'AZM. Par comparaison entre les deux essais à haute densité, 38 gènes ont été identifiés comme étant commun aux deux conditions de criblages testées, soit en présence de *L. rhamnosus* ou d'un pH acide et d'AZM (figure 2.5). Ces gènes ont donc pour l'instant été retirés de l'analyse de gènes d'intérêt pour les deux criblages effectués. Pour la condition en présence d'AZM et de *L. rhamnosus*, ceci nous laisse avec 321 gènes essentiels et uniques à cette condition (figure 2.5). Les gènes identifiés peuvent être regroupés dans plusieurs catégories. Une première catégorie est les gènes ayant un lien avec l'homéostasie du potentiel oxydatif-réducteur de la cellule ainsi que la chaîne de transport des électrons. Certains gènes de cette catégorie sont liés de façon plus précise aux derniers accepteurs d'électrons comme le tétrathionate (*cysP*, *glpE*, *phsB*, *trxA* & *trxB*) ou à la respiration anaérobie (*sdhA*, *sdhB*). D'autres gènes de cette catégorie sont notamment *atpG*, *cydB*, *cydC*, *ompA*, *ompC*, *ompR* et *yqjB*. Le fait que ces gènes présentent un défaut de croissance suite à la combinaison avec *L. rhamnosus* et

l'AZM pourrait indiquer que la combinaison affecte la respiration de *S. Typhimurium*, en forçant la cellule à passer à un mode de respiration anaérobie ou à modifier sa chaîne de transport des électrons. Un exemple de ce changement au niveau métabolique a pu être observé chez *S. aureus* en présence de *P. aeruginosa* (Filkins et al., 2015). Dans cette étude, il a été démontré que les exo-produits de *P. aeruginosa* induisaient un changement de la respiration aérobie vers la fermentation lactique chez *S. aureus*. Dans ce cas, ce changement était ensuite suivi d'une perte de viabilité de *S. aureus* mais cet exemple démontre tout de même qu'une souche peut définitivement induire un changement métabolique chez une souche partenaire. Dans une autre étude, il a été démontré que le bicarbonate pouvait affecter la susceptibilité aux antibiotiques de certains pathogènes via une modification de la chaîne de transport des électrons (Farha et al, 2018). Cette étude démontre que le bicarbonate permet d'augmenter l'efficacité de certains antibiotiques en perturbant la respiration cellulaire des cellules de *E. coli* ou *S. aureus*. De façon plus précise, le bicarbonate modifie la force proton motrice, ce qui a pour effet d'améliorer l'entrée des aminoglycosides, des macrolides et de certaines fluoroquinolones qui sont dépendantes de cette force pour rejoindre leur cible (Farha et al, 2018). Ainsi, il est possible que, suite à une modification de la chaîne de transport des électrons chez *S. Typhimurium* et donc de la force proton motrice, l'azithromycine (un macrolide) ait plus de difficulté à pénétrer les cellules, résultant en une plus grande tolérance du pathogène à cet antibiotique, tel qu'observé ici.

Une seconde catégorie de gènes pour ce criblage fait référence à la surface bactérienne. Plusieurs gènes ont été identifiés comme ayant un lien avec l'organisation du pili (*bcfB*, *fimC*, *lpfB*, *pefC*, *stdA*, *stfA*, *stfD*, *sthA*, *stjC* & *yrfC*), le transfert par conjugaison (*traA*, *traR*, *trbD* & *trbE*) ou la motilité (*flgJ*, *fliD* & *motB*). Ce groupe de gènes pourrait signifier que la combinaison modifie la surface bactérienne, ce qui pourrait avoir un impact sur l'entrée de l'AZM dans la cellule, d'où la diminution de susceptibilité à l'antibiotique observée chez *S. Typhimurium* en présence de *L. rhamnosus*. L'un des mécanismes de résistance possible à l'AZM est la modification de la perméabilité membranaire ou encore un changement dans l'expressions de pompes à efflux (Gomes et al., 2017; Li et al., 2015; Wilson, 2014). Il est donc possible que les gènes mentionnés

ci-haut puissent avoir un impact sur la structure membranaire des cellules de *S. Typhimurium*, et lorsqu'induit par la présence de *L. rhamnosus*, permettent d'augmenter la tolérance du pathogène à l'AZM. D'un autre côté, pour la condition avec pH acide et AZM, 86 gènes sont essentiels et uniques à cette condition (figure 2.5). Parmi les gènes identifiés pour ce criblage, une catégorie en particulier est fortement représentée et est également retrouvée dans le criblage en présence de *L. rhamnosus*. Ce groupe est celui ayant un lien avec la surface cellulaire, où les gènes *pal*, *dacA*, *yafK*, *yaiW*, *ybhC*, *stcB*, *fliE*, *yfgM*, *yeiH*, *yeiU*, *iron*, *yihD*, *yjiH*, *sapD* et *ssam* peuvent être retrouvés. Ces gènes sont différents de ceux identifiés dans le criblage avec *L. rhamnosus* mais font référence à un groupe important de gènes d'intérêt de ce criblage. Il est cependant à noter que parmi les gènes partagés entre les deux criblages, 4 gènes liés à la surface bactérienne ont été identifiés, soit *yceG*, *flgL*, *ybiS* et *cls*. De ceci, il pourrait donc être conclu que le pH joue un rôle important dans la diminution de la susceptibilité de *S. Typhimurium* à l'AZM en modifiant la surface bactérienne. Cependant, cette modification de la surface du pathogène est majoritairement différente de celle occasionnée par la souche probiotique *L. rhamnosus*. Comme expliqué plus haut, il est donc possible que la modification de la surface bactérienne soit la clé d'un changement de susceptibilité à l'AZM chez *S. Typhimurium* occasionné par *L. rhamnosus*.

Suite à l'obtention de tous ces résultats, une hypothèse a pu être émise sur un mécanisme possible de cette interaction particulière entre le pathogène *S. Typhimurium* et les souches probiotiques de *Lactobacillus* spp. En présence d'AZM. L'hypothèse la plus probable est que les souches probiotiques de *Lactobacillus* sécrètent un composé acide dans le milieu. Lorsque le pathogène *S. Typhimurium* est mis en présence de ce composé, en plus d'être soumis à un traitement à l'AZM, un changement d'expression des gènes survient et favorisent un remodelage de l'enveloppe bactérienne en diminuant notamment sa perméabilité. Ceci permet donc au pathogène de tolérer des concentrations plus élevées d'AZM puisque son entrée dans la cellule est diminuée par la présence d'un produit de sécrétion de *Lactobacillus* spp..

3.2 Perspectives

Suite à la caractérisation de l'interaction faisant sujet de ce mémoire, il est certain que d'autres étapes devront suivre pour confirmer le mécanisme ici suggéré. Comme mentionné plus haut, les souches de *Lactobacillus* spp. Sont connues pour produire une grande variété de produits acides (de Keersmaecker et al., 2006). Dans le but d'identifier si un composé acide en particulier est responsable de cette interaction, il serait intéressant de tester différents composés de synthèse chimique en présence du pathogène cible et d'AZM pour observer si un effet similaire à l'interaction avec les Lactobacilles peut être reproduit. Brièvement, une première expérience a déjà été effectuée avec l'un des produits acides les plus connus de *Lactobacillus* spp. Soit l'acide lactique. Cependant, lorsque l'acide lactique à différentes concentrations a été combiné avec *S. Typhimurium* en présence d'AZM, aucun effet n'a pu être observé sur la susceptibilité de *S. Typhimurium* face à l'antibiotique d'intérêt (résultats non inclus).

Un autre aspect de cette interaction qu'il serait intéressant de confirmer est la présence de changements visibles à la surface des cellules de *S. Typhimurium* suite à la combinaison avec *L. rhamnosus* ou *L. reuteri* et en présence d'AZM. En effet, puisque de nombreux gènes pouvant être reliés à la surface cellulaire ont été identifiés dans les criblages à haute densité effectués ici, l'observation par microscopie (notamment à transmission électronique) des cellules pourrait permettre de confirmer la théorie ici présentée du mécanisme impliqué dans cette interaction. Dans la littérature, de nombreuses études ont démontré que la morphologie cellulaire peut être affectée par la présence de différents composés retrouvés dans un milieu. Un exemple de ceci est avec *P. aeruginosa*, qui, en présence d'antibiotiques comme le méropénème prend une forme sphérique qui lui permet de tolérer de plus grandes concentrations d'antibiotique (Monahan et al., 2014). Aussi, chez le pathogène ici étudié, la polymyxine B peut avoir un effet similaire, où elle va induire l'apparition de bulbes à la surface cellulaire de *S. Typhimurium* (Schindler & Teuber, 1975). Il est donc clair que l'observation de la morphologie de *S. Typhimurium* suite à la combinaison pourrait nous donner un indice sur le mécanisme de cette interaction particulière.

Suite à l'étude de cette interaction et dans le but de la caractériser encore plus, il serait également intéressant de comparer les gènes identifiés dans le criblage à haut débit de la combinaison de *S. Typhimurium* et *L. rhamnosus* avec d'autres souche du microbiote intestinal humain. En effet, il a été observé que d'autres souches sont capables d'induire une diminution de la susceptibilité de *S. Typhimurium* face à l'AZM. Notamment, la présence de *Bifidobacterium adolescentis* L2-32, *Bifidobacterium breve* HPH0326 et *Bifidobacterium longum* subsp. *Longum* 2-2B permet d'augmenter la CMI de *S. Typhimurium* contre l'AZM de 4 µg/ml à 128, 64 et 64 µg/ml respectivement (figure supplémentaire 2.1). Pour étudier ces combinaisons en particulier, des criblages à haute densité pourraient être effectués en culture anaérobique. Des résultats similaires peuvent également être observés en combinant *S. Typhimurium* avec *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* et également *Staphylococcus aureus*. Pour cette dernière souche, il serait particulièrement intéressant d'étudier les caractéristiques de la combinaison avec *S. Typhimurium*. *S. aureus* (ici la souche USA300 LAC) est un pathogène d'intérêt majeur et très étudié au sein de la communauté scientifique. Nous avons donc trouvé intrigant d'observer une diminution de la susceptibilité de *S. Typhimurium* à l'AZM en présence de cette souche, soit de 4 µg/ml à 64 µg/ml (figure supplémentaire 2.1). Également, il a été observé que le pH d'une culture de *S. aureus* USA300 LAC était acide, de façon similaire aux cultures de *Lactobacillus* étudiées dans ce projet. Au laboratoire, la collection de mutants de délétions simples de gènes non essentiels de *S. aureus* USA300 LAC, la NTML (Fey et al., 2013), est à notre disposition. Il serait donc particulièrement intéressant d'utiliser cette collection en combinaison avec *S. Typhimurium* pour évaluer l'envers de l'interaction et ainsi déterminer quels gènes sont essentiels chez la bactérie partenaire pour causer un changement de susceptibilité chez *S. Typhimurium* face à l'AZM.

Également, pour poursuivre le projet, il serait intéressant d'étudier les interactions pouvant prendre place en présence d'autres traitements antibiotiques. Ici, seules les interactions en présence d'AZM ont été discutées puisque cet antibiotique en est un d'importance pour le traitement des infections à *S. Typhimurium* ainsi qu'à d'autres pathogènes d'origine alimentaire. Un exemple d'interaction qui pourrait être étudié dans ce cas serait suite à la combinaison de *S. Typhimurium* avec différentes souches du microbiote intestinal en présence de colistine. En

effet, il a déjà été observé que certaines souches comme *B. breve* permettent d'augmenter la susceptibilité de *S. Typhimurium* face à cet antibiotique. L'étude d'une telle interaction permettrait d'observer quels gènes sont affectés lorsqu'un effet d'augmentation de la susceptibilité du pathogène à un antibiotique est observé, contrairement à l'interaction faisant l'objet de ce mémoire. La comparaison entre les gènes essentiels lors de différents changements de susceptibilité aux traitements antibiotiques pourrait fournir une meilleure idée sur le fonctionnement et les différences entre ces différents types d'interaction.

3.3 Importance du projet

Ce projet avait pour but à long terme d'identifier des gènes essentiels à certaines conditions afin d'en faire de nouvelles cibles pour des traitements spécifiques. Ces nouveaux traitements permettraient ainsi de limiter l'utilisation des antibiotiques courants, ce qui favoriserait donc le ralentissement de la propagation des gènes de résistance aux antibiotiques. De plus, ce projet visait à mieux comprendre les interactions pouvant se produire entre un pathogène et les microorganismes commensaux retrouvés à son site d'infection. Puisque peu d'informations existent sur les interactions entre la majorité des microorganismes, ce projet participe donc à l'avancement des connaissances sur le sujet et démontre l'importance que peuvent avoir ces types d'interactions, notamment puisqu'elles peuvent modifier la susceptibilité des pathogènes à certains traitements antibiotiques courants ou de dernière ligne

BIBLIOGRAPHIE

Ababou, A., & Koronakis, V. (2016). Structures of Gate Loop Variants of the AcrB Drug Efflux Pump Bound by Erythromycin Substrate. *PloS one*, *11*(7), e0159154. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159154>

Abraham, E. P., & Chain, E. (1988). An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Reviews of Infectious Diseases*, *10*(4), 677–678.

Abukhattab, S., Taweel, H., Awad, A., Crump, L., Vonaesch, P., Zinsstag, J., Hattendorf, J., & Abu-Rmeileh, N. M. E. (2022). Systematic Review and Meta-Analysis of Integrated Studies on *Salmonella* and *Campylobacter* Prevalence, Serovar, and Phenotyping and Genetic of Antimicrobial Resistance in the Middle East—A One Health Perspective. *Antibiotics*, *11*(5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050536>

AbuOun, M., Suthers, P. F., Jones, G. I., Carter, B. R., Saunders, M. P., Maranas, C. D., Woodward, M. J., & Anjum, M. F. (2009). Genome scale reconstruction of a *Salmonella* metabolic model: Comparison of similarity and differences with a commensal *Escherichia coli* strain. *Journal of Biological Chemistry*, *284*(43), 29480–29488. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.005868>

Acar, J., & Röstel, B. (2001). Antimicrobial resistance: an overview. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, *20*(3), 797–810. <https://doi.org/10.20506/rst.20.3.1309>

Acheson, D., & Hohmann, E. L. (2001). Nontyphoidal Salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases*, *32*(2), 263–269. Consulté à : www.cdc.gov/ncidod/dbmd/foodnet/

Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A. L. v., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H. K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., ... McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: Antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 48(D1), D517–D525. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>

Amsden, G. W. (1996). Erythromycin, Clarithromycin, and Azithromycin: Are the Differences Real? *Clinical Therapeutics*, 18(1), 56–72. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0149-2918\(96\)80179-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0149-2918(96)80179-2)

Anandabaskar, N. (2021). *An Introduction to basics of pharmacology and toxicology: Protein synthesis inhibitors*. Springer Nature, 835–868. <https://doi.org/10.1007/978-981-33-6009-9>

Andrade, F. F., Silva, D., Rodrigues, A., & Pina-Vaz, C. (2020). Colistin update on its mechanism of action and resistance, present and future challenges. *Microorganisms*, 8(11), 1–12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111716>

Angelakis, E., Armougom, F., Carrière, F., Bachar, D., Laugier, R., Lagier, J. C., Robert, C., Michelle, C., Henrissat, B., & Raoult, D. (2015). A metagenomic investigation of the duodenal microbiota reveals links with obesity. *PloS ONE*, 10(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137784>

Appleton, J. (2018). The Gut-Brain Axis: Influence of Microbiota on Mood and Mental Health. *Integrative Medicine*, 17(4), 28–32.

Baba, T., Ara, T., Hasegawa, M., Takai, Y., Okumura, Y., Baba, M., Datsenko, K. A., Tomita, M., Wanner, B. L., & Mori, H. (2006). Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-

gene knockout mutants: The Keio collection. *Molecular Systems Biology*, 2. <https://doi.org/10.1038/msb4100050>

Bachmann, V., Kostiuk, B., Unterweger, D., Diaz-Satizabal, L., Ogg, S., & Pukatzki, S. (2015). Bile salts modulate the mucin-activated type vi secretion system of pandemic *Vibrio cholerae*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004031>

Bäumler, A. J., & Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 535(7610), 85–93. <https://doi.org/10.1038/nature18849>

Beaudoin, T., Yau, Y. C. W., Stapleton, P. J., Gong, Y., Wang, P. W., Guttman, D. S., & Waters, V. (2017). *Staphylococcus aureus* interaction with *Pseudomonas aeruginosa* biofilm enhances tobramycin resistance. *Npj Biofilms and Microbiomes*, 3(1). <https://doi.org/10.1038/s41522-017-0035-0>

Belina, D., Hailu, Y., Gobena, T., Hald, T., & Njage, P. M. K. (2021). Prevalence and epidemiological distribution of selected foodborne pathogens in human and different environmental samples in Ethiopia: a systematic review and meta-analysis. *One Health Outlook*, 3(1). <https://doi.org/10.1186/s42522-021-00048-5>

Brenner, F. W., Villar, R. G., Angulo, F. J., Tauxe, R., & Swaminathan, B. (2000). *Salmonella* Nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(7), 2465–2467. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.7.2465-2467.2000>

Brown, E. D., & Wright, G. D. (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature*, 529(7586), 336–343. <https://doi.org/10.1038/nature17042>

Butler, M. S., Gigante, V., Sati, H., Paulin, S., Al-Sulaiman, L., Rex, J. H., Fernandes, P., Arias, C. A., Paul, M., Thwaites, G. E., Czaplewski, L., Alm, R. A., Lienhardt, C., Spigelman, M., Silver, L. L., Ohmagari, N., Kozlov, R., Harbarth, S., & Beyer, P. (2022). Analysis of the Clinical Pipeline of Treatments for Drug-Resistant Bacterial Infections: Despite Progress, More Action Is Needed. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(3), e01991-21.

Cho, J. C., Zmarlicka, M. T., Shaeer, K. M., & Pardo, J. (2018). Meropenem/Vaborbactam, the First Carbapenem/ β -Lactamase Inhibitor Combination. *Annals of Pharmacotherapy*, 52(8), 769–779. <https://doi.org/10.1177/1060028018763288>

Chopra, I., & Roberts, M. (2001). Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 65(2), 232–260. <https://doi.org/10.1128/mubr.65.2.232-260.2001>

Comroe J. H., J. (1978). Pay dirt: the story of streptomycin. Part I. From Waksman to Waksman. *The American Review of Respiratory Disease*, 117(4), 773–781.

Côté, J. P., French, S., Gehrke, S. S., MacNair, C. R., Mangat, C. S., Bharat, A., & Brown, E. D. (2016). The genome-wide interaction network of nutrient stress genes in *Escherichia coli*. *mBio*, 7(6). <https://doi.org/10.1128/mBio.01714-16>

Davies, J., & Davis, B. D. (1968). Misreading of Ribonucleic Acid Code Words Induced by Aminoglycoside Antibiotics. *Journal of Biological Chemistry*, 243(12), 3312–3316. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)93308-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)93308-9)

Davies, J., Jones, D. S., & Knorana, H. G. (1966). A further study of misreading of codons induced by streptomycin and neomycin using ribopolynucleotides containing two nucleotides in alternating sequence as templates. *Journal of Molecular Biology*, 18(1), 48–57. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(66\)80075-X](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(66)80075-X)

De Berardinis, V., Vallenet, D., Castelli, V., Besnard, M., Pinet, A., Cruaud, C., Samair, S., Lechaplais, C., Gyapay, G., Richez, C., Durot, M., Kreimeyer, A., le Fèvre, F., Schächter, V., Pezo, V., Döring, V., Scarpelli, C., Médigue, C., Cohen, G. N., ... Weissenbach, J. (2008). A complete collection of single-gene deletion mutants of *Acinetobacter baylyi* ADP1. *Molecular Systems Biology*, 4. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.10>

De Keersmaecker, S. C. J., Verhoeven, T. L. A., Desair, J., Marchal, K., Vanderleyden, J., & Nagy, I. (2006). Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella* Typhimurium is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiology Letters*, 259(1), 89–96. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00250.x>

Djukovic, A., Garzón, M. J., Canlet, C., Cabral, V., Lalaoui, R., García-Garcerá, M., Rechenberger, J., Tremblay-Franco, M., Peñaranda, I., Puchades-Carrasco, L., Pineda-Lucena, A., González-Barberá, E. M., Salavert, M., López-Hontangas, J. L., Sanz, M., Sanz, J., Kuster, B., Rolain, J. M., Debrauwer, L., ... Ubeda, C. (2022). *Lactobacillus* supports *Clostridiales* to restrict gut colonization by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Nature Communications*, 13(1), 5617. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33313-w>

Dorsey, C. W., Raffatellu, M., Kingsley, R. A., & Bäumler, A. J. (2005). Mechanisms of *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Intestinal Colonization. *J. P. Nataro, P. S. Cohen, H. L. T. Mobley, & J. N. Weiser (Eds.), Colonization of Mucosal Surfaces*, 301–312. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/9781555817619.ch21>

Farha, M. A., French, S., Stokes, J. M., & Brown, E. D. (2018). Bicarbonate Alters Bacterial Susceptibility to Antibiotics by Targeting the Proton Motive Force. *ACS infectious diseases*, 4(3), 382–390. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.7b00194>

Fey, P. D., Endres, J. L., Yajjala, V. K., Widhelm, T. J., Boissy, R. J., Bose, J. L., & Bayles, K. W. (2013). A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes. *mBio*, 4(1). <https://doi.org/10.1128/mBio.00537-12>

Filkins, L. M., Graber, J. A., Olson, D. G., Dolben, E. L., Lynd, L. R., Bhujju, S., & O'Toole, G. A. (2015). Coculture of *Staphylococcus aureus* with *Pseudomonas aeruginosa* drives *S. aureus* towards fermentative metabolism and reduced viability in a cystic fibrosis model. *Journal of Bacteriology*, 197(14), 2252–2264. <https://doi.org/10.1128/JB.00059-15>

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), 226–236.

Fooks, L. J., & Gibson, G. R. (2003). Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. *Anaerobe*, 9(5), 231–242. [https://doi.org/10.1016/S1075-9964\(03\)00043-X](https://doi.org/10.1016/S1075-9964(03)00043-X)

Foulds, G., Shepard, R. M., & Johnson, R. B. (1990). The pharmacokinetics of azithromycin in human serum and tissues. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 25(Suppl A), 73–82. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jac/25.suppl_a.73

French, S., Mangat, C., Bharat, A., Côté, J.-P., Mori, H., & Brown, E. D. (2016). A robust platform for chemical genomics in bacterial systems. *Molecular biology of the cell*, 27(6), 1015–1025. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-08-0573>

Fugère, A., Séguin, D. L., Mitchell, G., Déziel, E., Dekimpe, V., Cantin, A. M., Frost, E., & Malouin, F. (2014). Interspecific small molecule interactions between clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* from adult cystic fibrosis patients. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086705>

Gal-Mor, O., Boyle, E. C., & Grassl, G. A. (2014). Same species, different diseases: How and why typhoidal and non-typhoidal *Salmonella enterica* serovars differ. *Frontiers in Microbiology*, 5(AUG). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00391>

Gebbru, E., Lee, J. S., Son, J. C., Yang, S. Y., Shin, S. A., Kim, B., Kim, M. K., & Park, S. C. (2010). Effect of probiotic-, bacteriophage-, or organic acid-supplemented feeds or fermented soybean meal on the growth performance, acute-phase response, and bacterial shedding of grower pigs challenged with *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Journal of Animal Science*, 88(12), 3880–3886. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-2939>

Gomes, C., Martínez-Puchol, S., Palma, N., Horna, G., Ruiz-Roldán, L., Pons, M. J., & Ruiz, J. (2017). Macrolide resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*: Focus on azithromycin. *Critical Reviews in Microbiology*, 43(1), 1–30. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2015.1136261>

Gu, S., Chen, D., Zhang, J. N., Lv, X., Wang, K., Duan, L. P., Nie, Y., & Wu, X. L. (2013). Bacterial Community Mapping of the Mouse Gastrointestinal Tract. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074957>

Harrison, C. J., & Bratcher, D. (2008). Cephalosporins: A Review. *Pediatrics in Review*, 29(8), 264–273. <https://doi.org/https://doi.org/10.1542/pir.29-8-264>

Hernando-Amado, S., Coque, T. M., Baquero, F., & Martínez, J. L. (2020). Antibiotic Resistance: Moving From Individual Health Norms to Social Norms in One Health and Global Health. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01914>

Hicks, L. A., Bartoces, M. G., Roberts, R. M., Suda, K. J., Hunkler, R. J., Taylor, T. H., & Schrag, S. J. (2015). US outpatient antibiotic prescribing variation according to geography,

patient population, and provider specialty in 2011. *Clinical Infectious Diseases*, 60(9), 1308–1316. <https://doi.org/10.1093/cid/civ076>

Honort, N., & Cole, S. T. (1994). Streptomycin Resistance in Mycobacteria. *ASM Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(2), 238–242.

Hooda, Y., Sajib, M. S. I., Rahman, H., Luby, S. P., Bondy-Denomy, J., Santosham, M., Andrews, J. R., Saha, S. K., & Saha, S. (2019). Molecular mechanism of azithromycin resistance among typhoidal *Salmonella* strains in Bangladesh identified through passive pediatric surveillance. *PLoS neglected tropical diseases*, 13(11), e0007868. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007868>

Hooper, L. v., Stappenbeck, T. S., Hong, C. v., & Gordon, J. I. (2003). Angiogenins: A new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nature Immunology*, 4(3), 269–273. <https://doi.org/10.1038/ni888>

Hu, Y., He, Y., Nguyen, S. v., Liu, C., Liu, C., Gan, X., Wang, W., Dong, Y., Xu, J., Li, F., & Fanning, S. (2022). Antimicrobial resistance of *Salmonella* Indiana from retail chickens in China and emergence of an *mcr-1*-harboring isolate with concurrent resistance to ciprofloxacin, cefotaxime, and colistin. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.955827>

Huttenhower, C., Gevers, D., Knight, R., Abubucker, S., Badger, J. H., Chinwalla, A. T., Creasy, H. H., Earl, A. M., Fitzgerald, M. G., Fulton, R. S., Giglio, M. G., Hallsworth-Pepin, K., Lobos, E. A., Madupu, R., Magrini, V., Martin, J. C., Mitreva, M., Muzny, D. M., Sodergren, E. J., ... White, O. (2012). Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486(7402), 207–214. <https://doi.org/10.1038/nature11234>

Jacobson, A., Lam, L., Rajendram, M., Tamburini, F., Honeycutt, J., Pham, T., van Treuren, W., Pruss, K., Stabler, S. R., Lugo, K., Bouley, D. M., Vilches-Moure, J. G., Smith, M., Sonnenburg, J. L., Bhatt, A. S., Huang, K. C., & Monack, D. (2018). A Gut Commensal-Produced Metabolite Mediates Colonization Resistance to *Salmonella* Infection. *Cell Host and Microbe*, 24(2), 296-307.e7. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.07.002>

Jarvik, T., Smillie, C., Groisman, E. A., & Ochman, H. (2010). Short-term signatures of evolutionary change in the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium 14028 genome. *Journal of Bacteriology*, 192(2), 560–567. <https://doi.org/10.1128/JB.01233-09>

Kapoor, G., Saigal, S., & Elongavan, A. (2017). Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology*, 33(3), 300–305. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15

Koenig, J. E., Spor, A., Scalfone, N., Fricker, A. D., Stombaugh, J., Knight, R., Angenent, L. T., & Ley, R. E. (2011). Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *PNAS*, 108(SUPPL. 1), 4578–4585. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000081107>

Lebeer, S., Vanderleyden, J., & de Keersmaecker, S. C. J. (2008). Genes and Molecules of Lactobacilli Supporting Probiotic Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(4), 728–764. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00017-08>

Lema, M., Williams, L., & Rao, D. R. (2001). Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. *Small Ruminant Research*, 39, 31–39.

Lewis, K. (2012). Antibiotics: recover the lost art of drug discovery. *Nature*, 485, 439–440.

Li, X. Z., Plésiat, P., & Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337–418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>

Lomovskaya, O., Sun, D., Rubio-Aparicio, D., Nelson, K., Tsivkovski, R., Griffith, D. C., & Dudley, M. N. (2017). Vaborbactam: Spectrum of beta-lactamase inhibition and impact of resistance mechanisms on activity in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(11). <https://doi.org/10.1128/AAC.01443-17>

Majowicz, S. E., Musto, J., Scallan, E., Angulo, F. J., Kirk, M., O'Brien, S. J., Jones, T. F., Fazil, A., & Hoekstra, R. M. (2010). The global burden of nontyphoidal *Salmonella* gastroenteritis. *Clinical Infectious Diseases*, 50(6), 882–889. <https://doi.org/10.1086/650733>

Malouin, F., & Bryan, L. E. (1986). Modification of Penicillin-Binding Proteins as Mechanisms of B-Lactam Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 30(1), 1–5.

Martin, F. P. J., Dumas, M. E., Wang, Y., Legido-Quigley, C., Yap, I. K. S., Tang, H., Zirah, S., Murphy, G. M., Cloarec, O., Lindon, J. C., Sprenger, N., Fay, L. B., Kochhar, S., van Bladeren, P., Holmes, E., & Nicholson, J. K. (2007). A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Molecular Systems Biology*, 3. <https://doi.org/10.1038/msb4100153>

Martínez, J. L. (2012). Bottlenecks in the transferability of antibiotic resistance from natural ecosystems to human bacterial pathogens. *Frontiers in Microbiology*, 2(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2011.00265>

Meynell, G. G. (1963). Antibacterial mechanisms of the mouse gut. II. The role of Eh and volatile fatty acids in the normal gut. *British Journal of Experimental Pathology*, 44(2), 209–219.

Monahan, L. G., Turnbull, L., Osvath, S. R., Birch, D., Charles, I. G., & Whitchurch, C. B. (2014). Rapid conversion of *Pseudomonas aeruginosa* to a spherical cell morphotype facilitates tolerance to carbapenems and penicillins but increases susceptibility to antimicrobial peptides. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), 1956–1962. <https://doi.org/10.1128/AAC.01901-13>

Mouratidou, A., Karbach, J., d’Hoedt, B., & Al-Nawas, B. (2011). Antibiotic Susceptibility of Cocultures in Polymicrobial Infections Such as Peri-Implantitis or Periodontitis: An In Vitro Model. *Journal of Periodontology*, 82(9), 1360–1366. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.100657>

Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 4(2), 464–472. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.vmbf-0016-2015>

Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629–655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)

Ng, K. M., Ferreyra, J. A., Higginbottom, S. K., Lynch, J. B., Kashyap, P. C., Gopinath, S., Naidu, N., Choudhury, B., Weimer, B. C., Monack, D. M., & Sonnenburg, J. L. (2013). Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens. *Nature*, 502(7469), 96–99. <https://doi.org/10.1038/nature12503>

Oates, J. A., Wood, A. J. J., Donowitz, G. R., & Mandell, G. L. (1988). Beta-Lactam Antibiotics. *New England Journal of Medicine*, 318(7), 419–426. <https://doi.org/10.1056/NEJM198802183180706>

Ocaña, V. S., Ocaña, O., Ai, A., De, A. A. P., Holgado, R., Mari'a, M. M., Nader-Maci'as, E., & Maci'as, M. (1999). Characterization of a Bacteriocin-Like Substance Produced by a Vaginal *Lactobacillus salivarius* Strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(12). <https://doi.org/10.1128/AEM.65.12.5631-5635.1999>

Oh, B., Kim, B. S., Kim, J. W., Kim, J. S., Koh, S. J., Kim, B. G., Lee, K. L., & Chun, J. (2016). The Effect of Probiotics on Gut Microbiota during the *Helicobacter pylori* Eradication: Randomized Controlled Trial. *Helicobacter*, 21(3), 165–174. <https://doi.org/10.1111/hel.12270>

Olson, R. D., Assaf, R., Brettin, T., Conrad, N., Cucinell, C., Davis, J. J., Dempsey, D. M., Dickerman, A., Dietrich, E. M., Kenyon, R. W., Kuscuoglu, M., Lefkowitz, E. J., Lu, J., Machi, D., Macken, C., Mao, C., Niewiadomska, A., Nguyen, M., Olsen, G. J., ... Stevens, R. L. (2023). Introducing the Bacterial and Viral Bioinformatics Resource Center (BV-BRC): a resource combining PATRIC, IRD and ViPR. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D678–D689. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1003>

O'Neill, J. (2016). Tackling Drug-resistant Infections Globally: Final Report and Recommendations.

O'Sullivan, J. N., Rea, M. C., O'Connor, P. M., Hill, C., & Ross, R. P. (2019). Human skin microbiota is a rich source of bacteriocin-producing staphylococci that kill human pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 95(2). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy241>

O'Sullivan, M. A., & O'Morain, C. A. (2000). Bacterial supplementation in the irritable bowel syndrome. A randomised doubleblind placebo-controlled crossover study. *Digestive and Liver Disease*, 32(4), 294–301. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1590-8658\(00\)80021-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1590-8658(00)80021-3)

Pantosti, A., Sanchini, A., & Monaco, M. (2007). Mechanisms of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 2(3), 323–334. <https://doi.org/10.2217/17460913.2.3.323>

Peechakara, B. v., Basit, H., & Gupta, M. (2022). Ampicillin. In StatPearls. StatPearls Publishing. Consulté à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK519569/>

Peng, H., Zhou, G., Yang, X.-M., Chen, G.-J., Chen, H.-B., Liao, Z.-L., Zhong, Q.-P., Wang, L., Fang, X., & Wang, J. (2022). Transcriptomic Analysis Revealed Antimicrobial Mechanisms of *Lactobacillus rhamnosus* SCB0119 against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(23), 15159. <https://doi.org/10.3390/ijms232315159>

Porwollik, S., Santiviago, C. A., Cheng, P., Long, F., Desai, P., Fredlund, J., Srikumar, S., Silva, C. A., Chu, W., Chen, X., Canals, R., Reynolds, M. M., Bogomolnaya, L., Shields, C., Cui, P., Guo, J., Zheng, Y., Endicott-Yazdani, T., Yang, H. J., ... McClelland, M. (2014). Defined single-gene and multi-gene deletion mutant collections in *Salmonella enterica* sv Typhimurium. *PLoS ONE*, 9(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099820>

Radlinski, L., Rowe, S. E., Kartchner, L. B., Maile, R., Cairns, B. A., Vitko, N. P., Gode, C. J., Lachiewicz, A. M., Wolfgang, M. C., & Conlon, B. P. (2017). *Pseudomonas aeruginosa* exoproducts determine antibiotic efficacy against *Staphylococcus aureus*. *PLoS Biology*, 15(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003981>

Rinninella, E., Raoul, P., Cintoni, M., Franceschi, F., Miggiano, G. A. D., Gasbarrini, A., & Mele, M. C. (2019). What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7(1). <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010014>

Rogers, A. W. L., Tsohis, R. M., & Bäumlér, A. J. (2021). *Salmonella* versus the Microbiome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 85(1). <https://doi.org/10.1128/mnbr.00027-19>

Sajib, M. S. I., Tanmoy, A. M., Hooda, Y., Rahman, H., Andrews, J. R., Garrett, D. O., Endtz, H. P., Saha, S. K., & Saha, S. (2021). Tracking the emergence of azithromycin resistance in multiple genotypes of typhoidal *Salmonella*. *mBio*, 12(1), 1–12. <https://doi.org/10.1128/mBio.03481-20>

Schindler, P. R. G., & Teuber, M. (1975). Action of Polymyxin B on Bacterial Membranes: Morphological Changes in the Cytoplasm and in the Outer Membrane of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 8(1). American Society for Microbiology. <https://journals.asm.org/journal/aac>

Sela, D. A., Chapman, J., Adeuya, A., Kim, J. H., Chen, F., Whitehead, T. R., Lapidus, A., Rokhsar, D. S., Lebrilla, C. B., German, J. B., Price, N. P., Richardson, P. M., & Mills, D. A. (2008). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *PNAS*, 105(48), 18964–18969.

Shivali, P., Preuss, C. v., & Bernice, F. (2022). Vancomycin. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing. Consulté à: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459263/>

Sibinelli-Sousa, S., de Araújo-Silva, A. L., Hespanhol, J. T., & Bayer-Santos, E. (2021). Revisiting the steps of *Salmonella* gut infection with a focus on antagonistic interbacterial interactions. *FEBS Journal*, 289(14), 4192–421. <https://doi.org/10.1111/febs.16211>

Smillie, C. S., Smith, M. B., Friedman, J., Cordero, O. X., David, L. A., & Alm, E. J. (2011). Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. *Nature*, 480(7376), 241–244. <https://doi.org/10.1038/nature10571>

Spratt, B. G. (1977). Temperature-Sensitive Cell Division Mutants of *Escherichia coli* with Thermolabile Penicillin-Binding Proteins. *Journal of Bacteriology*, 131(1), 293–305.

Spratt, B. G. (1980). Biochemical and genetical approaches to the mechanism of action of penicillin. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 289(1036), 273–283. <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0045>

Steed, H., MacFarlane, G. T., Blackett, K. L., Bahrami, B., Reynolds, N., Walsh, S. v., Cummings, J. H., & MacFarlane, S. (2010). Clinical trial: The microbiological and immunological effects of synbiotic consumption - A randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 32(7), 872–883. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2010.04417.x>

Taber, H. W., Mueller, J. P., Miller, P. F., & Arrow, A. S. (1987). Bacterial Uptake of Aminoglycoside Antibiotics. *Microbiological Reviews*, 51(4), 439–457.

Telenti, A., Imboden, P., Marchesi, F., Matter, L., Schopfer, K., Bodmer, T., Lowrie, D., Colston, M. J., & Cole, S. (1993). Detection of rifampicin-resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *The Lancet*, 341(8846), 647–651. [https://doi.org/doi:10.1016/0140-6736\(93\)90417-f](https://doi.org/doi:10.1016/0140-6736(93)90417-f)

Thai, T., Salisbury, B. H., & Zito, P. M. (2022). Ciprofloxacin. In StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing.

The Pew Charitable Trusts. (2021). Tracking the global pipeline of antibiotics in development, March 2021. Consulté à : <https://www.pewtrusts.org/en/research-and-analysis/issue-briefs/2021/03/tracking-the-global-pipeline-of-antibiotics-in-development>

Theriot, C. M., Koenigsnecht, M. J., Carlson, P. E., Hatton, G. E., Nelson, A. M., Li, B., Huffnagle, G. B., Li, J. Z., & Young, V. B. (2014). Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4114>

Tipper, D. J., & Strominger, J. L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *PNAS*, 54(4), 1133–1141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.54.4.1133>

Tritton, T. R. (1977). Ribosome-tetracycline interactions. *Biochemistry*, 16(18), 4133–4138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/bi00637a029>

Trivedi, N. A., & Shah, P. C. (2012). A meta-analysis comparing the safety and efficacy of azithromycin over the alternate drugs used for treatment of uncomplicated enteric fever. *Journal of Postgraduate Medicine*, 58(2), 112–118.

Tuo, Y., Song, X., Song, Y., Liu, W., Tang, Y., Gao, Y., Jiang, S., Qian, F., & Mu, G. (2018). Screening probiotics from *Lactobacillus* strains according to their abilities to inhibit pathogen adhesion and induction of pro-inflammatory cytokine IL-8. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 4822–4829. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13654>

Turnbaugh, P. J., Ley, R. E., Hamady, M., Fraser-Liggett, C. M., Knight, R., & Gordon, J. I. (2007). The Human Microbiome Project. *Nature*, 449(7164), 804–810. <https://doi.org/10.1038/nature06244>

US Centers for Disease Control and Prevention. (2019). Antibiotic resistance threats in the United States. <https://doi.org/10.15620/cdc:82532>

Vidal, M., Forestier, C., Charbonnel, N., Henard, S., Rabaud, C., & Lesens, O. (2010). Probiotics and intestinal colonization by vancomycin-resistant enterococci in mice and humans. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(7), 2595–2598. <https://doi.org/10.1128/JCM.00473-10>

Wang, X., Zhang, P., & Zhang, X. (2021). Probiotics Regulate Gut Microbiota: An Effective Method to Improve Immunity. *Molecules*, 26(6076). <https://doi.org/10.3390/molecules26196076>

Watanabe, T. (1963). Ineffective Heredity of Multiple Drug Resistance in Bacteria. *Bacteriological Reviews*, 27(1), 87–115. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/br.27.1.87-115>

Wehrli, W. (1983). Rifampin: Mechanisms of Action and Resistance. *Reviews of Infectious Diseases*, 5(Suppl 3), S407–S411. https://doi.org/https://doi.org/10.1093/clinids/5.supplement_3.s407

Werner, V., Sanders, C. C., Sanders, W. E., & Goering, R. v. (1985). Role of B-Lactamases and Outer Membrane Proteins in Multiple-Lactam Resistance of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27(4), 455–459.

Wilson, D. N. (2014). Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3155>

Wise, E. M. J., & Park, J. T. (1965). Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. *PNAS*, 54(1), 75–81. <https://doi.org/https://doi.org/10.1073/pnas.54.1.75>

World Health Organization. (2017). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Consulté à : <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>

World Health Organization. (2018, February 20). *Salmonella* (non-typhoidal). Consulté à : [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-\(non-typhoidal\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/salmonella-(non-typhoidal))

Xie, M., Chen, K., Chan, E. W. chi, & Chen, S. (2022). Identification and genetic characterization of two conjugative plasmids that confer azithromycin resistance in *Salmonella*. *Emerging Microbes and Infections*, *11*(1), 1049–1057. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2058420>

Zhang, Z., Lv, J., Pan, L., & Zhang, Y. (2018). Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *102*(19), 8135–8143. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9217-9>

